T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAF KÜLTÜR OLARAK STOKLANMIŞ BAZI MİKROFUNGUSLARIN ITS, β-TUBULİN VE AKTİN GEN DİZİLERİNE GÖRE MOLEKÜLER TANISI

ELÇİN TÜNEY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: PROF.DR.AHMET ASAN

EDİRNE-2016

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

.....

Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

.....

Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca 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/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Prof. Dr. Ahmet ASAN	.....
Doç. Dr. Burhan ŞEN	.....
Yrd. Doç Dr. İskender KARALTI	.....

Tarih: 23/02/2016

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZ 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.



23/02/2016

ELÇİN TÜNEY

Yüksek Lisans Tezi
Saf Kültür Olarak Stoklanmış Bazı Mikrofungusların ITS, B-Tubulin ve Actin Gen Dizilerine Göre Moleküler Tanısı
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, laboratuvar ortamında stok olarak saf kültür halinde saklanan bununla beraber; cins veya tür düzeyinde morfolojik olarak teşhis edilemeyen bazı mikrofunguslar moleküler olarak tanımlanmıştır. Çalışmada kullanılan mikrofunguslar daha önce tür düzeyinde morfolojik-koloniyal olarak tanımlanamamış izolatlardan oluşmuştur. Örnekler, MEA besiyerinde inoküle edilip 25 ºC'de 7 gün inkübe edilmiştir. Besiyerinden alınan numuneler analiz yapılana kadar -20ºC'de saklanmıştır. DNA izolasyonu için funguslara özel, kimyasal (SDS ve CTAB), biyokimyasal (proteinazK vb.) ve fiziksel (0.1 mm çaplı boncuklar) parçalama yöntemlerini bir arada kullanan DNA izolasyon kitleri kullanılmıştır. Çeşitlilik çalışmaları, PCR tabanlı fungal çeşitlilik çalışma kitleri ile yapılmıştır. Tüm izolatlar için ITS gen dizisine bakılmış, cinse bağlı olarak β-tubulin ve Actin gen dizilimlerini hedeflenmiştir. PCR ile çoğaltılan DNA dizilimleri "Sanger Sequencing Yöntemi" ile dizilenmiştir. Elde edilen dizilerin hangi organizmalara ait olduğu NCBI ve EBI gibi uluslararası nükleik asit data bankalarında mevcut dizilimlerle, elde edilen filotiplerin dizilimleri karşılaştırılarak belirlenmiştir. Toplam 61 mikrofungus örneği, cins düzeyinde 3 gruba (A,B,C) ayrılmış olup, gruplara göre ilgili gen bölgeleri moleküler teşhis için analiz edilmiştir. 3 grup için hem ilgili gen bölgeleri hem de ITS bölgeleri baz alınarak yapılan moleküler analizler sonucunda, 6 örneğin tür teşhisi yapılamamış, 56 tür moleküler düzeyde teşhis edilmiştir.

Yıl : 2016
Sayfa Sayısı : 49
Anahtar Kelimeler : β-tubulin gen dizisi, Actin gen dizisi, ITS gen dizisi, PCR, sekans yöntemleri, mikrofungusların moleküler teşhisi

Master's Thesis

Molecular (Based) Identification of stocked some microfungi as pure culture according to ITS, β-tubulin and Actin Genes

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biology

ABSTRACT

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

based on the results of molecular analyzes of ITS , 6 species diagnosis has not been made , for example , 56 species have been identified at the molecular level .

Year : 2016
Number of Pages : 49
Keywords : β-tubulin region, Actin region, ITS region, PCR, sequencing methods, identification of microfungi

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, çalışmaların boyunca her daim bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen, eğitimim süresince göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Ahmet ASAN'a (Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü),

Çalışmalarım süresince, uzaklık gözetmeksizin Edirne ve İstanbul'da, laboratuvar veya laboratuvar dışında hiçbir zaman beni yalnız bırakmayan, her daim destek olan, bilgisi ve tecrübesini benden esirgemeyen, sorunlara beraber çözüm getirmeye çalıştığımız değerli hocam, Doç. Dr. Burhan ŞEN'e (Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü),

Laboratuvar çalışmalarım boyunca hiç bir desteğini ve yardımını benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Suzan SARICA ÖKTEN'e (Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Ecz. Teknolojisi Bölümü),

Tüm tez çalışmam boyunca, ilgisini, özverisini her daim gösteren, tecrübesiyle beni her zaman yönlendiren, gerektiğinde benimle birlikte saatlerce çalışan arkadaşım Soner ÖZDİL'e,

Moleküler çalışmalarımda bana yardımcı olan Sayın Araş. Gör. Dr. Mustafa KOLUKIRIK (İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) ve Sayın Canan Ketre'ye,

Hayatımın her anında yanımda olarak beni desteleyen, sabırlarını ve hoşgörülerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük pay sahibi olan kıymetli AİLEME,

Bu yüksek lisans çalışması 2012/58 kod nolu Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi ile desteklendiğinden dolayı,

en içten teşekkürlerimi sunarım.

Elçin TÜNEY

İÇİNDEKİLER

DOĞRULUK BEYANI ..... **I**
ÖZET ..... **II**
ABSTRACT ..... **IV**
TEŞEKKÜR ..... **VI**
İÇİNDEKİLER ..... **VII**
SİMGELER ve KISALTMALAR ..... **IX**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **XI**
TABLO LİSTESİ ..... **XII**
BÖLÜM 1
1. GİRİŞ **1**
BÖLÜM 2
2. GENEL BİLGİLER **2**
2.1. Fungusların Genel Özellikleri ve Genetik Teşhisi **2**
2.1.1. Fungus (Çoğul=Fungi) **2**
2.1.2. Fungusların Morfolojisi **2**
2.1.3. Fungus Metabolizması **4**
2.1.4. Fungusların Üremesi **4**
2.1.5. Fungusların Habitatı ve Yayılmaları **5**
2.1.6. Fungusların Genomiği **9**
2.2. Fungal Teşhisde Moleküler Çalışmaların Önemi **10**
2.2.1. PCR **10**
2.2.2. Genomik DNA nın Spesifik Bir Parçasının Doğrudan İzolasyonu **11**
2.2.3. Fungusların Moleküler Filogenetik Analizi **13**
2.2.3.1. Filogenetik Belirleyiciler **14**
2.2.3.2. Fungusların Dizi Analizine Dayalı Tanımlanması ve Sınıflandırılması **16**
2.2.3.3. Genetik Sınıflama Yaklaşımları **18**
2.2.3.4. Fungal Dizi Analizi Verilerinin Uygulama Alanları **19**
2.2.3.5. Taksonomik Yaklaşımlar **20**
2.2.3.5.1. Blast **20**
2.3.3.5.2. Fasta **21**

2.2.3.5.3. Çoklu Dizi Karşılaştırması **21**
2.3.3.5.4. Genomik ve Fungal Yaşam Ağacı **22**
2.2.3.5.5. Online Fungal Genomik Kaynaklar **24**
BÖLÜM 3
3. MATERYAL VE METOD **25**
3.1. Materyal **25**
3.2. Metod **25**
3.2.1. Mikrofungusların Moleküler Tanısı **25**
3.2.1.1. DNA İzolasyonu **25**
3.2.1.2. Gerçek Zamanlı (Real Time) PCR (Q-PCR) **26**
3.2.1.3. Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz **27**
BÖLÜM 4
4. SONUÇLAR **29**
BÖLÜM 5
5. TARTIŞMA **38**
KAYNAKLAR **42**
ÖZGEÇMİŞ **49**

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFLP : Amplifiye Olmuş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi

bp : Base pair

CFU : Colony-forming Unit (koloni oluşturan birim)

CREA : Creatine Sucrose Agar

CYA : Czapek Yeast Agar

$CY_{20}S$: Czapek Agar with 20% Sucrose

CZ : Czapek Dox Agar

DG-18 : Dichloran % 18 Glycerol Agar

DNA : Deoksiribonükleik Asit

$G_{25}N$: % 25 Gliserol Nitrat Agar

IGS : Intergenic Spacer

ITS : Internal Transcribed Spacer

L : Litre

LSU : Büyük Alt Birim

M : Molar

MEA : Malt Ekstrat Agar

mg : Miligram

MI : Maximum Identification

µL : Mikrolitre

mM : Mikromolar

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PDA : Patates Dekstroz Agar

RAPD : Rastgele Amplifiye Olmuş Polimorfik DNA

rDNA : Ribozomal DNA

RFLP : Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

rpm : Rotatory per minute (Dakikada devir sayısı)

RNA : Ribonükleik Asit

rRNA : Ribozomal RNA

SSU : Küçük Alt Birim

YES : Yeast Ekstrat Agar

v/v : Volume/volume

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Fungal tanıda kullanılan hedef gen bölgelerin şematize edilişi **13**

Şekil 4.1. Actin gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Alternaria* cinsine ait türlerin Neighboor-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları **32**

Şekil 4.2. ITS gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Alternaria* cinsine ait türlerin Neighboor-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları **32**

Şekil 4.3. Actin gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Cladosporium* cinsine ait türlerin Neighboor-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları **33**

Şekil 4.4. ITS gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Cladosporium* cinsine ait türlerin Neighboor-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları **34**

Şekil 4.5. ITS gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Aspergillus* cinsine ait türlerin Neighboor-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları **35**

Şekil 4.6. β-tubulin gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Penicillium* cinsine ait türlerin Neighboor-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları **36**

Şekil 4.7. ITS gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Penicillium* cinsine ait tür lerin Neighboor-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları **37**

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.2. PCR Aşamaları..... **28**

Tablo 4.1. Mikrofungusların Actin ve ITS gen bölgelerine göre karşılaştırılması..... **30**

Tablo 4.2. Mikrofungusların β-tubulin ve ITS gen bölgelerine göre karşılaştırılması... **31**

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Organizmaların genetik manipülasyonu her bir bireydeki özelliklerin yeni kombinasyonlar oluşturma yeteneğini ifade eder. Bu süreç tarihsel olarak evcil hayvanlar, ekonomik yönden önemli bitkiler ve endüstriyel öneme sahip mantarların neslinin devamı için insanlığa olanak sağlayan önemli bir insan faaliyetidir [1].

Genetik manipülasyon popülasyon içindeki ilginç özelliklere sahip nadir bireylerin tanımlanması ve seçilmesi kadar kolay olabilir fakat bireysel varyasyon oranını arttırma kabiliyeti tarafından çok daha güçlü yapılabilir ve farklı bireylerdeki özellikler ile birleştirildiği zaman çok daha güçlü olur. Mutajenez ve rekombinasyon, genetik manipülasyon süreçlerini desteklemektedir [1,2].

Mantarlar bilimsel genetik çalışmaları yapılan ilk organizmalar arasındadır. Bezelye ve meyve sinekleri genler ve genetik bağlar için ilk kanıtları sağlamış olmasına rağmen, organizmaların genetik yapısının bazı öncül temel kavramları mantar sistemleri ile yapılan öncü çalışmalardan gelmektedir [2].

Günümüzde, geniş yelpazede, yarı endüstriyel uluslararası çabalar mantar genetik çalışmaları üzerinde büyük etkiye sahip olmaktadır. Bu çabalar genomik biliminin gelişiminde öncü olmaktadır [3].

Yapılan bu çalışmada, laboratuvar ortamında saf kültür olarak stoklanmış bazı mikrofungusların ITS, β-tubulin ve Actin gen dizilerine göre moleküler tanısının yapılması amaçlanmıştır.

.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Fungusların Genel Özellikleri ve Genetik Teşhisi

2.1.1. Fungus (Çoğul=Fungi)

Funguslar ökaryotik organizmalardır (nukleus ve membran ile çevrilenmiş organeller içerir). Klorofilleri bulunmaz ve saprofit, parazit veya kommensal olabilirler. Geleneksel olarak funguslar, bitkiler ile yakın ilişkili oldukları düşünülür, buna karşın fiogenetik olarak bitkilerden çok hayvanlara yakındırlar. Funguslar her yerde bulunabilir ve yararlı (biyoteknolojide kullanışlı), zararlı (hastalığa sebep olan) veya mutalistliktirler (bitkiler ile simbiyont yaşayan) [1]. Funguslar genelde tatlı suda, karada ve toprakta yaşarlar; denizde ve havada bulunan az sayıda fungus türü vardır. Bazıları alkol fermantasyonu yapar, bazıları ise hem ilaç ham maddelerini ve antibiyotik maddeleri oluşturur. Bir kısmı zehirli olduğu halde bazı funguslar yenilebilmektedir, önemli besin ve lezzet kaynağı olarak tüketilmektedir. Ascomycetes ve Basidiomycetes sınıflarına mensup bazı funguslar, mavi-yeşil ve yeşil algler ile ortak yaşayarak "likenleri" oluştururlar; bazıları da bitki kökleri ile başka bir ortak yaşama biçimi olan "mikoriza" oluşumunu gerçekleştirirler [4].

2.1.2. Fungusların Morfolojisi

Mantarlar ve küfler, funguslar içinde kabul edilmektedir, fakat bunların morfolojileri farklıdır. Tek maya hücreleri, genellikle bakteri hücrelerinden büyüktür. Mayalar 1-5 mikron ve 5-30 mikron veya daha fazla uzunluktadırlar. Bunlar genellikle ovaldir fakat bazıları uzun veya küresel olabilir. Her tür karakteristik bir şekile sahiptir; fakat, saf kültürlerde hücrelerin ölçü ve şekillerinde önemli farklılıklar olmaktadır. Mayalarda flagella yoktur. Bir agar besiyeri üzerinde düz, bakterilere benzeyen parlak koloniler oluştururlar. Bu koloniler yayılma, taşkınlık veya küfler tarafından oluşturulan

filamentöz kolonilerden oldukça farklıdır. Tek hücreli mayalara karşın, düşük büyüme altında filamentlere benzer olarak görülen küfler, çok hücreli organizmalardır. Yüksek büyütmelerde küfler, birçok kısımlarıyla küçük bir orman gibi görülebilmektedir. Bir küf, mycelliumu kapsayan thallus ve dormant sporlardan oluşmuştur [3].

Funguslar, klorofil içermediklerinden fotosentez yapamazlar. Parazit, saprofit ve kommensal olarak yaşayabilirler. İnsanlar için yararlı ve zararlı faaliyetleri mevcuttur. İplik şeklinde yapılardan oluşmuşlardır ve buna hif denir. Hifler septalı veya septasız olabilir.

Bir hifin çapı 5-10 mikron olabilir. Hiflerin tümüne birden misel denir. Vejetatif yapının tümüne birden tallus denir. Ancak misel terimi daha çok tercih edilir [5].

Besinlerini bitkilerden emeç yardımıyla alırlar. Ancak hayvanlar ve yapay ortamlar üzerinde yaşarken emeç oluşturmazlar. Funguslarda misellerin oluşturduğu dokuya plektenkima denir. Hücre etrafında hücre çeperi vardır. Çeperin yapısı selüloz kitin veya her ikisinin karışı olabilir. Gelişmiş türlerde çeper kitin yapısındadır. Hücreler içinde koful gayet iyi görünür ve hücre yaşlandıkça kofulların miktarı artar. Yedek besinler glikojen ve lipid olarak depo edilir. Mitoz bölünme esnasında nüklear membran ve nukleolus kaybolmaz; ancak mayoz bölünmede bu iki yapı kaybolur. Metafaz safhasında kromozomlar ekvatorial zemin üzerinde düzenli olarak yer almazlar. Bölünme telofaza ulaşınca, nukleus fıstık şeklinde bir yapı almakta, sonrada ikiye bölünmektedir. Bölünme sonucu görülen nukleusların içinde tipik nukleolus vardır. Nukleolus mitoz esnasında kaybolmadığına göre büyük olasılıkla bu organel bir noktada ikiye bölünmekte ve biri bir nukleusa, diğeri de diğer nukleusa gitmektedir.

Funguslarda hücre duvarları normalde selülozun mikrofibrilleri ya da kitin ya da bu biyokimyasal maddelerin bileşiminden oluşmuştur. Mayaları içeren birçok fungus, farklı biyokimyasal özellikler taşıyan hücre duvarına sahiptirler. Fungal hücre duvarının kompozisyonu, çevre şartlarına göre değişebilecek özelliktedir. Yapışkan küfler gibi bazı fungusların hücre duvarları yoktur. Fungal hücre duvarlarının biyokimyasal kompozisyonu, taksonomik ilişkilerin ortaya çıkarılmasında kullanılan önemli bir kriterdir [2,5,6]. Bu komponentler bazen birlikte de olabilmektedirler. Örneğin; Basidiomycetes ve Chytridiomycetesler de kitin+glukan; Zygomyceteslerde, kitin+ kitozan; Ascomyceteslerde kitin + glukan; Mayalarda mannan + glukan, gibi.

2.1.3. Fungus Metabolizması

Funguslar heterotroftur. Saprofitik olanlar, karbon kaynağı olarak ölü organik maddeleri kullanırlar; biyotrof olanlar (parazitik veya simbiyotikler) canlı organizmaya konak olarak gereksinim duyarlar. Bazı fungusların hem saprofitik hem biyotrofik formları vardır. Pek az istisna dışında, funguslar zorunlu aeroptur. Pek çok tür, çok basit besiyerlerinde bile üreyebilir. Termofil, psikrofil, asidofil, halofilik türler de vardır. Funguslar, bitki ve hayvan kalıntılarını parçalayarak yeniden kullanıma sundukları için önemli ekolojik rollere sahiptir [2]. Fungusların çok çeşitli metabolik etkinliklerinden besin endüstrisinde (ekmek, şarap, bira, peynir, tek hücre proteini üretimi) ve ilaç endüstrisinde (antibiyotik, enzim, sitrik asit vs. üretimi) yararlanılır. Bazı fungusların metabolik etkinlikleri zararlara da neden olabilir. Kontamine ettikleri besin maddeleri, tahta, tekstil ürünleri zarar görürler, tahrip olurlar ve faydalı bitkilerde ortaya çıkan hastalıklar başta olmak üzere pek çok bitki hastalığından sorumludurlar.

2.1.4. Fungusların Üremesi

Eşeysiz Üreme: Burada söz konusu olan hifler ve mayaların vejetatif çoğalması ve eşeysiz sporlarla çoğalmalarıdır. Hifler, hücre duvarının özellikle esnek olduğu uç kısmın hemen arasındaki bölgeden uzarlar. Kendilerinde, tekrar dallanabilen yan hifler şeklinde gelişen yanal büyümeler de olabilir. Eşeysiz sporlarla çoğalmada, eşeysiz sporlar olarak adlandırılan belirli yayılma formları oluşur. Dış ortam koşullarına karşı hayli dirençli olan bu yapılar mantarların doğada yayılmasını kolaylaştırırlar. İnsan dokularında parazit yaşayan fungus türleri çok ender olarak eşeysiz spor oluştururlar. Kültürde ise bu türler eşeysiz spor oluştururlar. Bu formlar fungusların identifikasyonunda da önem taşırlar.

Eşeyli üreme: Funguslarda eşeyli üreme, prensip olarak, yüksek ökaryotlardakiyle aynıdır. İki haploid bireyin nukleuslarının füzyonu sonucunda diploid bir zigot oluşur . Eşeyli sporlar ; Zigospor, askospor, basidyospordur. İnsan dokularında parazit olarak yaşayan türlerde eşeyli sporlar çok ender olarak gelişir.

Pek çok patojen fungusda eşeyli üremeye ait yapılar ya bilinmemektedir veya hiç bulunmaz. Bu tip mantarlar **Fungi imperfecti** veya **Deuteromycetes** olarak adlandırılırlar [3].

2.1.5 Fungusların Habitatı ve Yayılmaları

Biyosferdeki her büyük bölüm sayısız habitatlara bölünmüştür. Bir habitat bir organizmanın bulunabildiği fiziksel lokasyondur. Habitat, ekolojik niş olarak bilinen geniş bir kavramın kompanentidir.

Ekolojik niş, sadece organizmanın yaşadığı bir ortam değil, aynı zamanda oradaki faaliyetleri de kapsar; ekosistemdeki organizmanın fonksiyonel rolünü açıklayan bir kavramdır. Bir habitatın fiziksel ve kimyasal özellikleri, orada bulunan mikroorganizmaların büyüme, aktivite diğer organizmalarla ve çevreyle olan etkileşimler canlılıklarını etkiler. Bu parametreler, habitatta bulunan mikroorganizmaların nişini saptar [5,6].

Funguslar çeşitli şekillerde yayılabilirler. Bunlar misel yayılması, spor yayılması, suda yayılma, havada yayılma, hayvanlar ve insanların etkileriyle yayılma şeklinde özetlenebilir.

Fungus türlerinin kesin sayısı bilinmemektedir, fakat bu sayı yaklaşık 1,5 milyon olarak tahmin edilmektedir. Filogenetik analizler; **Chytridiomycota**, **Zygomycota**, **Ascomycota** ve **Basidiomycota** olarak fungusları 4 farklı filuma ayrıldığını göstermiştir.

Chytridiomycota, zoospor üreten tek mantar filumudur ve dağılımları için suya gereksinim duyarlar. Bunlar ilkel organizma grubudur ve tüm ökaryotların son yaygın atalarından ayrılan ilk mantarlardan çok az bir farklılık gösterdikleri düşünülmektedir.

Zygomycota, eşeyli ürer ve zygospor adı verilen kalın duvarlı eşeyli sporlar oluşturur. Zygomycetes morfolojik olarak ayrılır ve tanımlanan tüm mantar türlerinin %1 inin oluştururlar. En iyi bilinenlerden bazısı ekmek küfü ve kök çürüklüğüne neden olan sırasıyla *Mucor* sp. ve *Rhizopus* sp. türlerini içermektedir [6,7].

Ascomycota, bilinen tüm fungus türlerinin yaklaşık %65 ini kapsayan en geniş fungus filumlarından birisidir. Bu filumun ayırt edici özelliği askuslarıdır. Askuslar, mayozu takiben 1 mitoz görülmesi ile üretilen sekiz veya katları askosporu bulunduran eşeyli sporları üreten hücrelerdir. Askosporlar kalın duvara sahiptirler, bundan dolayı, değişen koşullara dirençlidirler fakat uygun koşullar altında bu sporlar haploid mantarı üretirler. Sacchromycotina, Pezizomycotina ve Taphrinomycotina olmak üzere Ascomycotina 3 alt filuma sahip olduğu tanımlanmıştır. Sacchromycotina askoma olmadığından aski çıplaktır ve *S. cerevisiae* ve *Candida albicans* gibi önemli patojenleri

türleri içerir. Pezizomycotine nın üyeleri *Aspergillus fumigatus* ve *Penicillium chrysogenum* gibi türlerinde içinde olduğu tüm filamentli mantarları içermektedir. Taphrinomycotina Filumu *Schizosaccharomyces pombe* formunda bölünen mayaların içinde olduğu çeşitli morfolojileri içermektedir.
Bu funguslar, dünyanın her tarafına yayılmış durumdadır; karbonhidrat bakımından zengin meyve, meyve suyu, sebze, rutubetli ekmek gibi ortamlarda saprofittirler. Depolanmış yiyecek maddeleri, toprak, hayvan dışkıları, keratinli maddeler (saç, tırnak, boynuz), reçel, jelatinli maddeler ve başka organik maddeler üzerinde saprofit yaşarlar. Bazı türleri bitki, hayvan ve insanda parazit olarak hastalık etmenleridir [3,5,8].

Aspergillus spp.

Genel özellikleri: Bu cinse ait funguslar, saprofittir bazı türleri ise bitki, hayvan ve insanda parazittir. Hifler ince çeperli, bölmeli ve çok çekirdeklidir. Karbonhidrat bakımından zengin ekmek, şekerli meyve sularında ve peynirde yaşar ve miseli gençken beyazdır. Bazı türleri kullanılarak organik asit, alkol ve antibiyotik elde edilir. Tür teşhisi, meydana getirilen koloninin rengine göre yapılır [3].

Genel olarak *Aspergillus* türlerinin morfolojik olarak teşhisi için, Czapek-Dox Agar'da oluşturduları koloni karakterizasyonuna göre sınıflandırma yapılır [8].

Czapek besin ortamında siyah, kahverengi, sarı, yeşil vb gibi koloni'ler elde edilir [3].

Ekoloji: *Aspergillus*'lar yeryüzünde Antarktika dahil her yerde, toprakta ve özellikle çürüyen organik maddelerde yaygındır. Sahip oldukları zengin enzim sistemleriyle hemen tüm organik materyalleri ayrıştırarak kullanabildikleri ve diğer mikroorganizmalar için çok düşük olan nem yüzeylerinde bile gelişebildikleri için, depolanmış tahıl ve tohumlarda, unlarda, deri ve tekstil ürünlerine kadar çeşitli gıda ve eşyalarda; ayrıca dış ortamda ve hastane ve evlerin iç ortamlarındaki havada asılı olarak bol bulunurlar [9].

Yurdumuzda çeşitli bölgelerde iç ve dış ortam havasının fungus florasına ilişkin olarak yapılmış çalışmalar yayınlanmıştır. İstanbul'da 110 evin iç ortam havasındaki alerjen küf florasının araştırıldığı bir çalışmada elde edilen 748 küf kökeninin 115'inin Aspergillus cinsine ait türlerden olduğu yazılmıştır [10].

İstanbul Topkapı Sarayı Müzesi Kütüphane ve Bölümleri'ne ait mekanlarda bir yıl boyunca aylık periyotlarla havada bulunan sporlardan "Yerçekimine Dayalı Petri Plak Metodu" ile alınan örneklerden üretilen funguslar arasında hakim flora tipinin *Penicillium* sp (%32.0) ve *Aspergillus* sp. (%24.5) olduğu bildirilmiştir [11].

Bursa'da ev dışı havasının *Penicillium* ve *Aspergillus* mikrobiotasının araştırıldığı bir çalışmada hava örneklerden üretilen tüm mantarlar içerisinde bu cinsin %3.7 oranında bulunduğu bildirilmiştir [12].

En yaygın türleri; *Aspergillus glaucus*, *A. flavus*, *A.fumigatus* ve *A.niger*'dir, son üçü insanda ve hayvanlarda "aspergilloz" hastalığı yaratmaktadır. *Aspergillus flavus* türünün "aflatoksin" isimli zehirli maddesi yerfıstığı (*Arachis hypogaea*) ve kabuğu soyulmuş fındık (*Corylus sp*) gibi yağlı yemiş materyalinde birikmektedir. *Aspergillus niger* mantarı, rutubetli ve havasız yerlerde depolanmış olan sarımsak (*Allium sativum*), soğan(*Allium cepa*), depodaki portakal (*Citrus aurantium*), darı (*Panicium sp.*), kuru erik (*Prunus domestica*), nohut (*Cicer arietinium*) gibi ürünlerde; toprakda çürümüş bitki kalıntılarında; "siyah çürüklük" hastalıklarına sebep olur.

Penicillium spp.

Genel Özellikleri: Bu cinse mensup türlerde, hiflerin ucunda konidiumlar oluşur. Şekerli ortamlarda, çürümekte olan sebzelerde ve meyvelerde, ette, rutubetli olan çok çeşitli bitki ve hayvan kökenli maddelerde saprofit olarak yaşar, yeşil küf veya mavi küf yaratır, çoğu türler ekonomi kaybı yaratır, birkaçı da "camembert" ve "roquefort" peynirlerinin olgunlaşması ile ilgili olarak ekonomi faydası sağlarlar. Çoğu tür depolanmış meyvelerin bozulmasına sebep olur [3]. Özellikle bu türlerden antibiyotik elde edilir.

Ekoloji: Karasal yaşama uyum sağlamış saprofit ya da parazit olan bu mantarlar, toprakta, toprak altında, hayvan gübreleri üzerinde, yiyecek maddelerinde, tüy, boynuz ve kıl gibi keratin maddeler üzerinde saprofit olarak yaşarlar. Parazit olanlar ise; bitkiler, hayvanlar ve hatta insanlar üzerinde hastalık yaparlar. İnsanlar üzerinde parazit olan türler genellikle cilt ve solunum yolları rahatsızlıkları meydana getirmektedirler [13].

Basidiomycota

Bilinen mantar türlerinin yaklaşık %35 ini oluştururlar. Basidiomycetes üyeleri şapkalı mantarlar ve puffballs'ları da içeren ayrıntılı "fruit bodies" oluşturmaları ile anında tanımlanabilir. En iyi bilinen Basidiomycota şapkalı mantarı *Agaricus bisporus* ve *Pleurotus ostreatus* içerir. Basidiomycota' nın belli üyelerinin ligninin parçalama yeteneğinde olması çok az mikropta bu yeteneğin olmasından dolayı önemlidir. Lignini parçalayabilen funguslar, biyoteknolojik açıdan ilgi çeker çünkü ayık ürünleri temizleme potansiyelleri vardır.

Deuteromycota (Fungi Imperfecti)

Genel Özellikleri: Bu bölüme giren fungusların sadece eşeysiz üreme formu (anamorfları) bilinmektedir. Morfolojik özellikleri; hif, bölme, bölmedeki gözenek, kimyasal özellikleri, hücre çeperi yapısı, DNA yapısı bakımından Ascomycota ve Basidiomycota bölümleri mensuplarına benzerleri olmakla beraber tek farkları eşeyli üreme yapmamalarıdır veya bunların eşeysiz safhaları hakkında bilgilerimizin mevcut olup eşeyli safhaları hakkında henüz bilgi sahibi olmamamızdır. Bu bölüm yapay bir sistemdir, çünkü eşeysiz üreme yapılarına göre kurulmuştur. Önceleri bilgi eksikliğinden dolayı bu bölüme sokulan fungus türlerinin bazılarının eşeyli üreme formu daha sonra keşfedilmiştir, bunların bazıları ait olduğu bölüme sokulmuş bazıları da Fungi Imperfecti bölümünde tutulmaya devam edilmektedir. Çünkü fungusun eşeysiz safhası daha ekonomi bakımından önemli olabilmektedir [3,5,6].

Bu bölüme giren türlerin anamorfu yani eşeysiz üremesi "konidiospor", "klamidospor" ve "sklerotium" gibi spor ve misel oluşumları ile yürütülmektedir. Telemorfunu yeni eşeyli üreme kabiliyetini kaybetmiş gibi gözüken cinslerde ve türlerde, "çapraz döllenme" yani "gen değiş tokuşu" başka düzenekler ile gerçekleşmektedir; bu düzenekler arasında; "heterokaryoz" yani farklı çekirdekli miseller arasında " birleşme (anastomozi kojugasyon)" olayı ile çekirdek değişimi ve "benzer üreme (paraseksüellik) olayı" yani geçici bir diploid safha ile tekrar birleşme (rekombinasyon) bulunmaktadır. Bun mantarlar genelde konidiospor ile üremektedir.

Ekoloji: Bu mantarlar arasında saprofit ve parazit türler vardır. Parazit olanlar arasında insanda ve hayvanlarda deri hastalıklarına (dermatoz) ve diğer başka hastalıklara (mikoz) sebep olanlar vardır. Depolanmış ürünlerin bozulmasına sebep

olanlar kadar tarım ve orman bitkilerinde hastalık yaratan türler de büyük ekonomi kayıplarına sebep olmaktadır. Toprak mantarlarının büyük çoğunluğu Fungi Imperfecti bölümüne mensuptur. Bunlar çoğunlukla saprofittir, humus oluşması ve organik maddelerin mineralleşmesinde görev yaparlar [3,6].

2.1.6 Fungusların Genomiği

Genomik, bir organizmanın tüm genom dizisinin çalışılması olarak tanımlanır. İlk tüm (nonviral) genomu dizilenen 1995 yılında bir bakteri olan *Haemophilus influenzae*'dir. Günümüzde, 1300 bakteriyal genomdan fazlası sekanslanmıştır.

Bira mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) tüm genomu tamamıyla sekanslanan 1996 yıllarında yayınlanmış ilk ökaryottur. O zamandan beri, 250 ökaryotik genomdan fazlası insan genomu da dahil (2001 yıllarında) tamamlanmıştır. Göreceli olarak küçük genom büyüklüğünde olmaları, insan/bitki patojenleri olarak rol oynamaları ve biyoteknoloji alanındaki önemlerinden dolayı, 102 fungusa ait genom günümüze kadar sekanslanmış, tüm mevcut ökaryotik genomik verinin yaklaşık %40'nı oluşturmaktadır [1].

Bazı türler, örneğin *S.cerevisiae* çok farklı ırklarının dizi analizine sahiptir. Günümüzde, sekanslanması yapılmış fungus türlerinin büyük çoğunluğu (%78) Ascomycota filumuna aittir dahası, göze çarpar şekilde bu funguslar insana patojen türlere yatkındır. Yeni dizileme teknolojileri ile ilişkili yeni gelişmeler ve düşük maliyet son yıllarda evrimsel, çevresel ve biyoteknolojik olarak ilgi çeken organizmaları ulaşılabilir hale getirmiştir.

Bu genomik verilerin zenginliği ökaryotik genomların ön saflarında fungus alemini çıkarmaktadır. Bazı türlerin dizi analizi yakın ilişili olsa da, diğerleri 1 milyar sene önce ayrılmıştır. Bu fungusların kullanılarak evrimsel mekanizmalarının ökaryotik genom yapısı, organizasyonu ve içeriği ile ilişkili hakkında çalışılmasına olanak sağlamaktadır. Dahası, iki veya daha fazla birbirine yakın akraba patojenik ve patojenik olmayan türler arasında karşılaştırılmalı genomik olarak da isimlendirilen direkt karşılaştırma yapılması metabolik yolakların ve virulans ile ilişkili genlerin yerine saptanabilmesine izin vermektedir.

Günümüze kadar dizi analizi tamamlanmış fungusların büyük çoğunluğu önemli biyolojik patojenler (*C.albicans, A.fumigatus* ve *Cryptococcus neoformans*) ya da

biracılıkta/ fermentasyonda görev alan yardımcı türler (*S.cerevisiae* ve *Aspergillus niger*) dir. Bu yüzden dizilenen türlerin filogenetik dağılımı açısından kasıtsız bir durum vardır. Dizi maliyetinin düşmesi ve kısmen küçük genom boyutları nedeniyle tüm fungal filumlardan birkaç yıl içinde fungal evrim ve patojenite hakkında pek çok soruya yönlendirecektir ve şüphesiz tıbbi ve biyoteknolojik potansiyele sahip yeni proteinlerin keşfinde yardımcı olacaktır [1,2].

2.2. Fungal Teşhisde Moleküler Çalışmaların Önemi

Moleküler tanımlama yöntemleri, gelişmekte olan teknolojinin mikrobiyoloji alanında sunduğu en önemli yeniliklerden biridir [14]. Son on yılda klasik yöntemlerin yanı sıra birkaç moleküler tekniğin pek çok avantajla beraber gelişmiş ve yeniliklere yol açmıştır [15]. Bunların içinde ise en çok kullanılanları "PCR" ve "Filogenetik Analizler" dir [16-18].

Filamentli funguslar yıllardan beri morfolojik olarak sınıflandırılmaktadır. Ekolojik türler çoğu zaman özel bir nişe uyumuna göre veya bitki patolojisinde bazı türler konak hastalık semptomlarına göre ve konak ile bağlantılı olarak tanılanmıştır. Morfolojik, ekolojik ve patolojik türler fonksiyonel ve yapısal yetenekleri ile ilgili fenotipik karakteristiklerine göre tanılanmıştır. Tüm bu sorunların düzeltilme stratejilerinde rRNA genlerinin karşılaştırılmalı dizi analizlerinin yapılmasının gerekliliği ortadadır [19]. Sonuç olarak klasik yöntemler ile tanımlamalarda yaşanılan problemler, günümüzde geliştirilmekte olan çeşitli moleküler yöntemler ile çözülmeye çalışılmaktadır. Bu yöntemler sayesinde gerek bilimsel, gerek endüstriyel, gerek toplum sağlığı açısından önemli olacak gelişmeler söz konusu olabileceği gibi analizlerde doğru ve hızlı sonuç alınması sağlanacağından, bu yöntemlerin iyi ve kötü yönlerinin araştırılarak optimizasyonun sağlanması büyük önem taşımaktadır [14].

2.2.1. PCR

1980'li yıllarda Kary Mullis tarafından geliştirrilen PCR; DNA polimeraz enziminin kullanılmasıyla in vitro şartlarda DNA çoğaltılmasını ifade etmektedir. PCR, hedeflenen DNA bölgesinin milyonlarca kopyasını bir iki saat gibi kısa sürelerde oluşturabilen bir tekniktir PCR'da DNA polimeraz enzimi yardımıyla genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir. Hangi bölgenin çoğaltılacağı ise

çalışmanın amacına ve kullanılan yönteme bağlıdır. PCR yönteminin uygulanabilmesi için teorik olarak tek kopya DNA bile yeterli görülmektedir [20]. Eğer belli bir DNA bölgesinin uçlarındaki nükleotid dizileri biliniyorsa, bunların arasında kalan parça polimeraz zincir reaksiyonu ile doğrudan çoğaltılabilir. PCR kontrollü bir şekilde çift zincir DNA molekülünün birbiri ardı sıra denatüre edilmesi ve komplementer tek zincirlerin hibridizasyonu özelliğine dayanır. Tipik bir PCR protokolü DNA moleküllerinin ısı ile denatüre edilmesi ile başlar. Bundan sonraki aşamada, yüksek miktarlarda hedef DNA moleküllerinin 3' uçlarına komplementer olan iki sentetik oligonükteotid denatüre olmuş DNA'ya eklenir ve ısı 50-60 °C'ye düşürülür. Çok yüksek konsantrasyonda olan bu özgün oligonükleotidler DNA örneğindeki komplementer dizilerle hibridize olurken, uzun kalıp DNA zincirleri düşük konsantrasyonda oldukları için birbirinden ayrı kalırlar. Hibridize olan oligonükleotidler, böylece, deoksinükleotidler ve *Thermus aquaticus* (sıcak su kaynaklarında yaşayan bir bakteri)'den izole edilen polimeraz gibiısıya dirençli bir polimerazın varlığında DNA zinciri sentezlenmesi için primer olarak işlev görür. *Taq polimeraz* adı verilen bu enzim, 95 °C ısıtıldığında bile etkinliğini korur ve 72 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda primeri sentezle uzatabilir. Sentez tamamlandığı zaman bu karışım yeni oluşan DNA çift sarmallarını denatüre etmek üzere 95 °C'de ısıtılır. Isı tekrar düşürüldükten sonra, yeni bir sentez döngüsü başlar. Çünkü ortamda hala aşırı miktarda primer bulunmaktadır. Tekrarlanan denatürasyon (ısıtma), onu izleyen hibridizasyon ve sentez (soğutma) döngüleri, kalıp dizileri hızlı bir şekilde çoğaltır. Her döngüde primer dizileri arasındaki bölgelerin kopya sayısı iki kat artar; bu nedenle istenilen bir dizi üstsel olarak ~ 20 döngüden sonra yaklaşık bir milyon kat artarken, orijinal DNA örneğindeki diğer diziler çoğaltılmazlar.

2.2.2. Genomik DNA nın Spesifik Bir Parçasının Doğrudan İzolasyonu

Genomunun tümü ya da büyük bir kısmının dizisi belirlenmiş olan canlılarda, ilgilenilen spesifik bir DNA bölgesinin klonlanmak üzere elde edilmesi için en kolay yol total genom DNA'sı kullanılarak yapılan PCR çoğaltımıdır. Bu uygulamada, ilgilenilen özgün genom bölgesinin uçlarındaki dizilerle hibridize olacak ve özgün restriksiyon enzimleri tarafından tanınan dizileri içerecek şekilde iki oligonükleotid primer tasarlanır. İstenilen hedef dizi yaklaşık 20 PCR döngüsü çoğaltıldıktan sonra

uygun restriksiyon enzimleri ile kesilir ve bu parça çoklu bağlanma bölgesi aynı restriksiyon enzimi ile kesilmiş bir plazmit vektöre etkin bir şekilde bağlanabilir. Aynı genom DNA parçasını taşıyan rekombinant plazmitler, daha sonra *E.coli* hücrelerine klonlanabilir. PCR'da beli iyileştirmeler yapılarak 10 kb'dan daha büyük DNA parçaları da bu şekilde çoğaltılıp klonlanabilir.

Bu yöntemin, genom DNA'sından elde edilmiş çok sayıda restriksiyon parçalarının klonlanması ve daha sonra ilgilenilen spesifik parçayı bulmak içintüm bu parçaların taranmasına gerek yoktur. Bu yönü ile PCR yöntemi, geleneksel yaklaşımı tersine çevirmekte ve böylece en sıkıcı yönünü ortadan kaldırmaktadır [2].

Mikoloji alanında ilk PCR uygulaması 1990 yılında White ve ark. Tarafından fungusların taksonomik ve filogenetik akrabalıklarını göstermek için rRNA'nın direkt dizi analizi ve amplifikasyonu ile yapılmıştır. rRNA dizileri yaşayan tüm hücrelerde bulunduğundan ve aynı görevi üstlendiğinden taksonomik ve filogenetik çalışmalar için sıklıkla kullanılmaktadır [21].

Standart olan DNA bazlı moleküler teknikler standarttır [22] ve buna göre şu işlemler yapılır; DNA bir fungus dokusundan ekstre edilir kültüre alınır, sıklıkla bununla ilgili olarak ulaşılabilir kitler kullanılmaktadır.

Ekstre edilen DNA'nın yalnızca küçük parçaları, spesifik primerler kullanılarak, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile oldukça büyük parçalar elde edilir [23].

Fungal tanıda kullanılan hedef gen bölgeleri şu şekilde sınıflanabilir (Şekil2.1.) ;

-Universal Fungal genler: rDNA genleri; 18S, ITS1 ve 2, 5,8S, 28S, 5S, IGS

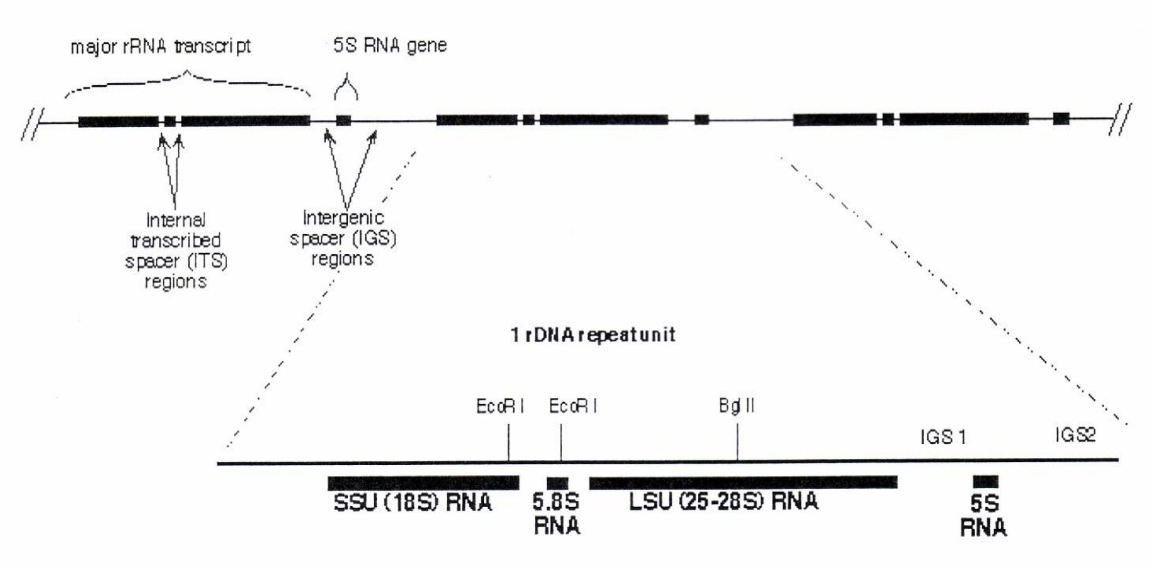
-Tek Kopyalı Genler: Aktin genleri, Alkalin-proteaz (ALP), Citin Sentaz, GP43, Lanosterol-α-demetilaz (L1A1), URA5, SAP, β glukan sentaz (FKS), Histon

-Cins veya Türe Özgü Primerler: 18S, ITS1 ve 2, 28S rDNA, mitokondriyal DNA, Histon genleri [24].

Bununla beraber; DNA protokollü moleküler sınıflandırmada fungus türleri için; büyük ribozomal alt ünitenin yaklaşık 400-600 baz çifti, ITS bölgesi, β-tubulin A gen sekansı ya da EF-1α sekansı ve diğer bazı protein kodlayan genler incelenebilir [25-29].

ITS1 ve ITS2 bölgeleri, her hangi bir protein için özelleşmemiştir organizmaya bağlı olarak geçirilen rastgele mutasyonlar sonucu gen bölgeleri barındırır. Bu iki bölge arasındaki farklılıklar farklı türlerin ortaya çıkarılması için elverişlidir. Bundan sonra ki

aşamada, bilgisayar programları ile (GenBank vs.)gen bölgeleri karşılaştırılır farklı araştırmacıların da bu şekilde kullanmaları üzerine, veri tabanlarına geçirilir [23].



Şekil 2.1. Fungal tanıda kullanılan hedef gen bölgelerin şematize edilişi.

PCR'ın fungal genetik, sistematik, ekoloji ve toprak mikrobiyolojisi, bitki patolojisi, medikal mikoloji, fungal biyoteknoloji vb. gibi mikolojinin birçok alanında geniş uygulamaları yapılmaktadır [21].

PCR için farklı birkaç dizi olmasına rağmen, rRNA genleri tüm DNA'ları çoğaltabilen yüksek oranda korunmuş bölgeleri ve tür düzeyinde tanımlamayı sağlayan oldukça korunmuş bölgeler içerdikleri için en uygun hedef bölgelerdir. Diğer bir avantajı rRNA genlerinin PCR'ın hassasiyetini artıran yüksek kopya sayısının olmasıdır [30].

Önceki yapılan çalışmalarda *Aspergillus* un pek çok moleküler tekniğe dayalı teşhisler için kullanılan fungal rRNA genleri değerlendirilmiştir [31-34].

2.2.3. Fungusların Moleküler Filogenetik Analizi

Filogentik analizi, yaygın bir ata soyundan gelen türlerin sorları hakkındaki hipotezlerin test edilmesi süreci anlamındadır. Daha pratik bir anlamda ise, bu analizi mevcut organizmaların yakın ilişkilerini belirlemek ve organizmaları evrimsel soylar kapsamında bir yere koymak için kullanılır. Bahsi geçen ikinci anlam, okuyucuların daha fazla ilgilendiği durum olup, bu bölümün amacı olacaktır.

Organizmalar arasındaki ilişkilerin evrimsel araştırması biçiminde tanımlanan filogeni, geleneksel olarak önerilen fenotip ilişkilerine dayalı olarak, organizmaların taksonomik sınıflandırılması olan sistematiklerin gizli bir bölümüdür. Filogenetik analizde önsel bir varsayı, mevcut iki organizmanın ortak bir ataya sahip olmasıdır. 1965'de, Zuckerkandl ve Pauling [35] farklı türlerden gelen benzer protein dizileri arasındaki mutasyon oranını benzer yapıda olduğunu göstermişlerdir. Evrimsel zaman cetveli üzerinden, benzer protein dizileri farklılık göstermekle beraber, soylar arasında karşılaştırma yapabilmek için yeterli benzerliklerini de korudular. Zaman içerisinde iki organizma birbirinden uzaklaştıkça, protein dizileri de o kadar birbirinden farklı olacaktır. Bu gözlem, "**Modern Moleküler Filogenetik Yenilenmesi"**nin temelini oluşturmuştur.

Moleküler filogenetik analizi, hızlı DNA dizilenmesinin oluşumu ile daha yaygın hale gelmiştir. Sonuç olarak bu durum yaşayan tüm organizmalar arasındaki filogenetik ilişkilerin büyük değişimine öncülük etmiştir [36]. O günden bugüne, filogenetik analizi için yararlı olan moleküler dizilere ait büyük veritabanı yaratılmıştır.

2.2.3.1. Filogenetik Belirleyiciler

Çoklu gen ve tüm genom filogenleri ortaya çıkmaya başlasa da [37,38] filogenler sıkça tek bir genin karşılaştırılmasından yeniden oluşturulur. Bu yaklaşımın gizli bir varsayımı, tek bir molekülün bir organizmanın filogeninin güvenilir ve yararlı bir gösterimini sağlamasıdır. Bir araştırmacının uygun moleküler bir filogen oluştururken ilgilendiği ilk şey, uygun bir moleküler belirleyicinin seçimidir. Tüm moleküller, iyi bir filogenetik analizi için eşit derecede uygun değildir. Belirli olabilir, fakat iyi bir filogenetik belirleyici ilgilenilen sınıfların tümünde var olmalıdır. Türler arası ya da türler içi karşılaştırılan gen, aynı zamanda benzer olmalıdır.

Benzerlik, genin incelenen sınıflar arasında ortak evrimsel bir kaynağa sahip olması anlamına gelir. Gen dizileri benzer ya da farklıdır. Bu terimi, gen dizileri arasında paylaşılan benzerlik yüzdesine karşılık olarak kullanmak uygun olmayabilir. **Ortholog genler**, dikey olarak transfer edilir ve takson içi filogenetik yenilenmesi için en uygunudur. Diğer yandan, gen kopyalanmasından ortaya çıkan **paralogous genler,** değişim oranlarının araştırılmasında, ortholog ağaçlarının oluşturulmasında ve taksonlar arası farklılığın tanımlanmasında en yararlı olanıdır. Örneğin, yaşayan organizmaların

(Bacteria, Archea ve Eucarya) önemli alanlarının her bir üyesinde var olan EF-Tu genleri, tanım gereği ortholog genlerdir. Ek olarak, EF-Tu ve EF-G birbirinin paralog'udur ve önemli alanların her biri arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde kullanılan gen çiftlerininin biridir. **Xenologlar,** yatay olarak transfer edilen genlerdir ve organizmaların filogenlerini anlamada uygun değildirler.

Filogenetik belirleyiciler, zaman üzerinde tutarlı bir değişim oranı ortalaması ortaya koyarak moleküler süreölçer gibi davranırlar. Molekülün yeterli korunan özellikleri, benzer diğer moleküllerle düzen içinde olmasını kolaylaştırmak için elde tutulurken; ideal olarak bu mutasyonlar, korunacak molekül boyunca rasgele olarak dağılım gösterirler. Sınıflar arası ayrışma için istenen düzey, uygun filogenetik belirleyicinin seçimi temeline dayalıdır. 16SrRNA ve 23SrRNA arasındaki genler arası kopyalanan "spacer" alanı, örneğin; seçici basınçtan göreli olarak bağımsız ortaya çıkar ve bu yüzden çabucak genişlemeye açıktır. Bu dizine dayanan filogenetik karşılaştırma, diziler arasında ayırt etmede uygun olabilir, ancak tür karşılaştırması için uygun değildir. Sonuç olarak, filogenin istatistiksel olarak sağlam gösterimini sağlamak için, molekül yeterli bağımsız genişleme pozisyonları içermelidir ve ilgilenilen çeşitliliğin genişliğini temsil etmelidir.

Nükleik asit ya da amino asit dizileri, filogenetik analizi için en çok kullanılan moleküllerdir. Filogenetikte, nükleik asitlerin kullanımı, nükleik asit dizilenmesinin hızlı, ucuz ve güçlü olması avantajına sahiptir. Bunun yanında, **Ribozomal Veritabanı Projesi** (Ribosomal Database Project) (Ek A) gibi büyük veritabanlarının mevcut olması, filogenetik analizini kolaylaştırır. Proteinleri direkt olarak dizilemek mümkün olsa da, bir genin nükleik asit dizisini belirlemek ve filogenetik analizinde kullanılan protein dizisini çıkarmak daha yaygındır. Bu durum, hata olasılığını gösterir, çünkü analiz, orijinal veriden çıkarılan bir aşamadır. Aktarım tarafından kazanılan düzen netliği, sıkça hata olasılığı için eşitlenir dengelenir. Amino asit dizileri, her bir kodon için üçüncü nükleotid yerleşimindeki yüksek değişkenlik derecesinden dolayı, temel nükleik asit dizilerininden daha çok korunur olmaya eğilimlidir. Üçüncü yerleşim değişkenliği, filogenetik analizi temel nükleik asit dizisi üzerinde gerçekleştirilirse nükleik asit değişim modellerinin karmaşıklığında anlamlı bir artışa gereksinim duyabilir. Bu yüzden, protein kodlama genlerinin filogenetik analizinin, amino asit düzeyinde gerçekleştirilmesi önerilir.

Jel paternlerine dayalı filogenler (restriction fragment lenght polymorphism [RFLP], terminal RFLP, amplified ribosomal DNA restriction analizi, denaturing gradient gel electrophoresis, temperature gradient gel electrophoresis) benzer sınıf gibi ele alınabilir. Sınıf olarak, bir restriksiyon veya başlangıç bölgesinin kaybedilmesi olasılığının, bir birimin elde edilmesi olasılığından daha fazla olması sınırlılığına sahiptir. Bunun yanında, bir jel üzerindeki her bir restriksiyon bölgesinin gösterimi, diğer restriksiyon bölgelerinden bağımsız değildir. Örneğin, bir restriksiyon bölgesinin kaybedilmesi, üç karakterdeki belirgin net değişim için iki restriksiyon parçasının ortadan kalkması ve daha büyük tek bir parçanın ortaya çıkması ile sonuçlanır. Bir restriksiyon bölgesinin yokluğu, iki organizmanın yakın bir evrimsel ilişkiden yoksun olması anlamına gelmez. Bunun tersine, bir nükleik asit dizisi içindeki nükleotid yerleşimindeki bir mutasyon, çevredeki nükleotidleri etkilemez. Moleküler dizi değişim modelleri, restriksiyon bölgelerinin kaybını karşılamak için geliştirilmiştir [39,40,41]. Restriksiyon endonükleaz parçalarını ve ilişkili yapıları kullanmanın ek bir dezavantajı, ilişkili birkaç banttan oluşmasıdır ve bu yüzden büyük dizi-temelli analizlerinin gücünden yoksun kalır.

2.2.3.2. Fungusların Dizi Analizine Dayalı Tanımlanması ve Sınıflandırılması

Gen dizi bilgilerinin, kültürde üremiş fungus türlerinin tanımlanması için veya kan, doku gibi örneklerde etken mantarın gösterilmesi ve tanımlanması amacıyla kullanımı, günümüzde fungus enfeksiyonlarının tanısı yönünden gittikçe daha çok önem kazanmaktadır. Buna ek olarak, dizi verilerinin bilinmesi, in vitro tanı yöntemleri arasında önem kazanan, moleküler problar ve diğer yeni tekniklerin geliştirilmesi için de gerekmektedir. Fungusların tanımlanmasında iki temel yaklaşım vardır. Tanımlanması gereken fungusların gen dizileri, veri tabanındaki diğer dizilerle karşılaştırılır.

Gen dizi verilerine göre tasarlanan moleküler problar, klinik örnekte önceden tanımlanmış olan türleri saptamak için kullanılır. Gen dizi veri tabanının tanımlanacak mantarın dizisini içerip içermemesi; klinik örnekte hedeflenen türlerin genomik materyalinin bulunup bulunmaması veya probun özgüllüğüne bağlı olarak farklı bir sınıftan olan genomik materyalin bulunması ve bundan dolayı saptanamaması, bu yöntemi kısıtlayan faktörlerdir.

Ekstraksiyon, hedef gen bölgelerinin çoğaltılması ve bu bölgelerin dizi analizi çok sayıda farklı mantar türünün tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Bu yöntem ile ilgili başlıca kısıtlayıcı faktörler, insan ve mantar DNA'sı arasındaki çapraz etkileşimi, analiz etmeyi sağlayacak yeterli fungal DNA elde etme sorunu, ideal primerlerin seçimi, referans alınan hedef gen bölgesi dizisinin veri tabanının büyüklüğü ve kalitesidir. Bu kısıtlayıcı faktörlere karşın, gen dizi analizi, sadece *Candida* ve *Aspergillus* türleri gibi en sık görülen patojenleri saptamak için tasarlanmış ola moleküler probların ötesinde bilgi sağlamaktadır.

Geleneksel olarak, klinik laboratuvarlarda tanımlanma ve sınıflandırma için tercih edilen fenotipik özellikler, kolay fark edilebilen veya ölçülebilen özelliklerdir. Bu özelliklerin başlıcaları, koloni morfolojisi ve belirli biyokimyasal reaksiyonların sonuçlarıdır. Ancak, daha az önemli olduğu düşünülen bazı fenotipik özellikler, aslında fenotipik ve genotipik bilgi arasındaki ilişkiyi kurmak amacıyla kullanılması gereken özellikler olabilir. Fenotipik adaptif değişiklikler, üreyen yeni toplulukların, yani türlerin oluşumun her zaman eşlik etmeyeceğinden, filogenetik olarak birbiriyle ilgisiz olan mantarların, aynı ekolojik ortam içinde, morfolojik olarak benzer veya tamamen aynı özellikler göstermesi nadir değildir.

Bundan dolayı, özelleşme ve adaptif fenotipin birbiri ile ilişkili olması gerekmez. Özelleşme, fenotipik adaptif değişikliklere neden olmaz ancak farklılaşmanın bir parçası olmasını sağlar. Bu nedenle, mikolojik sınıflama şemaları, basit morfolojik testlerin ötesine geçmelidir.

Mantarların sınıflandırılmasının esas amacı, bir grup mikroorganizmanın kendi içlerinde birbiriyle olan filogenetik ilişkilerini ortaya çıkarmaktır. Bunun için, ilgilenilen farklı türlerin tanınması gerekir. Bu da morfolojik, fizyolojik, seksüel uygunluk verileri gibi geleneksel yöntemler ile veya son dönemlerde olduğu gibi dizi analizi verileri ile yapılabilir. Ancak, özellikle morfolojik veya biyolojik tür kavramlarına dayanarak, farklı ve çok sayıdaki türleri, önceden belirlenmiş bir cins ve tür adı altında toplamak zorlu bir yaklaşımdır. Bilinen ve güvenilir kriterlere göre sınıflama şeması bir kez yapıldığında, fungusların tanımlanmasına yardımcı olacak önemli bir araç oluşturacaktır.

2.2.3.3. Genetik Sınıflama Yaklaşımları

Bir fungus suşunun rRNA dizisini belirlemek için önce o suş üretilir ve nükleik asit ekstraksiyonu yapılır. X bölgesini amplifiye etmek için, MicroSeq X LSU rDNA (applied Biosystems, FosterCity, Calif.) fungal dizi analizi kiti gibi, bir PCR bir de dizi analizi modülü içeren ticari dizi analizi kitleri kullanılabilir. Elde edilen PCR ürünlerine dizi analizi yapılır. "cycle-sequencing" analizi ürünleri, gel sisteminde elektroforez ile (örneğin, ABI Prism 377 DNA dizi analizi ve ABI Prism 4310 genetik analiz cihazları [Applied Biosystems) yapılır. Her mikroorganizma için elde edilen elektroferogramların düzenlenmesi ve araştırılan bölgenin dizisinin elde edilmesi için MikroSeq mikrobiyal tanımlama ve analiz programı (Applied Biosystems) kullanılır. Bu program, çalışılan bölgelerin dizilerinin, yarı otomatize şekilde ve hızlıca birleştirilmesini, kontrolünü, düzenlenmesini ve filogenetik analizini sağlamaktadır.

MikroSeq mikrobiyal tanımlama sistemi, nükleer rRNA gen diziliminde, her biri yaklaşık 1200 nükleotid uzunluğunda DNA dizilerinden oluşan bir DNA kütüphanesini kullanmaktadır. rDNA diziliminde, 23S-benzeri genin gömülü ekspansiyon segmenti (ES), en değişken bölge olması nedeniyle tanı için hedef bölge olarak kullanılmaktadır. D1'den D12'ye kadar numaralandırılmış olan 12 ES bölgesi bulunmaktadır. Mantarın tanımlanması, üç en büyük ve en değişken ES bölgesinin tüm DNA dizisi çıkarılarak yapılır. Bu dizi, suş düzeyindeki ayrım konusunda da bilgi verir. Bu bölgenin avantajı, prokaryotlarda bulunmaması, çok değişken olması ve en büyük bölgelerin büyük alt ünitenin (BAÜ) 5'ucunda yer almasıdır.

BAÜ geninin farklı bölgeleri, çok yakın ilişkili mantar türlerini ayırmada başarılı olmaktadır [42]. On iki ekspansiyon segmentinden ilk üçü (ES1, ES2 ve ES3), türler arası genetik varyasyonun büyük kısmını içermektedir. Şimdiye kadar yayınlanmış veriler, nükleer rRNA gen dizilimi kopyaları arasında, genom içi değişikliğin hiç olmadığını veya çok az miktarda olduğunu göstermektedir. Nadir polimorfik bölgeler, dizilimdeki kopya homojenizasyon oranının, yeni kopya varyantları oluşturacak mutasyonlardan genellikle daha fazla olduğunu göstermektedir. Polimorfik nükleotid bölgeleri, esas olarak tiamin ve sitozin bazlarını içermektedir. rRNA dizilimi hedef genin fungal genomu için çok sayıda idantik kopya sağladığından, bu dizilimin birleşik evrimi rastlantısaldır. Dolayısıyla bu sistem, amplifikasyon ve dizi analizi teknolojileri için ideal bir sistemdir.

Fungal ES bölgesindeki dizi değişkenlik paterni, daha iyi korunmuş olan değişmeyen bölgelerde aralıklıdır. Bu değişkenlik paterni iyi anlaşılmıştır ve mayalar gibi diğer ökaryotik mikroorganizmalarda bulunanla paralellik göstermektedir. Yaygın değişkenlik paterninin yararı, başarılı DNA dizi analizi yaklaşımlarının (başka bir deyişle ekstraksiyon oligomerlerinin) tasarlanmasını sağlamasıdır. Belki de bundan daha önemlisi değişmeyen DNA dizi bölgelerinin, sıralı algoritmalar için dayanak noktası olarak görev yapması ve BLAST ve Needleman-Wunch karşılaştırmalarının güvenilir şekilde yapılmasını sağlamasıdır.

2.2.3.4. Fungal Dizi Analizi Verilerinin Uygulama Alanları

Gen dizisi verileri, tıbbi ve ekonomik açıdan önem taşıyan mantarları tanımlamak için başarıyla kullanılmaktadır. Nükleer ribozomal DNA (rDNA) dizilimi küçük alt ünite (KAÜ) (18S-benzeri), BAÜ (23S,26S veya 28S-benzeri) ve 5.85 rRNA genleri, ökaryottik mikroorganizmalarda PCR amplifikasyonu ve direkt dizi analizi için ideal bir hedef oluşturmaktadır. Bunun nedeni, gen konversiyonu gibi moleküler işlemlerle çoklu dizilim kopyalarının homojenizasyonunun mümkün olmasıdır. 26S fragmanları mayalar ve bitkiler, 28S fragmanları ise hayvanlarla ilişkilidir [43,44]. rDNA dizilimi içinde, 23S-benzeri genin yukarda belirtilen ES bölgeleri, en değişken ve dolayısıyla tanıya en çok yardımcı olabilecek hedef dizileridir.

Fungusların tanımlanması, en büyük ve en değişken üç ES bölgesinin tüm DNA dizisi kullanılarak yapılabilir. Bu dizinin kullanımı, türler arasındaki, hatta tür içindeki farklılıkları da ortaya koyabilmektedir. *Histoplasma capsulatum* izotlarının, D-1'den D-3'e kadar olan bölgelerinin (1200bç) değerlendirilmesi sonucunda Kasuga ve ark.'nın önerdiği filogenetik türlerle yakın ilişkinin olduğu gösterilmiştir [45].

Fungusların tanımlanmasında tek gen dizisinin kullanılması, problemlere yol açabilir ve dikkatle uygulanmalıdır. Bir dizi, veri tabanında bulunan diziyle karşılaştırıldığında, olasılık sırasına göre bir sınıflama listesi ortaya çıkmaktadır. Bu liste, pek çok farklı kökenden gelen geniş bir mantar grubunu içermektedir. Genellikle yapılan, mantarın fenotipik özellikleri göz önüne alınmaksızın, en yüksek olasılığa sahip sınıfı seçmektir. Bu şekilde yapılan tanımlama, test edilen suş biyokimyasal ve morfolojik olarak incelenip mevcut özelliklerin önerilen tanımlamaya uyup uymadığı kesin olarak belirlenmedikçe, yanlış sonuçlara yol açabilir.

Açıkça görüldüğü gibi bu şekilde bir tanımlama için, mikoloji bilgisi ve deneyimine gereksinim vardır. Ancak, genel uygulama, çoğunlukla bu bilgi ve deneyimlerden yoksun olarak yapılmaktadır. Tek gen analizine dayalı sistemlerle deneyim kazanıldıkça, bazı problemli türlerde karşılaşılanlar başta gelmek üzere, bu sistemin uygulamaları ile ilgili kısıtlamalar daha iyi anlaşılacaktır.

2.2.3.5. Taksonomik Yaklaşımlar

18S rRNA genleri, filogenetiğe dayalı evrimsel ağaçları oluşturmak için mikoloji alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. 18S rDNA dizileri, bu evrimsel gelişmenin korunma hızına bağlı olarak, ilişkileri ve yakınlıkları ortaya çıkarmakta yüksek taksonomik düzeylerde yeterli bilgi sağlayabilmektedir [44] 23S rDNA verileri, genomun bu kısmının, çeşitlli taksonomik düzeylerdeki ilişkileri çözümlemede güvenilir olabileceğini göstermektedir. Ancak, moleküler tanımlamada, tek genom fraksiyonunun kullanılmasının doğru sonuç elde etmede çeşitli sorunlara neden olabileceği ortaya konmuştur [46].

rRNA genlerinin, nükleer küçük alt ünite ve kısmi büyük alt ünite dizileri toparlanabilir ve çoklu sıralama algoritmaları kullanılarak sıralanabilir. Daha sonra bu veriler, filogenetik analiz yapılmadan önce, en yüksek olasılık ve en yüksek benzerlik yöntemleri kullanılarak birleştirilebilir. Sonraki analizlerde, bu verilerden evrimsel gelişim modelinin parametreleri için öngörüde bulunulabilir ve ML değerlerinin hesaplanması için bilişim ortamına dahil edilebilir [47].

2.2.3.5.1. Blast

Orijinal sorgu bilgisi çevre eşiğinin üzerinde bir bilgi ile eşleşir. BLAST algoritmi daha sonra bu eşleşmeyi, eşleşmelere eşleşme skoru, yanlış eşleşmeler ve boşluklar ekleyerek her iki yönde ilerletir. Eşleşmenin maksimal uzunluğu eşleşmenin kümülatif skoru ile eşleşen pozisyonlarının sayısının çarpımı ile bulunur. Eşleşme uzaması, yanlış eşleşme sayısının eşleşme kümülatif skoruna düşmeye başlayana kadar devam eder. Eğer bu düşüş yeteri kadar büyükse (aşağıda tanımlanan X değeri) eşleşme işlemi biter ve eşleşme sonucu yüksek – skorlu segment çifti (HSP) olarak isim alır. Algoritm ile belirlenen bir skor eşiğini eğer HSP geçebiliyorsa eşleşme BLAST sonuç sayfasında rapor edilir.

Son olarak HSP'nin biyolojik önemi tanımlanır. BLAST HSP sayısını hesaplamak için yalnızca şans eseri S den daha büyük olacak E- değerini kullanır. Düşük değerlerdeki E' nin biyolojik önemi büyük olur, HSP'nin yanlış pozitif olup olmadığını kontrol eder.

2.2.3.5.2. Fasta

BLAST gibi FASTA da, DNA ya da protein dizilerinin hızlı karşılaştırmalarını yapan ve veritabanı benzerlik araştırmaları için yararlanılan algoritmanın sıklıkla kullanıldığı ilk programdır.

FASTA, veritabanı dizisinden sorgu dizisinin alt dizilerine özel bir bilgi uzunluğu yukarısında alt dizileri yerleştirerek başlar. FASTA' da bilgi uzunluğu parametresi ktup olarak adlandırılır ve BLAST'taki W değerine eş değerdir. FASTA bakiyelerin eşleştiği yerde bir nokta alan üzerinde çapraz çizgiler üretir. FASTA algoritmi daha sonra eşleşme matriksi içinde çapraz bölgelerin yerini belirler. Bu matriks mümkün olduğunca kısa aralıklar ile birbirinden ayrılan pek çok kutup eşleşmesi taşır. En yüksek skora sahip 10 çapraz bölge ayrılır ve boşluklar içermeyen yüksek skorlu lokal eşleşmelere karşılık gelir.

FASTA daha sonra birlikte katılım sağlayarak eşleşmenin tüm uzunluğunu bu şekilde arttıran komşu çaprazlarını belirler. Bir boşluğun katılımı ile bağlı her bir çapraz çağırılır ve tüm skor bireysel çaprazların net skorunun eklenip, boşlukların çıkarılması ile bulunur. Genişletilmiş çaprazların skoru initn olarak isim alır. Bütün genişletilmiş çaprazlar skora bağlı olarak sıralanır ve bir lokal eşleşme stratejisi kullanılarak en yüksek skorlu olanlar optimal olarak belirlenir. Son olarak FASTA, sorgu dizisi gibi kompozisyonları ve benzer uzunlukta olan diğer dizilerin rastgele eşleşmesinin önemini belirler ve bir eşleşmenin rastgele oluşmasındaki şansın olasılığını hesaplar.

2.2.3.5.3. Çoklu Dizi Karşılaştırması

Çoklu dizi karşılaştırması (MSA), DNA'ya da protein aileleri arasında iç ilişkileri saptamamızı sağlayan bir metodtur. "pairwise alignments" teknikleri veritabanlarında homologları belirlemek ve iki dizi arasında korunmuş dizileri açığa çıkarmak için kullanışlıyken bu teknikler MSA kadar bilgi verici değildir. MSA yüzlerce dizi arasında korunmuş bakiyeleri/ domainleri saptama yeteneğine sahiptir, bu

özellik önemli evrimsel ve fizyokimyasal süreçlere ışık tutabilir. MSA filogenetik analizlerde ilk basamaktır ve DNA amplifikasyonu için primer dizaynında sıklıkla kullanılır. MSA bilgisayar teknolojisini BLAST ve FASTA' nın pairwise stratejilerine göre daha yoğun kullanılır. MSA' yı kullanan en yaygın algoritmlerden biri CLUSTAL'dır ve ilgilenilen tüm dizileri etkin şekilde eşleştiren ilerleyici eşleştirme kullanır. CLUSTAL 3 ana basamak izler:

1.Pair-wise eşleştirme kullanılarak farklı dizilerin birinin diğerine nasıl yakın ilişkili olduğunun ilk değerlendirmesi

2.Pair-wise eşleştirme skoruna bağlı olarak rehber bir ağaç oluşturulur.

3.Filogenetik ağaç rehberliğinde dizilerin bağlantısı yapılır. İlk olarak yakın ilişkili diziler daha sonra ek diziler ve guplar eşleştirilir.

CLUSTAL birkaç sayıda eşleşme boşlukları uygulayarak kendi ilerleyici bağlantılarını düzeltir. Örneğin, boşluk insersiyonu ve uzama boşlukları daha çok bir hidrofilik bölge içindeki bir boşluk ihtimalini yansıtmak için ortaya çıkar çünkü boşlukların sık olduğu yerlerde rastgele halka bölgeleri ya da genellikle ilmekler vardır. Benzer olarak bakiye-spesifik boşluklar da zorunludur çünkü örneğin glisince zengin olan domainlerin bir komşu boşluk taşıma olasılığı daha fazlayken valin taşıyanlarınki daha azdır.

2.2.3.5.4. Genomik ve Fungal Yaşam Ağacı

Filogenetiğin amacı popülasyonlar, türler, bireyler ya da genlerin bir dizi düzenleme içine alarak aralarındaki evrimsel ilişkiyi ortaya çıkarmaktır. Türler arasındaki tarihsel evrimsel ilişkinin anlaşılması için genellikle bir evrim ağacı kullanılmaktadır. Fungal sistamatiklerin vejetatif hücre morfolojisi, seksüel basamaklar, büyüme testleri ve fermentasyonun fizyolojik yanıtları gibi geleneksel yöntemleri mantar türlerini ayrı genera (cins) ve ailelere bölmüştür. Fungus fosil kayıtları yetersiz olduğundan ve mantarların az morfolojik özellik göstermesinden dolayı altarnatif bir araştırma yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. Fungal sekans verileri (RNA, DNA ve protein) türler arasındaki evrimsel ilişkiyi ortaya çıkarmak için mükemmel bir şekilde kullanılmıştır. Birçok durumda, sıralanmış sekanslar aralıklı matriks gibi işlenmiştir. Birbirine çok benzeyen türlerin küçük uzaklıkları bulunurken birbirinden uzak ilişkili türlerin daha büyük uzaklık ölçüleri bulunacaktır. UPGMA, minimum evolüsyon ve

komşuluğu katılım gibi filogenetik algoritmalar uzak matrisli filogenetik ağaçları göstermek için kullanılmaktadır.

Fungusun hayat ağacına müdahale için filogenetik marker seçimi tartışmalı bir konudur. İncelenmekte olan türlerin genelinde filogenetik markerlar her yerde olabilir bununla birlikte tek kopya içinde bulunurlar, yavaş gelişen bölgeleri bulunur ve birbirine benzemeyen HGT' lere maruz kalırlar. Bu sebeple, fungal organizmalar arasındaki kabul edilen ilişkilerin önemli bir kısmı 18S ribozomal DNA kullanılarak belirlenir. Fakat tek gen analizleri tüm bir organizmayı yansıtan evrimsel bir hikayeye sahip filogenetik belirteçlere dayanır. Ayrıca bireysel genler sınırlı sayıda bölge içerdiklerinden kendi döngülerinde sınırlı kararlılıkları bulunmaktadır. Tek gen filogenisi için alternatif bir yaklaşım multigen filogenisidir.

Bunu yapmak için 2 adet çok yaygın kullanılan yöntem bulunmaktadır: Sıralı multigen filogenisinin yeniden yapılanması ve süperağaç analizi.

Multigen birleştirmesi daha büyük süper bir uyumluluk vermek için çoğu sıralı genin birbirine eklenmesidir. Verilerinin birleşmesi kendi bilgi vericiliklerini arttırmakta, nodları çözmeye yardımcı olmakta, basal dallanma ve filogenetik doğruluğunu geliştirmektedir. Sayısız tür filogenisi evrensel olarak dağıtılan genlerin birleşmesiyle elde edilmiştir. Son zamanlarda **Fungal Hayat Ağacı Birliği,** fungal krallığı evrimsel tarihçesini yeniden düzenlemek için 199 fungal türün 6 referans genini (18S,rRNA,28S rRNA, 5.8 S rRNA, elegation faktör alpha-1 ve 2 RNA polimeraz II alt ünitesi (RPB1 ve RPB2) kullanmaktadır.

Bu analizler tüm fungal floranın evrimsel tarihçesini gösterdiği gibi karasal fungusların çeşitlendirilmesine öncülük eden erken dağılan mantarların spor kamçılarını kaybetmelerine (hala varlığını sürdüren chytrids) rastlayan yeni spor dağılım mekanizmalarının gelişimini de göstermektedir.

Süperağaç metodları ise, tüm veri girişi yapılmış ağaçları alır ve tek bir temsili türler filogenisi oluşturur. Bireysel veri girişli ağaçlar tekli genlerden köken alır. Karşılaştırmalı fungal genomik analizler bütün fungal genlerin %1 den azının evrensel dağılmış genler olduğunu göstermiştir. Bu durum multigen filogenilerini yeniden yapılandırdığımızda funguslarda bulunan %99 geni yok sayacağımız anlamına gelmektedir. İdeal olarak biz gen verilerinin %100'ünü kullanırız. İşte süperağaç metodu bunu yapmamızı mümkün kılar.

Süperağaç metodları bir taksanın kısmi ya da tümüyle çakışan setlerini taşıyan veri girişi yapılmış ağaçların bir setinden bir filogeni üretir. Böylelikle süperağaç metodları filogenetik ağaçların bir setinin veri girişi olarak alınır. Analizlerin bu tipi kullanılan genleri sayısını maksimuma çıkaran filogeni verir, böylece tüm bir genom doğru temsil edilir.42 tane tamamlanmış fungal genomun bir süperağaç analizi 4805 bireysel gen ailesini tanımlamıştır. Her bir gen ailesi için bireysel filogeniler yeniden yapılandırılmış ve bu tüm set süperağaç tekniği olarak özetlenmiştir. Bu analiz Saccharomycotina içerisinde *C.albicans*'ı içeren bir monofiletik sınıf bulunduğunu göstermiştir ve yakın ilişkiler tanımlanmıştır.

Süperağaç tekniği, filogenetik analizlerde günden güne yaygın hal gelmektedir ve şu an ulaşılabilir olan fungal genomlara ek olarak yeni fungal yaşam ağaçlarının yapılandırılmasında kullanışlı olacaktır.

2.2.3.5.5. Online Fungal Genomik Kaynaklar

NCBI (National Centre for Biotechnology Information genel dizi veritabanlarına (GenBank gibi) ev sahipliği yapan, biyolojik sonuçları destekleyen uygulamalarla ilişkili biyoinformatik bir araçtır. NCBI özel bir fungal genom bölümüne sahiptir (Fungal Genomlar Merkezi, FGC).

FGC, şu an çalışılıyor olan ya da tamamlanmış 309 fungal genom dizileme projesine direkt olarak bağlantı sağladığı gibi BROAD ya da Wellcome Trust Sanger Institute gibi fungal dizileme merkezleri tarafından oluşturulan yeni okunmuş dizilere bağlantı sağlar. 80 fungal mitokondrinin tüm dizileri şu an indirilebilir durumdadır. NCBI tarafından ev sahipliği yapılan ulaşılabilir fungal genomik veri tabanlarının tümünde araştırılan genin bir fungal BLAST araştırma kolaylığı şu an mevcuttur. Tümüyle dizilemesi tamamlanmış fungal genomlar arasında homolog saptaması için oluşturulmuş otomatik bir sistem de vardır. Şu ana kadar 9000'den fazla fungal gen ailesi kataloglanmıştır.

FGC, NCBI veritabanında moleküler verilere sahip tüm fungal organizmalara ait filogenetik soyları ve isimleri içeren bir taksonomi araştırma mühendisliğine sahiptir [1].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırma materyali, laboratuvar ortamında saf kültür olarak stoklanmış bazı mikrofunguslardır. Bununla beraber örnekler cins düzeyinde morfolojik olarak 3 farklı gruba ayrılmıştır. A grubunu olşturan mikrofungus örnekleri 21 adet, B grubunu oluşturan mikrofungus örnekleri 35 adet, C grubunu oluşturan mikrofungus örnekleri ise 5 adettir. Toplam örnek sayısı 61 adettir. A grubu mikrofungus örneklerinin moleküler teşhisi için "actin" gen bölgesine, B gurubu mikrofungus örneklerinin moleküler teşhisi için "β-tubulin" gen bölgesine, C grubu mikrofungus örneklerinin moleküler teşhisi için ise hem "actin" hem "β-tubulin" gen bölgelerine bakılmış aynı zamanda her üç grup için de ITS gen bölgesine bakılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Mikrofungusların Moleküler Tanısı

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

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

3.2.1.1. DNA İzolasyonu

DNA İzolasyonu için Biospeedy DNA İzolasyon Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır. Kit protokolü aşağıdaki gibidir.

1. Bir mikrofüj tüpüne 400 µl Guanidinium thiocyanate (0.1 M Tris; pH 7.5) eklenmiş, daha sonra katı besi yerinden alınan fungi kolonileri kolonisi tamponun içine bırakılmıştır.

2. Numune vorteksle 1 dk 3000 RPM'de karıştırılmıştır ve daha sonra 95°C'de 10 dk inkübe edilmiştir.
3. Numune vorteksle 1 dk 3000 rpm karıştırıldıktan sonra tüp 14000 RPM'de 1 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen üst sıvı yeni bir tüpe transfer edilmiştir.
4. Elde edilen üst sıvıya 200 µl isopropanol eklenmiş, iyice karıştırılmıştır. Karışım DNA Kolonu'na eklenmiş, 1-2 dk beklenmiş ve 12000 RPM de 1 dk santrifüj edildikten sonra alt sıvı atılmıştır.
5. Kolona 500 µl Yıkama Tamponu (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5; 80% v/v Ethanol) eklenmiş, 12000 RPM de 1 dk santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır. Bu adım iki defa daha tekrarlanmıştır.
6. Kolon 12000 RPM de 1 dk boş santrifüj edildikten sonra steril yeni bir mikrosantrifüj tüpe yerleştirilmiş, 100 µl Çözücü Tampon eklenmiş, 1 dk oda sıcaklığında inkübe edimiş, 14000 RPM de 1 dk santrifüj edilmiş ve DNA izolatı elde edilmiştir.
7. Elde edilen DNA -20°C'de saklanmıştır.

3.2.1.2. Gerçek Zamanlı (Real Time) PCR (Q-PCR)

Q-PCR için Biospeedy Fungal Çeşitlilik Çalışma Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır. Kit fungal 18S rRNA'nın 3' ucu kısmi dizisi, ITS1, 5.8S rRNA ve ITS2 bölgesinin tümü ve 28S rRNA'nın 5'ucu kısmi dizisi bölgesini hedefleyen ileri 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' ve geri 5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3' pimerlerini , β-tubulin genini hedefleyen ileri 5'-TGG GCY AAG GGT YAY TAY

AC-3' ve geri 5'-GGR ATC CAY TCR ACR AA-3' primerlerini ve aktin genini hedefleyen 5'-TGG GAY GAY ATG GAN AAN ATH TGG CA-3' ve geri 5' TCN TCG TAT NCT NGC TNN GAN ATC CAC AT-3' primerlerini içermektedir.

Bütün reaksiyonlarda Biorad CFX Connect (Bio-Rad Laboratories, Amerika) kullanılmıştır. Reaksiyon 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP mix, 1x Reaksiyon Tamponu, 0.1U Fast Start Taq DNA Polimeraz, 1x EvaGreen, 4 ng/µl kalıp DNA ve her bir primerden 0.5 µM içermektedir. Cihazda, primer çiftine özgü optimizasyonu sağlanmış Tablo 3.2'de verilen ısı döngüsü programı uygulanmıştır. Q-PCR sırasında sadece

istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 65°C - 98°C arasında erime eğrisi analizi yapılmıştır. Q-PCR dataları CFX Manager Software 3.0'da analiz edilmiştir.

3.2.1.3. Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz

Dizi analizi için Bioeksen firmasından hizmet alınmıştır. Elde edilen bakteriyel amplikonların dizi analizleri Sanger yöntemiyle, ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit kullanılarak, ABI Prism 377 DNA Sequencer'da (Applied Biosystems, ABD) belirlenmiştir.

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

Tablo 3.2. PCR Şartları

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

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

Toplam 61 mikrofungus örneğinin moleküler identifikasyonu için yapılan DNA izolasyonu, Q-PCR ile örneklerin çoğaltılması, dizi analizi ve filogenetik analizler sonucunda ortaya çıkan mikrofungusların "Actin ve ITS" gen bölgelerine göre "Maksimum Identification" ları baz alınarak, tür karşılaştırılması yapılmış ve tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.1.). Aynı şekilde "β-tubulin ve ITS" gen bölgelerine göre yine "Maksimum Identification" baz alınarak mikrofungus türlerinin karşılaştırılması yapılmış ve tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.2.).

Karşılaştırma tablosunun ardından, mikrofungus türlerinin akrabalık düzeyini belirtmek ve incelemek amaçlı filogenetik ağaçlar çizilmiştir.

Fungal cinslerin ilgili fen bölgeleri göz önüne alınarak çizilen filogenetik ağaçlar, Şekil 4.1-4.7 arasında belirtilmiştir.

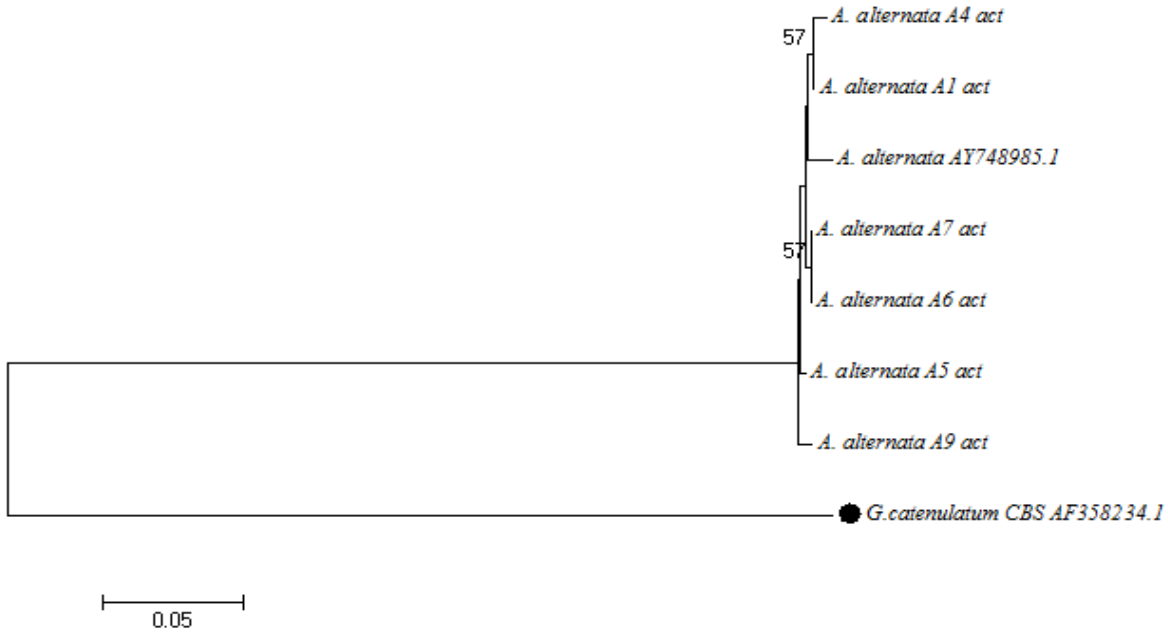
.

Tablo 4.1. Mikrofungusların Actin ve ITS gen bölgelerine göre karşılaştırılması

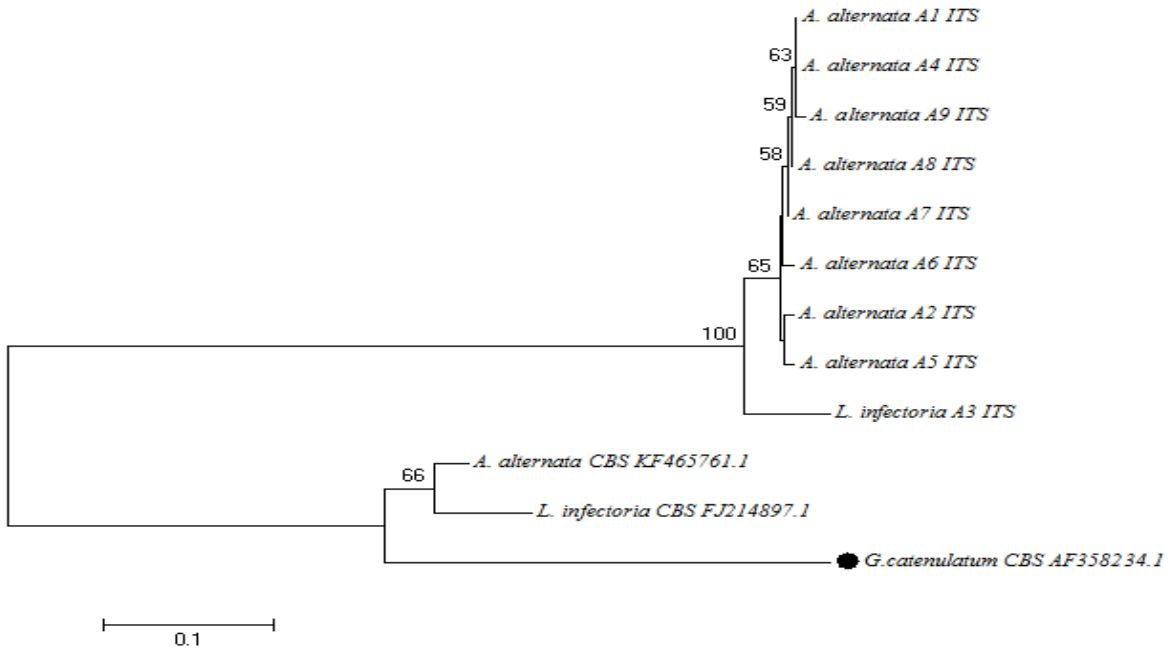
	ACTİN	Maksimum Identification		ITS	Maksimum Identification
A1	*Alternaria alternata*	815/838(97%)	A1	*Alternaria alternata*	555/558(99%)
A2	tür tespit edilememiştir		A2	*Alternaria alternata*	550/557(99%)
A3	tür tespit edilememiştir		A3	*Lewia infectoria*	579/586(99%)
A4	*Alternaria alternata*	713/729(98%)	A4	*Alternaria alternata*	563/568(99%)
A5	*Alternaria alternata*	757/776(98%)	A5	*Alternaria alternata*	557/565(99%)
A6	*Alternaria alternata*	717/723(99%)	A6	*Alternaria alternata*	552/561(98%)
A7	*Alternaria alternata*	669/674(99%)	A7	*Alternaria alternata*	563/572(98%)
A8	tür tespit edilememiştir		A8	*Alternaria alternata*	563/572(98%)
A9	*Alternaria alternata*	719/730(98%)	A9	*Alternaria alternata*	565/569(99%)
A10	*Cladosporium herbarum*	602/624(96%)	A10	tür tespit edilememiştir	
A11	tür tespit edilememiştir		A11	*Acrodontium sp.1*	477/478(99%)
A12	tür tespit edilememiştir		A12	*Cladosporium herbarum*	529/537(99%)
A13	tür tespit edilememiştir		A13	*Cladosporium tenuissimum*	538/541(99%)
A14	*Cladosporium tenuissimum*	679/710(96%)	A14	Cladosporium tenuissimum	537/541(99%)
A15	*Cladosporium herbarum*	732/734(99%)	A15	tür tespit edilememiştir	
A16	*Cladosporium tenuissimum*	684/712(96%)	A16	*Cladosporium tenuissimum*	537/541(99%)
A17	*Cladosporium tenuissimum*	698/726(96%)	A17	*Cladosporium tenuissimum*	536/544(99%)
A18	*Cladosporium tenuissimum*	732/735(99%)	A18	*Cladosporium tenuissimum*	532/536(99%)
A19	tür tespit edilememiştir		A19	tür tespit edilememiştir	
A20	*Cladosporium tenuissimum*	748/779(96%)	A20	*Cladosporium tenuissimum*	538/544(99%)
A21	*Cladosporium herbarum*	735/735(100%)	A21	tür tespit edilememiştir	
A22	*Cladosporium cladosporioides*	768/773(99%)	A22	tür tespit edilememiştir	
A23	tür tespit edilememiştir		A23	*Cladosporium cladosporioides*	538/543(99%)
C1	tür tespit edilememiştir		C1	*Trichothecium roseum*	596/603(99%)
C2	*Fusarium fujikuroi*	774/780(99%)	C2	tür tespit edilememiştir	
C3	*Acremonium implicatum*	688/716(96%)	C3	*Acremonium implicatum*	551/553(99%)
C4	tür tespit edilememiştir		C4	*Stereum gausapatum*	613/616(99%)
C5	*Aspergillus terreus*	621/622(99%)	C5	*Aspergillus terreus*	585/588(99%)

Tablo 4.2. Mikrofungusların β-tubulin ve ITS gen bölgelerine göre karşılaştırılması

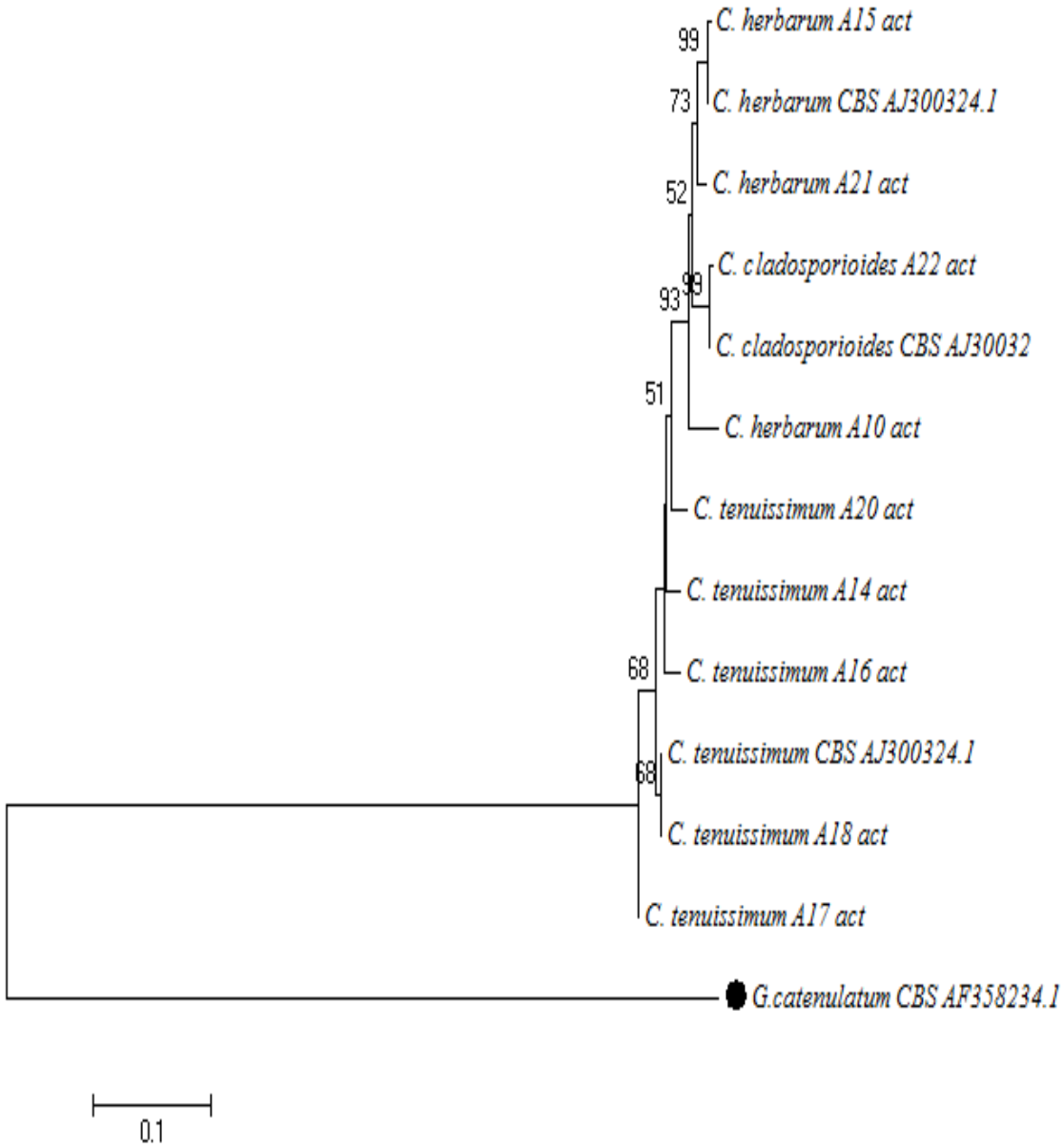
	β-TUBULİN	Maksimum Identification		ITS	Maksimum Identification
B1	*Penicillium chrysogenum*	734/738(99%)	B1	*Penicillium chrysogenum*	562/565(99%)
B2	tür tespit edilememiştir		B2	*Penicillium glabrum*	559/565(99%)
B3	tür tespit edilememiştir		B3	*Penicillium chrysogenum*	569/575(99%)
B4	tür tespit edilememiştir		B4	*Penicillium commune*	566/570(99%)
B5	*Penicillium brevicompactum*	733/743(99%)	B5	*Penicillium brevicompactum*	517/517(100%)
B6	tür tespit edilememiştir		B6	*Penicillium brevicompactum*	517/517(100%)
B7	*Penicillium citrinum*	672/677(99%)	B7	*Penicillium citrinum*	535/538(99%)
B8	tür tespit edilememiştir		B8	*Penicillium glabrum*	561/567(99%)
B9	tür tespit edilememiştir		B9	*Penicillium glabrum*	559/564(99%)
B10	tür tespit edilememiştir		B10	*tür tespit edilememiştir*	
B11	tür tespit edilememiştir		B11	*tür tespit edilememiştir*	
B12	tür tespit edilememiştir		B12	*Penicillium charlesii*	551/569(97%)
B13	tür tespit edilememiştir		B13	*tür tespit edilememiştir*	
B14	tür tespit edilememiştir		B14	*tür tespit edilememiştir*	
B15	tür tespit edilememiştir		B15	*Penicillium commune*	570/574(99%)
B16	*Penicillium viridicatum*	667/690(97%)	B16	*Penicillium commune*	567/573(99%)
B17	*Penicillium citrinum*	386/389(99%)	B17	*Penicillium citrinum*	538/541(99%)
B18	*Penicillium citrinum*	378/383(99%)	B18	*Penicillium citrinum*	539/547(99%)
B19	tür tespit edilememiştir		B19	*Penicillium griseofulvum*	541/546(99%)
B20	*Penicillium citrinum*	415/415(100%)	B20	*Penicillium citrinum*	540/544(99%)
B21	tür tespit edilememiştir		B21	*Penicillium glabrum*	561/567(99%)
B22	*Penicillium viridicatum*	719/726(99%)	B22	*Penicillium freii*	567/570(99%)
B23	*Penicillium italicum*	701/726(97%)	B23	*Penicillium brevicompactum*	517/517(100%)
B24	*Penicillium brevicompactum*	738/743(99%)	B24	*Penicillium brevicompactum*	517/517(100%)
B25	tür tespit edilememiştir		B25	*Penicillium commune*	573/577(99%)
B26	*Penicillium brevicompactum*	742/747(99%)	B26	*Penicillium brevicompactum*	517/517(100%)
B27	*Penicillium citrinum*	633/657(96%)	B27	*Penicillium citrinum*	534/538(99%)
B28	*Penicillium brevicompactum*	724/745(97%)	B28	*Penicillium brevicompactum*	535/535(100%)
B29	tür tespit edilememiştir		B29	*Talaromyces verruculosus*	565/572(99%)
B30	tür tespit edilememiştir		B30	tür tespit edilememiştir	507/512(99%)
B31	tür tespit edilememiştir		B31	*Aspergillus ochraceus*	567/569(99%)
B32	tür tespit edilememiştir		B32	*Aspergillus tubingensis*	586/594(99%)
B33	tür tespit edilememiştir		B33	*Davidiella sp1*	578/581(99%)
B34	tür tespit edilememiştir		B34	*Aspergillus fumigatus*	582/585(99%)
B35	tür tespit edilememiştir		B35	*Aspergillus sp1*	576/579(99%)
C1	tür tespit edilememiştir		C1	*Trichothecium roseum*	596/603(99%)
C2	tür tespit edilememiştir		C2	*tür tespit edilememiştir*	
C3	tür tespit edilememiştir		C3	*Acremonium implicatum*	551/553(99%)
C4	tür tespit edilememiştir		C4	*Stereum gausapatum*	613/616(99%)
C5	tür tespit edilememiştir		C5	*Aspergillus terreus*	585/588(99%)



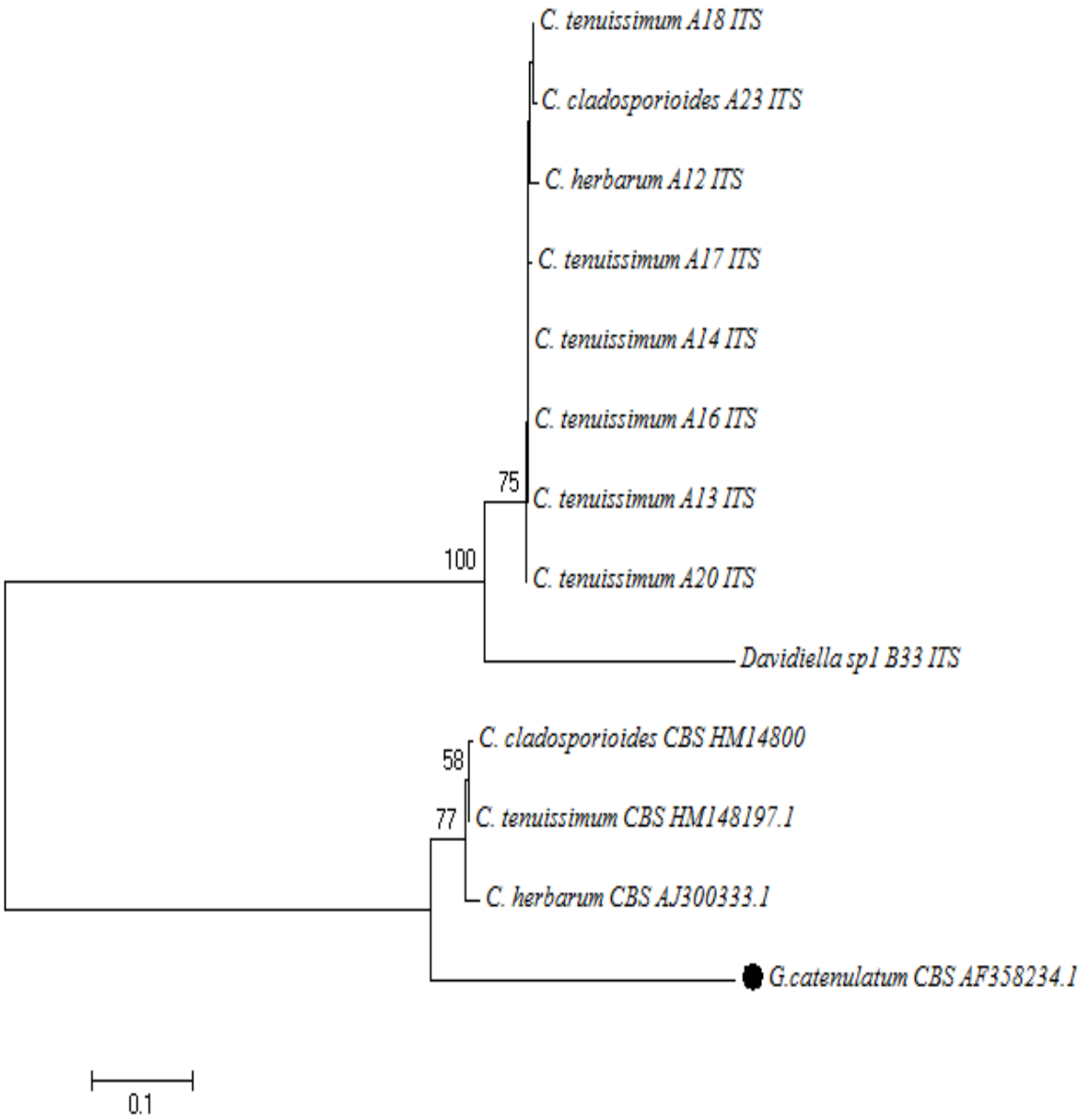
Şekil 4.1. Actin gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Alternaria* cinsine ait türlerin Neighbour-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları (%50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir)



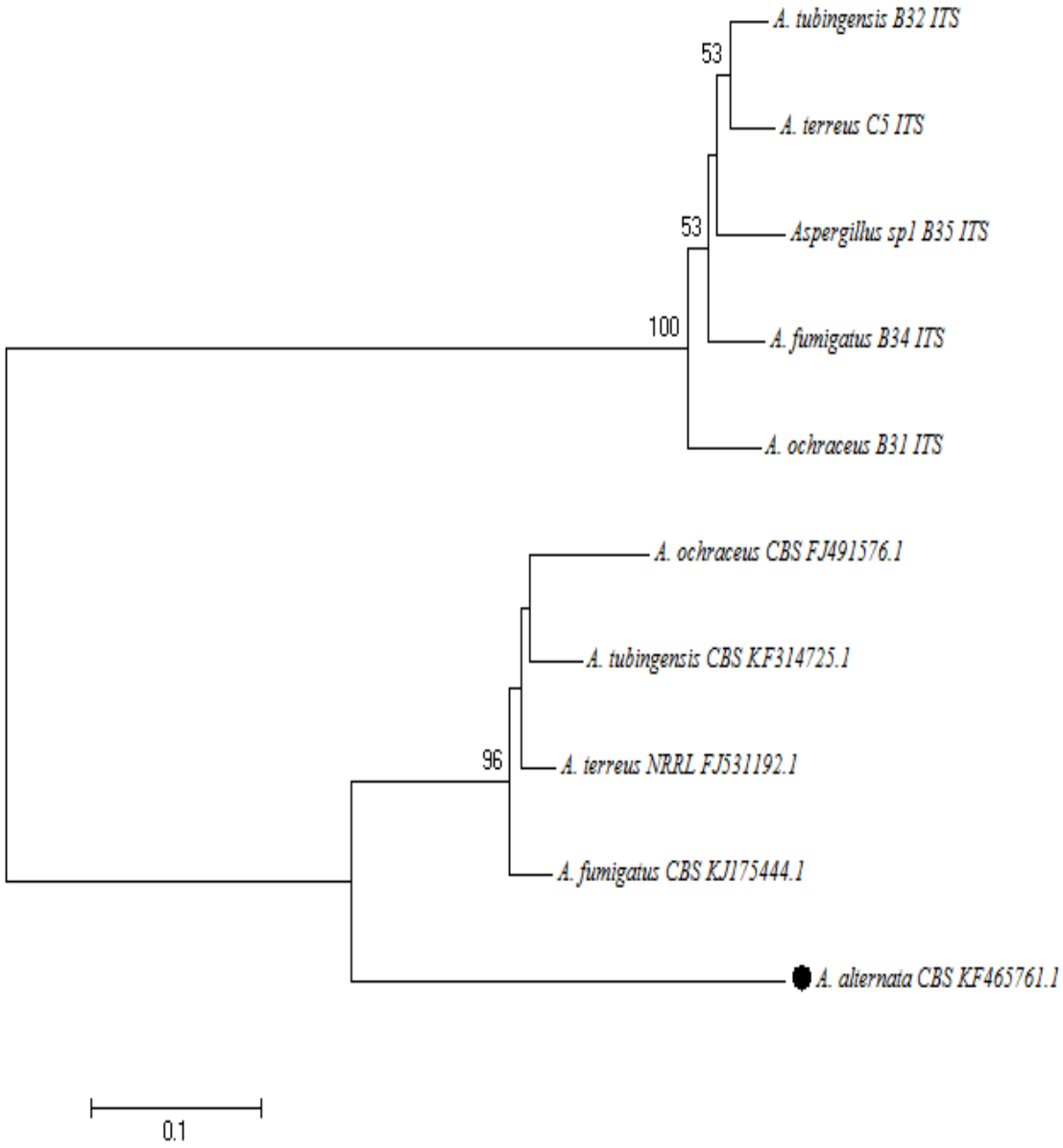
.**Şekil 4.2.** ITS gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Alternaria* cinsine ait türlerin Neighbour-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları (%50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir) .



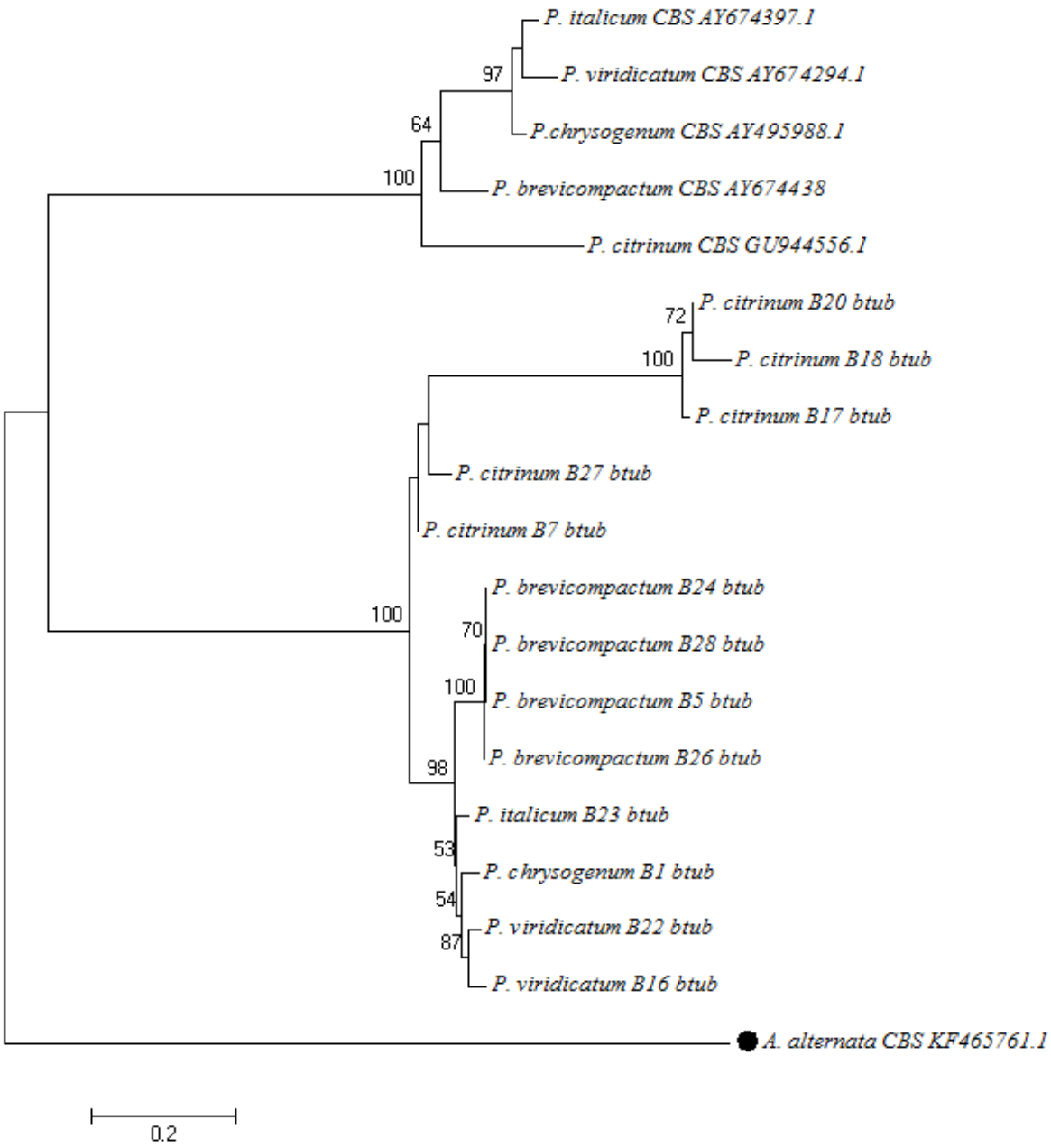
Şekil 4.3. Actin gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Cladosporium* cinsine ait türlerin Neighbour-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları (%50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir) .



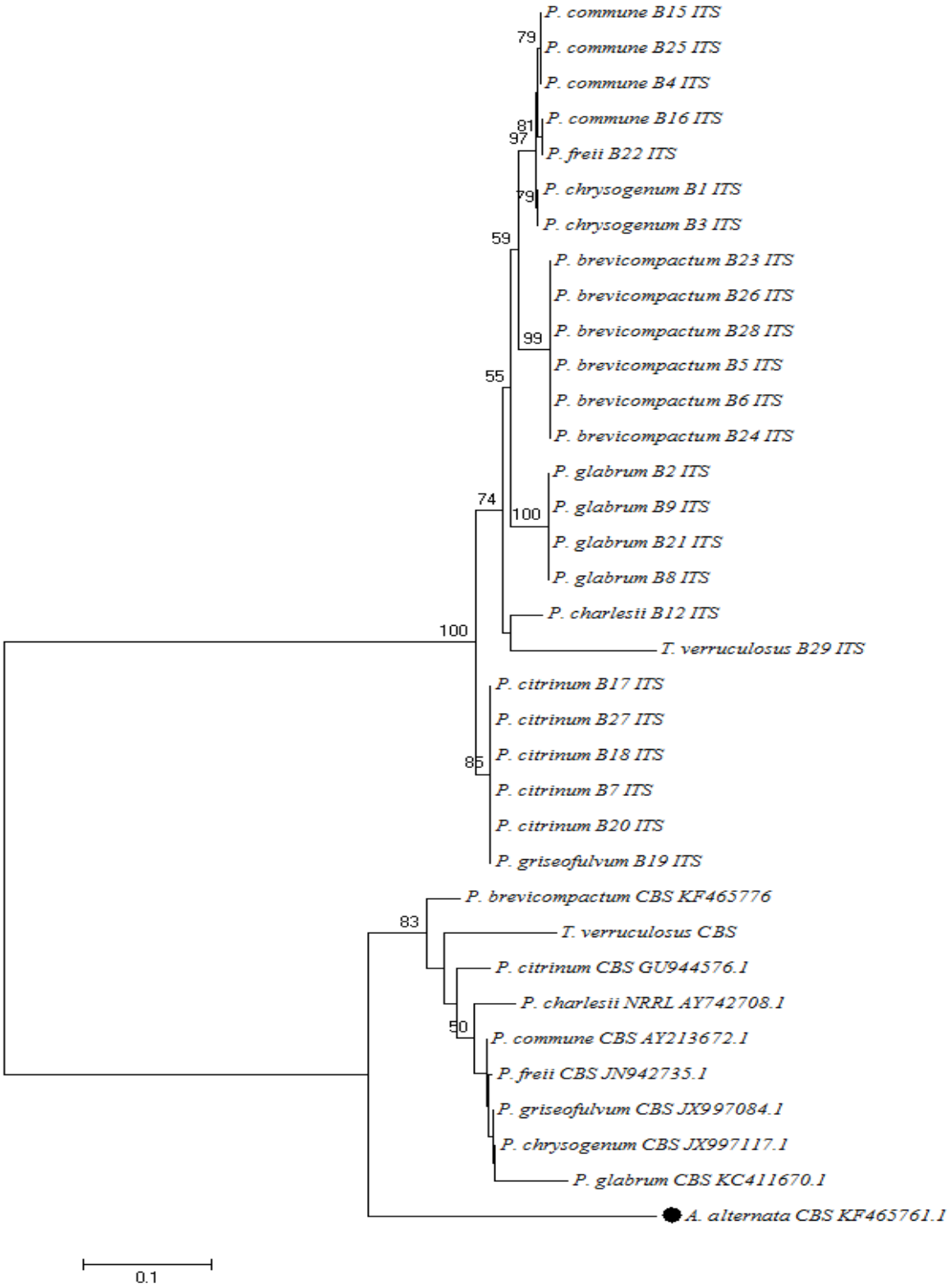
Şekil 4.4. ITS gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Cladosporium* cinsine ait türlerin Neighbour-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları (%50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir) .



Şekil 4.5. ITS gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Aspergillus* cinsine ait türlerin Neighbour-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları (%50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir) .



Şekil 4.6. β-tubulin gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Penicillium* cinsine ait türlerin Neighbour-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları (%50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir) .



Şekil 4.7. ITS gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Penicillium* cinsine ait türlerin Neighbour-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları (%50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir) .

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Moleküler tanımlama yöntemleri, gelişmekte olan teknolojinin mikrobiyoloji alanında sunduğu en önemli yeniliklerden biridir. Moleküler tanımlama tekniklerine her geçen gün bir yenisinin daha eklenmesi, farklı amaçlarla yürütülen bilimsel çalışmalara büyük kolaylıklar sağlamaktadır [48,49].

PCR, moleküler biyolojide geniş uygulama alanı ile güçlü bir yöntem olup, bu sayede her bir diziyi klonlayabilme, analiz ve modifiye edebilme ve hatta nadir dizileri bile saptayabilmeyi sağlamıştır.

Bu nedenle PCR; fungal genetik, toprak mikrobiyolojisi, medikal mikoloji, biyoteknoloji gibi mikolojinin pek çok ayrı dalında geniş uygulamaları kullanılmaktadır. PCR amplifikasyonu DNA dizisine dayalı bilgiler sağladığından, bugüne kadar fenotipik olarak tanımlanmış türlerin doğrulamasını yapmıştır [50].

PCR, hassasiyeti ve spesifikliği nedeniyle fungusların tanısında sıklıkla kullanılmaktadır. Fungusların ayrımı için PCR temelli analiz yöntemleri, spesifik primerlerin dizayn edilmesini gerekli kılmıştır. Bununla beraber, en azından hedef DNA bölgesinin bir kısmının bilinmesi gereklidir ki, bu durum hedef genin seçimini sağlayacağından PCR bazlı analizler için oldukça anlamlı olacaktır [51].

rRNA dizileri, yaşayan tüm hücrelerde bulunduğundan ve aynı görevi üstlendiğinden, taksonomik ve filogenetik çalışmalar için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu dizilerin evolüsyonunun; tüm genomun evolüsyonunu yansıttığı söylenebildiği gibi aynı zamanda farklılık gösteren ve korunmuş bölgeler de içermektedirler. Bu sayede farklı taksonomik gruplarda bulunan organizmaların karşılaştırma ve ayırımlarında kullanılmaktadır. Funguslarda nuklear rDNA, arka arkaya tekrar eden rDNA alt birimleri olarak organize olmuşlardır. Birinci alt birim küçük nuklear 18S rRNA, 5,8S rRNA ve büyük nüklear 28S rRNA genlerini içermektedir Birinci alt birimde genler ITS1 (internal transcribed spacer) ve ITS2 ile ayrılmıştır ve iki alt birim IGS (intergenic spacer) ile ayrılmıştır. Son rRNA geni (5S) fungal taksona bağlı olarak, tekrarlanmış alt birimler ile birlikte olabilir veya olmayabilir. 18S rDNA, nispeten yavaş evrim geçirir

ve uzak akraba organizmaların karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. Kodlama yapmayan (ITS ve IGS) bölgeleri daha hızlı evrim geçirir ve bir genustaki fungal türlerin veya bir türdeki suşların karşılaştırılması için kullanılmaktadır. 28S rDNA' nın bazı bölgeleri türler arasında farklılık göstermektedir [21]. Tanısal PCR'ın spesifikliğinde amplifikasyon için uygun hedef dizinin belirlenmesi gerekmektedir. Spesifiklik, farklı genuslar veya türlerin DNA dizileri ile hedef dizi arasındaki homolojinin derecesi ile belirlenmektedir.

ITS gibi DNA dizileri, farklı türler içerisinden tek bir türün saptanması için uygundur. Bununla beraber, rDNA'nın diğer dizilerinden; 18S rDNA, 28S rDNA ve mitokondriyel rDNA dizileri de spesifik primerler geliştirmek için kullanılmaktadır [48].

A grubu'ndaki toplam 23 mikrofungus örneğinden, Actin gen bölgesine bakıldığında 6 örneğin *Alternaria* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. 9 örneğin ise *Cladosporium* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. Toplamda 15 tür tespit edilmiştir.

ITS gen bölgesine bakıldığında ise 8 *Alternaria* cinsine ait tür tespit edilirken, 8 adet *Cladosporium* cinsine ait tür tespit edilmiştir. Toplamda 16 tür tespit edilmiştir.

B gurubundaki 35 mikrofungus örneği içerisinden, β-tubulin gen bölgesine bakıldığında, 14 adet *Penicillium* cinsine ait tür tespit edilirken, *Aspergillus* cinsine ait tür tespiti yapılamamıştır. Toplamda 14 örnek tespit edilmiştir.

Bununla beraber ITS gen bölgesine bakıldığında, 25 adet *Penicillium* cinsine ait tür tespit edilirken, 7 tür ise *Aspergillus* cinsine ait olarak tespit edilmiştir. Toplamda 32 tür tespit edilmiştir.

Blast analizi sonucunda tür tespiti için öncelikli olarak MI (Maksimum Identification) 'a dikkat edilmiştir bunun yanı sıra türlerin özellikle CBS, ATCC, NRRL gibi uluslararası standart suşlar ile benzer durumda olmasına dikkat edilmiştir.

Bu anlamda, her bir tür için hangi grupta ise ona göre "Actin" ve "β-tubulin" gen bölgelerine bakılmış ve ayrıca her örnek için "ITS" gen bölgesi ele alınmıştır.

Tespit edilen türlerin akrabalık düzeylerini incelemek amaçlı "Neighbour-Joining Algoritma Yöntemi" kullanılarak filogenetik ağaçlar çizilmiştir. *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsine ait türler için dış tür olarak *Alternaria alternata* (Strain/CBS KF465761.1), *Alternaria* ve *Caldosporium* türleri için ise dış tür olarak *Gliocladium catenulatum* (Strain/CBS AF358234.1) seçilmiştir. Tüm türlerin "type tür" leri yine

uluslararası suşlardan seçilmiş ve laboratuvar örnekleri ile akrabalık düzeyleri incelenmiştir. Filogenetik ağaç çizimi için, doğadaki en yaygın cinslerin (*Aspergillus, Penicillium, Cladosporium, Alternaria*) teşhis edilen türleri tercih edilmiştir.

Tüm analizlerin sonucunda, A grubuna mensup 23 örnekten actin gen bölgesi baz alınarak yapılan dizi analizi sonucunda 8 örnek tür düzeyinde teşhis edilememiş, ITS gen bölgesine yapılan dizi analizi sonucunda ise aynı 23 örnekten, 5 tanesi tür düzeyinde teşhis edilememiştir.

B grubuna mensup 35 örnek içerisinden β-tubulin gen bölgesi baz alınarak yapılan dizi analizi sonucunda 21 örnek tür düzeyinde teşhis edilememiş, ITS gen bölgesine yapılan dizi analizi sonucunda aynı 35 örnekten, 4 örnek tür düzeyinde teşhis edilememiştir.

C grubuna mensup toplam 5 örnek içinden actin gen bölgesi için bakıldığında, 2, β-tubulin gen bölgesi için bakıldığında 5, ITS gen bölgesi için bakıldığında 1 örnek tür düzeyinde teşhis edilememiştir. Sekens veri yetersizliği sebeiyle tüm bu örnekler tür düzeyinde teşhis edilememiştir.

Bir diğer sonuç olarak, *Acrodontium sp.,Aspergillus sp.,Davidiella sp.,* türleri uluslararası suşlar ile benzerlik göstermemektedir.

Tabloda görülebileceği üzere (Tablo 4.2.), B16 örneği için β-tubulin gen bölgesine bakıldığında, "*Penicillium viridicatum"* "MI =%97 oranında" tür teşhisi yapılırken, ITS gen bölgesine bakıldığında "*Penicillium commune"* "MI =%99 oranında" tür teşhisi yapılmıştır. Bu durumda, B16 örneği için ITS gen bölgesindeki sonuç, daha kaliteli istatistik sonuç verdiğinden, "*Penicillium commune"* türü B16 örneği için uygun bulunmuştur.

2. bir örnek olan, B23 örneği için β-tubulin gen bölgesine bakıldığında, "*Penicillium italicum"* "MI =%97 oranında" tür teşhisi yapılırken, ITS gen bölgesine bakıldığında "*Penicillium brevicompactum"* "MI =%100 oranında" tür teşhisi yapılmıştır. Bu durumda, B23 örneği için ITS gen bölgesindeki sonuç, daha kaliteli istatistik sonuç verdiğinden, "*Penicillium brevicompactum"* türü B23 örneği için uygun bulunmuştur.

Son zamanlarda tür teşhisi için yapılan moleküler analizlerde, protein kodlayan genler ön plana çıkmaktadır. Bu genler değişken bölge (intron) içerdiğinden tür tanısı

açısından oldukça anlamlıdır. Bu genler; elongation factor 1 alpha (TEF1 α), calmodulin (Cmd), β-tubulin (BenA), actin (Act) ve histone (HIS) genleridir [52].

Bu çalışmada, saf kültür olarak laboratuvar ortamından izole edilen bazı mikrofunguslarda ITS, Actin ve β-tubulin gen bölgelerine göre tür teşhisi yapılmıştır.

Çalışmanın sonucu olarak, çoğu mikrofungus türünün ITS ve ilgili gen bölgesinin (actin ve/veya β-tubulin) aynı türü teşhis etmesiyle başarılı olduğu söylenebilir. Bir örnek için farklı tür teşhisi yapan ilgili gen bölgeleri için, önce "MI" incelenmiş daha sonra filogenetik ağaç çizimleri ile türlerin birbirlerine olan uzaklıkları (akrabalık düzeyleri) incelenerek, tür teşhisleri desteklenmiştir.

Tür tespiti yapılamayan örnekler için, çalışma bir adım daha ileriye götürülerek cinse spesifik farklı bir gen bölgesinin araştırılması ve incelenmesi alternatif bir durum sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

[1] Kavanagh, K., ***Fungi Biology and Applications,*** 2nd Edition, Department of Biology National University of Ireland Maynooth, Nobel Akademik Yayıncılık, (2014).

[2] Bretscher, A., Berk, A., Kaiser, C., Lodish, H., Ploegh, H., Scott, M., Krieger, M., Matsudaira, P., ***Moleküler Hücre Biyolojisi,*** Palme Yayıncılık, Ankara (2000).

[3] Sümer, S. ***Genel Mikoloji.*** Nobel Yayın Dağıtım, (Ankara, İstanbul, İzmir, 2006).

[4] Kayser, F., Bienz, K., Eckert, J., Zinkernagel, R., ***Tıbbi Mikrobiyoloji***, Nobel Tıp Kitabevleri, (2000).

[5] Öner, M., ***Genel Mikrobiyoloji,*** Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, (1986).

[6] Mohovic, J., Gambale, W., Croce, J., ***Food spoilage microorganisms Woodhead Publishing***, Advances in food mycology, Springer, 371 pp., (2006).

[7] Mohovic, J., Gambale, W., Croce, J., ***Cutaneous positivity in patients with respiratory allergies to 42 allergenic extracts of airborne fungi isolated in São Paulo,*** Brazil, 1988.

[8] Kanbe, T., Yamaki, K., Kikuchi, A. ***Identification of the Pathogenic Aspergillus Species By Nested PCR Using a Mixture of spesific Primers To DNA Topoisomerase II Gene ,*** Microbiol. Immunol., (2002).

[9] Kantarcıoğlu, A.S., Yücel, A., ***Aspergillus Cinsi Mantarlar ve İnvaziv Aspergilloz: Mikoloji, Patogenez, Laboratuvar Tanımı, Antifungallere Direnç ve Duyarlılık Denyleri,*** Cerrahpaşa Tıp Dergisi, (2003).

[10] Özyaral, O., Germeyan, H., Johansson, B. C., ***İstanbul'da Ev Tozu Küfleri Üzerine Çalışmalar 1.Yatak Tozu Küf Florasının Saptanması***, Mikrobiyoloji Bülteni, (1988).

[11] Yücel, A., Kantarcıoğlu, A. S., ***Müzelerdeki Eserlerin Bozulmasında Mikropların Rolü,*** Kültür Bakanlığı Yayınları, (2004).

[12] Şimşekli, Y., Asan, A., Gücin, F., ***Bursa İlinin Çeşitli Semtlerinde Ev Dışı Havasında Bulunan Penicillium, Aspergillus Türleri ve Mevsimsel Dağılımları***, Kükem Dergisi, (1998).

[13] Güner, H., Aysel, V., Sukatar, A., ***Tohumsuz Bitkiler Sistematiği Cilt II,*** Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi no 138, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova İzmir, (1996).

[14] Çetinkaya, E., Ayhan, K., ***Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler,*** Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Dışkapı Ankara, ( ).

[15] Ettenauer, J., Pinar, G., Tafer, H., Sterflinger, K., ***Quantification of fungal abundance on cultural heritage using real time PCR targeting the β-actin gene***, Department of Biotechnology, Vienna Institute of Biotechnology, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria, (2014).

[16] Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K. H., ***Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation,*** Microbiol. Rev. 59, 143–169, (1995).

[17] Hugenholtz, P., Goebel, B. M., Pace, N. R., ***., Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity,*** J. Bacteriol. 180, 4765–4774, (1998).

[18] Hugenholtz, P., Pace, N. R., ***Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach.*** Trends Biotechnol. 14, 190–197 10.1016/0167-7799(96)10025-1, (1996).

[19] Borneman, J., Hartin, J. R., ***PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes From Environmental Samples.,*** Applied And Environmental Microbiology, (2000).

[20] Gezgin, T., Karakaya, M., ***Et ve Et Ürünlerinin Kalitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Biyolojik Yöntemler,*** Gıda Teknolojisi 15 (5), 90-96, (2011).

[21] Edel, V., ***Polymerase Chain Reaction İn Mycology: An Overview,*** P:357, Bridge PD, CAB1 Publishing, Wallingford,(1998).

[22] Seifert, K., Samson, R., Dewaard, J., Houbraken, J., Levesque, C.A., Moncalvo, J., Seize, G., Hebert, P., ***Prospects For Fungus İdentification Using CO1 DNA Barcodes, With Penicillium As a Test Case,*** University Of Philadelphia, PA, (2007).

[23] Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Wheeler, D. L., ***GenBank, Nucleic Acids Res., 36(Database issue): D25–D30***, (2008).

[24] www.mmrl.med.usyd.edu/au/fungalid.html

[25] Kurtzman, C. P., Robnett, C. J., ***Identification and phylogeny os ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences,*** Ant Leeuwenhoek 73:331–371, (1998).

[26] Druzhinina, I., Kopchinskiy, AG., Komon, M., Bissett, J., Szakacs, G., Kubicek, CP., ***An oligonucteotide barcode for species identification in Trichoderma and Hypocrea.*** Fungal Genet Biol 42:813–828., (2005).

[27] Kõljalg, U., Larsson, K-H., Abarenkov, K., Nilsson, RH., Alexander, IJ., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjøller, R., Larsson, E., ***a database providing web-based methods fort he molecular identification of ectomycorrhizal fungi,*** New Phytol., 166:1063–1068., (2005).

[28] Samson, RA., Seifert, KA., Kuijpers, AFA., Houbraken, JAMP., Frisvad, JC., ***Phylogenetic analysis of Penicillium subgenus Penicillium using partial β-tubulin sequences***, Stud. Mycol. 49:175–200., (2004).

[29] Geiser, DM., Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veerarahavan, N.,Ward, T., Zhang, N., Kuldau, G., O'donnell, K., Eur. J.Plant.Pathol., ***Fusarium-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium,s*** 110:473–479, 2004.

[30] Hugnes, T., Rogers, Tr., Haynes, K., ***PCR Diagnostics İn Medical Biology***, Bridge PD, CAB1 Publishing, Wallingford, 1998.

[31] Einsele, H., Hebart, H., Roller, G., Löffler, J., Rothenhöfer, I., Müller, C.A., Bowden, R.A., van Burik, J.-A., Engelhard. D., Kanz, L., Schumacher, U., ***Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes.***, J.Clin.Microbiol., 35:1353-1360, 1997.

[32] Ferrer, C.,Colom, F., Frases, S.,Mulet, E., Abad, J.L.,Alio, J.L., ***Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typingin ocular infections,*** J.Clin.Microbiol. 39:2873-2879, 2001.

[33] Henry, T., Iwen, P.C.,Hinrichs, S.H**.,** ***Identification of Aspergillus species using internal transcribed spacer regions 1 and 2***, J. Clin. Microbiol. 38: 1510-1515., 2000.

[34] Jaeger, E.E.,Caroll, N.M., Choudhury, S., Dunlop, A.A.,Towler, H.M., Matheson, M.M., Adomson, P., Okhravi, N., and Lightman, S., ***Rapid Detection and identification of Candida, Aspergillus, and Fusarium species in ocular samples using nested PCR***, j.Clin.,microbiol. 38: 2902-2908, 2000.

[35] Zukerkandl, E., Pauling, L., ***Molecules as documents of evolutionary history***, J. Theor. Biol. 8:357-366, 1965.

[36] Woese, C. R., Fox, G. E.,***Phlyogenetic structure of the prokaryotic domains: the primary kingdoms***, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5088-5090, 1977.

[37] Daubin, V., Gouy, M., ***Bacterial Molecular phylogeny using supertree approach. Genome. Inform. Ser. Workshop Genome Inform***, 12:155-164, 2001.

[38] Korbel, J.O., Snel, B., Huynen, M.A.,Bork, P., ***SHOT: a web server fort he construction of genome phylogenies***, Trends Genet. 18:158-162, 2002.

[39] Wolf, Y. I., Rogozin, I.B., Grishin, N.V.,Tatusov, R.L., Koonin, E.V.,***Genome trees constructed using five different approaches suggest new majör bacterial clades***, BMC Evol. Biol. 1:8, 2001.

[40] Nei, M., Li, W.H., ***Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases***, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5269-5273, 1979.

[41] Tajima, F., Nei, M., ***Biases of the estimates of DNA divergance obtained by the restriction enzyme technique,*** J. Mol. Evol. 18:115-120, 1982.

[42] Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., ***Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene***, J. Clin. Microbiol. 35:1216-1223, 1997.

[43] Hassouna, N., Michot, B., Bachellerie, J., ***The complete nucleotide sequence of Mouse 28S rRNA gene. Implications fort he process of size increase of the large-subunıt rRNA in higher eukaryotes***, Nucleic Acids Res. 12:3563-3583.

[44] Kuzoff, R.K., Sweere, J.A., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Zimmer, E.A., ***The phylogenetic potential of entire 26S rRNA sequences in plants***, Mol. Biol. Evol. 15:251-263,1998.

[45] Kasuga, T.J., Taylor, J.W., White, T.J., ***Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus Histoplasma Capsulatum***, Darling. J. Clin. Microbiol. 37:653-663, 1999.

[46] Lutzoni, F., Pagel, M., ***Accelerated evolution as a consequence of transitions to mutualism***, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:11422-11427, 1997.

[47] David A. Relman, David H. Persing, Elizabeth R. Unger, Fred C. Tenover, James Versalovic, Thomas J. White, Yi-Wei Tang, ***Moleküler Mikrobiyoloji (Tanı Presibleri ve Uygulamalar)***, Palme Yayıncılık,S:724, Ankara,2006.

[48] Abacı, Ö., Haliki, A., ***Fungal Tanıda Kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu***, Orlan On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, İzmir,2005.

[49] Bridge, P.D.,Arora D.K., ***Interpretation of PCR methods for Species Definition***, P:357, 63-84, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, 1998.

[50] Takamatsu, S., ***PCR Applications in Fungal Phylogeny***, P:357, 125-152, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, 1998.

[51] Manian, S., Sreenivasaprasad, S., Mills, P.R., ***DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi***, 307-310, Letters in Applied Microbiology, 2001.

[52] Samson, R. A, Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C. and Andersen, B. ***Food and Indoor Fungi***, CBS KNAW Fungal Diversity Centre, (Utrecht, The Netherlands, 2010).

ÖZGEÇMİŞ

19.03.1990 tarihinde Sarıyer/İSTANBUL'da doğdum. 2004 yılında Beykop Ali Çebi İlköğretim Okulu'nda ilköğrenimimi, 2008 yılında ise İstanbul Büyükçekmece YDA Lisesi'nde orta öğrenimimi tamamladım. Lisans öğrenimimi 2012 yılında Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladım. 2012 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programına başladım.