

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2019-YL-045

AYDIN İLİNDE BULUNAN TERMOFİLİK
ÇEVRELERDEN İZOLE EDİLEN
TERMOTOLERANT FUNGUSLARIN
MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER TANISI

Yusuf GEROĞLU

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. H. Halil BIYIK

AYDIN

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Yusuf GEROĞLU tarafından hazırlanan “Aydın İlinde Bulunan Termofilik Çevrelerden İzole Edilen Termotolerant Fungusların Morfolojik ve Moleküler Tanısı” başlıklı tez, 24.06.2019 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	:		
Üye	:		
Üye	:		

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gönül AYDIN
Enstitü Müdürü

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

.../.../20..

Yusuf GEROĞLU

ÖZET

AYDIN İLİNDE BULUNAN TERMOFİLİK ÇEVRELERDEN İZOLE EDİLEN TERMOTOLERANT FUNGUSLARIN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER TANISI

Yusuf GEROĞLU

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. H. Halil BIYIK
2019, 67 Sayfa

Aydın ilindeki termal su kaynaklarından ve kaynaklara yakın bölgelerdeki, Buharkent, Germencik, Salavatlı, Kuyucak ve İmamköy lokalitelerinden ilkbahar ve sonbahar aylarında aseptik şartlarda toprak ve su örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler, uygun dilusyonlarda RBKA besiyerine steril koşullarda yayma ekim yöntemiyle ekilerek inkübasyona bırakılmış ve karışık kültürlerinin izolatları elde edilmiştir. Karışık izolatlar PDA besiyerine üç nokta ekim yöntemiyle ekilip saflaştırılmış ve stok kültürleri yapılmıştır. Önce morfolojik sonra moleküler tür tanısı yapılmış. İzole edilen funguslardan DNA izolasyonu; DNA izolasyon protokolüne göre yapılmıştır. İzole edilen DNA örneklerinden ITS gen bölgeleri PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Sekanslama ile gen dizileri elde edilmiştir. Mikrofungusların sekans analizi BİOEDİT programı kullanılarak yapılmıştır. Sekans analizi yapıldıktan sonra elde edilen dizi verileri GENBANK'taki verilerle karşılaştırılmış ve türlerin moleküler tanısı yapılmıştır. Tanısı yapılan türlerin birbiriyle olan akrabalık derecesini araştırmak için MEGA programı kullanılmış ve analizi yapılmıştır. Fungusların gelişimini etkileyen toprağın içindeki organik-inorganik madde ve nem oranı dikkate alınarak örnek alım yerlerindeki toprak analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Westerdykella*, *Talaromyces*, *Lichtheimia*, *Sarcopodium*, *Scedosporium* ve *Curvularia* cinsi funguslara ait türler morfolojik ve moleküler olarak tanılanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Termofilik, Termotolerant, Fungus, ITS, rDNA, Moleküler Tanı, Morfolojik tanı, Termal Su Kaynakarı.

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF THERMOTOLERANT FUNGI ISOLATED FROM THERMOPHYLIC ENVIRONMENT IN AYDIN

Yusuf GEROĞLU

M. Sc. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. H. Halil BIYIK

2019, 67 Pages

Soil and water samples were collected in aseptic conditions in spring and autumn from the localities Buharkent, Germencik, Salavatlı, Kuyucak and İmamköy regions in Aydın province close to the thermal water sources. The samples were cultured in the appropriate dilutions on RBKA medium in sterile conditions and incubated. Isolated of mixed cultures were obtained. Mixed isolates were planted in PDA medium by three-point planting method and stock cultures were prepared. Firstly morphological diagnosis of the species was made and then molecular diagnosis of the species made to DNA isolated from fungi. Than used DNA isolation procedure. ITS gene regions was used for PCR. Gene sequences were obtained. Sequence analysis of microfungi was performed using BIOEDIT program. After the sequence analysis, obtained sequence data were compared with the data in GENBANK and the molecular diagnosis of the species was made. The MEGA program was used and analyzed to investigate the degree of affinity of the species identified. MEGA was also used to obtain genetic similarity of fungi to each other. Soil analysis at sampling sites was performed by taking into consideration the organic-inorganic matter and moisture content of the soil affecting the development of fungi. In this study, species belonging to *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Westerdykella*, *Talaromyces*, *Lichtheimia*, *Sarcopodium*, *Scedosporium* and *Curvularia* species were determined morphologically and molecularly

Key Words Thermophilic, Thermotolerant, Fungus, ITS, rDNA, Molecular Characterization, Morphological Characterization, Thermal Water Resource.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans Tez çalışmamda ve diğer bilimsel araştırmalarımnda her zaman yanımda olan bütün zamanını bana ayıran, yeri geldiğinde baba gibi, yeri geldiğinde yol gösterici ve iş arkadaşı gibi davranan bilgi birikimini, maddi ve manevi her türlü desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli Tez danışmanı hocam Sayın Prof. Dr. H. Halil BIYIK'a saygı ve sevgilerimle sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamda maddi, manevi desteği ve bilgileri ile her zaman yanımda olan, aynı zamanda çalışmamın ilerlemesi için laboratuvar tecrübeleriyle bana yön veren, zamanını bana ayıran çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Esin POYRAZOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez çalışmamda manevi desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Ömer Barış ÜZÜM, Prof. Dr. Aziz AVCI, Doç. Dr. Can YILMAZ, Dr. Bahadır TÖRÜN, Zeynep ÜN ve Mehmet TURAL'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda bana sabır gösteren, saygısıyla, sevgisiyle, maddi ve manevi desteğiyle her an yanımda olan eşim Gülşah GEROĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için maddi kaynak sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne (BAP Proje no: ADÜ- FEF-15011) teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında beni ayakta tutan, maddi ve manevini desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok kıymetli ailem; M. Raci GEROĞLU, Şükran GEROĞLU, Cüneyt GEROĞLU, Kerem Fatih GEROĞLU, Hilal GEROĞLU ve Cengiz GEROĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Yusuf GEROĞLU

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Araştırma Materyali	19
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler	21
3.1.3. Kullanılan Cihaz ve Aletler.....	28
3.2. Örneklerden Mikrofungus İzolasyonu.....	30
3.2.1. Toprakta Örneklerin Elde Edilmesi.....	30
3.2.2. Toprak Analizi	31
3.2.3. Mikrofungus İzolasyonu ve Stok Kültür	33
3.2.4. Mikrofungusların Morfolojik Tanısı	34
3.2.5. Total DNA İzolasyonu	36
3.2.5.1. Fenol-Kloroform DNA izolasyon yöntemi	37
3.2.5.2. Genematrix Fungus DNA izolasyon kit yöntemi	38
3.2.6. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	40
4. BULGULAR.....	42

5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	52
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	65



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

μ l	: Mikrolitre
AFTOL	: Assembling the Fungal Tree of Life
bç	: Baz Çifti
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
dNTP	: Deoxyribonucleotide Triphosphate
EDTA	: Etilen DiaminTetra Asetik Asit
FTS	: Fizyolojik Su
MEA	: Malt Ekstrat Agar
Nm	: Nanometre
PCI	: Fenol Kloroform İzoamilalkol
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	: Patates Dekstroz Agar
RBKA	: Rose Bengal Kloramfenikol Agar
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
STE	: Sodyum Tris EDTA
TE	: Tris EDTA
UV	: Ultraviyole ışığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bir fungus: Bir isim (Dual Nomenclature to 'One Fungus, One name').....	6
Şekil 1.2. Son yıllarda ismi değişen termofilik ve termotolerant mikrofungus türleri	7
Şekil 3.1. Arazi çalışmalarının yapıldığı lokaliteler.....	19
Şekil 3.2. Yeraltı su kaynağının bulunduğu alanlar (Buharkent ve Germencik lokaliteleri).....	20
Şekil 3.3 Termofilik alanlardan toprak örneklerinin alınması (Buharkent)	20
Şekil 3.4. a) GenMark, O Gene Ruler 100 bp- 3000 bp (GM100-LC) b) GeMark, O Gene Ruler 50 bp- 1000 bp (GM50-LC)	28
Şekil 3.5. UV görüntüleme ve nanodrop cihazı	29
Şekil 3.6. Liyofilizatör ve inkübatör cihazı	30
Şekil 3.7. Otoklav ve PCR cihazı.....	30
Şekil 3.8. RBKA ve PDA besiyeri karışık fungus kültürü.....	34
Şekil 3.9. <i>Aspergillus niger</i> 'in mikroskopik görüntüsü.....	35
Şekil 3.10. <i>Aspergillus niger</i> 'in makroskopik görüntüsü ve YpSs Agar besiyerinde kültürü	35
Şekil 3.11. <i>Aspergillus niger</i> 'in spor ve misel yapısının makroskopik görüntüsü.	36
Şekil 3.12. <i>Rhizopus oryzae</i> 'nin mikroskopik ve kültür görüntüsü.....	36
Şekil 3.13. Genomik DNA UV görüntüleme cihaz görüntüsü.....	39
Şekil 3.14. rDNA (18S, 28S) ITS gen bölgeleri, çalışma prensibi.....	40
Şekil 3.15. ITS gen bölgesi çoğaltılan PCR ürünlerinin UV görüntüleme cihazında görüntüsü.....	41
Şekil 4.1. Laktofenol pamuk mavisiyle boyanan spor örnekleri. a) <i>Aspergillus fumigatus</i> , b) <i>Aspergillus terreus</i> , c) <i>Penicillium spp.</i> , d) <i>Trichoderma harzanium</i>	42

Şekil 4.2. Fungus kültür örnekleri. a) <i>Aspergillus flavus</i> , b) <i>Mucor circilinooides</i> , c) <i>Aspergillus terreus</i> , d) <i>Trichoderma harzanium</i>	43
Şekil 4.3. BioEdit 7.2.5 programında DNA dizi analiz sonuçları.	44
Şekil 4.4. Nükleik asit dizisinin NCBI’da blastlanması	44
Şekil 4.5. NCBI blast sonucu dizi analizi.....	45
Şekil 4.6. Blast sonuçlarının GenBank’taki verilerle karşılaştırması	45
Şekil 4.7. Fungus türlerin MEGA 6.06 programındaki nükleotit dizi karşılaştırmaları	46
Şekil 4.8. Mikrofungus türlerinin maksimum parsimoni filogeni ağacı.....	47
Şekil 4.9. Fungus haplotiplerinin (ITS gen bölgesi) UPGMA uzaklık ağacı	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Arazi çalışmalarının yapıldığı lokaliteler ve koordinatları.	21
Çizelge 3.2. RBKA besiyeri bileşenleri ve oranları	21
Çizelge 3.3. PDA besiyeri bileşenleri ve oranları	22
Çizelge 3.4. YpSs besiyeri bileşenleri ve oranları.....	22
Çizelge 3.5. MEA besiyeri bileşenleri ve oranları	23
Çizelge 3.6. FTS çözeltisi bileşenleri ve oranları.....	23
Çizelge 3.7. Malt Broth besiyeri bileşenleri ve oranları.....	23
Çizelge 3.8. Laktofenol pamuk mavisi stok çözelti oranları	24
Çizelge 3.9. Laktofenol pamuk mavisi çözelti bileşen ve oranları.....	24
Çizelge 3.10. Tween-80 çözeltisi bileşen ve oranları.....	24
Çizelge 3.11. STE tamponu bileşen ve oranları	25
Çizelge 3.12. 10X TBE bileşen ve oranları.....	26
Çizelge 3.13. 6X Loading Dye bileşen ve oranları	26
Çizelge 3.14. 6X TE bileşen ve oranları	27
Çizelge 3.15. Toprak örneklerinin gravimetrik ölçüm metoduyla ölçümleri	31
Çizelge 3.16. Toprak analizleri ve verileri	32
Çizelge 3.17. Nanodrop spektrofotometre DNA derişimi.....	39
Çizelge 3.18. PCR reaksiyon koşulları.....	40
Çizelge 4.1. Mikrofungus izolatlarının numara, isim, derece, tür isimleri ve accession numaraları.....	49

1. GİRİŞ

Termofilik ve termotolerant terimi, gerçekte “ısı seven”, anlamına gelen çok farklı mikroorganizma grupları arasında ortaya çıkan bir özelliktir. Termofilik özelliğe sahip organizmalar Bakteriler ve Arkea'larda gözlenirken, hipertermofiller ise çoğunlukla Arkea'lardan oluşmaktadır. Bununla birlikte, termotolerant özelliğe mikroorganizmalar belirli yüksek sıcaklıklarda gelişebilme özelliğine sahiptir. Funguslarda görülen termotolerant özelliği; 45 °C ile 55 °C arasındaki her sıcaklıkta gelişebilme özelliği termotolerant olarak sınıflandırılır. Ökaryota domaininde yüksek sıcaklıklarda yaşam nadir görülen bir fenomendir.

Bilinen tahmini 600.000 mantardan sadece küçük bir kısmın termofilik olduğu kabul edilir ve 45 ila 55 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilirler. Bununla birlikte, mantarlardaki termofiller; bakteri veya archaea'daki kadar ekstrem olmasa da bazı türleri sıcak su kaynaklarında veya hidrotermal bacalarda 113 °C'ye varan sıcaklıklarda büyüebilirler. Üstelik bu durum termofilik organizmaların nasıl var olduğunu ve çoğu yaşam formu için ölümcül olan sıcaklıklarda yaşabildiklerini anlamak için önemli olmuştur. Fungus alemindeki termofilinin yeni termal nişler elde etmek için bir adaptasyon yerine günlük yüksek sıcaklıklara ve mevsimsel değişimlere adaptasyon olduğu tahmin edilmektedir. Termofilik funguslar bu dünyada geliştiklerinden beri doğanın ekonomisinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Biyoteknolojik önemleri yanında ,mantar kompostları hazırlamada da oldukça önemli organizmalardır (Maheshwari ve ark., 2000).

Tez çalışmamızın amacı; termofilik ve termotolerant mikrofungusların biyoteknolojik öneme sahip olmaları, ülkemizde 140'a yakın jeotermal saha bulunmasına rağmen bu alanlarda termofilik ve termotolerant mikrofunguslarla ilgili yapılmış çok fazla çalışmanın bulunmaması, izole edilen fungusların morfolojik tanılamasının yanında moleküler yöntemler kullanılarak, en doğru sonuca ulaşılmasıdır.

Termofilik Fungusların Tanımlanması

Mikrofunguslar çevre ve geliştikleri sıcaklık koşullarına göre termotolerant ve termofilik olarak sınıflandırılmıştır. Termotolerant funguslar için, en düşük 25 °C ile en yüksek 40 °C'de gelişim göstermektedir. Termofilik funguslar ise en iyi

geliştikleri sıcaklık aralığı 40-57 °C olarak tanımlanırken en yüksek sıcaklık 61°C üreyebildikleri daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir (Romanelli ark., 1975).

Fungusların birçoğu, 40-45 °C'den yüksek sıcaklıklarda gelişemedikleri için termofilik funguslar uzun süre fark edilmemiştir. Yaklaşık yüz yıl önce Lindt tarafından ekmekten *Mucor pusillus* türü izole edilmiştir. Lindt'in yaptığı bu çalışma izole edilen ilk termofilik fungus olma özelliğini taşımaktadır. Daha sonra Tsiklinskaia tarafından *Thermomyces lanuginosus* patatesden izole etmiştir. Bu küflerin her ikisi de tesadüfen keşfedilmişlerdir. Hugo Mische, termofilik funguslar ile ilgili geniş araştırmalar yapan ilk kişi olmuştur. Mische'in yaptığı çalışmalardan dolayı termofilik fungusların temel yaşam koşulları belirlenmiştir. Allen ve Emerson, bitki kümelerinin içerdiği besinlerin, hacminin ve havalandırma koşullarının termofilik fungusların üremelerine etkisini göstermişlerdir. Bu çalışmalardan sonra, Cooney ve Emerson'un 1964'te izole ettikleri 13 termofilik fungus türünü yaşama ortamlarına göre sınıflandırmış ve bu alanda çalışmaların artmasını sağlamışlardır (Deacon ve ark., 2007).

Termofilik fungusların tanımlanması zor ve oldukça karmaşıktır. İlk sınıflandırmalarda, İngilizce dışındaki dillerde yazılışları, tür adlarında karışıklıklara neden olmuştur. Bu nedenle fungusların bazı türleri birden fazla adla açıklanmış ve yeni sınıflandırma yapıldığında aynı funguslar farklı adlar ile tanımlanmıştır. Örneğin, *Thermomyces lanuginosus*, *Humicola lanuginosa* gibi türler birçok adla adlandırılmaktadır. Fungusların eşeyli ve eşeysiz üreme evrelerine göre sınıflandırılmaları farklı adlar almalarında karışıklığa neden olmaktadır. Örneğin, *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile* eşeysiz evredeki adı, *Myceliophthora thermophile* eşeyli evredeki adıdır. Termofilik fungusların tanımlanmasının zorluğu termofilik ve termotolerans ayırım ile daha da artmıştır. Termofilik olarak tanımlanmış *Achaetomium thermophilum*, *Sordaria thermophila*, *Gilmaniella thermophila* türleri günümüzde termotoleran olarak bilinmektedir (Maheshwari ve ark., 2000).

Crisan (1973) termofilik mikrofungusların termofilik özelliklerini açıklayan bazı hipotezler öne sürmüştür. Mikroorganizmalardaki yağ asitlerinin tipleri, üreme sıcaklıklarını belirlemekte ve gelişimlerini etkilemektedir. Yüksek sıcaklıklarda hücre içinde ve hücre zarının yapısında bulunan yağların erimesi gerçekleşebilir ve hücrenin bütünlüğü yok olabilir. Üreme ısıları yükseldikçe birçok hücrede genellikle doymuş yağ asitleri görülmektedir (Crisan ve ark., 1973).

Termofilik Fungusların Termofili Mekanizması

Termofilik mikroorganizmalar doymuş yağ içerdikleri için, yüksek ısılarda hücresel özelliklerini termotolerantlara göre daha iyi koruyabildiği gözlenmiştir. Yağların en önemli kısmı hücre zarında bulunan fosfolipitlerdir. Yağ asitlerinin saturasyonundaki değişiklik hücre içinde gerçekleşen metabolik olayları etkilemektedir. Yüksek sıcaklıklarda hücre zarındaki akışkanlık artmakta ve hücre içindeki sıvı miktarı düştüğü için geçirgenlik değişmektedir. Bu yönden bakıldığında, Crisan tarafından önerilen lipit çözünürlük hipotezi kabul edilebilir. İkinci bir hipoteze göre, temel metabolitlerin tekrar tekrar hızlı sentezinin olmasıdır. Termofilik mikroorganizmaların bilinen metabolik yollar dışında bir mekanizmaya sahip olmadıkları yapılan çalışmalarda desteklenmiştir. Çeşitli ısıya dirençli enzimler izole edilmiş, ancak hepsinde ortak olan bir enzim ya da makromolekül bulunamamıştır.

Termofilik ve termotolerant fungusların hiflerinde ultrastrüktürel düzeyde yapısal farklılıklar bulunmuştur. Hepsinde olmasa da, bazılarında sitoplazmik zara bağlı yağ dolu cisimcikler görülmüştür. Bu yapıların endoplazmik retikulumda devam ettiği gösterilmiştir. Asıl lipit depolanması, 50 °C’de değil, 37 °C’de üreyen hiflerde bulunmaktadır. Bu yağ cisimcikleri tam anlaşılacakla birlikte, termofili mekanizması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Hudson ve ark., 1987).

Termofilik funguslar buldukları yerlere göre, jeotermal bölgelerde üreyenler ve çürümüş bitki kümeleri, gübre gibi kendini ısıtan (self-heating) kaynaklarda üreyenler olmak üzere iki gruba ayrılmışlardır. Jeotermal topraklar, dünyada birçok yerde bulunmaktadır. Örneğin; Amerika Birleşik Devletleri’nde Yellowstone Milli Parkı’nda bu tür sıcak su kaynakları mevcuttur. Buradaki toprağın özelliği, ısısının 70°C ve daha fazla olması, ağır metaller içermesi, pH’nın 2-7 olması ve az organik madde içermesidir (Redman ve ark., 1999).

Termofilik fungusların en zengin bulunduğu yerlerden biri çürümüş organik maddelerden oluşan, azot gibi mineral besinleri içeren, pH’sı 4-8 olan, iyi havalandırılan bitki kümeleridir (Deacon ve ark., 2007). Bu kümelere bilinen en iyi örnek, bahçedeki yığınlardır. Diğer örnekler buğday, saman yığınları, at veya domuz gübresi, kuru ot veya mısır yığınları, tahta parçaları, toz haline getirilmiş ağaç ve şehir çöpleridir (Crisan ve ark., 1973).

Aslında bu tür funguslar çevremizde çok yaygındır. Isısı 40-50 °C olan sıcak sulardan, topraktan, sıcak havuzlardan, yağmur ormanlarının etrafından, çamurdan, ağaç yapraklarından, topraktan hem termotolerant hem de termofilik funguslar bir arada izole edilmiştir (Deacon ve ark., 2007).

Çürümüş madde kümesinde dört aşamalı bir olay gerçekleşir. Bunlar mezofilik aşama, termofilik aşama, soğutma aşaması ve olgunlaşma aşamasıdır. İlk aşamada, yeterli miktarda şeker ve amino-asitler bulunduğu için, mikroorganizmalar üremeye başlar. Mezofilik organizmaların metabolik aktivelerinden dolayı, ortamın ısı derecesi yavaş yavaş yükselir. *Rhizomucor pusillus* ve *Aspergillus fumigatus* gibi bazı funguslar ve *Bacillus stearothermophilus* bazı termofilik bakteriler pH 7'nin altında ve ısı 40 °C olduğunda üremeye başlar. Ortamın pH'sı 9, ısı derecesi 70-80 °C'ye kadar arttığında, olayı başlatan mikroorganizmalar ölür ya da inaktive olurlar. Termofilik türler bu aşamadan sonra üremeye başlarlar. Bu funguslar, bitki kümesindeki hücrelerin duvarlarındaki sellüloz gibi maddeleri çözerler. Sonunda ısı derecesi düşerken mezofil organizmalar tekrar üremeye başlar ve termofiliklerin yerine geçerler. *Aspergillus fumigatus* gibi bazı ısıya toleran türler üremeye devam ederler. Bu fungusun üreme ısı aralığı 12-55 °C olduğu için, termofilik bir fungus değildir. Ancak çürümüş bitki kümesinin içindeki en çok görülen fungustur (Anastasi ve ark., 2005).

Özellikle bitki kümelerinde, başlangıçta bulunan *Rhizomucor* türleri 20-55 °C aşamasından sonra ısı yükselince inaktive olur ve bir daha üremezler. Kendi kendine ısınan kuş gübreleri ve sıcak topraklar gibi yerlerde en yaygın görülen fungus *Thermomyces lanuginosus*'dur. Üreme ısı 52-55 °C'dir. Bu fungusun sellülozu ayırma yeteneği olmadığı için, sellülozu ayırma yeteneği olanlar ile ortak yaşamı sayesinde selülotik aktivitelerinden ortaya çıkan şekerleri kullanan bir fungustur (van Heerden ve ark., 2002).

Mikroorganizmalar ölümcül ısı derecesinde kısa bir süre bulduktan sonra kazanılmış termotolerans mekanizması sayesinde canlı kalabilirler. Termotolerant funguslar, aniden yüksek ısıya maruz kaldıklarında, ısı şok proteinleri (heat-shock protein, HSP) sentezinin artışı ile canlı kalmaları arasında bir ilişkili olduğu düşünülmüştür. Termofilik bakteriler termotolerans kazanmak için HSP'lerini sentez ederler. Konidyumları 50 °C'de çimlenmeye başlar, ısı şokundan sonra konidyumlar daha dayanıklı olur (Maranon ve ark., 1999).

Wright ve ark., (1983)'te *Talaromyces thermophilus* türünün üreme ısısının 50 °C'den 33 °C'ye düşmesine rağmen, doymamış yağ asitlerinin bu sıcaklıklarda değişmediğini saptamışlardır. Bu olay, oleatın linoleata değişiminin engellenmesi ile ilişkili olabilir. *Thermomyces lanuginosus* gibi bazı fungusların ise 50 °C'de içerdiği linoletik asit oranı 30 °C'dekinden iki kat daha fazladır (Wright ve ark., 1983).

Isı şok yöntemi kullanıldığı zaman, bazı termotolerant fungus türleri termofilik derecede üreyebilirler. Fungus hücreleri termotolerans kazanırsa, sitoplazma ve zardaki makromoleküllerin çözümleri artar. *Saccharomyces cerevisiae* türü 60 dakika, 43 °C'de üretildiğinde, mayanın bir sonraki aşamada daha yüksek ısıda üreyebilmesi, yani termotolerans kazanması sağlanır (Sridhar ve ark., 2002).

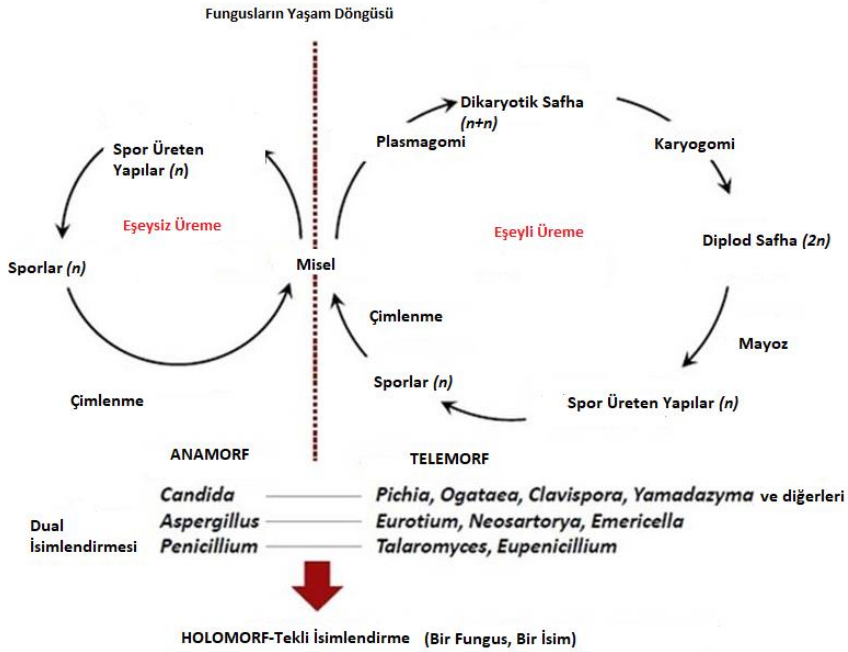
Maya hücrelerin termotolerans kazanma olasılıkları, durağan (stationary) evrede, çoğalma (exponentially) evresinden daha fazladır. Hücrelerin yüksek ısıda ölmelerinin nedeni, kinetik bozukluktan değil, en az iki farklı polimerazın geri dönüşümsüz değişmesinden (denatürasyonundan) dolayıdır (Obuchi ve ark., 2000).

Termotolerans kazanılmasında trehaloz gibi bazı karbonhidratlar rol oynayabilir. Ribeiro (1999), *S. cerevisiae*'da ısı-şok cevabı oluşumundan sonra trehaloz biriktiği göstermiştir.

Termofilik Fungusların Sınıflandırılması

Mikologlar eşeyli üreme sporu oluşturamayan fungusları “imperfekt”, eşeyli üreme sporuna sahip olanlara ise ‘perfekt’ olarak adlandırmışlardır. Sıklıkla karşılaşılan bir diğer terim ise birden fazla şekil alabilen anlamına gelen ‘pleomorfik’ (‘Pleomorfizm’ maya-misel fazı değişimi anlamına gelen dimorfizm yerine de kullanılabilirdiğinden kafa karıştırmaktadır) terimidir. ‘İmperfekt’bir fungusun aynı zamanda ‘perfekt’ olduğunun görülmesi ile ortaya “eşeysiz safha/faz/evre” ve “eşeyli safha/faz/evre” gibi ek etimolojik problemlerin açığa çıkmasına sebep olmuştur. Tüm bu terimler tutarsız bir şekilde kullanılmakta ve yanlış yorumlanmaktadır. Bu nedenle 1970li yıllarda Hennebert ve Weresub mitotik sporların oluştuğu morfolojik evre olan eşeysiz safha için anamorf; mayotik sporların oluştuğu morfolojik evre olan eşeyli safha için telemorf; tüm evreleri gösteren funguslar için ise holomorf terimini kullanmışlardır (Hennebert

ve ark., 1979; Weresub ve Hennebert, 1979). Bu terminoloji 1981’de Botanical Congress tarafından kabul edilmiş ve ‘anamorf’ ve ‘teleomorf’ terimleri yaygın bir şekilde kullanılırken ‘holomorf’ terimi daha az ilgi çekmiştir (Bennett ve ark., 2010). Son yıllarda eski “Botanical Code” un 59. maddesini revize etmek amaçlı ciddi bir değişiklik yapılması söz konusu olmuştur ve bu değişiklik Melbourne’de düzenlenen 2011 International Botanical Congress’in Nomenklatür Bölümünde kabul edilerek “Bir Fungus : Bir isim” (one fungus : one name) kuralı kabul edilmiştir (Norvell, 2011; McNeill ve ark., 2012).



Şekil 1.1. Bir fungus: Bir isim (Dual Nomenclature to 'One Fungus, One name'). (Salar ve ark., 2018)

Salar (2018)'de yayınladığı ‘THERMOPHILIC FUNGI, Basic Concepts and Biotechnological Applications’ kitabında son yıllarda yapılan moleküler filogeni ve taksonomi çalışmaları sonucu bazı termofilik ve termotolerant mikrofungus türlerinin isimlerinin değiştiğini tespit etmiştir. Bazı değişen termofilik ve termotolerant mikrofunguslar Şekil 2’de verilmiştir.

Son yıllarda gelişen teknoloji ile beraber moleküler çalışmaların önemi daha da arttırmıştır. Fungusların adlandırılmasında oluşan karışıklıkları önlemek için

oluşturulan fungus veri bankaları; Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>), MycoBank (<http://www.mycobank.org>), Fungal Names (<http://www.mycolab.org.cn/en/index.aspx>), CABI databases (<http://www.speciesfungorum.org>) gibi veri bankaları fungusların yanlış adlandırılmasının önüne geçmeyi hedeflemiştir (Salar ve ark., 2018).

Bazı Termofilik ve Termotolerant Fungusların Sinonimleri ve İsim Değişiklikleri Listesi

No.	Fungusun yeni ismi	Referans	Önceki isimi/Sinonimi	Referans	Yorumlanması
Zigomisetler					
1	<i>Rhizomucor miehei</i>	(Cooney & Emerson) Schipper, 1978	<i>Mucor miehei</i>	Cooney & Emerson, 1964	Original description by Cooney and Emerson
			<i>Mucor miehei</i> var. <i>minor</i>	(Cooney & Emerson) Subrahmanyam & Gopalkrishnan, 1984	Unwarranted taxonomic decision
			<i>Rhizomucor nainitalensis</i>	Joshi, 1982	Original description by M.C. Joshi
			<i>Rhizopus nainitalensis</i>	Joshi, 1982	Typographical error of <i>Rhizomucor nainitalensis</i>
2	<i>Rhizomucor pusillus</i>	(Lindt) Schipper, 1978	<i>Mucor pusillus</i>	Lindt, 1886	First-ever thermophilic fungus reported by W. Lindt
			<i>Mucor thermohyalospora</i>	Subrahmanyam, 1981	Resembles <i>Mucor tauricus</i> but homothallic
			<i>Rhizomucor pakistanicus</i>	Qureshi & Mirza et al., 1979	Invalid name, superfluous publication, synonym of <i>Rhizomucor pusillus</i>
Askomisetler					
3	<i>Coonemeria crustacea</i>	(Apinis & Chesters) Mouchacca, 1997	<i>Dactylomyces crustaceus</i>	Apinis & Chesters, 1964	Basionym and synonym of <i>Coonemeria crustacea</i>
4	<i>Coonemeria aegyptiaca</i>	(Ueda & Udagawa) Mouchacca, 1997	<i>Thermoascus aegyptiacus</i>	Ueda & Udagawa, 1983	Basionym of <i>Coonemeria aegyptiaca</i>
5	<i>Coonemeria verrucosa</i>	Yaguchi, Someya, & Udagawa, 1997	<i>Thermoascus crustaceus</i> var. <i>verrucosus</i>	Yaguchi, Someya, & Udagawa, 1995	Basionym of <i>Coonemeria verrucosa</i>
			<i>Thermoascus taitungiacus</i>	Chen & Chen, 1996	Synonym of <i>Coonemeria verrucosa</i>
			<i>Paecilomyces taitungiacus</i>	Chen & Chen, 1996	Anamorph of <i>Coonemeria verrucosa</i>
6	<i>Dactylomyces thermophilus</i>	(Sopp) Apinis, 1967	<i>Thermoascus thermophilus</i>	(Sopp) von Arx, 1970	Type species of <i>Dactylomyces</i> and a superfluous combination
7	<i>Melanocarpus thermophilus</i>	(Abdullah & Al-Bader, 1990) Guarro et al., 1996	<i>Thielavia minuta</i> var. <i>thermophila</i>	(Cain) Malloch & Cain, 1973	Basionym of <i>Melanocarpus thermophilus</i>
8	<i>Chaetomidium pingtungium</i>	(Chen & Chen) Mouchacca, 1999	<i>Thielavia pingtungia</i>	Chen & Chen, 1996	Basionym of <i>Chaetomidium pingtungium</i>
Anamorfik Funguslar					
9	<i>Myceliophthora fergusii</i>	(Klopotek) van Oorschot, 1977	<i>Chrysosporium fermentotritici</i>	Matsushima & Matsushima, 1996	Synonym <i>vide</i> Sigler et al., 1998
10	<i>Myceliophthora thermophila</i>	(Apinis) van Oorschot, 1977	<i>Chrysosporium thermophilum</i>	(Apinis) von Klopotek, 1974	Synonym of <i>Myceliophthora thermophila</i>
			<i>Myceliophthora indica</i>	Basu, 1984	Invalid nomenclature, synonym of <i>Myceliophthora thermophila</i>

Şekil 1.2. Son yıllarda ismi değişen termofilik ve termotolerant mikrofungus türleri (Salar ve ark., 2018)

Fungal türlerin teşhisi ve karakterizasyonu gereklidir (Zhang ve ark., 2007). Fungusların morfolojik karakterlerine göre yapılan sınıflandırmalar, moleküler sistematiğe belirlenen filogenetik ilişkilerle birlikte yeniden değerlendirilmelidir. Taksonlar arasında morfolojik karakterlerin birbirine anlamlı olmayan benzerliği, indirgenmiş olabileceği yada taksonlar arasında ortadan kalkmış olduğu durumlarda, filogenetik analiz için moleküler karakterlerin kullanımı önem

kazanmaktadır (Blackwell ve ark., 2007). Geleneksel olarak fungusların sınıflandırılmasında temel kriter eşeyli üreme yapılarıdır. Moleküler karakterlerin kullanımının bir avantajı da, aseksüel fungusların sınıflandırılmasındaki belirsizliği ortadan kaldırıp onların en yakın akrabaları içinde sınıflandırılmalarını sağlamasıdır (Blackwell ve ark., 2007).

Fungusların sistematiği oldukça değişken ve karmaşıktır. Fungi alemindeki grupların belirlenmesi ve sınıflandırılma çalışmaları oldukça eski olmakla birlikte, 2004 yılında başlatılan ve şu anda da devam eden AFTOL olarak isimlendirilen ortak bir çalışma ile (yeni moleküler çalışmalar ve filogenetik yöntemler kullanılarak) fungusların tüm gruplarının en yüksek düzeyde moleküler (filogenetik) sınıflandırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmada toplam 195 taksonu içeren bir fungus grubuyla çalışılmış ve sonuçta 7 filum [*Chytridiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Blastocladiomycota*, *Microsporidia*, *Glomeromycota*, Dikarya: (*Ascomycota*, *Basidiomycota*)] 10 subfilum, 35 sınıf, 129 ordo şeklinde bir sınıflandırma elde edilmiştir (Hibbett ve ark., 2007). Bu projeye elde edilen yeni sınıflandırmalardaki en önemli değişiklik geleneksel olarak *Chytridiomycota* ve *Zygomycota* içerisinde sınıflandırılmış olan organizmalarla ilgilidir. Moleküler çalışmalar ile beraber, *Chytridiomycota* oldukça sınırlandırılmış ve *Blastocladiomycota* ve *Neocallimastigomycota* ayrı flagellumlu filum içine alınmıştır. Geleneksel olarak *Zygomycota* içerisinde yerleşen taksonlardan *Glomeromycota* ve birkaç subfilum (*Mucoromycotina*, *Entomophthoromycotina*, *Kickxellomycotina* ve *Zoopagomycotina*) içinde değerlendirilmeleri tamamlanmıştır. Ayrıca *Microsporidia* Fungi alemine dahil edilmiş fakat bu grubun daha ileri seviyedeki ayrımından bahsedilememiştir. Sınıflandırmaları belirsiz birkaç bazal fungus cinsi (*Basidiobolus*, *Caulochytrium*, *Olpidium* ve *Rozella*) daha üst taksonlara yerleştirilmiştir (Hibbett ve ark., 2007).

Fungi alemi içinde yer alan organizmaların yaşam döngülerinde hem eşeyli hem de eşeysiz üreme safhaları yer almaktadır. Fungusların sınıflandırılmasında kullanılan temel kriterler, yaşam döngülerinin eşeyli safhasında oluşturdukları bu üreme yapılarıdır (Moore-Landecker, 1996). Ancak eşeyli üreme yapıları özel koşullar altında oluşturulduğu için bazı fungusların eşeyli safhası ya henüz belirlenememiş ya da bazı funguslarda bu safha tamamen ortadan kalkmış olabilir. Bundan dolayı günümüzde funguslar iki farklı şekilde sınıflandırmaları yapılmaktadır. Birincisi, fungusların yaşam döngülerinin eşeyli safhalarında oluşturdukları fruktifikasyon yapıları, eşeyli sporları ve tallus yapıları kriter

alınarak gerçekleştirilen sınıflandırma teleomorfik sınıflandırma olarak adlandırılır. Eşeyli üreme yapıları tespit edilemediği için, bazı funguslar tallus yapıları ve eşeysiz üremede oluşan sporları göz önüne alınarak sınıflandırılırlar, bu sınıflandırma biçimi ise anamorfik sınıflandırma olarak adlandırılır (Sneh ve ark., 1991).

Anamorfik sınıflandırmada kullanılan yöntemlerin ortak özelliği gözlemlere dayalı olmasıdır. Bu yöntemin dezavantajı, fazla zaman alması ve hata yapma olasılığının fazla olmasıdır. Bazı fungusların sınıflandırılmasındaki bu belirsizlik çoğu zaman aynı taksona iki farklı isim verilmesine hatta farklı organizmalara da aynı ismin verilmesine neden olabilmektedir (Reynolds ve Taylor, 1992).

Fungusların Moleküler Tanısı

Funguslar aleminde sınıflandırmada tür karışıklıkların önlenmesi için günümüzde güvenilirliğinden dolayı moleküler yöntemler daha çok kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler yöntemlerde genel olarak kullanılan molekül DNA molekülüdür. Evrimsel süreçte değişikliğin ilk olarak yansıdığı molekül DNA'dır. DNA ile yapılan araştırmalar daha güvenilir ve daha hızlı sonuçlar elde etmeyi sağlar.(Taylor ve ark., 2000).

Polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin keşfiyle organizmaların genlerinin klonlanması ve bunların birbirleriyle karşılaştırılması moleküler (filogeni) sistematik alanda büyük bir kolaylık sağlamıştır.

Özgüllük ve duyarlılığın yüksek olmasından dolayı, PCR yöntemlerinin kullanılması fungusların moleküler tanımlanması için kullanışlı olmakta ve fungal suşların, türlerin yada daha üst takson gruplarının belirlenmesi amacıyla kullanılabilir. Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi aracılığıyla elde edilen bilgiler sayesinde mevcut taksonlar için spesifik oligonükleotid primerlerin tasarlanması mümkün hale gelmiştir (Dieffenbach ve ark., 1993). Fungal türler arasındaki polimorfik DNA dizilerinden biri olan ITS gen bölgesi, günümüzde bir türün doğru olarak tespiti açısından evrensel olmasıyla daha kullanışlı ve bu uygulama ile diğer tüm türlerden büyük ölçüde ayrılabilir. Bununla birlikte, ITS gen dizilerindeki varyasyon ve bu varyasyonu doğrudan değerlendirebilen PCR temelli teknikler sayesinde fungus izolasyonuna gerek kalmaksızın konukçu bitkiler üzerindeki ve çevresindeki bir çok fitopatojenik fungus türünün

belirlenmesi kolay hale gelmiştir (Maukhamedov ve ark., 1994). Spesifik fungus türlerine ait primerlerle gerçekleştirilen PCR amplifikasyon yöntemleri sadece teşhiste değil, simbiyotik ve zorunlu parazitlik konusundaki çalışmaları aydınlatmayı da büyük oranda kolaylaştırmıştır. Örneğin normal izolasyon yöntemleriyle izolasyonu mümkün olmayan mikorizal fungus türü DNA'sının spesifik amplifikasyonu bitki köklerinden elde edilebilmiştir (Di Bonita ve ark., 1995).

Mikolojide PCR yöntemi uygulamaları ilk kez White ve ark. (1990) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarında, fungusların filogenetik ve taksonomik ilişkilerini ortaya koymak amacıyla rDNA'nın doğrudan çoğaltılması ve nükleotid dizilerinin belirlenmesini kapsamaktadır.

PCR yöntemi ile gen çoğaltma işlemi, moleküler ve filogenetik çalışmalarda DNA dizi analizi için kullanışlı olduğu ispatlanmıştır. Elde edilen DNA gen bölgeleri; çekirdek, mitokondrial rDNA ve protein kodlayan genleridir (Bridge ve ark., 1998). DNA dizi analizi *Trichoderma* taksonomisine önemli katkılar sağlamıştır. Bu yöntem kullanılarak yaklaşık atmıştan fazla fungus türü tanımlanırken, iki yada daha fazla gen de karakterize edilmiştir. Sonuç olarak moleküler analizler sayesinde morfolojik tanı yöntemi temeline dayalı olarak belirlenenden daha fazla türün varlığı ortaya çıkarılmıştır (Samuels, 2004).

rRNA genlerinin kodlandığı DNA dizileri funguslarda taksonomik ilişkilerin ve genetik varyasyonun belirlenmesi çalışmalarında geniş oranda kullanılan yöntemdir. Funguslarda çekirdek rDNA (rRNA gen kümesi) ardışık tekrarlanan rDNA dizi birimleri olarak organize olmuştur (Salazar ve ark., 2000). rRNA gen kümesi hem çekirdek hem de mitokondrilerde bulunur ve oldukça korunmuş ve değişken bölgelerden meydana gelmektedir (White ve ark., 1990).

PCR Tekniği

Polimeraz Zincir Reaksiyon yöntemi temelde üç aşamada gerçekleşmektedir. DNA Zincirinin Açılması (Denaturation): Kalıp olarak kullanılan DNA (template DNA), 92-95 °C'de 2-5 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçiklerinin birbirlerinden ayrılması sağlanmaktadır. DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilir (Watson ve ark., 1992; Hadidi ve ark., 1995).

Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing): Reaksiyon sıcaklığının, 37-65 °C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir (Innis ve Gelfand 1990).

Primer Uzaması (Primer Extension): DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enziminin (Taq DNA polymerase) aktif olmasıyla beraber sentezin gerçekleşmesini sağlamaktır. *Thermus aquaticus*'tan elde edilen Taq DNA polymerase enzimi 72 °C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılması tercih edilmektedir (Erich ve ark. 1991). PCR amplifikasyonu sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadardır (Hadidi ve ark., 1995). Üç basamaktan (denaturation, annealing, primer extension) oluşan işlem, bir polimeraz zincir reaksiyonunun devrini temsil etmektedir. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa arasında tekrar edilerek başlangıçtaki DNA gen dizisinden milyonlarca yeni DNA gen bölgesi çoğaltılması yapılmaktadır. PCR sonucunda elde edilen DNA gen bölgeleri (ürün) agaroz veya poliakrilamid jellerde yürütüldükten sonra, ethidium bromide (EtBr) veya gümüş nitrat (GN) ile boyanarak gözlemlenir (Hadidi ve ark., 1995).

PCR Optimizasyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu teknolojisinin gelişmesiyle çok farklı PCR uygulamaları da ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, yeni PCR uygulamalarının düzenli ve optimum bir şekilde çalışması için, her laboratuarda tekrardan PCR koşullarının ayarlanması gerekmektedir (Hadidi ve ark., 1995). PCR şartları yeni PCR uygulaması için uygun bir şekilde yeniden ayarlanmazsa bazı problemlerle karşı karşıya gelebilir ve tekrardan PCR koşullarının optimize edilmesi gerekebilir. PCR koşulları optimize edilmezse problemler oluşur (Innis ve Gelfand 1990; Erlich ve ark., 1991; Hadidi ve ark., 1995). Bu problemler;

1. PCR'dan elde edilmek istenen ürün ya az elde edilir ya da hiç elde edilemez.
2. Primerlerin yanlış bağlanmasıyla sonucu spesifik olmayan bantlar oluşabilir.
3. Primerler yanlış şekilde uzayabilir.

4. Primer-dimer oluşumu ortaya çıkabilir ve bu oluşumlar çoğaltma işlemini yavaşlatabilir veya durdurabilir.
5. Yeni sentezlenen DNA dizilerinde mutasyon gerçekleşebilir veya istenilenden farklı diziler elde edilebilir.

PCR Çalışma Şartlarını Etkileyen Faktörler

Kullanılan Enzim Konsantrasyonu: PCR şartları optimize edildiği zaman 100 µl reaksiyon için önerilen Taq DNA polimeraz enzim konsantrasyonu 1-2.5 ünite kadardır. Fakat reaksiyon için gerekli enzim ihtiyacı kullanılan kalıp DNA'ya veya kullanılan primerlere göre değişebilir. Enzim konsantrasyonu düşük olursa elde edilecek ürün (DNA) az olur. Eğer enzim konsantrasyonu yüksek olursa spesifik olmayan bantlar ortaya çıkabilir (Innis ve Gelfand, 1990; Erlich ve ark. 1991; Yang ve ark., 1992).

Magnezyum Konsantrasyonu: PCR uygulamalarında magnezyum (Mg) iyon konsantrasyonunun ayarlanması oldukça önemlidir. Çünkü Mg iyonunun konsantrasyonu açılan DNA zincirlerine primerlerin yapışmasını sağlamaktadır. Kalıp DNA'nın açılma sıcaklığını, PCR sonucunda elde edilen DNA'nın kalitesini, primer-dimer reaksiyonunda bağ oluşumlarını, enzim aktivitesini ve güvenilir sonuç elde edilmesini etkilemektedir. Ayrıca, Taq DNA polimeraz enziminin iyi çalışabilmesi için; kalıp DNA, primerler ve nükleotid bazları üzerinde serbest Mg iyonlarının bulunması gerekir. Bu yüzden 0.5-2.5 mM arasında Mg iyonlarının dNTP konsantrasyonu içerisinde bulunması gerekmektedir (Innis ve Gelfand, 1990; Hadidi ve ark., 1995).

Deoksinükleotid Trifosfatlar (Deoxynucleotide Triphosphates=dNTPs) Her bir deoksinükleotid (A, G, C, T) konsantrasyonu 20- 200 µM arasında olduğunda genellikle PCR uygulamalarından iyi sonuç alınabilmektedir. Bu dört bazın konsantrasyon içerisindeki oranı eşit olmalıdır. Başlangıç stok solüsyonu 10 mM kadar seyreltildikten sonra, küçük hacimlere ayrılarak -20 °C'de saklanmalıdır. dNTP konsantrasyonunun yüksek olması yeni sentezlenen DNA dizilerinde istenilenden farklı dizilerin (misincorporation) hatalı olarak ortaya çıkmasına sebep olabilir. Bu yüzden mümkün olduğu kadar düşük konsantrasyonda dNTP'leri kullanmak PCR spesifikliğini ve güvenilirliğini artırmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990; Hadidi ve ark., 1995; Weising ve ark., 1995).

Diğer Reaksiyon Unsurları: Polimeraz zincir reaksiyonu uygulamalarında genel olarak 10-50 mM arasında Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 8.3-8.8) kullanılmaktadır. Tampon çözeltinin 20 °C de pH'sı 6.8 ile 7.8 arasında değişebilir. PCR karışımı içerisine 50 mM KCl ilave edilmesi primer bağlanmasını daha da kolaylaştırır. Fakat 50 mM'ın üzerindeki KCl veya 50 mM NaCl Taq DNA polimeraz enziminin çalışmasını yani aktivitesini engeller. Ayrıca, PCR solüsyonuna Jelatin (gelatin), bovine serum albumin veya Tween 20 deterjanı eklenmesi durumunda enzimin çalışmasında daha iyi reaksiyon vermesine yardımcı olabilir. Fakat bu kimyasal maddeler eklenmeden de PCR protokolleri çok iyi bir şekilde çalışabilir (Innis ve Gelfand, 1990; Demeke ve Adams 1992; Henson ve French 1993).

DNA Zincirinin Açılması İçin Gerekli Zaman ve Sıcaklık: Polimeraz zincir reaksiyonu uygulamalarında sistemin çalışmamasının en önemli nedenlerinden birisi kalıp DNA zincirinin veya üretilen DNA bölgesinin yeterince açılmamasıdır. Genel olarak DNA moleküllerinin 95 °C de 2 dakika tutulması zincirin açılması için yeterli olmaktadır. Fakat G-C bazları bakımından zengin kalıp DNA zincirlerinde bu süre ve sıcaklığın fazla olması istenmektedir (Innis ve Gelfand, 1990; Erlich ve ark., 1991).

Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması: Açılan DNA zincirlerine primerlerin yapışması için gerekli sıcaklık derecesi ve zaman aralığı primerlerin konsantrasyonu gerçekleşecek reaksiyonu etkiler ve elde edilecek DNA'nın uzunluğu ve kullanılan bazların kompozisyonuna göre değişiklik gösterir. Kalıp DNA'ya primerlerin bağlanması 37 °C ile 65 °C sıcaklıkları arasında gerçekleşir. Açılan DNA'ya primerlerin bağlanması sırasında sıcaklık artırılması DNA seçiciliğini de artırmaktadır. Bu yüzden primerlerin yanlış yerlere bağlanması ve hatalı DNA dizilerinin elde edilmesi önlenmiş olmaktadır. Özellikle PCR işleminin ilk birkaç devrinde sıcaklığın artırılması PCR uygulamasının hassasiyetini çok yükseltmekte ve spesifik olarak beklenen DNA parçacıkları sentezlenmektedir. Sıcaklığın düşürülmesi primerlerin hatalı şekilde bağlanmasına ve yeni sentezlenen DNA dizilerinde hatalı baz bağlanmalarına sebep olmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach ve ark., 1993; Kwok ve ark., 1994).

Primer Uzunluğu, Konsantrasyonu ve Yapısı: Primer konsantrasyonunun 0.1-0.5 µM arasında olması PCR reaksiyonunun daha iyi çalışmasını sağlamaktadır. Yüksek primer konsantrasyonu primerlerin yanlış bağlanmasına ve spesifik

olmayan istenmeyen DNA bantlarının üretilmesine neden olur. Ayrıca primer-dimer oluşumunu sağlayarak elde edilecek ürünün DNA gen bölgesinin daha az çoğaltılmasına neden olmaktadır. Genelde primer uzunluğu 16-30 baz arasında değişmekte fakat 18-24 baza (nükleotid) sahip primerler eğer primer yapışma sıcaklığı (Tm) da iyi ayarlanmış olursa çok spesifik ürün elde edilebilmektedir. Ancak 14 bazdan daha kısa uzunluktaki primerler de bazı özel amaçlar için kullanılmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach ve ark., 1993; Kwok ve ark., 1994). Primerlerin baz dizilişinde Guanin, sitosin (GC) miktarı ve primerlerin yapışması için gerekli sıcaklık ayarlanması (Tm) arasında çok iyi bir ilişki kurmak gerekir. Eğer bu denge sağlanamazsa PCR ürünlerinden istenilen sonucu elde etmek mümkün olmayabilir. Bu bakımdan primer dizilerinde GC bazlarının toplam oranı % 50 veya daha yukarı olması gerekmektedir. Örneğin bir primerin baz dizisinde GC oranı % 50 ve Tm değeri 56-62 °C arasında olursa bu primerin sorunsuz bir şekilde çalışması beklenir. Primerlerin açılan DNA kalıplarına hatasız bir şekilde bağlanabilmesi için yapışma sıcaklığının iyi hesaplanması gerekmektedir. Primerlerin yapışma sıcaklığını hesaplamak için bir formül geliştirilmiştir. Bu formül $Tm = 4(G+C) + 2(A+T)$ şeklinde ifade edilmiştir. Burada Tm yapışma sıcaklığını, G,C,A ve T ise nükleotid bazlarını ifade etmektedir (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach ve ark., 1993). Primerlerin 3' uçlarındaki baz dizilişi, primerin yanlış veya doğru yere bağlanmasını belirlemektedir. Eğer aşağı ve yukarı yönlü (upstream ve downstream) primerlerin karşılıklı olarak 3' uçlarında birbirlerine bağlanabilecek baz dizilişi (complementarity) mevcut olur ise bu durum istenmeyen primer-dimer oluşumlarına neden olmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990).

Primer uzaması: Primerlerin DNA polimeraz enzimi tarafından uzatılması için gerekli zaman dilimi, çoğaltılması hedeflenen kalıp DNA bölgesinin uzunluğu, kalıp DNA molekülünün konsantrasyonu ve ortam sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak primer ile uzatılma işlemi 72 °C de yapılmaktadır. Çünkü bu sıcaklık Taq DNA polimeraz enziminin maksimum düzeyde çalışması için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Primerlerin uzatılması için gerekli süre ise baz uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach ve ark., 1993).

Devir sayısı: PCR'ın çalışma şartları iyi ayarlandığı takdirde 25-40 arasında devir sayısı yeterli olmaktadır. Devir sayısı, çoğaltılacak kalıp DNA miktarı ile yakından ilişkilidir. Devir sayısının fazla olması spesifik olmayan bantların ortaya

çıkmasına, devir sayısının az olması üretilen DNA miktarının az olmasına neden olmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990; Watson ve ark., 1992).

Polimeraz zincir reaksiyonu metotları, PCR tekniğinin bulunmasından bu yana teknolojide çok hızlı gelişmeler meydana gelmiş ve buna bağlı olarak çok farklı PCR teknikleri geliştirilmiştir.

PCR tekniklerinde çoğaltılması hedeflenen DNA dizisinin sekans yapısı bilimektedir. Oligonükleotid primer çifti kullanılarak çift sarmal DNA dizileri Taq DNA polimeraz enzimi tarafından 5'→3' yönünde okunmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach ve ark., 1993).

Standart PCR Tekniği: Temel PCR yöntemlerini içermektedir. Bir PCR reaksiyonu için, 0.5 ml'lik PCR tüpü içerisinde 100 µl'lik bir reaksiyon oluşturmak için genel olarak aşağıda belirtilen kimyasallar tüpe ilave edilmektedir: Kalıp DNA (105, 106 hedef molekül) 20 pmol yukarı yönlü (upstream) primer 20 pmol aşağı yönlü (downstream) primer 20 mM Tris-HCl (pH 8.3) (20 C)İ 1.5 mM MgCl₂ 25 mM KCl* 0.05 % Tween 20* 50 µM dNTPs 2 unite Taq DNA polimeraz enzimi ve kalan miktar steril suyla 100 µl'ye tamamlanarak PCR ile gen çoğaltma işlemi için PCR cihazına konulmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990). Bunlar reaksiyona eklenmese de PCR reaksiyonu çalışır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Termofilik funguslar ilk defa (Cooney ve Emerson, 1964) bitki materyallerinden fungus sporları elde edilerek kültürü yapılmıştır.

Cooney ve Emerson, 1964'teki çalışmalarında farklı kaynaklardan, substratlardan termofilik funguslar standart izolasyon prosedürleriyle izole edilmiştir. Havadan izolasyon Petri plakalarına maruz kalma yöntemiyle, topraktan ve diğer katı substratlardan yapılmaktadır. Bunun için seri seyreltme plakası yöntemi ve doğrudan plaka yöntemi kullanılmaktadır. Termofilik funguslar çeşitli standart mikolojik ortamlardan izole edilebilir fakat besiyerinde gelişimleri oldukça zordur. Yeast Souble Starch Agar(YpSs) ve Yeast Glucose Agar standart besiyerleri, termofilik ve termotolerant mikrofunguslar için en yaygın kullanılan besiyerleridir. İlk izolatların gelişimi için seçici besiyeri, Rose Bengal Agar (50 mg/L) besiyerinin içine streptomisin (30 ünite/L) eklenerek hazırlanan seçici besiyeri kullanılmıştır. Yüksek sıcaklıklarda yeterli nem sağlanamadığı için mikrofungus kültürlerinin bekletilmesi bir problemdir. Yüksek sıcaklık, petri plakalarında agarın kurumasına neden olur. Agar plakalarının sterilize edilmiş suya sahip nemlendirilmiş kaplara yerleştirilmesi ile bu sorun çözülür. İlk termofilik funguslar 45 °C'de geliştirilmiştir Bu yöntem kullanılarak, bilim dünyasında 11 termofilik fungus türü tanımlanmıştır.

Tansey ve Jack 1976'da izole edilen fungusları nemli odalarda inkübasyon için zenginleştirilmiş besiyeri ve seçici besiyeri kullanarak geliştirmişlerdir.

Satanarayana ve Johri 1984 'de termofilik fungusların çoğunun, karbon ve azot kaynakları ile birkaç mineral tuz içeren ortamlarda geliştirerek, çok basit besin gereksinimlerine sahip oldukları düşünülmüşlerdir. Fakat termofilik ve termotolerant fungusların besiyerinde gelişmelerinin kolay olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle besiyerine sodyum, potasyum, nitrat ve maya özütü gibi basit azot kaynaklarının eklenmesi ile fungusların daha iyi gelişmesi sağlanmıştır.

Hawksworth ve ark. (1995)'de son kırk yılda birkaç termofilik fungus türü izole etmişler fakat izole ettikleri fungusların tanımlamalarını doğru şekilde yapamamışlardır. İzole edilen fungusların tanımlanamamasının nedeni, fungus gelişimi için uygun sıcaklık ve belirli substratları bozma kabiliyeti gibi bir çok

ekolojik özelliklere sahip olmaları. Bazı fungusların benzer kültürel ve morfolojik benzerliğe sahip olmaları karışıklığa neden olmuştur.

Termofilik fungusların çoğunlukla *Zygomycetes*, *Ascomycetes* ve *Deuteromycetes*'e (Anamorfik Funguslar) ait olduğu tespit edilmiştir. Gerçek bir termofil olarak hiçbir *Myxomycetes* veya *Basidiomycetes* bildirilmemiştir. Taksonomisi hakkında bilgi toplarken termofilik funguslar ve bu fungusların kafa karıştırıcı isimlendirilmeleri nedeniyle zorluklarla karşılaşmıştır. Termofilik fungus taksonomisinin çeşitli yönleri henüz bulunmamıştır. Özellikle *Deuteromycetes* cinsine ait funguslarının uygun şekilde sınıflandırılmasında karşılaşılan zorluk, ilgili cinsin revizyona ihtiyaç duyduğunu kanıtlamışlar. Bununla birlikte, bilinen termofillerin sayısı, o kadar azdır ki, termofilik karakterleri bir kez belirlendiğinde, burada sağlanan basit anahtar sayesinde gelecekteki izolatları tanımlamak, mikologlar ve mikolog olmayanlar için kolay olacağını çalışmalarında dile getirmişlerdir.

White ve ark. (1990) fungusların moleküler tanılanması için PCR yöntemini kullanmışlardır. DNA'dan PCR yardımı ile ITS gen bölgesini çoğaltmışlar ve filogenetik sınıflandırmanın temelini oluşturarak, günümüze kadar gelmesini sağlamışlardır.

Fungusların yüksek adaptasyon yeteneklerinden dolayı günlük yaşantımızda hemen her yerde üreyebilmektedirler Hawksworth 2001'deki bir diğer çalışmada, dünyada yaklaşık 110.000 fungus türü tanımlanmasına rağmen fungusların tahmin edilen tür sayısının yaklaşık 1,5 milyon olduğunu düşünmüştür..

Mora ve ark. (2011) bilinen yaklaşık 600.000 fungustan sadece küçük bir kısmının termofilik olduğunu ve 45- 55 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişebildiklerini bildirmişlerdir.

Morgenstern ve ark. (2012) yaptıkları moleküler filogeni çalışmasında, termofilik fungusların 22 °C, 34 °C, 45 °C ve 55 °C'deki sıcaklıklarda geliştiklerini gözlemlemişlerdir. ITS gen bölgesini çalışarak ve 30 fungus suşundan 22'sinin termofilik veya termotolerant olduğunu tespit etmişlerdir.

Zhang ve ark. (2013)'de Çin'de termofilik mikrofunguslarla ilgili yaptıkları çalışmada *Myceliophthora* cinsine ait yeni bir türü topraktan izole etmişlerdir.

Toprağın havayla temas etmeyen yüzeyinden toprak örnekleri alınmış. Laboratuvar koşullarında Cooney ve Emerson'un daha önceki termofilik funguslar üzerinde yaptığı çalışmaları örnek olarak uygun PDA besiyerleri kullanmışlardır. 40-45 °C'de gelişebilen *Myceliophthora guttulata*, *M. fergusii*, *M. thermophila*, *M. heterothallic*, and *M. hinnulea* mikrofungus türlerini izole etmişlerdir. Morfolojik olarak mikrofungusların tür özelliklerini belirlemek için 25 °C'de gelişimleri sağlanmıştır. Günümüzde mikrofungusların taksonomisi için morfolojik tanılama yetersiz kaldığı için moleküler çalışmalar yapılarak, ITS gen bölgesi kullanılmaktadır.

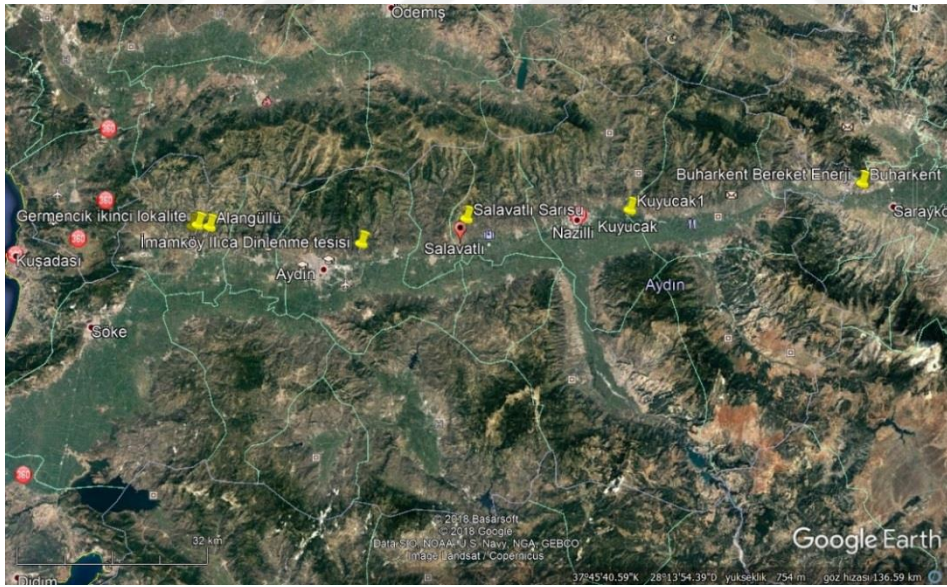
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma Materyali

Bu araştırmada termotolerant Ffungusların izolasyonu amacıyla çeşitli termofilik kaynaklardan toprak ve su örnekleri toplanmıştır.

Aydın ilinde bulunan termofilik alanların bulunduğu beş farklı lokalitede 2015 ve 2016 yıllarının Ekim, Kasım, Mart, Nisan ve Mayıs aylarında arazi çalışmaları yapılmıştır (Arazi çalışmasının yapıldığı lokaliteler ve bu lokalitelerin koordinatları, Çizelge 3.1’de verilmiştir). Arazi çalışmalarının yapıldığı ve örneklerin toplandığı Buharkent, Germencik, Salavatlı, İmamköy ve Kuyucak lokaliteleri haritada gösterilmiştir (Şekil 3.1). Bu bölgelerden alınan toprak ve su örnekleri materyal olarak kullanılmıştır (Şekil 3.2-3.3).



Şekil 3.1. Arazi çalışmalarının yapıldığı lokaliteler



Şekil 3.2. Yeraltı su kaynağının bulunduğu alanlar (Buharkent ve Germencik lokaliteleri).



Şekil 3.3 Termofilik alanlardan toprak örneklerinin alınması (Buharkent)

Çizelge 3.1. Arazi çalışmalarının yapıldığı lokaliteler ve koordinatları.

No	Lokalite Adı	Koordinat
1.	Germencik1	37°53'12.15" K
		27°35'27.84" D
2.	Germencik2	37°53'20.42" K
		27°36'5.28" D
3.	Germencik3 (Alangüllü)	37°53'9.87" K
		27°37'23.59" D
4.	Buharkent1	37°56'37.98" K
		28°51'30.62" D
5.	Buharkent2 (Bereket Jeotermal Enerji)	37°56'39.29" K
		28°51'27.51" D
6.	Kuyucak1	37°54'27.09" K
		28°25'3.86" D
7.	Kuyucak2	37°54'30.34" K
		28°25'4.13" D
8.	Salavathı (Sarı Su)	37°53'48.38" K
		28°6'32.47" D
9.	İmamköy (Ilıca Dinlenme Tesisi)	37°51'38.16" K
		27°54'38.16" D

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

Rose-Bengal Kloramfenikol Agar (RBKA) (Oxoid, CM549)

Çizelge 3.2. RBKA besiyeri bileşenleri ve oranları

Bileşen	Miktar
Mikolojik pepton	5 g/l
Glukoz	10 g/l
Magnezyum sülfat	0.5 g/l
Dikloran	0.002 g/l
Potasyum dihidrojen fosfat	1 g/l
Rose bengal	0.05 g/l
Agar	15.5 g/l
Distile su	1000 ml
pH	5.6±0.2

RBKA besiyeri; toprak, su ve diğer kaynaklardan maya ve fungusların izolasyonu ve sayımında kullanılır. Bakterilerin üremesini engelleyen ve doğrudan maya ve fungusların elde edilmesini sağlayan seçici besiyeridir. RBKA besiyeri pembe-kırmızı renktedir (Pitt ve Hocking, 1979). 31.5 g hazır besiyeri 1000 ml distile suda manyetik karıştırıcıda homojen olarak çözülmüştür. Otoklavda 121 °C'de 10

dakika sterilize edilen besiyeri steril petrilere dökülerek topraktan fungus izolasyonu için kullanılmıştır.

Potato Dextrose Agar PDA (Merck 110130)

Çizelge 3.3. PDA besiyeri bileşenleri ve oranları

Bileşen	Miktar
Potato Infusion	4 g/l
D(+) Glukoz	20 g/l
Agar	15 g/l
Distile su	1000 ml
pH	3.7±0.2

Potato Dextrose Agar (PDA) besiyeri maya ve imperfekti grubunda yer alan fungusların saf kültürünün elde edilmesinde ve spor sayımında kullanılan besiyeridir (Downes ve Ito, 2001). 1 litre distile suda 39 g PDA manyetik karıştırıcıyla homojen karışımı sağlanarak çözdürülüp besiyerinin pH'sı 3.9-4.3 arasında sabit tutularak 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilerek hazırlanmıştır.

YpSs Agar (Half Strength Yeast Extract Agar)

Çizelge 3.4. YpSs besiyeri bileşenleri ve oranları

Bileşen	Miktar
Yeast extract	2 g/l
Nişasta	7.5 g/l
K ₂ HPO ₄	0.5 g/l
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.25 g/l
Agar	20 g/l
Distile su	1000 ml
pH	7.0±0.2

Bazı termofilik ve termotolerant fungus türleri farklı besiyerinde gelişim göstermektedir. Termofilik funguslar 40 °C, 45 °C, 50 °C ve 55 °C'de gelişimi için bazı minerallere gereksinim duyar (Cooney ve Emerson, 1964). YpSs agar besiyeri Emerson'un geliştirdiği besiyeridir. Besiyeri fungus gelişimi için kullanılmıştır.

Malt Extract (MEA) Agar (Merck 1.05398)

Çizelge 3.5. MEA besiyeri bileşenleri ve oranları

Bileşen	Miktar
Malt Extract	30 g/l
Mikolojik pepton	5 g/l
Agar	15 g/l
Distile su	1000 ml
pH	5.4±0.2

Standart mikrobiyolojik analizlerde maya ve küflerin geliştirilmesi, izolasyonu, sayımı ve stok kültürü elde edilmesi için kullanılan katı besiyeridir (Rapp , 1974). 48 g MEA 1 litre distile suda çözdürülerek manyetik karıştırıcı ile homojen bir şekilde karışması sağlanmış. Besiyerinin pH'sı 5.6'e ayarlanıp 5 ml'lik kryo tüplere 3 ml aktarılmış ve 121 °C'de 10 dakika sterilize edilmiştir. Tüpler yatık pozisyona getirilerek besiyerinin donması sağlanmıştır. Funguslar hazırlanan kryo tüp içindeki besiyerine ekilerek geliştirilmiştir. Gelişen fungus üzerine steril mineral yağ eklenerek stok kültürler hazırlanmıştır. Stok kültürler +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Fizyolojik Tuzlu Su Çözeltilisi (FTS)

Çizelge 3.6. FTS çözeltisi bileşenleri ve oranları

Bileşen	Miktar
NaCl	85 g/l
H ₂ O	1000 ml

Topraktan fungus örneklerinin elde edilmesi için kullanılan seyreltme çözeltisidir. FTS, 85 g NaCl'nin 1 litre distile suda çözdürülmesi ile hazırlanır ve otoklavda 121 °C'de 10 dakika sterilize edilir.

Malt Broth (Merck 1.05397)

Çizelge 3.7. Malt Broth besiyeri bileşenleri ve oranları

Bileşen	Miktar
Malt Extract	17 g/l
Mikolojik pepton	4 g/l
pH	4.8±0.2

Maya veya fungus sporlarının elde edilmesi ve sayımı için kullanılan besiyeridir (Rapp, 1974). Çalkalamalı inkübatörde üreyen sporlar liyofilize edilip DNA izolasyonunda kullanılmıştır. 1 litre distile suda 17 g MEB manyetik karıştırıcıda homojen karıştırılarak, 50 ml'lik erlenlere 15'er ml eklenip otoklavda 121 °C'de 10 dakika steril edilerek hazırlanır.

Laktofenol Pamuk Mavisi Çözeltisi (Merck 115945)

Çizelge 3.8. Laktofenol pamuk mavisi stok çözelti oranları

Bileşen	Miktar
%85 Laktik asit	99 ml
Anilin mavisi	1 g

Laktofenol Pamuk Mavisi Çözeltisi (Merck, M1137410100)

Çizelge 3.9. Laktofenol pamuk mavisi çözelti bileşen ve oranları

Bileşen	Miktar
%85 Laktik asit	100 ml
Gliserol	250 ml
Stok çözelti	3 ml
H ₂ O	50 ml

Laktofenol pamuk mavisi stok çözeltisi; anilin mavisinden 1 g tartılarak %85 laktik asitten 99 ml alınıp homojen karıştırılarak çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiden 3 ml, %85'lik laktik asitten 100 ml, gliserolden 250 ml ve steril distile sudan 50 ml alınarak homojen karışımı sağlanarak laktofenol pamuk mavisi hazırlanmıştır. Hazırlanan fungus preparatlarının misel ve spor yapılarının boyanarak morfolojik tanısının yapılmasında kullanılmıştır (Sime ve ark., 2002).

Tween-80 Çözeltisi (Merck CAS 9005-65-6)

Çizelge 3.10. Tween-80 çözeltisi bileşen ve oranları

Bileşen	Miktar
Tween-80	0.1 ml
Distile su	99.9 ml

Fungus spor süspansiyonu hazırlanması için kullanılmıştır.

GeneMATRIX Bitki&Fungus DNA İzolasyon Kiti (EURX, Cat. No. E3595)

Buffer P

Lyse F

RNase

Proteinase K

Buffer AC

Sol P

%96 etanol

Wash PX

Kit çözeltileri genomik DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

STE (Sodyum-Tris_EDTA) Tamponu

Çizelge 3.11. STE tamponu bileşen ve oranları

Bileşen	Miktar
0,1 M NaCl	5,844 g
0,05 M Tris (pH:7,5)	6,057 g
0,001 M EDTA	0,372 g
pH	7.5

Çözeltinin hazırlanması için maddeler tartılıp 1000 ml distile suda çözdürülmüştür. Çözeltinin pH'sı 7.5 olarak ayarlanmıştır. Fungus DNA izolasyonu sırasında hücrelerinin lizis işlemi için STE tamponu kullanılmıştır.

%10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)

10 g SDS tartılarak 100 ml distile suda çözdürülerek çözelti hazırlanmıştır. DNA izolasyonunda hücre içeriğinde bulunan lipidlerin parçalanması için kullanılmıştır.

Proteinaz K (20mg/ml)

20 mg Proteinaz K tartılarak 1 ml STE tamponunda çözdürülür. DNA izolasyonunda proteinlerin parçalanması için kullanılmıştır.

10X TBE (Tris-Borik asit_EDTA)

Çizelge 3.12. 10X TBE bileşen ve oranları

Bileşen	Miktar
0,89 M Tris-Baz	108 g
0,88 M Borik asit	55 g
0,02 M EDTA.2H ₂ O	9,3 g
pH	8.15±0.2

Elektroforezde kullanılan, iyonik güç ile jel üzerinde DNA ve PCR ürünlerinin ilerlemesini kolaylaştıran çözeltilidir. Maddeler tartılıp, 1 L distile suda manyetik karıştırıcıda homojen karışımı sağlanıp pH'sı 8.15-8.30 arasında ayarlanmıştır.

% 1'lik Agaroz Jel Hazırlanması

1 g agaroz üzerine 100 ml 1XTBE tamponu ve 5 µl SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Inc.) eklenerek hazırlanır. Elektroforez aşamasında total genomik DNA kalitesinin belirlenmesi ve PCR ürünlerinin kontrol edilmesinde kullanılmıştır.

6X Loading Dye

Çizelge 3.13. 6X Loading Dye bileşen ve oranları

Bileşen	Miktar
%0,015 Bromfenol Mavisi	5,844 g
%0,015 Xylene Cyanol FF	6,057 g
%30 Gliserol	0,372 g

Maddeler tartılarak 100 ml distile suda çözdürülerek elde edilen bir boyadır. İzolasyon sonucu elde edilen genomik DNA ve PCR ürünleriyle birlikte kullanılarak, elektroforez aşamasında hazırlanan jel kuyucuklarına DNA ve PCR ürünlerinin çökmesi için kullanılmıştır.

TE (Tris-EDTA) Tamponu

Çizelge 3.14. 6X TE bileşen ve oranları

Bileşen	Miktar
0,01 M Tris-HCl	1,211 g
0,001 M EDTA	0,372 g
pH	8.0

Tartılan maddeler 1 L distile suda homojen olarak çözüldükten sonra pH 8'e ayarlandı. Otoklavda 121 °C'de 5 dakika sterilize edilerek hazırlanan tampon çözeltilidir. Total DNA izolasyonunun son aşamasında elde edilen DNA'ların oda sıcaklığında çözünmesi ve uzun süreli saklanması için kullanılmıştır.

dNTP karışımı (Fermentas)

Ticari olarak satılan, 10 mM deoksिनükleotidtrifosfat içeren çözelti PCR(Polymerase chain reaction) işlemleri için kullanılmıştır.

Primerler (Thermo Fisher Scientific, Germany)

ITS-1: 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG'3

ITS-4: 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC'3

Fungus DNA örneklerinin 700 bp uzunluğundaki ITS (The Internal Transcribed Spacer) gen bölgesinin elde edilmesi için kullanılmıştır.

Tag DNA polimeraz (Fermentas 500 U, EP0402)

Kalıp DNA molekülünden hedeflenen gen bölgesinin çoğaltılmasını sağlamak için kullanılmıştır. Nükleotitlerin sentezini gerçekleştirir ve 72 °C'de çalışan enzimdir.

PCR reaksiyon buffer (Fermentas, 10X PCR, EP0402)

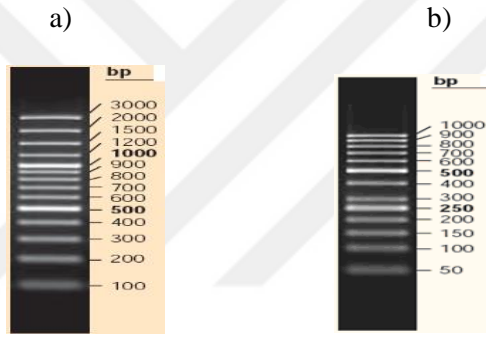
Taq DNA polimeraz ile beraber gelen ve enzimin çalışması için gerekli stabil pH şartlarını sağlar.

MgCl₂ solüsyonu (Fermantas, 3 mM, EP0402)

Taq DNA polimeraz ile beraber gelen ve enzimin çalışması için gerekli kofaktör olarak görev alan Mg iyonunu sağlar.

DNA Marker'ları (GenMark)

Genomik DNA'ların ve PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra yaklaşık bç uzunluğunu belirlemek amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 3.4. a) GenMark, O Gene Ruler 100 bp- 3000 bp (GM100-LC) b) GeMark, O Gene Ruler 50 bp- 1000 bp (GM50-LC)

3.1.3. Kullanılan Cihaz ve Aletler

Fungus inkübatörü (Thermo Scientific Heraeus)

Işık mikroskobu (Olympus CX22)

Olympus Stereo Zoom Mikroskop (Olympus SZ61)

Çalkalamalı inkübatör (Gerhardt-THO 500-1)

Su banyosu

Manyetik karıştırıcı (Thermomac T12)

Vorteks (WiseMix, WVM00010)

Santrifüj (Sigma 1-14)

Soğutmalı santrifüj (Hettich, Rotina 350)

Otoklav (Hirayama HG-50 CE)

Liyofilizatör (Labconco , Freezone 6)

Elektroforez (Consart HU13)

PCR cihazı(AB, Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler)

U.V Translüminatör (biodoc imaging system)

Spectrofotometre (Thermo Scientific, Nanodrop 2000)

100-1000 µl mikropipet (Eppendorf)

10-100 µl mikropipet (Eppendorf)

1-10 µl mikropipet (Eppendorf)

100-1000 µl mikropipet ucu

100-1000 µl filtreli mikropipet ucu

10-100 µl mikropipet ucu

10-100 µl filtreli mikropipet ucu

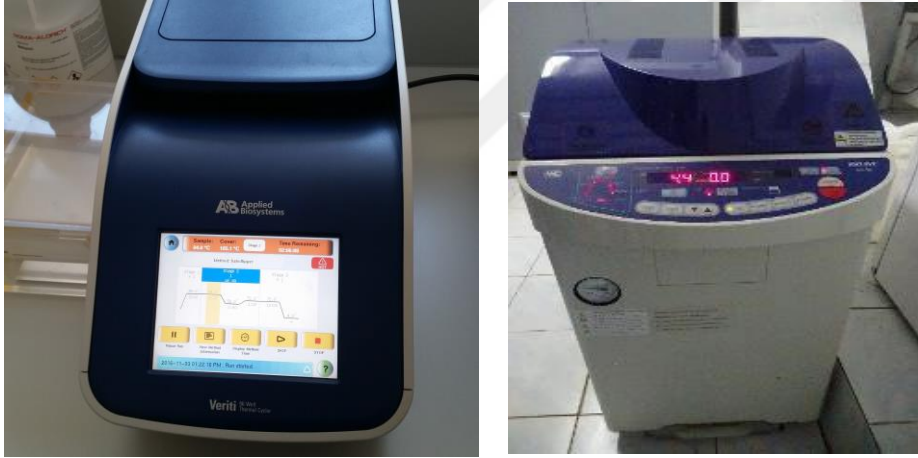
1-10 µl mikropipet ucu



Şekil 3.5. UV görüntüleme ve nanodrop cihazı



Şekil 3.6. Liyofilizatör ve inkübatör cihazı



Şekil 3.7. Otoklav ve PCR cihazı.

3.2. Örneklerden Mikrofungus İzolasyonu

3.2.1. Toprakta Örneklerin Elde Edilmesi

Buharkent, Germencik, Salavatlı, İmamköy ve Kuyucak lokalitelerinde, yer altından çıkan sıcak su kaynağından ve kaynağa yakın alanlardan her bir lokaliteyi temsil eden bölgelerden toprak ve su örnekleri gündüz 09.00-17.00 saatleri arasında alınmıştır. Ekstrem çevre koşullarında gelişen mikroorganizmalar ile çalışma yapıldığı için en kısa sürede örnekler laboratuvara getirilmiştir.

Örnekler, 20 g ile 50 g arasında değişen ağırlıklarla 5'er toprak örneği ve 5'er su örnekleri aseptik koşullar sağlanarak alınmıştır. Araziden alınan toprak örneklerinin alınma yöntemi; toprağın direkt havayla temas eden yüzeyinden yaklaşık 15-20 cm'lik üst yüzeyi kazılmış ve üst toprak atıldıktan sonra steril spatül ile alt kısımda bulunan doğrudan havayla temas etmeyen kısımdan toprak örnekleri alınmıştır. Alınan toprak örnekleri steril kilitli poşetlere konulmuştur (Zhang ve ark,2013).

Su örnekleri, eczaneden alınan steril 10 ml'lik enjektörler kullanılarak sıcak su kaynağının bulunduğu alanlardan alınmış 25 ml'lik steril falkonlara aktarılmıştır. Bütün örnekler steril örnek toplama kaplarına konulup Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma laboratuvarına getirilmiştir.

3.2.2. Toprak Analizi

Buharkent, Germencik, Salavatlı, Kuyucak ve İmamköy lokalitelerinden alınan toprak örnekleri Chow L. ve ark (2009)'nın yöntemine göre tartılmış gravimetrik ölçüm metodu ile 105 °C' de 24-48 saat bekletilerek sonrasında tekrar tartılarak toprağın sahip olduğu nem oranı ölçülmüştür. Bunun için $W_{H_2O} = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_2 - m_0)} * 100$ formülü kullanılarak ölçülmüştür.

m_0 : boş kabın kapağı ile birlikte kütlesi, g.

m_1 : nemli toprak ve örneği bulundurankabın kütlesi, g.

m_2 : 105 °C'de kurutulmuş toprak örneğinin kapla birlikte kütlesi, g.

Çizelge 3.15. Toprak örneklerinin gravimetrik ölçüm metoduyla ölçümleri

Lokalite	Toprak Ağırlığı(g)	Kuru Ağırlık (g)	Aradaki Fark (g)	% W_{H_2O}
Salavatlı	105,1	95,3	9,8	9,32
Germencik1	100,6	79,3	21,3	21,17
Germencik2	114,6	98,69	15,91	13,88
Buharkent1	135,1	114,6	20,5	15,17
Buharkent2	115,9	94,7	21,2	18,29
İmamköy	119,8	96,18	23,62	19,71
Kuyucak	124,3	108,51	15,79	12,70

Fungusların gelişimi için toprağın sahip olduğu organik-inorganik madde ve pH değeri önemlidir. Lokalitelerden alınan toprak örneklerinin karşılaştırılması için

her lokalitenin farklı bölgelerinden yaklaşık 500 gr toprak örneği alınmıştır. Toprağın içerdiği organik-inorganik madde oranı ve sahip olduğu pH değerlerini belirlemek için toprak analizleri Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde yapılmıştır. Toprak analizi çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.16. Toprak analizleri ve verileri

Örnek No	Bünye	Su ile Doygunluk (ml)	EC (mS/cm)	pH	Kireç (%)	Org. Mad. (%)			
P51	L	42	0,641	8,24	4,29	1,22			
İmamköy	Tın			Alkali	Kireçli	Düşük			
P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mg (ppm)	Na (ppm)	Fe (ppm)	Zn (ppm)	Mn (ppm)	Cu (ppm)	B (ppm)
5,46	52	2413	413	240	52,36	4,20	8,06	17,20	0,68
Düşük	Çok Düşük	Orta	Çok Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yeterli	Yeterli	Yeterli	Düşük
Örnek No	Bünye	Su ile Doygunluk (ml)	EC (mS/cm)	pH	Kireç (%)	Org. Mad. (%)			
P52	L	44	1,645	9,65	4,77	0,73			
Germencik	Tın			Çok Kuv. Alkali	Kireçli	Çok Düşük			
P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mg (ppm)	Na (ppm)	Fe (ppm)	Zn (ppm)	Mn (ppm)	Cu (ppm)	B (ppm)
9,55	468	2011	176	1736	136,46	4,98	12,10	23,34	10,51
Orta	Çok Yüksek	Orta	Orta	Çok Yüksek	Yüksek	Yeterli	Yeterli	Yeterli	Toksik
Örnek No	Bünye	Su ile Doygunluk (ml)	EC (mS/cm)	pH	Kireç (%)	Org. Mad. (%)			
P53	CL	62	3,900	8,38	31,65	0,91			
Kuyucak	Killi Tın			Alkali	Aşırı	Çok Düşük			
P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mg (ppm)	Na (ppm)	Fe (ppm)	Zn (ppm)	Mn (ppm)	Cu (ppm)	B (ppm)
12,11	703	9753	178	2559	30,10	3,48	14,02	20,92	10,50
Orta	Çok Yüksek	Çok Yüksek	Yüksek	Çok Yüksek	Yüksek	Yeterli	Yeterli	Yeterli	Toksik
Örnek No	Bünye	Su ile Doygunluk (ml)	EC (mS/cm)	pH	Kireç (%)	Org. Mad. (%)			
P54	L	38	0,855	9,94	24,97	0,49			
Buharkent	Tın			Çok Kuv. Alkali	Aşırı	Çok Düşük			
P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mg (ppm)	Na (ppm)	Fe (ppm)	Zn (ppm)	Mn (ppm)	Cu (ppm)	B (ppm)
5,80	409	2413	73	1373	17,68	2,99	10,60	14,34	10,50
Düşük	Çok Yüksek	Orta	Düşük	Çok Yüksek	Yüksek	Yeterli	Yeterli	Yeterli	Toksik

Mikrofungusların gelişimini etkileyen en önemli faktör toprağın sahip olduğu organik-inorganik madde miktarı, pH değeri, toksik element değeri, toprağın suya doygunluk oranlarıdır. Bunun için lokatilerinden alınan toprak örneklerinin analiz sonuçları mikrofungusların geliştiği ortam ile ilgili bilgi sahibi olmasını sağlamıştır. Elde edilen toprak analizi sonucu mikrofungusların gelişebileceği uygun besiyeri hazırlamak için kullanılmıştır. Germencik, Buharkent ve Kuyucak lokalitelerinin alınan toprak örneklerinin organik madde oranı çok düşük değerde olduğu, İmamköy lokalitesinin ise düşük değerde organik madde içerdiği ölçülmüştür. Bütün toprak örnekleri kireçli yapıya sahip olduğu ölçülmüştür. Toprakların sahip olduğu su doygunluk değerleri normal değerlerde olduğu ölçülmüştür. Bütün toprak örneklerinde bulunan inorganik madde miktarı değişkenlik göstermektedir. Mikrofungusların ve diğer organizmaların gelişimini etkileyen Bor (B) elementi değerleri ölçülmüştür. Bor (B) elementi İmamköy'den alınan toprak örneğinde düşük değerde olduğu, Kuyucak, Germencik ve Buharkent lokalitelerinden alınan toprak örneklerinde ise bor (B) elementinin toksik değerde olduğu ölçülmüştür.

3.2.3. Mikrofungus İzolasyonu ve Stok Kültür

İzolasyon, Zhang ve ark (2013) çalışmalarında belirttikleri şekilde seyreltme plaka tekniği ile yapılmış, kültürel ve morfolojik karakterizasyonu için, toprak örneklerinden 10 g, fizyolojik tuzlu (FTS)'dan 90 ml alınıp 9:1 oranı göz önüne alınarak süspansiyonlar hazırlanmıştır. 120 rpm de 2 dakika vorteks edildikten sonra 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 'ya kadar dilüsyonlar hazırlanmıştır. Steril Rose Bengal Kloramfenikol Agar (RBKA) besiyerine hazırlanan her bir süspansiyondan mikropipet yardımıyla 100' er µl alınarak besiyerine dökülmüş ve steril drigalski spatülü yardımı ile yayma ekim yöntemi kullanılmıştır. Karışık kültürler elde etmek için 4-7 gün 30 °C'de inkibe edilmiştir (Krishnan ve ark,2011). RBKA besiyeri kullanılmasının amacı, topraktan alınan örneklerde bakterilerin gelişimini engellemek ve doğrudan fungus örnekleri elde etmektir.



Şekil 3.8. RBKA ve PDA besiyeri karışık fungus kültürü

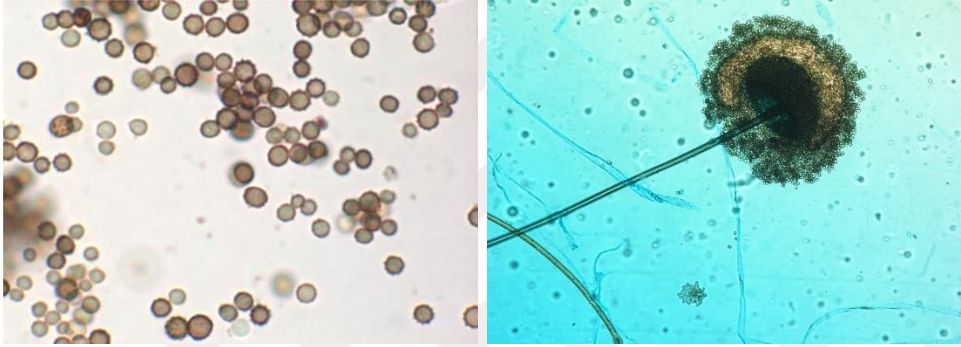
Otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilen PDA (Potato-Dextrose Agar) besiyerine RBKA besiyerinde karışık kültürü elde edilen funguslardan üç nokta ekim yöntemiyle kültürler saflaştırılmıştır. Saf kültürlerden stok kültür elde etmek için Malt Extract Agar (MEA) besiyeri kullanılmıştır. Kryo tüplerde yatık olarak hazırlanmış steril yatık MEA'ya tek nokta ekim yöntemiyle ekilerek 30 °C'de 5-7 gün inkubasyondan sonra üzerlerine steril mineral yağdan 3-5 ml mikropipetle eklenmiş ve +4 °C'de stok kültürler saklanmıştır.

Fungusların termofilik ve termotolerant özelliğe sahip olduğunu tespit etmek için PDA besiyerine stok kültürlerden üç nokta ekim yöntemi kullanılmış inkübatör kullanılarak 40 °C ,45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C'de fungus örnekleri 4-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Belirlenen sıcaklıklarda farklı besiyerine ihtiyaç duyan ve PDA besiyerinde gelişimi gözlenmeyen fungusların Cooney ve Emerson'un 1964'te fungusların gelişimi ile ilgili yaptığı bilimsel çalışma örnek alınarak hazırlanan YpSs Agar besiyerine ekimi yapılmıştır. 40 °C , 45 °C, 50 °C, 55 °C'de fungus örneklerinin gelişimi gözlenmiştir (Cooney ve Emerson, 1964).

3.2.4. Mikrofungusların Morfolojik Tanısı

Morfolojik tanımlama yöntemi mikroskobik ve makroskobik olarak iki aşamada yapılıp, buna bağlı olarak fungus türlerinin özelliklerine bakılarak daha önceki çalışmalarda yapılmış fungus tayin anahtarı kullanılarak morfolojik tür tanımı yapılmıştır (van Oorschot, 1977; Awao ve Udagawa, 1983; Basu, 1985; Stchigel ve ark, 2000) .

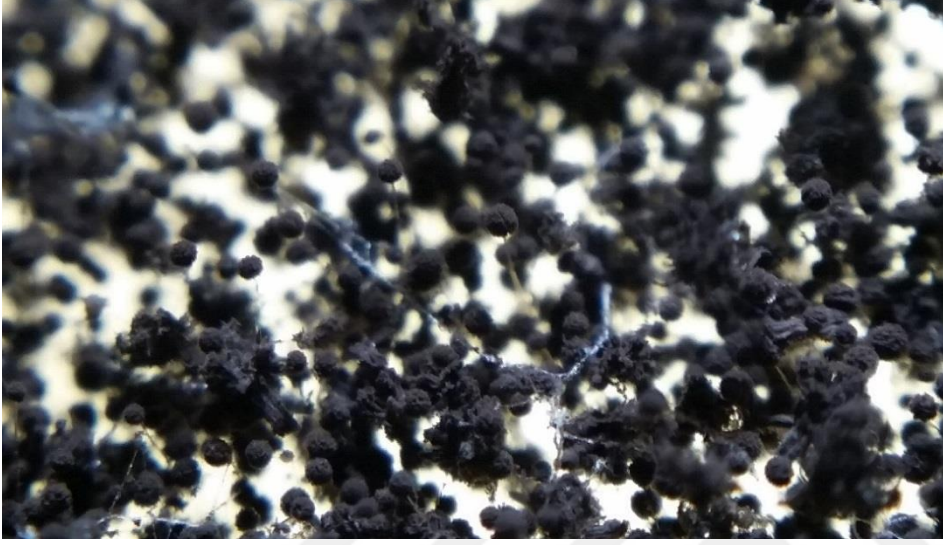
Mikroskopik olarak, laktofenol pamuk mavisi boyasıyla spor yapısına, spor rengine ve spor şekline bakılarak incelenmiştir. Ayrıca konidyofor, vezikül, fiyalid, medula, konidya ve konidyal kafa yapısı özelliklerine bakılarak tayin anahtarları yardımıyla türler tespit edilmiştir. Makroskopik olarak, tayin anahtarında kullanılan diğer özellikler ise koloni rengi, koloni büyüklüğü, koloni yapısı gibi özelliklerdir.



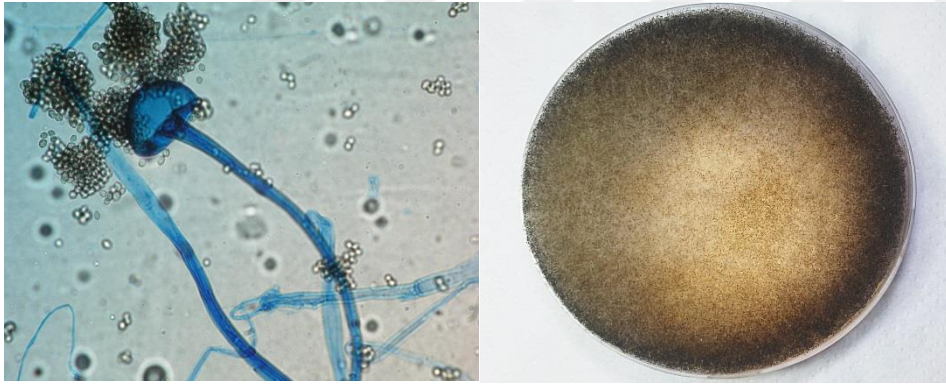
Şekil 3.9. *Aspergillus niger*'in mikroskopik görüntüsü



Şekil 3.10. *Aspergillus niger*'in makroskopik görüntüsü ve YpSs Agar besiyerinde kültürü



Şekil 3.11. *Aspergillus niger*'in spor ve misel yapısının makroskobik görüntüsü.



Şekil 3.12. *Rhizopus oryzae*'nin mikroskobik ve kültür görüntüsü.

3.2.5. Total DNA İzolasyonu

Moleküler tür tanımlama yöntemi; makroskobik ve mikroskobik morfolojik tanısı yapılan türlerin DNA izolasyonu için stok kültürlerden MEA besiyerine ekim yapılarak, 5 gün 30 °C' de inkube edilen kültürlerden oluşan misellerden 0.5 g boş steril eppendorf tüplerine aktarılmış ve 12 saat liyofilizasyon işlemi yapılmıştır. Elde edilen funguslardan fenol-kloroform DNA izolasyonu Tran-Dinh ve ark. (1999)'a göre gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyon protokolü modifiye edilerek yapılmıştır.

3.2.5.1. Fenol-Kloroform DNA izolasyon yöntemi

1. Fungus izolatlarından yaklaşık 0.05 g miselleri tartılarak etiket numaraları yazılmış steril eppendorf tüplerine konulmuş, kapakları açılarak parafilmle kaplanmıştır.

2. Örnekler -20°C 'de 4-6 saat bekletilmiş, daha sonra 1 gece liyofilizatöre bırakılmıştır.

3. Liyofilizatörden alınan örneklerin üzerine 600 μl STE tamponu eklenerek suspanse edilmiştir.

4. 75 μl SDS ve 25 μl Proteinaz K eklenerek 2 saat 55°C 'de sıcak su banyosunda inkubasyona bırakılmıştır.

5. İnkubasyon sonrasında v/v (eşit hacimde) Fenol-Kloroform İzomil Alkol (25:24:1) eklenerek, tüpler 5 dakika alt üst edilmiştir.

6. Daha sonra 13.200 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Oluşan üst faz yine etiket numaraları yazılmış steril eppendorf tüplerine aktarılmıştır.

7. Üzerine 1 ml %96'lık soğuk etanol eklenerek tüpler alt üst edilmiştir.

8. Tüpler 20 dakika buzda bekletilerek, 13.200 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmış ve tüplerdeki alkol dikkatli bir şekilde dökülmüştür.

9. Örnekler 37°C 'lik etüvde birkaç dakika bekletilerek etanolün tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır.

10. Alkolü uzaklaşan örneklere 100 μl TE tamponu eklenerek, bir gece oda sıcaklığında bekletilmiştir.

11. Tamamen çözünen DNA örnekleri PCR çalışmaları için -20°C 'de saklanmıştır.

Bazı fungus türlerinde pigmentasyondan dolayı fenol-kloroform DNA izolasyon yönteminde elde edilen DNA'ların kalitesinin düşük olmasından dolayı fungus izolasyon kiti kullanılmıştır.

3.2.5.2. Genematrix Fungus DNA izolasyon kit yöntemi

1. Steril kolonlara 40 µl Buffer P solüsyonu kolonları aktive etmek için eklenmiştir.
2. 20mg liyofilize edilmiş fungus örneği steril eppendorfa aktarılmıştır.
3. 400 µl Lyse F çözeltisi eklenip vorteksle karışımı sağlanmıştır.
4. 3 µl RNase ve 10 µl Proteinase K eklenip vorteksle karıştırıldıktan sonra 3-5 defa alt-üst edilmiştir.
5. 65 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 dakika bekletilmiş. Her 10 dakikada bir 3-5 defa alt üst edilmiştir.
6. 130 µl Ac Buffer solüsyonu eklendikten sonra 3-5 defa alt üst edildikten sonra 5 dakika -20 °C'de buzda bekletilmiştir.
7. 10 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
8. 400 µl supernatant yeni eppendorfa alınmıştır.
9. 350 µl Sol P çözeltisinin eklenmiş.
10. -20de bekletilmiş %70 EtOH'dan 250 µl eklenip 1 dakika alt üst edilmiştir.
11. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
12. Supernatanttan 600 µl alınıp aktive edilmiş kolona eklenmiştir.
13. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilen supernatant tekrar kolona yüklenmiştir.
14. 12000 rpm'de 1 dk santrifüj edildikten sonra supernatant atılmıştır.
15. Kolon toplama eppendorfuna konulup üzerinde 500 µl Wash PX solüsyonu eklenmiş ve 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra toplama çözeltisi atılmıştır. Bu işlem 2 defa uygulanmıştır.

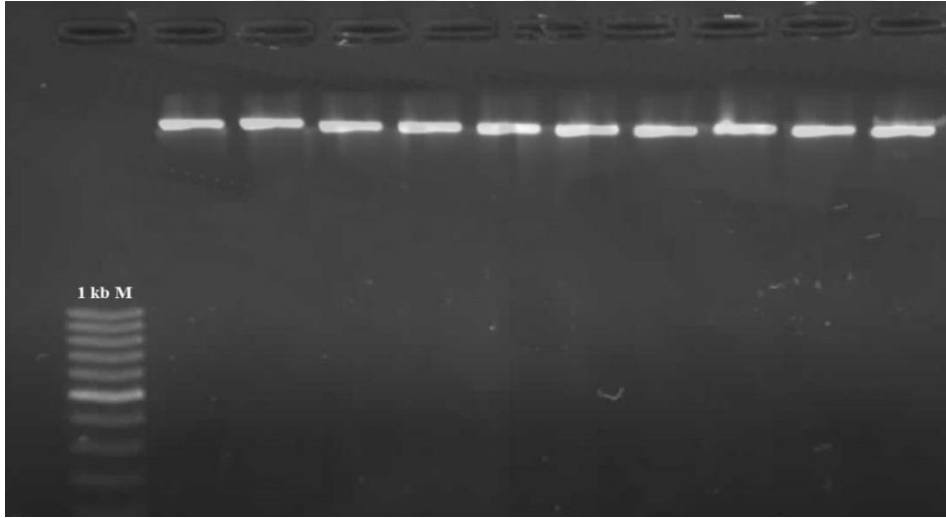
16. Kolon alınıp eppendorfa yerleştirilmiş, kolonun üzerine 70 °C su banyosunda bekletilmiş Eulotion Buffer'dan 100 µl konulmuş ve 3 dakika su banyosunda bekletilmiştir.

17. 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra total DNA elde edilmiştir.

18. Elde edilen DNA örnekleri doğrudan PCR çalışmaları için kullanılmıştır

19. Stok DNA'lar daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

DNA izolasyonu gerçekleştirilen DNA örnekleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV (UVP- UVGL-58) elektroforez görüntüleme cihazında genomik DNA görüntülenmiştir.



Şekil 3.13. Genomik DNA UV görüntüleme cihaz görüntüsü.

DNA örnekleri Nanodrop Spektrofotometre (Thermo) yardımıyla 260 nm dalga boyunda ölçümlerine bağlı olarak çift zincirli DNA derişimi hesaplandı.

Çizelge 3.17. Nanodrop spektrofotometre DNA derişimi.

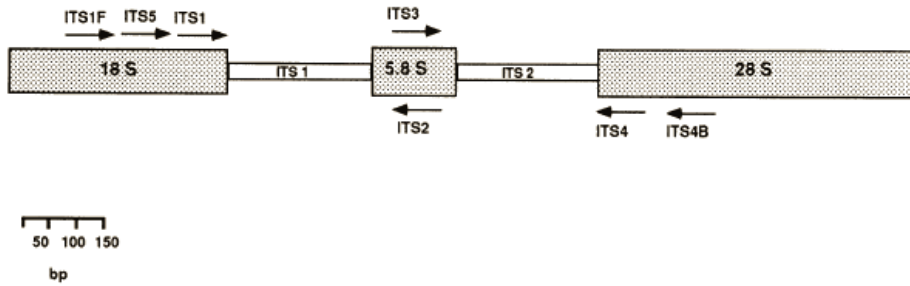
$CDNA = OD_{260\text{ nm}} \times SK \times 50$
OD - Optik Dansite (260 nm'de okunan absorbans değeri).
SK - Sulandırma katsayısı.
50 - 260 nm'de 1 optik dansitenin içerdiği DNA miktarı.

3.2.6. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), *in vitro* koşullarında DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PCR; basit, spesifik ve hassas bir tekniktir (Saiki ve ark, 1985; Mullis, 1990). Fungusların moleküler tanısı için yaklaşık 700 bp uzunluğundaki ITS (The Internal Transcribed Spacer) gen bölgesi parçası çalışılmıştır. PCR için, ITS-1 ve ITS-4 ;

ITS-1: 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG'3 (Forward)

ITS-4: 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC'3 (Reverse) primerleri kullanılarak oligonükleotidler elde edilerek çoğaltıldı.



Şekil 3.14. rDNA (18S, 28S) ITS gen bölgeleri, çalışma prensibi (Boysen ve ark., 1996)

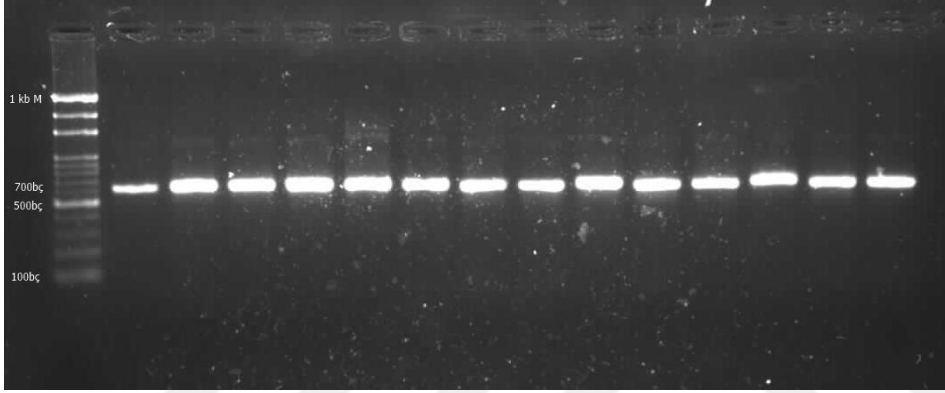
ITS gen bölgesi çoğaltma işlemi için, son hacimde 4 ng/μl kalıp DNA (100 ng/μl), 1x Taq tamponu [10x Taq Buffer; 100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, % 0.8 Nonidet P40; Fermentas, MBI], 1.5 mM MgCl₂ (25 mM; Fermentas, MBI), 0.1 mM dNTP karışımı (herbir dATP, dTTP, dCTP, dGTP 0.5 mM; Fermentas, MBI), 0.02 U/μl Taq polimeraz (5 U/μl; Fermentas, MBI), 0.2 pmol/μl ITS 1 ve ITS 4 oligonükleotidleri (her biri 25 pmol/μl) 25 μl reaksiyon hacminde steril distile su ile tamamlanmıştır. PCR reaksiyonu için; AB(Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler) cihazı kullanılmıştır.

Çizelge 3.18. PCR reaksiyon koşulları

Pre-denatürasyon	95 °C	5 dk
Denatürasyon	95 °C	1 dk
Annealing	55 °C	1 dk
Extasyon	72 °C	1 dk
Final extasyon	72 °C	5 dk

PCR ile gen çoğaltma işlemi 35 döngü (95 °C 1 dk (denatürasyon), 55 °C 1 dk (annealig), 72 °C 1 dk (extasion)) olarak yapıldı.

Elde edilen PCR ürünleri, hazırlanan %1.2'lik agaroz jele yüklenmiştir. PCR ürünleri UV görüntüleme sisteminde (UVP- UVGL-58) görüntülenmiştir.



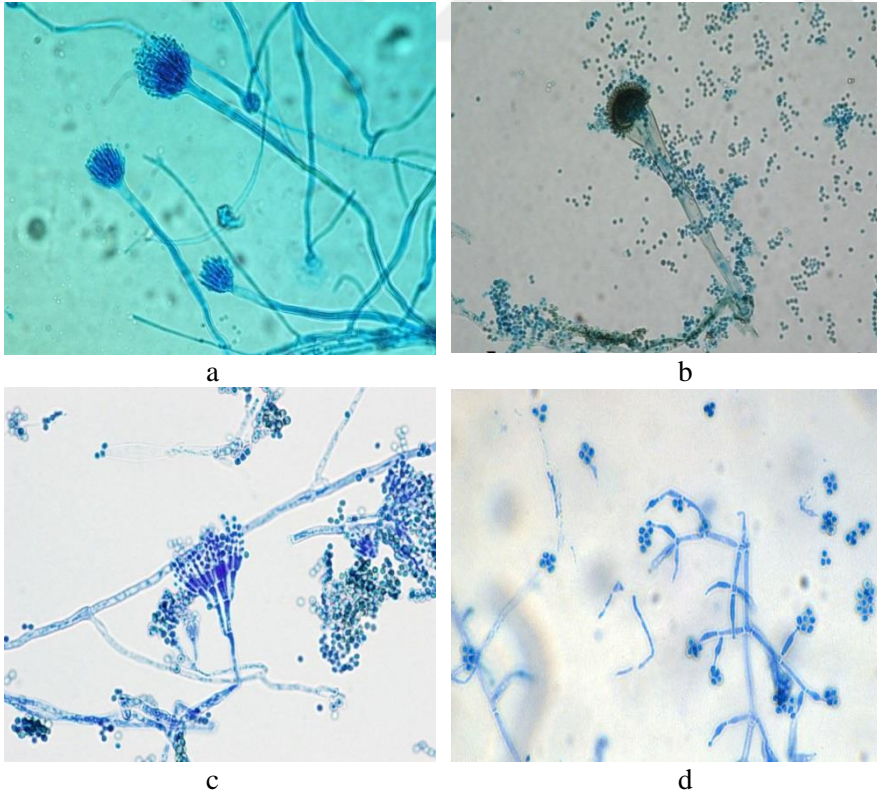
Şekil 3.15. ITS gen bölgesi çoğaltılan PCR ürünlerinin UV görüntüleme cihazında görüntüsü

4. BULGULAR

Morfolojik ve moleküler tür tayini sonucu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Westerdykella*, *Talaromyces*, *Lichtheimia*, *Sarcopodium*, *Scedosporium* ve *Curvularia* cinslerine ait termofilik ve termotolerant 99 fungus türü izole edilmiştir (Çizelge 4.1).

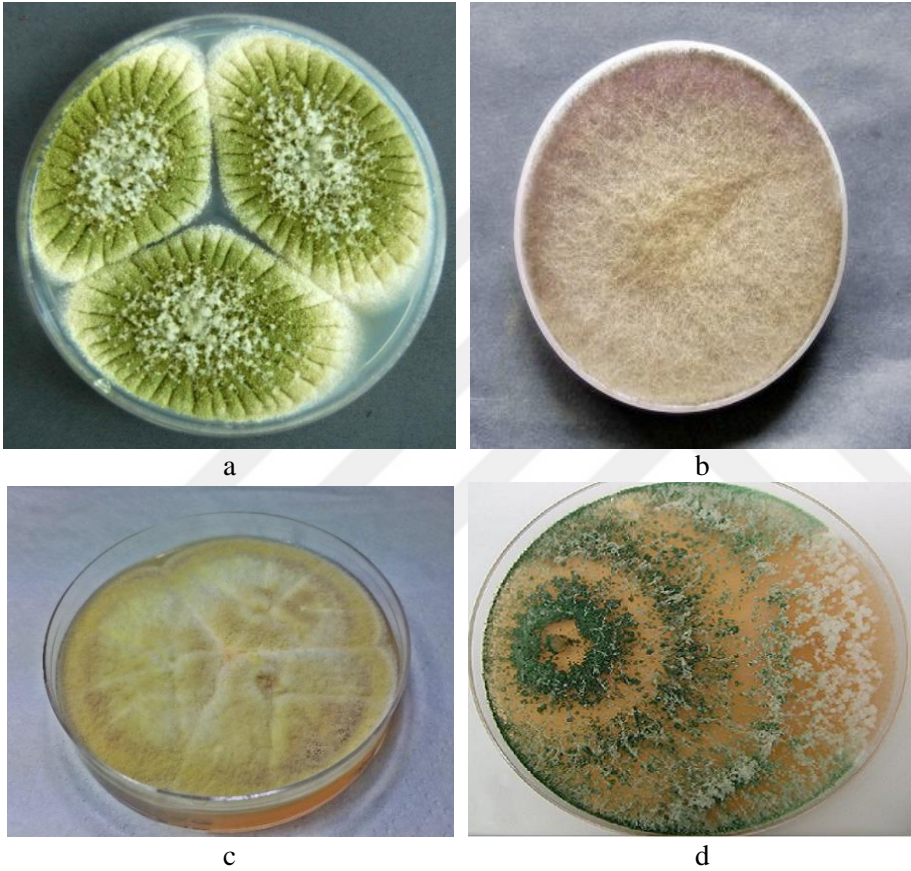
Morfolojik tanılama yönteminde makroskobik ve mikroskobik olarak (Hartog ve ark., 1981, Samson ve ark. 2004)'te yaptıkları çalışmaya göre; fungusların kültür rengi, koloni büyüklüğü, konidyofor yapısı, konidyofor uzunluğu, konidia şekli, fiyalid ve metula durumu, spor şekli ve spor yapısı gibi özelliklere bakılarak tayini yapılmıştır.

Laktofenol pamuk mavisi boyasıyla boyanan fungusların mikroskobik görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Laktofenol pamuk mavisiyle boyanan spor örnekleri. a) *Aspergillus fumigatus*, b) *Aspergillus terreus*, c) *Penicillium spp.*, d) *Trichoderma harzanium*.

Makroskobik olarak kültür rengi, kültür büyüklüğü gibi özellikler kullanılarak tayin edilmiştir (Şekil 4.2).

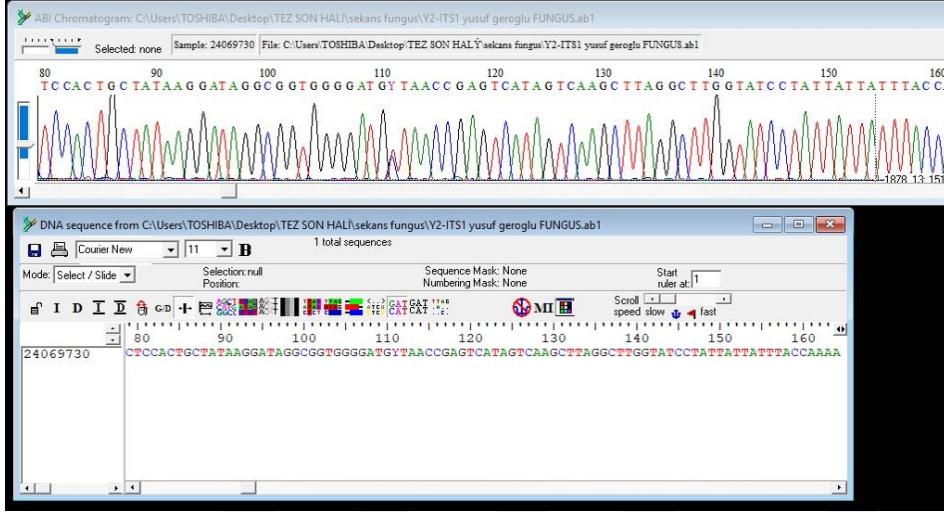


Şekil 4.2. Fungus kültür örnekleri. a) *Aspergillus flavus*, b) *Mucor circilinooides*, c) *Aspergillus terreus*, d) *Trichoderma harzanium*

Moleküler tür tanımlanma için daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan ITS 1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') ve ITS 4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') primerleri kullanılarak (White ve ark., 1990) yaklaşık olarak 700 bp uzunluğunda bölgesi PCR yardımıyla çoğaltılarak gen dizileri elde edilmiştir.

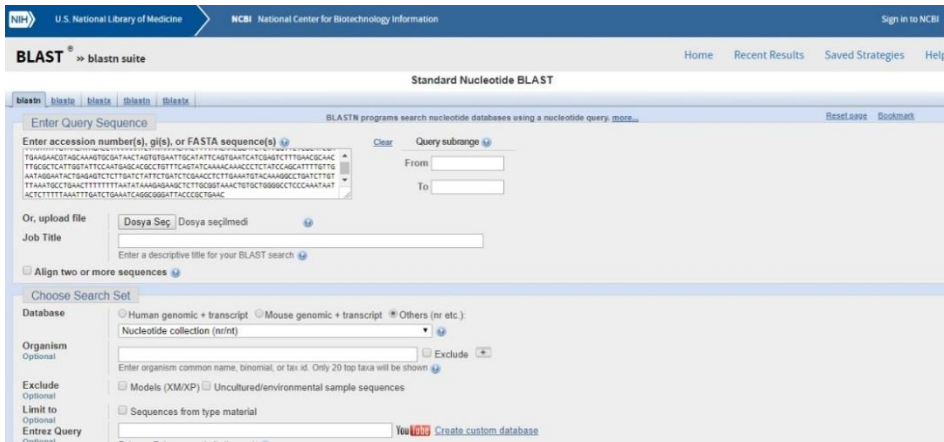
PCR temizleme kitinden geçirilen agaroz jelle kontrol edilen ITS örneklerine, enzimatik sentez yöntemi (Sanger ve Coulson, 1975) kullanılarak geliştirilmiş bir kapiller sistemle (Automatic Sequencer 3730xl) otomatik DNA dizi analizi MacroGen firması tarafından yaptırılmıştır (MacroGen Inc., Netherlands). DNA

dizi analiz sonuçları BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) programı (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) kullanılarak görüntülenmiştir.



Şekil 4.3. BioEdit 7.2.5 programında DNA dizi analiz sonuçları.

DNA dizi verileri, Clustal W çoklu dizi hizalama programı (Clustal W multiple sequence alignment program) (<http://www.clustalw.genome.jp/>) ile hizalanmıştır. Elde edilen diziler daha önceki çalışmalarda tespit edilen ve GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)’da bulunan dizilerle kıyaslanmıştır. En yüksek yüzdeye sahip olan eşleştirmelerle karşılaştırma yapılarak moleküler tür tayini yapılmıştır.



Şekil 4.4. Nükleik asit dizisinin NCBI’da blastlanması

Download - GenBank Graphics

Uncultured *Aspergillus* clone GM58 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: MQ452851.1 Length: 568 Number of Matches: 1

Score: 837 bits(453) Expect: 0.0 Identities: 453/453(100%) Gaps: 0/453(0%) Strand: Plus/Plus

Query 1 0000CCCGCCCGCCGAGACCCACATCAACGCTTTCCTGAAGTATCGAGTCTGAGT 60
Sbjct 106 0000CCCGCCCGCCGAGACCCACATCAACGCTTTCCTGAAGTATCGAGTCTGAGT 60

Query 61 TGTATTCTGTAACTAAATTTTCCACACGGATCTCTTGTTCGGCATCATGAA 120
Sbjct 166 TGTATTCTGTAACTAAATTTTCCACACGGATCTCTTGTTCGGCATCATGAA 120

Query 121 GAAACGAGCAATGCGATAGTATTTGATTTGAGATTTCAATGATCATCGAGTTC 180
Sbjct 226 GAAACGAGCAATGCGATAGTATTTGATTTGAGATTTCAATGATCATCGAGTTC 180

Query 181 TBAACGACATTTGCCCCCTGATATTCGCGGGGACATGCTTCCGAGCTATTGCT 240
Sbjct 286 TBAACGACATTTGCCCCCTGATATTCGCGGGGACATGCTTCCGAGCTATTGCT 240

Query 241 CCTCAAGACAGCTTTTATTTTGGCCCGCCCGCTCCCTCCCGAGGAGAGCCGAA 300
Sbjct 346 CCTCAAGACAGCTTTTATTTTGGCCCGCCCGCTCCCTCCCGAGGAGAGCCGAA 300

Query 381 AAGCAGCGGACCCCGCTCGTCTGAGCTATGAGGCTTTTCACCTCTCTGTA 360
Sbjct 406 AAGCAGCGGACCCCGCTCGTCTGAGCTATGAGGCTTTTCACCTCTCTGTA 360

Query 361 BACCAGCCCGCCGACGCGACACCTTATTTTCTAGGTTTCGATCGATCAAG 420
Sbjct 406 BACCAGCCCGCCGACGCGACACCTTATTTTCTAGGTTTCGATCGATCAAG 420

Query 431 TAGGGATCCCGTGAACCTTAGCATCAATA 453
Sbjct 526 TAGGGATCCCGTGAACCTTAGCATCAATA 453

Download - GenBank Graphics

Aspergillus fumigatus strain M1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: MH620181.1 Length: 569 Number of Matches: 1

Şekil 4.5. NCBI blast sonucu dizi analizi

Nucleotide BLAST: Search x NCBI BlastNucleotide S... x YUSUF

← → Güvenli | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

İşbiyoloji konular | Summer Music Mix | Rose Bengal Chloro | The Korean Journal | Fusarium verticillioides | Growth of ex-type | Select seq KR70457 | Baculose lampiro | Diğer yer işaretleri

Sequences producing significant alignments:
Select All None Selected 0

Alignments | Download | GenBank | Graphics | Distance from results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Mucor circinelloides isolate FBK1.3.0127 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1020	1020	100%	0.0	99%	KY928860.1
Mucor circinelloides isolate NIN-D01 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1020	1020	100%	0.0	99%	M0519730.1
Mucor circinelloides isolate NIN-D1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1020	1020	100%	0.0	99%	M0519730.1
Mucor circinelloides f. circinelloides strain SGU-RT727 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1020	1020	100%	0.0	99%	KJ945899.1
Mucor circinelloides strain 4-H090 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1020	1020	100%	0.0	99%	KJ921185.1
Mucor circinelloides strain ITCM-5032 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1020	1020	100%	0.0	99%	KR263057.1
Mucor circinelloides strain ITCM-195 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1020	1020	100%	0.0	99%	KR050963.1
Mucor circinelloides f. circinelloides 195 ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1; 5.8S ribosomal RNA gene; and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1020	1020	100%	0.0	99%	KJ588204.1
Mucor circinelloides isolate Bam1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1020	1020	100%	0.0	99%	KF298072.1
Baculosella lamerospora strain Ba-21 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1; 5.8S ribosomal RNA gene; and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1020	1020	100%	0.0	99%	JQ679463.1
Mucor circinelloides strain DGMs internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1020	1020	100%	0.0	99%	KJ521085.1
Mucor circinelloides strain UOAHCPFF 9964 isolate ITHM1-IT9 ID MT92078 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1; 5.8S ribosomal RNA gene; and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1020	1020	100%	0.0	99%	GU376118.1
Uncultured compost fungus 195 rRNA gene (partial); ITS1; 5.8S rRNA gene; ITS2; and 28S rRNA gene (partial); clone NK009_029	1020	1020	100%	0.0	99%	FM177667.1
Uncultured zygomycete ITS region including 18S rRNA gene; ITS1; 5.8S rRNA gene; ITS2; and 28S rRNA gene; clone BF-GTU2	1020	1020	100%	0.0	99%	AM991804.1
Mucor circinelloides isolate BMJ04995 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	100%	0.0	99%	M0563951.1
Mucor circinelloides isolate BMJ03934 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	100%	0.0	99%	M0583947.1
Mucor circinelloides isolate BMJ02707 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	100%	0.0	99%	M0583944.1
Mucor circinelloides f. circinelloides strain 16-08-85 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	100%	0.0	99%	M0583944.1

Questions/comments

Şekil 4.6. Blast sonuçlarının GenBank'taki verilerle karşılaştırması

Türleri tespit edilen mikrofungusların birbiriyle olan benzerliklerini ve akraba ilişkilerini analiz etmek için fasta formatlarındaki nükleotit dizileri MEGA 6.06 programına kaydedilmiştir (Şekil 4.5).

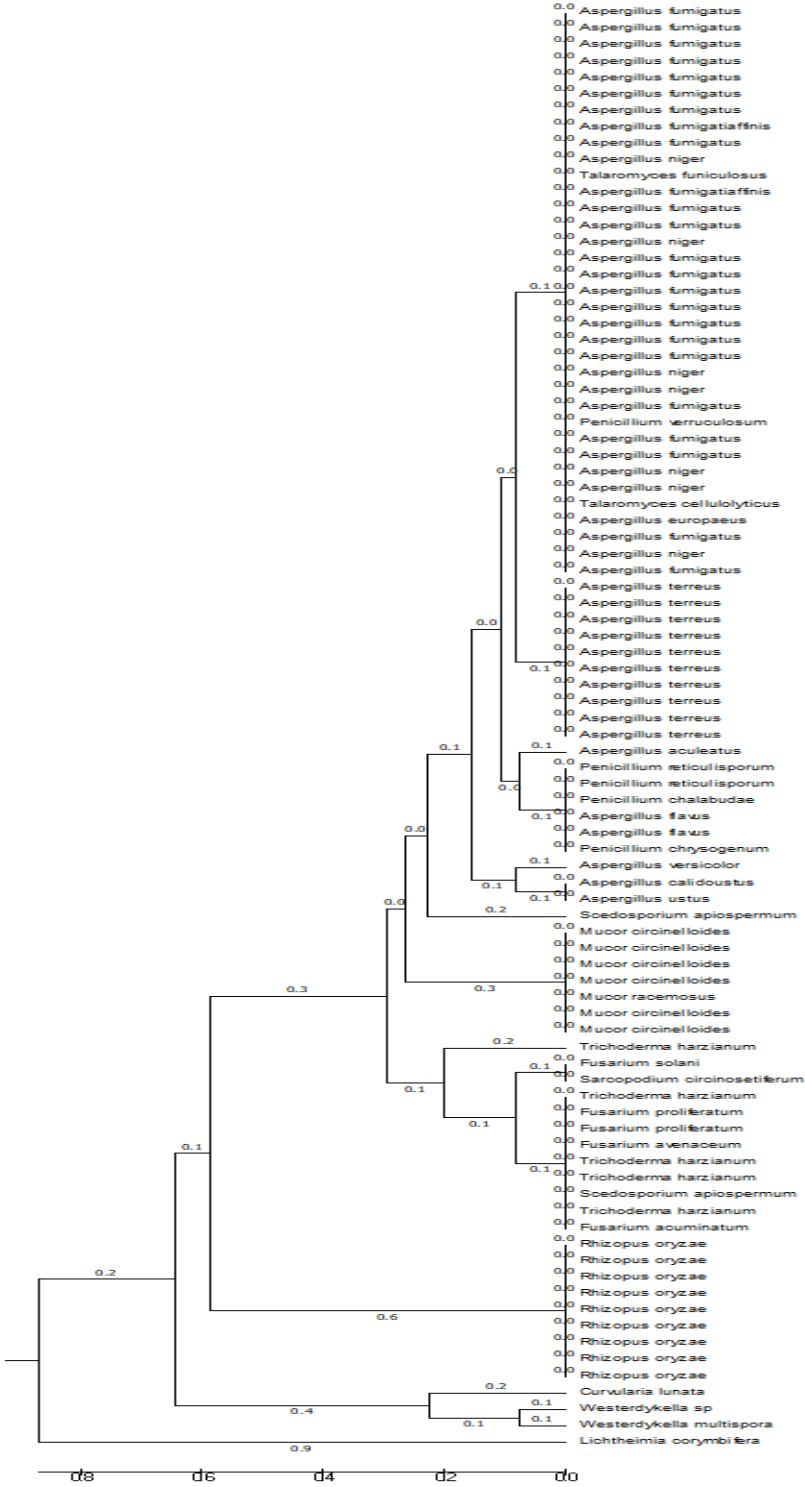


Şekil 4.7. Fungus türlerin MEGA 6.06 programındaki nükleotit dizi karşılaştırmaları

ITS gen bölgesi dizileri tespit edilen fungusların birbirlerine olan benzerlikleri ve filogenetik akrabalıklarını tespit etmek funguslara ait haplotiplerinin istatistiksel veri analizi (Clement ve ark., 2000)'de geliştirdikleri MEGA 6.06 bilgisayar programı kullanılmıştır. Programda (Phylogeny/Construct/Test Maximum Parsimony Tree) maksimum parsimoni filogeni ağacı (Şekil 4.8) ve ITS gen bölgesi ile tespit edilen türlerin farklı haplotiplerinin UPGMA uzaklık ağacı Jukes-Cantor modeli kullanılmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Mikrofungus türlerinin maksimum parsimoni filogeni ağacı



Şekil 4.9. Fungus haplotiplerinin (ITS gen bölgesi) UPGMA uzaklık ağacı

Tez çalışmasında morfolojik ve moleküler tanısı yapılan mikrofungus türlerinin; laboratuvar kayıt numaraları, üredikleri sıcaklık, tür isimleri ve GenBank'taki kayıtlı accession numaraları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Mikrofungus izolatlarının numara, isim, derece, tür isimleri ve accession numaraları

No.	İsim	Derece (°C)	Tür isimleri	Accession No.	GenBank % Eşleşme
1	GE1B	40	<i>Mucor circinelloides</i>	KY828880.1	100
2	SA3C2	40	<i>Mucor circinelloides</i>	KY828880.1	100
3	GE1C su örneği	50	<i>Aspergillus terreus</i>	MH201174.1	100
4	BU5C19	50	<i>Aspergillus terreus</i>	MF447153.1	100
5	GE1D su örneği	50	<i>Aspergillus fumigatus</i>	KF177414.1	100
6	SA19B	40	<i>Aspergillus niger</i>	MF379661.1	100
7	K1A28	50	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MF379664.1	99
8	GE1B56	45	<i>Rhizopus oryzae</i>	MG583994.1	100
9	SA3C11	45	<i>Aspergillus terreus</i>	MH389054.1	100
10	BU11A	40	<i>Curvularia lunata</i>	MH299873.1	100
11	BU92	40	<i>Fusarium solani</i>	KC156601.1	100
12	KU1A su örneği	40	<i>Penicillium reticulisporum</i>	NR_121231.1	100
13	BU41A	40	<i>Aspergillus europaeus</i>	LT899469.1	99
14	KU1D3	40	<i>Talaromyces cellulolyticus</i>	MF093209.1	100
15	BU4D2	40	<i>Trichoderma harzianum</i>	MF780869.1	100
16	GE1X su örneği	40	<i>Aspergillus versicolor</i>	KU258497.1	100
17	BU3A	40	<i>Aspergillus niger</i>	MF379660.1	100
18	BU5F	40	<i>Aspergillus niger</i>	MG659659.1	100
19	KU1A	45	<i>Penicillium reticulisporum</i>	NR_121231.1	100
20	BU51B	40	<i>Aspergillus aculeatus</i>	MH389050.1	100
21	BU28B	50	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MF379664.1	100
22	BU68	50	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MF189909.1	100
23	GE1C	40	<i>Aspergillus terreus</i>	MH389054.1	100
24	SA3C11	40	<i>Aspergillus terreus</i>	MH389054.1	100
25	BU4D1	40	<i>Penicillium verruculosum</i>	JN565299.1	100
26	KU1E	40	<i>Fusarium proliferatum</i>	MF186028.1	100
27	K1A1	40	<i>Fusarium proliferatum</i>	MH392760.1	100
28	KU1D15	40	<i>Penicillium chalabudae</i>	NR_144845.1	100
30	K1A2	45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MG321622.1	100

Çizelge 4.1. Mikrofungus izolatlarının numara, isim, derece, tür isimleri ve accession numaraları (Devamı)

No.	İsim	Derece (°C)	Tür isimleri	Accession No.	GenBank % Eşleşme
31	BU5F	45	<i>Aspergillus niger</i>	MF379661.1	100
32	BU5A1	45	<i>Rhizopus oryzae</i>	MG946219.1	99
33	GESU su örneği	45	<i>Aspergillus niger</i>	MF379661.1	100
34	SA3B2	45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MF379664.1	100
35	GE8C su örneği	45	<i>Aspergillus terreus</i>	MH065614.1	100
36	K1A20	45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MH620181.1	100
37	BU5C1	45	<i>Aspergillus terreus</i>	MH712038.1	100
38	SA3C11	50	<i>Aspergillus terreus</i>	MH705126.1	100
39	GE2A	40	<i>Rhizopus oryzae</i>	MG671995.1	100
40	K1A29	40	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MG970416.1	100
41	BU41A	45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MH620181.1	100
42	BU1A	45	<i>Rhizopus oryzae</i>	MH707053.1	100
43	BU55X	40	<i>Rhizopus oryzae</i>	MH000590.1	100
44	SA19B	40	<i>Mucor circinelloides</i>	KY828880.1	100
45	SA3B2	40	<i>Mucor circinelloides</i>	MG519710.1	100
46	SA3C10	40	<i>Rhizopus oryzae</i>	MH000598.1	100
47	BU41A	45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MG970416.1	100
48	BU18G	40	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MF780706.1	100
49	SA3A19	40	<i>Rhizopus oryzae</i>	MG671995.1	100
50	BU18B	45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MG970416.1	100
51	BU1A8	40	<i>Rhizopus oryzae</i>	MH707054.1	100
52	GE60 su örneği	40	<i>Aspergillus niger</i>	MF379661.1	100
53	BU49A1	45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MH270614.1	100
54	YB18A	40, 45	<i>Aspergillus flavus</i>	MH399568.1	100
56	BYH3	40, 45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MG970416.1	100
60	BY35	30, 40	<i>Fusarium avenaceum</i>	MF186082.1	100
61	KY33A1	30,40	<i>Scedosporium apiospermum</i>	LC317767.1	100
62	BY3B	30, 40	<i>Sarcopodium circinosetiferum</i>	KT184722.1	100
63	BY39B	30, 40, 45	<i>Mucor circinelloides</i>	MG583937.1	99
64	KY42	30, 40	<i>Westerdykella sp</i>	JX235699.1	100
65	BY43	30, 40 , 45	<i>Aspergillus flavus</i>	MH634488.1	100
66	KY34	30, 40, 45	<i>Aspergillus calidoustus</i>	MF196861.1	100
67	BY95A	30, 40, 45	<i>Aspergillus fumigatiaffinis</i>	MH474540.1	100
68	KY41A8	30, 40	<i>Trichoderma harzianum</i>	MF409002.1	100
69	BY39A	30, 40 , 45	<i>Trichoderma harzianum</i>	MF669731.1	100

Çizelge 4.1. Mikrofungus izolatlarının numara, isim, derece, tür isimleri ve accession numaraları (Devamı)

No.	İsim	Derece (°C)	Tür isimleri	Accession No.	GenBank % Eşleşme
70	KY37	30, 40	<i>Talaromyces funiculosus</i>	MH345867.1	100
71	KY31B	30°C	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	KY828854.1	100
72	KY61	30, 40, 45	<i>Aspergillus niger</i>	MF379661.1	100
73	BY36	30, 40	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MG970416.1	100
74	KY34A	30, 40	<i>Aspergillus ustus</i>	MH559498.1	100
75	BY3A	30, 40	<i>Aspergillus fumigatiaffinis</i>	MH474540.1	100
77	KY31A	30, 40	<i>Mucor circinelloides</i>	MG519711.1	100
78	KY33A3	30, 40, 45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MH620181.1	100
79	KY33	30, 40	<i>Scedosporium apiospermum</i>	KJ914779.1	99
80	BY42A	30, 40	<i>Rhizopus oryzae</i>	MH707054.1	100
81	KY310	30, 40, 45	<i>Aspergillus terreus</i>	MH712038.1	100
82	BY41A8	30, 40	<i>Mucor circinelloides</i>	MG583952.1	100
83	KY4A5	30, 40, 45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MH620181.1	99
84	KY411A	30, 40	<i>Trichoderma harzianum</i>	KM278031.1	100
85	BY11	30, 40, 45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MH465125.1	100
87	KY43	30, 40, 45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MF379664.1	100
88	KY63	30, 40, 45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MH620181.1	100
89	BY38	30, 40, 45	<i>Aspergillus terreus</i>	MH712038.1	100
90	BY31	30, 40	<i>Trichoderma harzianum</i>	MF409002.1	100
92	KY41	30, 40, 45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MH620181.1	100
93	KY62	30, 40, 45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MH591451.1	100
94	KY36B	30, 40	<i>Westerdykella multispora</i>	KT013243.1	99
95	BY32A8	30, 40	<i>Fusarium acuminatum</i>	LT970802.1	100
99	GE40A	30, 40, 45	<i>Penicillium chrysogenum</i>	MH469504.1	100

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışmasında; 2015-2016 yıllarının ilkbahar ve sonbahar aylarında Aydın ilinde bulunan 9 lokalitede yapılan arazi çalışmalarında termofilik alanlardan alınan toprak örneklerinden 12 fungus cinsi bu cinslere ait toplam 99 termotolerant ve termofilik fungus türü izole edilmiştir. Funguslar için en uygun besiyerleri hazırlanmış ve fungusların gelişimi gözlenmiştir. Fungus türlerinin termotolerant ve termofilik özellikleri geliştikleri sıcaklıklara göre belirlenmiştir. Elde edilen fungus türleri için morfolojik tanı ile moleküler tanı yöntemleri birbirini takip ederek tanısı yapılmıştır. Moleküler tanılama için, PCR ile ITS gen bölgesi çoğaltılmış ve GenBank'taki verilerle karşılaştırılarak kesin sonuçları elde edilmiştir. MEGA 6.06 programı kullanılarak fungusların (maksimum parsimoni) filogeni ağacı ve UPGMA haplotip uzaklık ağacı oluşturulmuştur.

Fungusların morfolojik tanısı uzun zaman almaktadır. Fungusların morfolojik tanımlanması; geliştikleri besiyeri, besiyerinin pH'sı, inorganik madde ihtiyacı ve geliştiği sıcaklık gibi özellikler makroskobik ve mikroskobik özelliklerini doğrudan etkilediği tez çalışmasında gözlenmiştir. Örneğin, PDA besiyerinde 50 °C'de *Aspergillus terreus* türünün gelişimi tam gözlenemezken, YpSs Agar ortamında daha iyi geliştiği gözlenmiştir. Bu durumda besiyeri, fungusların kültür büyüklüğünü, kültür rengini, konidi büyüklüğünü ve şeklini etkilediğinden sadece morfolojik tanılama yapmak yeterli olmayacaktır. Morfolojik tanılamada çoğu izolatin cins düzeyinde tanımlaması yapılmıştır. Tür düzeyinde kesin tanımlama yapılamamasının nedeni, fungusların değişen çevre koşullarına göre gelişim farklılıkları göstermesinden kaynaklanmaktadır.

Fungusların morfolojik karakterlerine bakılarak yapılan sınıflandırmalar, moleküler sistematikte belirlenen filogenetik ilişkilerine bakılarak yeniden değerlendirilmelidir. Taksonlar arasında gözlemlenen morfolojik karakterlerin birbirine anlamlı olmayan benzerliği tespit edildiği durumlarda, filogenetik analiz için moleküler karakterlerin kullanımı önem kazanmaktadır (Blackwell ve ark., 2007).

Moleküler çalışmaların da kendine ait bazı dezavantajları bulunmaktadır. Doğru DNA izolasyon yönteminin belirlenmesi. PCR koşullarının optimize edilmesi. PCR ile çoğaltılacak gen bölgesinin doğru seçilmesi oldukça önemlidir. Çalışmada *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus flavus* türlerinde Fenol-

Kloroform DNA izolasyon yönteminde elde edilen DNA'ları PCR ile ITS gen bölgesini çoğaltmak için kullanılmıştır. Fakat funguslar pigment içerdikleri için PCR koşullarında, PCR için kullanılan kimyasallarla tepkimelerinden dolayı ITS gen bölgesi başta çoğaltılamamıştır. Bunun için fungus DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA'ları elde edildikten sonra tekrar PCR ile gen bölgeleri çoğaltılmıştır.

Sonuç olarak; tez çalışmasında kullanılan morfolojik ve moleküler tür tayini birbirini desteklemiştir. İki yöntemin birlikte kullanılması daha doğru ve daha kesin sonuçların elde edilmesini sağlamıştır. Elde edilen fungus türleri; Index Fungorum, MycoBank, Fungal Names ve CABI databases verileriyle karşılaştırılarak adlandırılmalarında karışıklık olmaması için kontrol edilmiştir. Botanik bilimiyle uğraşan bilim insanlarının öne sürdüğü 'Bir Fungus, Bir İsim' görüşü tartışma konusu olmalıdır. Bazı fungus türleri aynı olmasına rağmen evrimsel süreçte organizmaların geçirdiği mutasyonlardan dolayı DNA'da bazı değişikliklere neden olmaktadır ve bu değişiklikler fungusların farklı suşlara sahip olmasını sağlamaktadır. Aynı cins ve türe ait bir mikrofungusun farklı suş olma özelliğinden dolayı farklı isimlendirilmesi daha da karışık adlandırmalara neden olabilir.

Ranzoni (1968) ABD'de bulunan Sonora Çölü'nde 24 farklı lokalitede çalışmış ve topraktan fungus izolasyonu gerçekleştirmiştir. İzole ettiği 229 fungus türünden sadece birkaçı 45 °C'de üremiştir. Tansey ve ark. (1976) Indiana'da bulunan güneş enerjisiyle ısınan topraklardan termofilik ve termotolerant fungus türleri izole etmişlerdir. Frate ve ark. (1987-1988) Antartika'da topraktan, penguen ve kuş gübrelerinden psikrofilik, termofilik ve termotolerant fungus türlerini izole etmişlerdir. Mouchacca ve ark. (1997-2000) yıllarında ABD, Avrupa ve Nijerya'da yaptıkları çalışmalarda bilim dünyasına 20 termofilik fungus türünü kazandırmıştır. Mantar kompostları, toprak, saman, bitki kompostları ve hayvan gübrelerinden termofilik fungustürlerini izole etmişlerdir. Zhang ve ark. (2013) Çin'de yaptıkları çalışmada *Myceliophthora* cinsine ait yeni termofilik fungus türünü topraktan izole etmişlerdir. Bazı ülkelerde termofilik saha olmamasına rağmen yukarıda verilen çalışmalarda termofilik ve termotolerant funguslar izole edilmiş ve tanısı yapılmıştır. Türkiye'de jeotermal saha bakımından zengin olması ve bu sahalarda funguslar ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmaması tez çalışmasının yapılmasını teşvik etmiştir.

Ülkemizde termofilik alanlardan bugüne kadar termofilik ve termotolerant mikrofungus türlerinin izolasyonuna ait herhangi bir moleküler ve morfolojik tanılama yöntemine ait herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Termofilik ve termotolerant mikrofunguslar ile ilgili çalışmalar sadece enzim biyoteknolojisiyle sınırlı kalmıştır. Bu da çalışmamızın ülkemizde yapılan ilk çalışma olarak; termofilik ve termotolerant mikrofungusların hem morfolojik hem de moleküler yöntemler kullanılarak tanınması açısından önemini arttırmaktadır. Ülkemizde termofilik ve termotolerant mikrofungusların izole edilmesi ile ilgili moleküler çalışmaların arttırılması, farklı termofilik ve termotolerant mikrofungus türlerine ait enzim taraması yapılması gelecekte enzim biyoteknolojisi ve gen biyoteknolojisinin gelişmesini sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- AL-Mohsen, I.Z., Sutton, D.A., Sigler, L. et al. 2000. *Acrophialophora fusispora* brain abscess in a child with acute lymphoblastic leukemia: Review of cases and taxonomy. **Journal Clinical Microbiology**; 38: 4569-76.
- Anastasi, A., Varese, G.C., Marchisio, V.F. 2005. Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. **Mycologia**; 97: 33-44.
- Awao T., Udagawa, S.I. 1983. A new thermophilic species of *Myceliophthora*. **Mycotaxon**; 16:436-440.
- Basu, M. (1985) *Myceliophthora indica* in a new thermophilic species from India. **Nova Hedwig**; 40:85-90.
- Bennett, J.E., Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. 2000. *Candida* species Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2656-74.
- Blackwell, M., Vilgays, R., James, T.Y., Taylor, J.W. 2007. Fungi. Available From <http://tolweb.org/Fungi/2377/2007.07.13>.
- Bourbean, P., Mcguoch, D.A., Fraer Shah, N., Rinaldi, M.G. 1992. Fatal disseminated infection caused by *Myceliophthora thermophila*, a new agent of mycosis: case history and laboratory characteristics. **Journal Clinical Microbiology**; 1992; 30: 3019-23.
- Bridge, P. D., Arora, D. K., Reddy, C. A., Elander, R. P. 1998. Application of PCR in Mycology, Cab International, New York.
- Bridge, P.D., Spooner, B.M., Roberts, P.J. 2005. The Impact of Molecular Data in Fungal Systematics. **Advances in Botanical Research**; 42, 33-67.
- Bruns, T. D., Fogel, R., Taylor, J. W., 1990. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. **Mycologia**; 82, 175-184.
- Bruns, T.D., Vilgays, T.J., Taylor, J.W., 1991. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**; 22, 525-564.
- Chow L., Xing Z., Rees H.,W. Meng, F., Monteith J., and Stevens L., Field Performance of Nine Soil Water Content Sensors on a Sandy Loam Soil in New Brunswick, Maritime Region, Canada, **Sensors**, 2009, 9, 9398-9413.

- Clement, M.D., Posada, D., Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**; 9:1657-9.
- Cooney, D.G. and Emerson, R. 1964. Thermophilic Fungi – an account of their biology, activities and classification. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- Crisan, E.V. (1973) Current concept of thermophilism and thermophilic fungi. **Mycologia**; 65: 1171-1198.
- Deacon J., 2007. The microbial world: Thermophilic microorganisms produced by institute of Cell and Molecular Biology, The University of Edinburgh. <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/thermo.htm>.
- Demeke, T. and F.P. Adams 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. **BioTechniques**; 12: 332-335.
- Destino, S., Sutton, D.A., Helon, A.L. et al. 2006. Seven osteomyelitis caused by *Myceliophthora thermophila* after a pitchfork injury. **Annal Clinical Microbiology and Antimicrobials**; 5: 21.
- Di Bonita, R., Elliott, M.L., Desjardin, E.A. 1995. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. **Applied and Environmental Microbiology**; 61, 2809-2810.
- Dieffenbach, C.W., T.M.J. Lowe and G.S. Dveksler. 1993. General concepts for PCR primer design. **PCR Methods and Applications**; 530-537.
- Downes, F. P. and Ito K., (Eds.), 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed., APHA, Washington, D.C.
- Edwards, J.E., Jr. Candida Species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. 7th ed. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2010: 3225-41.
- Erlich, H A, D. H. Gelfand and J. J. Sninsky. 1991. Recent advances in polymerase chain reaction. **Science**; 252:1643-1650.
- Farina, C., Gamba, A., Tambinii, R., Beguin Hand Trouillet, J.L. 1998. Fatal aortic *Myceliophthora thermophila* infection in a patient affected by cystic medical necrosis. **Medical Mycology**; 1998; 36: 113-8.

- Hadidi A, L. Levy, Podleskis E. V. 1995. Polymerase chain reaction technology in plant pathology. In: *Molecular Methods in Plant Pathology*, pp.167-187. Eds. R. P. Singh, U. S. Singh. Boca Raton: CRS Press.
- Hadidi A, Y. Terai, C. A. Powell, S. E. Scott, J. C. Desvignes, L. M. Ibrahim, and L. Levy. 1992. Enzymatic cDNA amplification of hop stunt viroid variants from naturally infected fruit crops. **International Society for Horticultural Science**; 309:339-342.
- Hadidi, A. A. J. Hansen and C. L. Parish. 1993. Apple scar skin and dapple apple viroids are seed borne. **International Society for Horticultural Science**; 309:297-304
- Hadidi, A., and X. Yang. 1990. Detection of pome fruit viroids enzymatic cDNA amplification. **Journal of Virological Methods**; 30:261-270.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**; 41: 95-98.
- Hartog, B.J. 1981. The detection and quantification of fungi in food. Chapter 2 by Samson, R.A., R.A.; Hoekstra, E.S.; Oorschot, C.A.N. Van; Hartog, B.j.; Northolt, M.D.; Soentoro, P. S. S.; Egmond, H.P. Van; Baggerman, W.I.; Boer, E. de; Ko Swan Djien, Introduction to Food-borne Fungi, C.B.S, Baarn, Delf, Institute of Royal Netherlands.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. and Pegler, D.N. 1995. Ainsworth and Bisby's Dictionary of Fungi 8th Edition. International Mycological Institute, CAB International, UK.
- Hibbett, S.A., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Lumbsch H., Lutzoni, T., Matheny, F., McLaughlin, P.B., Powell, D. J., Redhead, M.J., Schoch, S., Spatafora, C.L., Stalpers, J.W., Vilgalys, J.A., Aime, R., Aptroot, M.C., Bauer, A., Begerow, R., Benny, D., Castlebury, G.L., Crous, L.A., Dai, P.W., Gams, Y.C., Geiser, W., Griffith, D.M., Gueidan, G.W., Hawksworth, C., Hestmark, D.L., Hosaka, G., Humber, K., Hyde, R.A., Ironside, K.D., Klörljal, J.E., Kurtzman, U., Larsson, C.P., Lichtwardt, K.H., Longcore, R., Midlikowska, J., Miller, J., Moncalvo, A., Mozley-Standridge, J.M., Oberwinkler, S., Parmasto, F., Reeb, E., Rogers, V., Roux, J. D., Ryvarden, C., Sampaio, L., Schüssler, J. P., Sugiyama, A.,

- Thorn, J., Tibell, R. G., Untereiner, L., Walker, W.A., Wang, C., Weir, Z., Weiss, A., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.J., Zhang, N., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**; 111:509-547.
- Hudson, H.J. 1987. *Fungal Biology*. London: Edward Arnold Press; 6: 158-75.
- Innis, M.A. and D.H. Gelfand. 1990. Optimization of PCRs In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J (eds.). *PCR protocols A guide to methods and applications*. **Academic Press**; 3-12 pp.
- Iwen, P.C., Freifel, A.G., Sigler, L., Tarantolo, S.R. 2005. Molecular identification of *Rhizomucor pusillus* as a cause of sinus-orbital zygomycosis in patient with acute myelogenous leukemia. **Journal Clinical Microbiology**; 34: 5819-21.
- King, D.A., Hocking, A.D., and Pitt, J.I. (1979) Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of moulds from foods. **Applied and Environmental Microbiology**; 37, 959-964.
- Krishnan A., Alias S.A., Wong C.M.V.L., Pang K.L. and Convey P. 2011. Extracellular hydrolase enzyme production by soil fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biology**; 34: 1535–1542.
- Kwok, S., S-Y. Chang, J.J. Sninsky and A., Wang. 1994. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. **PCR Methods and Applications**; 539-547.
- Lee, S.B., Taylor, J.W. 1992. Phylogeny of five funguslike protist species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**; 9,636-653.
- Lennette, E.H., A. Balows, W.J. Hausler, Jr., and H.J. Shadomy (ed.). 1985. *Manual of clinical microbiology*, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Levy, L., A. Hadidi and S.M. Garsey. 1992. Reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the rapid detection of citrus viroids using multiplex primer sets. **Proceeding of the International Society of Citriculture**; 2:800.

- Maheshwari, R., Bhardwaj, G., Bhat, M.K. 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**; 64: 461-88.
- Maranon, I.M., Chaudanson, N., Joly N., Gervais P. 1999. Slow heat rate increase yeast thermotolerance by maintaining plasma membran integrity. **Biotechnology and Bioengineering**; 65: 176-81.
- Maukhamedov, R., Hu, X., Nazar, R.N., Robb, J. 1994. Use of polymerase chain reaction- amplified ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology* 84, 256-259. Mazzola, M., Wong, O.T., Cook, R.J., 1996. Virulence of *Rhizoctonia oryzae* and *R. solani* AG-8 on wheat and detection of *R. oryzae* in plant tissues by PCR. *Phytopathology*; 86, 354-360.
- Minafra, A., A. Hadidi and P. Sandarelli. 1993. Sensitive immunocapture and multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of grapevine leafroll associated virus III and grapevine virus B, 11th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine (ICVG), (Abstr.), 137.
- Moore-Landecker, E. 1996. Fundamentals of the Fungi, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B, 2011. How many species are there on earth and in the ocean. **A Peer-Reviewed Open-Access Journal**; 9: Article No.: e1001127.
- Morgenstern I., Powlowski, J., Ishmael, N., et. al. 2012. A molecular phylogeny of thermophilic fungi. **Fungal Biology**; The British Mycological Society 116: 489-502.
- Mouchacca, J. (2000). Thermophilic fungi and applied research: a synopsis of name changes and synonymies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**; 16: 881-888.
- Mullis K. B. 1990. The unusual origin of th polymerase chain reaction. **Scientific American**; April:56-61.
- Obuchi, K., Iwahashi, H., Lepock, J.R., Komatsu, Y. 1998. Stabilization of two families of critical targets for hyperthermic cell killing and aquired thermotolerance of yeast cells. **Yeast**; 14: 1249-55.

- Obuchi, K., Iwahashi, H., Lepock, J.R., Komatsu, Y. 2000. Calorimetric characterization of critical targets for killing and aquired thermotolirance in yeast. **Yeast**; 16: 111-9.
- Özkoç İ., Çebi Kılıçoğlu M. 2008. Fungal sistematikteki moleküler gelişmeler. **OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi**, 23:65-72.
- Perlroth, J., Choi, B., Spellberg, B. 2007. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Medical Mycology**; 45: 321-46.
- RAPP, M. (1974) Indikator-Zusätze zur Keimdifferenzierung auf Würze und Malzextrakt Agar Milchwiss. 29:341-344.
- Redman, R.S., Litvintseva, A., Sheehan, K.B., Henson, J.M., Rodringuez, R.J. 1999. Fungi from geothermal soils in Yellowstone National Park. **Applied and Environmeental Microbiology**; 65: 5193-7.
- Rex J.H., Bennett J.E., Sugar A.M., Pappas P.G., van der Horst C.M., Edwards J.E. et al 1994. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. Candidemia Study Group and the National Institute. **The New England Journal of Medicine**; 331:1325-30.
- Rex, J.H., Bennett, J.E., Sugar, A.M., Pappas PG, Serody J, Edwards JE, et al. 1995. Intravascular catheter exchange and duration of candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group. **Clinical Infectious Diseases**; 21:994-996.
- Reynolds, D.R., Taylor, J.W., 1992. The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. Cab International. Newport Oregon.
- Ribeiro, M.J., Leao, L.S., Morais, P.B., Rosa, C.A., Panek, A.D. 1999. Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**; 75: 245-51.
- Romanelli, R.A., Houston, C.W., Barnett, S.M. 1975. Studies on thermophilic cellulolytic fungi. **Applied and Environmeental Microbiology**; 30: 276-81.

- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of B-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**; 230:1350-1354.
- Salar, R. K. and Aneja, K.R. 2007. Thermophilic Fungi: Taxonomy and Biogeography. **Journal of Agricultural Technology**; 3: 77-107.
- Salar, R.K. 2018. The Conflict of Name Change and Synonymies. Thermophilic Fungi. Taylor & Francis NewYork.
- Salazar, O., Julian, M.C., Rubia, V. 2000. Primers based on specific rDNA-ITS sequences for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG 2 subgroups and ecological types, and binucleate *Rhizoctonia*. **Mycological Research**; 104, 281-285.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S. and Frisvad, J.C. 2004. Introduction to Food-and Airborne Fungi, Laboratory Manual Series 2, Food and Indoor Fungi.
- Samuels, G.J. 2004. Changes in taxonomy, occurrence of the sexual stage and ecology of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**; 94, 138.
- Sanger, F., Coulson, A.R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**; 94:441-448.
- Scorza, R., L. Levy, V. Damstegt, M. Yepes, J. Cordts, A. Hadidi, J. Slighton and D. Gonsalves. 1993. Plum pox virus protection in transgenic plum expressing the papaya rainspot virus coat protein gene. 6th International Congress of Plant Pathology, Canada (Abst.) 192.
- Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M., Sneh, B., 2006. The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. Using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**; 47, 299-316.
- Sime D.A., Abbotti L.L., Abbotti S.P. 2002. A mounting medium for use in indoor air quality spore-trap analyses. **Mycologia**; 94:1087-1088.
- Sridhar, M., Sree, N.K., Rao, L.V. 2002. Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* VS1 and VS3 strains. **Bioresource Technology**; 83: 199-202.

- Stchigel, A.M., Sagués, M., Cano, J., Guarro, J. 2000. Three new thermotolerant species of *Corynascus* from soil, with a key to the known species. **Mycological Research**; 104:879–887.
- Sugiyama, J., 1987. Pleomorphic Fungi. The Diversity and Its Taxonomic Implications. Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo. Japan.
- Tansey, M.R. and Brock, T.D. 1972. The upper temperature limit for eukaryotic organisms. **Proceedings of National Academy of Sciences**; 69: 2426-2428.
- Tansey, M.R. and Jack, M.A. 1975. *Thielavia australiensis* sp.nov., a new thermophilic fungus from incubator bird (mallee fowl) nesting material. **Canadian Journal of Botany**; 53: 81-83.
- Taylor, J. W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., Fisher, M. C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concept in fungi. **Fungal Genetic and Biology**; 31, 21-32.
- Tekkok, I.H., Higgins, M.J., Ventureyra, E.C. 1996. Posttraumatic gas-containing brain abscess caused by *Clostridium perfringens* with unique simultaneous fungal suppuration by *Myceliophthora thermophila* : case report. **Journal of Neurosurgery**; 39: 1245-51.
- van Heerden, I., Cronje, C., Swart, S.H., Kotze, J.M. 2002. Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. **Bioresource Technology**; 81: 71-6.
- van Oorschot CAN, 1977. The genus *Myceliophthora*. **Persoonia**; 9:401–408.
- Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski and M. Zoller. 1992. The polymerase chain reaction In: Recombinant DNA. Second Edition. New York. 79-98.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, pp 315–322.
- Wright, C., Kafkewitz, D., Somberg, E.W., 1983. Eucaryote thermophily: role of lipids in the growth of *Talaromyces thermophilus*. **Journal of Bacteriology**; 156: 493-7.

- Yang, X., A. Hadidi and S.M., Garnsey. 1992. Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. **Phytopathology**; 82: 279.
- Yoldaş, A. 2017. Çeşitli kaynaklardan izole edilen *Aspergillus section nigri* türlerinin fenotipik ve moleküler biyolojik yöntemlerle karakterizasyonu. Ege üniversitesi fen bilimleri enstitüsü, doktora tezi. Bornova, İzmir.
- Yu Zhang, Wen-Ping Wu , Dian-Ming Hu , Yuan-Ying Su , Lei Cai 2013. A new thermophilic species of Myceliophthora from China. **Mycological Progress**; 13:165–170.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Yusuf GEROĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi : Mardin-30.10.1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi :Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi

Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler

-SCI

-Diğer

b) Bildiriler

-Uluslararası

-Ulusal

c) Katıldığı Projeler:

Uluslararası Dergilerde Yayınlanan Makaleler

Bıyık Hacı Halil, Poyrazoglu Çoban Esin, Geroglu Yusuf, Ilgıt Kırgız , Aydın İlinde Termofilik Çevreden İzole Edilen Mayaların Moleküler Tanısı,Journal of Fungus,4,2017.

Bıyık Hacı Halil, Törün Bahadır, Geroglu Yusuf, Poyrazoglu Esin,Basbulbul Gamze , Preservation and molecular identification of *Aspergillus* and *Penicilium* species with ITS PCR, European Journal of Biotechnology and Bioscience,2016.

Yörükçe Mehmet Ali, Aktaş Betül, Geroglu Yusuf, Poyrazoğlu Esin, Bıyık Hacı Halil , Isolation and Identification of Bacteria from Fruit Garden Soils in Aydın Province,International Journal of Secondary Metabolite,1,2017

Yörükçe Mehmet Ali, Aktaş Betül, Geroglu Yusuf, Poyrazoğlu Esin, Bıyık Hacı Halil, Isolation and Identification of Bacteria from Fruit Garden Soils in Aydın Province, International Journal of Secondary Metabolite, 1, 2017.

Olgun Kurtuluş, Bozkurt Emin, Ceylan Süleyman, Turhal Mehmet, Özcan Serdar, Karasüleymanoğlu Şahin, Geroğlu Yusuf, Nesting Activity of Sea Turtles *Caretta caretta* Linnaeus 1758 and *Chelonia mydas* Linnaeus 1758 Reptilia Chelonidae at Patara Beach Antalya Turkey over Four Nesting Seasons, Turkish Journal of Zoology, 2, 2016.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan Bildiriler

Geroglu Yusuf, Ün Zeynep, Karasüleymanoglu Kazım, Gözde Gözegir, Bıyık Hacı Halil . Termofilik Çevrelerden İzole Edilen Fungusların Morfolojik ve Moleküler Tanısı 22. Ulusal Biyoloji Kongresi 26.06.2014. (Sözlü sunum).

Geroğlu Yusuf, Bıyık Hacı Halil. Bazı Gıda Kaynaklı Patojen Mikroorganizmaların Temel Özellikleri, Rezervuarları ve Alınan Önlemler, Aydın, Adnan Menderes Üniversitesi 02.05.2014.

Geroglu Yusuf, Törün Bahadır, Touray Mustafa, Poyrazoglu Çoban Esin, Bıyık Hacı Halil. Effects of Two Fungi Species on *Triticum aestivum* L Growth VIIth International Scientific Symposium for young scientists, PhD students and students of Agriculture Colleges, Bydgoszcz, Poland, 15-17 September, 2016.

Bıyık Hacı Halil, Poyrazoğlu Esin, Geroglu Yusuf, Yaman Fatma. Effects of Some Bacteria on *Avena sativa* L Growth VIIth International Scientific Symposium for young scientists, PhD students and students of Agriculture Colleges 20.09.2016.

Bıyık Hacı Halil, Törün Bahadır, Geroglu Yusuf, Coban Esin, Basbulbul Gamze. Molecular Identification of *Aspergillus* and *Penicilium* Species with ITS PCR 3 rd International Congress on Biosensors, Ankara, 04-05 October, 2016. 09.10.2016.

Bıyık Hacı Halil, Törün Bahadır, Geroglu Yusuf, Poyrazoğlu Esin, Başbülbul Gamze. Molecular Identification of *Aspergillus* and *Penicilium* Species with ITS PCR 3 rd International Congress on Biosensors 10.10.2016.

Yorukce Mehmet Ali, Aktas Betul, Geroglu Yusuf, Poyrazoglu Esin, Bıyık Hacı Halil. Biodiversity of PHB Producing Bacteria from Fruit Garden Soils in Aydın.

Providence Second Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2016)
23.05.2016.

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : yusuf.geroglu93@gmail.com

Tarih :.././....

