

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ORMAN TOPRAĞINDAN İZOLE EDİLEN *ASPERGİLLUS* TÜRLERİ
ÜZERİNDE MORFOLOJİK, KOLONİYAL VE MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR**

EDA GİZEM AYAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: PROF. DR. AHMET ASAN

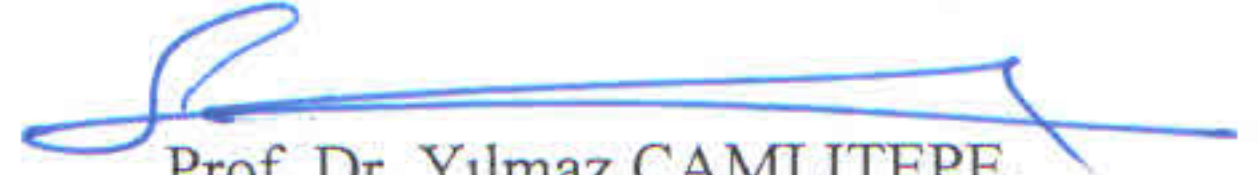
EDİRNE-2017

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



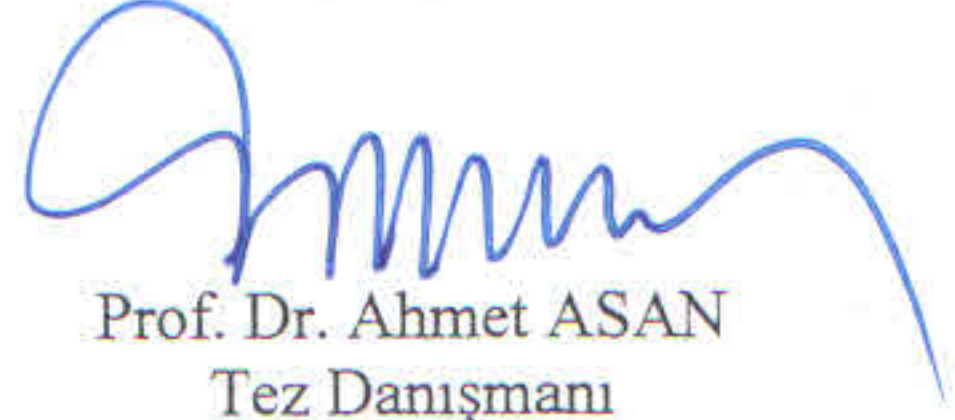
Prof. Dr. Murat YURTCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.



Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ahmet ASAN
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

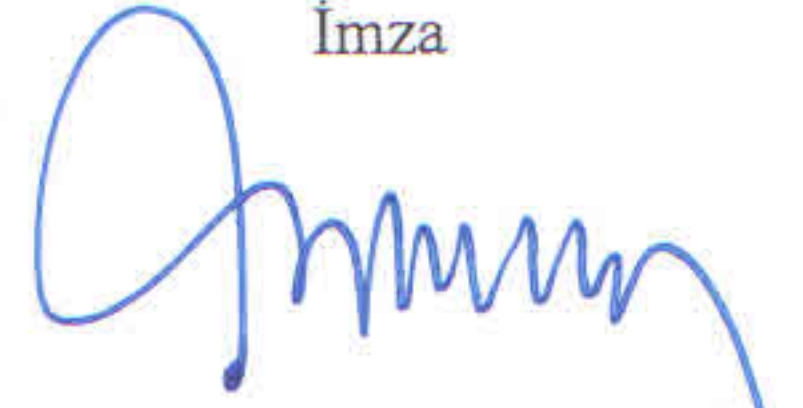
Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ahmet ASAN

Doç. Dr. Burhan ŞEN

Doç. Dr. Ilgaz AKATA

İmza



Tarih: 19/06/2017

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

19/06/2017

Eda Gizem AYAN



Yüksek Lisans Tezi

Orman Toprağından İzole Edilen *Aspergillus* Türleri Üzerinde Morfolojik, Koloniyal ve Moleküler Çalışmalar

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, Edirne ili orman topraklarındaki *Aspergillus* türlerinin geleneksel fenotipik karakterlere dayanan morfolojik çalışmaların yanında moleküler çalışmalar ile tespit edilebilmesi amaçlanmıştır. Araştırma kapsamında, Karaağaç Kent Ormanı istasyon olarak belirlenmiştir. 2016 yılı Mart ayında Brown (1958)'un metodu kullanılarak toprak örnekleri alınmıştır. Topraktan mikrofungus izolasyonu için Waksman (1922)'in "Toprağı Sulandırma Metodu" kullanılmıştır. İzole edilen kolonilerden *Aspergillus* türlerinin tespit edilebilmesi amacı ile morfolojik, koloniyal ve moleküler tanımlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Morfolojik çalışmalar için CZ, CYA, CY20S, MEA besiyerlerine yapılan ekimlerin ardından, mikroskopik ve makroskopik karakterler incelenmiştir. Moleküler çalışmalar için ise sırasıyla DNA izolasyonu, Calmodulin gen bölgesini hedefleyen PCR işlemleri, PCR ürününün saflaştırılması, dizi analizi ve flogenetik analiz aşamaları uygulanmıştır. Çalışmalar sonucunda 7 adet *Aspergillus* türü tespit edilmiştir. Bu türler, *Aspergillus affinis*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus dimorphicus*, *Aspergillus europaeus*, *Aspergillus spelaeus* ve *Aspergillus fischeri*'dir.

Yıl : 2017

Sayfa Sayısı : 59

Anahtar Kelimeler : Toprak, *Aspergillus*, Calmodulin geni

Master's Thesis

Morphological, Colonial and Molecular Studies of *Aspergillus* Species Isolated from Forest Soil

Trakya University Institute of Natural Sciences

Biology

ABSTRACT

In this study, it is aimed to detect *Aspergillus* species that take place in forest lands of Edirne City by morphological studies based on traditional phenotypic characteristics in addition to molecular studies. In the scope of the research, Karaağaç City Forest has been determined as station. Soil samples were taken by using Brown (1958)'s Method in March, 2016. Waksman (1922)'s “Soil Dilution Method” was used for microfungus isolation from soil. Morphological, colonial and molecular identification processes were performed for detection of *Aspergillus* species from isolated colonies. For morphological studies, microscopic and macroscopic characters were examined after the operation of planting in CZ, CYA, CY20S, MEA medias. For molecular studies, DNA isolation, PCR operations that targeting Calmodulin gene region, purification of the PCR product, sequence analysis and phlogenical analysis processes were performed respectively. Seven *Aspergillus* species were detected as a result of studies. This species are *Aspergillus affinis*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus dimorphicus*, *Aspergillus europaeus*, *Aspergillus spelaeus* and *Aspergillus fischeri*.

Year : 2017

Number of Pages : 59

Keywords : Soil, *Aspergillus*, Calmodulin gene

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bütün koşullarda sabır ve hoşgörü gösteren değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Ahmet ASAN'a (Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü),

Araştırma sürecinde, özellikle laboratuvar çalışmalarında bilgilerini ve zamanını benimle paylaşan, öğreten, sorunlarımı çözmede yardımcı olan, Doç. Dr. Burhan ŞEN'e (Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü),

Yüksek lisans eğitimi ve tez aşamasının her anında beraber çalıştığım, engellerin üstesinden birlikte geldiğim arkadaşım Tuğba KORUR KOLANLARLI'ya,

Hayatım boyunca yanımda olan ve beni destekleyen annem, babam ve kardeşime,

teşekkürlerimi sunarım.

EDA GİZEM AYAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
SİMGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİL LİSTESİ.....	VIII
TABLO LİSTESİ.....	IX
BÖLÜM 1	
1. GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2	
2. ARAŞTIRMA BÖLGESİNİN TANIMI.....	7
2.1. Coğrafi Özellikler.....	7
2.2. İklim.....	8
2.3. Bitki Örtüsü.....	11
2.3.1. Edirne Bitki Örtüsü.....	11
2.3.2. Edirne Karaağaç Kent Ormanı Bitki Örtüsü.....	11
2.4. Toprak Özellikleri.....	12
2.5. Jeolojik Yapı.....	12
BÖLÜM 3	
3. MATERYAL VE METOT.....	13
3.1. Materyal.....	13
3.2. Toprak Örneklerinin Alınması.....	13
3.3. Toprak Örneklerinden İzolasyon İşlemleri.....	13
3.4. Stok Kültür Hazırlanması.....	15
3.5. Morfolojik Teşhis.....	16
3.6. Morfolojik Teşhis ve İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler.....	16
3.6.1. Dichloran Glycerol Chloramphenicol (DG18) Agar.....	16
3.6.2. Maximum Recovery Diluent (MRD).....	17
3.6.3. Malt Extract Agar (MEA).....	17

3.6.4. Czapek Concentrate with trace metals.....	17
3.6.5. Czapek Dox Agar/Czapek's Solution Agar (CZ).....	18
3.6.6. Czapek Yeast Agar (CYA25, CYA37).....	18
3.6.7. Czapek Yeast Agar with %20 Sucrose (CY20S).....	18
3.6.8. Potato Dextrose Agar (PDA).....	19
3.6.9. SS Buffer Çözeltisi.....	19
3.6.10. Laktofenol.....	19
3.7. Moleküler Teşhis.....	19
3.7.1. DNA İzolasyonu.....	20
3.7.2. PCR Kurulumu.....	21
3.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	22
3.7.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	24
3.7.5. Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz.....	24
BÖLÜM 4	
4. SONUÇLAR.....	25
4.1. Tür Düzeyinde Teşhis Edilen <i>Aspergillus</i> Türleri.....	28
4.1.1. <i>Aspergillus affinis</i> Davolos, Persler, Pietrangeli & Maggi 2011...28	
4.1.2. <i>Aspergillus awamori</i> Nakaz. 1907.....	29
4.1.3. <i>Aspergillus carbonarius</i> (Bainier) Thom 1916.....	31
4.1.4. <i>Aspergillus dimorphicus</i> B.S. Mehrotra & R. Prasad 1969.....	33
4.1.5. <i>Aspergillus europaeus</i> Hubka, A. Nováková, Samson, Houbraken, Frisvad & M. Kolařík 2016.....	35
4.1.6. <i>Aspergillus spelaesus</i> A. Nováková, Hubka, M. Kolarík & S.W. Peterson 2015.....	37
4.1.7. <i>Aspergillus fischeri</i> Wehmer 1907.....	38
4.2. Tür Düzeyinde Teşhis Edilemeyen <i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i> Türleri.....	41
BÖLÜM 5	
5. TARTIŞMA.....	45
KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	59

SİMGELER DİZİNİ

BenA	: β -tubulin
CaM	: Calmodulin
cm	: Santimetre
CTAB	: Hekzadesil Trimetil Amonyum Bromid
CYA	: Czapek Yeast Agar
CY20S	: Czapek Yeast Agar with %20 Sucrose
CZ	: Czapek Dox Agar
DG18	: Dichloran Glycerol Chloramphenicol Agar
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
g	: Gram
g	: Relatif Santrifüj Kuvveti
ITS	: Internal Transcribed Spacer
kg	: Kilogram
km	: Kilometre
km ²	: Kilometrekare
M	: Molar
m	: Metre

m ²	: Metrekare
MEA	: Malt Extract Agar
mg	: Miligram
MGW	: Moleküler Ölçekli Su (Molecular Grade Water)
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
MRD	: Maximum Recovery Diluent
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
PDA	: Potato Dextrose Agar
rpm	: Dakikada Devir Sayısı (Rotatory Per Minute)
sn	: Saniye
UV	: Ultraviyole
v/v	: volume/volume
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
°C	: Santigrat (Celcius)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Edirne ili Karaağaç Kent Ormanı haritası.....	8
Şekil 2.2. Türkiye iklim tipleri haritası.....	9
Şekil 4.1. <i>Aspergillus affinis</i> A. MEA B. CYA25 C. CZ D. CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri E. Spor yapısı x40 F. Konidiafor x40.....	29
Şekil 4.2. <i>Aspergillus awamori</i> A. MEA B. CYA25 C. CZ D. CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri E. Spor yapısı x40 F. Konidiafor x40.....	31
Şekil 4.3. <i>Aspergillus carbonarius</i> A. MEA B. CYA25 C. CZ D. CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri E. Spor yapısı x40 F. Konidiafor x40.....	33
Şekil 4.4. <i>Aspergillus dimorphicus</i> A. MEA B. CYA25 C. CZ D. CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri E. Spor yapısı x100 F. Konidiafor x40.....	34
Şekil 4.5. <i>Aspergillus europaeus</i> A. MEA B. CYA25 C. CZ D. CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri E. Spor yapısı x40 F. Konidiafor x40.....	36
Şekil 4.6. <i>Aspergillus spelaesus</i> A. MEA B. CYA25 C. CZ D. CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri E. Spor yapısı x100 F. Konidiafor x40.....	38
Şekil 4.7. <i>Aspergillus fischeri</i> A. MEA B. CYA25 C. CY20S besiyerlerinde 5 günlük koloni görünüşleri D. Askus x100 E. Kleistotesyum x10 F. Konidiafor x40 G. Askospor x100 H. Basidiospor x100.....	40
Şekil 4.8. 26A no'lu örnek A. MEA B. CYA25 C. CYA37 besiyerlerinde 5 günlük koloni görünüşleri D. CYA37 besiyeri koloni altı E. Spor yapısı x100 F. Konidiafor x40.....	42
Şekil 4.9. 25A no'lu örnek A. MEA B. CYA37 C. CY20S besiyerlerinde 5 günlük koloni görünüşleri D. CY20S besiyeri koloni altı E. Spor yapısı x100 F. Konidiafor x40.....	43
Şekil 4.10. 24A no'lu örnek A. CZ B. CY20S besiyerlerinde 5 günlük koloni görünüşleri C. CZ besiyeri koloni altı D. CY20S besiyeri koloni altı E. Spor yapısı x100 F. Konidiafor x40.....	44

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Araştırmanın gerçekleştirildiği 2016 yılı Mart ayına ait meteorolojik veriler.....	10
Tablo 3.1. PCR kurulumu için gerekli olan bileşenler ve miktarları.....	22
Tablo 3.2. <i>Aspergillus</i> Calmodulin Touchdown PCR programı.....	23
Tablo 4.1. Morfolojik ve moleküler teşhis sonuçları.....	25



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Toprak, içeriğinde çeşitli mikroorganizmalar barındıran kompleks bir yaşam ortamıdır [1,2,3,4,5,6]. Topraklar ve toprak üzerindeki döküntüler, funguslar için barınak ve önemli besin kaynaklarıdır [4]. Mikrofunguslar, doğadaki her ortamda bulunabilmelerine karşın sunduğu optimum şartlarla fungal gelişimin en iyi olduğu yer topraktır [1,2,6,7,8,9].

Dünya çapında toprak mikrofungusları ile ilgili ilk çalışmaları, 1886 yılında Adametz isimli araştırmacı gerçekleştirmiştir. Bu çalışmalar sonucunda 11 fungus türü izole ederek toprağın karışık bir mikrofungus florasına sahip olduğunu belirlemiştir [5,6,10,11,12,13,14,15]. Ülkemizde bu alandaki ilk çalışmalar ise 1970 yılında Öner tarafından başlatılmıştır [3,7,11,16,17,18]. 1902 yılında Oedemans ve Koning tarafından toprak funguslarının ilk detaylı sınıflandırılması yapılmıştır [14,19].

Topraktaki sayı ve çeşitlilikleri fazla olan önemli ve büyük mikroorganizma grupları; bakteri, aktinomiset, fungus, alg ve protozoonlar olarak sayılabilir [5]. Bu mikroorganizmalardan sayısal olarak en yüksek değere bakteriler sahipken, biyokütle olarak en fazla funguslardır [1,13,14,20]. Çeşitli araştırmacılar tarafından 1 gram toprakta normal şartlar altında 30000 protozoon, 50000 alg, 400000 fungus, 700000 aktinomiset ve 15000000 bakteri olduğu belirlenmiştir [3,5,21]. Mikroorganizmaların toprakta en yoğun bulundukları alan, kök etrafındaki rizosfer tabakasıdır [22]. Mikrofunguslar toprakta organik maddenin zengin olduğu yüzey kısmında, özellikle ilk 10 cm’de daha sık bulunurlar. Derine gidildikçe organik madde miktarının düşmesi sebebiyle sayıları azalır [17,22,23,24]. Fungal biyokütle, rizosfer toprakları dışındaki birçok toprakta bakterilerinkinden fazladır. [25,26].

Funguslar, asit, nötr ve alkali karakterli farklı özellikteki topraklarda yaşama kabiliyetine sahiptirler. Özellikle asidik topraklarda diğer mikroorganizmalardan daha baskın bulunurlar [8,17,19,25,27,46]. Düşük pH koşullarında, topraktaki faaliyetlerin devamlılığını sağlarlar [13].

Fungusların topraktaki tür çeşitliliği ve miktarı birçok ortam faktöründen etkilenir [46]. Bazı türler yaygın şekilde bulunurken bazıları ise habitatlarla sınırlıdır [26]. Bu faktörlerin olumlu veya olumsuz etkileri vardır [5]. Organik madde miktarı, pH, nem miktarı, su tutma kapasitesi, sıcaklık, ışık, toprak yapısı, bitki örtüsü ve mevsimler toprak mikrofunguslarını etkileyen başlıca etmenlerdir [1,3,5,22,26]. Ortamdaki ağaç türleri de edafik ve mikroklimatik koşulları değiştirerek fungal topluluk yapısını etkilemektedir [28]. Fungal gelişim için toprakta karbon, hidrojen, oksijen, azot, potasyum, fosfor, kalsiyum, magnezyum, kükürt gibi makroelementler ve çinko, demir, mangan, bakır, molibden, klor, bor gibi mikroelementler bulunmalıdır [19,24]. Killi topraklar, havalanmayı önlediğinden dolayı biyokütleyle olumsuz etki eder [46]. Ayrıca, toprağın minimum %12, optimum %55-60 oranında su tutma kapasitesinde olması gereklidir [24]. Genel anlamda funguslar, organik maddelerce zengin, iyi havalandırılmalı, 25-30°C arası sıcaklığa sahip, nemli ve asit karakterli topraklarda daha yaygındırlar [10].

Mikrofunguslar, toprakta çeşitli faaliyetlerde bulunurlar. Bu faaliyetlerin bazıları yararlı bazıları zararlı sonuçlara yol açar [2,6]. Mikrofunguslar, toprak oluşumunda ve toprak verimliliğinde önemli rol oynarlar [1,2,5]. Başka mikroorganizma gruplarıyla birlikte organik maddeleri parçalayarak humus oluşumunu sağlarlar [1,2,3,5,29,]. Humus, toprak verimliliği ve kalitesini artırır [5,21]. Bünyesinde yeterli çeşitlilikte ve miktarda mikroorganizma barındırmayan topraklarda verimin düştüğü araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [1,5,21,29].

Toprak mikrofunguslarının en önemli görevlerinin başında, bitki ve hayvan artıklarının ve organik artıkların ayrıştırılmasını gerçekleştirerek biyolojik besin döngüsünün devamlılığının sağlanması gelmektedir [5,9,30,31,32]. Böylece bu artıkların doğada yığınlar oluşturmamasını önler ve bitkilerin gelişimi için besin maddesi açığa çıkarmış olurlar [3,8]. Toprak ekosistemindeki başlıca ayrıştırıcılarıdır [20,76]. Ayrıca, topraktaki bu faaliyetleri sonucunda atmosfere yoğun miktarda CO₂ salınarak fotosentezin devamlılığı sağlanır [1,2,5]. Toprak kaynaklı bitki hastalıklarını önleyerek

sağlıklı bitki gelişimini desteklemede rol oynarlar. Son zamanlarda, bitkisel üretimde kayıplara neden olan fitopatojen funguslar, bakteriler, yabancı ot ve parazit bitkiler, nematodlar ve böcekler ile mücadelede kullanılırlar [4].

Funguslar toprakta saprofitik, parazitik ve simbiyotik yaşam tarzı gösterirler [21,33]. Toprakta en fazla yer kaplayanlar saprofitik funguslardır. Salgıladıkları enzimler sayesinde pektin, kitin, selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi polimerlerin ayrışmasını sağlarlar [17,20,23,25,26,34]. Sadece bazı fungus türleri odunsu bitkilerin hücre duvarında bulunan lignini tamamen parçalayabilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca, büyük molekül ağırlıklı protein, yağ ve yağ benzeri bileşikler de kullanabildiklerinden dolayı bu mikroorganizmalar büyük öneme sahiptir [35]. Diğer canlılar ile simbiyotik ilişkiler kurarlar. Alglerle likenleri, yosunlar ve eğreltiotlarıyla bazı dernekleri ve özellikle bitkilerle mikorizaları meydana getirirler [36]. Mikorizal funguslar, yüzey alanını artırarak, bitki köklerinin topraktan besin özütleme verimliliğini önemli ölçüde arttırırlar [13,14,20,35]. Bunların dışında, bazı türlerden genetik araştırmalarda çalışma materyali olarak yararlanılır [1,5,29].

Mikrofungusların mikrobiyal faaliyetleri sonucunda elde edilen ürünler, endüstriyel mikrobiyoloji alanında birçok yarar sağlar [2,5,29,37]. Bu ürünlere ekonomik yönden değeri fazla olan enzimler, organik asitler, vitaminler, alkoller, antibiyotikler, proteinler ve pigmentler örnek gösterilebilir [1,2,3,5,8,29,30,38]. Bu alanda, doğal kaynak olarak en fazla yararlanılan organizmalar mikrofunguslardır [3,5]. Son dönemlerde endüstriyel mikrobiyolojinin yaygınlaşması ve gelişmesinin nedenleri başında tür düzeyinde teşhis, bu türlerin işlevlerinin belirlenmesi ve üretilmesi gelmektedir [1,3]. Bu yüzden farklı topraklardan yeni türlerin izole edilmesi, yeni kimyasal maddelerin elde edilerek ekonomi ve sağlık alanında uygulanmasına katkı sağlaması açısından son derece önemlidir [2]. Mikrofunguslar, bu alanda en fazla yararlanılan mikroorganizmalardır. En önemli yaşam ortamlarının toprak olması nedeniyle bir bölgedeki toprak mikrofunguslarını belirlemek çok önemlidir [1]. Ek olarak, eczacılık, tarım, ormancılık, ekoloji, fitopatoloji gibi alanların da yararlanılma kaynaklarıdır [32]. Ayrıca, çeşitli besinlerin direkt ya da dolaylı üretimi için gıda fermantasyonu işlemlerinde kullanılırlar [30].

Zararlı faaliyetleri arasında üzerinde parazit yaşadıkları canlılarda hastalık ve ölümlere neden olmaları yer alır [1,2,4,31]. İnsanlarda, bitkilerde ve hayvanlarda

hastalıklara sebep olan bu patojenik mikrofunguslar en çok toprakta bulunur [17,32,39]. Bitki paraziti olan türler kültür bitkilerinde arızlara sebep olarak ekonomik kayıplara yol açarlar [1,4,5]. Örneğin, *Aspergillus* Mich. Ex Fr. tohum çürüklüğüne neden olur [1,5,31]. İnsanlarda alerjik reaksiyonlara neden oldukları bilinmektedir [8]. Bağışıklık sistemi baskılanmış veya zayıflamış kişilerde gözlenen ölümlerin %5'inden çoğuna patojen fungusların neden olduğu bilinmektedir [40]. Bazı türler besin maddelerinin bozulmasına sebep olurken, bazıları ise bilinen en toksik metabolitler olan mikotoksinleri oluşturarak zehirlenmelere sebep olurlar [1,4,5].

Bu çalışmanın konusu olan *Aspergillus* cinsi ilk olarak Micheli tarafından 1729 yılında tanımlanmıştır. 200'den fazla türe sahiptir [41,42]. *Aspergillus* türleri özellikle ılıman iklimlerde doğada oldukça yaygın olan, toprak ve çürümüş organik maddelerde bol bulunan funguslardır [34,43]. Düşük nem koşullarında bile gelişebilen, üreme yetenekleri fazla olan mikroorganizmalardır [34]. Spor üretimi, yayılması ve aşırı çevre şartlarına direncinin yüksek olması sebebiyle, çalışmalarda en sık rastlanan grupların başında gelir [23]. Ekosistemdeki esas görevleri karbon ve nitrojen çevrimi ve biyodegradasyonda rol oynamalarıdır. Ürettikleri enzimlerle neredeyse bütün organik materyalleri parçalayabilirler [34]. Ekonomik, ekolojik ve tıbbi yönden önemli rol oynayan türler içerir [7,44,45]. Ayrıca patolojik, tarımsal, farmasötik, bilimsel ve kültürel açıdan önemleri de yüksektir [47].

Aspergillus türleri, birçok alanda yararlanılan birincil ve ikincil metabolitler üretmeleri sebebiyle ticari önemi en fazla olan funguslardandır [48]. En büyük olumlu ekonomik etkileri birincil metabolitleri olan bazı enzim ve organik asitleri sentezleme yetenekleridir [42]. Bunlardan en önemlisi *Aspergillus niger* tarafından üretilen sitrik asittir [41,42]. Faydalanılan diğer organik asitler; *A. niger*'den oksalik asit, glukonik asit, *A. terreus*'tan itakonik asit, *A. oryzae*'den kojik asit'tir [42]. Ayrıca, askorbik asit yani C vitamini elde edilmesinde de *A. niger* kullanılmaktadır [49]. Ticari enzimler; *A. oryzae* ve *A. niger*'den elde edilen alfa-amilaz, amiloglukosidaz ve pektinaz, *A. niger*'den elde edilen lipaz, invertaz, fitaz, proteaz ve sellüloz'dır [47,49]. Bunlara ek olarak, bazı türler gıda fermentasyon süreçlerinde kullanılırlar [16,44,45]. Koji küfleri olarak adlandırılan *A. oryzae*, *A. sojae* ve *A. awamori* uzun yıllardır bazı Asya yemekleri ve meşrubatlarının imalinde kullanılır [42]. Soya sosu, miso ve sake bunlara örnektir [42,43,47]. Bu faydalı enzim ve organik asitler dışında, biyoteknoloji alanında

önem taşıyan birçok sekonder metabolit üretirler [43,50]. Bu bileşikler arasında antibiyotikler, bağışıklık baskılayıcılar, kolesterol düşürücü maddeler ve mikotoksinler sayılabilir [47]. Bazı türler, gıdalarda özellikle kurutma, depolama esnasında bulunan ve son derece toksik, kanserojenik olan mikotoksin üreten önemli kontaminantlardır [7,42,44,45]. Dünya çapında ekonomik yönden en önemli ve tehlikeli mikotoksinlerin başında özellikle *A. flavus* ve *A. parasiticus* tarafından meydana getirilen aflatoksinler gelir [42,47]. Bunun dışında farklı türler tarafından üretilen mikotoksinlere sterigmatosistin, patulin, okratoksin, sitrinin, aspergillik asit, tenuasonik asit, penisilik asit, sitokalazin E, verrukulojen, fumitramorgin, ferrukulogen, 3-nitropropionik asit, siklopiazonik asit, gliotoksin, sitreoviridin, xanthomonas, viomellin, vioxantin, emodin, ostamid, ostidiyol, ostin ve ostosistinler örnek gösterilebilir [42]. *Aspergillus terreus* tarafından üretilen kolesterol düşürücü statin maddesinden geliştirilen lovastatin ilacı da sekonder metabolitlerdendir [43,47]. *Aspergillus* türlerinin bazıları ise özellikle bağışıklığı baskılanmış kişilerde hastalıklara (aspergillosis) ve alerjiye neden olur [42]. Bu enfeksiyonların başında *Aspergillus fumigatus* gelir [42,50]. Bunu, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* ve *A. ochraceus* takip eder [42]. Bitki patojeni türlerden *A. niger* ise siyah çürüklük hastalığı sebebidir [49]. Tüm bunlar göz önüne alındığında *Aspergillus*'ları tür düzeyinde tanımlamanın gerekliliği açıktır [44,45].

Funguslar, uzun yıllar boyunca fenotipik karakterlere dayalı morfolojik özellikleri kullanılarak tanımlanmıştır [51,52]. Fakat bazı türleri teşhis etmek için bu özellikler yeterli değildir [53]. Fenotipik karakterlerin belirsizliği, tür düzeyindeki morfolojik tanımlamayı zorlaştırmaktadır [54]. Bu belirsizlik aynı türlere farklı, farklı türlere aynı ismin verilmesine yol açabilmektedir. Bunun dışında, yapılan çalışmalar çok zaman almakta ve ağır iş yüküne neden olmaktadır [48,55]. Ayrıca son zamanlarda morfolojik olarak ayırt edilemeyen çok sayıda yeni tür keşfedilmektedir [26]. Bu nedenlere dayanarak DNA tabanlı moleküler yaklaşımlar mikrofungusların teşhisinde önemli bir alternatif haline gelmiştir [54,56]. Birçok ormandaki toprak funguslarının araştırılmasında kullanılmış ve yüksek bir fungal çeşitlilik ortaya konulmuştur [57].

Aspergillus türlerinin identifikasyonu da fenotipik karakterlere göre gerçekleştirilmesine rağmen son yıllarda moleküler ve kemotaksonomi yöntemleri etkili olmaktadır [58,59]. Moleküler yöntemler, çok sayıda *Aspergillus* türünün tanımlanmasında da yaygın olarak uygulanmıştır [60].

Sonuç olarak, geleneksel morfolojik ve koloniyal yöntemlere ihtiyaç duyulmasına rağmen moleküler analizlerle daha hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edilerek daha fazla trn varlığı ortaya çıkarılmaktadır [61].

Bu açıklamalar doğrultusunda bu çalışmada, orman toprağından izole edilen *Aspergillus* türlerinin hem mikroskopik ve makroskopik özelliklerine dayalı morfolojik ve koloniyal yöntemlerle hemde Calmodulin gen bölgesine dayalı moleküler yöntemlerle tespit edilmesi amaçlanmıştır.



BÖLÜM 2

ARAŞTIRMA BÖLGESİNİN TANIMI

2.1. Coğrafi Özellikler

Edirne ili, ülkemizin kuzey batısında Marmara Bölgesi'nin Trakya kısmında yer almaktadır. Güneyinde Ege denizi ve Çanakkale ili, kuzeyinde Bulgaristan, batısında Meriç Nehri ve Yunanistan, doğusunda Tekirdağ ve Kırklareli illeri ile çevrili, 41° 40' Kuzey enlemleri ile 26° 34' Doğu boylamları arasında bulunmaktadır. Yüzölçümü 6.276 km² olan ilin, rakımı 41 metredir. Bir tanesi merkez 8 ilçe ve 248 köyden oluşmaktadır. Türkiye batı sınırının önemli bir kısmını oluşturan il, Bulgaristan ile 88 km Yunanistan ile 204 km uzunluğunda sınıra sahiptir.

Edirne'de en büyüğü Meriç Nehri olmak üzere Tunca, Arda ve Ergene nehirleri yer almaktadır. Meriç Nehri Yunanistan ile 187 km'lik, Tunca Nehri ise Bulgaristan ile 12 km'lik sınır oluşturmaktadır. Mart-Nisan aylarındaki yoğun yağışlar sebebiyle nehirlerin debileri en üst seviyeye çıkmaktadır. Yaz aylarında normal seviyelerini korurlar. En önemli tarım kaynağı olan çeltik ekim ve sulama dönemlerinde ise debileri en alt seviyeye düşer. Edirne'de akarsular haricindeki yüzey suları; göller, barajlar, rezervuarlar ve göletlerdir. Bu göller; Taşaltı, Gala, Tuzla, Bücürmene, Sığircık, Dalyan ve Pamuklu gölleri olarak sayılabilir.

Araştırma, Edirne ili Merkez ilçesi Karaağaç mahallesine bağlı olan Edirne Kent Orman'ından alınan toprak örnekleri ile yapılmıştır. Kent ormanı, Edirne-Karaağaç karayolu üzerinde, Meriç nehri kıyısında ve 41° 39' 39" koordinatlarında yer almaktadır. Orman alanı 29,6 hektardır. Rakımı 47 metredir. Edirne'nin merkezine yaklaşık 2 km mesafede çeşitli ağaç türlerini barındıran yeşillik bir bölgedir [62].



Şekil 2.1. Edirne ili Karaağaç Kent Ormanı haritası

2.2. İklim

Edirne ili, çeşitli iklim özellikleri sergiler. Marmara, Karadeniz ve Ege denizlerinin de etkisiyle bu özellikler zaman zaman ve yer yer farklılık gösterir. İklim, ilin güneyinden kuzeyine doğru çıktıkça sertleşir. Denize kıyısı olmasına rağmen bölgede Karasal iklim hüküm sürer. Kış ayları oldukça soğuk ve sert geçmektedir. Yaz mevsimi sıcak ve kurak, baharları ise yağışlıdır. Ege Denizi'nin kıyısındaki güney kesiminde ılık ve yağışlı Akdeniz iklimi yaşanır [62]. Bazı dönemlerde ise bölgede Karadeniz iklimi özellikleri görülür.

Sıcaklık, genellikle Temmuz ve Ağustos aylarında en fazladır. Ocak ve Şubat ise en soğuk geçen aylardır. Toprak örneklerinin alındığı 2016 yılı Mart ayında, en yüksek ortalama sıcaklık 15,3°C, en düşük ortalama sıcaklık 4,5°C ve aylık ortalama sıcaklık değeri 10,4°C'dır.

Genel nemlilik indislerine göre değerlendirildiğinde Edirne ili, yarı nemli iklim tipine sahiptir. Nisbi nem, Meriç havzasında oldukça fazladır. Bu koşullar, havza bitki örtüsünü olumlu yönde etkilemektedir. Toprak örneklerinin alındığı aydaki en yüksek nisbi nem değeri %89,8, en düşük %59,7 ve aylık ortalama değer %76,92'dur.

İlde, en fazla yağmur ilkbahar mevsiminde yağmaktadır. Meriç havzasına yağış düşme miktarı, kışları fazla yazları ise düşüktür. 2016 yılı Mart ayına ait yağışlı gün sayısı 15, toplam yağış miktarı ise 41,7 kg/m²'dir.

Kuzey rüzgarı (Yıldız), egemen rüzgardır. Bunu kuzeybatı (Karayel) ve güneydoğu (Keşişleme) rüzgarları takip etmektedir. 2016 yılı Mart ayındaki ortalama rüzgar hızı 8,0 m/sn'dir [63,64].



Şekil 2.2. Türkiye iklim tipleri haritası

T.C. Edirne Meteoroloji Müdürlüğü'nden temin edilen veriler Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Araştırmanın gerçekleştirildiği 2016 yılı Mart ayına ait meteorolojik veriler

GÜN	Ortalama Sıcaklık (°C)	Minimum Sıcaklık (°C)	Maksimum Sıcaklık (°C)	Yağış (kg/m²)	Ortalama Nem (%)
01	14,4	8,5	20,9	-	81,6
02	13,5	11,5	19,5	-	86,1
03	12,3	8,2	17,4	0,2	77,6
04	10,9	9,5	17,5	10,7	79,9
05	9,9	4,3	16,9	1,0	71,3
06	11,6	3,4	17,8	-	80,7
07	14,0	10,1	19,2	-	75,1
08	13,5	10,1	17,7	-	85,3
09	11,8	10,2	14,6	1,4	89,8
10	9,8	7,9	13,3	1,0	88,3
11	11,7	8,4	18,4	0,5	80,0
12	10,6	3,9	17,5	0,0	80,5
13	9,5	7,7	12,4	4,2	85,3
14	4,5	3,8	5,3	3,4	75,0
15	5,3	-1,4	11,7	0,1	62,0
16	5,5	2,6	10,8	-	68,8
17	6,7	1,6	13,3	-	59,7
18	7,3	-1,2	15,7	-	71,8
19	9,7	1,5	17,9	-	66,0
20	9,3	5,6	15,3	-	68,9
21	11,7	2,0	22,3	0,0	69,7
22	14,1	9,6	19,0	0,0	77,0
23	14,4	10,5	20,3	-	75,0
24	11,9	13,4	19,8	2,0	88,1
25	6,6	6,5	8,2	13,8	89,0
26	6,5	2,7	12,2	3,4	77,8
27	6,6	2,0	11,5	-	78,0
28	8,8	1,5	15,9	0,0	70,9
29	10,7	2,7	20,3	-	76,2
30	14,1	6,3	23,0	-	72,4
31	15,3	9,1	24,0	-	77,0
Toplam				41,7	
Ortalama	10,4	5,9	16,4		76,9
Maksimum	15,3		24,0	13,8	89,8
Minimum	4,5	-1,4			59,7

2.3. Bitki Örtüsü

2.3.1. Edirne Bitki Örtüsü

Edirne ili bitki örtüsü, iklim, toprak yapısı ve çeşitli çevre faktörlerine göre değişiklikler göstermektedir.

Meriç havzasını değerlendirdiğimizde ise buradaki bitki örtüsü, iklim, toprak ve rölyef gibi çevresel koşullara uyum sağlamaktadır. Havzanın yağış alma miktarı yazları düşük olduğundan dolayı bitkilerin büyüme evrelerindeki su noksanlığı, kışın toprakta biriken nemden temin edilmektedir. Ayrıca, nisbi nemin fazla olması havza bitki örtüsünü olumlu yönde etkilemektedir.

Edirne topraklarının %57'si tarım toprağı, %14'ü çayır ve meralık, %25'i orman ve fundalıklardır. Ekime uygun olmayan arazi ise %4'tür. Trakya kesimindeki en verimli topraklardır.

Edirne bitki örtüsü, ormanlar, makiler ve stepler olmak üzere üç çeşittir. Ormanlık alanlar fazla değildir. Toplam 104.228 hektar ormanlık alanın, tüm arazi varlığına oranı %16,6'dır. Genel olarak akağaç, karaağaç, meşe, gürgen, dişbudak, kıızılcık, karaçalı ve çınar gibi ağaç türleri bulunmaktadır. Ergene havzası steplerle, Kuru dağları ve Saros körfezi ise makiliklerle kaplıdır.

Edirne bol nemli ve rüzgârlı bir bölgedir. Rüzgârlar buharlaşmayı engeller. Bu olay, bitki örtüsünün çeşitliliğini sağlar.

Trakya bölgesinin bitki örtüsü beş grupta ele alınır; Nemli ormanlar, Kuru ormanlar, Antropojen Step, Maki-Psödomaki ve Kıyı bitkileri. Meriç havzasında kuru ormanlar, antropojen step ve maki-psödomaki yer almaktadır. Havzada, sık bulunması beklenen yem bitkilerinden çok buğdaygil bitki türleri daha yaygındır. Meriç nehri boylarında kavak ve söğüt ağacı türlerine sıklıkla rastlanır. Yörenin Karaağaç bölgesinde geniş yapraklı ağaçlar daha sıktır, iğne yapraklılar seyrek.

2.3.2. Edirne Karaağaç Kent Ormanı Bitki Örtüsü

Bu alanda gerçekleştirilen doğal bitki örtüsüne ilişkin çalışmalarda daha çok; Aksöğüt (*Salix alba*), Saplı Meyveli Karaağaç (*Ulmus leavis Pall.*), Ova Karaağacı (*Ulmus minor Miller*), Dişbudak Yapraklı Akçaağaç (*Acer negundo L.*), Erguvan (*Cercis siliquastrum*), Titrek Kavak (*Populus tremula*) gibi türler yer almaktadır.

Bunlara ek olarak; Yabani Erik (*Prunus spinosa L.*), Armut (*Pyrus eleagnifolia Pall.*), Muşmula (*Mespilus germanica L.*) gibi meyve ağaçları da bulunmaktadır.

2.4. Toprak Özellikleri

Topraklar iklim, bitki örtüsü, ana materyal ve topoğrafya gibi özelliklere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Edirne ili arazisi altı büyük toprak grubuna sahiptir.

Bu gruplar içerisinde en yaygın olanlar, Kalkersiz Kahverengi Topraklar ile Kalkersiz Kahverengi Orman Toprakları'dır. Bunlardan sonra Vertisoller, Alüvyaller, Kahverengi Orman Toprakları ve Hidromorfik Alüvyal Topraklar gelmektedir.

Meriç Nehri boyunca uzanan ve 87.863 hektar alanı kaplayan Alüvyal topraklar, tarımsal faaliyetlere elverişli, besin maddelerince zengin verimli topraklardır. Kum ve mil içeriklerinden dolayı kolay işlenirler. Akarsularla taşınan ince malzemeler, genişlemiş vadi tabanlarında bu toprakları meydana getirmektedir.

2.5. Jeolojik Yapı

Trakya Yöresi jeolojik yapısı, tersiyer kuvarterner yaşlı birimlerden meydana gelmektedir. Yaşlıdan gence doğru; Tersiyere ait Oligosen devrini Yenimuhacir Formasyonu, Üst Oligosen devrine ait Danişment Formasyonu, Pliyosene ait Ergene Formasyonu ve Kuvarternere ait Genç Çökeller yani Alüvyonlar olarak sıralanmaktadır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırma materyali, 2016 yılının Mart ayında Edirne ili Karaağaç Kent Ormanı'ndan alınan toprak örnekleridir.

3.2. Toprak Örneklerinin Alınması

Topraktan örneklerin alınması işleminde Brown (1958)'un yöntemi kullanılmıştır [65]. Örnek alınacak alanın yüzeyi steril bir çapa ile temizlendikten sonra yaklaşık 500 gram ağırlığındaki örnekler, steril bir spatül ile 10 cm derinliğindeki topraktan aseptik şartlarda alınmıştır. Alınan toprak örnekleri steril kilitli torba içerisine konularak uygun şartlarda laboratuvara getirilmiştir. En fazla 2 gün içerisinde çalışılmak üzere +4°C'da buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.3. Toprak Örneklerinden İzolasyon İşlemleri

Toprak mikrofunguslarının izolasyon işlemi “Toprağı Sulandırma Metodu” kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu metot, diğer yöntemler içerisinde toprak mikrobiyolojisinde en fazla tercih edilen metottur [66].

Toprak örneklerinin nem miktarını hesaplamak amacıyla hassas terazi ile örneklerden 10 gram tartılmıştır ve her 10'ar gramlık toprak, darası alınan cam petri kapları içerisine konulmuştur. Petriler, 105°C'daki etüvde 24 saat tutulduktan sonra tekrar tartılmıştır. Bu işlemle 25 gram kuru toprağı verecek olan yaş toprak miktarı bulunmuştur [67].

Ölçülen ağırlıkların yüzde nem miktarı aşağıdaki eşitlik yardımı ile belirlenmiştir.

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

Seyreltme ve ekim işlemlerine başlanmadan önce dilüsyonların hazırlanmasında kullanılan çeşitli derecelerdeki erlenmayerler ağız kısımları kapatılarak otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Dilüsyon sıvısı Maximum Recovery Diluent (MRD) hazırlanıp otoklavlandıktan sonra soğumaya bırakılmıştır. Ekim işleminde kullanılacak olan Dichloran Glycerol Chloramphenicol (DG18) Agar hazırlanıp otoklavlandıktan sonra 45°C'lık su banyosunda bekletilmiştir. Toprak, su aktivitesi düşük bir ortam olduğundan dolayı bu besiyeri tercih edilmiştir [68].

Yüzde nemi belirlenmiş olan 25 gram kuru toprağı verecek yaş toprak, steril bir spatül yardımı ile alüminyum folyo üstünde tartılarak, 500 mL dereceli steril erlenmayer içerisine konulmuştur. Üzerine, toplam hacim 250 mL'ye tamamlanacak şekilde MRD eklenmiştir. Böylece, toprak örneğinin içeriğindeki su miktarı da hesaba katılmıştır.

Bu şekilde elde edilen 1/10'luk toprak süspansiyonu, homojenizasyon işlemi amacıyla mekanik çalkalama cihazında 150 rpm hızda 30 dakika boyunca çalkalanmıştır. Bu esnada seyreltme ve ekim işlemlerinin yapılacağı biyogüvenlik kabini, %70'lik alkol ile silinmiş ve UV lambası açılarak ortam sterilizasyonu sağlanmıştır.

Dilüsyon serilerinin hazırlanması için 250 mL dereceli steril erlenmayerlere 90'ar mL MRD konulmuştur. Çalkalama işlemi tamamlandığında 1/10'luk süspansiyondan, toprak zerrecikleri dibe çökmeden, steril bir pipet ile 10 mL örnek alınarak, 90 mL dilüsyon sıvısı içeren kaba aktarılmıştır. Bu sayede 1/100'lük süspansiyon elde edilmiştir. Bu süspansiyondan da 10 mL örnek alınarak 90 mL dilüsyon sıvısı içeren diğer bir kaba aktarılmış, bu şekilde 1/1.000'lik süspansiyon elde edilmiştir. 1/1.000'lik süspansiyondan da alınan 10 mL örneğin 90 mL dilüsyon sıvısı içeren kaba aktarılması sonucunda 1/10.000'lik süspansiyon elde edilmiştir. Her aktarım sırasında pipet ile örnek çekilmeden önce kaptaki süspansiyon iyice çalkalanmıştır ve her seferinde yeni bir pipet kullanılmıştır. Mikrofungusların topraktan izole edilmesine

en uygun süspansiyon serileri dilüsyon oranları 1/1.000 ile 1/100.000 arasında olanlarıdır. Bu sebeple, ekim işlemlerinde kullanılmak üzere 1/10.000'lik süspansiyon tercih edilmiştir.

Uygun sıcaklıktaki kullanıma hazır DG18 besiyeri 90 mm'lik steril boş petri kaplarına dağıtılmıştır. 1/10.000'lik toprak süspansiyonundan, toprak zerrelere dibe çökmeden, steril uçlu bir mikropipet ile 1 mL örnek çekilmiş ve içerisinde katılaşma derecesine yakın bir sıcaklığa (45-50°C) kadar soğutulmuş (henüz katılaşmamış) yaklaşık 15-20 mL DG18 Agar bulunan petri kaplarına aktarılmıştır. Bu işlem, 10 petri kabı için tekrar edilmiştir. Bu şekilde dökme yöntemi kullanılarak hazırlanan petri kapları, düz bir zemin üzerinde el ile rotasyon hareketi yaptırılarak, süspansiyonun besiyeri içinde homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Karıştırma işleminin ardından agar katılaşmaya kadar bekletilen petri kapları, inkübatöre kaldırılarak 25°C'da yaklaşık 7-10 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi boyunca kurumayı engellemek amacı ile inkübatör içerisine su dolu küçük bir kap konulmuştur [69,70].

İnkübasyon süresi sonunda karışık mikrofungus üremesi gözlenen petri kaplarından *Aspergillus* özelliği gösteren koloniler seçilerek DG18 Agar içeren petrilere üç nokta ekim tekniği ile inoküle edilmiştir. [71]. Petri kapları, inkübatöre kaldırılarak 25°C'da yaklaşık 7-10 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Buradaki amaç, *Aspergillus* kolonilerini saf halde izole edebilmektir.

3.4. Stok Kültür Hazırlanması

İzole edilen *Aspergillus* kolonileri, içerisinde yatık Potato Dextrose Agar (PDA) bulunan tüplere iğne öze ile inoküle edilmiştir. İnoküle edilen tüpler, 25°C'da yaklaşık 7-10 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tüpler, teşhisi yapılmak üzere buzdolabında +4°C'da muhafaza edilmiştir.

Elde edilen izolatların uzun süre saklanabilmesi için stok kültür çözeltileri hazırlanmıştır. %30'luk gliserol ve SS-buffer çözeltisi hazırlanarak otoklavda sterilize edilmiştir. Gliserol, steril eppendorf tüplerine 750'şer µL dağıtılmıştır. Ucu kesik steril uçlu bir mikropipet ile çekilen 750 µL SS-buffer, koloninin üzerine bırakılıp ezdirilerek geri çekilmiştir. Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Tüm koloniler için aynı işlem tekrar

edilmiştir. Son olarak eppendorf tüpleri, vortekslenerek parafilm ile kapatıldıktan sonra etiketlenerek dondurucuda -80°C’da muhafaza edilmiştir [58].

3.5. Morfolojik Teşhis

Makroskobik inceleme için, her bir küf izolatından Czapek Dox Agar (CZ), Czapek Yeast Agar (CYA25), Czapek Yeast Agar with %20 Sucrose (CY20S) ve Malt Extract Agar (MEA) içeren petrilere üç nokta ekimi yapılmıştır. Petriler 25°C’da 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Czapek Yeast Agar (CYA37) içeren farklı bir petri ise 37°C’da 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda petrilerdeki kolonilerin yapısı, şekli, alt ve üst rengi, büyüklüğü, eksudasyon ve pigmentasyon varlığı incelenmiştir.

Mikroskobik inceleme için, öncelikle bir stereo mikroskop ile koloni tekstürü ve konidial başlıkların tipi incelenmiştir. Daha sonra, klasik lam lamel ve selüloz bant yöntemleri kullanılarak preparatlar hazırlanmıştır. Selüloz banttan uygun boyutta parçalar kesilerek koloninin kenar kısmına hafifçe değdirilmiş ve bandın yapışkan kısmına yapışması sağlanmıştır. Daha sonra hazırlanan lam üzerine yapışkan taraf altta olacak şekilde gerdirilerek iki uçtan yapıştırılmıştır [77]. Preparat ortamı olarak %85’lik laktik asit ve laktofenol kullanılmıştır. Hazırlanan preparatlar, bir ışık mikroskobu ile 10x, 40x, 100x’lük objektiflerde *Aspergillus* cinsi küflerin genel mikroskobik morfolojileri açısından incelenmiştir. Vezikül yapısı, konidia rengi, şekli, büyüklüğü ve yapısı, konidiafor şekli, uzunluğu, genişliği, çeper özelliği ve duvar yapısı, konidial kafa yapısı, fiyalid şekli, metula, sklerotia gibi yapılar ve hülle hücrelerinin varlığı, boyut ve şekilleri incelenmiştir.

Tüm bu özellikler dikkate alınarak *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında “The Genus *Aspergillus*”, “Identification of Common *Aspergillus* Species” ve “Toprak Mikrofungusları Cilt I” eserlerinden faydalanılmıştır [72,42,43].

3.6. Morfolojik Teşhis ve İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

3.6.1. Dichloran Glycerol Chloramphenicol (DG18) Agar: (Merck/100465)

Enzymatic digest of casein.....5,0 g

D (+)-glucose.....10,0 g

Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄).....1,0 g

Magnesium sulfate (MgSO₄).....0,5 g
Dichloran.....0,002 g
Chloramphenicol.....0,1 g
Agar-agar.....15,0 g
Glycerol.....220,0 g
Distile su.....1000 mL

pH: 5.6 ± 0.2

31,6 g hazır besiyeri içeriği tartılarak 1000 mL distile su içinde çözdürülmüştür. Isıticılı manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. İçerisine 175 mL/220 g gliserol ilave edilerek tekrar karıştırılmıştır. Otoklavda 121°C’da 15 dk sterilize edilmiştir. 45-50°C’a soğutulduktan sonra steril petrilere dağıtılmıştır.

3.6.2. Maximum Recovery Diluent (MRD) (Labm/LAB103):

Peptone.....1,0 g
NaCl.....8,5 g
Distile su.....1000 mL

pH: 7.0 ± 0.2

9,5 g hazır besiyeri içeriği tartılarak 1000 mL distile su içinde çözdürülmüştür. Isıticılı manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Otoklavda 121°C’da 15 dk sterilize edilmiştir.

3.6.3. Malt Extract Agar (MEA) [73]:

Malt extract (Oxoid CM0059).....50,0 g
CuSO₄.5H₂O.....0,005 g
ZnSO₄.7H₂O.....0,01 g
Distile su.....1000 mL

pH: 5.4 ± 0.2

İçeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra 1000 mL distile su içinde çözdürülmüştür. Isıticılı manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Otoklavda 115°C’da 10 dk sterilize edilmiştir. 45-50°C’a soğutulduktan sonra steril petrilere dağıtılmıştır.

3.6.4. Czapek Concentrate with trace metals [42]:

NaNO ₃	30,0 g
KCl.....	5,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	5,0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,1 g
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,05 g
Distile su.....	100 mL

İçeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra 100 mL distile su ile homojenize edilmiştir. Besiyerlerinin içerisine belirtilen miktarlarda katılmıştır.

3.6.5. Czapek Dox Agar/Czapek's Solution Agar (CZ) [42]:

K ₂ HPO ₄	1,0 g
Czapek Concentrate.....	10,0 mL
Sucrose.....	30,0 g
Agar.....	17,5 g
Distile su.....	1000 mL
pH: 7.3 ± 0.2	

İçeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra 1000 mL distile su içinde çözdürülmüştür. Isıtcılı manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Otoklavda 121°C'da 15 dk sterilize edilmiştir. 45-50°C'a soğutulduktan sonra steril petrilere dağıtılmıştır.

3.6.6. Czapek Yeast Agar (CYA25, CYA37) [42]:

K ₂ HPO ₄	1,0 g
Czapek Concentrate.....	10,0 mL
Powdered Yeast Extract.....	5,0 g
Sucrose.....	30,0 g
Agar.....	15,0 g
Distile su.....	1000 mL
pH: 6.2 ± 0.2	

İçeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra 1000 mL distile su içinde çözündürülmüştür. Isıtcılı manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Otoklavda 121°C’da 15 dk sterilize edilmiştir. 45-50°C’a soğutulduktan sonra steril petrilere dağıtılmıştır.

3.6.7. Czapek Yeast Agar with %20 Sucrose (CY20S) [42]:

K₂HPO₄.....1,0 g
Czapek Concentrate.....10,0 mL
Powdered Yeast Extract.....5,0 g
Sucrose.....200,0 g
Agar.....15,0 g
Distile su.....1000 mL
pH: 5.4 ± 0.2

İçeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra 1000 mL distile su içinde çözündürülmüştür. Isıtcılı manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Otoklavda 121°C’da 15 dk sterilize edilmiştir. 45-50°C’a soğutulduktan sonra steril petrilere dağıtılmıştır.

3.6.8. Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck / 110130):

Potato infusion.....4,0 g
D(+) Glucose.....20,0 g
Agar-agar.....15,0 g
Distile su.....1000 mL
pH: 5.6 ± 0.2

39,0 gram hazır besiyeri içeriği 1000 mL distile su içinde çözündürülmüştür. Isıtcılı manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Otoklavda 121°C’da 15 dk sterilize edilmiştir. 45-50°C’a soğutulduktan sonra steril tüplere dağıtılmıştır.

3.6.9. SS Buffer Çözeltisi [58]:

Agar.....0,5 g
Tween 80.....0,5 g
Distile su.....1000 mL

İçeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra 1000 mL distile su içinde çözündürülmüştür. . Isıtıcılı manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Otoklavda 121°C’da 15 dk sterilize edilmiştir.

3.6.10. Laktofenol [78]:

Kristal fenol.....20,0 g
Laktik asit.....20,0 g (veya 16 mL)
Gliserol.....40,0 g (veya 31 mL)
Distile su.....20,0 g (veya 20 mL)
Çözelti içerisine boya maddesi olarak 100 mL için 0,5 g anilin mavisi (pamuk mavisi) eklenmiştir.

3.7. Moleküler Teşhis

Toprak örneklerinden elde edilen *Aspergillus* cinsi mikrofungusların moleküler tanımlaması için öncelikle DNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile Calmodulin gen bölgesine özgü primerler kullanılarak ürün çoğaltılmıştır. Son basamak olarak, elde edilen saf DNA örneklerinden dizi analizi ve filogenetik analiz yapılmıştır.

3.7.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu işlemleri için Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri TİC.LTD.ŞTİ.’den hizmet alımı gerçekleştirilmiştir.

İşlem, Bio-Speedy™ Fungal DNA İzolasyonu Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İşlem basamakları şu şekildedir:

1. İçinde 500 µL %0,1 Tris Buffer veya MGW (Molecular Grade Water) bulunan 2 mL’lik parçalama tüplerine, besiyerinin yüzey kısmından kazınan koloniler konulmuştur.
2. Tüpler, yaklaşık 10 saniye boyunca son hızda vortekslenmiştir.
3. 1 dakika boyunca 14000 g’de santrifüj edilmiştir.
4. Üst faz atıldıktan sonra tüplerin içerisine 1,3 mm çapında metal boncuklar ve 500 µL Parçalama Tamponu (%2 CTAB-hexadecyltrimethylammonium bromide, 100 mM TrisHCl pH 8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl) ilave edilmiştir.

5. Homojenizatörde 7000 rpm'de 1'er dakika 2 tur (toplam 2 dakika) homojenize edilmiştir.
6. Homojenize edilen tüplerin içerisine 5 µL Proteinaz-K (20 mg/mL) eklenerek hafifçe vortekslenmiştir.
7. 55°C'da 2 saat boyunca inkübe edilmiştir.
8. Ardından tekrar 14000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Üst kısımdaki sıvı faz, başka bir tüpe alınarak numunenin boncuklardan ayrılması sağlanmıştır.
10. Bu tüpe, 500 µL Bağlama Tamponu-1 (4 M Guanidine thiocyanate, 20 mM Tris-HCl, pH 8) eklendikten sonra vortekslenmiştir.
11. 95°C'da 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
12. İnkübasyondan sonra 1 dakika 14000 g'de santrifüj edilmiştir.
13. Üst kısımdaki sıvı faz, yeni bir tüpe aktarılmıştır.
14. Tüp içerisine 500 µL Bağlama Tamponu-2 (2-propanol) eklendikten sonra vortekslenmiştir.
15. Toplama tüpüne DNA kolonu yerleştirilmiştir.
16. 750 µL karışım, DNA kolonuna transfer edilmiştir.
17. 1 dakika 14000 g'de santrifüj edildikten sonra fitrat kısmı (alttaki sıvı) atılmıştır.
18. Numune bitinceye kadar 16. ve 17. işlemler tekrarlanmıştır.
19. DNA kolonuna 500 µL Yıkama Tamponu (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 8; %80 v/v Etanol) konulmuştur.
20. 30 saniye 14000 g'de santrifüj edildikten sonra fitrat kısmı (alttaki sıvı) atılmıştır.
21. Daha sonra 19. ve 20. işlemler tekrarlanmıştır.
22. Boş kolon, 1 dakika 14000 g'de santrifüj edildikten sonra yeni steril bir mikrosantrifüj tüpüne konulmuştur.
23. DNA kolonu içine 100 µL Çözücü Tampon (moleküler saflıkta su veya elüsyon tamponu) konularak oda sıcaklığında 1 dakika boyunca bekletilmiştir.
24. 1 dakika 14000 g'de santrifüj edildikten sonra kolon atılmıştır. Tüpte kalan sıvının içerisinde izole edilen DNA bulunmaktadır.
25. Elde edilen DNA'nın saflık ve miktarı, spektrofotometrik yöntem ile tayin edilmiştir. DNA konsantrasyonu >50 ng/µL ve saflığı OD₂₆₀/OD₂₈₀ 1,6-2,0 aralığında olması gereklidir. PCR işlemlerinden önce, DNA konsantrasyonu >100 ng/µL bulunan

numuneler, Çözücü Tampon ile 50 ng/μL konsantrasyona ayarlanacak şekilde seyreltilmiştir.

26. Bu işlemler sonucunda elde edilen DNA, -20°C’da muhafaza edilmiştir.

3.7.2. PCR Kurulumu

PCR kurulumu için gerekli olan bileşenler ve miktarları Tablo 3.1.’de verilmiştir.

Tablo 3.1. PCR kurulumu için gerekli olan bileşenler ve miktarları

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

3.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR uygulamaları için Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri TİC.LTD.ŞTİ.’den hizmet alımı gerçekleştirilmiştir.

PCR işlemleri, Bio-Speedy™ Maya ve Küf Real-Time PCR Hızlı Tespit Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit, Calmodulin gen bölgesini hedefleyen ileri 5'-GCKWAAAYAGGACAAGGATGG-3' ve geri 5'-CTGGTCVGCCTCACRAAT-3' primerlerini içermektedir. *Aspergillus* Calmodulin primeri dejenere bir primer olduğundan dolayı standart PCR ile ürün elde edilememiştir ve bu yüzden Touchdown PCR uygulanmıştır. Uygulanan protokol Tablo 3.2.’de verilmiştir.

Tablo 3.2. *Aspergillus* Calmodulin Touchdown PCR programı

Program	Döngü Sayısı	Adım	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Hız (°C/s)	Floresan okuma (470/510 nm) (Ekzitasyon/Tespit)
Ön Inkübasyon	1	Denatürasyon	95	600	4<	
Çoğalma	5	Denatürasyon	95	15	4<	
		Bağlanma ve uzama	60	45		Adım sonunda, tek okuma
	5	Denatürasyon	95	15		
		Bağlanma ve uzama	59	45		Adım sonunda, tek okuma
	5	Denatürasyon	95	15		
		Bağlanma ve uzama	58	45		Adım sonunda, tek okuma
	5	Denatürasyon	95	15		
		Bağlanma ve uzama	57	45		Adım sonunda, tek okuma
	5	Denatürasyon	95	15		
		Bağlanma ve uzama	56	45		Adım sonunda, tek okuma
	5	Denatürasyon	95	15		
		Bağlanma ve uzama	55	45		Adım sonunda, tek okuma
	5	Denatürasyon	95	15		
		Bağlanma ve uzama	54	45		Adım sonunda, tek okuma
	5	Denatürasyon	95	15		
		Bağlanma ve uzama	53	45		Adım sonunda, tek okuma
	5	Denatürasyon	95	15		
		Bağlanma ve uzama	52	45		Adım sonunda, tek okuma
	5	Denatürasyon	95	15		
		Bağlanma ve uzama	51	45		Adım sonunda, tek okuma
Erime Eğrisi	1	Erime	65	1	0,5	65°C - 98°C arası sürekli okuma
			98	1		

3.7.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

1. PCR ürününün yaklaşık 10 µL'si, 200 µl'lik yeni bir tüpe aktarılmıştır.
2. PCR ürünü içeren tüpe, 10 µL MGW eklenerek pipetaj yapılmıştır.
3. 60 µL Bağlama Tamponu-1 ve 20 µL Bağlama Tamponu-2 eklenerek hafifçe vortekslenmiştir.
4. DNA kolonu, toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir.
5. Karışımın tümü, DNA kolonuna transfer edilmiştir.
6. 1 dakika boyunca 14000 g'de santrifüj edildikten sonra fitrat kısmı atılmıştır.
7. Kolona 500 µL Yıkama Tamponu ilave edilmiştir.
8. 30 saniye boyunca 14000 g'de santrifüj edildikten sonra fitrat kısmı atılmıştır.
9. 7. ve 8. işlemler tekrar edilmiştir.
10. Boş kolon, 1 dakika boyunca 14000 g'de santrifüj edilmiştir.
11. Kolon, yeni bir mikrosantrifüj tüpünün içerisine konulduktan sonra toplama tüpü atılmıştır.
12. DNA kolonu içine 20 µL Çözücü Tampon (moleküler saflıkta su veya elüsyon tamponu) konularak oda sıcaklığında 1 dakika bekletilmiştir.
13. 1 dakika 14000 g'de santrifüj edildikten sonra kolon atılmıştır. Tüpte kalan sıvının içerisinde saflaştırılan PCR ürünleri bulunmaktadır.
14. Bu işlemler sonucunda elde edilen saf PCR ürünleri, -20°C'da muhafaza edilmiştir.

3.7.5. Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz

Dizi analizi için T.C. Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÜTAGEM)'nden hizmet alımı gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen fungal ampliconların dizi analizleri Sanger yöntemi ile tespit edilmiştir. Elde edilen dizilere karşılık gelen diziler, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> adresindeki NCBI gen bankasından Blast yöntemi ile belirlenmiştir.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

Toprak örneklerinden izole edilen *Aspergillus* cinsine ait 52 adet koloni üzerinde yapılan morfolojik ve moleküler teşhis işlemleri sonucunda 7 adet *Aspergillus* türü tespit edilmiştir. Bunlar sırasıyla; *Aspergillus affinis* Davolos, Persler, Pietrangeli & Maggi 2011, *Aspergillus awamori* Nakaz., *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom, *Aspergillus dimorphicus* B.S. Mehrotra & R. Prasad, *Aspergillus europaeus* Hubka, A. Nováková, Samson, Houbaken, Frisvad & M. Kolařík, *Aspergillus spelaeus* A. Nováková, Hubka, M. Kolařík & S.W. Peterson ve *Aspergillus fischeri* Wehmer'dir. Çalışılan örneklerle ait morfolojik ve moleküler sonuçlar Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Morfolojik ve moleküler teşhis sonuçları

Kod	Morfolojik Teşhis	Moleküler Teşhis	Eşleşen Örneğin Accession Numarası	Identities
1A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	509/517 (%98)
2A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	LT158494.1	509/510 (%99)
3A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	496/503 (%99)
4A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Circumdati</i>	* <i>Aspergillus affinis</i>	JF805764.1	510/513 (%99)
5A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	502/503 (%99)
6A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Circumdati</i>	* <i>Aspergillus affinis</i>	GU721091.1	532/535 (%99)
7A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Flavipedes</i>	* <i>Aspergillus spelaeus</i>	HG916745.1	508/510 (%99)
8A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	496/503 (%99)

9A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Circumdati</i>	* <i>Aspergillus affinis</i>	GU721091.1	531/535 (%98)
10A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Circumdati</i>	* <i>Aspergillus affinis</i>	GU721091.1	534/537 (%98)
11A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	503/504 (%99)
12A	Teşhis Edilemedi	DNA İzolasyonu Yapılamadı	-	-
13A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	506/507 (%99)
14A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	LT158494.1	505/506 (%99)
15A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	453/458 (%99)
16A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	497/504 (%99)
17A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	503/504 (%99)
18A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	LT158494.1	507/508 (%99)
19A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	504/506 (%99)
20A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	506/507 (%99)
21A	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	FN394670.1	508/509 (%99)
22A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i>	Dizileme yapılamadı	-	-
23A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus welwitschiae</i> <i>Aspergillus awamori</i>	LT558746.1 KJ777809.1	508/509 (%99)
		<i>Aspergillus niger</i>	JF838354.1	507/509 (%99)
24A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i> <i>Aspergillus phoenicis</i> <i>Aspergillus niger</i>	KP739458.1 KJ123904.1 KJ123900.1	507/508 (%99)
25A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus welwitschiae</i> <i>Aspergillus awamori</i>	LT558746.1 KJ777809.1	507/508 (%99)
		<i>Aspergillus niger</i>	JF838354.1	506/508 (%99)
26A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i>	Dizileme yapılamadı	-	-
27A	<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Aspergillus carbonarius</i>	KR020714.1	501/502 (%99)
28A	<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Aspergillus carbonarius</i>	KR020714.1	503/505 (%99)
29A	<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Aspergillus carbonarius</i>	KR020714.1	502/503 (%99)
30A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	LT158494.1	505/506 (%99)
31A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	499/506 (%99)

32A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	499/506 (%99)
33A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	497/504 (%99)
34A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	507/509 (%99)
35A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	506/507 (%99)
36A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	506/507 (%99)
37A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	506/507 (%99)
38A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	LT158494.1	505/506 (%99)
39A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	LT158494.1	505/506 (%99)
40A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	504/506 (%99)
41A	Teşhis Edilemedi	Dizileme yapılamadı	-	-
42A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	499/506 (%99)
43A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	500/507 (%99)
44A	<i>Aspergillus fischeri</i>	Dizileme yapılamadı	-	-
45A	Teşhis Edilemedi	Dizileme yapılamadı	-	-
46A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	501/508 (%99)
47A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	503/504 (%99)
48A	<i>Aspergillus fischeri</i>	DNA İzolasyonu Yapılamadı	-	-
49A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	499/506 (%99)
50A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	499/506 (%99)
51A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	LT158494.1	505/506 (%99)
52A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	499/506 (%99)

*Türkiye için yeni kayıtlardır.

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

4.1. Tür Düzeyinde Teşhis Edilen *Aspergillus* Türleri

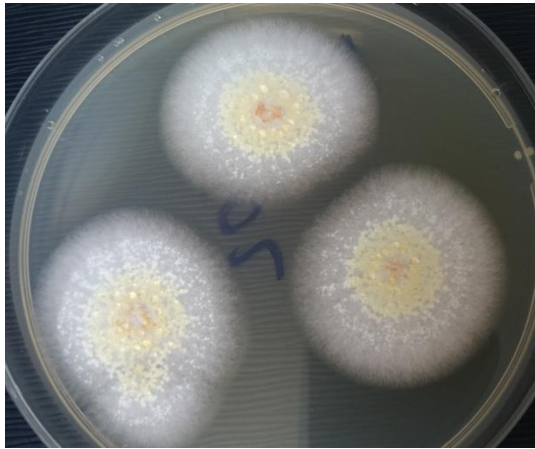
4.1.1. *Aspergillus affinis* Davolos, Persler, Pietrangeli & Maggi 2011

Kingdom: Fungi, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Class: Eurotiomycetes, Subclass: Eurotiomycetidae, Ordo: Eurotiales, Familia: Trichocomaceae, Genus: *Aspergillus*, Subgenus: *Circumdati*, Section: *Circumdati*

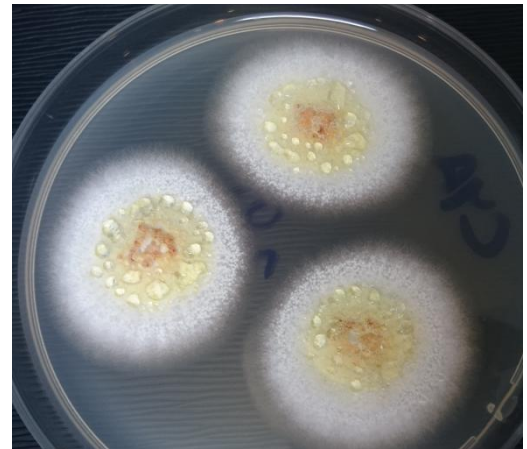
7 günlük inkübasyon sonunda koloni çapı CYA25 besiyerinde 35-37 mm, MEA besiyerinde 34-35 mm, CZ besiyerinde 26-30 mm, DG18 besiyerinde 47-48 mm'dir. CYA37 besiyerinde ise mikrokoloniler görülür.

CYA25 besiyerinde koloni yüzeyi yünsü; sklerotia beyaz-sarı renkte; uzun; eksuda şeffaf-sarımsı renkte; koloni altı merkezde grimsi turuncu, kenarlarda sarı beyaz renkte; çözünür pigment yok ve uzun inkübasyon süresi sonunda sporulasyon görülür. CYA37 besiyerinde mikrokoloniler beyaz renktedir. MEA besiyerinde koloni yüzeyi yünsü; sklerotia beyaz-soluk/açık sarı renkte; eksuda şeffaf-sarımsı renkte; koloni altı merkezde kahverengi, kenarlarda grimsi turuncu renkte; çözünür pigment yoktur. DG18 besiyerinde koloni yüzeyi yünsü; koloni altı sarımsı beyaz renkte; eksuda ve çözünür pigment yoktur.

Konidial başlar radiate; konidiaforlar biseriate; saplar şeffaf- kahverengi renkte, pürüzlü duvarlı, 730-2300 x 11-17 µm; veziküller küresel, 35-70 µm genişliğinde; metula vezikülün tüm yüzeyinde, 12,5-21,5 x 4,5-7 µm; fiyalidler ampulliform, 9-11 x 3-4,5 µm; konidia subglobose-ellipsoidal, ince pürüzlü, 2,5-4 x 2,5-3,5 µm; sklerotia beyaz-soluk/açık sarı, 133-675 µm'dir.



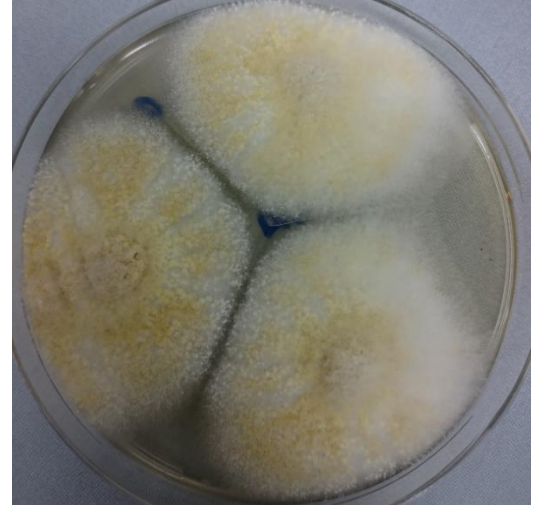
A



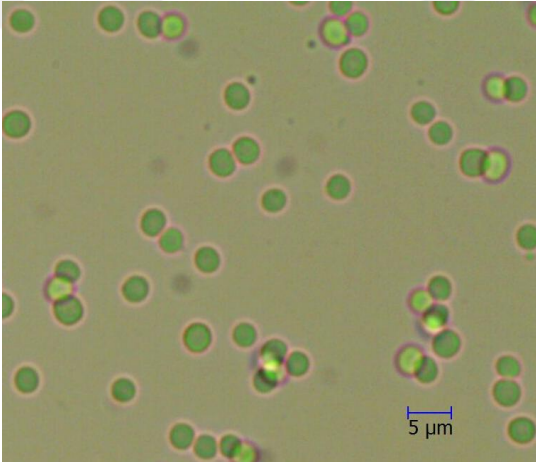
B



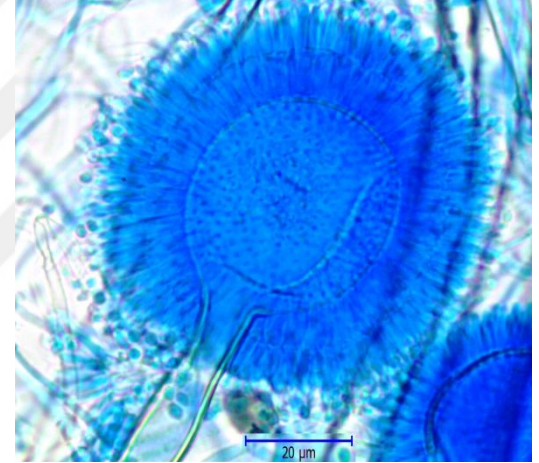
C



D



E



F

Şekil 4.1. *Aspergillus affinis* **A.** MEA **B.** CYA25 **C.** CZ **D.** CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri **E.** Spor yapısı x40 **F.** Konidiafor x40

4.1.2. *Aspergillus awamori* Nakaz. 1907

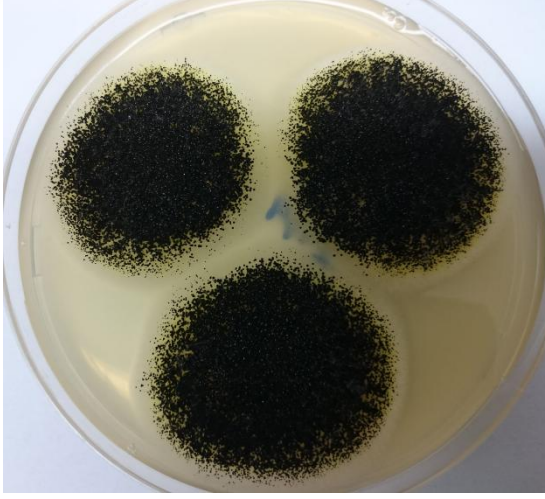
Kingdom: Fungi, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Class: Eurotiomycetes, Subclass: Eurotiomycetidae, Ordo: Eurotiales, Familia: Trichocomaceae, Genus: *Aspergillus*, Subgenus: *Circumdati*, Section: *Nigri*

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

CYA25 besiyerinde konidia koyu kahverengi-siyah; miselyum genellikle fark edilmeyen görünümde ve beyaz-sarı renkte; eğer varsa eksuda koyu kırmızı kahverengi

renkte; koloni altı donuk kahverengi, yoğun sarı ya da gri kahverengi; eğer mevcutsa çözünür pigmentler donuk sarı; koloni zayıf, taneli-granüllüdür. MEA besiyerinde konidia koyu kahverengi-siyah renkte; miselyum fark edilmeyen görünümde; bireysel konidial başlar seyrek. CY20S, CYA37 ve CZ besiyerlerinde koloniler CYA25 ile benzer morfoloji gösterir. Yalnızca CYA37 besiyerinde koloni altı koyu kahverengi-siyahtır.

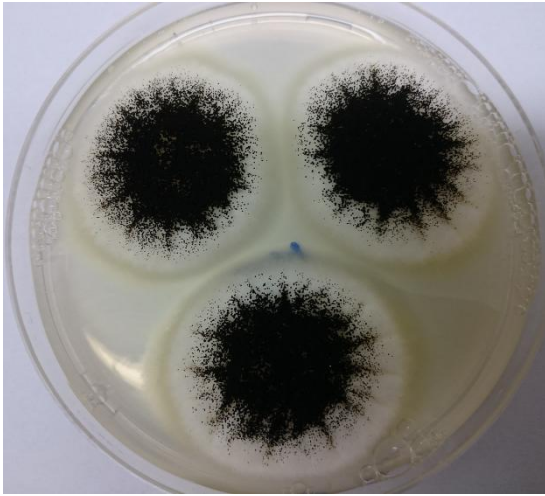
Konidial başlar radiate, olgunlaştığında sütunlara bölünmüş; saplar 300-1500 x 7-17 μm , pürüzsüz duvarlı; veziküller globose, 20-40 μm ; ağırlıklı olarak biseriate; metula vezikülün üst yarısında ve 10-20 x 4-8 μm ; fiyalidler 6-9 x 2,5-4 μm ; konidia 4-5 μm çapında, küresel, pürüzsüz-ince pürüzlüdür.



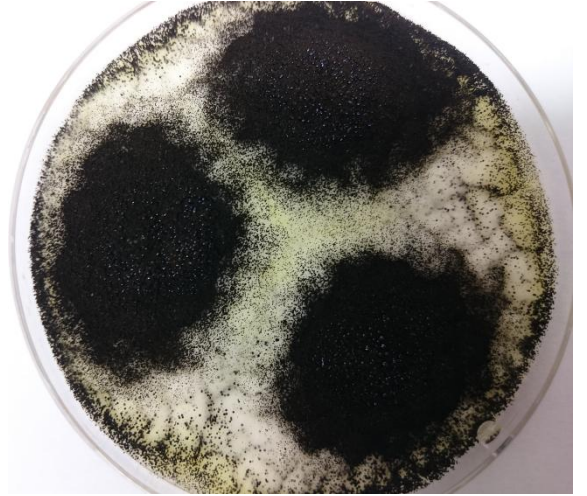
A



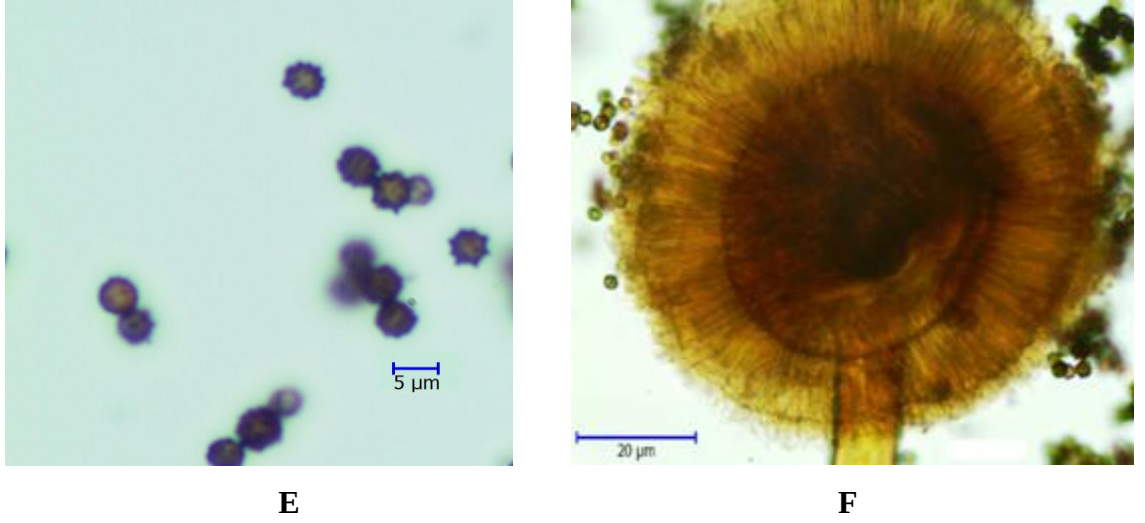
B



C



D



Şekil 4.2. *Aspergillus awamori* **A.** MEA **B.** CYA25 **C.** CZ **D.** CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri **E.** Spor yapısı x40 **F.** Konidiafor x40

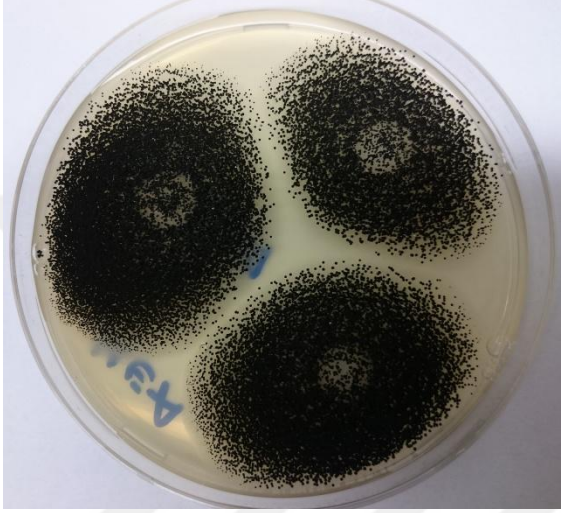
4.1.3. *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom 1916

Kingdom: Fungi, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Class: Eurotiomycetes, Subclass: Eurotiomycetidae, Ordo: Eurotiales, Familia: Trichocomaceae, Genus: *Aspergillus*, Subgenus: *Circumdati*, Section: *Nigri*

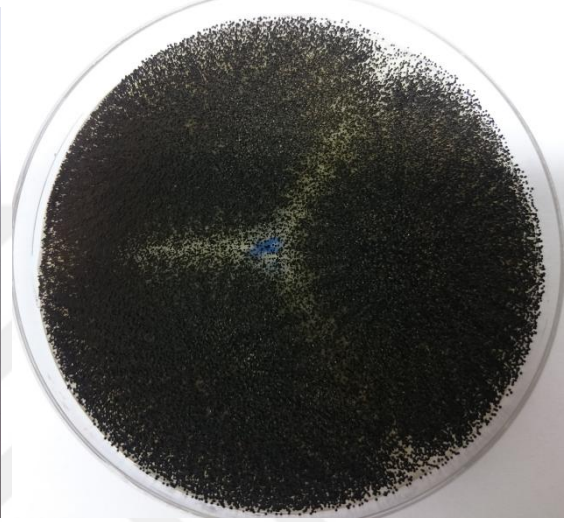
7 günlük inkübasyon sonunda koloni çapı CYA25 besiyerinde 65-70 mm, MEA besiyerinde 55-70 mm, CY20S besiyerinde 68-70 mm, CYA37 besiyerinde 10-30 mm ve CZ besiyerinde 35-45 mm'dir.

CYA25 besiyerinde konidia zeytin siyahı-siyah renkte; miselyum genellikle fark edilmeyen beyaz renkte; eğer varsa sklerotia sarımsı devetüyü rengi ya da pembemsi renkte; koloni altı renksiz ya da donuk sarı-koyu gri tonlarında; koloni uzun saplı konidiaforlardan oluşan yoğun keçe görünümündedir. MEA besiyerinde konidia siyah renkte ve seyrek; miselyum beyaz renkte ya da fark edilmeyen görünümde; eğer varsa sklerotia sarı-devetüyü renginde; koloni altı renksiz ya da hafif sarı renkte; zayıf miselyum ve uzun saplı bireysel konidiaforlar göze çarpar. CY20S besiyerinde konidiaforlar yoğun değildir ve sapları 3-4 mm uzunluğundadır. Bunun dışında koloni karakteri CYA25 ile benzer özelliklere sahiptir. CYA37 besiyerinde koloniler CYA25 ile benzer renktedir. Koloni altı siyah-gri renkte ve bazen de görünür kahverengi pigmentlidir. Konidiaforlar CYA25'ten kısadır. CZ besiyerinde koloniler CYA25 ile benzerdir, fakat konidiaforlar yoğun değildir.

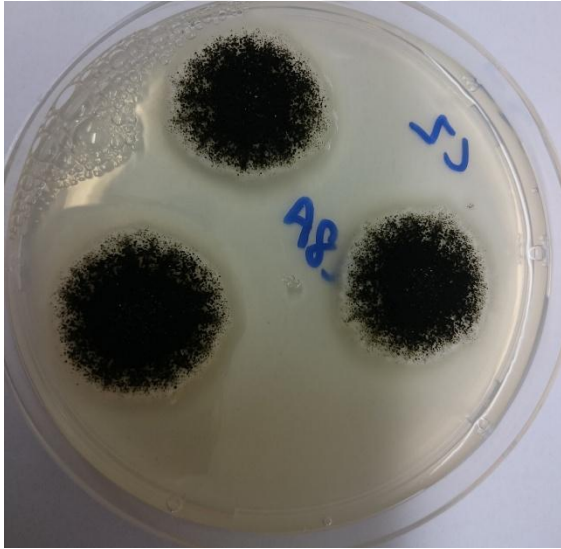
Konidial başlar radiate, olgunlaştığında sütunlara bölünmüş; saplar 1000-3500 x 15-20 μm , kalın duvarlı, pürüzsüz-ince pürüzlü, renksiz ya da uçların yakınına doğru kahverengimsi; veziküller 65-90 μm , küresele yakın; biseriata; metula vezikülün tüm yüzeyinde, 25-40 x 6-11 μm ölçülerinde; fiyalidler 8-12 x 5-7 μm ; konidia çok büyük, 7-10 μm çapında, globose, duvarlar olgunlaştığında sivri uçlar veya tüberküllerle son derece pürüzlüdür.



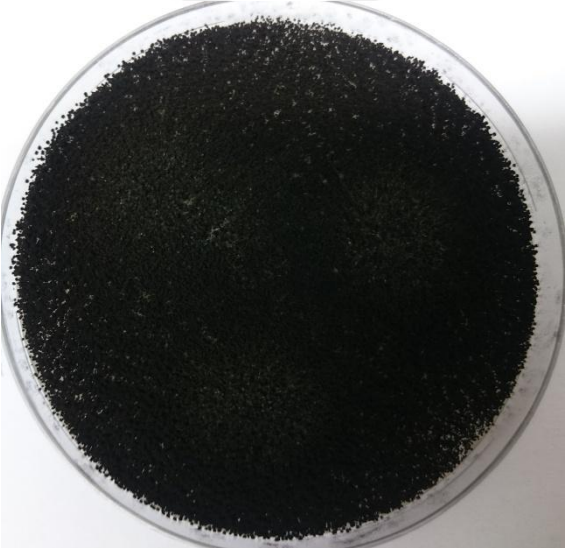
A



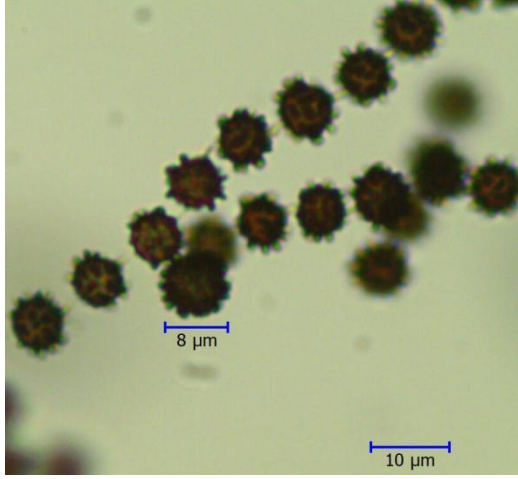
B



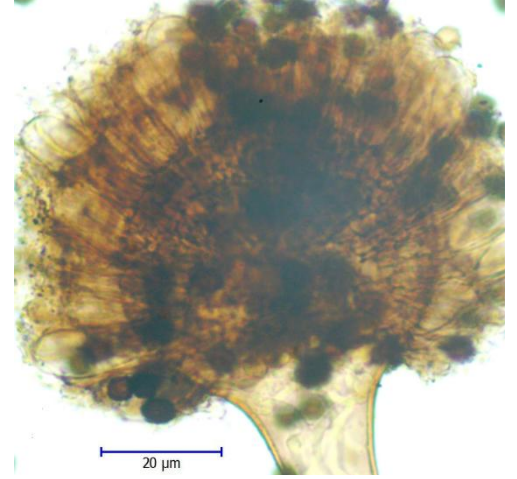
C



D



E



F

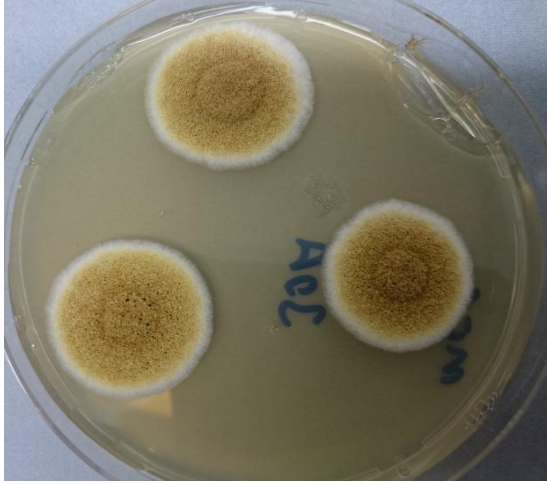
Şekil 4.3. *Aspergillus carbonarius* **A.** MEA **B.** CYA25 **C.** CZ **D.** CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri **E.** Spor yapısı x40 **F.** Konidiafor x40

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

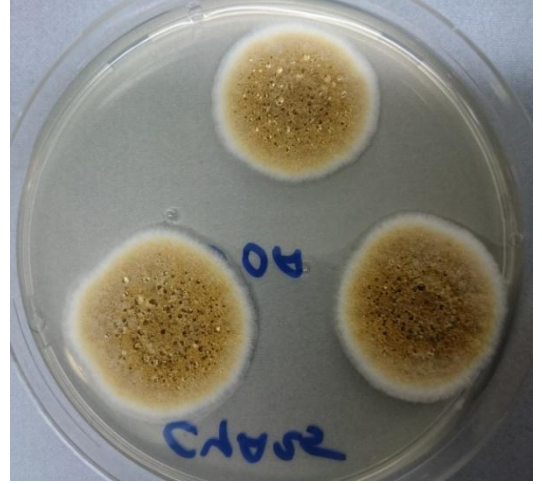
Kingdom: Fungi, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Class: Eurotiomycetes, Subclass: Eurotiomycetidae, Ordo: Eurotiales, Familia: Trichocomaceae, Genus: *Aspergillus*, Subgenus: *Circumdati*, Section: *Cremeri*

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

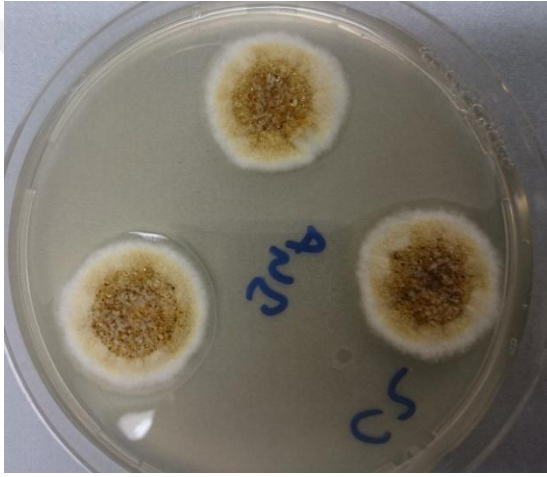
CZ besiyerinde koloniler yavaş gelişir ve 7-10 günde 2-5 cm olmaktadır. Koloniler önce soluk kahverengi, daha sonra devetüyü kahverengisi-koyu sarı, en son ise koyu zeytinimsi devetüyü renginde; koloni altı renksiz-açık devetüyü, daha sonra devetüyü renginde; konidial başlar globoz-gevşek radyat, 60-225 µm çapında, genellikle olgunlukta gevşek sütunlara bölünmüş; konidiaforlar 225-450 µm çapında, pürüzsüz duvarlı, bazen ince bazen kalın duvarlı, kavisli, açık sarı renkte, dallanmamış veya bazen bir veya iki dallı; vezikül globose-subglobose, tüm yüzey boyunca verimli, 15-37,5 µm çapında; sterigma iki seri halinde, primerler 4,5-10,5 x 2,2-3,8 ve çoğunlukla 6,8-9 x 3,0 µm, sekonderler 4,5-12 x 2,2-3,0 ve çoğunlukla 7,5-9, 0 x 2,2-3,0 µm; konidia subgloboz-globoz, 3,0-4,5 µm, çok ince pürüzlü; az ila çok damlacıklar şeklinde eksuda vardır. MEA besiyerinde koloniler CZ besiyeri ile yaklaşık olarak aynıdır. Koloni gelişimi biraz sınırlı ve 7-10 günde 2-4 cm olmaktadır.



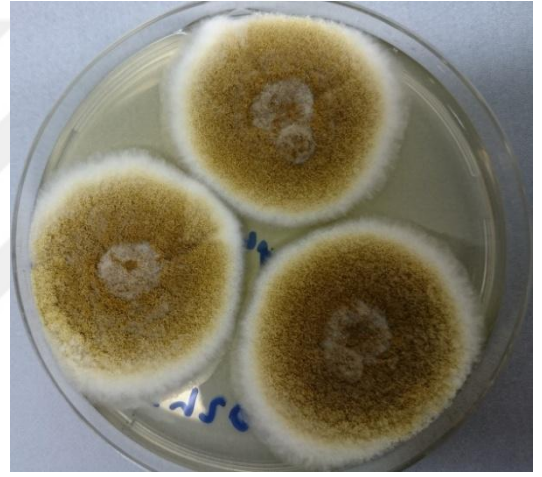
A



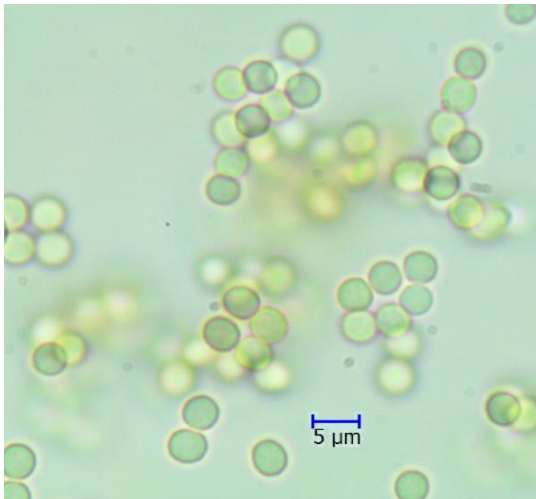
B



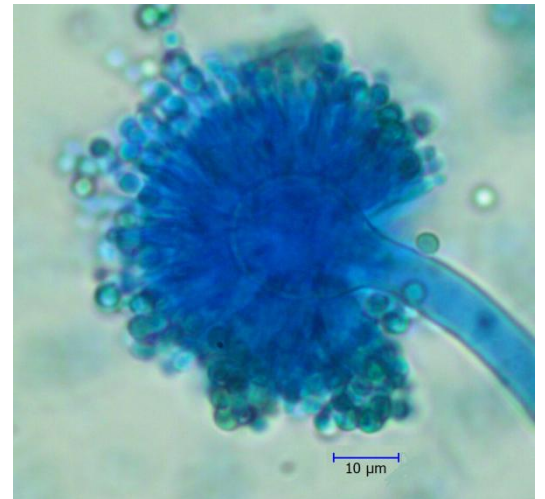
C



D



E



F

Şekil 4.4. *Aspergillus dimorphicus* **A.** MEA **B.** CYA25 **C.** CZ **D.** CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünimleri **E.** Spor yapısı x100 **F.** Konidiafor x40

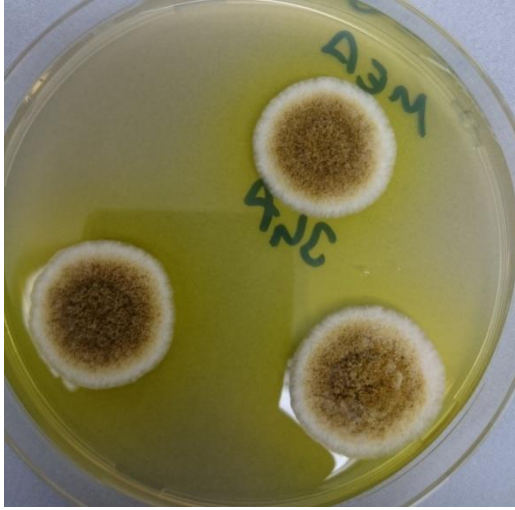
4.1.5. *Aspergillus europaeus* Hubka, A. Nováková, Samson, Houbraken, Frisvad & M. Kolařík 2016

Kingdom: Fungi, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Class: Eurotiomycetes, Subclass: Eurotiomycetidae, Ordo: Eurotiales, Familia: Trichocomaceae, Genus: *Aspergillus*, Subgenus: *Circumdati*, Section: *Cremeri*

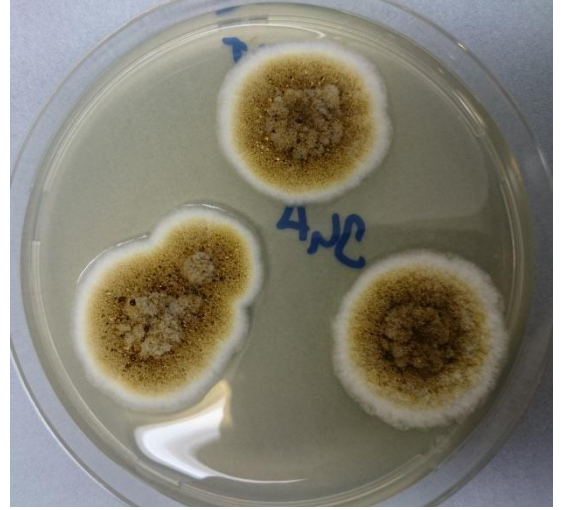
7 günlük inkübasyon sonunda koloni çapı CYA25 besiyerinde 32-45 mm, MEA besiyerinde 21-30 mm, CZ besiyerinde 25-38 mm, CY20S besiyerinde 53-65 mm'dir.

MEA besiyerinde koloniler yassı, flokkoz (yünsü), bazen koloni merkezi kabarık, koloni yüzeyi ince granüllü-granüllü; miselyum sarımsı beyaz-sarımsı gri renkte; sporulasyon koloni merkezinde veya tüm yüzeyde, koyu sarı-açık zeytin kahverengi renkte; çözünür pigment hafif belirgin açık sarı-canlı sarı renkte; koloni altı merkezde parlak sarı veya grimsi/soluk sarı renkte; eksuda yoktur. CYA25 besiyerinde koloniler kadifemsi-yünsü, radyal olarak buruşuk; miselyum beyaz veya sarımtırak beyaz; sporulasyon sarımsı gri, grimsi sarı, koyu grimsi sarı, orta sarı veya açık zeytin kahverengi renkte; bazı suşlarda sporulasyon zayıf; koloni altı renksiz, açık sarı, soluk sarı, sarımsı beyaz, orta sarı veya koyu sarı renkte; çözünür pigment yoktur. CZ besiyerinde koloniler yassı, bazı suşlarda koloni merkezi kabarık, kadifemsi, ince granüllü-granüllü, bazı suşlarda koloni merkezi yünsü; sporulasyon koyu sarı veya açık zeytin kahverengisi renkte; eksuda yoktur veya koloni merkezinde 1 mm'lik koyu sarı damlacıklar halindedir. CY20S besiyerinde koloniler yassı, kadifemsi-yünsü; sporulasyon canlı sarı, koyu sarı, açık turuncu sarı, orta sarı, açık grimsi kahverengi-açık kahverengi veya koyu turuncu sarı renkte; koloni altı soluk sarı, açık sarı veya parlak sarı renkte; eksuda ve çözünür pigment yoktur. CYA37 besiyerinde gelişme görülmez.

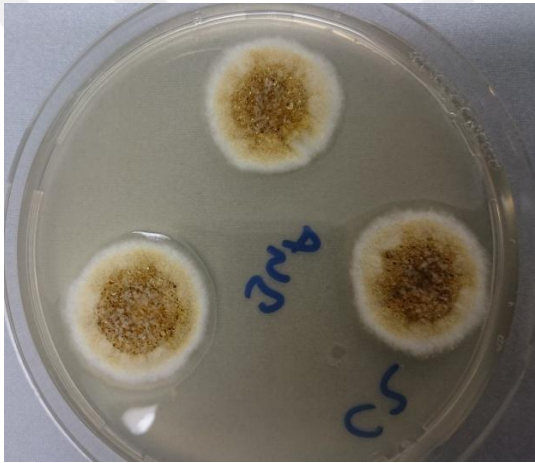
Vezikül piriform veya globose, 11-44 µm çapında; biseriate; metula vezikülün $\frac{3}{4}$ 'ünü kaplayan, 6-25 µm uzunluğunda ve 5-9 µm genişliğinde; fiyalidler ampulliform, 6-11,5 x 3-6 µm; konidia renksiz, genellikle globose veya subglobose, olgunlaştığında kaba pürüzlü, sarı kahverengi-kahverengi renkte; 3,5-5 x 3-4,5 µm; hütle hücresi ve sklerotia yoktur.



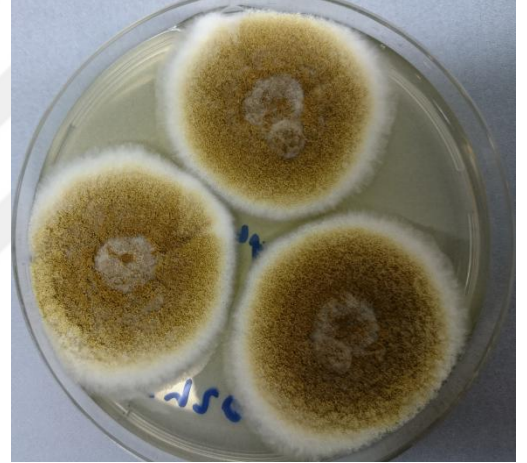
A



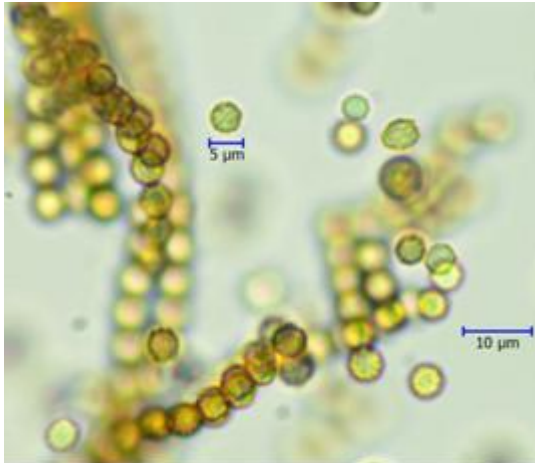
B



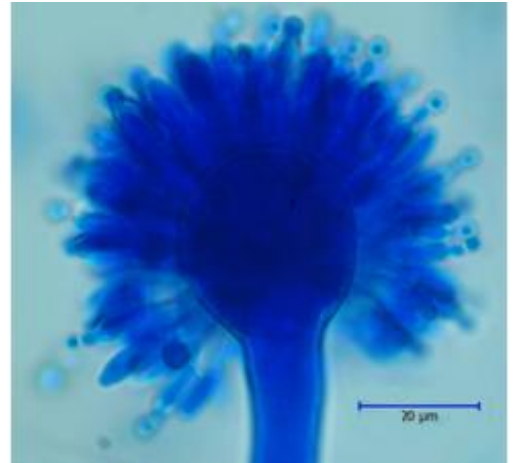
C



D



E



F

Şekil 4.5. *Aspergillus europaeus* **A.** MEA **B.** CYA25 **C.** CZ **D.** CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünümleri **E.** Spor yapısı x40 **F.** Konidiafor x40

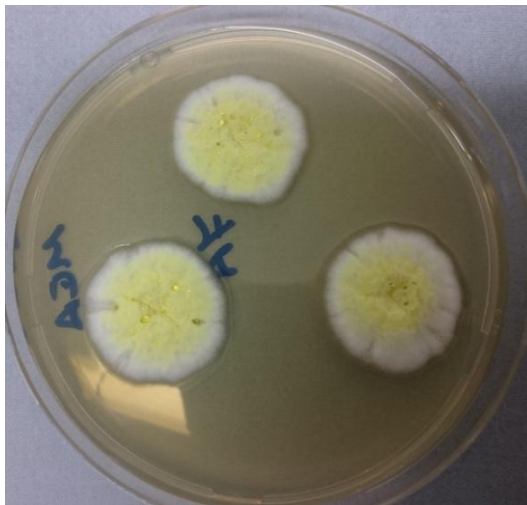
4.1.6. *Aspergillus spelaeus* A. Nováková, Hubka, M. Kolarík & S.W. Peterson 2015

Kingdom: Fungi, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Class: Eurotiomycetes, Subclass: Eurotiomycetidae, Ordo: Eurotiales, Familia: Trichocomaceae, Genus: *Aspergillus*, Subgenus: *Nidulantes*, Section: *Flavipedes*

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

CYA25 besiyerinde koloniler yassı ve düzensiz; floccose; açık kahverengimsi sarımsak kahverengi renkte; koloni altı koyu turuncu sarı renkte; eksuda ve çözünür pigment yok. MEA besiyerinde koloniler yassı, ince granüllü-granüllü; açık sarı renkte; sporulasyon açık grimsi sarımsak kahverengi renkte; koloni altı sarımsı kahverengi renkte; çözünür pigment yok ve koloni yüzeyinde bol miktarda küçük renksiz veya soluk sarı damlacıklar bulunur. CZ besiyerinde koloniler yassı, granüllü; soluk sarı-grimsi sarı veya açık kahverengimsi sarımsak kahverengi renkte; koloni altı orta sarı renktedir. CYA37 besiyerinde gelişme görülmez.

Konidial başlar beyaz-soluk kahverengi renkte, radiate veya columnar; konidiaforlar biseriate, nadiren uniseriate; saplar açık kahverengi-kahverengi renkte; veziküller piriform veya spatül şeklinde, 7-18 µm çapında; metula vezikülün üçte ikisinde, 4-7 µm uzunluğunda; fiyalidler 4-7,5 µm uzunluğunda; konidia globose veya subglobose, pürüzsüz, 2,3-2,9 µm'dir. Aksesuar konidia nadir bulunur ya da bulunmaz; çoğunlukla 1-3 konidiaya sahip hiyalin mikro-semimakronematöz konidiaforlar globose veya subglobose, 4,5-6 µm çapındadır. Bazı suşlarında hülle hücreleri bulunur.



A



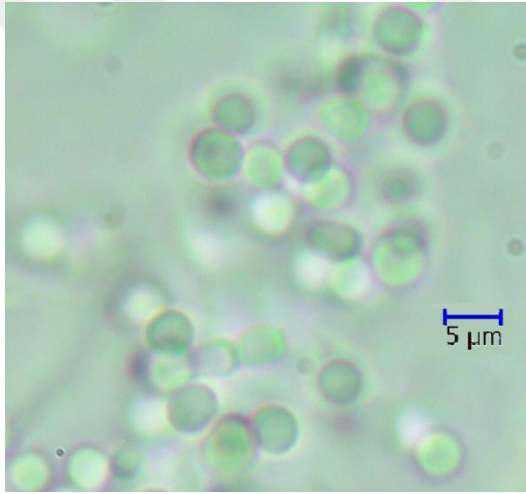
B



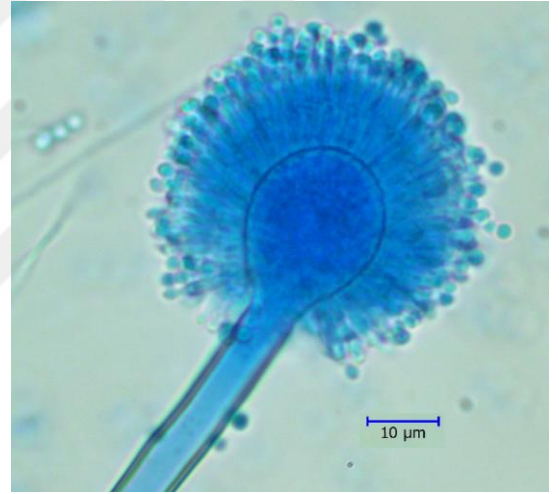
C



D



E



F

Şekil 4.6. *Aspergillus spelaesus* **A.** MEA **B.** CYA25 **C.** CZ **D.** CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri **E.** Spor yapısı x100 **F.** Konidiafor x40

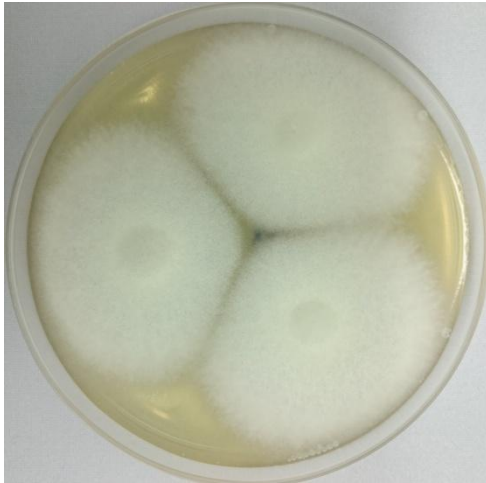
4.7. *Aspergillus fischeri* Wehmer 1907

Kingdom: Fungi, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Class: Eurotiomycetes, Subclass: Eurotiomycetidae, Ordo: Eurotiales, Familia: Trichocomaceae, Genus: *Aspergillus*, Subgenus: *Fumigati*, Section: *Fumigati*

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

CYA25 besiyerinde konidia seyrek, gri yeşil-soluk mavi yeşil renkte; miselyum krem renkli kleistotesyumlara sahip beyaz-krem renkte; eğer varsa eksuda renksiz-soluk kahverengi renkte; koloni altı renksiz, sarı veya kahverengi renkte; koloni dokusu kadifemsi-yünsü, düzgün veya biraz oluklu; çözünür pigment yoktur. MEA besiyerinde sporulasyon yok veya seyrek, CYA25 besiyerine benzer renklerde; miselyum açık krem renkli kleistotesyumlara sahip beyaz-krem renkte; koloni altı renksiz-mat donuk sarı renkte; koloni dokusu zayıf, düzgün veya biraz yünsüdür. CY20S besiyerinde koloniler CYA25 besiyerine benzer renk ve yapıdadır. CYA37 besiyerinde konidia bol miktarda, CYA25 besiyerine benzer renkte; koloniler alçak, yoğun, genellikle radyal olarak olukludur. CZ besiyerinde konidia seyrek, donuk mavi yeşil renkte; koloni altı soluk sarı-şeftali renginde ve diğer özellikler CYA25 besiyeri ile benzerdir.

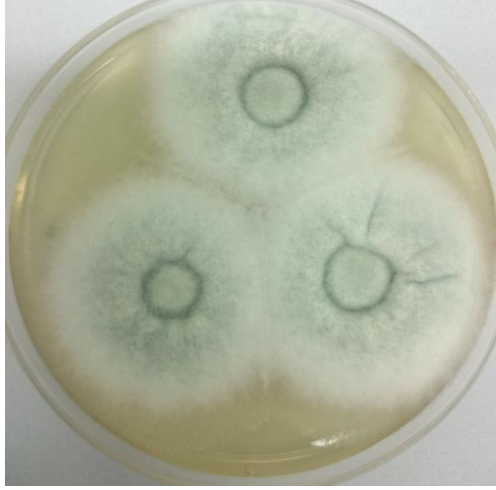
Konidial başlar radiat-columnnar; saplar renksiz, pürüzsüz duvarlı, 150-350 x 5-9 μm ; veziküller 10-20 μm çapında; uniseriate; vezikülün üst kısmının üçte ikisini kaplayan fiyalidler 5-8 x 2-3 μm ; konidia pürüzsüz-ince pürüzlü, küresel-elips şeklinde, 2,5-3 x 2-3 μm ; kleistotesyum globose, 150-350 μm , yumuşak duvarlı, beyaz-krem renkte; 7-14 günde olgunlaşan 8 adet renksiz askospor içeren askuslar 9-15 μm boyutunda; askosporlar hemen hemen küresel mercek biçiminde, 5-8 μm uzunluğunda, 4-5 μm genişliğinde, konveks yüzeyler anastomoz yapan kenarlı ve belirgin iki adet ekvator tacına sahiptir.



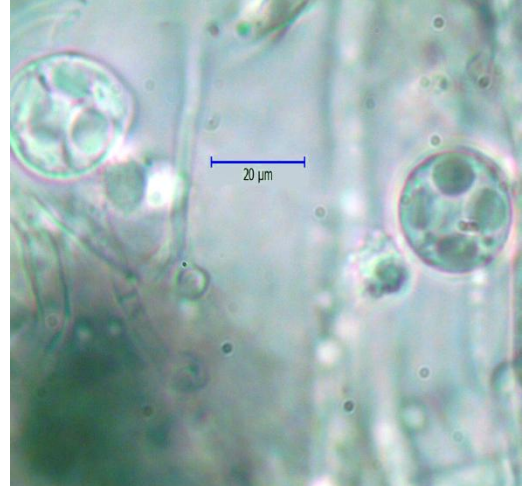
A



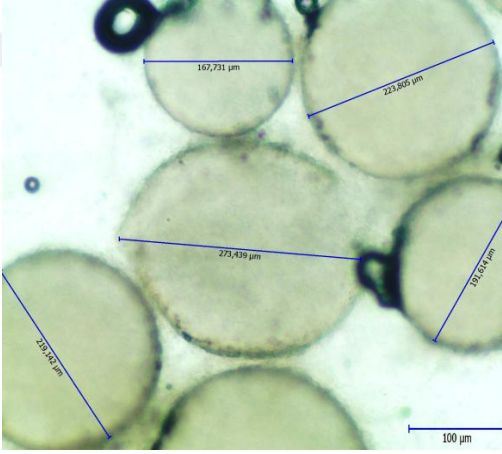
B



C



D



E



F



G



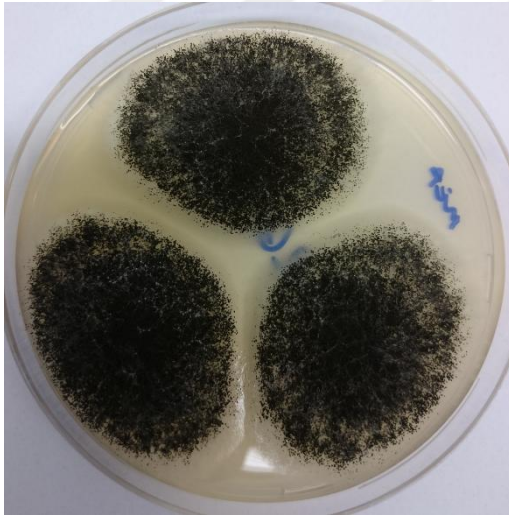
H

Şekil 4.7. *Aspergillus fischeri* **A.** MEA **B.** CYA25 **C.** CY20S besiyerlerinde 5 günlük koloni görünüşleri **D.** Askus x100 **E.** Kleistotesyum x10 **F.** Konidiafor x40 **G.** Askospor x100 **H.** Konidiaspor x100

4.2. Tür Düzeyinde Teşhis Edilemeyen *Aspergillus* Section *Nigri* Türleri

Kingdom: Fungi, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Class: Eurotiomycetes, Subclass: Eurotiomycetidae, Ordo: Eurotiales, Familia: Trichocomaceae, Genus: *Aspergillus*, Subgenus: *Circumdati*, Section: *Nigri*

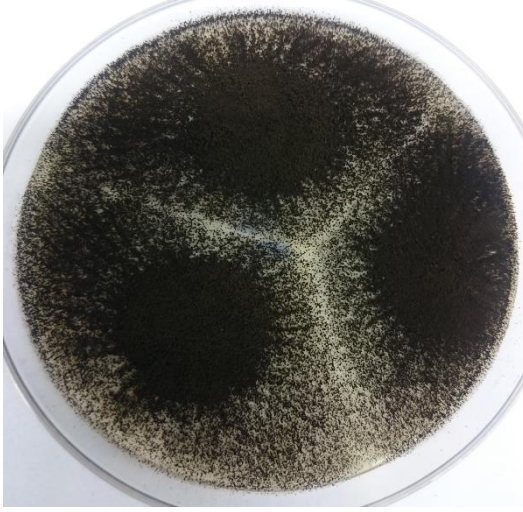
Konidi başları siyah tonlarında, yeşilimsi siyah, kahverengimsi siyah, morumsu siyah veya karbon siyahı renkte, globoz, radyat, birkaç veya çok sayıda düzensiz yada iyice belirgin konidi zinciri sütununa yarılmaktadır. Konidiaforlar renksiz-kahverengi renkte, tipik olarak düz çeperli ancak birkaç türde hafif granüllü veya noktalı, genellikle kalın çeperli, gevrek, üzerine bastırıldığında uzunluğuna yarılmaktadır. Veziküller globoz veya globoza yakın, renksiz veya açık-koyu kahverengi tonlarındadır. Sterigmalar türe bağlı olarak bir veya iki serili, genellikle koyu renkli hatta pigmentle dolmuş durumdadır. Konidiler globoz, subgloboz, eliptikal veya horizontal olarak yassılaştırmış, düz veya düze yakın, ekinulat, verrukuloz veya belirgin şekilde uzunlamasına çizgilidir. Sklerosyumlar globoz-subgloboz, gençken krem renginde, daha sonra devetüyü-pembemsi veya grimsi devetüyü veya kahverengi renktedir.



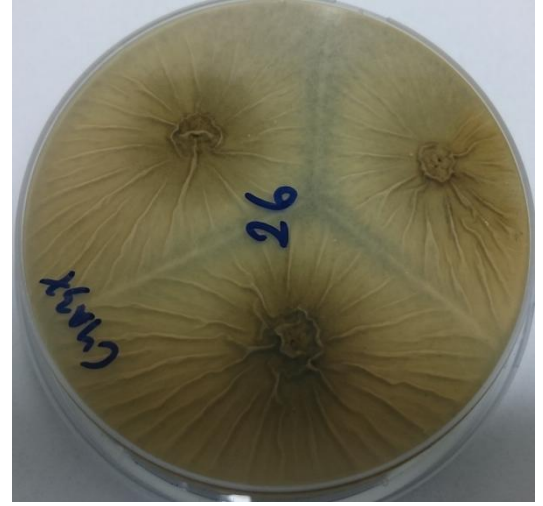
A



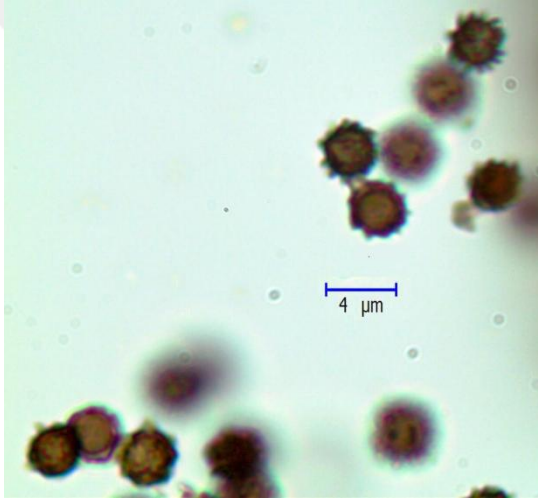
B



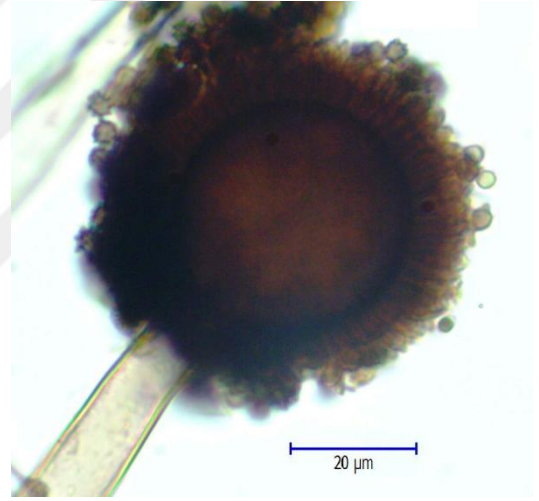
C



D

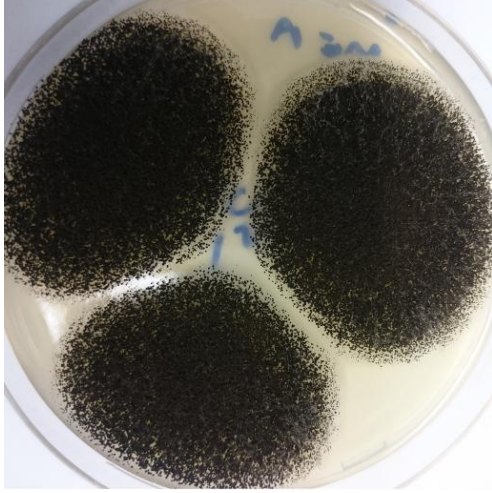


E



F

Şekil 4.8. 26A no'lu örnek **A.** MEA **B.** CYA25 **C.** CYA37 besiyerlerinde 5 günlük koloni görünüşleri **D.** CYA37 besiyeri koloni altı **E.** Spor yapısı x100 **F.** Konidiafor x40



A



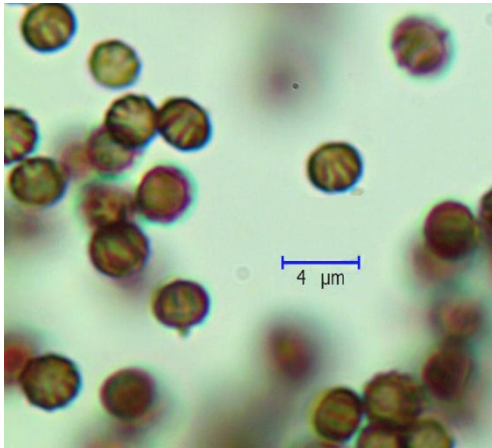
B



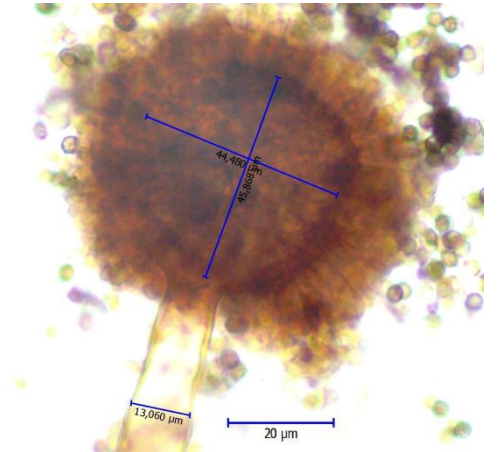
C



D



E



F

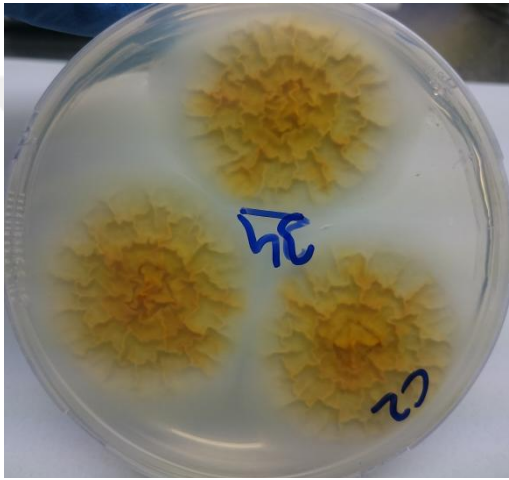
Şekil 4.9. 25A no'lu örnek **A.** MEA **B.** CYA37 **C.** CY20S besiyerlerinde 5 günlük koloni görünüşleri **D.** CY20S besiyeri koloni altı **E.** Spor yapısı x100 **F.** Konidiafor x40



A



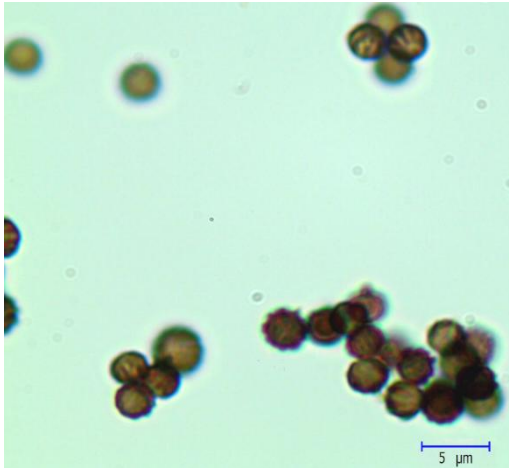
B



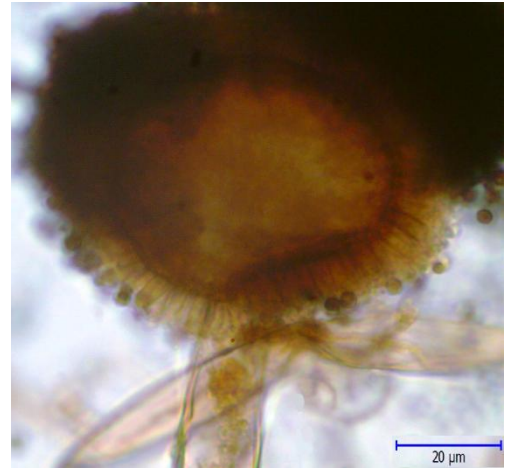
C



D



E



F

Şekil 4.10. 24A no'lu örnek **A.** CZ **B.** CY20S besiyerlerinde 5 günlük koloni görünümleri **C.** CZ besiyeri koloni altı **D.** CY20S besiyeri koloni altı **E.** Spor yapısı x100 **F.** Konidiafor x40

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Edirne ili Karaağaç Kent Ormanı'ndan *Aspergillus* türlerini teşhis etmek amacıyla alınan toprak örnekleri “Toprağı Sulandırma Metodu” ile çalışılmıştır. Metot, ilk olarak bakteri izolasyonu için uygulanmaya başlanmış, daha sonra funguslara uyarlanmıştır. Bu yöntem *Aspergillus* cinsi gibi fazla spor üreten mikrofungusların izolasyonunda avantaj sağlamaktadır. Diğer yöntemlere göre daha yüksek niteliklere sahip olması nedeniyle birçok araştırmacı tarafından tercih edilen geleneksel bir yöntemdir. Bazı olumsuz özellikleri daha fazla petri kabına paralel ekimler yapılarak azaltılabilir. Bu yüzden bu çalışmada da ekimler 10 adet petri kabıyla gerçekleştirilmiştir.

İzolasyon işlemleri sonucunda elde edilen 52 adet koloni üzerinde morfolojik ve moleküler tanımlama çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda 7 adet *Aspergillus* türü tespit edilmiştir. Bu türler, *Aspergillus affinis*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus dimorphicus*, *Aspergillus europaeus*, *Aspergillus spelaeus* ve *Aspergillus fischeri*'dir. *Aspergillus awamori* ve *Aspergillus carbonarius* türleri hem morfolojik hem de moleküler olarak, *Aspergillus fischeri* ise morfolojik olarak tespit edilmiştir. Fenotipik tanımla tür düzeyinde tespit edilemeyen türlerin varlığı moleküler veriler ile belirlenmiştir. *Aspergillus dimorphicus*'un morfolojik olarak *Aspergillus* Section *Cremei*'ye ait olduğu bulunarak, tür düzeyinde teşhisi moleküler yöntem ile yapılmıştır. Bu türler, Türkiye'deki çalışmalarda daha önce tanımlanan türlerdir. *Aspergillus affinis*'in *Aspergillus* Section *Circumdati*, *Aspergillus europaeus*'un *Aspergillus* Section *Cremei* ve *Aspergillus spelaeus*'un *Aspergillus* Section *Flavipedes* bölümlerine ait oldukları bulunarak, tür düzeyinde teşhisleri moleküler yöntem ile yapılmıştır. *Aspergillus affinis*, *Aspergillus europaeus*, *Aspergillus spelaeus* türleri

Türkiye için yeni kayıtlardır [44]. İzole edilen kolonilerden morfolojik çalışmalar ile tespit edilemeyen bazı türler moleküler yöntemlerle de ayırt edilememiştir. Morfolojik yöntemler ile bu örneklerin yalnızca *Aspergillus* Section *Nigri* üyesi türler oldukları tespit edilmiştir. 22A ve 26A kodlu örneklerin dizi analizleri yapılamamıştır. 23A ve 25A kodlu örneklerin blast analizleri sonucunda aynı Ident ve Query cover oranına sahip üç adet tür görülmektedir. Bunlardan *Aspergillus welwitschiae* ve *Aspergillus awamori* aynı Max score değerine sahiptir. 24A kodlu örneğin blast analizleri sonucunda aynı Ident ve Query cover oranı ve aynı Max score değerine sahip üç adet tür görülmektedir.

Mikrofungusların tanımlanmasında yalnızca fenotipik karakterlere dayanan morfolojik yöntemlerin kullanılmasının, teşhis anahtarlarının güncel türleri içermemesi de göz önüne alındığında yetersiz olduğu söylenebilir. Fenotipik karakterlerin aynı türlerde farklılık, farklı türlerde benzerlik göstermesi tanımlamayı zorlaştıran diğer bir etkidir. Bu çalışmaların zahmetli, zaman alan ve deneyim gerektiren yöntemler olması da moleküler metotların gerekliliğini kanıtlar [55]. Bu yüzden tanımlama çalışmalarında moleküler tekniklerinde kullanılması tamamlayıcı olmaktadır [54]. Moleküler analizler sayesinde daha fazla tür çeşitliliği ortaya konulmaktadır. Ayrıca daha hızlı, güvenilir ve uluslar arası geçerliliği olan sonuçlar elde edilmektedir [61]. Moleküler yöntemlerin gitgide gelişmesine rağmen yine de morfolojik ve koloniyal çalışmalar önemini korumaktadır [40].

Aspergillus identifikasyonu da morfolojik tekniklere dayanmaktadır fakat son zamanlarda DNA tabanlı moleküler çalışmalar hız kazanmıştır [59]. Özellikle PCR yöntemleri, türe özgü primerler kullanarak hedef fungal gen bölgesini çoğaltan duyarlı yöntemlerdir [47]. Evrensel ribozomal DNA bölgelerine ITS (Internal Transcribed Spacer), büyük ribozomal alt birim D1-D2, β -tubulin (BenA) ve Calmodulin (CaM) örnek gösterilebilir [74]. Bunların içinde ITS, fungusların resmi DNA barkodu olarak nitelendirilir. Ancak bu lokus bütün *Aspergillus* türlerini doğru tanımlamak için yeterli değildir [59]. Bazı durumlarda yakın türlerin ayrımını yapabilecek nükleotid farklılıklarına sahip değildir [75]. Son dönemlerde filogenetik çalışmalarda, oldukça değişken intron bölgelerine sahip protein kodlayan genler tercih edilmektedir. Bu genlere, elongation factor 1 alpha, calmodulin, β -tubulin, actin ve histone genleri örnek gösterilebilir. Bunlar ITS'ye göre daha çok değişkenlik gösterir ve daha elverişlidirler.

Bu çalışmada tercih edilen calmodulin bölgesinin amplifikasyonu kolaydır ve neredeyse tüm *Aspergillus* türleri arasında ayırım yapılabilir [59].

Toprak içerisinde çeşitli mikrofungus türlerini barındıran bir ortamdır. Bunların içinde *Aspergillus* türleri toprakta en fazla sayıda bulunanların başında gelir. Bu türlerin diğerlerine göre çevresel koşullara daha iyi uyum sağladıkları söylenebilir [7]. Birçok çalışmada en sık izole edilen toprak mikrofungusu *Aspergillus* cinsidir. Örneğin; Çolakoğlu (2001)'nin İstanbul Belgrad Ormanı'nda yaptığı çalışmada, araştırma alanındaki topraklarda tür bakımından en zengin cins %23.664 oranla *Aspergillus* olarak belirlenmiştir [24]. Hasenekoğlu ve Sülün (1993) tarafından yapılan 'A study on *Aspergillus* Mich ex Fr. and *Penicillium* Link ex Gray flora of the soils of Northeast Anatolia, Türkiye' ve Eltem, Taşkın ve Pazarbaşı (2009) tarafından yapılan 'Biodiversity and flora of microfungi from Sultana-Type vineyard soil in Turkey' adlı çalışmada *Aspergillus carbonarius* ve *Aspergillus awamori* türleri tespit edilmiştir [79,18]. *Aspergillus carbonarius*, Çöl (2006)'ün 'Değişik ekolojik koşullarda saksı toprağında bulunan alerjik küf florasının saptanması' adlı yüksek lisans tez çalışmasında ve Göçmen ve Özkan (2001)'in 'A research on the microfungal flora of some greenhouse soils in the vicinity of Lapseki Çanakkale, Turkey' adlı çalışmasında tespit edilmiştir [80,81]. *Aspergillus awamori*, Bilgin (1994)'in 'Çiçekli köyü (Bornova) ve civarı toprakları mikrofungus florasının bitki süksesyonuna bağlı olarak incelenmesi' adlı yüksek lisans tez çalışmasında, Al-Sheboul (1990)'un 'Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü meyve bahçelerindeki mikrofungus florası ile ilgili bir araştırma' adlı yüksek lisans tez çalışmasında ve Asan (1997)'in 'Trakya Bölgesi mısır tarlaları mikrofungus florası üzerinde araştırmalar-1' adlı çalışmasında tespit edilmiştir [82,2,83]. *Aspergillus fischeri*, Öner (1970)'in 'Soil microfungi of Turkey' adlı çalışmasında, Öner (1973)'in 'Atatürk Üniversitesi Erzurum Çiftliği Egerli dağı kuzey yamacı ve Trabzon-Hopa Sahil Şeridi mikrofungus florası ile ilgili bir araştırma' adlı çalışmasında, Çiğden ve Ekmekçi (1994)'nin 'Yamanlar Dağı Güney Yamacı mikrofungus florasının araştırılması' adlı çalışmasında, Kara ve Bolat (2007)'in 'Influence of soil compaction on microfungal community structure in two soil types in Bartın Province, Turkey' adlı çalışmasında tespit edilmiştir [84,12,85,86].

KAYNAKLAR

- [1] A. Asan, *Edirne ili Topraklarından İzole Edilen Aspergillus Mich, Ex Fr. ve Penicillium Link Ex Fr. Türleri Üzerinde Taksonomik ve Ekolojik Arastirmalar*, Yayınlanmamış Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne, (1992).
- [2] Y. Al-Sheboul, *Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Meyve Bahçelerindeki Mikrofungus Florası ile İlgili Bir Araştırma*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova-İzmir, (1990).
- [3] Z. Boynukara, *Van Gölü Çevresi Topraklarının Aspergillus Mich Ex Fr. ve Penicillium Link ex Fr. Türleri Üzerine Taksonomik ve Ekolojik Bir Araştırma*, Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Van, (1998).
- [4] F. Oskay, *Çankırı İli Eldivan İlçesi Karaçam Ormanı Topraklarındaki Fungal Floranın ve In-vitro'da Antagonistik Etkileşimlerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, (2007).
- [5] A. İmalı, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Kampüs Alanı Topraklarının Aspergillus Mich Ex Fr. ve Penicillium Link ex Fr. Florası Üzerine Bir Araştırma*, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Van, (1997).
- [6] A. Asan, S. Ekmekçi, *The Determination of Penicillium and Aspergillus in Edirne Soils and Their Seasonal Distribution*, Turkish Journal of Biology, 18 (4): 291-303, 1994.

- [7] A. Asan, S. Ekmekçi, ***Contribution to The Colonial and Morphological Characteristics of Some Aspergillus Species Isolated From Soil***, Journal of Faculty of Science Ege University, 25 (1): 121-139, (2002).
- [8] A. Asan, S. Sarıca Ökten, B. Şen, ***Airborne and Soilborne Microfungi in the Vicinity Hamitabat Thermic Power Plant in Kırklareli City (Turkey), Their Seasonal Distributions and Relations With Climatological Factors***, Environmental Monitoring and Assessment, 164 (1-4): 221–231, (2010).
- [9] B. G. Özdemir, H. Bıyık, F. Kalyoncu, E. Kalmış, E. Oryaşın, ***Aydın, İzmir ve Manisa İllerinde Endüstriyel Atıksular ile Kirlenmiş Toprakların Mikrofungus Florasının Belirlenmesi***, Ekoloji, Vol. 20, No. 80: 66-73, (2011).
- [10] A. Uztan, ***İzmir İli Topraklarından İzole Edilen Mikrofungusların Taksonomi ve Ekolojileri Üzerinde Araştırmalar***, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Bornova-İzmir, (1981).
- [11] S. Ekmekçi, ***Güney Yarı Ege Bölgesi Topraklarında İzole Edilen Aspergillus (Micheli) Corda ve Penicillium Link Türlerinin Taksonomi, Ekoloji ve Fizyolojileri Üzerinde Bir Araştırma***, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Sistematik Botanik Kürsüsü, Bornova-İzmir, (1974).
- [12] M. Öner, ***Atatürk Üniversitesi Erzurum Çiftliği Eğerli Dağı Kuzey Yamacı ve Trabzon-Hopa Sahil Şeridi Mikrofungus Florası ile İlgili Bir Araştırma***, Atatürk Üniversitesi Yayınları, No:158, Sevinç Matbaası, Ankara, (1973).
- [13] R. Demirel, ***Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Deneme, Üretim ve İyileştirme Tarlalarının Mikrobiyotası ve Mevsimsel Dağılımı***, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, (2003).

- [14] E. A. Paul, ***Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry***, Elseiver Academic Press, (2007).
- [15] S. İlhan, A. Asan, ***Soilborne Fungi in Wheat Fields of Kırka Vicinity (Eskişehir-Turkey)***, Biologia, 56 (4): 363-371, (2001).
- [16] A. Asan, S. Ekmekçi, ***Topraktan İzole Edilen Bazı Aspergillus Türlerinin Kolonial ve Morfolojik Özelliklerine Katkılar***, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, Cilt: 02, Sayı: 01, Sayfa: 12-15, (2004).
- [17] A. Ş. Karaoğlu, S. Ülker, ***Isolation, Identification and Seasonal Distribution of Soilborne Fungi in Tea Growing Areas of Iyidere-Ikizdere Vicinity (Rize-Turkey)***, J. Basic Microbiol., 46 (3), 208-218, (2006).
- [18] R. Eltem, E. Taşkın, S. Pazarbaşı, ***Biodiversity and Flora of Microfungi From Sultana-Type Vineyard Soils in Turkey***, Fresenius Environmental Bulletin, 18 (1): 82-86, (2009).
- [19] A. S. Waksman, ***Principles of Soil Microbiology***, The Williams & Wilkins Company, (1927).
- [20] J. J. Hoorman, ***The Role of Soil Fungus***, The OSU Fact sheet Agriculture and Natural Resources, 1-6, (2011).
- [21] A. Asan, ***Toprak Oluşumunda Biyolojik Faktörler***, Ekoloji Dergisi, 8: 36-38, (1993).
- [22] S. Ekmekçi, ***İzmir Çevresinde Karada, Suda ve Kumda Gelişen Bitki Süksesyon Evrelerinde Bulunan Toprak Mantarlarının Taksonomi ve Ekolojisi ile İlgili Bir Araştırma***, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Botanik Bölümü, Mikrobiyoloji Seksiyonu, Bornova-İzmir, (1981).

- [23] S. P. Banakar, B. Thippeswamy, B. V. Thirumalesh, K. J. Naveenkumar, ***Diversity of Soil Fungi in Dry Deciduous Forest of Bhadra Wildlife Sanctuary, Western Ghats of Southern India***, Journal of Forestry Research, 23(4): 631-640, (2012).
- [24] G. Çolakoğlu, ***İstanbul/Belgrad Ormanı'nda Karaçam (Pinus Nigra Arnold.) Ve Meşe (Quercus spp.) Meşçerelerinin Topraklarındaki Mikrofungus Floraları ve Bunların Karşılaştırılması Üzerine Bir Araştırma***, İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, Seri A, Cilt 51, Sayı 1, 95-116, (2001).
- [25] L. Elíades, M. Cabello, C. Voget, ***Soil Microfungi in Celtis tala and Scutia buxifolia Forests in Eastern Buenos Aires Province (Argentina)***, Journal of Agricultural Technology, 2 (2): 229-249, (2006).
- [26] L. S. Devi, P. Khaund, F. M. W. Nongkhaw, S. R. Joshi, ***Diversity of Culturable Soil Micro-fungi along Altitudinal Gradients of Eastern Himalayas***, Mycobiology, 40 (3): 151-158, (2012).
- [27] E. Brodie, S. Edwards, N. Clipson, ***Soil Fungal Community Structure in a Temperate Upland Grassland Soil***, FEMS Microbiology Ecology, 45 (2): 105-114, (2003).
- [28] Ö. Kara, A. Asan, ***Microfungal Community Structure From Forest Soils in Northern Thrace Region, Turkey***, Annals of Microbiology, 57 (2): 149-155, (2007).
- [29] A. Haliki, ***İzmir İline Bağlı Bergama Yöresindeki Bazı Kültivasyon Alanlarından İzole Edilen Mezofilik, Termofilik ve Termotolerant Funguslar Üzerinde Bir Araştırma***, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova-İzmir, (1992).
- [30] S. İlhan, A. Haliki, M. Ateş, S. Tokur, ***Soil Microfungi of Agricultural Fields Polluted by Lead (Pb²⁺) in Satılmışoğlu Village (Eskişehir-Turkey)***, Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 7 (1): 219-227, (2006).

- [31] İ. Türkekul, *Tokat İli Kazgözü Civarındaki Toprakların Termofil ve Termotolerant Mikrofungus Florası Üzerine Bir Araştırma*, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, (1995).
- [32] R. Demirel, S. İlhan, A. Asan, E. Kınacı, S. Öner, *Microfungi in Cultivated Fields in Eskişehir Province (Turkey)*, J. Basic Microbiol., 45 (4): 279-293, (2005).
- [33] Fracetto et al., *Impact of Amazon Land Use on the Community of Soil Fungi*, Scientia Agricola, 70 (2): 59-67, (2013).
- [34] A. S. Kantarcıoğlu, A. Yücel, *Aspergillus Cinsi Mantarlar ve İnvaziv Aspergilloz: Mikoloji, Patogenez, Laboratuvar Tanımı, Antifungallere Direnç ve Duyarlılık Deneyleri*, Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 34 (3): 140-157, (2003).
- [35] S. Jeffery, C. Gardi, A. Jones, L. Montanarella, L. Marmo, L. Miko, K. Ritz, G. Peres, J. Römbke, W. H. van der Putten (eds.), *European Atlas of Soil Biodiversity, Chapter 3: Ecosystems and Biomes, European Commission, Publications Office of the European Union*, 128 pp. (Luxembourg, 2010).
- [36] F. W. Went, N. Stark, *The Biological and Mechanical Role of Soil Fungi*, PROC. N.A.S., Vol. 60: 497-504, (1968).
- [37] G. Çolakoglu, *Karaçam (Pinus Nigra Arnold.) Meşcerelerinin Topraklarındaki Mikrofungus Florası Üzerinde Araştırmalar*, İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, Seri A, Cilt 52, Sayı 1, 115-124, (2002).
- [38] R. Eltem, T. Aşkun, N. Sarıgül, E. Ö. Taşkın, H. Efendiler, *Colonial and Morphological Characteristics of Some Aspergillus Fr.:Fr. Species Isolated from Vineyards in Manisa and izmir Provinces (Turkey)*, Turkish Journal of Biology, Cilt 28, Sayı 3, 287-298, (2004).

- [39] V. K. Özkan, N. M. Müftüoğlu, H. Göçmen, C. Türkmen, ***The Microfungal Flora of Some Agricultural Areas in Ezine (Çanakkale) Vicinity***, OT Sistematik Botanik Dergisi, Cilt 8, Sayı 1, 119-131, (2001).
- [40] A. Asan ***Tipta Önemli Mantarların Filogenetik ve Sistematigi***, Ek-İnfeksiyon Dergisi, Cilt 21, 21-31, (2007).
- [41] R. Prakash, S. N. Jha, ***Basics of The Genus Aspergillus***, International Journal of Research in Botany, 4 (2): 26-30, (2014).
- [42] M. A. Klich, ***Identification of Common Aspergillus Species***, 1. Baskı. 122 pp., Published by the Centraalbureau voor Schimmelcultures, (Utrecht, The Netherlands, 2002).
- [43] İ. Hasenekoğlu, ***Toprak Mikrofungusları***, Cilt I, Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 689, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Yayınları No: 11, (Erzurum, 1991).
- [44] A. Asan, ***Aspergillus, Penicillium and Related Species Reported from Turkey***, Mycotaxon, 89 (1): 155-157, (2004).
- [45] S. İlhan, R. Demirel, A. Asan, C. Bayçu, E. Kınacı, ***Colonial and Morphological Characteristics of Some Microfungal Species Isolated from Agricultural Soils in Eskişehir Province (Turkey)***, Turkish Journal of Botany, 30 (2): 95-104, (2006).
- [46] Ö. Kara, ***Kuzey Trakya Dağlık Yetiştirme Ortamı Bölgesindeki Meşe, Kayın ve Karaçam Ormanlarındaki Toprak Mikrofungusları***, Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 6 (2): 167-174, (2005).
- [47] G. H. Goldman, S. A. Osmani, ***The Aspergilli Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods***, CRC Press Taylor & Francis Group, (2008).

- [48] K. H. Domsch, W. Gams, T. H. Anderson, **Compendium of Soil Fungi**, Vol. 1, pp. 77-124, Academic Press, (London, 1980).
- [49] S. Sümer, **Genel Mikoloji**, 1. Basım, Nobel Yayın Dağıtım, (Ankara, 2006).
- [50] M. Machida, K. Gomi, **Aspergillus: Molecular Biology and Genomics, Chapter 1: An Overview of The Genus Aspergillus**, Joan W. Bennett, Caister Academic Press, (2010).
- [51] S. A. Waksman, **Soil Microbiology**, John Wiley and Sons Inc., p. 356, (New York, 1952).
- [52] A. Rossman, R. Tulloss, T. Dell, R. G. Thorn, **Protocols for an All Taxa Biodiversity Inventory of Fungi in a Costa Rican Conservation Area**, Parkway Publishers, ISBN 1-887905-05-7, pp. 195, Inc. Boone, (North Caroline, 1998).
- [53] İ. Hasenekoğlu, Y. Sülün, **Erzurum Aşkale Çimento Fabrikasının Kirlettiği Toprakların Mikrofungus Florası Üzerine Bir Araştırma**, Turk. J. of Botany, 15 (1): 20-27, (1990).
- [54] H. Bıyık, B. Törün, Y. Geroğlu, E. Poyrazoğlu Çoban, G. Başbülbul, **Preservation and molecular identification of Aspergillus and Penicilium species with ITS-PCR**, European Journal of Biotechnology and Bioscience, 4 (11): 04-07, (2016).
- [55] E. M. Goltapeh, R. Aggarwal, B. S. Pakdaman, Renu, **Molecular Characterization of Aspergillus Species Using Amplicon Length Polymorphism (ALP) and Universal Rice Primers**, Journal of Agricultural Technology, 3(1): 29-37, (2007).
- [56] T. D. Bruns, T. J. White, J. W. Taylor, **Fungal Molecular Systematics**, Annual Review of Ecology and Systematics, 525-564, (1991).

- [57] L. L. Shi, P. E. Mortimer, J. W. Ferry Slik, X. Ming Zou, J. Xu, Ting Feng, W., Qiao, L., ***Variation in Forest Soil Fungal Diversity Along a Latitudinal Gradient***, Fungal Diversity, 64 (1): 305–315, (2014).
- [58] Samson et al., ***Phylogeny, Identification and Nomenclature of the Genus Aspergillus***, Studies in Mycology, 78: 141–173, (2014).
- [59] V. K. Gupta, ***New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications, Chapter 3: Molecular Evolution of Aspergillus***, Elsevier, 41-51 pp., (2016).
- [60] P. Rodrigues, C. Soares, Z. Kozakiewicz, R. R. M. Paterson, N. Lima, A. Venâncio, ***Identification and Characterization of Aspergillus flavus and Aflatoxins, Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology***, A. Mendez-Vilas Ed., Formatex, p.527-534, (2007).
- [61] M. Ç. Kılıçoğlu, İ. Özkoç, ***Fungal Sistematikteki Moleküler Gelişmeler***, OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 23 (1): 65-72, (2008).
- [62] T. Kiper, A. G. Öztürk, ***Kent Ormanlarının Rekreatyone Kullanımı ve Yerel Halkın Farkındalığı: Edirne Kent (İzzet Arseven) Ormanı Örneği, Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi***, 8 (2): 105-118, (2011).
- [63] www.edirne.bel.tr
- [64] www.edirne.gov.tr
- [65] J. C. Brown, ***Soil Fungi of Some British Sand Dunes in Relation to Soil Type and Successions***, Ecology, 46: 641-664, (1958).
- [66] S. A. Waksman, ***A Method Counting The Numbers of Fungi in The Soil***, J. Bacteriol., 7: 339-341, (1922).

- [67] Cireli ve ark., ***Bitki ekolojisi uygulamaları***, E.Ü. Fen Fak. Yay. 21-25, (1973).
- [68] A. D. Hocking, J. I. Pitt, ***Dichloran-glycerol Medium for Enumeration of Xerophilic Fungi from Low-Moisture Foods***, Applied and Environmental Microbiology, 39: 488-492, (1980).
- [69] M. R. Tansey, M. A. Jack, ***Thermophilic Fungi in Sun-Heated Soils***, Mycologia, 68: 1061-1075, (1976).
- [70] S. Singh, D. K. Sandhu, ***Thermophilous Fungi in Port Blair Sails***, Can. J. Bot., 64, 1018-1026, (1986).
- [71] K. B. Raper, C. Thom, ***A manual of penicillia***, The Williams and Wilkins Company, (Baltimore, 1974).
- [72] K. B. Raper, D. I. Fennell, ***The Genus Aspergillus***, The Williams and Wilkins Company, 686 pp., (Baltimore, USA, 1965).
- [73] Samson et al., ***Food and Indoor Fungi***, CBS KNAW Biodiversity Center, (Utrecht, 2010).
- [74] S. A. Balajee, J. Houbraken, P. E. Verweij, S-B. Hong, T. Yaghuchi, J. Varga, R. A. Samson, ***Aspergillus species identification in the clinical setting***, Studies in Mycology 59: 39-46. (2007).
- [75] A. Katoch, P. Kapoor, ***Recent Concepts in Fungal Taxonomy: A Review***, Research and Reviews: Journal of Agriculture and Allied Sciences, Vol 3, No 2, (2014).
- [76] Seth et al., ***Isolation and Identification of Soil Fungi from Wheat Cultivated Area of Uttar Pradesh***, Journal of Plant Pathology & Microbiology, 7:11, (2016).

- [77] E. E. Butler, M. P. Mann, *Use of cellophane tape for mounting and photographing photopathogenic fungi*, Phytopath., 49, 231-232, (1959).
- [78] W. Games, H. A. Van der Aa, A. J. Van der Plaast-Niterink, R. A. Samson, J. A. Stallpers, *CBS Course of mycology*, Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn, p. 137, (1987).
- [79] Y. Sülün, İ. Hasenekoğlu, *A study on Aspergillus Mich ex Fr. and Penicillium Link ex Gray flora of the soils of Northeast Anatolia, Türkiye*, Turkish Journal of Botany, 17: 49-60, (1993).
- [80] A. Çöl, *Değişik ekolojik koşullarda saksı toprağında bulunan alerjik küf florasının saptanması*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, (2006).
- [81] H. Göçmen, V. K. Özkan, *A research on the microfungal flora of some greenhouse soils in the vicinity of Lapseki Çanakkale, Turkey*, Mycopathologia, 153 (2): 103-112, (2001).
- [82] İ. Bilgin, *Çiçekli köyü (Bornova) ve civarı toprakları mikrofungus florasının bitki süksesyonuna bağlı olarak incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji, İzmir, (1994).
- [83] A. Asan, *Trakya Bölgesi mısır tarlaları mikrofungus florası üzerinde araştırmalar-1*, Turkish Journal of Biology, 21: 89-101, (1997).
- [84] M. Öner, *Soil microfungi of Turkey*, Mycopathol Mycol Appl, 42: 81-87, (1970)
- [85] Ö. Kara, İ. Bolat, *Influence of soil compaction on microfungal community structure in two soil types in Bartın Province, Turkey*, Journal of Basic Microbiology, 47: 394-399, (2007).

[86] N. iğden, S. Ekmekçi, *Yamanlar Dağı Güney Yamacı mikrofungus florasının araştırılması*, XII. Ulusal Biyoloji Kongresi. Botanik seksiyonu posterler kitabı, Cilt II, 137-140, (Edirne, 1994).



ÖZGEÇMİŞ

02.06.1990 tarihinde Lüleburgaz/Kırklareli’nde doğdum. Lise öğrenimimi Edirne Anadolu Lisesi’nde 2008 yılında tamamladım. Lisans öğrenimimi Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde 2013 yılında tamamladım. 2013 yılı güz döneminde Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Programına başladım.

