



EGE ÜNİVERSİTESİ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PİYASADA SATIŞA SUNULAN HAYVAN
YEMLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ASPERGILLUS*
TÜRLERİNDE RİBOTOKSİN ÜRETİMİNDEN
SORUMLU GEN BÖLGESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bahar MİDİLLİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 31.05.2018

Bornova-İzmir

2018

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PİYASADA SATIŞA SUNULAN HAYVAN
YEMLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ASPERGILLUS*
TÜRLERİNDE RİBOTOKSİN ÜRETİMİNDEN
SORUMLU GEN BÖLGESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bahar MİDİLLİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 31.05.2018

Bornova-İzmir

2018



Bahar MIDİLLİ tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak sunulan “Piyasada Satışa Sunulan Hayvan Yemlerinden İzole Edilen *Aspergillus* Türlerinde Ribotoksin Üretiminden Sorumlu Gen Bölgesinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 31.05.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile başarılı bulunmuştur.

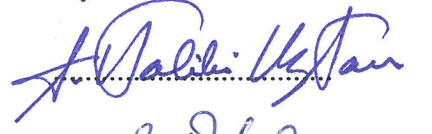
Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR

Raportör Üye : Doç. Dr. Alev HALİKİ UZTAN

Üye : Doç. Dr. Evrim ÖZKALE KAYA


.....

.....

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca **Yüksek Lisans Tezi** olarak sunduğum **“Piyasada Satışa Sunulan Hayvan Yemlerinden İzole Edilen *Aspergillus* Türlerinde Ribotoksin Üretiminden Sorumlu Gen Bölgesinin Araştırılması”** başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

31/05/2018

Bahar MİDİLLİ



ÖZET**PİYASADA SATIŞA SUNULAN HAYVAN YEMLERİNDEN
İZOLE EDİLEN *ASPERGILLUS* TÜRLERİNDE RİBOTOKSİN
ÜRETİMİNDEN SORUMLU GEN BÖLGESİNİN ARAŞTIRILMASI**

MİDİLLİ, Bahar

Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR

Mayıs 2018, 102 Sayfa

Çalışmamızın amacı piyasada satışa sunulan hayvan yemlerinden izole edilen *Aspergillus* genusuna ait türlerde ribotoksin gen bölgesinin varlığının araştırılmasıdır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde ribotoksin üretici funguslar arasında *Aspergillus* genusuna ait türlerin fazlalığı dikkati çekmektedir. Ribotoksinler, protein sentezi inhibisyonuna ve apoptozis ile hücre ölümüne yol açan, 28S rRNA'nın büyük ölçüde korunmuş sarcin/ricin domainindeki fosfodiester bağ üzerinde oldukça spesifik bir nükleolitik aktivite sergileyen ribozom inaktive edici proteinlerin bir ailesidir.

Çalışmamızda Ege Bölgesinde büyükbaş ve küçükbaş hayvan yemi satan yerlerden alınan 16 hayvan yemi örneği kullanılmıştır. Bu yem örneklerinden izole edilen fungusların tümünün fenotipik yöntemler ile tanısı yapılmış ve bunlardan 27 adet *Aspergillus* genusuna ait izolatın tanısı genotipik yöntemler ile doğrulanmıştır. Genotipik tanı amacıyla, funguslarda korunmuş gen bölgesi olan ITS gen bölgesi için spesifik universal primerler olan ITS1 ve ITS4 primerlerinin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyon (PCR) yöntemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri dizi analizine gönderilmiştir. Analizden gelen sekans sonuçları Finch TV (Blast) ve ApE programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Tür tayini, araştırmacıların kullanımına açık olan Gen Bankası'nın <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (NCBI) web sayfasında, nükleotid dizilerinin kıyaslanarak benzerliklerinin incelenmesi ile yapılmıştır. Bu

incelemeler sonucunda 27 *Aspergillus* izolatında 13 farklı *Aspergillus* türü tespit edilmiştir.

Genotipik olarak tanısı yapılan tüm *Aspergillus* suşlarında ribotoksin gen bölgesinin varlığını araştırmak amacıyla, funguslarda ribotoksin gen bölgesi için spesifik olduğu belirtilen KQ1-KQ2 primerleri ile PCR yapılmıştır. Elde edilen tüm ürünlerin sekans analizi yapılmış ve NCBI sayfasında sonuçlar incelenmiştir. Sonuçta 27 izolattan bir *Aspergillus clavatus* türünde mitogillin ailesinden cytotoxin clavin/c-sarcin ve bir *Aspergillus fumigatus* türünde mitogillin ailesinden Asp1 ribotoksin gen bölgesi varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca ribotoksin gen bölgesine spesifik primerlerle yapılan PCR sonrasında *Aspergillus aculeatus* türünde elde edilen PCR ürününün dizi analizi sonuçlarına göre *Aspergillus aculeatus* hypothetical proteine ait kısmi mRNA ile %95 dizi homolojisi gösterdiği saptanmıştır. Her geçen gün yeni ribotoksin çeşitlerinin keşfedildiği düşünülürse ileride yapılacak çalışmalar bu protein bölgesinin de ribotoksinlerle bağlantısı olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Ribotoksin, , *Aspergillus*, Fungal toksinler, Hayvan yemi

ABSTRACT**RESEARCHING OF GENE REGION RESPONSIBLE FOR
RIBOTOXIN PRODUCTION IN *ASPERGILLUS* SPECIES
ISOLATED FROM ANIMAL FEED IN THE MARKET**

MİDİLLİ, Bahar

MSc in Biology

Thesis Manager: Assoc. Prof. Özlem ABACI GÜNYAR

MAY 2018, 102 Pages

The aim of study is researching gene region responsible for ribotoxin production in *Aspergillus* species which belongs to the genus *Aspergillus* isolated from animal feed in the market. When the studies are examined, among the ribotoxin producing fungi, the excess of species belonging *Aspergillus* genus is remarkable. Ribotoxins are a family of ribosome inactivator proteins which have a fairly high specific activity against the phosphodiester bond of the sarcin/ricin loop universally preserved in 28S rRNA, leading to protein synthesis inhibition and cell death by apoptosis.

In our study, 16 animal feed taken from places which selling cattle and sheep feed in Aegean Region were used. All of the fungi isolated from these feed samples were identified by phenotypic methods, and the identification of the 27 isolates belonging to *Aspergillus* genus was confirmed by genotypic methods. For the genotypic diagnosis, the polymerase chain reaction (PCR) method was performed using the universal primers ITS1 and ITS4 which spesific for the ITS gene region conserved in the fungus. The resulting PCR products were submitted for sequence analysis. Sequence results from the analysis were evaluated using Finch TV (Blast) and ApE program. The species identification was made by examining the similarities of the nucleotide sequences in the Gene Bank's <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (NCBI) website, which is open to the use of researchers. As a result of these researchs, 13 different *Aspergillus* species were detected in 27 *Aspergillus* isolates.

In order to research the presence of the ribotoxin gene region in all genotypically identified *Aspergillus* strains, PCR was performed with KQ1-KQ2 primers that were specific for the ribotoxin gene region in the fungi. Sequence analysis of all the obtained products was carried out and the results were examined on the NCBI page. As a result, the presence of mitogillin family cytotoxin clavin / c-sarcin gene region in an *Aspergillus clavatus* species and the presence of mitogillin family Asp1 ribotoxin gene region in an *Aspergillus fumigatus* species from 27 *Aspergillus* isolates. In addition, it was determined that 95% sequence homology with the partial mRNA of *Aspergillus aculeatus* hypothetical protein was shown by the sequence analysis of the PCR product obtained from the *Aspergillus aculeatus* strain after PCR with the primers specific to the ribotoxin gene region. Considering that new ribotoxin varieties are being discovered every passing day, future studies suggest that this protein region may also be linked to ribotoxins.

Key words: Ribotoxin, *Aspergillus*, Fungal toxins, Animal feed

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım günden itibaren bana destek olan, beni yönlendiren, hiçbir zaman yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr.Özlem ABACI GÜNYAR’a teşekkür ederim.

Denemelerim sırasında desteklerini esirgemeyen Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarı arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Bu aşamaya gelirken, her zaman yanımda yer alan, her konuda benden maddi, manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme ve dostlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fon Saymanlığı tarafından desteklenmiştir (2016 Fen 026). Bu nedenle, ayrıca Araştırma Fonu Yönetim Kuruluna teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	IX
TEŞEKKÜR.....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XVII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XX
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XXI
1.GİRİŞ.....	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ.....	5
2.1.Fungal Sekonder Metabolitler.....	5
2.2. Fungal Ribotoksinler.....	7
2.2.1. α -sarcin.....	9
2.2.2.Restrictocin.....	9
2.2.3.Hirsutellin A.....	10
2.2.4.Mitogillin.....	11
2.2.5.Aspf 1.....	11
2.2.6.Gigantin.....	12
2.2.7. Ageritin.....	12
2.2.8. Anisoplin.....	13
2.2.9. C-sarcin/Clavin.....	13
2.3. Ribotoksinlerin Yapısı.....	14
2.4. Ribotoksinlerin Etki Mekanizması.....	17
2.5. Ribotoksin Üreticisi Funguslar.....	21

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa No

3. MATERYAL ve METOD.....	23
3.1. MATERYAL.....	23
3.1.1. Araştırma Materyali.....	23
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanması.....	23
3.1.3. Tampon ve Çözeltiler.....	28
3.1.3.1. Fenotipik Tanılamada Kullanılan Çözeltiler.....	28
3.1.3.2. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	29
3.1.3.3. PCR İşleminde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	30
3.1.3.4. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	30
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Ekipmanlar.....	31
3.1.5. Referans Suş.....	32
3.2. METOD.....	32
3.2.1. Yem Örneklerinin Seyreltilmesi ve Toplam Küf Sayımı.....	32
3.2.1.1. Dökme Plaka Yöntemiyle Toplam Küf Sayımı.....	32
3.2.2. Saflaştırma İşlemleri.....	33
3.2.3. Fenotipik Tanı	34
3.2.4. <i>Aspergillus</i> Genusu Üyelerinin Genotipik Tanısı.....	34
3.2.4.1. DNA İzolasyonu.....	34
3.2.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	35
3.2.4.3. Total DNA'ların Görüntülenmesi ve Miktar Tayini.....	35
3.2.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	35
3.2.5. <i>Aspergillus</i> Türlerinde Ribotoksin Gen Bölgesinin Aranması.....	38
3.2.6. DNA Dizi Analizi ve Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	39

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa No

4. BULGULAR.....	40
4.1. Genel Bulgular.....	40
4.2. Yem Örneklerinden İzole Edilen <i>Aspergillus</i> Türleri.....	42
4.2.1. Yem Örneklerinden İzole Edilen <i>Aspergillus</i> Türlerinin Sistematigi.....	43
4.3. <i>Aspergillus</i> Türlerinin Fenotipik Tayini.....	44
4.3.1. <i>Aspergillus clavatus</i> Desm. 1834.....	44
4.3.2. <i>Aspergillus flavus</i> Link 1809.....	46
4.3.3. <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen 1863.....	49
4.3.4. <i>Aspergillus niger</i> Tiegh., 1867	51
4.3.5. <i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh. 1877.....	54
4.3.6. <i>Aspergillus sydowii</i> Thom & Church 1926.....	56
4.3.7. <i>Aspergillus terreus</i> Thom, 1918.....	59
4.3.8. <i>Aspergillus amstelodami</i> , L. Mangin, 1908.....	61
4.4. Genotipik Tanı İle Belirlenen Türlerin Fenotipik Özellikleri.....	64
4.4.1. <i>Aspergillus aculeatus</i> Iizuka 1953.....	64
4.4.2. <i>Aspergillus brasiliensis</i> Varga, Frisvad & Samson 2007.....	66
4.4.3. <i>Aspergillus pseudoglaucus</i> Blochwitz 1929.....	68
4.4.4. <i>Aspergillus ruber</i> Thom & Church 1926.....	70

İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa No**

4.4.5. <i>Aspergillus tritici</i> B.S. Mehrotra & M. Basu 1976.....	72
4.5. <i>Aspergillus</i> Türlerinin Genotipik Tayini.....	73
4.5.1. ITS Gen Bölgesi Sonuçları.....	73
4.6. <i>Aspergillus</i> Türlerinde Ribotoksin Gen Bölgesinin Varlığının Aranması.....	74
4.7. ITS ve Ribotoksin Gen Bölgeleri Dizi Analizi Sonuçları.....	75
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	78
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	91
ÖZGEÇMİŞ.....	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. α -sarcin üç boyutlu yapısı.....	15
Şekil.2.2. Restrictocin üç boyutlu yapısı.....	15
Şekil 2.3. Hirsutellin A üç boyutlu yapısı.....	15
Şekil 2.4. RNaz T1 ve α -sarcin üç boyutlu yapıları.....	16
Şekil 2.5. α -sarcin ve Hirsutellin üç boyutlu yapılarının üst üste bindirilmiş karşılaştırması	17
Şekil 2.6. SRL üç boyutlu yapısı.....	18
Şekil 2.7. α -sarcin üç boyutlu yapısında Tyr 48, His 50, His 137, Arg 121, Glu 96 ve Leu 145 bölgelerinin yeri.....	19
Şekil 4.1. <i>Aspergillus clavatus</i> CYA25, CYA37, MEA, CZ ve CY20S besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler.....	45
Şekil 4.2. <i>Aspergillus clavatus</i> (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia.....	46
Şekil 4.3 <i>Aspergillus flavus</i> CYA25, CYA37, MEA, CZ ve CY20S besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler.....	48
Şekil 4.4. <i>Aspergillus flavus</i> (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia.....	48
Şekil 4.5. <i>Aspergillus fumigatus</i> CYA25, CYA37, MEA, CZ ve CY20S besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler.....	49
Şekil 4.6. <i>Aspergillus fumigatus</i> (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia.....	50
Şekil 4.7. <i>Aspergillus niger</i> CYA25, CYA37, MEA, CZ ve CY20S besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler.....	53
Şekil 4.8. <i>Aspergillus niger</i> (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Biseriat sterigmata, (B) Konidia.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.9. <i>Aspergillus ochraceus</i> CYA25, CYA37, MEA, CZ ve CY20S besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler.....	55
Şekil 4.10. <i>Aspergillus ochraceus</i> (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Biseriat sterigmata, (B) Konidia.....	56
Şekil 4.11. <i>Aspergillus sydowii</i> CYA25, CYA37, MEA, CZ ve CY20S besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler.....	58
Şekil 4.12. <i>Aspergillus sydowii</i> (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia.....	58
Şekil 4.13. <i>Aspergillus terreus</i> CYA25, CYA37, MEA, CZ ve CY20S besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler.....	60
Şekil 4.14. <i>Aspergillus terreus</i> (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Biseriat sterigmata, (B) Konidia.....	61
Şekil 4.15. <i>Aspergillus amstelodami</i> CYA25, CYA37, MEA, CZ ve CY20S besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler.....	63
Şekil 4.16. <i>Aspergillus amstelodami</i> (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia.....	63
Şekil 4.17. <i>Aspergillus aculeatus</i> CYA25, CYA37, MEA, CZ ve CY20S besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler.....	65
Şekil 4.18. <i>Aspergillus aculeatus</i> (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia.....	65
Şekil 4.19. <i>Aspergillus brasiliensis</i> CYA25, CYA37, MEA, CZ ve CY20S besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler.....	67
Şekil 4.20. <i>Aspergillus brasiliensis</i> (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia.....	67
Şekil 4.21. <i>Aspergillus pseudoglaucus</i> CYA25, CYA37, MEA, CZ ve CY20S besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler.....	69
Şekil 4.22. <i>Aspergillus pseudoglaucus</i> (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia.....	69

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.23. <i>Aspergillus ruber</i> CYA25, CYA37, MEA, CZ ve CY20S besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler.....	71
Şekil 4.24. <i>Aspergillus ruber</i> (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia.....	71
Şekil 4.25. <i>Aspergillus tritici</i> CYA25, CYA37, MEA, CZ ve CY20S besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler.....	72
Şekil 4.26. <i>Aspergillus tritici</i> (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia.....	73
Şekil 4.27. <i>Aspergillus</i> suşlarının ITS gen bölgesi amplifikasyon ürünleri JelGörüntüsü.....	73
Şekil 4.28. <i>Aspergillus</i> suşlarının ITS gen bölgesi amplifikasyon ürünleri JelGörüntüsü(devam).....	74
Şekil 4.29. KQ1-KQ2 gen bölgesi amplifikasyon ürünleri Jel Görüntüsü.....	74
Şekil 4.30. KQ1-KQ2 gen bölgesi amplifikasyon ürünleri Jel Görüntüsü (devam).....	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa No</u>
3.1. PCR tüpüne sırasıyla koyulan bileşikler ve miktarları.....	37
3.2. Amplifikasyonun sağlandığı PCR koşulları.....	37
3.3. PCR tüpüne sırasıyla koyulan bileşikler ve miktarları.....	38
3.4. Amplifikasyonun sağlandığı PCR koşulları.....	39
4.1. Yem örneklerinden izole edilen küflerin sayıları (kob/gr).....	40
4.2. Yem Örneklerinde Saptanan Türler	41
4.3. Yem Örneklerinde Saptanan Türler (devam).....	42
4.4. ITS ve Ribotoksin Gen Bölgeleri Amplifikasyon Ürünlerinin Dizi Analizi Sonuçları.....	76
4.5. ITS ve Ribotoksin Gen Bölgeleri Amplifikasyon Ürünlerinin Dizi Analizi Sonuçları (devam).....	77

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
FIPs	: Fungal immün modülatör proteinler
RNaz	: Ribonükleazlar
RIP	: Ribozomu inaktive eden proteinler
SRL	: Sarcin/ricin loop
HtA	: Hirsutellin A
mAb	: Monoklonal antikor
DG18	: Dichloran Glycerol Agar
CYA	: Czapek Yeast Agar
MEA	: Malt Extract Agar
CZ	: Czapek Dox Agar
CY20S	: %20 Sukrozlu Czapek Yeast Agar
G25N	: %25 Glycerol Nitruate Agar
CSN	: Nötral Kreatin Sukroz Agar
TBE	: Tris Borik Asit Edta
DSMZ	: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DON	: Deoksinivalenol
DBA	: Diamond-Blackfan Anemi
SDS	: Schwachman-Diamond Sendromu
TCS	: Treacher Collins Sendromu
ABPA	: Alerjik bronkopulmoner Aspergillozis
UV	: Ultraviyole
NO	: Nitrik oksit
iNOS	: İndüklenebilir nitrit oksit sentezi
IBD	: İnflamatuvar bağırsak hastalığı



1. GİRİŞ

Funguslar, kimyasal olarak çeşitlilik arz eden ve biyolojik olarak ilginç küçük molekülleri üretebilen biyosentetik açıdan yetenekli organizmalardır. Fungal ürünlere olan bilimsel ilgi ilaç uygulamaları, çok yönlü ekolojik fonksiyonları ve mikotoksinler olarak rolleri üzerine odaklanmıştır (Williams et al., 2008).

Günümüzde bir buçuk milyon fungus türünden yalnızca yüz bin kadarı sınıflandırılmıştır. Funguslar, sadece organik maddenin ayrıştırıcısı olarak değil aynı zamanda biyojeokimyasal döngülerde ve birçok gıda ağında kritik bir rol oynadığı için de yeryüzü ekosistemleri açısından çok önemlidir. Bu türler, gıda üretimi, medikal anlamda çok önemli farmasötik ajanların elde edilmesi ve biyoteknolojik enzim kaynakları olmaları gibi nedenlerle yoğun ilgi çekmektedirler. Öte yandan, funguslar, insan ve bitki hastalıklarına ve gıda bozulmalarına neden olan başlıca grup oldukları için ayrıca önem taşımaktadırlar (Landi et al., 2017).

Funguslar enzim, polisakkarit, alkol, pigment, probiyotik, lipid ve glikolipid, fermente içecek, biyo-yakıtların üretimi gibi birçok endüstriyel işlemde kullanılır. Bu ürünlerin bazıları ticari olarak kullanılırken bazıları da biyoteknolojik uygulamalarda kullanılır (Akkara ve Tosun, 2014; Kavanagh, 2011). Tıbbi özellikleri düşünüldüğünde funguslar, antikanser, antiviral, hepatoprotektif, immunopotansif ve hipokolesterolemik aktiviteler için tamamlayıcı tıp/diyet takviyeleri olarak kullanılabilir. Ayrıca lakkazlar, lektinler, fungal immün modülatör proteinler (FIPs), antimikrobiyal proteinler, ribonükleazlar (RNazlar), ribozomu inaktive eden proteinler (RIP'ler) ve ribotoksinler gibi birçok biyoaktif peptid ve/veya protein üretmektedirler. Özellikle, RNazlar, RIP' ler ve ribotoksinler, organizmayla ilişkiye geçtiğinde hastalığa sebep olan patojenik ajanlar olmalarının yanında, terapötik maddeler, antikanser terapisinde immünotoksinler ve tarım alanındaki zararlılarla mücadelede kullanılmaları nedeniyle çok sayıda çalışmaya konu olmuştur (Rohlf and Churchill, 2011; Landi et al., 2017).

Hayvan yemleri bir veya birden fazla bitkisel kökenli hammaddenin karışımından meydana gelmiş karma yemlerdir. Hayvan yemlerinin üretiminde kullanılan ürünler yem yapımına kadar geçen sürede depolanarak bekletilir. Ayrıca üretilen hayvan yemleri de paketleme süresine kadar depolanmaktadır. Tüm bu bekleme süresi ve depolanma koşulları, yemi oluşturan ürünlere hasattan depolanma sürecine kadar olan zamanda bulaşmış olan fungal sporların gelişimine olanak tanımaktadır (Ergül, 2008). Yemlerde gelişim gösteren funguslar sıcaklık, nem gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak sekonder metabolitleri üretirler. Sekonder metabolitler hem bu yemleri doğrudan tüketen hayvanları hem de dolaylı olarak hayvansal gıdaları tüketen insanların sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (Losada et al., 2009 ; Tiryaki vd., 2011).

Canlıların metabolik faaliyetleri sonucu oluşan ürünlerine metabolit denir. Büyüme, gelişme ve çoğalma için gerekli olan maddeler primer metabolitlerdir. Ekspansiyon fazının sonunda üretilen, düşük molekül ağırlıklı doğal bileşiklere ise sekonder metabolitler denilmektedir (Brakhage and Schroeckh, 2011; Cantürk, 2015). Sekonder metabolitler, uçucu alarm feromonları, birçok böcekte cinsel çekim, yırtıcılara karşı savunma gibi salgılayıcı organizmaya göre değişiklik gösteren pekçok değişik fonksiyon sergilemektedir. Ancak pekçoğunun biyolojik fonksiyonu henüz tam olarak tespit edilememiştir (Hansson, 2013).

Funguslar sekoder metabolitler açısından çok zengin bir kaynak oluşturmaktadır ve bu nedenle büyük bir ilgi kaynağı olmuşlardır. Günümüze kadar binlerce fungal sekonder metabolit izole edilmiştir. Fungal sekonder metabolitlerden biri olan mikotoksinler, büyük ilgi görmektedir ve bu alanda çok miktarda çalışma yapılmaktadır. Günümüzde 400'den fazla türün mikotoksin ürettiği bilinmektedir. Yiyecek ve yemlere mikotoksin bulaşması dünya genelinde önemli bir problemdir. Mikotoksinlerin, insanlar ve hayvanlar üzerinde canlılığın türüne ve duyarlılığına bağlı olarak çeşitli akut ve kronik etkileri vardır. Mikotoksin üreten funguslarının çoğunluğu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria* cinsleri içinde yer almaktadır (Hussein and Brasel, 2001; Öksüztepe ve Erkan, 2016; Tunail, 2000).

Ribotoksinler, protein sentezi inhibisyonuna ve apoptozis ile hücre ölümüne yol açan, 28S rRNA'daki büyük ölçüde korunmuş sarcin/ricin

domainindeki bir fosfodiester bağ üzerinde oldukça spesifik bir nükleolitik aktivite sergileyen ribozom inaktive edici proteinlerin bir ailesidir (Gasset et al. 1994; Kao and Davies, 1995).

Ribotoksinler de hayvan yemlerinde bulunan funguslarca üretilen potansiyellerinden dolayı hayvan ve insan sağlığına ciddi zararlar verebilecek fungal sekonder metabolitlerdir. 1956' da antibiyotik ve antitümör ajanlar aramak için başlatılan Michigan Sağlık Bakanlığına ait bir tarama programı sırasında keşfedilmişlerdir. Bu toksini üreten fungus *Aspergillus giganteus* MDH 18894 olarak tanımlanmış ve bu etkilere sebep olan molekülün **α -sarcin** adında bir protein olduğu belirlenmiştir (Olson and Goerner, 1965).

Ribozom inaktive edici proteinler çeşitli biyolojik alemlerde belirlenmiştir;

- ricin, abrin, modeccin, trichosanthin, agrostin, saporin, ebulin bitkilerden,
- α -sarcin, restrictosin, mitogillin, Aspf1, hirsutellin A, ageritin, anisoplin, c-sarcin/clavin, gigantin funguslardan,
- shiga toxin, verotoxin, tricholin bakterilerden elde edilmiştir.

Fungal ribotoksinler filamentöz funguslar tarafından üretilen tek hücre dışı ribonükleazlar değildir ama tek sitotoksik aktivite gösterenlerdir. Ribotoksinler ribonükleolitik aktivitelerini ribozomun büyük RNA molekülü üzerinde uyguladıkları için oldukça spesifiktirler (Olombrada et al., 2017).

Ribotoksinleri *Aspergillus* genusundan funguslar çoğunlukta olmak üzere *Penicillium* genusundan birkaç fungus türü ve *Hirsutella thompsonii*, *Metarhizium anisopliae* gibi bazı entomopatojen funguslar da üretir (Martinez-Ruiz et al., 1999; Hwu et al., 2001; Lacadena et al., 2007; Herrero-Galan et al., 2008). *Aspergillus giganteus* MDH 18894 türünde α -sarcinin keşfinden sonra ribotoksin üretiminin *A. restrictus* NRRL 2869 tarafından da yapıldığı görülmüş ve bu ribotoksine de **restrictocin** adı verilmiştir (Yang and Kenealy 1992; Lopez- Otin et al., 1984).

Sonraki çalışmalarda başka ribotoksin çeşitleri belirlenmiştir. Bunlar **mitogillin, gigantin, c-sarcin/ clavin, hirsutellin A, anisoplin ve ageritin**'dir. α -

sarcin, restrictocin ve Aspfl en yaygın şekilde karakterize edilen ribotoksinlerdir (Lacadena et al., 2007, Olombrada et al., 2016, 2017; Landi et al., 2017).

Ribotoksinler tüm aile içerisinde korunmuş 2 disülfid köprüsü de dahil olmak üzere oldukça yüksek benzerlik gösteren 149-150 amino asitten oluşan proteinlerdir (Herrero-Galan et al., 2009). Ribotoksinler arasında hirsutellin A ve anisoplin hariç %85 amino asit sekans benzerliği olduğu bulunmuştur (Martinez-ruiz et al., 1999b). Katalitik mekanizmaları üzerinde çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalar sonucunda guanly-spesifik RNazlarla benzerlikleri tespit edilmiştir. Bu bağlamda, ribotoksinler özel biyolojik aktiviteleri olan ribonükleazların diğer bir örneğidir. Bu proteinlerin diğer tipik RNazlar ile ortak bir atadan evrimleşmiş olabileceği düşünülmektedir (Lamy and Davies, 1992; Kao and Davies, 1995; Martinez-ruiz et al., 1999a; Olombrada et al., 2017). Ancak ribotoksinler daha büyük proteinlerdir ve guanly-spesifik RNazlarda bulunmayan ekstra düğümler içermektedirler. Bu yapıların, ribotoksinlerin RNazlardan farklı katalitik spesifiteye sahip olması ve membranları bozup geçme yeteneğinde olmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Martinez-Ruiz et al., 1999a; Olombrada et al., 2017).

Hayvan yemlerinde ribotoksin üreticisi fungusların bulunması, ribotoksinlerin yüksek toksisitesi sebebiyle insan ve hayvan sağlığı açısından risk teşkil etmektedir (Lacadena et al., 2007). Çünkü ribotoksinlerin bu yemleri tüketen hayvanları ve dolaylı olarak bu hayvanlardan elde edilen gıda ürünleriyle beslenen insanları ne şekilde etkileyeceği öngörülememektedir. Çalışmamızda piyasada satışa sunulan hayvan yemlerinde bulunan küflerin ribotoksin üretiminden sorumlu gen bölgesini taşıma potansiyellerini araştırmayı hedefledik. Bu sayede ülkemizdeki yemlerin ihtiva ettiği funguslar ve bu yemlerin ribotoksin bulundurması ile ilgili bir fikir elde edinebilecektir. Ayrıca ribotoksin üretiminden sorumlu gen bölgesine sahip yeni türlerin keşfedilmesinin ribotoksinlerle ilgili yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağına inanmaktayız.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1.Fungal Sekonder Metabolitler

Canlıların metabolik faaliyetleri sonucu oluşan ürünlerine metabolit denir. Primer metabolitler büyüme, gelişme ve çoğalma için gerekli olan maddelerdir. Primer metabolitlerin sentezi sırasında oluşan ara metabolitlerden üretilen metabolitlere ise sekonder metabolitler denilir (Keller et al., 2005, Cantürk, 2015).

Sekonder metabolizmanın enzimolojisi, genetiği ve kontrolü üzerine yapılan daha detaylı çalışmalar bu metabolitlerin üretimlerinin sadece çevreye atılan atık ürünler gibi önemsiz bir şey olmadığını onaylamaktadır. Çünkü sekonder metabolitlerin üretiminde gerçek bir genetik ve enerji maliyeti bulunmaktadır. Bu nedenle, her bir sekonder metabolitin oluşumunun üretici üzerinde bazı evrimsel avantajlar sağladığı, bazılarının diğerlerinin biyosentezinde ara ürünler olabileceği hipotezi mevcuttur (Moss, 2011).

Fungal gelişimin karmaşık ve etkileyici bir özelliği sekonder metabolitlerin üretilmesidir. Sekonder metabolitler genel olarak hücre büyümesi, hücre bölünmesi, hücre solunumu veya fotosentez gibi birincil metabolik süreçlerde doğrudan yer almayan organik bileşikler olarak tanımlanır (Hansson, 2013). Genellikle sporlasyon prosesleriyle ilişkili olan bu bileşikler, niş özelleşmesi için fungusa gerekli olan kimyasal silahların bir parçası olarak düşünülür ve biyoteknolojik ve farmasötik uygulamalardan ötürü yoğun ilgi görür. Bunların birçoğu, yararlı olan antibiyotik, antiviral, antitümör, antihiperkolesterolemik ve immünoşüpresan aktivitelerinin yanı sıra arzu edilmeyen fito ve mikotoksik aktiviteler sergilemektedir (Bok and Keller, 2004). Sekonder metabolit üretiminde funguslar; bitkilere önemli bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Mikrofunguslar, kültürasyon işlemlerinin kolay olması sebebiyle sekonder metabolit üretiminde önemli bir potansiyele sahiptirler (Cantürk, 2015).

1993-2001 yılları arasında izole edilen ve karakterize edilen 1500 fungal sekonder metabolit ile yapılmış bir literatür araştırması, bu bileşiklerin yarısından çoğunun antibakteriyel, antifungal veya antitümör aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Selim et al., 2012; Keller et al., 2005; Hansson, 2013).

Alexander Fleming'in 1929'da penisilini keşfetmesi ve 1940'lı yıllarda Florey ve Chain tarafından penisilinin bir ilaç haline getirilmesine kadar olan süreçte fungal sekonder metabolitlere fazla ilgi gösterilmemiştir. O zamandan bu yana, bu alanda çok fazla araştırmalar yapılmış ve çok çeşitli biyolojik aktiviteler içeren binlerce bileşik karakterize edilmiştir. Fungal sekonder metabolitlerin, bitkilerle etkileşimden kaynaklı hastalıklarda çok önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür. Bitkiler üzerinde hastalık yaratan bu fungusların çoğu enfeksiyon sırasında salgılanan sekonder metabolitleri üretmektedir ve bunlara mikotoksinler, fitotoksinler veya daha genel olarak toksinler denilmektedir (Fox and Howlett, 2008; Meinwald, 2011; Hansson, 2013).

Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* başta olmak üzere bazı fungusların oluşturdukları fungal metabolitlerdir. En çok karşılaşılan mikotoksinler aflatoksin, okratoksin, trikotesen, zearalenon, patulin ve fumonisindir (Bennet and Klich, 2003; Sabuncuoğlu vd., 2008). Mikotoksinler insanlar ve hayvanlar üzerinde türe ve duyarlılık derecesine göre değişkenlik gösteren çeşitli akut ve kronik etkilere sebep olabilirler. İnsanlarda veya mikotoksinle kirlenmiş yemleri tüketen hayvanlarda meydana gelen toksisitenin büyüklüğü, maruziyet derecesi, türün metabolizması ve savunma mekanizması ile çeşitli kimyasallarla olası sinerjik etkilere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Peraica et al., 1999; Hussein and Brasel, 2001).

Gıdalarda ve yemlerde bulunan filamentli fungusların taksonomide *Zygomycetes*, *Ascomycetes* ve *Deuteromycetes* bölümleri altında yer alan değişik genus ve türdeki funguslar olduğu görülür. Tarımsal ürünler tarladan başlayarak, hasat edilmeleri, işleme ve depolama süreçlerinde ortam koşullarına ve tarım ürününe bağlı olarak çeşitli küflerle kontamine olmaktadır (Tunail, 2000). Tarımsal ürünlerdeki küflerin bulunması ürünlerde bozulmalara neden olduğu için ekonomik açıdan önemli görülür. Ayrıca, tarımsal ürünlere bulaşan fungusların

ürettiği sekonder metabolitler bu ürünleri tüketen insanların ve hayvanların sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (Döll and Danicke, 2011; Tunail, 2000).

Besinler ve yemlerde küflenmeye yol açan funguslar başlıca üç kaynaktan gelmektedir. Birincisi, bitkinin büyümesi, gelişmesi sırasında fitoparazit olarak yerleşen, ekim alanlarında bulaşan funguslardır. Bu grupta *Fusarium*, *Cladosporium*, *Claviceps*, *Pullaria*, *Rhizopus*, *Altemaria* türleri bulunmaktadır. İkincisi, hasat sonucunda tarımsal ürünlere bulaşan, depo şartlarına uyum sağlamış olan *Aspergillus* ve *Penicillium* türleridir. Üçüncüsü, depolama koşullarının çeşitli sebeplerle fungusların üreyebileceği koşullar yönünde değişmesiyle ortaya çıkan ve *Fusarium*, *Sordaria*, *Popullaspora*, *Aspergillus* türlerinin içinde yer aldığı gruptur. Bu fungusların hayvan yemlerinde bulunması onları ürettikleri toksinler nedeniyle insan ve hayvan sağlığı için zararlı hale getirmektedir (Kaya, 1990; Bennet and Klich, 2003).

Ribotoksinler de fungal sekonder metabolitler içinde yer almaktadır. Ve hayvan yemlerinde çokça bulunan *Aspergillus*, *Penicillium* gibi filamentöz fungusların bazı türlerinin ribotoksin üreticisi olduğu tespit edilmiştir (Lin et al., 1995; Hwu et al., 2001)

2.2.Fungal Ribotoksinler

Ribotoksinler 28S ribozomal RNA'nın büyük ölçüde korunmuş sarcin/ricin (SRL) domainindeki tek bir fosfodiester bağına karşı oldukça spesifik bir ribonükleolitik aktivite gösteren ribozom inaktive edici proteinler(RIP) ailesindendir. Ribotoksinler, toksik olmayan fungal RNazlardan daha büyük, yaklaşık 150 amino asitlik ve genel olarak bazık olan küçük proteinlerdir (Olombrada et al., 2017).

Ribotoksinler, 1960'lı yıllarda antibiyotik ve antitümör ajanlar arayan bir tarama programı sırasında keşfedilmiştir. Bu çalışmada *Aspergillus giganteus*'un, α -sarcin olarak adlandırılan ve farelerde sarkom ve karsinomayı inhibe edebilen bir protein ürettiği bulunmuştur (Olson and Goerner, 1965). Sonraki

araştırmalarda *Aspergillus restrictus*'ta benzer aktiviteye sahip iki antitümör protein olan restrictocin ve mitogillin keşfedilmiştir. *A. fumigatus* tarafından üretilen başka bir ribotoksin olan Asp1, *Aspergillus* ile ilişkili hastalıklarda temel alerjen olarak keşfedilmiş ve tanılanmıştır (Varga and Samson, 2008). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda diğerk fungal ribotoksinler keşfedilmeye devam edilmiştir. Bunlar hirsutellin A (HtA), gigantın, c-sarcin/ clavin, ve anisoplin'dir. α -sarcin, restrictocin, hirsutellin A ve Asp1 en yaygın şekilde karakterize edilen ribotoksinler olarak bilinmektedirler. Yapılan çalışmalarla her geçen gün yeni fungal ribotoksinler keşfedilmektedir. Örneğın 2017 yılında Landi ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ilk defa Basidiomycetic bir fungus olan *Agrocybe aegerita*'dan ageritin adı verilen bir ribotoksin elde edildiğii bildirilmiştir (Landi et al., 2017).

Ribotoksinler, yapı-işlev ilişkileri bakımından ilginç bir protein grubudur. Yüksek derecedeki sekans benzerlikleri ve T1 ailesinin toksik olmayan fungal RNazlarıyla olan yapısal benzerlikleri, her iki ailenin ortak bir ataya sahip olabileceğii fikrini ortaya çıkarmıştır (Lamy et al., 1992 ; Kao and Davies, 1995; Olombrada et al, 2017).

A.giganteus ve *A. restrictus* gibi ribotoksin üretebilen türlerin kendi ribozomları da dahil olmak üzere şimdiye kadar çalışılan tüm ribozomların, ribotoksinlerin aktivasyonuna karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir (Hobden et al, 1978; Miller and Bodley, 1988).

Ribotoksinler için hiçbir protein reseptörü bulunmamasına rağmen tercihen değiiştirilmiş membran geçirgenliğii gösteren, virüsle enfekte olmuş hücrelere karşı sitotoksiktirler. Sitotoksik işlemin pek çok basamağii ve bu ribotoksinlerin farklı mutant versiyonlarının yapımı ve saflaştırılması, çeşitli metodolojik yaklaşımlar vasıtasıyla moleküler seviyede aydınlatılmıştır (Lacadena et al., 2007).

2.2.1. α -sarcin

α -sarcin, *Aspergillus giganteus* MDH 18894 suşu tarafından salgılanan, 3 boyutlu bir yapı gösteren, ribozom inaktive edici proteinlerin tip I grubuna ait güçlü bir polipeptid toksindir (Olson et al., 1965; Olmo et al, 2001). α -sarcin ribotoksin grubunun bilinen ilk üyesi olması nedeniyle önem taşımaktadır.

α -sarcin umut verici bir anti-tümör ajanı olmasına rağmen (ismi anti-sarkom özelliklerinden ortaya çıkmıştır), esas olarak ribozom yapısı ve fonksiyonu ile ilgili olan çalışmalara katkısı açısından önemlidir. 28S rRNA'nın yüksek derecede korunmuş sarcin / ricin domainindeki bir fosfodiester bağına spesifik olarak parçalayarak protein biyosentezini inhibe eder (Castano-Rodriguez et al., 2015). Bu enzimatik aktiviteye ilaveten, α -sarcin, füzyonunu ve lipidten sızma işlemini gerçekleştirmek için lipid tabakaları ile etkileşime girer ve fosfolipid veziküllerin membranlarıyla da translokasyon yapabilmektedir (Gasset et al., 1994; Olmo et al, 2001).

α -sarcinin karakterizasyonu ile ilgili ilk raporlar, bazı tümörlerin büyümesini inhibe etme kabiliyetini tarif etmiştir (Olson and Goerner, 1965). Ek veriler, bu proteinin çok çeşitli hücre tipleri için toksik olduğunu göstermiştir (Turnay et al., 1993). Bununla birlikte α -sarcinin hücrenin içine girdiği, protein biyosentezini inhibe ettiği ve toksik etkilerini ortaya koyduğu mekanizmalar ile ilgili çok az şey bilinmektedir. α -sarcinin insan rabdomiyosarkom hücrelerine giriş mekanizması ve hücre ölümüne neden olan hücresel olayları araştırılmıştır. Fakat α -sarcin için spesifik hücre yüzeyi reseptörü bulunamamıştır (Olmo et al., 2001).

2.2.2. Restrictocin

Restrictocin moleküler ağırlığı 16.8 kDa olan, 149 amino asitten oluşan temel bir sitotoksik proteindir. *A. restrictus*'un bir suşundan elde edilmiştir. Restrictocin, α -sarcin ve mitogillin gibi ribotoksin ailesinin tanınmış üyeleri arasındadır. 28S rRNA'nın SRL domainindeki tek bir fosfodiester bağına spesifik

olarak parçalayabilen ve protein sentezini inhibe edebilen ribotoksin ailesinin bir üyesidir (Schindler and Davies, 1977; Nayak et al, 2001).

Restrictocin, mitogillinden sadece bir rezidü farklıdır ve α -sarcin ile %86 sekans benzerliği taşımaktadır (Yang and Moffat, 1996). Restrictocin de dahil olmak üzere, ribotoksinler hedefleri için yapı ve sekans özgüllüğüne sahiptirler. Restrictocinin spesifik hedef tanıma kabiliyetinin 49 konumundaki bir histidin rezidüsü içinden olduğu bulunmuştur, bu değişim proteinin RNaz aktivitesinin muhafaza edilmesine rağmen özgüllüğün kaybolmasına neden olmaktadır (Nayak and Batra, 1997; Yadav and Batra, 2015).

2.2.3.Hirsutellin A

Böcek patojenik funguslar, böcek zararlılarının kontrolünde önemli bir doğal rol oynadığı için özel ilgi gösterilir. Entomopatojenik fungusların bilinen yaklaşık 1000 türü, tüm böcekleri olmasa da pek çok böceği hedef almaktadır. Ancak bu fungusların her biri sınırlı konukçu türleri üzerinde etkilidirler. *H. thompsonii*, 1981 yılında narenciye pası maytalarının kontrolü için kullanılmış, ancak düşük etkisi nedeniyle kısa süre içerisinde terk edilmiştir (McCoy, 1981). Ardından yapılan çalışmaların sonuçlarına göre *Hirsutella thompsonii*'nin Acari alt sınıfına karşı yüksek bir özgüllük gösterdiği ve yaygın olarak incelenen *Metarhizium anisopliae*'ye kıyasla daha öldürücü olduğu saptanmıştır (Shaw et al., 2002).

Hirsutella thompsonii tarafından üretilen etkili toksik maddeler aranırken, insektisidal protein HtA, 1995 yılında saptanmıştır (Zhen Liu et al., 1995; Mazet and Vey, 1995; Olombrada et al., 2014). Ribotoksin üretici entomopatojen fungus olan *H. thompsonii*'nin ürettiği HtA'nın keşfi böcek öldürücü aktivitenin potansiyel katılımcıları olarak ribotoksinlere yeni bir bakış açısı kazandırmıştır (Herrero-Galan et al., 2008).

Fungal ribotoksin ailesi, çoğunluğu yaklaşık 150 amino asitten oluşan ve en az% 85 sekans benzerliği sergileyen üyelerden oluşur (Martinez-Ruiz et al., 1999b). Bunlar arasında hirsutellin A farklıdır çünkü diğer ribotoksinlere göre daha

küçüktür ve onlarla olan sekans benzerliği %35tir (Lacadena et al., 2007; Herrero-Galan et al., 2008).

HtA'nın biyokimyasal karakterizasyonu ökaryotik hücrelere karşı test edildiğinde α -sarcin ile aynı spesifik ribonükleotit aktiviteyi ve aynı zamanda sitotoksik bir etki gösterdiği görülmüştür (Herrero-Galan, 2008).

Hirsutellin A, *Galleria mellonella* larvalarına ve *Aedes aegypti*'nin yenidoğan larvalarına enjekte edildiğinde toksik etki göstermektedir. Bu gözlemler, *H. thompsonii*'nin potansiyel bir virülans faktörü olduğu yönündeki öneriye yol açmış ancak daha ileri çalışmalar yapılmamıştır (Olombrada et al., 2017).

2.2.4.Mitogillin

Mitogillin de aynı restrictocin gibi *Aspergillus restrictus* tarafından üretilen, ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde protein sentezini inhibe eden toksik proteinlerden biridir (Fernandez-Luna et al., 1985). Yapılan çalışmalara göre, mitogillinin sekonder ve üçüncül yapıları, restrictocin ve α -sarcininkilerle çok benzerdir. Buna ek olarak, mitogillin antiserumunun kısmen restrictocin ve kısmen α -sarcin ile çapraz tepkimeye girdiği belirtilmiştir (Gavilanes et al., 1983; Fernandez-Luna et al., 1985).

Mitogillin, α -sarcin ve restrictocinin etkinlikleri kapsamlı olarak incelenmiştir. Mitogillin, restrictocinden yalnızca bir amino asit ile farklıdır ve α -sarcin ile arasında % 86'lık bir amino asit homolojisi bulunur. Mitogillin, protein sentezinin güçlü inhibisyonu ve nispeten küçük boyutundan ötürü, monoklonal antikorlarla bağlanma için cazip bir adaydır (Better et al, 1992).

2.2.5.Aspf1

Aspergillus fumigatus birçok alerjik solunum yolu hastalığından sorumludur, bunların en önemlileri ciddiyetinden dolayı alerjik bronkopulmoner aspergillozistir. Asp1, bu fungusun önemli bir alerjenidir. Bu 149 amino asitlik protein, çok iyi karakterize edilmiş olan ribotoksin ailesine aittir. Asp1,

A. fumigatus'un başlıca ve en iyi karakterize edilmiş allerjenlerinden biridir. Aspfl α -sarcinden sadece 19 (%87 sekans benzerliği) ve restrictocinden 1 (%99 sekans benzerliği) rezidü farklılık gösterir. Aspfl ve α -sarcin arasındaki bu 19 amino asit farklılığından 5 tanesi β -hairpinin NH₂-terminal kısmında yer almaktadır (Garcia-Ortega et al., 2005).

A. fumigatus tarafından üretilen Aspfl *Aspergillus* ile ilişkili hastalıklarda büyük bir alerjen olarak tanımlanmış ve enfekte hastaların idrarında tespit edilmiştir (Lamy and Davies, 1991; Arruda et al., 1992).

2.2.6. Gigantin

Gigantin de tıpkı α -sarcin gibi *Aspergillus giganteus* türünden elde edilmiştir. İlk elde edildiği suş *Aspergillus giganteus* IFO 5818'dir. Biyokimyasal veriler, gigantinin heksoz birimleri içermeyen, tekli bir polipeptit zincir proteini olduğunu göstermektedir (Salvarelli et al., 1994).

A. restrictus'un iki suşu tarafından üretilen mitogillin ve restrictocin arasında tek bir amino asitlik yer değişimi gözlemlendiği tespit edilmiştir. Bu nedenle α -sarcin ve gigantın arasındaki dizi farklılıklarının da aynı türün farklı suşları tarafından üretildiklerinden dolayı düşük olacağı bildirilmiştir. Bununla birlikte, gigantın immünolojik olarak α -sarcinden ayırt edilebilir bir substrat özgülüğü göstermektedir. Tüm bu veriler α -sarcin ile gigantının aynı türden izole edilmesine ve aralarında çok az bir sekans farklılığı olmasına rağmen onların substrat özgülüğü birbirinden farklı iki ribotoksin olarak sınıflandırılmalarına sebep olmuştur (Wirth et al., 1997).

2.2.7. Ageritin

Diğer tüm ribotoksinler Ascomycetic funguslar tarafından sentezlenirken, ageritin ilk defa Basidiomycetic bir fungus tarafından sentezlendiği görülen ribotoksindir. Bu toksin *Agrocybe aegerita* tarafından üretilmektedir. Ageritin sitotoksitesi, nöral ve glial insan tümör hücre hatları üzerinde çalışılmıştır. *A.aegerita* fungusunun bir tavşan retikülosit lizat sisteminde protein sentezini

engellediği tespit edilmiştir. Biyokimyasal karakterizasyon çalışmalarında, ageritinin Ascomycetic funguslardan elde edilen ribotoksinlerin yapısal özelliklerinden farklı olduğunu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, maya ribozomları ile inkübe edildiğinde, Ascomycetic fungus olan *Aspergillus giganteus*'tan izole edilen bir prototip ribotoksin olan α -sarcin ile aynı α -fragmentini serbest bırakma kabiliyetinde olduğu görülmüştür. Ageritinin izolasyonu, Basidiomycetic funguslardan yeni biyoaktif ribotoksinler keşfetmeyi amaçlayan araştırmaların önünü açmıştır (Landi et al., 2017).

2.2.8. Anisoplin

Fungal ribotoksinler, ribozomlara karşı olağanüstü etkinliğe sahip toksik ribonükleazlar ve potansiyel böcek öldürücü aktiviteleri ile ilgi görmektedirler. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Metarhizium anisopliae* kültürlerinde yeni bir ribotoksin karakterize edilmiştir. Çalışma sonucunda anisoplin rekombinant bir protein olarak elde edilmiştir. Yapısal olarak, entomopatojen *Hirsutella thompsonii*'den elde edilen bir ribotoksin olan HtA'ya benzemektedir. Ayrıca, anisoplinin ribotoksine özgü ribonükleolitik aktiviteyi ve böcek hücrelerine karşı sitotoksiteyi de sergilediği belirtilmektedir. Fungusun bu toksini ne şekilde kullandığı ve bu toksin ile yapılabilecek çalışmalar ilgi uyandırmaktadır. Bu nedenle bu toksinle ilgili ayrıntılı çalışmalar devam etmektedir (Olombrada et al., 2016).

2.2.9. C-sarcin / Clavin

C-sarcin/clavin, *Aspergillus clavatus* kültüründen izole edilmiştir. C-sarcin/clavin kodlayan bir genomik DNA (c-sar) klonlanmış ve amino asit dizisi saptanmıştır. Elde edilen amino asit dizisi, restrictocin ve α -sarcin ile yüksek bir homoloji göstermektedir. c-sarcinin hem monomerleri hem de dimerlerinin yoğun RNA'yı in situ olarak inhibe ettiği görülmüştür. Sonuç, α -sarcinin ribonükleolitik etkinliği ile benzerlik göstermiştir. C-sarcin'in intron dizisi, restrictocininkinden farklı, ancak α -sarcininkiyle benzer bulunmuştur. C-sarcin intronu ile α -sarcin arasında % 34 benzerlik vardır ve bu benzerlik, eğer poliadenin gerilmesi atlanırsa % 83'e çıkmaktadır. C-sarcinin amino asit sekans benzerliği α -sarcin, restrictocin

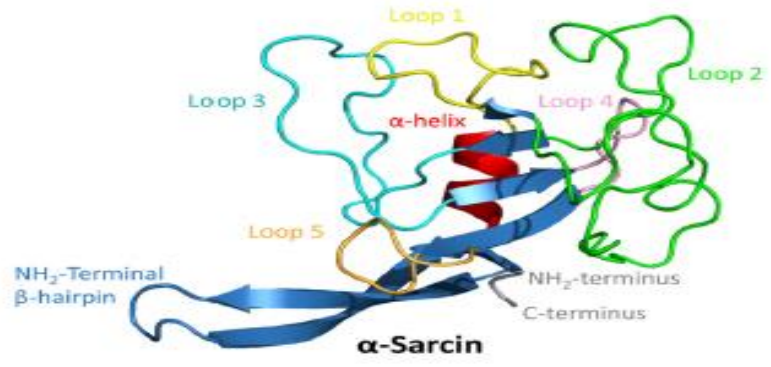
ve mitogillin ile karşılaştırılmıştır. C-sarcin ile α -sarcin ve restrictocin arasındaki amino asit sekanslarının benzerlikleri sırasıyla % 84.7 ve % 80 olarak tespit edilmiştir (Huang et al., 1997).

Protein, spesifik in vitro sitotoksinite göstermektedir ve yeterli in-vivo yarı ömre sahip olduğu, az miktarda toksinite ve düşük immünojenite gösterdiği görülmektedir. Monoklonal bir antikora (mAb) bağlanarak seçilen bir tümör hücresi antijeni hedeflendiğinde, c-sarcinin/clavinin nanomolar konsantrasyonda protein sentezini inhibe ettiği görülmüştür. Yüksek seviyelerde rekombinant üretimi ve biyolojik özellikleri bu toksini terapötik konjuge jenerasyon için iyi bir aday yapmaktadır (Parente et al., 1996).

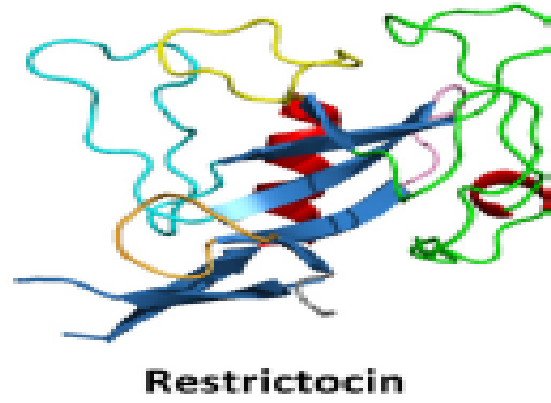
2.3. Ribotoksinlerin Yapısı

α -sarcin, restrictocin, HtA ve Asp1, en yaygın şekilde karakterize edilen ribotoksinlerdir, ancak diğerleri çoğunlukla farklı fungus türlerinde tanımlanmış ve kısmen karakterize edilmiştir. Çoğu ribotoksin, benzer boyutlara ve % 85'in üstünde amino asit sekans homolojisine sahiptir. HtA ve son zamanlarda keşfedilen anisoplin, entomopatojen fungus *Hirsutella thompsonii* ve *Metarhizium anisopliae* tarafından üretilmektedir. Her iki protein de oldukça benzerdir ancak bilinen diğer ribotoksinlere göre daha küçük olup onlarla sadece % 25 oranında sekans homolojisi sergilemektedir (Olombrada et al., 2017).

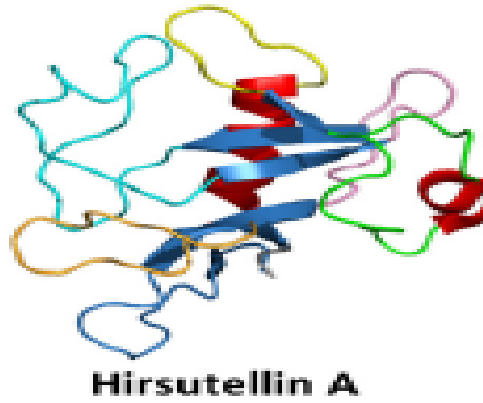
Elde edilen veriler, ribotoksinlerin farklı fungal türler arasında yaygın olduğunu ve *Aspergillus* genusuyla sınırlı olmadığını doğrulamıştır. Birkaç ribotoksinin üç boyutlu yapısı bilinmektedir ve mutasyonel analizler farklı rezidülerin spesifik rollerinin belirlenmesine olanak vermiştir (Yang and Moffat, 1996; Viegas et al., 2009).



Şekil 2.1. α -sarcin üç boyutlu yapısı (Olombrada et al., 2017).



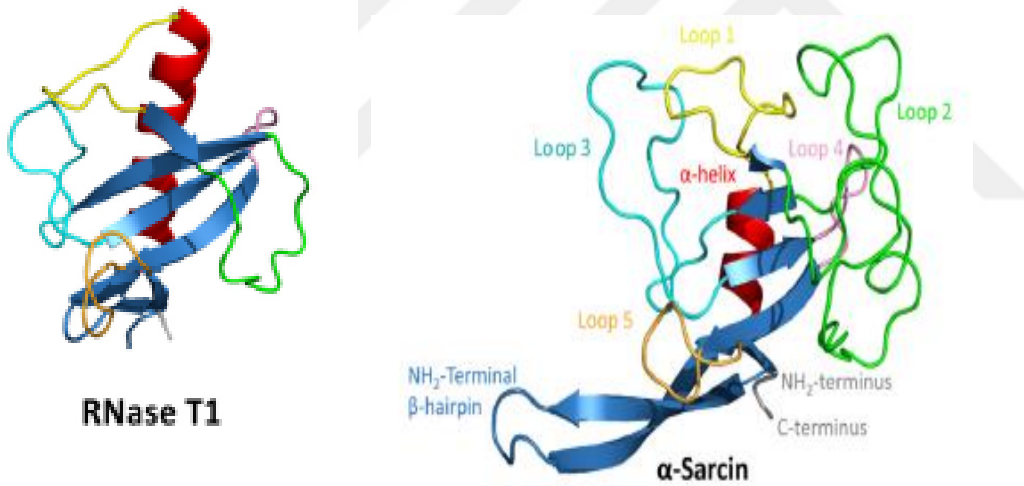
Şekil.2.2. Restrictocin üç boyutlu yapısı (Olombrada et al., 2017).



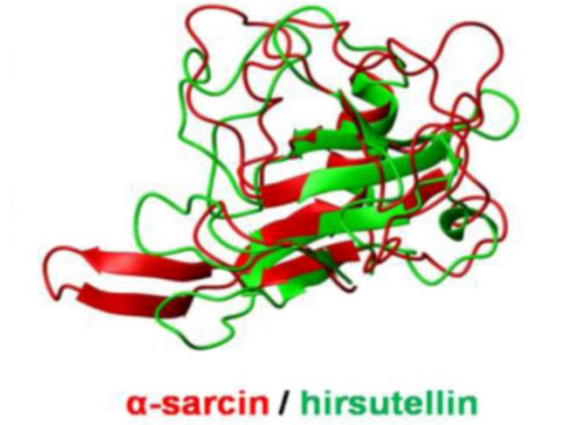
Şekil 2.3. Hirsutellin A üç boyutlu yapısı (Olombrada et al., 2017).

Ribotoksinler fungusların ürettiği tek RNaz değildir. Bunlar çok daha geniş bir fungal hücre dışı RNaz grubunun bir parçasıdır. Ribotoksinler, toksik olmayan fungal RNazlardan daha büyük olsa da, yaklaşık 150 amino asitlik ve genel olarak bazik olan küçük proteinlerdir. RNaz T1 ya da U2 gibi toksik olmayan RNazlar ile ribotoksinler arasındaki temel yapısal farklılığın, bu bileşiklerin toksisitesinin yapısal temeli olduğu öne sürülen daha uzun ve pozitif yüklü halkalar içermesi olduğu tespit edilmiştir (Martinez del Pozo et al., 1988).

HtA ve restrictocinin α -sarcin ile karşılaştırıldığında daha fazla değişkenlik gösterdiği kısım da işte bu uzun ve pozitif yüklü halkaların olduğu bölgedir. HtA'nın NH₂-terminal β -hairpin kısmı çok daha kısadır, ancak bu kısalık aynı zamanda daha fazla pozitif yüklü olan ilmiik 5'in uzatılmasıyla dengelenmiş gibi görünmektedir (Olombrada et al., 2016b, 2017).



Şekil 2.4. RNaz T1 ve α -sarcin üç boyutlu yapıları (Olombrada et al., 2017).

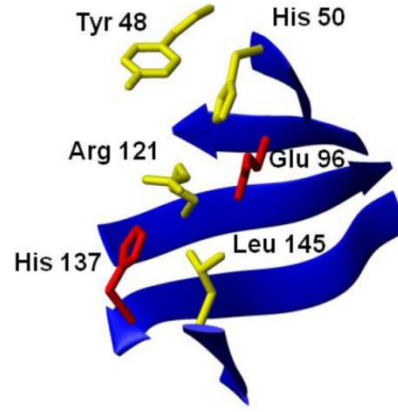


Şekil 2.5. α -sarcin ve Hirsutellin üç boyutlu yapılarının üst üste bindirilmiş karşılaştırması (Olombrada et al., 2017).

2.4. Ribotoksinlerin Etki Mekanizması

Hem RIP'ler hem de ribotoksinler aynı evrensel olarak korunmuş rRNA dizisini hedeflemektedir. Ancak, her iki toksin çeşidi tarafından hedeflerine ulaşmak için kullanılan mekanizmalar oldukça farklıdır. Ribotoksinlerin biyolojik fonksiyonu henüz tam anlamıyla netleştirilmemiş olsa da, birçok çalışma, bu proteinlerden en az iki tanesinin böcek öldürücü özelliklerinin olduğunu ispatlamış, bu da bu toksinlerin savunma ve parazitlik konusundaki rollerini desteklemiştir (Olombrada et al., 2017).

Ribotoksinlerin ribonükleolitik aktivitesi son derece spesifik ve tüm ribozomlarda oldukça korunmuş olan rRNA'nın bir dizisini (SRL) hedef alır. SRL, translasyon sırasında uL11 bağlanma bölgesi ile birlikte, L7 / L12 sapı ve ribozomal proteinler uL6 ve uL14 ile birlikte, ribozomun işlevini doğru yapması için gereken uzama faktörü bağlanma bölgesini oluşturmaktadır. SRL yapısı çarpık bir saç tokasından oluşur ve en önemli yapısal özellikleri GAGA tetraloop ve şişkin G motifidir. Ribotoksinler, GAGA tetraloopunun tek bir fosfodiester bağımlı parçalayıp α fragmenti olarak bilinen ribozom kökenli rRNA'nın 300-400 nükleotidlik küçük bir fragmentini üretirler. Ribotoksinler, Tıpkı RNase T1 ailesinin diğer üyeleri gibi RNA mekanizmasının genel asit-bazlı tipte



α -sarcin

Şekil 2.7. α -sarcin üç boyutlu yapısında Tyr 48, His 50, His 137, Arg 121, Glu 96 ve Leu 145 bölgelerinin yeri (Lacadena et al., 2007).

Ribotoksinlerin toksisitesi, son derece spesifik RNaz etkinliğinin ve zarları geçme yeteneklerinin kombinasyonundan kaynaklanmaktadır. Şimdiye kadar ribotoksinler için hiçbir protein reseptörü bulunamamıştır. Bu nedenle, ribotoksinler potansiyel olarak herhangi bir ribozomu inaktive edebiliyor olsa da, hücre membranının lipid yapısının ribotoksinlerin spesifik olan sitotoksik aktivitelerinde önemli rol oynadığı anlaşılmaktadır. Ribotoksinlerin transforme veya virüsle enfekte olmuş hücreler üzerinde daha etkili oldukları düşünülmüş, büyük olasılıkla değiştirilmiş permeabilite veya hücre zarının bileşimi nedeniyle böyle olduğu fikri ortaya atılmıştır (Turnay et al., 1993; Olmo et al., 2001). Böceklerde, lipid zar diğer ökaryotlarda olduğundan daha incedir ve daha akışkandır, bu nedenle ribotoksin için daha erişilebilir ve duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Olombrada et al., 2013,2017).

Lipid model sistemlerinin kullanımı, α -sarcinin asidik fosfolipitlerle zenginleştirilmiş lipid veziküller ile etkileşime girdiğini kanıtlamıştır. Bu etkileşim, vesikül yığılmayı takiben fosfolipidlerin füzyonu ve birbirine karışması ve nihayetinde sulu içeriğinin sızdırılmasına neden olmaktadır (Gasset et al., 1989). Ancak, bu mekanizma ribotoksinler arasında korunmuş görünmemektedir. Sızma deneylerinde α -sarcininkinden daha yüksek bir membran geçirgenlik özelliğine sahip olmasına rağmen, HtA'nın vesikül kümeleşmesini teşvik etmediği tespit edilmiştir (Herrero-Galan et al., 2008; Olombrada et al., 2013).

α -sarcin'de, 116-139 rezidülerini içeren bölgenin, zarlarla hidrofobik etkileşime katıldığı varsayılmaktadır. Ve son zamanlarda loop 3'teki Lys rezidüleri 111 ve 114'ün vezikülleri etkileşime sokmak için gerekli olan elektrostatik etkileşimlere katıldığı öne sürülmüştür (Castano-Rodriguez et al., 2015). HtA içinse, Trp71 ve Trp78 'in membran-permeabilize edici etkinlikte bir rol üstlendiği ileri sürülmüştür (Herrero-Galan et al., 2012). Lipid membranlarla etkileşim kabiliyeti aynı zamanda ribotoksinlerin N-terminali β -hairpini ile de ilişkilendirilmiştir. α -sarcinin içindeki bu pozitif yüklü bölgenin silinmesi, zar etkileşim özelliklerine sahip, toksik olmayan fakat aktif bir ribonükleaz üretmektedir (Garcia-Ortega et al., 2002). HtA ve restrictocin'in α -sarcin ile karşılaştırıldığında daha fazla değişkenlik gösterdiği kısım da bu bölgedir. Pozitif yüklenmiş ribotoksin yüzeyi, ribotoksinlerin ribozom ile olumlu elektrostatik etkileşimler kurmalarına olanak sağlamaktadır. Ayrıca ribotoksinlerin yüksek spesifitesi, SRL'yi tanımak için ribozom ile etkileşime girebilen aktif bölgenin yanı sıra ek elementler gerektirdiği düşünülmektedir. Şimdiye kadar, SRL'nin ve diğer ribozomal elementlerin tanımlanmasına katılmak için birkaç bölge önerilmiştir. Fakat bunlar henüz kesinlik kazanmamıştır (Alford et al., 2009; Alvarez-Garcia et al., 2011; Olombrada et al., 2017)

Translasyon esnasında uzama faktörlerinin toplanmasıyla bağlantılı diğer ribozomal bölgeler toksinler ile etkileşim kurabilmektedir. Ribozomal sap proteinleri ve ricin, trichosantin gibi RIP'lerin durumu budur. Ribozomal sap, ribozomun, uzatma faktörleri için bir demirleme platformu görevi gören çıkıntılı bir yapıdadır ve SRL'yi daha iyi tanımak için çeşitli RIP'ler aracılığıyla bulunur. Aynı hedefin paylaşılmasına rağmen, pikavirus antiviral proteinleri ile ökaryotik sap proteinleri arasında hiç bir etkileşim bulunmadığından, tüm RIP'ler aynı şekilde davranmamaktadır. Ribotoksinlerde ökaryotik ribozomal sapın, ribozomun α -sarcin inaktivasyonuna katılmadığı saptanmıştır. Bu sonuç, ribotoksinlerin, ricin gibi bitki RIP'leri tarafından kullanılabilecek farklı bir ribozom tanıma mekanizması kullandığını düşündürmektedir (Ayub et al., 2008; Olombrada et al., 2014, 2017).

Ribozomun katalitik olarak inaktivasyonu nedeniyle ribotoksinlerin uyguladığı toksisite dışında, α -sarcinin protein biyosentezini inhibe etme ve ribonükleolitik aktiviteden bağımsız olarak sitotoksiteyi artırma yeteneğini

vurgulayan bazı çalışmalar da mevcuttur (Alford et al., 2009; Alvarez-Garcia et al., 2011; Olombrada et al., 2017)

Ribotoksinlerin bilinen her ribozomu etkisizleştirebilmeleri fungusların kendi ribozomlarını nasıl koruduğu sorusunu ortaya çıkarmaktadır. Ribotoksinler, hücrel membran bölmelerinde işlenen öncüler olarak sentezlenmektedir. Üreten hücrelerin korunması, sinyal dizilerinin çok verimli bir şekilde tanınmasına ve hücre dışı ortama salınmadan önce yeterli bölümlendirmeye dayandığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda lider dizi bozulduğunda ya da başka birtaneyle değiştirildiğinde *A. nidulans*'daki restrictocinin heterolog ekspresyonu azalan transkript seviyeleri ve arttırılmış hücrel lizis göstermiştir. Ribotoksinin fungusun konidyoforlarında daima lokalize olmadığı, restrictocinin lider sınırlayıcı dizisinin sekresyon sırasında fungusu koruma rolünde oldukça etkili olduğu öne sürülmüştür. *A. restrictus*'daki restrictosin geni, sekansının başında bir introna sahiptir. Son zamanlarda, bir çalışma, intronların barnaz toksisitesini hafifletmek için kullanılabileceğini kanıtlamıştır. Bu nedenle belki de restrictocin içerisindeki bir intronun varlığı, bu fungusların sentezleri sırasında hücre ribozomlarına karşı kendi toksisitesini zayıflatmak için kullandıkları stratejilerin ek bir örneği olabileceği düşünülmektedir (Brandhorst and Kenealy, 1995; Olombrada et al., 2017).

Tüm bunlar ribotoksinlerin karmaşık mekanizmalarıyla ilgili henüz çok az bilginin mevcut olduğunu ve farklı görüşlerin mevcut olduğunu göstermektedir. Ribotoksinlerin hücre ölümüne sebep olan bu etki mekanizması hala incelenmekte ve aydınlatılmak için çok daha fazla araştırmaya gerek duyulmaktadır.

2.5. Ribotoksin Üreticisi Funguslar

Yapılan çalışmalarda ribotoksin üreticisi funguslarda özellikle *Aspergillus* genusuna mensup türlerin yoğunlukta olduğu görülmektedir. Bu genus içerisinde *A. giganteus*, *A. restrictus*, *A. fumigatus* türleri ve *Clavati* şubesine mensup tüm *Aspergillus* türlerinin ribotoksin gen bölgesini bulundurduğu ama bunlardan yalnızca *A. giganteus*, *A. restrictus* ve *A. fumigatus* türlerinin toksini salgıladığı tespit edilmiştir (Varga and Samson, 2008).

Ayrıca *Penicillium* genusunda ribotoksin gen bölgesi varlığı ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda da *P. resedanum*, *P. spinulosum*, *P. daleae*, *P. digitatum*, *P. aculeatum* ve *P. chermesinum* türlerinin ribotoksin gen bölgesini taşıdığı fakat bunlardan yalnızca *P. resedanum*, *P. spinulosum*, *P. aculeatum* ve *P. chermesinum* türlerinin toksini salgıladığı tespit edilmiştir (Hwu et al., 2001).

Bu genuslar haricinde Ascomyceteler içerisinde *Hirsutella thompsonii* ve *Metarhizium anisopliae* entamopatojen türlerin toksinleri ile ilgili yapılan çalışmalarda bu fungusların ribotoksin gen bölgesini taşıdığı ve proteini salgıladığı ortaya çıkmıştır (Olombrada et al., 2014, 2016).

Son birkaç yılda Basidiomycetic *Agrocybe aegerita* fungusunda ribotoksin keşfi yapılmıştır. Bu keşif ilk defa bir basidiomycetes sınıfına ait fungusta ribotoksin gen bölgesinin bulunması ve bu fungusun yenilebilir bir fungus olması sebebiyle büyük önem taşımaktadır. Diğer Basidiomycetes üyelerinde ribotoksin varlığının araştırılmasının da önünü açmıştır.

3.MATERYAL VE METOD

3.1.Materyal

3.1.1 Araştırma Materyali

Çalışmamızda Ege Bölgesinde piyasada satışa sunulan 16 farklı yem örneğinden steril poşetlere örnek alımı yapılmıştır. Alınan yemler küçükbaş ve büyükbaş hayvanlar için üretilmekte olup, yulaf ve arpa yemleri, toz yemler, sıkıştırılmış tane yemler şeklinde satılmakta ve besi yemi, süt artırımı ve enerji verme gibi amaçlarla kullanılmaktadır.

3.1.2.Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanması

Besiyeri 1: Dichloran Glycerol Agar (DG-18) (Merck 100465)

• Pepton	5,0 g
• Glikoz	10,0 g
• KH_2PO_4	1,0 g
• Dichloran	0,002 g
• MgSO_4	0,5 g
• Kloramphenicol	0,1 g
• Agar	15,0 g
• Distile su	825 ml

Bu besiyeri kuru maddelerdeki küflerin aranması ve/veya sayımı amacıyla kullanılmaktadır. Besiyeri ticari olarak hazır toz halindedir. Litrede 31,6 g olacak şekilde distile su içerisinde eritilmiştir. Üzerine 175 ml gliserol (Merck 1.04092) ilave edilerek karıştırılıp, 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Sonrasında steril petrilere petri başına 25 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Besiyeri 2: Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck 110130)

- Patates infüzyonu 4,0 g
- D(+) Glukoz 20,0 g
- Agar 15,0 g
- Distile su 1000ml

Bu besiyeri fungi imperfecti grubunda yer alan küflerin ve mayaların kültüvasyonu, sayımı ve gerektiğinde stok kültür olarak saklanması için kullanılmaktadır (Downes ve Ito, 2001). Besiyeri ticari olarak hazır toz halindedir. Litrede 39 g olacak şekilde distile su içerisinde çözülmüş ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Sonrasında fungusların saflaştırılmasında kullanılmak üzere steril petrilere petri başına 25 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Eğer bu besiyeri stok kültür elde etmek için kullanılacaksa otoklavlanmadan önce ısıtılarak çözülür ve cam tüplere 5’er ml koyulup sonrasında otoklavlanır.

Besiyeri 3: Czapek Yeast Agar (CYA 5, CYA 25, CYA 37)

- K₂HPO₄ 1.0 g (Merck 105101)
- Czapek Konsatresi 10.0 ml
- Yeast Extract 5.0 g (Merck 103753)
- Sukroz 30.0 g (Merck 107651)
- Agar 15.0 g (Merck 101613)
- Distile su 1000 ml

Aspergillus ve *Penicillium* türlerinin tayininde kullanılan besiyeridir (Samson and Pitt, 2000; Klich 2002; Samson et al., 2010). Fungusun 5 °C, 25°C ve 37°C’deki morfolojik gelişimine bakmak için kullanılır. Bileşenler uygun miktarlarda tartılarak 1000 ml distile su ile karıştırılmış, 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Daha sonra steril petrilere petri başına 25 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Besiyeri 4: %20 Sukrozlu Czapek Yeast Agar (CY20S)

- K_2HPO_4 1.0 g (Merck 105101)
- Czapek Konsantresi 10.0 ml
- Yeast Extract 5.0 g (Merck 103753)
- Sukroz 200.0 g (Merck 107651)
- Agar 15.0 g (Merck 101613)
- Distile su 1000 ml

Bu besiyeri *Aspergillus* türlerinin fenotipik tayininde kullanılmaktadır (Klich, 2002; Samson et al., 2010). Bileşenler uygun miktarlarda tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözülmüş, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Daha sonra steril petrilere petri başına 25 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Besiyeri 5: Malt Extract Agar (MEA)

- Powdered Malt Extract 20.0 g (Merck 105391)
- Peptone 1.0 g (Merck 107214)
- Glucose 20.0 g (Sigma 16301)
- Agar 20.0 g (Merck 101613)
- Distile su 1000 ml

Bu besiyeri küf ve mayaların kültüve edilmesinde, sayımında kullanılır. Özellikle de *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin fenotipik tayininde kullanılan genel bir besiyeridir (Thom and Church, 1926; Klich, 2002; Samson and Pitt, 2000; Samson et al., 2010). Bileşenler uygun miktarlarda tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözülmüş, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Daha sonra steril petrilere petri başına 25 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Besiyeri 6: Czapek Dox Agar (CZ)

- Czapek Konsantresi 10.0 ml
- K_2HPO_4 1.0 g (Merck 105101)
- Sukroz 30.0 g (Merck 107651)
- Agar 17.5 g (Merck 101613)
- Distile su 1000 ml

Bu besiyeri *Aspergillus* türlerinin tayininde kullanılmaktadır (Klich, 2002; Samson et al., 2010). Bileşenler uygun miktarlarda tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözülmüş, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Daha sonra steril petrilere petri başına 25 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Besiyeri 7: %25 Glycerol Nitruate Agar(G25N)

- Czapek Konsantresi 10 ml
- K_2HPO_4 1g (Merck 105101)
- Yeast extract 4.94 g (Merck 103753)
- Gliserol 333.32 g (Merck 104092)
- Agar 16 g (Merck 101613)
- Distile su 1000 ml

Bu besiyeri *Penicillium* türlerinin tayininde kullanılmaktadır (Samson and Pitt, 2000; Samson et al., 2010). Bileşenler uygun miktarlarda tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözülmüş, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Daha sonra küçük boy steril petrilere petri başına 15 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Besiyeri 8: Nötral Kreatin Sukroz Agar (CSN)

- Kreatin Sukroz Konsantresi 10 ml
- Sukroz 10 g (Merck 107651)
- Kreatin 5 g (Sigma C0780)
- KH_2PO_4 1 g (Merck 104873)
- Bromocresol purple 0.05 g (Merck 103025)
- Agar 15 g (Merck 101613)
- Distile su 1000 ml

Bu besiyeri *Penicillium* türlerinin tayininde kullanılmaktadır (Samson and Pitt, 2000; Samson et al., 2010). Bileşenler uygun miktarlarda tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözülmüş, 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Daha sonra küçük boy steril petrilere petri başına 15 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Besiyeri 9: Malt Extract Broth

- Powdered Malt Extract 20.0 g (Merck 105391)
- Pepton 1.0 g (Merck 107214)
- D-Glukoz 20.0 g (Sigma 16301)
- Distile su 1000 ml

Bu besiyeri izolatların pellet şeklinde üretilmesi amacıyla kullanılmıştır. Bileşenler uygun miktarlarda tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözülmüş, 250 ml’lik erlenlerin içerisine erlen başına 90 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.3. Tampon ve Çözeltiler

3.1.3.1. Fenotipik Tanılamada Kullanılan Çözeltiler

Czapek Konsantresi

- NaNO_3 30.0 g (Merck 106535)
- KCl 5.0 g (Merck 104936)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 g (Merck 105886)
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g (Merck 103965)
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g (Merck 108883)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g (Merck 102790)
- Distile su 100 ml

Czapek konsantresi *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin tanılanmasında kullanılan CYA, CY20S, CZ, G25N gibi besiyerlerin içerisine eklenen bir çözeltilerdir (Pitt, 1973; Samson and Pitt 2000; Klich, 2002). Bu çözelti otoklavlanmadan +4 °C'de saklanmaktadır. Kullanılmadan önce çözeltilerde çökme olabileceği için çalkalanmaktadır.

Kreatin Sukroz Konsantresi

- KCl 5 g (Merck 104936)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g (Merck 105886)
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g (Merck 103965)
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g (Merck 108883)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05g (Merck 102790)
- Distile su 100 ml

Penicillium türlerinin tanılanmasında kullanılan CSN besiyerinin içerisine eklenen bir çözeltilerdir (Pitt, 1973; Samson and Pitt 2000). Bu çözelti

otoklavlanmadan +4 °C’de saklanmaktadır. Kullanılmadan önce çözeltide çökme olabileceği için çalkalanmaktadır.

3.1.3.2. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Lizis Tamponu

- EDTA (pH: 8) 2.35 gr (Glenthams GE3023)
- Tris HCl (pH: 8) 6.3 gr (Glenthams GP7166)
- NaCl 0.9 gr (Merck 106404)
- SDS 1 gr (Glenthams GD2962)
- Distile su 100 ml

Aspergillus türlerinden manuel DNA izolasyonunda kullanılmıştır (Liu, 2000).

Potasyum Asetat Tamponu (pH: 4,8)

- Potasyum asetat 14.7 gr (Sigma P1190)
- Glacial asetik asit 5.75 ml (Riedel de Haen 27225)
- Distile su 29.55 ml

Aspergillus türlerinden manuel DNA izolasyonunda kullanılmıştır (Liu, 2000).

İzopropanol (Tekkim C3H8O)

Aspergillus türlerinden manuel DNA izolasyonunda kullanılmıştır (Liu, 2000).

%70’lik Etanol (Sigma 32221)

- Etanol (%96) 146 ml
- Distile su 54 ml

Aspergillus türlerinden manuel DNA izolasyonunda kullanılmıştır (Liu, 2000).

3.1.3.3. PCR İşleminde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

- Taq DNA Buffer(Thermo Scientific, 500 U)
- MgCl₂ Solusyonu (Thermo Scientific, 500 U)
- dNTP Karışımı(Thermo Scientific)
- Primerler (Invitrogen)

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (Samson, 2014)

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (Samson, 2014)

KQ1: 5'- CCTCTYTCCGACGGCAAGAC-3' (Martinez-Ruiz, 1999)

KQ2: 5'- GTTRGGATARGTRTAGATGACC-3' (Martinez-Ruiz, 1999)

- Taq DNA Polimeraz (Thermo Scientific, 500 U)

3.1.3.4. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

TBE (Tris Borik Asit Edta) Tamponu

- 5X Stok TBE: 10.8 gr Tris Base (Sigma T6066) , 5.5 gr Borik Asit (J.T.Baker 0501), 0.75 gr EDTA (Glenthams GE3023), 182.95 ml distile su
- 1X kullanıma hazır TBE: 200 ml 5X TBE, 800 ml distile su

Bu tampon agaroz jel elektroforezinde kullanılan agaroz jelin hazırlanmasında ve yürütme tankının doldurulmasında kullanılmıştır.

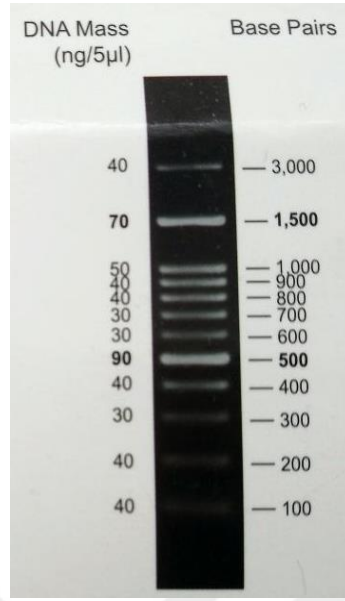
Jel Yükleme Tamponu (Thermo Fisher Scientific)

Ticari olarak satın alınan 6x Orange DNA Dye tamponu, jel yükleme tamponu olarak kullanılmıştır.

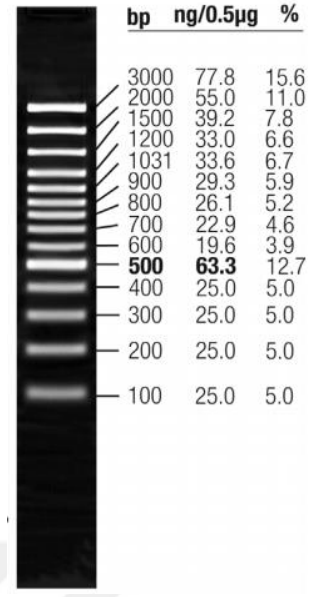
Nükleik asit boyası (Biotium Gelred)

Marker DNA'lar (GeneDireX, Fermentas GeneRuler)

Ticari olarak satın alınan marker DNA'lar PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra uygun boyutta olup olmadığının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.



GeneDireX, 100-3000 bp
DNA Ladder H3 RTU



Gene Ruler 100-3000 bp
DNA Ladder PLus

3.1.4 Çalışmada Kullanılan Ekipmanlar

- Terazı (Sartorius BP 610)
- Hassas terazı (GEC-AVERY)
- Mikrodalga (Arçelik MD574)
- Otoklav (HIRAYAMA- HICLAVE HVE-50)
- Vortex (Heidolph)
- Zoom Stereo Mikroskop (Nikon SMZ800)
- Çalkalamalı inkübatör (Shaker)- ZHICHENG®-ZHWHY-2112B
- İnkübatör (BINDER)
- Steril kabin (Labcaire BH18)
- Işık mikroskobu (Olympus CX22)
- Santrifüj (Hettich®- ROTINA35/35R)
- Isı bloğu (Stuart- SBH130D)
- Gradient termal döngü cihazı / Palm cyclers
- Yatay elektroforez (Consort HU13)
- Güç Kaynağı (1500V Sigma)

- Spektrofotometre (Varian 50)
- Jel görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat)

3.1.5. Referans Suş

Ribotoksin üreticisi olan *Aspergillus giganteus* NRRL 10 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmak amacı ile DSMZ'den sipariş edilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. Yem Örneklerinin Seyreltilmesi ve Toplam Küf Sayımı

3.2.1.1. Dökme Plaka Yöntemiyle Toplam Küf Sayımı

Hayvan yemi örneklerinin her birinden 10'ar gram tartılmış, örnekler alüminyum folyo üzerinde 105°C'de 16 saat pastör fırınında bırakılmış, sonrasında tekrar tartılmıştır. Aşağıdaki formülle kuru ağırlıkları hesaplanmıştır (Nursoy ve Şahin, 2017).

KM, g = (A3-A1/A2).

A1 = alüminyum folyo darası,

A2 = saf yem ağırlığı,

A3 = kurutulduktan ve soğutulduktan sonra dara+ yem

Kuru ağırlıkları hesaplanan yem örnekleri ve distile su ile erlenlerde 9'a 1 oranında yapılan ilk seyreltmelerden tüplere 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 'lik seyreltmeler hazırlanmıştır. Sonrasında dökme plakayla ekim yöntemi uygulanmıştır. Seyreltmelerden steril petrilere 1'er ml aktarılacak üzerine DG18 besiyerinden 25 ml (Yaklaşık 45°C'de) aktarılacak 25°C'de 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır.

Küf sayımlarında 10-150 koloni oluşturan petrilere esas alındığı için yem örneklerinin 7 günlük inkübasyonundan sonra bu aralıkta olan petrilere koloni sayımı yapılmıştır (Halkman, 2017). Daha sonra aşağıda verilen formül

kullanılarak yem örneklerinin toplam küf sayımı yapılmıştır (Gürgün ve Halkman, 1990).

$$\text{Sayı/ml veya g} = \frac{\text{Koloni sayısı} \times \text{Seyreltme Faktörü}}{\text{Seyreltmede alınan inokulum miktarı(1ml)}}$$

$$\text{Seyreltme faktörü} = \frac{1}{\text{Seyreltme oranı}}$$

3.2.2. Saflaştırma işlemleri

Koloni sayımından sonra petrilere farklı olduğu düşünülen küfler işaretlenmiş ve bunların saf üremesini sağlamak amacıyla Potato Dextrose Agar ile hazırlanan besiyer bulunan petrilere üç nokta ekimleri yapılmıştır. 27°C’de 5 gün inkübasyondan sonra saf bir üreme gerçekleşmeyen petrilere örneklerin ekimi ve inkübasyonu tekrarlanmıştır. 5 gün içerisinde üreme olmayan petrilere de 2 gün daha inkübasyona bırakılmış ve 7. günün sonunda saf üremesi gerçekleşmiş tüm örneklerin daha uzun süre saklanması amacıyla içerisinde potato dextrose agar bulunan yatık tüplere ekimleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Fenotipik Tanı

Saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen izolatların morfolojik ve mikroskopik özellikleri, Hasenekoğlu, 1991 ve Barnett and Hunter, 1998’de belirtildiği şekilde incelenerek genus düzeyinde fenotipik tanıları yapılmıştır.

Sonrasında bu izolatlardan *Aspergillus* ve *Penicillium* genuslarına ait olanlar belirlenip beş farklı *Aspergillus* ve *Penicillium* besiyerine üç nokta ekimleri yapılmış, yedi gün 25°C’de inkübasyona bırakılmıştır. (CYA37 besiyeri 37°C’de, CYA5 besiyeri 5°C’de)

- *Aspergillus* genusu için Czapek Yeast Agar(CYA 25°C, 37°C) , Malt Agar(MEA), %20 Sukrozlu Czapek Yeast Agar(CY20S)ve Czapek Dox Agar(CZ) (Klich, 2002; Samson and Pitt 2000; Samson et al., 2010),

- *Penicillium* genusu için Czapek Yeast Agar(CYA 5 °C, 25°C, 37°C), Malt Agar(MEA), %25 Glycerol Nitrate Agar (G25N) ve Neutral Creatine Sucrose Agar(CSN) besiyerleri kullanılmıştır (Pitt, 1985; Samson and Pitt 2000; Samson et al., 2010).

7 günlük inkübasyon sonrasında *Aspergillus* ve *Penicillium* izolatlarının fenotipik tanısı Klich, 2002, Pitt, 1985 ve Samson and Pitt, 2000’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Mikroskopik tayin için CYA25 besiyeri kullanılmış, kültürden bir öze yardımıyla alınan misel laktofenol çözeltisi ile lam-lamel arasına koyularak preparat hazırlanmış ve Olympus CX22 mikroskopunda incelenmiştir. *Aspergillus* ve *Penicillium* genusu üyeleri dışındaki diğer izolatların fenotipik tanısı Hasenekoğlu, 1991 ve Barnett and Hunter, 1998’de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

3.2.4. *Aspergillus* Genusu Üyelerinin Genotipik Tanısı

3.2.4.1. DNA İzolasyonu

Tür düzeyinde fenotipik tanısı yapılan *Aspergillus* örneklerinin 250 ml’lik erlenlerde bulunan 90 ml Malt Broth sıvı besiyerine ekimleri yapılmış ve çalkalamalı etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saatin sonunda üreme göstermeyen ya da kontamine olan örneklerin Malt Broth sıvı besiyerine ekimi tekrarlanmıştır. Üretilen organizma pelletlerinin steril filtre kağıdı ile süzme işlemi yapılmış ve steril eppendorflara alınmıştır. DNA izolasyonunda Liu et al. (2000) tarafından belirtilen yöntem esas alınmış ve modifiye edilerek uygulanmıştır.

- Eppendorflardaki örneklerin üzerlerine 500µl lizis buffer ilave edilmiş sonrasında hücre sıyrıcı çubuklarla mekanik parçalama gerçekleştirilmiştir.
- Mekanik parçalamadan sonra eppendorflar 5 dakika vortekslenmiş, sonrasında ısı bloğunda 20 dakika 65°C’de bekletilmiştir.

- Isıl işlemden sonra eppendorflara 150 µl potasyum asetat ilave edilmiş ve 15 dakika -20°C’de bekletilmiştir.
- Sonrasında eppendorflar 1 dakika vortekslenmiş ve 12.000 rpm’de 3 dakika santifüj edilmiştir.
- Santrifüjden sonra 500 µl süpernatant yeni steril eppendorflara aktarılmıştır.
- Potasyum asetat ilavesi ve santrifüj işlemi bir kere daha tekrarlanmış ve 500 µl süpernatant yeni steril eppendorflara aktarılmıştır.
- Daha sonra üzerlerine 500 µl izopropil alkol ilave edilmiş ve 12.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj işleminden sonra eppendorflardaki süpernatant dökülmüş, eppendorfların üzerine 300 µl %70’lik etanol ilavesi yapılmış ve -20°C’de 1 saat bekletilmiştir.
- Bekleme işleminden sonra eppendorflar 12.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant dökülerek 1 gece boyunca eppendorflarda kalan etanolün uçması için oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Etanolün uçmasından sonra eppendorflara 50 µl steril saf su ilave edilerek 1 gün bekletilmiştir. Bu şekilde moleküler identifikasyonda kullanılacak olan genomik DNA’lar elde edilmiştir.

3.2.4.2 Agaroz Jel Elektroforezi

Total DNA’nın varlığını ve saflığını kontrol edebilmek için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Tampon olarak TBE kullanılmış ve işlem %1 agaroz jel ile gerçekleştirilmiştir.

- Elektroforez tepsisinin açık olan uçları otoklav bandı ile kapatılır.
- Steril bir erlende 100 ml TBE tamponuna 1 g agaroz ilave edilerek kaynatılır.
- Tamponun sıcaklığı yaklaşık 45 °C sıcaklığa düştüğünde içerisine 1.5 µl nükleik asit boyası ilave edilir ve elektroforez tepsisine dökülerek

kuyucukların meydana gelmesi için her birinde 20 kuyucuk olan 2 tarak yükseklikleri 0.5-1 mm olacak şekilde yerleştirilir.

- Donma işlemi gerçekleştirildikten sonra elektroforez tankına yeterli miktarda TBE tamponu eklenir ve içerisine agaroz jel bulunan tepsi yerleştirilir.
- Elektroforez için 5 µl total DNA, 1 µl jel yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenir.
- Total DNA'lar 90V- 300mA- 50W elektrik akımında 60 dakika yürütülür.

3.2.4.3.Total DNA'ların Görüntülenmesi ve Miktar Tayini

İzole edilen tüm genomik DNA'ların bütünlükleri agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir. Genomik DNA'ların saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir.

Agaroz jel elektroforezi, 1.5 µl Jel Red ilaveli %1 agaroz (Sigma) içeren jelde gerçekleştirilmiştir. Jel hazırlanmasında ve elektroforezde TBE kullanılmış, 5 µl DNA solüsyonu, 1 µl yükleme solüsyonu ile karıştırılarak 85V'da 60 dakika süreyle yürütülmüştür. Genomik DNA'ların saflık kontrolleri ve miktar tayinleri ise nanodrop spektrofotometre ile yapılmıştır. DNA'ların 260 nm ve 280 nm'deki absorbanları hesaplanmış (OD 260 ve OD 280) ve bu değerler arasındaki oran kullanılarak DNA'nın saflığı kontrol edilmiştir. OD 260/OD 280 oranının 1,65-1,85 arasında olması DNA'nın saf olduğunu, bu aralıktan daha yukarı olması RNA kontaminasyonu olduğunu ve bu aralıktan daha aşağıda olması da protein kontaminasyonu olduğunu göstermektedir (Temizkan ve Arda, 1999). Saflık kontrolleri yapılan genomik DNA miktarlarının hesaplanması için OD 260 değerleri kullanılmış ve DNA miktarları; $\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD 260} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 50$ formülü ile hesaplanmıştır (Temizkan ve Arda, 1999).

3.2.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Genotipik tanı amacıyla, funguslarda korunmuş gen bölgesi olan ITS gen bölgesi için spesifik universal primerler ITS1 ve ITS4 primerlerinin kullanıldığı PCR gerçekleştirilmiştir (Samson, 2014).

ITS Gen Bölgesinin PCR Analizi

PCR işleminde ITS 1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ve ITS 4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' primerleri kullanılmıştır. DNA amplifikasyonu optimize edilmiştir (Samson, 2014). DNA amplifikasyonu 25 µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde bileşenler Çizelge 3.1'deki sıra ile koyulmuştur.

Çizelge 3.1. PCR tüpüne sırasıyla koyulan bileşikler ve miktarları

Bileşik	Miktar
Ultra saf su	17.3 µl
PCR reaksiyon tamponu	2.5 µl (10x)
MgCl ₂	2 µl (2 mM)
dNTP mix	0.5 µl
Primer ITS1	1 µl (10 pmol/µl)
Primer ITS4	1 µl (10 pmol/µl)
Taq Polimeraz	0.2 µl (2U)
Kalıp DNA	0.5 µl

Reaksiyon koşulları optimize edilmiş, Çizelge 3.2.'de gösterildiği gibi ayarlanarak amplifikasyon Thermal Cycler'da gerçekleştirilmiştir (Samson, 2014).

Çizelge 3.2. Amplifikasyonun sağlandığı PCR koşulları

İşlem	Döngü	Süre	Sıcaklık
Denatürasyon	1	3 dk	94°C
Denatürasyon	35	1 dk	94°C
Annealing (primer bağlanması)		1 dk	60°C
Elongasyon (uzama)		1 dk	72°C
Son uzama	1	5dk	72°C
Soğutma	-	Sınırsız	4°C

Reaksiyon bittikten sonra pcr ürünleri -20°C'de saklanır.

3.2.5. *Aspergillus* Türlerinde Ribotoksin Gen Bölgesinin Aranması

Genotipik tanısı yapılan 27 *Aspergillus* izolatının ribotoksin gen bölgesini bulundurup bulundurmadığının tespit edilmesi için ribotoksin gen bölgesine spesifik olduğu belirtilen KQ1 ve KQ2 primerleri ile PCR yapılmıştır. Referans suş olarak α -sarcin gen bölgesini içeren *Aspergillus giganteus* NRRL10 suşu temin edilmiş ve PCR sürecinde pozitif (+) kontrol olarak kullanılmıştır. (Martinez-Ruiz et al., 1999).

Ribotoksin Gen Bölgesinin PCR ile Saptanması

PCR işleminde bilinen *Aspergillus* ribotoksin dizileri içinde korunan bölgelere karşılık gelecek şekilde dizayn edilmiş KQ1: 5'-CCTCTYTCCGACGGCAAGAC-3' ve KQ2: 5'-GTTRGGATARGTRTAGATGACC-3' primerleri kullanılmıştır. DNA amplifikasyonu optimize edilmiştir (Martinez-Ruiz et al., 1999). Toplam reaksiyon hacmi 25 μ l olacak şekilde bileşenler Çizelge 3.3.'deki sıra ile koyulmuştur.

Çizelge 3.3. PCR tüpüne sırasıyla koyulan bileşikler ve miktarları

Bileşik	Miktar
Ultra saf su	16.3 μ l
PCR reaksiyon tamponu	2.5 μ l (10x)
MgCl ₂	2.5 μ l (2.5 mM)
dNTP mix	0.5 μ l
Primer KQ1	1 μ l (10 pmol/ μ l)
Primer KQ2	1 μ l (10 pmol/ μ l)
Taq Polimeraz	0.2 μ l (1U)
Kalıp DNA	1 μ l

Reaksiyon koşulları optimize edilmiş, Çizelge 3.4.'de gösterildiği gibi ayarlanarak amplifikasyon Thermal Cycler'da gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. Amplifikasyonun sağlandığı PCR koşulları

İşlem	Döngü	Süre	Sıcaklık
Denatürasyon	1	5 dk	94°C
Denatürasyon	35	30 sn	95°C
Annealing (primer bağlanması)		1 dk	55°C
Elongasyon (uzama)		1 dk	72°C
Son uzama	1	7 dk	72°C
Soğutma	-	Sınırsız	4°C

Reaksiyon bittikten sonra pcr ürünleri -20°C’de saklanır.

3.2.6. DNA Dizi Analizi ve Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Genotipik tür tanısı için 27 *Aspergillus* izolatına ait ITS gen bölgesinin amplifikasyonu sonucunda elde edilen ürünleri, MEDSANTEK firmasından hizmet alımı gerçekleştirilerek dizi analizine yollanmıştır. Analizden gelen sekans sonuçları Finch TV (Blast) ve ApE programları kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, tür tayini araştırmacıların kullanımına açık olan Gen Bankası’nın <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (NCBI) web sayfasında, nükleotid dizileri kıyaslanarak incelenmiş ve *Aspergillus* izolatlarının genotipik tür tanısı yapılmıştır. Genotipik tür tanısı yapılan *Aspergillus* izolatlarının, bilinen *Aspergillus* ribotoksin dizileri içinde korunan bölgelere karşılık gelen KQ1 ve KQ2 primerleri ile amplifikasyonu sonucunda elde edilen ürünleri, ribotoksin gen bölgesi varlığının incelenmesi için ALTIGENBIO firmasından hizmet alımı gerçekleştirilerek dizi analizine yollanmıştır. Analizden gelen sekans sonuçları Finch TV (Blast) ve ApE programları kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (NCBI) web sayfasında, nükleotid dizileri kıyaslanarak ribotoksin gen bölgesi varlığı bakımından incelenmiştir.

4.BULGULAR

4.1. Genel Bulgular

Çalışmamızda Ege Bölgesinde büyükbaş ve küçükbaş hayvan yemi satan yerlerden alınan 16 hayvan yemi örneği kullanılmıştır. Hayvan yemlerinin dökme plaka yöntemi sonrasında yapılan toplam küf sayımı sonuçları aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 4.1. Yem örneklerinden izole edilen küflerin sayıları (kob/gr)

Örnek No	Küf kolonilerinin Sayısı	Örnek No	Küf Kolonilerinin Sayısı
1	$1,0 \times 10^3$ kob/gr	9	$1,4 \times 10^2$ kob/gr
2	$1,1 \times 10^2$ kob/gr	10	$6,0 \times 10^1$ kob/gr
3	$1,2 \times 10^2$ kob/gr	11	$1,4 \times 10^2$ kob/gr
4	$4,5 \times 10^2$ kob/gr	12	$5,1 \times 10^2$ kob/gr
5	$6,9 \times 10^2$ kob/gr	13	$9,0 \times 10^1$ kob/gr
6	$5,0 \times 10^1$ kob/gr	14	$2,1 \times 10^2$ kob/gr
7	$8,0 \times 10^2$ kob/gr	15	$1,8 \times 10^3$ kob/gr
8	$2,8 \times 10^2$ kob/gr	16	$3,8 \times 10^2$ kob/gr

16 yem örneğinden toplamda 63 fungus izole edilmiştir. Fenotipik tanılama sonucunda bu izolatların genus dağılımı; 27 *Aspergillus*, 13 *Penicillium*, 9 *Rhizopus*, 6 *Mucor*, 3 *Fusarium*, 2 *Alternaria*, 1 *Paecilomyces*, 1 *Cladosporium* ve 1 *Aureobasidium* şeklindedir.

Aspergillus türleri haricinde diğer genuslarda fenotipik olarak tanılanan türler; *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium herbarum*, *Aureobasidium pullulans*, *Alternaria alternata*, *Rhizomucor miehei*, *mucor miehei*, *mucor racemosus*, *Penicillium viridicatum*,

Penicillium variabile, *Penicillium islandicum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium chrysogenum* ve *Penicillium aurantiogriseum* şeklindedir (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3).

Çizelge 4.2. Yem Örneklerinde Saptanan Türler

Örnek No	Fungal Türler
1	<i>Aspergillus brasiliensis</i> Varga, Frisvad & Samson 2007 <i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prins. Geerl. 1895 <i>Aspergillus pseudoglaucus</i> Blochwitz 1929 <i>Aspergillus flavus</i> Link 1809 <i>Aspergillus amstelodami</i> Thom & Church 1926
2	<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church 1926 <i>Penicillium viridicatum</i> Westling 1911 <i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prins. Geerl. 1895 <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. 1881 <i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link 1816 <i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud 1918
3	<i>Aspergillus aculeatus</i> Iizuka 1953 <i>Aspergillus amstelodami</i> Thom & Church 1926 <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen. 1863 <i>Penicillium chrysogenum</i> Thom 1910
4	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i> Blochwitz 1929 <i>Aspergillus niger</i> Tiegh. 1867 <i>Aspergillus tritici</i> B.S. Mehrotra & M. Basu 1976 <i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prins. Geerl. 1895 <i>Mucor racemosus</i> Bull. 1791 <i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl. 1824
5	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh. 1867 <i>Aspergillus ruber</i> Thom & Church 1926 <i>Penicillium variabile</i> Sopp 1912 <i>Penicillium islandicum</i> Sopp 1912 <i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prins. Geerl. 1895 <i>Mucor miehei</i> Cooney & R. Emers. 1964

Çizelge 4.3. Yem Örneklerinde Saptanan Türler (devam)

Örnek No	Fungal türler
6	<i>Aspergillus amstelodami</i> Thom & Church 1926 <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill. 1902 <i>Mucor miehei</i> Cooney & R. Emers. 1964 <i>Penicillium expansum</i> Link 1809
7	<i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prins. Geerl. 1895 <i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx 1901
8	<i>Penicillium expansum</i> Link 1809 <i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prins. Geerl. 1895 <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. 1912 <i>Aspergillus amstelodami</i> Thom & Church 1926
9	<i>Aspergillus clavatus</i> Desm. 1834 <i>Penicillium chrysogenum</i> Thom 1910 <i>Mucor miehei</i> Cooney & R. Emers. 1964 <i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl. 1824 <i>Aspergillus amstelodami</i> Thom & Church 1926
10	<i>Aspergillus amstelodami</i> Thom & Church 1926 <i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prins. Geerl. 1895
11	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i> Blochwitz 1929 <i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx 1901 <i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prins. Geerl. 1895
12	<i>Aspergillus flavus</i> Link 1809 <i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh. 1877 <i>Penicillium chrysogenum</i> Thom 1910 <i>Aspergillus amstelodami</i> Thom & Church 1926
13	<i>Aspergillus terreus</i> Thom 1918 <i>Aspergillus flavus</i> Link 1809 <i>Penicillium viridicatum</i> Westling 1911
14	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i> Blochwitz 1929 <i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx 1901
15	<i>Aspergillus amstelodami</i> Thom & Church 1926 <i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx 1901 <i>Mucor miehei</i> Cooney & R. Emers. 1964 <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. 1912
16	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i> Blochwitz 1929 <i>Paecilomyces variotii</i> Bainier 1907 <i>Rhizomucor miehei</i> (Cooney & R. Emers.) Schipper 1978

4.2. Yem Örneklerinden İzole Edilen *Aspergillus* Türleri

Aspergillus genusuna ait 27 izolat içerisinde saptanan türler; *Aspergillus pseudoglaucus* (5), *Aspergillus amstelodami* (8), *Aspergillus flavus* (3), *Aspergillus niger* (2), *Aspergillus ruber* (1), *Aspergillus brasiliensis* (1),

Aspergillus clavatus (1), *Aspergillus terreus* (1), *Aspergillus fumigatus* (1), *Aspergillus aculeatus* (1) , *Aspergillus tritici* (1), *Aspergillus ochraceus* (1) ve *Aspergillus sydowi* (1) şeklindedir.

4.2.1 Yem Örneklerinden İzole Edilen *Aspergillus* Türlerinin Sistematığı

Hayvan yemlerinden izole edilen ve tür düzeyinde fenotipik ve genotipik tanısı yapılan *Aspergillus* türlerinin sistematik sıralaması aşağıdaki gibidir.

Regnum: *Fungi*

Phylum: Ascomycota

Classis: Eurotiomycetes

Subclassis: Eurotiomycetidae

Ordo: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Genus: *Aspergillus* P. Micheli ex Link 1809

Species: *Aspergillus aculeatus* Iizuka 1953

Aspergillus brasiliensis Varga, Frisvad & Samson 2007

Aspergillus clavatus Desm. 1834

Aspergillus flavus Link 1809

Aspergillus fumigatus Fresen. 1863

Aspergillus niger Tiegh. 1867

Aspergillus ochraceus G. Wilh. 1877

Aspergillus pseudoglaucus Blochwitz 1929

Aspergillus ruber Thom & Church 1926

Aspergillus sydowii(Bainier & Sartory) Thom & Church 1926

Aspergillus terreus Thom, 1918

Aspergillus tritici B.S. Mehrotra & M. Basu 1976

Aspergillus amstelodami Thom & Church 1926

4.3. *Aspergillus* Türlerinin Fenotipik Tayini

Fenotipik tayinler Klich, 2002 ve Samson, 2010'da belirtilen tayin anahtarı kullanılarak yapılmıştır. Klich, 2002 ve Samson, 2010'a göre belirlenen türlerin özellikleri sırasıyla verilmiştir.

4.3.1. *Aspergillus clavatus* Desm. 1834

25°C'de 7 günlük inkübasyon sonrasında Koloni Çapları (mm): CYA25 37–48; MEA 35–45; CY20S 35–54; CYA 37 8–30; CZ 25–35.

Koloni Renkleri ve Tekstür. CYA25'de koloniler soluk yeşil, grimsi turkuaz, koyu turkuaz veya soluk yeşil renkte, miselyum beyaz, belli belirsiz veya yünümsüdür. Eksuda eğer mevcutsa renksizdir. Ters yüzey soluk sarı veya soluk kahve renkte olabilir. Koloni tekstürü yünümsüdür ve üzerine ışınal yarıklar oluşturmuştur. MEA'da konidya soluk yeşil, grimsi yeşil veya grimsi turkuaz renktedir. Miselyum çok göze çarpmayan beyaz renkte, çoğunlukla düzensiz ve yünümsü olan konidyal alanlar dışında koloni zayıf ve küçüktür. Koloni tekstürü, özellikle merkez kısımlarda, yünümsüdür. CY20S'de koloni rengi ve tekstür CYA25'e benzerdir fakat eksuda bulunmaz. CYA37'de konidya daha az olmasıyla birlikte diğer özellikler CYA25'e benzerdir. Bazı izolatlarda CYA 37'de üreme görülmez. CZ'de koloni morfolojisi CYA25'e benzer, ters yüzey rengi daha az yoğundur.

Mikroskopik Karakteristikler. Konidial başlar ışınaldır. Konidiofor (300) 500–2000 (3000) x (5) 10–30 µm; konidiofor çeperi pürüzsüz, renksiz, bazen çok soluk kahverengidir. Gittikçe genişleyen klavat veziküller (8) 10–75 (90) µm çapındadır, daha küçük veziküller bazen pyriformdur, konidial zonlar vezikülün başından aşağıya doğru 12-250 µm genişler. Uniseriattır. Phialidler (6) 7–10 x (14) 2–3,5 (4) µm'dir. Konidia pürüzsüz, elipsoidal, bazen pyriform, apikulat ya da elipsoidal olabilir, çoğunlukla silindirik yapıda olup 3,6 X 2,5-4 µm çapındadırlar.

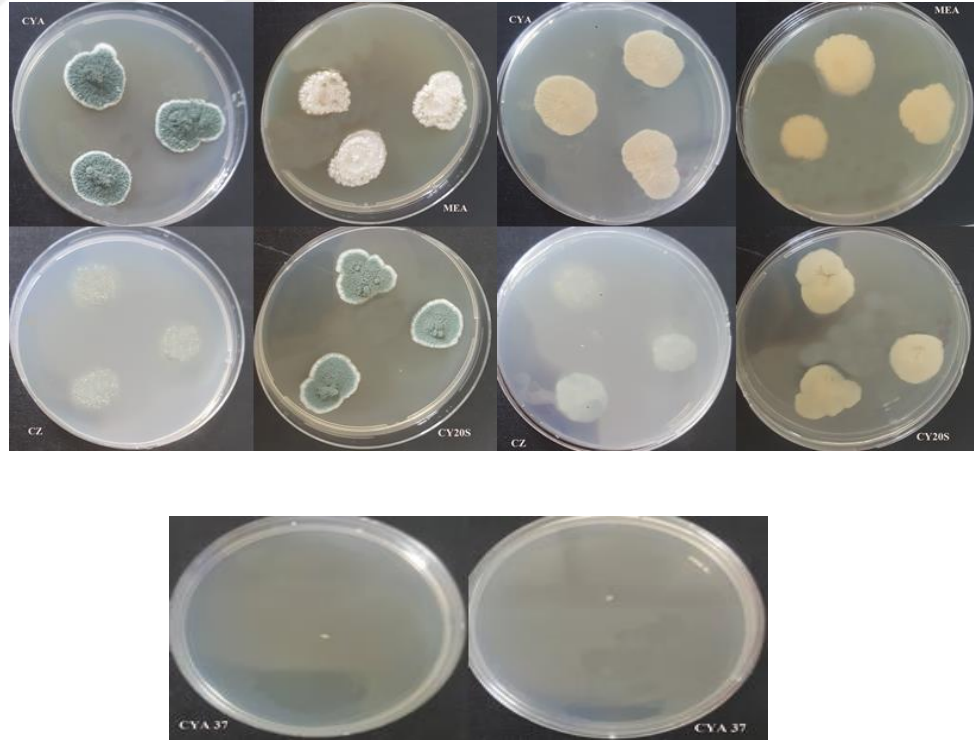
Ayırt Edici Özellikleri. *A. clavatus*'un en ayırt edici özelliği, 250 µm uzunluğundaki verimli alanları ile tokmak şeklindeki vezikülleri ve büyük bir

oluşuma sahip olmasıdır. Konidial başlar sık dizilmiş phialidler şeklinde olup uniseriattır. Konidya soluk turkuaz, koyu turkuaz ya da soluk yeşildir.

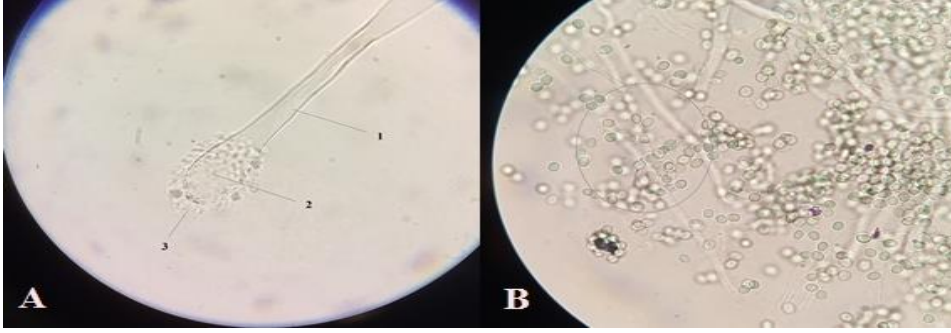
Taksonomik Referanslar. Raper & Fennell, 1965; Christensen, 1982; Klich & Pitt, 1985; Klich & Pitt, 1988; Kozakiewicz, 1989; Tzean *et al.*, 1990; Pitt & Hocking, 1997; Samson *et al.*, 2000.

Habitat. *Aspergillus clavatus* sıcak iklimlerdeki topraklarda daha yaygın bulunan bir toprak fungusudur (Domsch *et al.*, 1980). Yapılan çalışmalarda, ormanlarda, çöllerde, işlenen topraklarda ve enlem derecesi 25° ve 36° olan bölgelerde bulunma sıklığından daha fazla olduğu belirtilmiştir (Klich, 2002). Özellikle tahıllar olmak üzere çok çeşitli gıdalarda (Pitt & Hocking, 1997; Flannigan, 1986) ve kapalı ortamlarda (Samson *et al.*, 2001) oldukça fazla dağılım göstermektedir.

Bu türün tanınması Klich (2002) ve Samson (2010)'a göre yapılmış olup, makroskopik ve mikroskopik görüntüleri Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.' de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Aspergillus clavatus* CYA25, MEA, CZ, CY20S VE CYA 37 besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler



Şekil 4.2. *Aspergillus clavatus* (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia

4.3.2. *Aspergillus flavus* Link 1809

25°C’de 7 günlük inkübasyon sonrasında Koloni Çapları (mm): CYA25 65–70; MEA 65–70; CY20S 65–70; CYA37 55–65; CZ 55–65.

Koloni Renkleri ve Tekstür. CYA25’de koloniler koyu yeşil, zeytin yeşili ya da zeytin renklidir, bazen yeşilimsi sarı ya da zeytin sarısı kaplı alanlar bulunabilir. Miselyum beyazdır. Sklerotia eğer bulunuyorsa koyu kahverengi ya da siyah renklere sahiptir. Eksuda eğer mevcutsa renksiz ya da kahverengi olabilir. Ters yüzey renksiz, soluk kahve ya da turuncumsu renkte olabilir. Koloni tekstürü çeşitlilik gösterir fakat genelde 2–3 mm derinlikte ve yünüksüdür. MEA’da konidia zeytin rengi, nadiren koyu yeşil renktedir. Miselyum belirgin olmamakla birlikte beyaz renktedir. Sklerotia mevcutsa, kahverengi siyah renklere sahiptir. Koloni tekstürü, özellikle merkez kısımlarda, yünüksüdür. CY20S’de koloni morfolojisi CYA25’e benzer fakat eksuda bulunmaz ve ters yüzey rengi nadiren parlak sarı renktedir. CYA37’de konidia rengi zeytin yeşili ya da zeytin kahverengisidir. Diğer özellikler CYA25’e benzemektedir. CZ’de koloni morfolojisi CYA25’e benzerdir.

Mikroskopik Karakteristikler. Konidial başlar ışınal ya da kolumnardır. Konidiofor (250) 400–800 (2500) x 8–17 µm; konidiofor çeperi pürüzlü, nadiren az pürüzlü, renksiz, bazen çok soluk kahverengidir. Veziküller küresel ya da elongat olabilir ve (12) 20–45 (85) µm çapındadır. CYA25’te en az %20si biserial olan izolatların hemen hemen hepsi MEA’da uniseriat olarak görülür. Metula

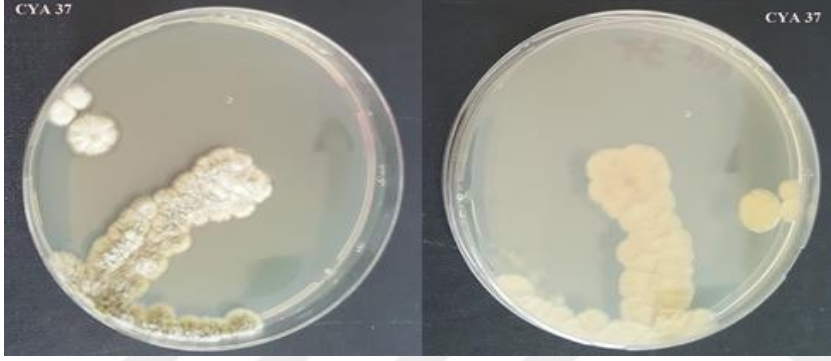
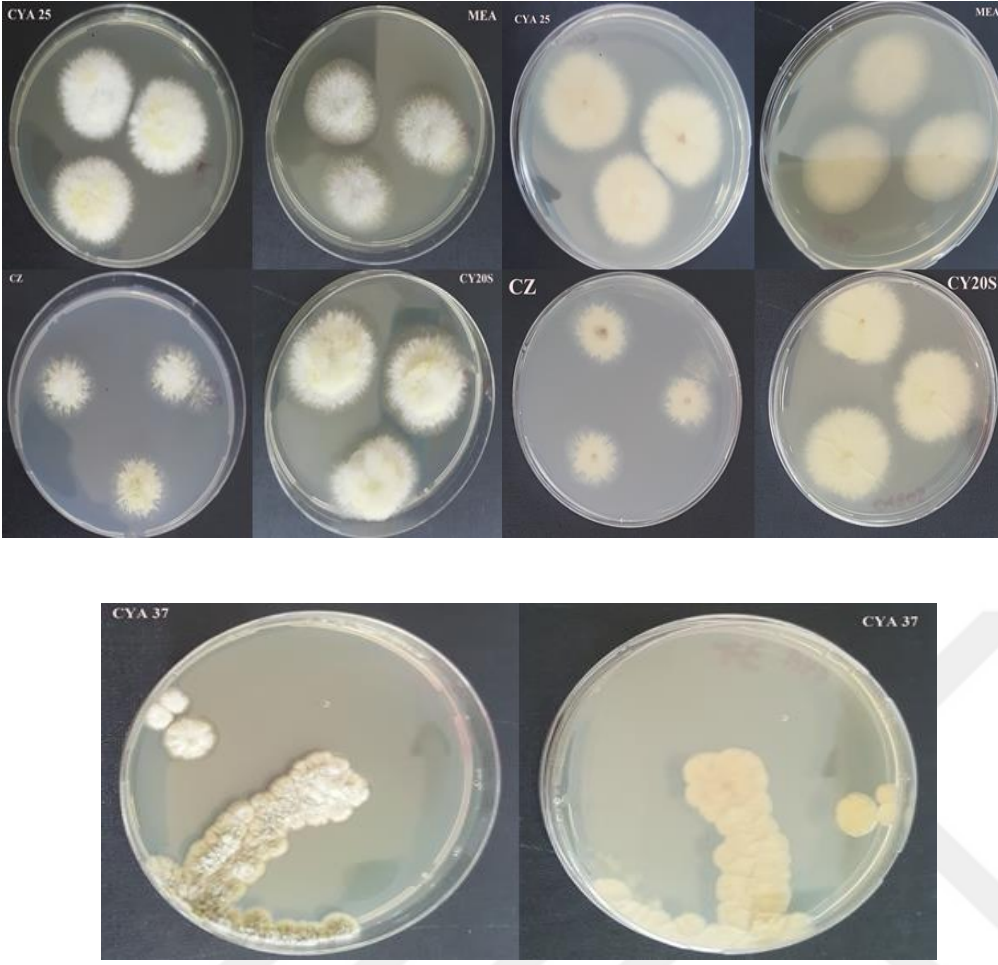
vezikülün dörtte üçünü ya da tümünü kaplamaktadır, (6) 8–10 (16) x (4) 5–7 (9) µm; phialidler 7–12 x (2,5) 3–4 (5) µm'dir. Konidia globoz ya da elipsoidal olabilir, 3–6 µm çapındadırlar, çeperleri düz ya da hafif pürüzlüdür.

Ayırt Edici Özellikleri. Konidioforları pürüzlü çepere sahip ve 3–6 µm boyutlarında, sporları düz ya da hafif pürüzlü çepere sahip; yaygın dağılmış sarı-yeşil renkli koloniler bu türün en ayırt edici özellikleridir. *A. flavus* *A. oryzae*'den daha az yünümsü tekstürü, daha yeşilimsi renkleri ve daha küçük boyutlu sporları ile; *A. parasiticus*'tan ise düz çeperli sporları ile ayrılır.

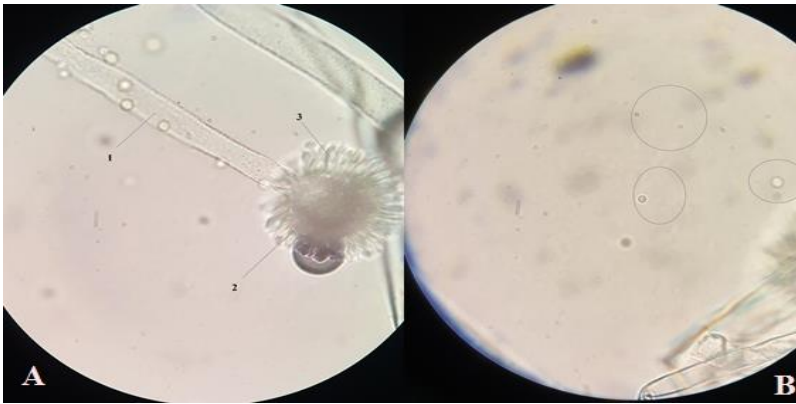
Taksonomik Referanslar. Raper & Fennell, 1965; Christensen, 1982; Klich & Pitt, 1985; Klich & Pitt, 1988; Kozakiewicz, 1989; Tzean *et al.*, 1990; Pitt & Hocking, 1997; Samson *et al.*, 2000.

Habitat. *A. flavus* tüm dünyada yaygın olarak görülen bir türdür. En çok bildirilen gıda kaynaklı funguslardan biridir, aynı zamanda çürüten bitkiler, tahıllar, tohumlar ve hem iç alan hem de dış alanlarda pek çok substrat üzerinde büyüeyebilirler. (Pitt & Hocking, 1997; Samson *et al.*, 2001). Böcek ve hayvan patojeni olduğu bildirilmiştir. İzolatların yaklaşık olarak yarısı aflatoksin üretmektedir. (Domsch *et al.*, 1980; Christensen, 1981; Diener *et al.*, 1987). 26–35°C'lik sıcaklıklarda beklendiğinden daha yaygın olduğu bildirilmiştir. (Klick, 2002)

Bu türün tanınması Klich (2002) ve Samson (2010)'a göre yapılmış olup kolonilerin makroskobik ve mikroskobik özellikleri Şekil 4.3 ve Şekil 4.4.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. *Aspergillus flavus* CYA25, MEA, CZ, CY20S VE CYA 37 besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler



Şekil 4.4. *Aspergillus flavus* (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia

4.3.3. *Aspergillus fumigatus* Fresen. 1863

25°C'de 7 günlük inkübasyon sonrasında Koloni Çapları (mm): CYA25 40–70; MEA 45–70; CY20S 40–70; CYA37 60–70; CZ 45–60.

Koloni Renkleri ve Tekstür. CYA25'de konidya gri turkuaz, koyu turkuaz, koyu yeşil ya da soluk yeşil renktedir. Miselyum beyazdır. Eğer eksuda varsa renksizdir. Ters yüzey renksiz, sarımsı, kırmızımsı kahverengi ya da yeşil olabilir. Çözünür pigment genelde üretilmez ancak nadiren kırmızımsı kahve renklerde çözünür pigment görülebilir. Tekstür kadifemsi yünümsü şeklinde değişiklik gösterebilir. Düz ya da ışınsal yarıklar görülebilir. MEA'da konidia rengi CYA25'deki gibidir; miselyum belli belirsiz beyaz renktedir. Ters yüzeyi renksiz, soluk sarı ya da gri renktedir. Eğer çözünür pigment varsa ters yüzey rengiyle aynı renktedir. Tekstür CYA 25 ile benzerdir. CY20S'de eksuda bulunmaz, diğer morfolojik özellikler CYA25 ile aynıdır. CYA37'de konidya CYA25'dekine benzer ya da grimsi kahverengi renktedir. CZ'de koloni morfolojisi CYA25 ile benzerdir.

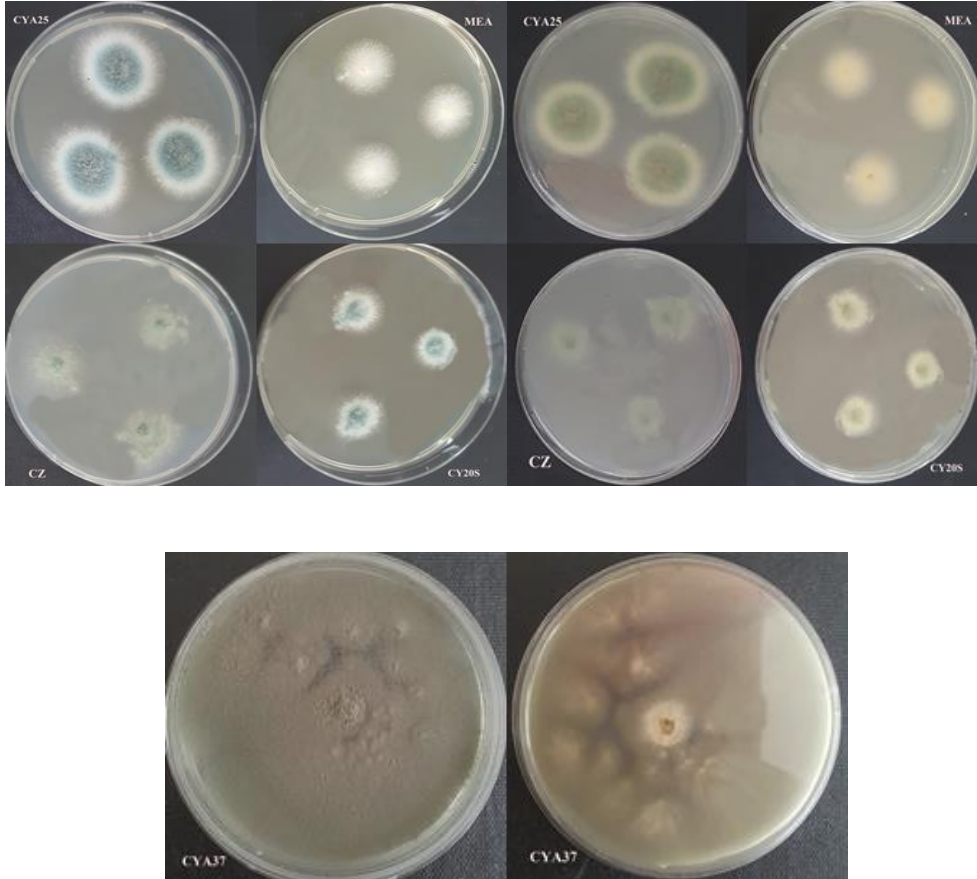
Mikroskopik Karakteristikler. Konidial başlar kolumnar, konidioforlar renksiz ya da apikale yakın bölgelerde grimsi, düz çepirli, (100) 200–400 (580) µm boyutlarındadır. Yaşlanmaya bağlı olarak priformdan spatulata dönüşür. Veziküller (10) 15–30 (40) µm çapında ve uniseriattır. Fiyalidler 5–9 x 2–3 µm boyutlarındadır ve vezikülün üst yarısını ya da üçte ikisini kaplamaktadır. Tüm fiyalidler birbirine ve konidiofor eksenine paralel görünürler. Konidya globoz ya da elipsoidal, düz çepirli, hafif pürüzlü ya da spinoz olabilir ve 2–3 (3,5) µm çapındadır.

Ayırt Edici Özellikleri. Bu tür turkuaz, koyu yeşil tonlarında olan ve hızlı büyüyen kolonileri ve fiyalidlerinin birbirine ve konidyofor eksenine paralel olması ile ayırt edilebilir.

Taksonomik Referanslar. Raper & Fennell, 1965; Domsch *et al.*, 1980; Klich & Pitt, 1988; Kozakiewicz, 1989, Tzean *et al.*, 1990; Pitt & Hocking, 1997; Samson *et al.*, 2000.

Habitat. *A. fumigatus* oldukça yaygın görülen bir türdür. Oldukça geniş bir sıcaklık aralığında iyi büyüme gösterir. İnsan ve hayvan patojenidir. Solunum sistemi ya da akciğerlere invazyonu ile sonuçlanan sistemik mikozların sorumlusudur. Kapalı ve açık alanlarda, toprak, bitkiler, tohumlar, çamur, pamuk, kompost ve hatta penguen dışkısı gibi çok çeşitli substratlardan izole edilmiştir (Domsch *et al.*, 1980; Ellis, 1980; Samson *et al.*, 2001; Klich, 2002).

Bu türün tanınması Klich (2002) ve Samson (2010)'a göre yapılmış olup kolonilerin makroskobik ve mikroskobik özellikleri Şekil 4.5. ve Şekil 4.6. 'da gösterilmiştir.



Şekil 4.5. *Aspergillus fumigatus* CYA25, MEA, CZ, CY20S VE CYA 37 besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler



Şekil 4.6. *Aspergillus fumigatus* (A) 1: Konidyoforesis, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia

4.3.4. *Aspergillus niger* Tiegh. 1867

25°C’de 7 günlük inkübasyon sonrasında Koloni Çapları (mm): CYA25 55–70; MEA 50–70; CY20S 68–70; CYA37 50–70; CZ 40–62.

Koloni Renkleri ve Tekstür. **CYA25**’de konidyal alanlar siyah ya da çok koyu kahverengi ve yoğundur. Hifler genelde belli belirsiz, beyaz ya da soluk sarı renklidir. Eğer sklerotia mevcutsa krem ya da ten rengi ve soluk pembe renklidir. Eğer eksuda mevcutsa renksizdir. Ters yüzey renksiz ya da sarı renkli olabilir. Çözünür pigment bulunmaz ve koloni tekstürü granüler, yünümsü ya da bazen ışınsal sulkattır. **MEA**’da konidyal alanlar siyah rentedir. Miselyum belli belirsiz beyaz renktedir. Ters yüzey renksiz, koloniler granüler ya da yünümsüdür. **CY20S**’de koloni görünümü CYA25’e benzer fakat ters yüzey rengi genelde daha yoğundur. **CYA37** ve **CZ**’de koloniler görünüm olarak CYA25’dekilere benzerdir.

Mikroskopik Karakteristikler. Konidial başlar ışınsaldır, konidioforlar (300) 400–3000 x (7) 12–17 (20) µm’dir. Konidyoforesis düz, hyelin ya da

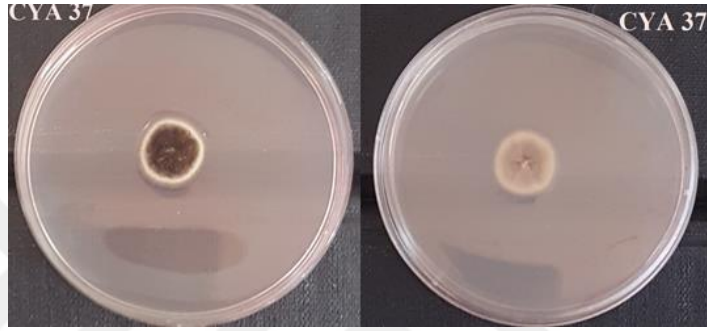
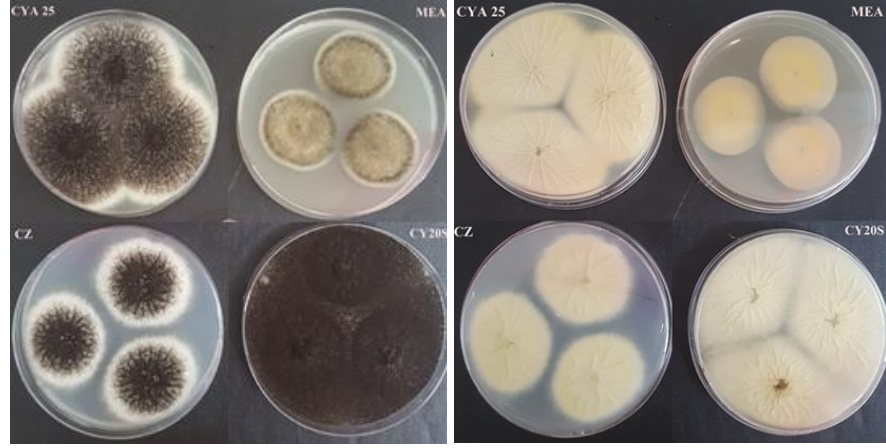
özellikle apikale yakın kısımlarda hafif kahverengidir. Veziküller (20) 30–75 (85) µm çapında, küresele yakın; biseriattır (çok nadiren uniseriat). Metula vezikülün tüm yüzeyini kaplar, 12–20 (40) x 3–6 µm boyutlarındadır. Fiyalidler 7–10 x 3–4 µm'dir. Konidya globoz ve (3) 3,5–4,5 (5) µm çapındadır. Çeperi genelde çok pürüzlü, nadiren az pürüzlüdür.

Ayırt Edici Özellikleri. Yaygın görülen bu tür genellikle çok koyu kahverengi ya da siyah olan kolonileri, büyük veziküllü biseriat konidial başı, oldukça uzun olan metulası ve düzensiz pürüzlü konidyası ile ayırt edilir.

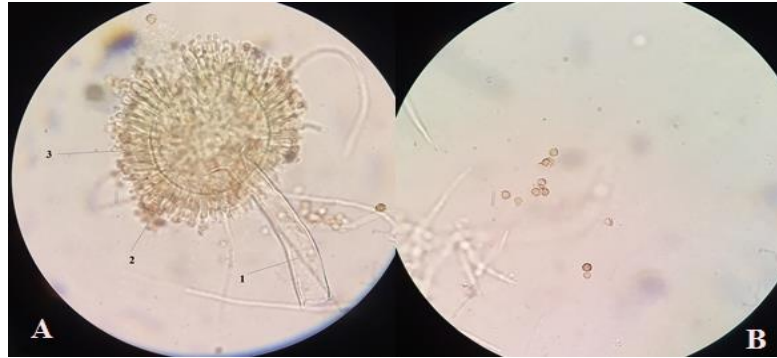
Taksonomik Referanslar. Raper & Fennell, 1965; Al-Musallam, 1980; Klich & Pitt, 1988; Kozakiewicz, 1989, Tzean *ve ark*, 1990; Pitt & Hocking, 1997; Samson *et al.*, 2000.

Habitat. Yaygın görülen bu tür genelde topraktan, bitki atıklarından, bitki rhizosferlerinden, tahıllardan, kurutulmuş meyveler ve fındık gibi sert kabuklu yemişlerden izole edilir. Gıdalarda ve kapalı alanlarda en sık görülen türlerden biridir.

Bu türün tanınması Klich (2002) ve Samson (2010)'a göre yapılmış olup kolonilerin makroskopik ve mikroskopik özellikleri Şekil.4.7. ve Şekil.4.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. *Aspergillus niger* CYA25, MEA, CZ ve CY20S ve CYA37, besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler



Şekil 4.8. *Aspergillus niger* (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Biseriat sterigmata, (B) Konidia

4.3.5. *Aspergillus ochraceus* G. Wilh. 1877

25°C’de 7 günlük inkübasyon sonrasında Koloni Çapları (mm): CYA25 35–59; MEA 44–55 (57); CY20S 44–70; CYA37 0–35; CZ 22–42.

Koloni Renkleri ve Tekstür. CYA25’de konidya buğday ya da ten rengidir. Miselyum beyazdır. Hifler genelde belirgin değildir. Tekstürü yünümsüdür. Eğer sklerotia mevcutsa soluk pembe renktedir. Eğer eksuda mevcutsa renksiz, sarı ya da soluk kırmızıdır. Ters yüzey soluk sarı, grimsi kırmızı ya da kahverengi renkte olabilir. Koloni tekstürü zayıf, yünümsü, düz, bazen sulkattır. **MEA**’da konidya genelde yoğun değildir. Konidya rengi soluk sarıdan açık sarıya ya da kehribar rengine kadar değişiklik gösterebilir. Miselyum belli belirsiz beyazdır. Tekstür yünümsü, ters yüzey rengi sarı, soluk turuncu ya da grimsi altın tonlarındadır. Koloniler yoğun sporulasyon göstermezler, görünüşleri değişiklik gösterebilir. **CY20S**’de koloni görünümü ters yüzey renginin kahverengi tonlarda olması dışında CYA25’e benzerdir. **CYA37**’de konidya oluşumu aralıklıdır, koloni yoğun ve kıvrılmış olup diğer karakteristik özellikler CYA 25’ deki benzerdir. CZ’de çözülebilir pigment gözlenmemesi haricinde koloniler görünüm olarak CYA25’deki benzerdir.

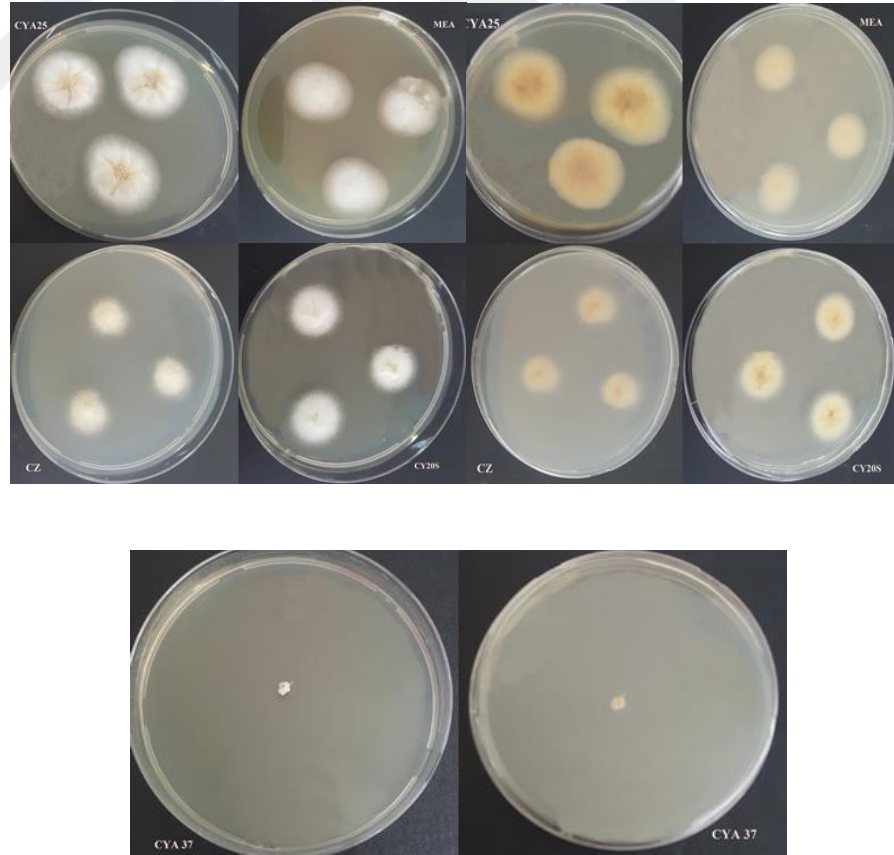
Mikroskopik Karakteristikler. Konidyal başlar ışınımsaldır, konidioforlar (100) 300–1700 µm, konidyofor çeperi hafif pürüzlü, hyalin ya da özellikle apikale yakın kısımlarda renksiz, sarımsı veya soluk kahverengidir. Veziküller (12) 25–55 (80) µm genişliğinde, globoz, elongat, biseriattır. Vezikülün üzerinde metulalar sıkı bir şekilde dizilmiştir, (5) 6–12 (30) x 2–6 µm boyutlarındadır; Fiyalidler 7–12 (14) x 2–3 µm’dir. Konidya globoz ve (2) 2,5–3,5 (4,5) µm çapındadır; çeperi genelde pürüzsüz, çoğu zaman elipsoidal yapıda olup nadiren apikulattır.

Ayrt Edici Özellikleri. Bu tür için en temel ayrt edici özellikler sarımsı ten rengine koloniler, küçük (2,5- 3,5 µm) pürüzsüz konidyalı ve pembe-eflatun sklerotialarıdır.

Taksonomik Referanslar. Raper & Fennell, 1965; Domsch et al., 1980; Christensen, 1982; Klich & Pitt, 1988; Kozakiewicz, 1989, Tzean ve ark, 1990; Pitt & Hocking, 1997; Samson *et al.*, 2000.

Habitat. Yaygın görülen bu türün büyük çoğunluğu tropikal alanlardan (enlem 0°-15° arası) ve çöl topraklarından izole edilmiştir. Ancak aynı zamanda diğer topraklarda, bitki atıklarında, bitki rhizosferlerinde, depolanan tahıllarda, geniş çeşitlilikteki gıdalarda ve kapalı alanlarda izole edilmiştir (Domsch et al., 1980; Pitt & Hocking, 1997; samson et al., 2001; Klich, 2002).

Bu türün tanınması Klich (2002) ve Samson (2010)'a göre yapılmış olup kolonilerin makroskobik ve mikroskobik özellikleri Şekil 4.9. ve Şekil 4.10' da gösterilmiştir



Şekil 4.9. *Aspergillus ochraceus* CYA25, MEA, CZ ve CY20S ve CYA37, besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler



Şekil 4.10. *Aspergillus ochraceus* (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Biseriat sterigmata, (B) Konidia

4.3.6. *Aspergillus sydowii* (Bainier & Sartory) Thom & Church 1926

25°C’de 7 günlük inkübasyon sonrasında Koloni Çapları (mm): CYA25 20–30; MEA 22-30; CY20S 24–35 CYA37 2-10; CZ 20-27.

Koloni Renkleri ve Tekstür. CYA 25’de konidyal çok yoğun, grimsi turkuaz ya da koyu turkuaz ya da koyu gri renktedir. Miselyum beyazdır. Eğer eksuda mevcutsa kırmızımsı kahverengi ya da koyu kahverengidir. Ters yüzey kahvengi, turuncumsu kahverengi ya da kestane rengindedir. Eğer çözünür pigment mevcutsa rengi ters yüzey gibidir. Koloniler kadifemsi ve ışınsal sulkattır. MEA’daki konidyal grimsi turkuaz, koyu turkuaz ya da koyu yeşildir. Miselyum belli belirsiz beyaz renktedir. Ters yüzel genellikle renksiz, bazen soluk yeşil ya da koyu kırmızımsı kahverengidir. Koloni tekstürü kadifemsi, granüler, düzdür. CY20S’deki morfolojik özellikler CYA 25’deki gibidir. Yalnızca eksuda yoktur ve bazı bölgeler yünümsüdür. CYA 25’dekinden farklı olarak CYA 37’de konidyal renkler daha az yoğundur ve koloniler bazen daha çok yünümsüdür. CZ’deki morfolojik özellikler CYA 25’dekiyle benzerdir. Yalnızca konidyal renkler daha az yoğundur.

Mikroskobik Karakteristikler. Konidyal baş ışınsal, konidyoforlar düzgün ince duvarlı renksiz ya da soluk kahverengidir. Veziküller spatulat ya da

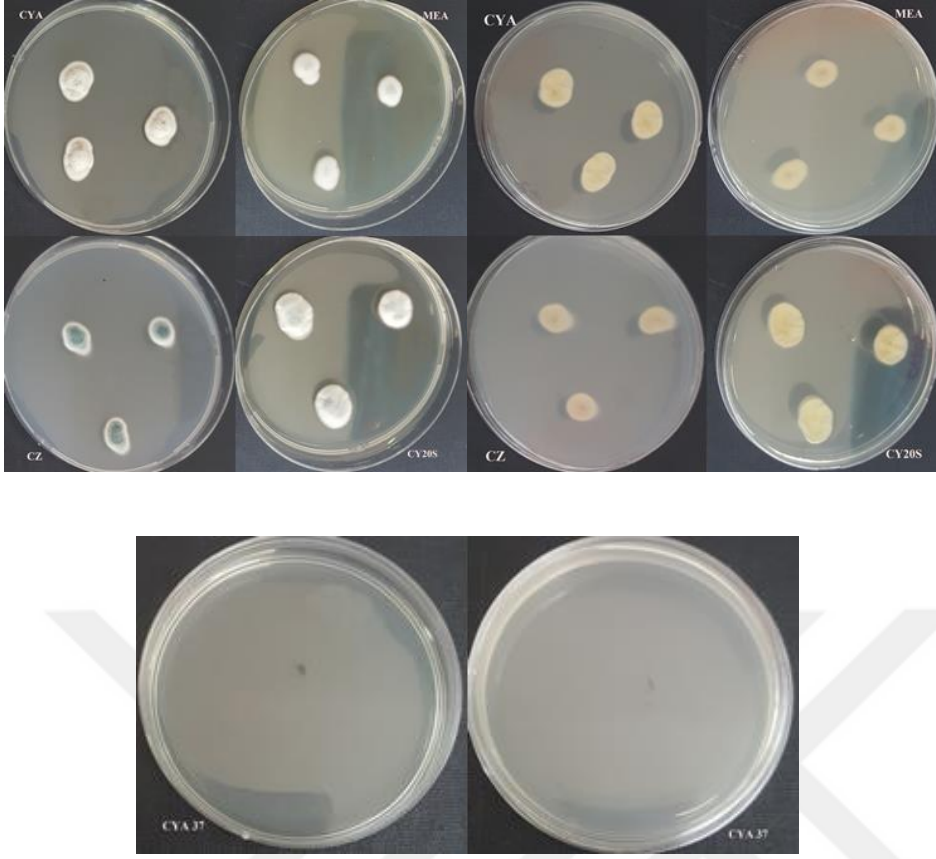
çoğunlukla klavattır. 7-17 (20) μm çapındadır. Metula (3) 4-6 (8) x -3,5 μm 'dir ve fiyalidler (4) 5-7 (10) x 2-3 (3,5) μm 'dir. Kobidya sferik, oldukça pürüzlü ve iğnelidir, (2,5) 3-4 (4,5) μm boyutundadır. Raper & Fennell (1965) bazen hülle hücrelerinin üretildiğini rapor etmiştir.

Ayırt Edici Özellikleri. CYA 25'deki turkuaz koloni rengi *Aspergillus sydowi*'nin en çarpıcı özelliğidir ve bu özellik *Aspergillus versicolor*'dan kolayca ayrılmasını sağlar. Nispeten küçük koloni çapları, son derece pürüzlü duvarlı sferik konidyalı, küçük biserial konidyal başları renksiz ve ince konidyoforları da ayrıca ayırt edici özellikleridir.

Taksonomik referanslar. Raper & Fennell, 1965; Domsch *et al.*, 1980; Klich & Pitt, 1988; Kozakiewicz, 1989; Tzean *et al.*, 1990; Klich, 1993; Pitt & Hocking, 1997; Samson *et al.*, 2000.

Habitat. *Aspergillus sydowi* dünya genelinde geniş yayılım gösteren bir türdür. Öncelikli habitatı topraktır ama açık ve kapalı alanlardaki pekçok substrattan izole edildiği bildirilmiştir. *Aspergillus versicolor*'a göre yiyeceklerde daha az bulunur.

Bu türün tanılaması Klich (2002) ve Samson (2010)'a göre yapılmış olup kolonilerin makroskobik ve mikroskobik özellikleri Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. *Aspergillus sydowii* CYA25, MEA, CZ ve CY20S ve CYA37, besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler



Şekil 4.12. *Aspergillus sydowii* (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Biseriat sterigmata, (B) Konidia

4.3.7. *Aspergillus terreus* Thom, 1918

25°C'de 7 günlük inkübasyon sonrasında Koloni Çapları (mm): CYA25 40–60; MEA 40–70; CY20S 65–70; CYA37 65–70; CZ 30–48.

Koloni Renkleri ve Tekstür. CYA25'de konidya soluk grimsi/kahverengimsi turuncu, ten renginde olabilir. Miselyum beyaz, bazen merkezi kısımda sarı renklidir. Eğer eksuda mevcutsa sarı, altın renklerdedir. Bazen sarımsı kahverengi çözünür pigment oluşturulur. Koloni tekstürü genelde kadifemsi veya yünümsüdür ya da sadece merkezi kısım yünümsüdür, düzgün ya da ışınsal sulkattır. **MEA**'da konidia seyrek, soluk turuncu, grimsi turuncu ya da ten rengidir. Miselyum genelde belli belirsiz beyaz renktedir. Ters yüzey ise grimsi sarı tonlardadır. Koloni tekstürü granüler ve bazen yünümsüdür. **CY20S**'de koloni rengi CYA25'e benzerdir. Tekstür kadifemsiden yünümsüye değişkenlik gösterir ve genelde ışınsal sulkattır. **CYA37** ve **CZ**'de koloniler CYA25'e benzer, fakat CZ'de koloniler merkezi olarak sarı renkli miselyuma sahiptir ve genelde fimbriat kenarlara sahiptir.

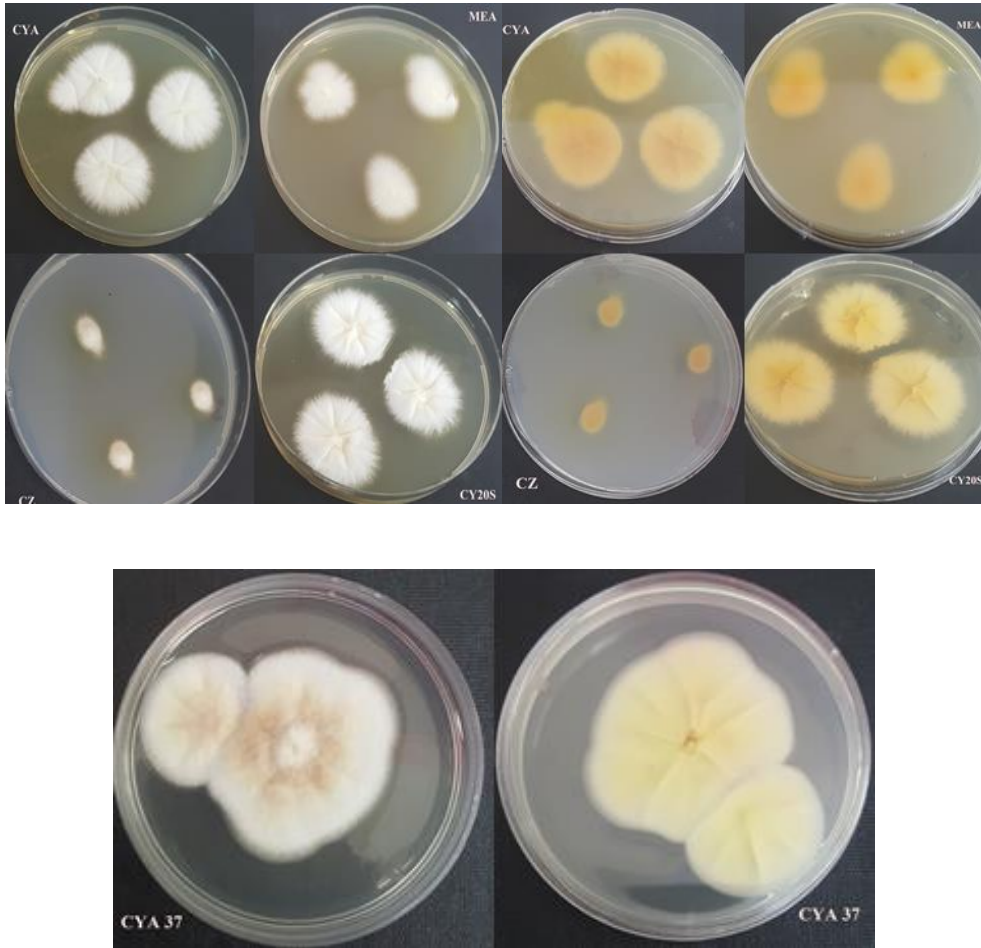
Mikroskopik Karakteristikler. Konidial başlar kompakt kolumnardır; konidioforlar düz çeperli, renksiz, (70) 100–250 (300) x 4– 7 µm'dir. Veziküller (7) 12–20 µm çapında, küresel ya da piriform olabilir. Biseriattır. Metula vezikülün üst yarısını ya da dörtte üçünü kaplar, 5– 7 x 2–3 µm'dir. Fiyalidler 5– 7 x 1,5–2,5 µm boyutlarındadır. Konidia 2– 2,5 µm çapında, globoz ya da elipsoidaldir. Genelde batık hiflerin yanlarında globoz ya da ovoid hyalin hücreler üretilir.

Ayırt Edici Özellikleri. Soluk turuncudan ten rengine kadar değişen kompakt kolumnar konidial baş yapıları, çok küçük boyutlu, düz çeperli sporları ve batık hiflerdeki lateral hyalin hücrelerin varlığı bu türün ayırt edici özellikleridir.

Taksonomik Referanslar. Raper & Fennell, 1965; Domsch *et al.*, 1980; Klich & Pitt, 1988; Kozakiewicz, 1989; Tzean *et al.*, 1990; Pitt & Hocking, 1997; Samson *et al.*, 2000.

Habitat. *A. terreus* tüm dünyada yaygın olarak görülse de tropik ve subtropik iklimlerde daha yaygın olarak görülmektedir. Ekili topraklarda orman ya da çimenlik alanlara nazaran daha sık görülür. Ekili topraklarda daha sık görülen nadir *Aspergillus* türlerinden biridir (Klich, 2002). Depolanmış tahıllarda yaygın olarak görülür ve çeşitli gıdalardan ve kapalı alanlardan da izole edilmiştir (Domsch *et al.*, 1980; Samson *et al.*, 2001).

Bu türün tanınması Klich (2002) ve Samson (2010)'a göre yapılmış olup kolonilerin makroskobik ve mikroskobik özellikleri Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. *Aspergillus terreus* CYA25, MEA, CZ ve CY20S ve CYA37, besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler



Şekil 4.14. *Aspergillus terreus* (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Biseriat sterigmata, (B) Konidia

4.3.8. *Aspergillus amstelodami*, Thom & Church 1926

25°C’de 7 günlük inkübasyon sonrasında Koloni Çapları (mm): CYA2514-20; MEA 18-22; CY20S 34-59; CYA37 2-13; CZ7-19.

Koloni Renkleri ve Tekstür. **CYA25**’de konidya grimsi yeşil, grimsi turkuaz ya da koyu yeşil renktedir. Miselyum beyaz sarı ya da sarımsı gri renktedir. Eğer eksuda mevcutsa, renksiz olabildiği gibi kahverengi de olabilir. Ters yüzey renksiz, sarı ya da kahverengi olabilir. Çözünür pigment mevcutsa kahverengidir. Tekstür kadifemsi ya da yünümsü, düz ya da sulkat olabilir. **MEA**’da konidya koyu yeşil renktedir. Miselyum belli belirsiz beyaz ya da sarı renktedir. Cleistothecia mevcutsa sarı renktedir. Ters yüzey renksiz, ya da merkezde sarımsıdır. Tekstür genelde yoğun değildir ve granülerdir. **CY20S**’de konidia soluk yeşil ya da koyu yeşil renktedir. Miselyum ve cleistothecia renkleri CYA 25’deki gibidir. Ters yüzey genellikle sarı ya da yeşildir. **CYA 37**’de koloninin ortasında beyaz bir tepecik bulunur ve Ter yüzey rengi grimsi kahverengidir. **CZ**’de konidya seyrek, tüm görünümde açık sarı cleistothecia baskındır. Ters yüzey renksiz ya da sarı ya da yeşil renktedir. Tekstür kadifemsidir.

Mikroskopik Karakteristikler. Konidial başlar ışınsaldır ya da zayıf kolumnardır. Konidioforlar düzgün duvarlı, renksiz ya da kahverengi, (90)110-

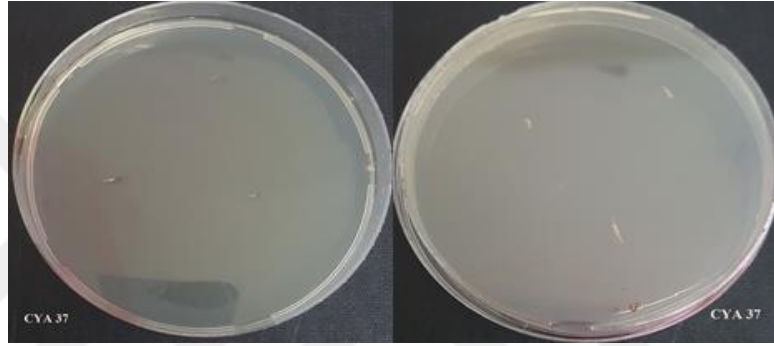
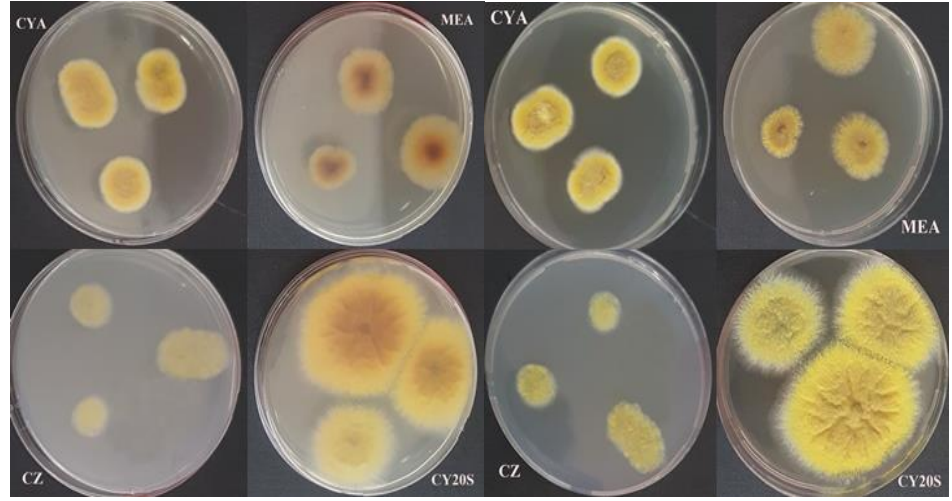
350(500) x(5) 7-12 μm , 'dir. Veziküller globoz ya da spatulat (10-) 17-30 (-40) μm boyutlarında ve uniseriattır. Fiyalidler 5-8 x3-4,5 μm ve vezikülün üçte ikisini kaplamaktadır. Konidia globoz ya da subgloboz ve geniş elipsoidal, az pürüzlü (3) 4-5 (7) μm çapındadır. Kleistotesia sarı globoz ya da subglobozdur ve (50) 75-150(170) μm çapındadır.

Ayırt Edici Özellikleri. *Aspergillus amstelodami* CY20S besiyerindeki koloni çapının CYA 25 besiyerindekinin yaklaşık iki katı olmasıyla ve hyalinli sarı cleistothecialarıyla, pürüzlü duvarlı ascosporlarıyla ayırt edilir.

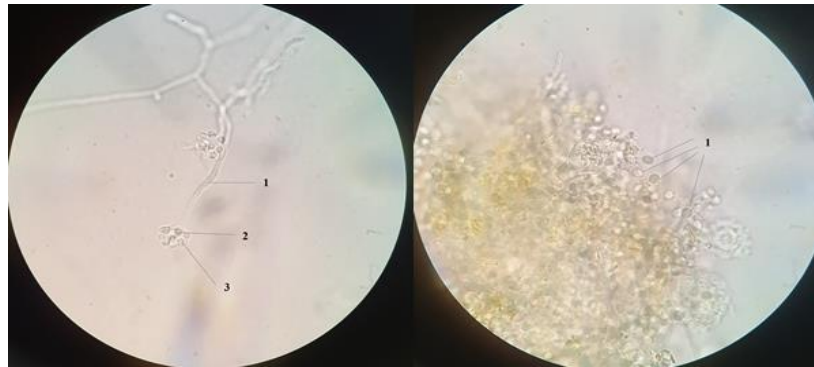
Taksonomik Referanslar. Raper & Fennell, 1965; Domsch *et al.*, 1980; Pitt, 1985 ;Klich & Pitt, 1988; Kozakiewicz, 1989; Tzean *et al.*, 1990; Pitt & Hocking, 1997; Samson *et al.*, 2000.

Habitat. *A. amstelodami* tropik ve subtropik topraklarda yaygın olarak bulunan bir türdür. Çöl topraklarında ve 25°-36° enlemlerinde beklendiğinden çok daha fazla tespit edilmiştir. Topraklarda, kuru ya da konsatre gıda ürünlerinde, kapalı alanlarda ve çok fazla çeşitte kaynakta rapor edilmiştir.

Bu türün tanınması Klich (2002) ve Samson (2010)'a göre yapılmış olup kolonilerin makroskobik ve mikroskobik özellikleri Şekil 4.15. ve Şekil 4.16' da gösterilmiştir.



Şekil 4.15. *Aspergillus amstelodami* CYA25, MEA, CZ ve CY20S ve CYA37, besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler



Şekil 4.16. *Aspergillus amstelodami* (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) 1: Konidia

4.4. Genotipik Tanı İle Belirlenen Türlerin Fenotipik Özellikleri

Klich, 2002 ve Samson, 2010'a göre fenotipik tayini yapılan türlerin PCR ürünlerinin dizi analizi MEDSANTEK tarafından yapılmıştır. Genotipik tayin sonucunda türü fenotipik tayinden farklı olan 5 tür belirlenmiştir. Bu türlerin CYA 25, CYA 37, CY20S, MEA ve CZ besiyerlerindeki fenotipik özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

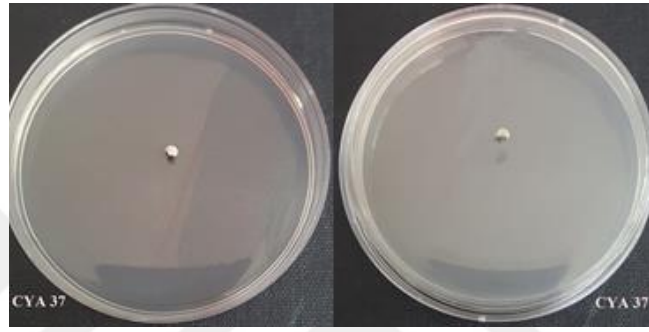
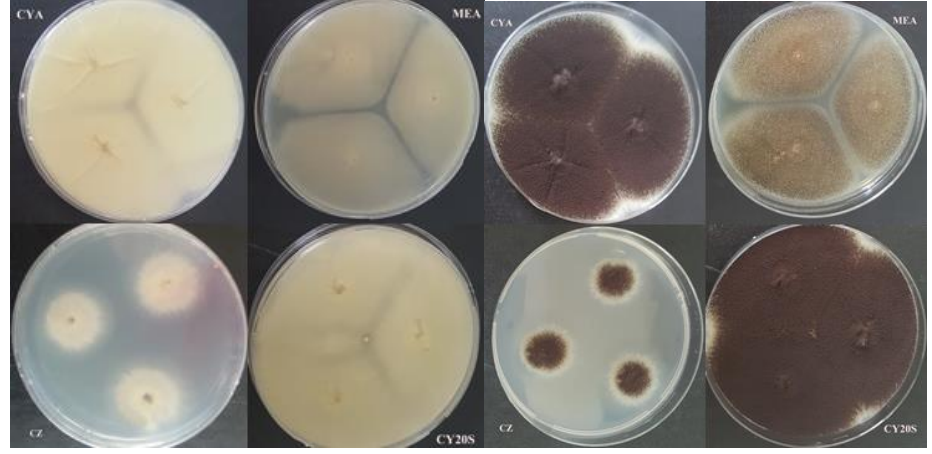
4.4.1. *Aspergillus aculeatus* Iizuka 1953

7 günlük inkübasyon sonucunda koloni çapları (mm) : CYA 25°C'de: 65-78, MEA'da: 52-60, CY20S'de: 62-76, CZ'de: 37-42 olarak ölçülmüştür.

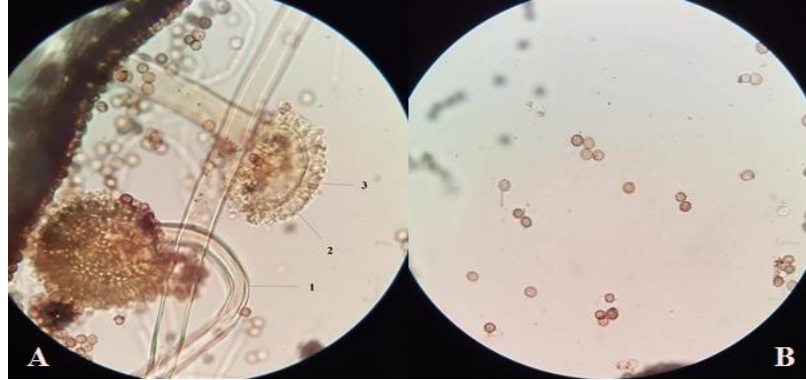
CYA'da konidya morumsu kahverengi, morumsu siyah, sporulasyon çok yoğun, miselyum belirsiz, tekstür kadifemsi, ters yüzey renksiz, krem ya da açık kahverengi, az sayıda ışınsal yarık mevcuttur. Eksuda yoktur. **MEA**'da konidya kahverengi, sporulasyon çok yoğun, miselyum belirsiz, koloni tekstürü kadifemsi, ters yüzey renksiz, krem, ışınsal yarık yoktur. Eksuda yoktur. **CY20S**'de konidya morumsu kahverengi- morumsu siyah, sporulasyon çok yoğun, miselyum belirsiz, tekstür kadifemsi, ters yüzey krem, açık kahverengi, az sayıda ışınsal yarık mevcuttur. Eksuda yoktur. **CZ**'de konidya koyu kahverengi, siyah, sporulasyon çok yoğun, miselyum belirsiz, şeffaf, koloni tekstürü granüler, ters yüzey renksiz, krem, ışınsal yarık yoktur. **CYA 37°C**'de üreme var, az, sporulasyon az ve merkezde, konidya koyu kahverengi, miselyum krem-beyaz, tekstür kadifemsi, ışınsal yarık yoktur.

Mikroskopik özellikler 7 günlük inkübasyon sonrasında CYA ve MEA besiyerlerinde incelenmiştir. Konidyal baş ışınsal, düzgün duvarlı ve üniseriattır. Vezikül sferik, 28-40 µm çapındadır. Fiyalidler vezikülün tamamını kaplamaktadır. Sporlar globoz, pürüzlü ve 3-4,5 µm çapındadır.

Bu türün kolonilerin makroskopik ve mikroskopik özellikleri Şekil 4.17. ve Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. *Aspergillus aculeatus* CZA25, MEA, CZ ve CY20S ve CZA37, besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler



Şekil 4.18. *Aspergillus aculeatus* (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia

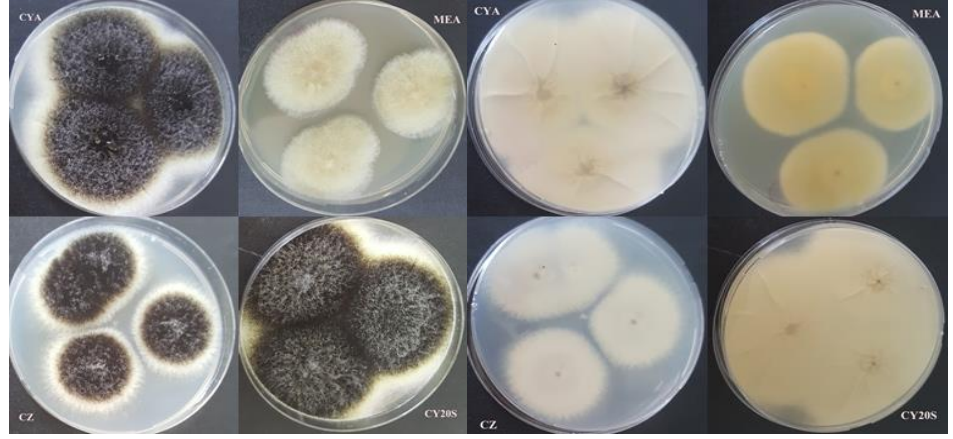
4.4.2. *Aspergillus brasiliensis* Varga, Frisvad & Samson 2007

7 günlük inkübasyon sonucunda koloni çapları: CYA 25°C’de: 35-42 cm, MEA’da: 25-32 cm, CY20S’ de: 44-58 cm, CZ de: 15-22 cm olarak ölçülmüştür.

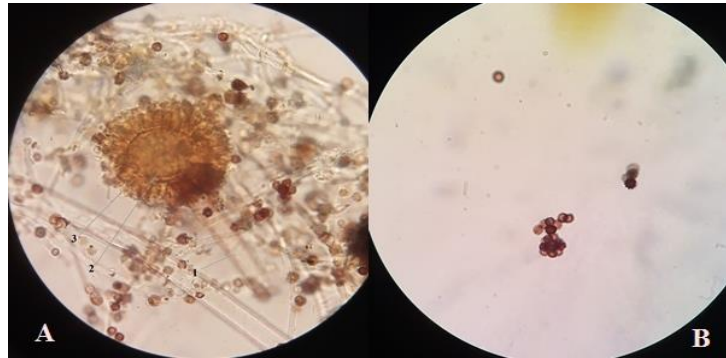
CYA’da konidya morumsu siyah, sporulasyon çok yoğun, miselyum belirsiz, tekstür granüler, ters yüzey krem - açık kahverengi, az sayıda ışınal yarık mevcuttur. Eksuda yoktur. **MEA**’da konidya kahverengi, sporulasyon yoğun, miselyum krem beyaz, koloni tekstürü granüler, ters krem, ışınal yarık yoktur. Eksuda yoktur. **CY20S**’de konidya morumsu kahverengi- siyah, sporulasyon çok yoğun, miselyum belirsiz, tekstür granüler, ters yüzey krem-açık kahverengi renkte, ışınal yarık yoktur. Eksuda yoktur. **CZ**’de konidya koyu kahverengi-siyah, sporulasyon yoğun, miselyum şeffaf-krem, koloni tekstürü granüler, ters yüzey renksiz- krem, ışınal yarık yoktur. Eksuda yoktur. **CYA 37°C**’de üreme var, sporulasyon çok yoğun, konidya koyu kahverengi, miselyum krem-beyaz, tekstür granüler, ışınal yarık yoktur.

Mikroskopik özellikler 7 günlük inkübasyon sonrasında CYA ve MEA besiyerlerinde incelenmiştir. Konidyal baş ışınal, düzgün duvarlı ve uniseriattır. Vezikül globoz, 29-42 µm çapındadır. Fialidler vezikülün tamamını kaplamaktadır. Konidyal globoz, pürüzlü ve 3,5-4,5 µm çapındadır.

Bu türün kolonilerin makroskopik ve mikroskopik özellikleri Şekil 4.19. ve Şekil 4.20.’de gösterilmiştir.



Şekil 4.19. *Aspergillus brasiliensis* CYA25, MEA, CZ ve CY20S ve CYA37, besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler



Şekil 4.20. *Aspergillus brasiliensis* (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia

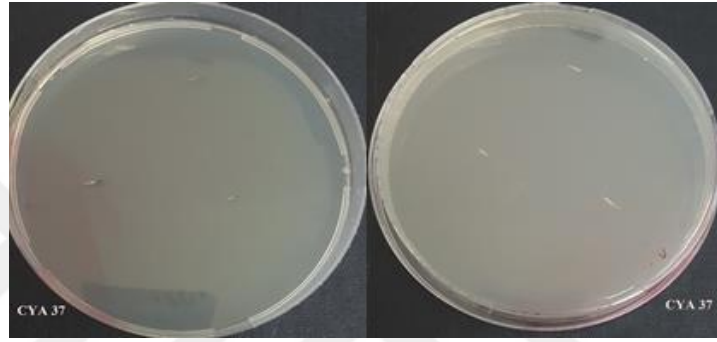
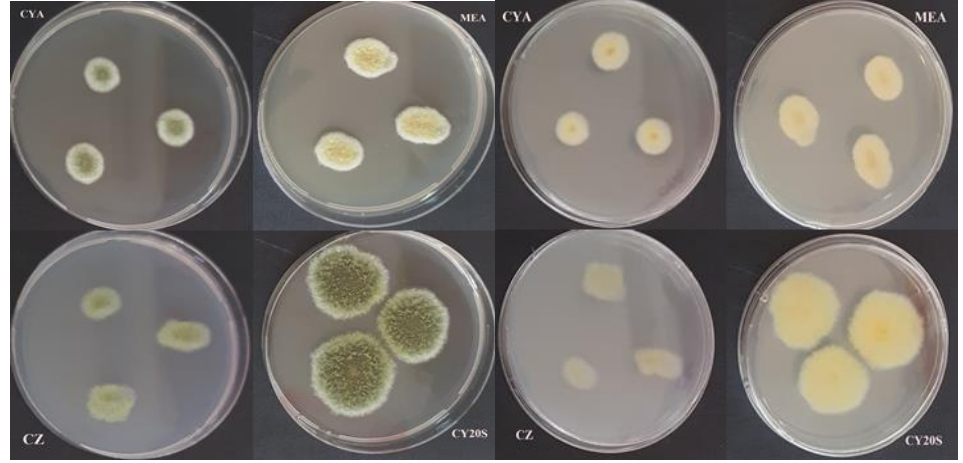
4.4.3. *Aspergillus pseudoglaucus* Blochwitz 1929

7 günlük inkübasyon sonucunda koloni çapları: CYA 25°C’de: 12-14 cm, MEA’da: 10-15 cm, CY20S’ de: 25-32 cm, CZ de: 6-10 cm olarak ölçülmüştür.

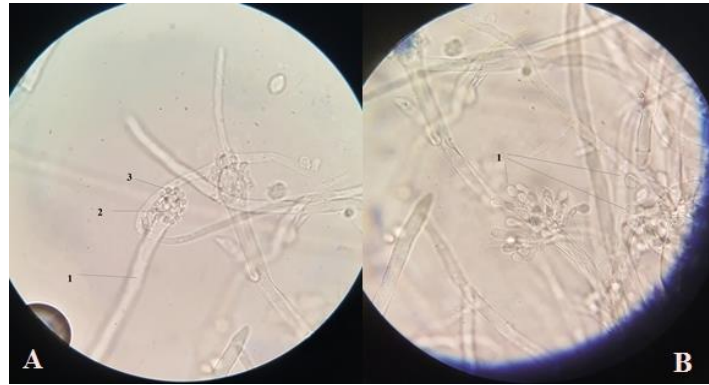
CYA’da konidya yeşil, sporulasyon orta yoğunlukta, miselyum beyaz, koloni tekstürü yünümsü, ters kremi kahve, ışınal yarık yoktur. Eksuda yoktur. **MEA**’da konidya sarı, sporulasyon orta yoğunlukta, miselyum sarımsı krem, koloni tekstürü yünümsü, ters yüzey sarımsı krem, ışınal yarık yoktur. Eksuda yoktur. **CY20S**’de konidya sarımsı yeşil renkte, sporulasyon yoğun, miselyum şeffaf kremi, koloni tekstürü yünümsü, ters yüzey kremi kahve renkte, ışınal yarık yoktur. Eksuda yoktur. **CZ**’de konidya sarımsı yeşil, sporulasyon az, miselyum krem, koloni tekstürü yünümsü, ters yüzey krem, ışınal yarık yoktur. Eksuda yoktur. **CYA 37°C**’de üreme yoktur.

Mikroskopik özellikler 7 günlük inkübasyon sonrasında CYA ve MEA besiyerlerinde incelenmiştir. Konidyal baş ışınal düzgün duvarlı ve uniseriattır. Fiyalidler vezikülün tamamını kaplamaktadır. Vezikül globoz ya da sub-globoz 12-15 µm çapındadır. Sporlar sub-globoz hafif elipsoidal, pürüzsüz ve 4,5-5 µm çapındadır.

Bu türün kolonilerin makroskopik ve mikroskopik özellikleri Şekil 4.21. ve Şekil 4.22’de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. *Aspergillus pseudoglaucus* CYA25, MEA, CZ ve CY20S ve CYA37, besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler



Şekil 4.22. *Aspergillus pseudoglaucus* (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia

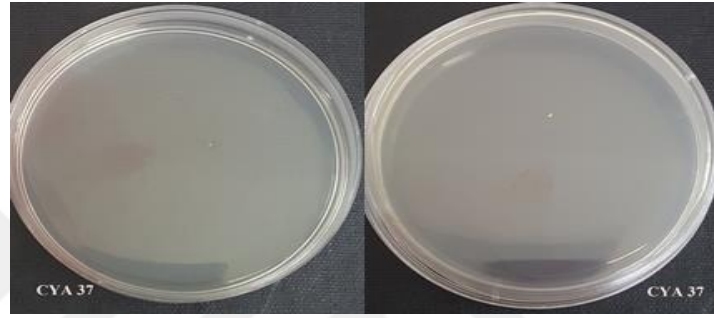
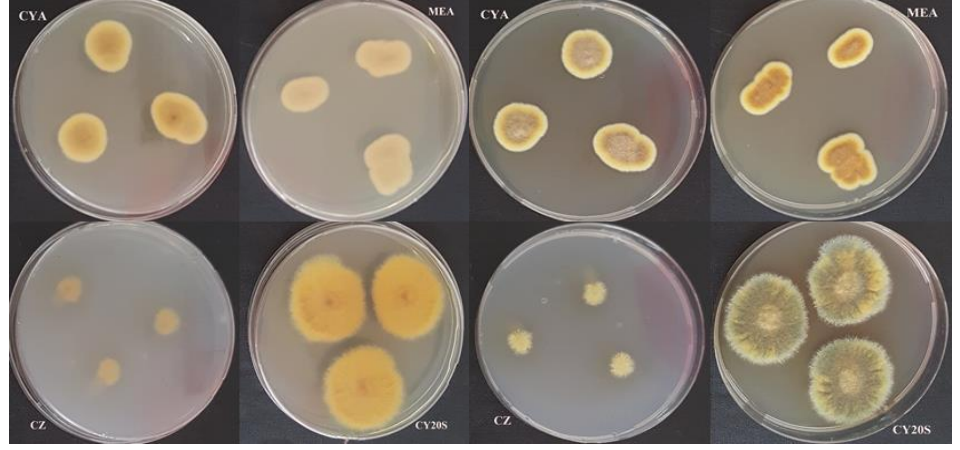
4.4.5. *Aspergillus ruber* Thom & Church 1926

7 günlük inkübasyon sonucunda koloni çapları: CYA 25°C'de: 13-19 cm, MEA'da: 8-11 cm, CY20S' de: 22-30 cm, CZ de: 4-9 cm olarak ölçülmüştür.

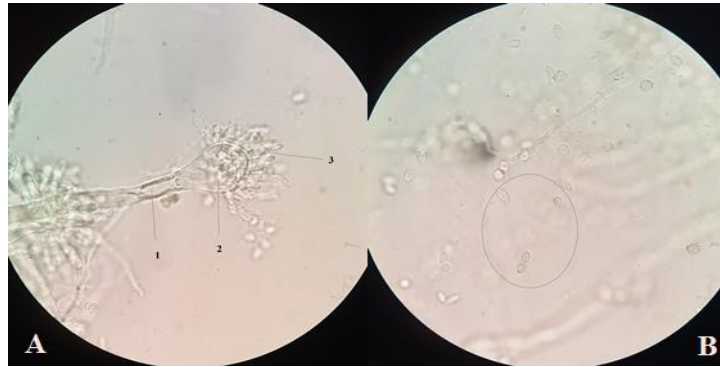
CYA'da konidya sarı-koyu sarı, sporulasyon az, miselyum belirsiz, koloni tekstürü kadifemsi, ters yüzey sarımsı kahverengi renkte, ışınal yarık yoktur. Eksuda yoktur. **MEA**'da konidya sarı, sporulasyon az, miselyum belirsiz, koloni tekstürü kadifemsi, ters yüzey sarımsı krem, ışınal yarık yoktur. Eksuda yoktur. **CY20S**'de konidya açık yeşil-yeşil, sporulasyon yoğun, miselyum sarımsı krem, koloni tekstürü kadifemsi, ters yüzey sarımsı krem, ışınal yarık yoktur. Eksuda yoktur. **CZ**'de konidya sarı, miselyum şeffaf, koloni tekstürü kadifemsi, ters yüzey sarımsı krem, ışınal yarık yoktur. Eksuda yoktur. **CYA 37°C**'de üreme yoktur.

Mikroskopik özellikler 7 günlük inkübasyon sonrasında CYA ve MEA besiyerlerinde incelenmiştir. Konidyal baş ışınal, düzgün duvarlı ve uniseriattır. Fiyalideler vezikülün 3te 2sini kaplamaktadır. Vezikül sub-globoz, 16-17 µm çapındadır. Sporlar elipsoid, pürüzsüz ve 3,5-4 µm çapındadır. Kleistotesya mevcuttur.

Bu türün kolonilerin makroskopik ve mikroskopik özellikleri Şekil 4.23. ve Şekil 4.24 'de gösterilmiştir.



Şekil 4.23. *Aspergillus ruber* CYA25, MEA, CZ ve CY20S ve CYA37, besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler



Şekil 4.24. *Aspergillus ruber* (A) 1: Konidyofofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia

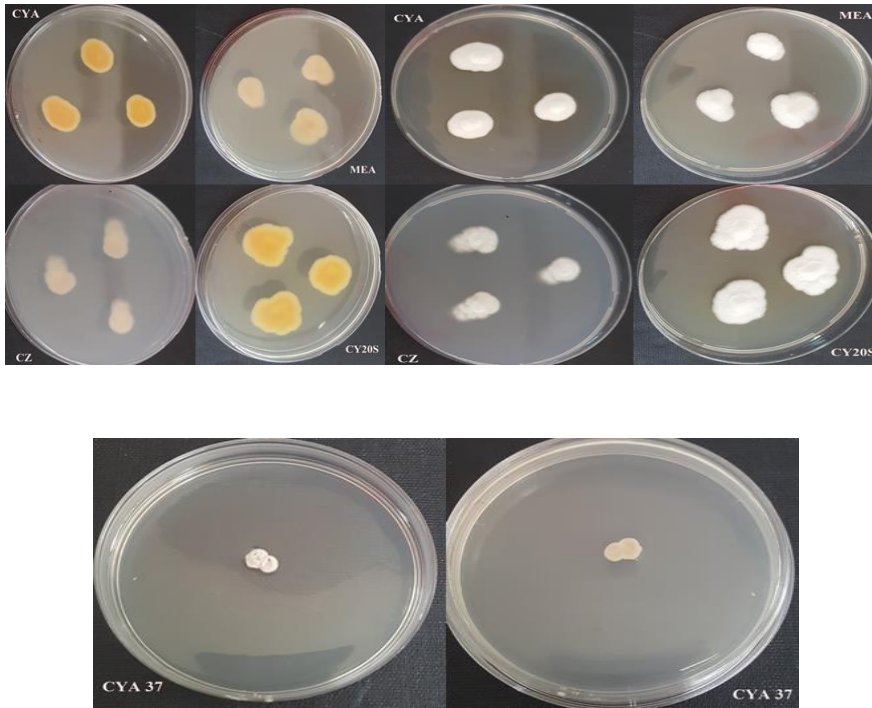
4.4.6. *Aspergillus tritici* B.S. Mehrotra & M. Basu 1976

7 günlük inkübasyon sonucunda koloni çapları(mm) : CYA 25°C'de: 16-28, MEA'da: 8-12, CY20S' de: 18-23, CZ de: 5-12 olarak ölçülmüştür.

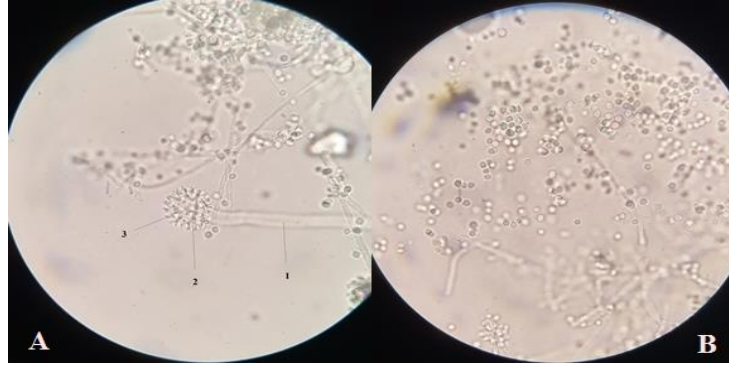
CYA'da konidya kremsi beyaz renkte, sporulasyon az, miselyum belirsiz, koloni tekstürü kadifemsi, ters yüzey kremsi kahverengi renkte, ışınal yarık yoktur. Eksuda yoktur. **MEA**, **CY20S** ve **CZ** morfolojik özellikleri CYA 25 ile benzerdir. Sadece CY20S'de ters yüzey rengi CYA25'ten farklı olarak sarı renktedir. **CYA 37°C**'de üreme vardır. Konidya beyaz renkte miselyum şeffaftır.

Mikroskobik özellikler 7 günlük inkübasyon sonrasında CYA ve MEA besiyerlerinde incelenmiştir. Konidyal baş ışınal, düzgün duvarlı ve uniseriattır. Fiyalideler vezikülün tamamını kaplamaktadır. Vezikül sub-globoz, 8-9 µm çapındadır. Konidyalar globoz, pürüzsüz ve 3-3,5 µm çapındadır.

Bu türün kolonilerin makroskobik ve mikroskobik özellikleri Şekil 4.25.ve Şekil 4.26'da gösterilmiştir.



Şekil 4.25. *Aspergillus tritici* CYA25, MEA, CZ ve CY20S ve CYA37, besiyerlerinde 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler

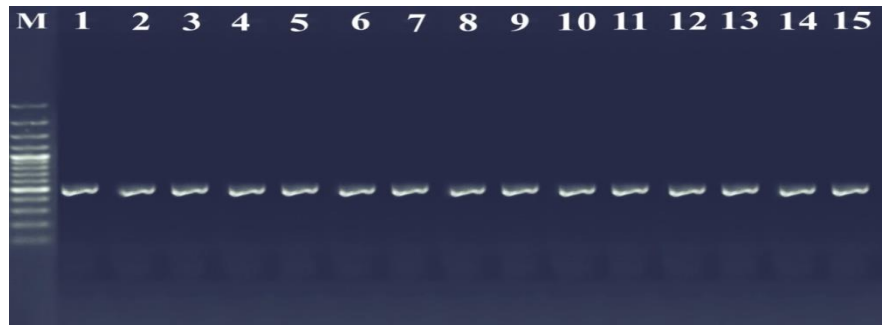


Şekil 4.26. *Aspergillus tritici* (A) 1: Konidyofor, 2: Vezikül, 3: Uniseriat sterigmata, (B) Konidia

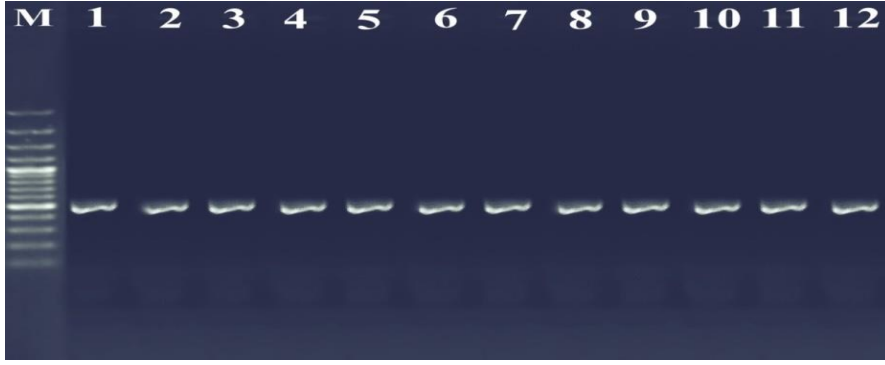
4.5. *Aspergillus* Türlerinin Genotipik Tayini

4.5.1. ITS Gen Bölgesi Sonuçları

Hayvan yemlerinden izole edilen ve fenotipik olarak tanısı yapılan 27 *Aspergillus* izolatının genotipik tanısı için ITS1 ve ITS4 primerleri ile PCR yapılmıştır. ITS gen bölgesi amplifikasyon ürünü jel görüntüleri Şekil 4.27. ve 4.28’de verilmiştir.



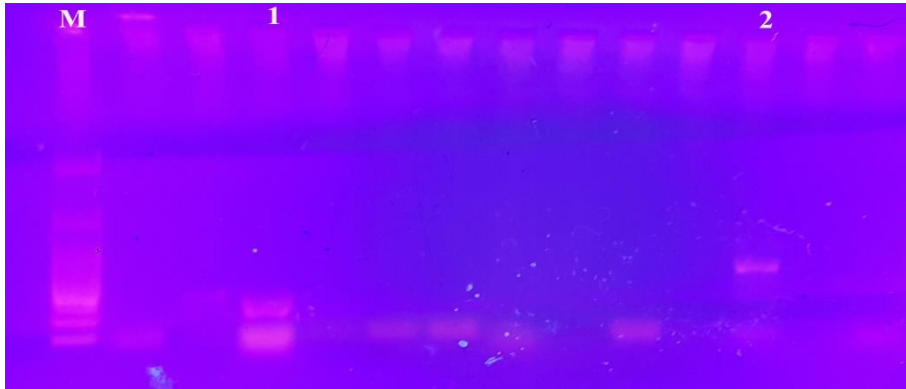
Şekil 4.27. *Aspergillus* suşlarının ITS gen bölgesi amplifikasyon ürünleri Jel Görüntüsü
M: Moleküler ağırlık standardı (100-1500 bç), 1: BT1, 2: BT2, 3: BT3, 4: BT4, 5: BT5, 6: BT6, 7: BT7, 8: BT8, 9: BT9, 10: BT10, 11: BT11, 12: BT12, 13: BT13, 14: BT14, 15: BT15



Şekil 4.28. *Aspergillus* suşlarının ITS gen bölgesi amplifikasyon ürünleri Jel Görüntüsü (devam)
M: Moleküler ağırlık standardı (100-1500 bp), 1: BT 16, 2: BT 17, 3: BT 18, 4: BT 19, 5: BT 20,
6: BT 21, 7: BT 22, 8: BT 23, 9: BT 24, 10: BT 25, 11: BT 26, 12: BT 27

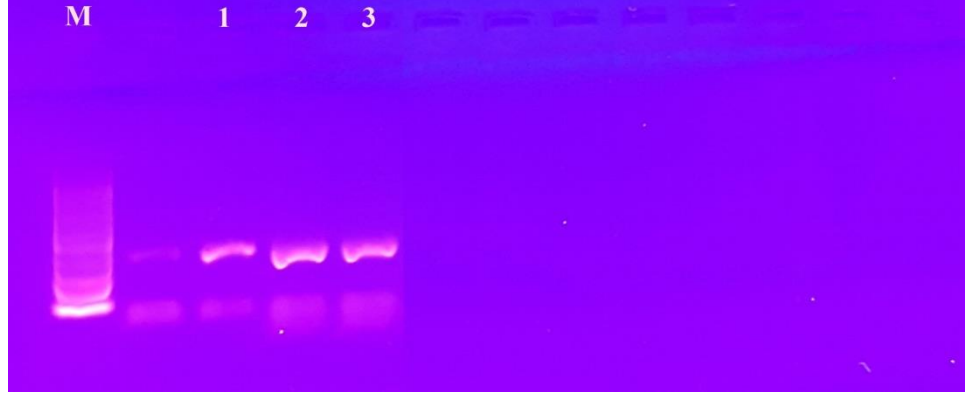
4.6. *Aspergillus* Türlerinde Ribotoksin Gen Bölgesinin Varlığının Aranması

Fenotipik ve genotipik olarak tanısı yapılan *Aspergillus* türlerinde ribotoksin gen bölgesinin varlığının aranması amacı ile ribotoksin gen bölgesine spesifik KQ1 ve KQ2 primerleriyle PCR yapılmıştır. Pozitif kontrol amacıyla kullanılan referans suş *Aspergillus giganteus* NRRL 10'un ve BT7, BT10 ve BT19 izolatlarının ribotoksin gen bölgesi amplifikasyon ürünü jel görüntüleri Şekil 4.29. ve Şekil 4.30.'da verilmiştir.



Şekil 4.29. KQ1-KQ2 gen bölgesi amplifikasyon ürünleri Jel Görüntüsü

M: Moleküler ağırlık standardı (100-1500 bp), 1: Pozitif kontrol *Aspergillus giganteus* NRLL 10,
2: BT10



Şekil 4.30. KQ1-KQ2 gen bölgesi amplifikasyon ürünleri Jel Görüntüsü (devam)

M: Moleküler ağırlık standardı (100-1500 bç), 1: Pozitif kontrol *Aspergillus giganteus* NRLL 10, 2: BT7, 3: BT19

4.7. ITS ve Ribotoksin Gen Bölgeleri Dizi Analizi Sonuçları

Genotipik Tanı için yapılan ITS gen bölgesi amplifikasyon ürünlerinin dizi analizi sonuçları ile ribotoksin gen bölgesi amplifikasyon ürünlerinin dizi analizi sonuçları Çizelge 4.4 ve 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. ITS ve Ribotoksin Gen Bölgeleri Amplifikasyon Ürünlerinin Dizi Analizi Sonuçları

İzolat Adı	Fungal Türler	GenBank Accession Numarası	Ribotoksin Gen Varlığı	Ribotoksin Çeşidi	GenBank Accession Numarası
					Ribotoksin Gen Bölgesi
BT1	<i>Aspergillus flavus</i>	MH137908	Yok		
BT2	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	MH137909	Yok		
BT3	<i>Aspergillus amstelodami</i>	MH137910	Yok		
BT4	<i>Aspergillus sydowii</i>	MH137911	Yok		
BT5	<i>Aspergillus amstelodami</i>	MH137912	Yok		
BT6	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	MH137913	Yok		
BT7	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MH137914	Var	<i>Aspergillus fumigatus</i> Asp f 1 gene for mitogillin, partial cds	MH255602
BT8	<i>Aspergillus niger</i>	MH137915	Yok		
BT9	<i>Aspergillus flavus</i>	MH137916	Yok		
BT10	<i>Aspergillus aculeatus</i>	MH137917	Yok		
BT11	<i>Aspergillus amstelodami</i>	MH137918	Yok		
BT12	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	MH137919	Yok		
BT13	<i>Aspergillus tritici</i>	MH137920	Yok		
BT14	<i>Aspergillus amstelodami</i>	MH137921	Yok		

Çizelge 4.5. ITS ve Ribotoksin Gen Bölgeleri Amplifikasyon Ürünlerinin Dizi Analizi Sonuçları (devam)

İzolat Adı	Fungal Türler	GenBank Accession Numarası	Ribotoksin Gen Varlığı	Ribotoksin Çeşidi	GenBank Accession Numarası
		ITS Bölgesi			Ribotoksin Gen Bölgesi
BT15	<i>Aspergillus ruber</i>	MH137922	Yok		
BT16	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	MH137923	Yok		
BT17	<i>Aspergillus amstelodami</i>	MH137924	Yok		
BT18	<i>Aspergillus amstelodami</i>	MH137925	Yok		
BT19	<i>Aspergillus clavatus</i>	MH137926	Var	<i>Aspergillus clavatus</i> mitogillin family cytotoxin clavin/c-sarcin, partial cds	MH255603
BT20	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	MH137927	Yok		
BT21	<i>Aspergillus ochraceus</i>	MH137928	Yok		
BT22	<i>Aspergillus terreus</i>	MH137929	Yok		
BT23	<i>Aspergillus niger</i>	MH137930	Yok		
BT24	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	MH137931	Yok		
BT25	<i>Aspergillus amstelodami</i>	MH137932	Yok		
BT26	<i>Asprgillus amstelodami</i>	MH137933	Yok		
BT27	<i>Aspergillus flavus</i>	MH137934	Yok		

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sekonder metabolitler genellikle, hücre büyümesi, hücre bölünmesi, hücre solunumu veya fotosentez gibi birincil metabolik süreçlerde yer almayan organik bileşikler olarak tanımlanır. Sekonder metabolitler üreticileri için koloninin diğer bireylerini tehlikeye karşı uyarmak amaçlı salgılanan uçucu alarm feromonları, birçok böcekte cinsel çekim, yırtıcılara karşı savunma, kendi ekolojik nişlerinde yayılma için silah olmak gibi fonksiyonları içeren pekçok değişik fonksiyon sergilerler. Ama pekçoğunun biyolojik fonksiyonu tam olarak tespit edilememiştir (Hansson, 2013).

Fungal sekonder metabolitlerin en önemlilerinden biri mikotoksinlerdir. Birçok mikotoksin arasında, gıdalardaki yüksek prevalansı ve yüksek toksisitesi nedeniyle en çok trikotesenler incelenmiştir. T-2 toksin, nivalenol, deoksinivalenol (DON) veya satratoksinleri de içeren trikotesenler esas olarak *Fusarium* ve *Stachybotrys* türlerine ait fungusların ürettiği yapısal olarak ilişkili sekonder metabolitlerdir. Bunlar ribozom alt birimlerine bağlanma yoluyla protein sentezinin güçlü inhibitörleri olarak etki etmeleri nedeniyle ribotoksin ailesinin üyeleridir ve bu etkileri ribotoksik stres etkisi olarak adlandırılmaktadır (Razafimanjato et al., 2011; Döll and Danicke, 2011).

Mikroorganizmalar büyümelerini ve yayılmalarını sağlayabilmek, aynı zamanda da bulundukları ortamda kendilerine rakip olabilecek diğer organizmaların gelişimlerini engellemek ya da zarar görebilecekleri organizmalardan kendilerini korumak amacıyla ribotoksin olarak adlandırılan ekstrasellüler RNazlar üretirler. Salgılanan bu ribotoksinler, ribozomun evrensel olarak korunmuş sarcin-ricin domainindeki (SRL) RNA alanlarına bağlanma spesifikliği gösterir ve ribozomu inaktive ederek apoptozis ile hücre ölümüne sebep olurlar (Alvarez-Garcia et al., 2008; Kanwar and Kumar, 2017).

Toksik etkileri sebebiyle ribotoksinlerin gıdalarda bulunmasının taşıdığı risklerin yanında, ribozomu inhibe etme yeteneklerinden dolayı bu toksinlerin biyoteknolojik kullanım olanaklarının zenginliği dikkati çekmektedir. Bu sebeple de keşfedilmeye başlandıkları 1960'lı yıllardan bu yana ribozomla ilişkili

hastalıklardaki rolleri, immünotoksinlerin geliştirilmesine sağlayacakları katkıları, *Aspergillus* alerjilerindeki rolleri, bazı virüslere karşı anti-viral etkisi göstermeleri, zararlılarla mücadelede kontrol ajanı olarak kullanılma potansiyelleri üzerine odaklanılmış ve gelecek vadeden birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (Roga et al., 1971; Alvarez-Garcia et al., 2008; Herrero-Galan et al., 2012).

Ribozomlar, hücredeki en iyi moleküler makineler arasındadır. Hücre büyümesi için gerekli olan tüm proteinleri üreten yaşam için gerekli yapılardır. İnsanlarda, özellikle spesifik kusurlar, ribozomopatiler adı verilen heterojen bir dizi hastalığa neden olur. Bu hastalıkların ortak noktası ribozomal bir işlev bozukluğu olmakla birlikte, mekanizma, klinik semptomlar ve potansiyel tedaviler açısından aralarında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Diamond-Blackfan anemi (DBA) gibi bazı bozukluklar, ribozomal proteinlerde mutasyonlarla bağlantılı iken Schwachman-Diamond Sendromu (SDS) veya Treacher Collins Sendromu (TCS) gibi bazı bozukluklar doğrudan kusurlu ribozom biyogeneziyle ilişkilidir. Ribozom biyogenezi, büyük ve küçük ribozomal altbirimlerin toplandığı karmaşık bir hücresel süreçtir. Ökaryotlarda bu süreç çekirdekte başlar. Ardından, her iki ribozomal alt birim(60S ve 40S), nükleoplazma ve sitoplazma yoluyla olgunlaşır. Ancak, bu karmaşık olayla ilgili hala cevapsız birçok soru bulunmaktadır. Fungal ribotoksinler bu soruları bir miktar aydınlayabilir. Ribozom biyogenezi çalışmalarında ribotoksinlerin kullanımı ribozomopatilerin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Ribozom biyogenezi kısmında, bu toksinler 60S öncesi parçacıkların olgunlaşma yolunu, özellikle de sitoplazmada keşfetmek için uygun araçlar olabilir, çünkü hedefleri olan SRL, bu süreçte gerekli olan bir bölgede lokalizedir (Narla and Ebert, 2010; Olombrada et al., 2017).

Fungal ribotoksinlerin küçük boyutları, yüksek termostabiliteleri, zayıf immünojeniteleri, proteazlara karşı olan dirençleri ve en önemlisi ribozomları inaktive etmedeki yüksek verimlilikleri onları immünotoksinlerin yapımı için uygun hale getiren özelliklerdir (Olombrada et al., 2017). Bununla birlikte, ribotoksinlerin sitotoksik etkileri kanserli hücrelerin dışında sağlıklı hücrelere de zarar verebileceğinden bu toksinlerin terapötik ajanlar olarak kullanımını engellemektedir. Ancak günümüzde artmış kararlılık ve afinite ile genetiği

değiştirilmiş immünotoksinler geliştirilmektedir. Ayrıca, yeni tip ribotoksinlerin bulunması, tümörojenik proseslere karşı ajan olarak bunların kullanılmalarını kolaylaştırabileceği vurgulanmaktadır (Varga and Samson 2008). Ribotoksinlerin evrim ve etki mekanizması üzerine yapılan çalışmalar da immünotoksin olarak kullanılmalarının önünü açabileceği için önem taşımaktadır. Çünkü bu proteinlerin bu kadar etkili toksinler haline gelmesine izin veren yapısal belirleyicilerin tanımlanmasına yol açabilir ve bu durum da ribotoksinlerin farklı insan patolojilerine karşı silah olarak biyomedikal kullanımları için önemli bir adım olabilir. Buna bağlı olarak, bazı ribotoksinlerin allerjik karakteri ve hipoalerjenik mutantların üretimi ve bu fungal ribonükleazlara dayalı immünotoksinlerin gelişimi ile ilgili çalışmalar, orta vadeli gelecek için en uygun alternatifler olarak öne çıkmaktadır (Rathore et al., 1997; Herrero-Galán et al., 2009; Carreras-Sangra et al., 2012).

Son yıllarda özellikle α -sarcin ve Aspfl ribotoksinlerinin β -hairpin kusurlu mutantları üzerinde çalışılmaktadır. Bu mutantların toksisitesinde yüksek derecede azalma görülürken ribozomu inhibe etme yeteneklerinin aynı spesifiklikte devam ettiği tespit edilmiştir (Alvarez-Garcia et al., 2010).

İmmünotoksinler bir toksine bağlı hedef parça içeren kimerik moleküllerdir ve öncelikli olarak sağlıklı hücreleri hedeflemekten kaçınan, tahrip olmuş hücreleri hedef alan terapötikler olarak kullanılırlar. İmmünotoksinin hedefleme kısmı, spesifik bir hücre yüzeyi molekülüne veya reseptörüne bağlanmak üzere tasarlanmış bir antikor, antikor parçası veya başka bir hedefleme proteini (örneğin abdurin, sitokin, peptid, ligand ve hormondur) olabilir. Son zamanlarda kolon tümörü dokularını barındıran farelerde yüksek spesifik antitümör aktivite gösteren α -sarcine dayalı kolon kanserine karşı spesifik immünotoksin tanımlanmıştır. Bu sonuçlar, ribotoksin bazlı immün toksinlerin ve özellikle α -sarcini esas alan immünotoksinlerin potansiyel klinik uygulamalarını desteklemektedir (Jones et al., 2016).

Tümörlere karşı antikorların kullanıldığı immünoterapötik yaklaşımlar geniş çapta araştırılmış ancak solid tümörlere karşı etkili bir tedavi hala bir problem olarak kalmıştır. Düşük molekül ağırlıklı antikor fragmentlerinin daha iyi

tümör difüzyon özelliklerine sahip oldukları bilindiğinden, tek zincirli değişken fragmentler (scFv) kanser hücrelerine protein bazlı toksinler vermek için tercih edilmiştir. 2015 yılında yapılan bir çalışmada, hümanize scFvA33 ve α -sarcinin füzyonuyla insan kolon kanser hücrelerine yönelik ilk ribotoksin bazlı scFv rekombinant immünotoksini (IMTXA33 α S) bildirilmiştir. Nanomolar konsantrasyonlardaki inkübasyon, invitro deneylerde hedeflenen hücrelere karşı çok yüksek spesifite ve etkili bir sitotoksiste yaratmıştır. Burada sunulan sonuçlar, in vivo olarak kolon kanseri ksenograftlarını barındıran çıplak fareler kullanılarak spesifik antitümör etkisi açısından, tümör büyümesinin, anjiyogenезin ve proliferatif özelliklerin kuvvetli bir inhibisyonunun gerçekleşmesi ile büyük bir antitümör etkinliği ortaya koymaktadır (Tome-Amat et al., 2015). Bu sonuç, ribotoksinlere dayanan immünotoksinlerin farklı tümör patolojilerine karşı bir terapötik araç olabileceğinin kanıtı olarak düşünülebilir.

Protein mühendisliği kullanılarak, scFvA33 ve üçlü mutant olan HtA'nın yeni ve daha güvenli bir üçlü varyantını (W65/71/78F) içeren, kolon kanseri hücrelerini hedefleyen yeni bir immünotoksin (IMTXA33HtA3DW), izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Bu nedenle, IMTXA33HtA3DW' nin, kolon kanser hücrelerini hedef alan, güvenli, çok spesifik ve toksik bir immün toksin olduğu ve ribozomlara karşı tipik ölümcül spesifik ribotoksin aktivitesinin bulunduğu sonucuna varılmıştır (Tome-Amat et al., 2015).

Yine bir ribotoksin olan ageritinin, agresif ve malign merkezi sinir sistemi ile ilgili kanserlere karşı anti-tümör potansiyelini değerlendirmeye yönelik ön sitotoksik analizler yapılmış ve test edilen üç hücre hattında, onların kendi redoks mitokondriyal aktivitesini kuvvetli bir şekilde etkileyerek hücre proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Landi et al., 2017).

Günümüzde insanlarda kanser görülme sıklığının oldukça yüksek olduğu ve kanser çeşitlerinin önemli bir kısmı için başarılı tedavilerin tam olarak geliştirilemediği düşünüldüğünde insanlarda başarılı ve güvenli bir şekilde kullanılabilecek ribotoksin kökenli immünotoksin tasarlanması ve piyasaya sürülmesi ile ilgili çalışmalar oldukça ümit vericidir (Tome-Amat et al., 2014). Bunun gerçekleşebilmesi için de ribotoksinlerin mekanizması, mutant

varyasyonlarıyla ilgili çok daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmakla birlikte yeni ribotoksinlerin aranması da kayda değer bir yarar sağlayacaktır.

Ribotoksinler, ribonükleolitik aktivitelerine ilaveten, herhangi bir bilinen protein reseptörü olmadan lipid membranları aşarlar. Bu nedenle, herhangi bir ribozom potansiyel olarak bu proteinler tarafından etkisiz hale getirilebilir, ancak SRL'nin evrensel muhafazası nedeniyle özellikle transforme veya virüs bulaşmış hücreler üzerinde aktiftirler (Lacadena et al., 2007).

Restrictocin ile ilgili yapılan bir çalışmada restrictocininin HIV-1 genomu içindeki bölge(ler)i hedef olarak tanıyabildiği gösterilmiş, restrictocinin, konukçu hücrelerde HIV-1'in çoğalmasını engellediği tespit edilmiştir. Ayrıca, restrictocinin anti-HIV aktivitesinin, spesifik ribonükleolitik aktiviteye bağlı olduğu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar restrictocinin HIV-1'e karşı terapötik bir antiviral ajan potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Aspfl'in anti-hiv aktivitesi kanıtlandığından ribotoksinlerin anti-viral aktivitelerinin olabileceği sonucu vurgulanmaktadır. Virüs kökenli tedavisi olan ya da olmayan birçok hastalığın dünya genelinde insanlara olan olumsuz etkileri düşünüldüğünde bu virüsleri inhibe edecek ribotoksin kökenli ilaçların keşfedilmesi çok yakın gelecekte mümkün olmasa da uzak gelecek için umut vadetmektedir (Yadav and Batra, 2015).

Hirsutellin A'nın üretimi ribotoksinlere potansiyel böcek öldürücü olmaları açısından yeni bir bakış açısı getirmiştir. Çünkü bir *H. thompsonii* kültürünün fermentasyon sıvısının, hedef böceklerle karşı çok yavaş fakat yüksek öldürücü etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Olombrada et al., 2014). HtA preparatlarının yetişkin narenciye pas maytları için in vivo olarak oldukça toksik, *Galleria mellonella* larvaları için ölümcül olduğu ve in vitro sistemde hem tavşan retikülositinde hem de buğday tohumunda Brome mozaik virüsünün protein sentezini inhibe ettiği saptanmıştır (Herrero-Galan et al., 2013).

HtA ve α -sarcin aktivitesinin ayrıntılı bir karşılaştırması, α -sarcinin böcek larvalarına, böcek hücre kültürlerine ve böcek ribozomlarına karşı HtA kadar toksik olduğu kanıtlamıştır (Olombrada et al., 2013). Böcek öldürücü aktivite açısından restrictocin de çalışılmıştır. *C. freemani*'ye , *Spodoptera frugiperda*'ya

ve *Helicoverpa zea*'ya karşı test edilmiş ve çok etkileyici olmasa da önemli derecede toksik bir etki gösterdiği tespit edilmiştir (Brandhorst et al., 1996). Anisoplinin de aynı hirsutellin A'da olduğu gibi böcek hücrelerine karşı sitotoksikite sergilediği bildirilmiştir (Olombrada et al., 2016).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar ribotoksinlerin fungal pestisitler olarak kullanılabileceği düşüncesini destekleyici niteliktedir. Birçok ribotoksinin çeşitli böceklerle ve larvalara karşı sitotoksik olduğu düşünülürse piyasaya sürülebilecek ribotoksin kökenli fungal pestisitlerin oluşturulması tarımda zararlılarla olan mücadelede kimyasal pestisitlere nazaran daha sağlıklı ve etkili alternatifler sunabilir (Zhen-Liu et al., 1995; Omoto and McCoy, 1998; Herrero-Galan, 2008; Olombrada et al., 2014).

Mitogillinin insan idrarında saptanabilen en önemli *A. fumigatus* antijenlerinden biri olduğu bulunmuştur. Mitogillin, aspergilloma hastalarının serumlarında saptanmış ve bu nedenle *A. fumigatus* ile ilişkili hastalıklar için spesifik tanısal belirteç olarak başarıyla kullanılabileceğini öne sürülmüştür. Özel antikor tespiti için rekombinant mitogillinin varlığının, *A. fumigatus* ile ilişkili hastalıkların teşhisi için yeni bir serolojik araç sağlayabileceği düşünülmektedir (Weig et al., 2001).

Aspf1, alerjen olarak en ayrıntılı incelenen ribotoksindir ve alerjik solunum hastalıkların en şiddetli biçimi olan alerjik bronkopulmoner aspergillozisin (ABPA) patojenitesi ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Aspf 1 ayrıca in vivo test edilen ilk rekombinant alerjendir ve serolojik tayinlerle tam uyumlu olduğunu görülmüştür. Ayrıca ribotoksinler aspergillozisli hastaların idrarlarında bulunmuştur ve bunların fungal enfeksiyon düğümlerinin çevresinde bulunduğunu ispatlamak için antikorlar kullanılmıştır (Herrero-Galan et al., 2009).

Aspf1 ve α -sarcin'in sitotoksik olmayan ve hipoalerjenik mutant varyantları, *Aspergillus* hipersensitivitesi ve teşhisine karşı immün modüle edici tedavilerde kullanımları için uygun olabileceği düşünülmüş ve bunlar bir aşı aracı olarak Aspf1'e bağlı hastalıklar için immünoterapötik protokollerde kullanılabilen genellikle güvenli olarak kabul edilen bir mikroorganizma olan *Lactococcus*

lactis'in vektör olarak kullanımı ile rekombinant olarak üretilmiştir (Alvarez-Garcia et al., 2010).

Bu kısma kadar açıkladığımız ribotoksinlerin kullanım amaçlarına ilave olarak, SRL dizisinin ve yapısının evrenselliği, tüm alemlerdeki ribozomları ribotoksin aktivitesine karşı duyarlı hale getirir. Bu toksinlerle ilgili çalışmalar, büyük rRNA gen fragmentindeki tek bir fosfodiester bağına spesifik olarak parçalayarak ribozomal preparatlarda protein biyosentezini 0,1 nM kadar düşük konsantrasyonlarda inhibe ettiğini göstermiştir. Ribotoksinlerin bu özel eylemi öylesine etkilidir ki α -sarcinin tek bir molekülünün bir hücrenin öldürülmesi için yeterli olacağı tespit edilmiştir (Lacadena, 2006).

rRNA N-glikozidaz aktivitesi sergileyen ribozomu inaktive eden proteinler, peptidil transferazın işlev bozukluğuna ve sonrasında küresel translasyonel durgunluğa yol açan 28S ribozomal RNA'yı parçalama işlevini gerçekleştirirler. Ultraviyole (UV) ışınlama, trikotesen grubu mikotoksinler ve anizomisin antibiyotikleri dahil olmak üzere diğer fiziksel ve kimyasal hasarlar doğrudan veya dolaylı olarak 28S rRNA'yı modifiye ederek peptidil transferaz aktivitesini etkilemektedir; bunlar topluca ribozomu inaktive edici stres veya ribotoksik stres olarak adlandırılır. Bu toksik hasarların, hücresel homeostaz için önemli genlerin yanı sıra, epitelyal iltihaplanma ve karsinogeneizde rol alan çeşitli patojenik süreçlere ayrılmış genlerin anlatımına neden olduğu tespit edilmiştir. Birkaç epidemiyolojik çalışma, ribotoksin zehirlenmesi ile akut mukozal inflamatuvar hastalıktan epitelyal maligniteye kadar değişen insan mukozalepitel hastalıkları arasında bağlantı olduğunu ileri sürmektedir. Kimyasal ribotoksik stres, transepitelyal direnç, epitel farklılaşması ve beslenme absorpsiyonuna müdahale ederek bağırsak mukozasının bütünlüğünü değiştirmektedir ve bunlar anoreksi ve kilo kaybıyla ilişkili bulunmuştur. Dahası, ribotoksik ajanların bağırsak ve sistemik inflamasyonu tetiklediği ve epitel hücrelerinde ve diğer bağışıklık ile ilgili hücrelerde pro-inflamatuvar mediatörlerin üretilmesine yol açtığı belirtilmiştir (Moon, 2011).

Bağırsak epiteli, pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimi ve nitrik oksit (NO) gibi antimikrobiyal moleküllerin üretimi de dahil olmak üzere aktif bağışıklık

işlevlerine sahiptir. Bağışıklık hücrelerinde gözlemlendiği gibi, bağırsak epitelinin nitrit oksit üretimi, esas olarak indüklenebilir nitrit oksit sentezinin (iNOS veya NOS2) ekspresyonundan kaynaklanmaktadır. Epitelyal immün fonksiyonlar, patojenik mikroorganizmalar ve gıda ile ilişkili toksinler (bakteri ve fungal) dahil birçok faktörden etkilenebilir. Son zamanlarda bir ribotoksin olarak kabul edilen deoksinivalenolün (DON) sistemik ve barsak bağışıklığını değiştirdiği bilinmektedir (Graziani et al., 2015).

Yuseok Moon'nun yaptığı çalışmada bağırsak epiteli inflamatuvar hastalıklarının gelişiminde ribotoksik stres yanıtının önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Mukozanın ribotoksik strese maruz kalmasının bakteriyel kompozisyonun değişmesine yol açtığı, özellikle inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) yaşayan hastalarda rahatlıkla gözlenebilen mikrobiyal çeşitliliğin azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Dahası, ribotoksik stres ile enterik bakteriler arasındaki etkileşime yönelik proenflamatuvar yanıtın, birbirine bağlı olabileceği veya bağırsak epitelinde mukozal toleransı tetikleyebileceği ileri sürülmektedir (Moon, 2011).

Yapılan çalışmalar ribotoksinlerin spesifik olmayan fakat kuvvetli toksisiteye sahip moleküller olduğunu göstermektedir. Yine *A. fumigatus*' un ürettiği 18kDa' lık RNaz konidyal hücre duvarında mevcut ve in vivo olarak salgılanabildiği invazif aspergillozisli hastaların idrar örneklerinde ve fungus ile çevrili dokulardaki nekroz bölgelerinde gösterilmiştir. Ve immunokonjugat formda veya değiştirilmiş permabilitateye sahip hücrelerde nanomolar düzeyde modifiye olmamış hücrelerde ise micromolar konsantrasyonda oldukça güçlü toksik etkisi olduğu vurgulanmıştır (Nierman et al., 2005). Bu toksinlerin potansiyel üretici funguslarının hayvan yemlerinde bulunması da hem bu yemlerle beslenen hayvanlar hem de hayvansal gıdalarla beslenen insanlar için risk teşkil ettiğini düşünmekteyiz. Bizim çalışmamız, hayvan yemlerinde bulunan ribotoksin üreticisi fungal türlere dikkat çektiği için önem arz etmektedir.

Hayvan yemleri birden fazla hammaddenin bir araya gelmesinden elde edilen karma yemlerdir. Hayvan yemlerinde kullanılan ürünlerin hasattan depolanmalarına kadar uzun bir süre geçmektedir. Ayrıca bu ürünlerden elde edilen hayvan yemleri de depolarda paketleme sürecine kadar uzun süre

bekletilebilmektedir. Tüm bu bekleme süreçleri bu ürünlere mikrobiyal bulaşmanın gerçekleşmesine neden olur (Basmacıoğlu ve Ergül, 2003).

Hayvan yemlerinde düşük konsantrasyonlarda bile olsa mikotoksin bulunması hayvanın karaciğer ve böbreklerinde kronik veya akut toksik hasar meydana getirebilir (Kaya ve Yarsan, 1995). Ayrıca yemin hijyenik kalitesinin önemi sadece hayvanlar için değil aynı zamanda bu hayvanlardan elde edilen ürünleri tüketen insanlar için de geçerlidir. Hem hayvan hem de insan sağlığı açısından tehdit oluşturan fungal metabolitler ısıya ve bozulmaya karşı dayanıklı olduğundan, zararlı maddelerin birikimini önlemek için toksin üreticilerini tanımlamak ve bunların büyüme ve gelişimlerini kontrol etmek zorunludur (Girgin vd., 2001).

Çalışmamızda piyasada büyükbaş ve küçükbaş hayvanlar için satışta bulunan 16 adet hayvan yemindeki ribotoksin üretim gen bölgesini içeren *Aspergillus* türlerini araştırmayı hedefledik. Bu amaçla, DG18 besiyeri kuru maddelerdeki küflerin aranması ve/veya sayımı amacıyla kullanılan bir besiyeri olduğu için dökme plaka yöntemi ile hayvan yemlerinin DG18 besiyerine ekimlerini gerçekleştirdik. Yedi gün 25°C’de inkübasyona bıraktık. İnkübasyon sonrasında 10-150 arası koloni içeren petrilere toplam küf sayımı yaptık. Bu petrilere farklı olan tüm kolonileri saflaştırarak toplamda 63 izolat elde ettik. Tüm izolatların fenotipik tanısını, *Aspergillus* genusuna ait izolatlar için Klich, 2002 ve Samson et al., 2010, *Penicillium* genusuna ait izolatlar için Samson and Pitt, 2000 ve diğer izolatlar için de Hasenekoğlu, 1991 ve Barnett and Hunter, 1998’de kitaplarındaki tanılama anahtarlarında belirtilen yönergeleri izleyerek tür düzeyinde belirledik. Bu türler Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.’de belirtilmiştir.

Yaptığımız literatür taramalarında ribotoksin üretici türlerin büyük çoğunluğunun *Aspergillus* genusuna ait türler olduğunu tespit edilmiştir. Bizim hayvan yemi örneklerimizde de *Aspergillus* yoğunluğunun fazla olduğunu tespit ettik ki bu ribotoksin üreticisi türlerin yemlere bulaşmış olabileceği düşüncemizi güçlendirmiştir. İzole edilen ve genus düzeyinde tanılanan 27 *Aspergillus* izolatının tür düzeyinde tanısını yapmak için CYA, MEA, CY20S ve CZ ortamlarına ekimlerinin yaparak 25°C’de ve CYA ortamında ayrıca 37°C’de 7 gün

inkübasyona bıraktık. İnkübasyon sonrasında bu izolatların fenotipik tanısı Klich, 2002 ve Samson et al., 2010'da belirtilen yönergeleri izleyerek yapılmıştır. Fenotipik tanısı yapılan 27 *Aspergillus* izolatının genotipik tanısı için ITS1-ITS4 primerleriyle Samson, 2014'de belirtilen miktar ve koşullar optimize edilerek PCR gerçekleştirilmiş ve sekans analizine gönderilmiştir. Analizden gelen sekans sonuçları Finch TV (Blast) ve ApE programı kullanılarak değerlendirdik ve <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (NCBI) sayfasında Standard Nucleotide Blast kısmında program ayarlarından megablast (yüksek sekans benzerliği) özelliğini seçerek inceledik. ITS gen bölgesi PCR ürünlerinin sekans analizi sonuçlarını fenotipik tayin sonuçlarıyla beraber değerlendirerek hataya yer vermeksizin 27 izolatın genotipik tanısını yaptık.

Yapılan genotipik tanılamadan sonra 27 *Aspergillus* izolatında 13 farklı *Aspergillus* türü tespit edilmiştir. Bu türler Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.'de belirtilmiştir. Aynı türün farklı suşlarında farklı özellikler görülebileceğinden dolayı 27 *Aspergillus* izolatı da ribotoksin gen bölgesi varlığı açısından incelenmiştir. Bu örneklerin ribotoksin gen bölgesi varlığını Martinez-Ruiz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kullandığı, ribotoksin bölgesine spesifik olarak tanımlanmış KQ1 ve KQ2 olarak adlandırılmış primerleri kullandık (Matinez-Ruiz et al., 1999). Bu çalışmada *Aspergillus giganteus* MDH 18894, *Aspergillus giganteus* NRRL 10, *Aspergillus giganteus* NRRL 1780, *Aspergillus giganteus* NRRL 4763, *Aspergillus viridinutans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus spp.*(7), *Aspergillus spp.*(8), *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus restrictus* MDH 13462L, *Aspergillus glaucus*, *Neosartorya glabra*, *Aspergillus nidulans* (CS2008), *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae* NRRL 447, *Aspergillus niger*, *Aspergillus alutaceus* NRRL 398, *Aspergillus terreus*, *Hemicarpenales acanthosporus*, *Penicillium notatum*, *Penicillium italicum* suşları kullanılarak KQ1 ve KQ2 primerleri ile PCR yapılmıştır. PCR sonucunda *Aspergillus giganteus* MDH 18894, *Aspergillus giganteus* NRRL 10, *Aspergillus giganteus* NRRL 1780, *Aspergillus giganteus* NRRL 4763, *Aspergillus viridinutans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus spp.*(7), *Aspergillus spp.*(8), *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus restrictus* MDH 13462L, *Aspergillus glaucus*, *Neosartorya glabra* suşlarında α -sarcin gen bölgesi tespit edilmiştir. Yine *A. fumigatus*' da mitogillin, *A. restrictus* MDH 13462L' de *restrictocin*, *A. clavatus*' da *clavin* ve *A. clavatus*

CRC32114' de c-sarcin geni varlığı gösterilmiştir. α -sarcin üretimini gen ekspresyonu ve aktivite testleri ile de doğrulamışlardır (Matinez-Ruiz et al., 1999). Yapılan bu çalışmada PCR koşulları belirtilmediğinden PCR optimizasyonunu doğru bir şekilde yapmak amacıyla çalışmada kullanılan ve pozitif sonuç veren *Aspergillus giganteus* NRRL 10 suşu pozitif kontrol olarak kullanmak üzere DSMZ'den (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) temin edilmiştir. KQ1 ve KQ2 primerleriyle *Aspergillus giganteus* NRRL 10 standart suşunu kullanarak PCR standardizasyonunu gerçekleştirdik. Daha sonra bu primerlerle 27 izolatomuzun PCR'ını uygun koşullarda gerçekleştirdik. PCR sonucunda yapılan agaroz jel elektroforezinde literatürdeki sonuçlarla uyumlu olarak hem fenotipik hem genotipik yöntemlerle *Aspergillus clavatus* ve *Aspergillus fumigatus* olarak tanıladığımız iki örneğimizde amplifikasyon ürünü tespit ettik (Şekil 4.30). Ayrıca türü *Aspergillus aculeatus* olan bir örneğimizde de diğer iki örnekteki ürünlerden daha büyük bir PCR ürünü tespit ettik (Şekil 4.29). Bu bölgelerin ribotoksin gen bölgeleri olduğunu onaylamak için PCR ürünlerimizi sekans analizine göndedik. Gelen sonuçları <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (NCBI) sayfasında Standard Nucleotide Blast kısmında program ayarlarından megablast (yüksek sekans benzerliği) özelliğini seçerek inceledik. *Aspergillus clavatus* türümüzdeki bölgenin mitogillin ailesinden cytotoxin clavin/c-sarcin olduğunu ve *Aspergillus fumigatus* türümüzdeki bölgenin mitogillin ailesinden Asp f 1 gen bölgesi olduğunu tespit ederek bu örneklerimizdeki ribotoksin gen bölgesi varlığını ispat ettik. *Aspergillus aculeatus* türümüzün sekans analiz sonuçlarına göre bu bölgenin *Aspergillus aculeatus* hypothetical proteine ait kısmi mRNA ile %95 dizi homolojisi gösterdiğini tespit ettik.

Kullandığımız primerlerin Martinez-Ruiz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kullanılan primerler olduğu ve yaptıkları çalışmada bu primerlerin ribotoksin gen bölgesine spesifik olarak belirtildiği düşünüldüğünde *Aspergillus aculeatus* türümüzde hypothetical proteine ait kısmi mRNA olarak tanımlanan bu bölge üzerine ileride yapılacak çalışmalar neticesinde belki de bu bölgenin yeni bir ribotoksin için tanımlanacak bir ribotoksin gen bölgesine ait olabileceğini düşünmekteyiz. Ribotoksinlerle ilgili yapılan biyoteknolojik araştırmalar düşünüldüğünde keşfedilecek yeni ribotoksinlerin bu alanda yeni kapılar açacağı su götürmez bir gerçektir. Elde ettiğimiz bu veri ileride yapılacak çalışmalara

vesile olması ve yeni bir ribotoksin bulunması potansiyelinden dolayı çalışmamızı son derece değerli kılmaktadır.

1995 yılında Lin ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada *Aspergillus* türlerinde ribotoksin üretimini araştırmak için α -sarcin geni spesifik primerler ile amplifikasyon ve ardından PCR ürünlerinin α -sarcin geni spesifik prob ile Southern dot hybridizationu yapılmıştır. *A. flavus*, *A. asperescens*, *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. giganteus*, *A. oryzae* var. *effusus*, *A. ostianus*, *A. tamarii*, and *N. fischeri* var. *spinosa*'da α -sarcin geni varlığı gösterilmiştir. Yine sonuçlar aktivite testleri ile de doğrulamışlardır (Lin et al., 1995).

Ayrıca 2008 yılında Varga ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Aspergillus*'un *Clavati* şubesine ait türlerde ribotoksin gen bölgesinin varlığını araştırılmıştır. Bu şubeye ait tüm türlerin farklı ribotoksin genlerini taşıdığını saptamışlardır. Buna göre test edilen *A. giganteus* izolatlarının çoğunun *gigantin*, *A. clavatus*, CBS 106.45, *A. clavatonanicus* CBS 474.65, *A. giganteus* MDH 18894 ve iki *A. rhizopodus* izolatının ise α -sarcin ilgili gen taşıdığı saptanmıştır. *A. longivesica*'nın *gigantin* ve *Neocarpenteles acanthosporus*'un c-sarcin ile uzaktan ilgili ribotoksin genlerini taşıdığını göstermişlerdir (Varga and Samson, 2008).

Ribotoksinlerin çok yüksek toksisite gösterdikleri düşünüldüğünde bunların hayvan yemlerinde bulunması, dolayısıyla hayvan vücudundaki birikimleri ve hayvansal gıdalar aracılığıyla insan sağlığına olacak sonuçları öngörülememektedir. Çalışmamız Türkiye'de piyasada satışta bulunan hayvan yemlerinin ihtiva ettiği funguslardan bazılarının ribotoksin gen bölgesini barındırdığını açıkça ortaya koymaktadır. Ribotoksinlerle ilgili çalışmalar, bu toksinlerin 0,1 nM gibi çok düşük konsantrasyonlarda bile ribozomal preparatlarda protein biyosentezini inhibe ettiğini göstermiştir (Lacadena et al., 2007). Bu nedenle de bu fungusların ribotoksin üretme potansiyellerinin olma olasılığı çalışmamızı insan ve hayvan sağlığı açısından önemli kılmaktadır. Literatür taraması yapıldığında *Aspergillus* türlerinde ribotoksin gen bölgesi varlığının araştırılması hakkında yukarıda bahsetmiş olduğumuz çalışmalar öne

çıkmakla birlikte ribotoksinlerin biyoteknolojik uygulamalarıyla ilgili çalışmaların olduğu fakat ribotoksin üreticisi funguslarla ilgili sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmektedir. Ülkemizinse bu alanda ne kadar eksik olduğu ortaya çıkmaktadır. Ribotoksinlerle ilgili çalışmaların yurt dışında ribotoksinlerin 1960'lardaki keşfinden sonra başladığı ve 1990'lardan itibaren hız kazandığı göze çarparken ülkemizde bu alanda yapılmış bir çalışmaya ait makaleye neredeyse rastlanamamaktadır. Dünyada 50 yılı aşkın süredir çalışılan bu konuya ülkemizde gereken önemin verilmediği açıkça görülmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar göz önüne alındığında çalışmamız, bilim dünyamızda yeterince ilgi görmemiş ribotoksinlere verilen önemi arttırmak ve yapılacak yeni çalışmaların kapısını açmak için küçük ama önemli bir adımdır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akkara, M. ve Tosun, H.**, 2014, Funguslardan Elde Edilen Endüstriyel Ürünler, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 9(2): 46-53 s.
- Alford, S.C., Pearson, J.D., Carette, A., Ingham, R.J., Howard, P.L.**, 2009, α -sarcin catalytic activity is not required for cytotoxicity, BMC Biochem.,10, 9.
- Alvarez-Garcia, E., Garcia-Ortega, L., Verdun, Y., Bruix, M., Martinez-del Pozo, A., Gavilanes, J.G.**, 2006, Tyr-48,a conserved residue in ribotoxins, is involved in the RNA degrading activity of α -sarcin, Biol. Chem.,387, 535–541
- Alvarez-Garcia, E., Alegre-Cebollada, J., Batanero, E., Monedero, V., Perez Martinez,G., Garcia-Fernandez, R., Gavilanes, J.G., Martinez-del-Pozo, A.**, 2008, *Lactococcus lactis* as a vehicle for the heterologous expression of fungal ribotoxin variants with reduced IgE binding affinity, Journal of Biotechnology, 134(1-2): 1-8 pp.
- Alvarez-Garcia, E., Batanero, E., Garcia-Fernandez, R., Villalba, M., Gavilanes, J.G., Martinez-del- Pozo, A.**, 2010, A Deletion Variant of the *Aspergillus fumigatus* Ribotoxin Asp f 1 Induces an Attenuated Airway Inflammatory Response in a Mouse Model of Sensitization, J. Investig. Allergol. Clin. Immunol., 20(1): 69-75 pp.
- Alvarez-Garcia, E., Diago-Navarro, E., Herrero-Galan, E., Garcia-Ortega, L., Lopez Villarejo, J., Olmo, N., Diaz-Orejas, R., Gavilanes, J.G., Martinez del-Pozo, A.**, 2011, The ribonucleolytic activity of the ribotoxin α -sarcin is not essential for in vitro protein biosynthesis inhibition, Biochim.Biophys. Acta, 1814, 1377–1382.
- Arruda, L.K., Mann, B.J., Chapman, M.D.**, 1992, Selective expression of a major allergen and cytotoxin, Asp f I, in *Aspergillus fumigatus*, Implications for the immunopathogenesis of *Aspergillus*-related diseases. J. Immunol., 149, 3354–3359.
- Ayub, M.J., Smulski, C.R., Ma, K.W., Levin, M.J., Shaw, P.C., Wong, K.B.**, 2008, The C terminal end of P proteins mediates ribosome inactivation by trichosanthin but does not affect the pokeweed antiviral protein activity, Biochem. Biophys. Res. Commun., 369, 314–319 pp.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B.**, 1998, Illustrated Genera of Imperfect Fungi, Fourth Ed., AP Press, The AmericanPhytopathological Society.St.Paul, Minnesota, USA, 218 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Basmacıoğlu, H. ve Ergül, M.,** 2003, Yemlerde Bulunan Toksinler ve Kontrol Yolları, Hayvansal Üretim 44(1): 9-17 pp.
- Bennett, J.W. and Klich, M.,** 2003, Mycotoxins, Clinical Microbiology Reviews, 497-516 pp.
- Better, M., Bernhard, S.L., Lei, S.P., Fishwild, D.M., Carroll, S.F.,** 1992, Activity of Recombinant Mitogillin and Mitogillin Immunoconjugates, The Journal of Biological Chemistry, 267(23): 16712-16718.
- Bok, J.W. and Keller, N.P.,** 2004, LaeA, a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* spp, Eukaryotic Cell, Apr., 3(2): 527-537 pp.
- Brakhage, A.A., Schroeckh, V.,** 2011, Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters, Fungal Genetics and Biology, 48(1) : 155-22 pp.
- Brandhorst, T. and Kenealy, W.R.,** 1995, Effects of leader sequences upon the heterologous expression of restrictocin in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*, Can. J. Microbiol., 41, 601–611 pp.
- Brandhorst, T., Dowd, P.F., Kenealy, W.R.,** 1996, The ribosome-inactivating protein restrictocin deters insect feeding on *Aspergillus restrictus*, Microbiology , 142, 1551-1556 pp.
- Cantürk, Z.,** 2015, *Aspergillus* ve *Penicillium* Cinslerine Ait Sekonder Metabolitler ve Sınıflandırılması, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 13(2): 1-8 s.
- Carreras-Sangra, N., Tome-Amat, J., Garcia-Ortega, L., Batt, C.A., Onaderra, M., Martinez-del-Pozo, A. Gavilanes, J.G., Lacadena, J.,** 2012, Production and characterization of a colon cancer-specific immunotoxin based on the fungal ribotoxin a sarcin, Protein Engineering, Design & Selection, 25(8): 425– 435 pp.
- Castano-Rodriguez, C., Olombrada, M., Partida-Hanon, A., Lacadena, J., Onaderra, M.,Gavilanes, J.G., Garcia-Ortega, L., Martinez-del-Pozo, A.,** 2015, Involvement of loops 2 and 3 of α -sarcin on its ribotoxic activity, Toxicon, 96, 1–9 pp.
- Downes, F.P. and Ito, K.,** 2001, Microbial Examination of Foods, American Public Health Association, 679 p.
- Döll,S. and Danicke, S.,** 2011, The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding, Preventive Veterinary Medicine, 102(2): 132-145 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ergül, M., 2008,** Karma Yemler ve Karma Yem Teknolojisi, Ege Üniversitesi Yayınları Ziraat Fakültesi, 384, 169-188 s.
- Fernandez-Luna, J.L., Lopez-Otin, C., Soriano, F., Mendez, E., 1985,** Complete Amino Acid Sequence of the *Aspergillus* Cytotoxin Mitogillin, *Biochemistry*, 24, 861-867.
- Fox, E.M. and Howlett, B.J., 2008,** Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology, *Current Opinion in Microbiology*, 11(6): 481-487 pp.
- Garcia-Ortega, L., Masip, M., Mancheno, J.M., Onaderra, M., Lizarbe, M.A., Garcia Mayoral, M.F., Bruix, M., Martínez-del-Pozo, A., Gavilanes, J.G., 2002,** Deletion of the NH₂-terminal β -hairpin of the ribotoxin α -sarcin produces a nontoxic but active ribonuclease, *J Biol. Chem.*, 277, 18632–18639
- Garcia-Ortega, L., Lacadena, J., Villalba, M., Rodriguez, R., Crespo, J.F., Rodriguez, J., Pascual, C., Olmo, N., Onaderra, M., Martinez-del-Pozo, A., et al., 2005,** Production and characterization of a noncytotoxic deletion variant of the *Aspergillus fumigatus* allergen Asp1 displaying reduced IgE binding, *FEBS J.*, 272, 2536–2544.
- Gasset, M., Mancheno, J.M., Lacadena, J., Turnay, J., Olmo, N., Lizarbe, M.A., Martinez del-Pozo, A., Onaderra, M., Gavilanes, J.G., 1994,** α -arcin, a ribosome-inactivating protein that translocates across the membrane of phospholipid vesicles, *Curr. Top. Pept. Protein Res.*, 1, 99-104 pp.
- Gavilanes, J.G., Vazquez, D., Soriano, F., Mendez, E., 1983,** Chemical and spectroscopic evidence on the homology of three antitumor proteins: α sarcin, mitogillin, and restrictocin, *Journal of Protein Chemistry*, 2(3): 251-261 pp.
- Girgin, G., Başaran, N., Şahin, G., 2001,** Dünyada ve Türkiye’de İnsan Sağlığını Tehdit Eden Mikotoksinler, *Türk Hij. Den. Biyol. Derg.*, 58(3): 97-118 s.
- Graziani, F., Pujol, A., Nicoletti, C., Pinton, P., Armand, L., Di Pasquale, E., Oswald, I.P., Perrier, J., Maresca, M., 2015,** The Food-Associated Ribotoxin Deoxynivalenol Modulates Inducible NO Synthase in Human Intestinal Cell Model, *Toxicological Sciences*, 145(2): 372-382 pp.
- Gürgün, V. ve Halkman, K., 1990,** Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri, Gıda Teknolojisi Derneği Yayın no 7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Halkman, A.,** 2017, Mikroorganizma Analiz Yöntemleri, <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/DosyaGoster.aspx?DIL=1&BELGANAHA=76 &DOSYASIM=942300070.pdf> (Erişim Tarihi: 25 Aralık 2017)
- Hansson, D.,** 2013, Structure and biosynthesis of fungal secondary metabolites, Uppsala : Sveriges lantbruksuniv., Acta Universitatis agriculturae Sueciae 1652-6880(63): 73 pp.
- Haseneoğlu, İ.,** 1991, Toprak Mikrofungusları, Atatürk Üniversitesi Yayınları No. 689
- Herrero-Galan, E., Lacadena, J., Martinez del Pozo, A., Boucias, D.G., Olmo, N., Onaderra, M.,** 2008, The insecticidal protein hirsutellin A from the mite fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* is a ribotoxin, Proteins , Wiley-Liss, Inc., 72: 217–228 pp.
- Herrero-Galan, E., Alvarez-Garcia, E., Carreras-Sangra, N., Lacadena, J., Alegre Cebollada, J., Martinez del-Pozo, A., Onaderra, M., Gavilanes, J.G.,** 2009, Fungal Ribotoxins: Structure, Function and Evolution, Microbial Toxins: Current Research and Future Trends, 167-182 pp.
- Herrero-Galan, E., Garcia-Ortega, L., Lacadena, J., Martinez-del-Pozo, A., Olmo, N., Gavilanes, J.G., Onaderra, M.,** 2011, A non-cytotoxic but ribonucleolytically specific ribotoxin variant: implication of tryptophan residues in the cytotoxicity of hirsutellin A, Biological Chemistry, 393(6): 449-456 pp.
- Herrero-Galan, E., Garcia-Ortega, L., Olombrada, M., Lacadena, J., Martinez del-Pozo, A., Gavilanes, J.G., Onaderra, M.,** 2013, Hirsutellin A: A Paradigmatic Example of the Insecticidal Function of Fungal Ribotoxins, Insects, 4, 339-356 pp.
- Hobden, A.N. and Cundliffe, E.,** 1978, The mode of action of alpha sarcin and a novel assay of the puromycin reaction, Biochem J., 170(1): 57-61 pp.
- Huang, K.C., Hwang, Y.Y., Hwu, L., Lin, A.,** 1997, Characterization of A New Ribotoxin Gene (*c-sar*) from *Aspergillus Clavatus*, Toxicon, 35(3): 383-392 pp.
- Hussein, H.S. and Brasel, J.M.,** 2001, Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals, Toxicology, 167(2): 101-134 pp.
- Hwu, L., Cho, C., Tzeanz, S.S., Lin, A.,** 2001, Nucleotide sequence and the action of ribotoxin gene (*sar* gene) of *Penicillium* isolates from Taiwan, Bot. Bull. Acad. Sin., 42: 101-107 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jones, T.D., Hearn, A.R., Holgate, R.G.E., Kozub, D., Fogg, M.H., Carr, F.J., Baker, M.P., Lacadena, J., Gehlsen, K.R.,** 2016, A deimmunised form of the ribotoxin, α -sarcin, lacking CD4+ T cell epitopes and its use as an immunotoxin warhead, *Protein Engineering, Design&Selection*, 29(11): 531–540 p.
- Kanwar, S.S. and Kumar, R.,** 2017, Ribonuclease as Anticancer Therapeutics, *Enzyme Engineering*, 6(1), DOI: 10.4172/2329-6674.1000162
- Kavanagh, K.,** 2011, *Fungi Biology and Applications*, A John Wiley & Sons, Ltd., UK, 384p.
- Kao, R. and Davies, J.,** 1995, Fungal ribotoxins: a family of naturally engineered targeted toxins?, *Biochemistry and Cell Biology*, 73(11-12): 1151-1159 pp.
- Kaya, S.,** 1990, *Veteriner Toksikoloji. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları.*
- Kaya, S. ve Yarsan, E.,** 1995, Yem ve Yem Hammaddelerinde Küflenmenin Önlenmesi ve Mikotoksinlerle Kirlenmiş Bu Tür Yemlerin Değerlendirilmesine Yönelik Uygulamalar, *Ankara Üni. Vet. Fak. Dergisi*, 42 (2): s.111-122 s.
- Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W.,** 2005, Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics, *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), 937-947 pp.
- Klich, M.A.,** 2002, *Identification of Common Aspergillus Species* (Uhrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures)
- Lacadena, J., Martinez-del-Pozo, A., Lacadena, V., Martinez-Ruiz, A., Mancheno, J.M., Onaderra, M., Gavilanes, J.G.,** 1998, The cytotoxin α -sarcin behaves as a cyclizing ribonuclease. *FEBS Lett.*, 424, 46–48 pp.
- Lacadena, J., Alvarez-Garcia, E., Carreras-Sangra, N., Herrero-Galan, E., Alegre Cebollada, J., Garcia-Ortega, L., Onaderra, M., Gavilanes, J.G., Martinez-del-Pozo,** 2007, A. Fungal ribotoxins: Molecular dissection of a family of natural killers, *FEMS Microbiology Reviews.*, 31(2): 212–237 pp.
- Lamy, B. and Davies, J.,** 1991, Isolation and nucleotide sequence of the *Aspergillus restrictus* gene coding for the ribonucleolytic toxin restrictocin and its expression in *Aspergillus nidulans*: The leader sequence protects producing strains from suicide, *Nucleic Acids Res.*, 19, 1001–1006.
- Lamy, B. and Davies, J.,** 1992, *The Aspergillus Ribonucleolytic Toxins (Ribotoxins)*, Genetically Engineered Toxins, Marcel Dekker Inc., 237-257 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Landi, N., Pacifico, S., Ragucci, S., Iglesias, R., Piccolella, S., Amici, A., Di Giuseppe, A.M.A., Di Maro, A.,** 2017, Purification, characterization and cytotoxicity assessment of Ageritin: The first ribotoxin from the basidiomycete mushroom *Agrocybe aegerita*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1861(5): 1113–1121 pp.
- Lin, A., Huang, K.C., Hwu, L., Tzean, S.S.,** 1995, Production of Type II Ribotoxins by *Aspergillus* Species and Related Fungi in Taiwan, *Toxicon*, 33(1): 105–110 pp.
- Liu, W.Z., Boucias, D.G., McCoy, C.W.,** 1995, Extraction and Characterization of the Insecticidal Toxin Hirsutellin A Produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii*, *Experimental Mycology*, 19, 254–262 pp.
- Liu D., Coloe S., Baird R. and Pedersen J.,** 2000, Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 471 p.
- Lopez-Otin, C., Barber, D., Fernandez-Luna, J.L., Soriano, F., Mendez, E.,** 1984, The primary structure of the cytotoxin restrictocin, *Eur. J. Biochem.*, 143, 621–634 pp.
- Losada, L., Ajayi, O., Frisvad, J.C., Yu, J., Nierman, W.C.,** 2009, Effect of competition on the production and activity of secondary metabolites in *Aspergillus* species, *Medical Mycology*, 47, 88–96 pp.
- Martinez-del-Pozo, A., Gasset, M., Onaderra, M., Gavilanes, J.G.,** 1988, Conformational study of the antitumor protein α -sarcin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 953, 280–288 pp.
- Martínez-Ruiz, A., Kao, R., Davies, J., Martínez-del-Pozo, A.,** 1999a, Ribotoxins are a more widespread group of proteins within the filamentous fungi than previously believed, *Toxicon*, 37, 1549–1563 pp.
- Martinez-Ruiz, A., Martinez-del-Pozo, A., Lacadena, J., Onaderra, M., Gavilanes, J.G.,** 1999b, Hirsutellin A displays significant homology to microbial extracellular ribonucleases, *J. Invertebr. Pathol.*, 74: 96–97 pp.
- Masip, M., Lacadena, J., Mancheno, J.M., Onaderra, M., Martinez-Ruiz, A., Martinez-del Pozo, A., Gavilanes, J.G.,** 2001, Arginine 121 is a crucial residue for the specific cytotoxic activity of the ribotoxin α -sarcin, *Eur. J. Biochem.*, 268, 6190–6196.
- Mazet, I. and Vey, A.,** 1995, Hirsutellin A, a toxic protein produced in vitro by *Hirsutella thompsonii*, *Microbiology* 141, 1343–1348.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McCoy, C.W.**, 1981, Pest control by the fungus *Hirsutella thompsonii*, In: Burges, H.D., Hussey, N.W. (Eds.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1979–1980, Academic Press, New York, 499–512 pp.
- Meinwald, J.**, 2011, Natural Products as Molecular Messengers, Journal of Natural Products, 74(3): 305-309 pp.
- Miller, S.P. and Bodley, J.W.**, 1988, The ribosomes of *Aspergillus giganteus* are sensitive to the cytotoxic action of α -sarcin, FEBS Lett., 229: 388–390 pp.
- Moss, M.O.**, 2011, Fungal Metabolites, Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd., <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000360.pub2>
- Narla, A. and Ebert, B.L.**, 2010, Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction, Blood, 115, 3196-3205.
- Nayak, S.K. and Batra, J.K.**, 1997 A single amino acid substitution in ribonucleolytic toxin restrictocin abolishes its specific substrate recognition activity, Biochemistry, 36, 13693-13699
- Nayak, S.K., Bagga, S., Gaur, D., Nair, D.T., Salunke, D.M., Batra, J.K.**, 2001, Mechanism of specific target recognition and RNA hydrolysis by ribonucleolytic toxin restrictocin, Biochemistry, 40, 9115–9124
- Nierman, W.C., Pain, A., Anderson, M.J., Worthman, J.R., Kim, H.S., Arroya, J. et al.**, Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*, Nature, 438, 1151-1156
- Nursoy, H. ve Şahin E.**, 2017, Son metodlara göre yemlerin kuru madde analizleri, Tr. Doğa ve Fen Dergisi, 6(1) : s. 61-66 s.
- Olmo, N., Turnay, J., Gonzalez de Buitrago, G., Lopez de Silanes, I., Gavilanes, J.G., Lizarbe, M.A.**, 2001, Cytotoxic mechanism of the ribotoxin α -sarcin. Induction of cell death via apoptosis. Eur. J. Biochem., 268, 2113–2123.
- Olombrada, M., Herrero-Galan, E., Tello, D., Onaderra, M., Gavilanes, J.G., Martinez-del Pozo, A., Garcia-Ortega, L.**, 2013, Fungal extracellular ribotoxins as insecticidal agents, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 43, 39-46 pp.
- Olombrada, M., Martinez-del-Pozo, A., Medina, P., Budia, F., Gavilanes, J.G., Garcia Ortega, L.**, 2014, Fungal ribotoxins: Natural protein-based weapons against insects, Toxicon, 83, 69–74 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Olombrada, M., Medina, P., Budia, F., Gavilanes, J.G., Martinez-Del-Pozo, A., Garcia-Ortega, L.,** 2016a, Characterization of a new toxin from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: The ribotoxin anisoplin, Biological Chemistry, 398(1): 135-142 pp. DOI: <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0119>
- Olombrada, M., Garcia-Ortega, L., Lacadena, J., Onaderra, M., Gavilanes, J.G., Martinez del-Pozo, A.,** 2016b, Involvement of loop 5 lysine residues and the N-terminal β -hairpin of the ribotoxin hirsutellin A on its insecticidal activity, Biological Chemistry, 397(2): 135-145 pp.
- Olombrada, M., Lazaro-Gorines, R., Lopez-Rodriguez, J.C., Martinez-del-Pozo, A., Onaderra, M., Maestro-Lopez, M., Lacadena, J., Gavilanes, J.G., Garcia-Ortega, L.,** 2017, Fungal Ribotoxins: A Review of Potential Biotechnological Applications, Toxins ,9(2): 71
- Olson, B.H., Goerner, G.L.,** 1965, α -sarcin, a new antitumor agent I. Isolation, purification, chemical composition, and the identity of a new amino acid. Appl. Microbiol., 13, 314–321 pp.
- Omoto, C. and McCoy, C.W.,** 1998, Toxicity of Purified Fungal Toxin Hirsutellin A to the Citrus Rust Mite *Phyllocoptruta oleivora* (Ash.), Journal of Invertebra Pathology, 72, 319-322 pp.
- Öksüztepe, G. and Erkan, S.,** 2016, Mikotoksinler ve Halk Sağlığı Açısından Önemi, Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 5(2) : 190-195 s.
- Parente, D., Raucchi, G., Celano, B., Pacilli, A., Zannoni, L., Canevari, S., Adobati, E., Colnaghi, M.I., Dosio, F., Arpicco, S., Cattell, L., Mele, A., De Santis, R.,** 1996, Clavin, a Type-1 Ribosome-Inactivating Protein from *Aspergillus clavatus* IF0 8605, Eur. J. Biochem., 239, 272-280 pp.
- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic M.,** 1999, Toxic effects of mycotoxins in humans, Bulletin of the World Health Organization, 77(9): 754-766 pp.
- Pitt, J.I.,** 1973, An Appraisal of Identification Method for *Penicillium* species Novel Taxonomic Criteria Based on Temperature and Water Relations, Mycologia, 65, 1135-1157.
- Rathore, D., Nayak, S.K., Batra, J.K.,** 1997, Overproduction of fungal ribotoxin α sarcin in *Escherichia coli*: generation of an active immunotoxin, Gene, 190(1): 31-35 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Razafimanjato, H., Benzaria, A., Taieb, N., Guo, X.J., Vidal, N., Di Scala, C., Varini, K., Maresca, M.,** 2011, The Ribotoxin Deoxynivalenol Affects the Viability and Functions of Glial Cells, *GLIA* 59:1672–1683.
- Roga, V., Hedeman, L.P., Olsin, B.H.,** 1971, Evaluation of mitogillin (NSC-69529) in the treatment of naturally occurring canine neoplasms, *Cancer Chemotherapy Reports*, 55(2): 101-113 pp.
- Rohlf, M. and Churchill, A.C.L.,** 2011, Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods, *Fungal Genetics and Biology*, 48(1) : 23-24 pp.
- Sabuncuoğlu, S.A., Baydar, T., Giray, B., Şahin, G.,** 2008, MİKOTOKSİNLER: Toksik Etkileri, Degredasyonları, Oluşumlarının Önlenmesi ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, 28(1) 63-92 s.
- Salvarelli, S., Munoz, S., Conde, F.P.,** 1994, Purification and characterization of a ribonuclease from *Aspergillus giganteus* IF0 581 8, the gigantins Immunological and enzymic comparison with alphasarcin, *Eur. J. Biochem.* 225, 243-251 pp.
- Samson, R.A. and Pitt, J.I.,** 2000, Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification, CRC Press, London, p.524
- Samson, R.A., Houbbraken, J., Thrane, U.,** 2010, Food and Indoor Fungi, CBS KNAW Biodiversity Center; Utrecht
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbbraken, J.,** 2014, Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*, *Studies in Mycology*, 78: 141-173 pp.
- Schindler, D.G. and Davies, J.E.,** 1977, Specific cleavage of ribosomal RNA caused by α -sarcin, *Nucleic Acids Res.*, 4, 1097-1110 pp.
- Selim, K.A., El-Beih, A.A., Abdel-Rahman, T.M., El-Diwany, A.I.,** 2012, Biology of endophytic fungi, *Current research in environmental & applied mycology*, 2(1): 31-82 pp.
- Shaw, K.E., Davidson, G., Clark, S.J., Ball, B.V., Pell, J.K., Chandler, D., Sunderland, K.D.,** 2002, Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, *Apis mellifera*, *Biol. Control*, 24, 266 276 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Temizkan, G. ve Arda, N.,** 1999, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEİM), Yayın no:1
- Thom, C. and Church, M.B.,** 1926, The Aspergilli, Baltimore: Williams & Wilkins Co.
- Tiryaki, O., Seçer, E., Temur, C.,** 2011, Yemlerde Mikotoksin Oluşumu, Toksisiteleri ve Mikotoksin Kalıntı Analizleri, ANADOLU, J. of AARI, 21(1) : 44-58 s.
- Tome-Amat, J., Ruiz-de-la-Herran, R., Martinez-del-Pozo, A., Gavilanes, J.G., Lacadena, J.,** 2014, α -sarcin and RNase T1 based immunoconjugates: the role of intracellular trafficking in cytotoxic efficiency, FEBS Journal 282, 673–684 pp.
- Tome-Amat, J., Herrero-Galan, E., Onaderra, M., Martinez-del-Pozo, A., Gavilanes, J.G., Lacadena, J.,** 2015(a), Preparation of an engineered safer immunotoxin against colon carcinoma based on the ribotoxin hirsutellin A, FEBS Journal, 282, 2131–2141.
- Tome-Amat, J., Olombrada, M., Ruiz-de-la-Herran, J., Perez-Gomez, E., Andradas, C., Sanchez, C., Martinez, L., Martinez-del-Pozo, A., Gavilanes, J.G., Lacadena, J.,** 2015(b), Efficient in vivo antitumor effect of an immunotoxin based on ribotoxin α -sarcin in nude mice bearing human colorectal cancer xenografts, Tome-Amat et al. SpringerPlus, 4: 168.
- Tunail, N.,** 2000, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Sim Matbaası, Ankara, 522 p.
- Turnay, J., Olmo, N., Jimenez, A., Lizarbe, M.A., Gavilanes, J.G.,** 1993, Kinetic study of the cytotoxic effect of α -sarcin, a ribosome inactivating protein from *Aspergillus giganteus*, on tumour cell lines: Protein biosynthesis inhibition and cell binding, Mol. Cell. Biochem., 122, 39–47 pp.
- Yadav, S. and Batra, J.K.,** 2015, Ribotoxin restrictocin manifests anti-HIV-1 activity through its specific ribonuclease activity, International Journal of Biological Macromolecules, 76, 58-62 pp.
- Yang, R. and Kenealy, W.R.,** 1992, Regulation of restrictocin production in *Aspergillus restrictus*, Journal of General Microbiology, 138: 1421-1427 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, X. and Moffat, K.**, 1996, Insights into specificity of cleavage and mechanism of cell entry from the crystal structure of the highly specific *Aspergillus* ribotoxin, restrictocin, *Current Biology Ltd.*, 4:837–852 pp.
- Varga, J. and Samson, R.A.**, 2008, Ribotoxin genes in isolates of *Aspergillus* section *Clavati*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 94, 481–485 pp.
- Viegas, A., Herrero-Galan, E., Onaderra, M., Macedo, A.L., Bruix, M.**, 2009, Solution structure of hirsutellin A, New insights into the active site and interacting interfaces of ribotoxins. *FEBS J.*, 276, 2381–2390.
- Weig, M., Frosch, M., Tintelnot, K., Haas, A., Grob, U., Linsmeier, B., Heesemann, J.**, 2001, Use of Recombinant Mitogillin for Improved Serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus* Associated Diseases, *Journal of Clinical Microbiology*, 1721-1730 pp.
- Williams, R.B., Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Lee, A.E., Cichewicz, R.H.**, 2008, Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome, *Organic & Biomolecular Chemistry*, (6), 1895-1897 pp.
- Wirth, J., Martinez-del-Pozo, A., Mancheno, J.M., Martinez Ruiz, A., Lacadena, J., Onaderra, M., Gavilanes, J.G.**, 1997, Sequence Determination and Molecular Characterization of Gigantin, a Cytotoxic Protein Produced by the Mould *Aspergillus giganteus* IFO 5818, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 343(2): 188-193 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Bahar MİDİLLİ, 16/05/1989 yılında Balıkesir’de doğdu. İlk öğrenimini 1996-2000 yılları arasında Balıkesir’de Nadir Tolun İlköğretim Okulu’nda, orta öğrenimini 2001-2003 yılları arasında Özel ALÇEV Ortaokulu ve Mustafa Keskin Ortaokulu’nda, lise öğrenimini 2004-2007 yılları arasında Burhaniye Süper Lisesi’nde tamamladı. Yüksek öğrenimini 2008-2013 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümünde tamamladı. Ardından 2014 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans’a başladı. Aynı bölümdeki yüksek lisans eğitimini 2018 yılında ‘‘Piyasada satışa sunulan hayvan yemlerinden izole edilen *Aspergillus* türlerinde ribotoksin üretiminden sorumlu gen bölgesinin araştırılması’’ konulu tez ile tamamladı.