

OCAK 2013

Yüksek Lisans – Biyoloji Bölümü

EDİBE ÖZGÜN

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTEP FISTIĞINDA (*Pistacia vera* L.) AFLATOKSİN
OLUŞTURAN *ASPERGILLUS* TÜRLERİNİN
BELİRLENMESİ

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

EDİBE ÖZGÜN
OCAK 2013

**Antep Fıstığında (*Pistacia vera* L.) Aflatoksin Oluşturan
Aspergillus Türlerinin Belirlenmesi**

**Gaziantep Üniversitesi
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman
Prof. Dr. Canan CAN**

**Edibe ÖZGÜN
Ocak 2013**


©2013 [Edibe ÖZGÜN]

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

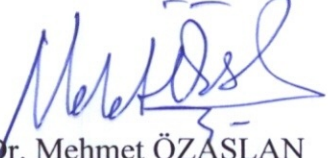
Tezin Adı: Antep fıstığında (*Pistacia vera* L.) aflatoksin oluşturan *Aspergillus* türlerinin belirlenmesi

Öğrencinin Adı, Soyadı: Edibe ÖZGÜN
Tez Savunma Tarihi: 16 Ocak 2013


Fen Bilimleri Enstitüsü onayı


Doç. Dr. Metin BEDİR
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.


Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN
Enstitü ABD Başkanı

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


Prof. Dr. Canan CAN
Tez Danışmanı

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

Jüri Üyeleri İmzası

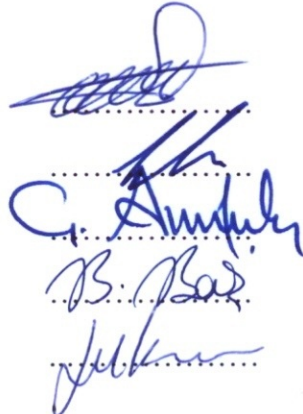
Prof. Dr. Osman ERKMEN

Prof. Dr. Canan CAN

Doç. Dr. Abuzer ÇELEKLİ

Yrd. Doç. Dr. Berna BAŞ

Yrd. Doç. Dr. İ. Halil KILIÇ


.....
.....
.....
.....
.....

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

Edibe ÖZGÜN

ABSTRACT

Determination of *Aspergillus* spp. Producing Aflatoxin Contamination in Pistachio Nut (*Pistacia vera* L.)

ÖZGÜN, Edibe

M.Sc. in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Canan CAN

January 2013, 52 pages

Pistachio (*Pistacia vera* L.) has an important market value in Turkey's economy. *Aspergillus* species synthesize aflatoxins that contaminate pistachio nuts, and reduce fruit quality. There is no detailed information on *Aspergillus* infection time, population of *Aspergillus* spp. during pre-harvest, processing and storage. *Aspergillus* species producing aflatoxins in the group of Flavi of *Aspergillus* genus on *P. vera* was determined. In this study *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, both belonging to Flavi group as main aflatoxin producing species, were investigated.

Analyses of the collected samples that *Aspergillus* population was low on pistachio from flowering to pre-harvest period, and the population increases during harvest and storage. *A. flavus* was densely isolated from Şanlıurfa and Adıyaman provinces. Besides, *A. flavus* and *A. parasiticus* were characterized through PCR-RFLP methods. It was determined that 34 of isolates were *A. flavus*, 1 of the isolate was *A. parasiticus* according to *aflR* gene region. However ITS region was not efficient for differentiating these two species. When the results were compared, *aflR* gene region was found to be more accurate than of ITS in distinguishing *A. flavus* and *A. parasiticus*.

Key Words: *Pistacia vera* L., *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*, PCR-RFLP, Aflatoxin

ÖZ

Antep Fıstığında (*Pistacia vera* L.) Aflatoksin Oluşturan *Aspergillus* Türlerinin Belirlenmesi

ÖZGÜN, Edibe

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Canan CAN

Ocak 2013, 52 sayfa

Antep fıstığı (*Pistacia vera* L.) Türkiye pazarında önemli bir yer almaktadır. *Aspergillus* türleri aflatoksin üretmekte ve fıstığı kontamine ederek, ürün kalitesini azaltmaktadır. Antep fıstığında *Aspergillus* spp. infeksiyonlarının ne zaman başladığı, hasat öncesi, işleme ve depolardaki popülasyonu hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır. Bu amaçla; Antep fıstığında aflatoksin üreten *Aspergillus* cinsinin Flavi grubuna bağlı türlerin belirlenmesi üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmada Flavi grubunda bulunan ve aflatoksin oluşumunu sağlayan *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* türlerinin tanımlanması yapılmıştır.

Toplanan örneklerin analizi sonucunda, Antep fıstığının çiçeklenme döneminden hasat öncesi döneme kadar *Aspergillus* popülasyonunun düşük olduğu, hasat döneminde ve depolarda ise popülasyonunun arttığı belirlenmiştir. Şanlıurfa ve Adıyaman illerinde *A. flavus*' un yoğun olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada, *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin PCR-RFLP yöntemi ile de moleküler tanımlanması yapılmıştır. *aflR* gen bölgesine göre izolatlardan 32'si *A. flavus* ve 1'i ise *A. parasiticus* olarak belirlenmiştir. Ancak ITS gen bölgesinin bu iki türü ayırmada farklılık göstermediği düşünülmektedir. Çalışma sonucu elde edilen veriler değerlendirildiğinde; *A. flavus* ile *A. parasiticus*'un birbirinden ayırımında *aflR* gen bölgesinin ITS gen bölgesinden daha güvenilir sonuçlar verdiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Pistacia vera* L., *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*, PZR-RFLP, Aflatoksin

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgileri ile bana yol gösteren değerli katkılarından dolayı danışmanım; Sayın Hocam Prof. Dr. Canan CAN'a;

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiğim ve her konuda bana yardımcı olan Sayın Hocam Arş. Gör. Dr. Feyza Nur KAFADAR'a;

Tez çalışmamda laboratuvar ve arazi aşamalarında bilgileri ve önerileriyle bana yardımcı olan Zir. Yük. Müh. Kamil SARP KAYA, M. Agâh AKTAN, Mehmet ÇITAK'a;

Tez yazımım sırasında bana yardımcı olan Arş. Gör. Fatih YAYLA'ya;

Çalışmalarım boyunca hep yanımda olan, desteğini her daim hissettiğim arkadaşım Seyfettin ÖZBAY'a;

Arazi çıkışları ve örnekleme çalışmalarında verdikleri destekten dolayı Antep fıstığı Araştırma İstasyonu Müdürlüğüne (Şahinbey/Gaziantep);

Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü Başkanlığına ve öğretim üyelerine ;

Hayattaki en büyük şansım olan annem ve babama;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ABSTRACT	v
ÖZ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
TABLolar LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	10
KAYNAK ÖZETLERİ	10
BÖLÜM 3	14
MATERYAL VE YÖNTEM	14
3.1 Materyal.....	14
3.1.1 <i>Aspergillus</i> İzolatları.....	14
3.1.2 <i>Aspergillus</i> Türlerinin Kültürleri İçin Kullanılan Besin Ortamları....	14
3.1.3 Kullanılan Cihazlar.....	14
3.2 Yöntem.....	15
3.2.1 Arazi Çalışmaları.....	15
3.2.2 Toprak ve Meyveden Fungus İzolasyonu.....	15
3.2.3 Tek Spor İzolasyonu.....	16
3.2.4 <i>Aspergillus</i> Türlerinin Makroskobik ve Mikroskobik Tanısı.....	16
3.2.5 <i>Aspergillus</i> İzolatlarının Saklanması	17
3.2.6 Aflatoksin Üreten <i>Aspergillus</i> Türlerinin Tanısı.....	17
3.2.7 <i>Aspergillus</i> Türlerinin Moleküler Tanısı.....	17
3.2.7.1 DNA İzolasyonu.....	17
3.2.7.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri.....	18
3.2.7.3 PZR Protokolü.....	18
3.2.7.4 PZR Amplifikasyonu.....	19

3.2.7.5Agaroz Jel Elektroforezi.....	19
BÖLÜM 4	20
ARAŞTIRMA BULGULARI	20
4.1 Arazi Çalışmaları.....	20
4.2 <i>Aspergillus</i> Türlerinin Morfolojik Tanısı.....	22
4.3 Aflatoksin Üreten <i>Aspergillus</i> Türlerinin Tanısı.....	27
4.4 <i>Aspergillus</i> Türlerinin Moleküler Tanısı.....	29
BÖLÜM 5	34
TARTIŞMA	34
BÖLÜM 6	40
SONUÇ VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	42
EKLER	48
EK 1 Fungal Besi Ortam İçerikleri.....	49
EK 2 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1.1 Aflatoksinlerin kimyasal yapısı.....	4
Şekil 1.2 Konodiofor yapısı.....	7
Şekil 1.3 Ribozomal RNA (rRNA) genleri, ITS-1 ve ITS-2 primer lokalizasyonları.....	8
Şekil 1.4 <i>Aspergillus flavus</i> 'un aflatoksin gen kümesi.....	8
Şekil 4.1 Hastalık semptomu gösteren Antep fıstığı meyveleri.....	20
Şekil 4.2 <i>Aspergillus</i> türlerinin makroskobik ve mikroskobik yapısı.....	22
Şekil 4.3 <i>Aspergillus flavus</i> 'un farklı ortamlardaki koloni morfolojisi.....	25
Şekil 4.4 <i>Aspergillus parasticus</i> 'un farklı ortamlardaki koloni morfolojisi	26
Şekil 4.5 <i>Aspergillus</i> türlerinin vezikül formları.....	27
Şekil 4.6 <i>Aspergillus</i> türlerinin AFPA ortamında görüntüsü.....	27
Şekil 4.7 <i>Aspergillus flavus</i> 'un (MAM/MRC327) farklı ortamlardaki koloni morfolojis.....	29
Şekil 4.8 <i>aflR</i> bölgesinin PZR sonrası elde edilen bant profili	30
Şekil 4.9 <i>aflR</i> bölgesinin PZR sonrası <i>HincII</i> enzimi ile kesimi sonucu elde edilen bant profili	30
Şekil 4.10 <i>aflR</i> bölgesinin PZR sonrası <i>HincII</i> enzimi ile kesimi sonucu elde edilen bant profili.....	30
Şekil 4.11 <i>aflR</i> bölgesinin PZR sonrası <i>PvuII</i> enzimi ile kesimi sonucu elde edilen bant profili	31
Şekil 4.12 <i>aflR</i> bölgesinin PZR sonrası <i>PvuII</i> enzimi ile kesimi sonucu elde edilen bant profili	31
Şekil 4.13 ITS bölgesinin PZR sonrası elde edilen bant profili	32
Şekil 4.14 ITS bölgesinin PZR ürünlerinin <i>HhaI</i> ile kesimi sonucunda elde edilen bant profili	32
Şekil 4.15 <i>Aspergillus flavus</i> 'un (MAM/MRC327) <i>aflR</i> bölgesinin PZR analizi.....	33
Şekil 4.16 <i>Aspergillus flavus</i> 'un (MAM/MRC327) ITS bölgesinin PZR analizi..	33

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo1.1 Aflatoksinlerin kapalı formülleri, erime noktaları ve ultroviyole ışığında verdikleri renkler.....	3
Tablo 1.2 Türkiye ve Avrupa Birliği'nde gıdalarda bulunmasına izin verilen aflatoksin düzeyleri.....	5
Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan primerler ve dizilimleri.....	18
Tablo 4.1 2011 yılı aylara göre izolasyonları yapılan türleri.....	21
Tablo 4.2 İzole edilen <i>Aspergillus</i> türlerinin lokalizasyonlara göre dağılımı ve % oranları.....	21
Tablo 4.3 Morfolojik tanılamada kullanılan <i>Aspergillus</i> izolatları.....	23

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AF	Aflatoksin
AFB1	Aflatoksin B1
AFB2	Aflatoksin B2
AFG1	Aflatoksin G1
AFG2	Aflatoksin G2
afIA,	yağ asit sentaz geni
afIB	yağ asit sentaz geni
afIC	poliketid sentaz geni
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
afIR	Aflatoksin Düzenleyici Gen
AFPA	<i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> agar
bç	Baz çifti
CY20S	Czapek Yeast Extract Agar + %20 Sakkaroz
CYA	Czapek Yeast Extract Agar
CZ	Czapek Dox Agar
dH2O	Distile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
ITS	Internal Transcribed Spacer
kb	Kilo baz

KCl	Potasyum klorür
MEA	Malt Extract Agar
Mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mM	Milimolar
NaOCl	Sodyum hipoklorit
ng	Nanogram
°C	Santigrat derece
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
pmol	Pikomolar
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA	Ribozomal DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Rotation Per Minute
sdH ₂ O	Steril distile su
spp	Türler
TAE	Tris, Asetik asit, EDTA
TE	Tris-EDTA
U	Unit
UV	Ultra-viyole
V	Volt
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Türkiye Antep fıstığı (*Pistacia vera* L.)'nin gen ve orijin bölgelerinden birisidir. Yetiştiriciliği 56 ilimize yayılmış olmakla beraber üretimi, yoğun olarak Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yapılmaktadır. Bu bölge ekolojik faktörlerin uygun olması nedeni ile Antep fıstığının doğal yayılım alanı bulmasını sağlamış ve geniş alanlarda yetiştiricilik yapılmasına öncülük etmiştir [68].

Antep fıstığı, Plantae (bitkiler) âleminin Magnoliophyta (kapalı tohumlular) bölümünde yer almaktadır. Magnoliopsida (iki çenekliler) sınıfının Sapindales takımına ait olan bu tür Anacardiaceae (sakız ağacıgiller) familyasında olan ve yenebilen kabuklu bir meyvedir. Bu ağaç adını en çok yetiştiği kentlerden biri olan Gaziantep'ten alır. Tatlıcılık, eczacılık (öksürük şurubu yapımında) vb. kullanım alanlarına sahiptir. Antep fıstığının Yakın Doğu ve Orta Asya gen merkezi olmak üzere iki anavatanı vardır. Antep fıstığı günümüzde, 30–45 güney-kuzey paralelleri arasında ve genellikle kuzey yarım kürede, mikro klima alanlarında yetiştirilmektedir [4, 2]. Anacardiaceae familyasına giren *Pistacia* cinsinin meyve ağacı ve süs bitkisi olarak değer kazanan 11 türü bulunmaktadır [46]. Türkiye'de Güneydoğu Anadolu Bölgesinde; *Pistacia vera* L., *Pistacia khinjuk*, *Pistacia terebinthus* L., Akdeniz ve Güneydoğu Ege Bölgesinde; *Pistacia vera* L., *Pistacia terebinthus*, *Pistacia atlantica*, *Pistacia palestina*, *Pistacia mutica* ve *Pistacia lentiskus* melezleri yaygın olarak bulunmaktadır. Antep fıstığı periyodisite eğilimi olan bir türdür [7].

P. vera'nın dünya üzerinde geniş bir alanda tarımı yapılmasına karşın bu ülkeler içerisinde sadece İran, Türkiye, ABD, Suriye, Çin, Yunanistan, Afganistan ve İtalya'da ekonomik olarak üretilmektedir. Ülkemiz Antep fıstığı yetiştiriciliği açısından ortalama 112.000 ton/yıl üretim ile İran ve Amerika Birleşik Devletlerinden sonra üçüncü sırada gelmektedir [19].

Antep fıstığı besinsel değeri yüksek olan bir meyvedir. 100 gram Antep fıstığı 594 kalori, 20,8 g protein, 51,6 g yağ ve 16,4 g karbonhidrat ve 0 kolesterol içermektedir. Ayrıca 100 gramında, 500 mg fosfor, 1020 mg potasyum, 136 mg kalsiyum, 158 mg magnezyum, 7,3 mg demir, 5,2 mg vitamin E, 7 mg vitamin C, 0,62 mg vitamin B1, 0,20 mg B2 ve 1,45 mg nikotinamide bulundurmaktadır [27].

Türkiye’de Antep fıstığı yetiştiriciliği profesyonel anlamda 1948 yılında Ceylanpınar Devlet çiftliği ile 114 dekar alanda başlatılmıştır. Bugün bu kurum Antep fıstığı araştırmalarında önemli bir yere sahip olup, bu araştırmalar için 10,7 milyon hektarlık bir alan ayrılmış bulunmaktadır [24].

Ülkemiz Antep fıstığı üreticisi konumunda olup, ekonomik değere sahip Antep fıstığı üstün kalite özellikleri ile ulusal ve uluslar arası pazarlarda tercih edilmektedir. Türkiye’de Antep fıstığının üretimden tüketimine kadar geçen tüm süreçlerde bazı sorunlar bulunmaktadır. Antep fıstığının ihracatında son yıllarda sıkıntılar yaşanmaktadır. Bunun en büyük nedeni mikotoksin kaynaklanmaktadır. Bu amaçla fındık ve yanı sıra, incir, üzüm vb. ekonomik değeri yüksek olan ürünlerde de mikotoksinin önlenmesine yönelik çalışmalar büyük önem kazanmıştır [11].

İnsanların besinlerinde bulunan mikotoksinler özellikle *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* türleri tarafından oluşturulmakta ve bu ürünler sekonder metabolitleri olarak bilinmektedir. *Penicillium* ve *Fusarium* türleri birçok ürün bitkisinde fitopatojendir. Bu türler tarafından oluşturulan mikotoksinler özellikle hasat öncesi dönemde kontaminasyon yaratmaktadır. *Aspergillus* türleri tarafından üretilen mikotoksinler (aflatoksinin) ürünlerde kurutma ve depolama esnasında kontaminasyonun daha fazla olduğu bildirilmiştir [65, 60]. Bazı *Aspergillus* türleri cyclopiazonik asit, ochratoksin ve kojik asitin yanı sıra önemli bir mikotoksin olan aflatoksini de üretirler [63].

Aflatoksinler ürünün tarlada veya bahçede gelişme aşamasında meydana gelebildiği gibi, hasat, kurutma, depolama, gıda ve yem halinde, mamule işleme aşamasında da oluşabilmektedir. Ürünün % su oranı, kurutma hızı, ortamın nisbi nemi, sıcaklık, ortamda bulunan sporlarının yoğunluğu, gelişen türlerin toksin oluşturma güçleri, mikroorganizmalar arası rekabet, ürünün ve yetiştirilen çeşidin direnci, böcek veya

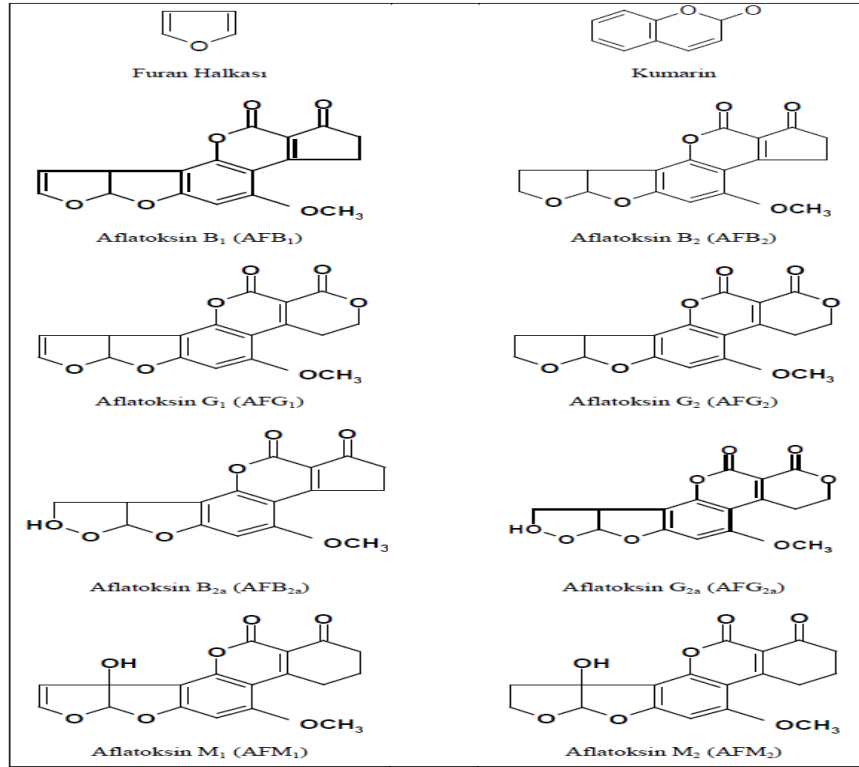
diğer zararlıların faaliyeti, bitki stresi, hava sıcaklığı, atmosferik gazların bileşimi gibi birçok etken aflatoksin oluşumunu etkilemektedir [12].

Aflatoksinlerin AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2 olarak belirlenmiş önemli 4 tipi bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, AFM1 ve AFM2 tipleri de bulunmaktadır (Tablo 1.1). Bu tipler ultraviyole ışığı altında mavi veya yeşil floresan vermelerinden dolayı bu şekilde adlandırılmışlardır. AFB1, insan gıdalarında ve hayvan yemlerinde sıklıkla rastlanan bir mikotoksindir. Yüksek dozları akut toksik etki göstererek, önemli sağlık sorunlarına ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır [44, 59].

Tablo 1.1 Aflatoksinlerin kapalı formülleri erime noktaları ve ultraviyole ışığında verdikleri renkler [31, 32].

Aflatoksin	Kimyasal Formülü	Erime Noktası	Renk
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	268-269	Mavi
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	286-289	Mavi
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	244-246	Yeşil
G ₂	C ₁₇ H ₁₇ O ₇	237-124	Yeşil –Mavi
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	299	Yeşil –Menekşe
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	293	Menekşe

Aflatoksinler yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı olup, normal pişirme sıcaklıklarında ve pastörizasyon sıcaklıklarına karşı dayanıklıdır. Aflatoksinin yapısında bulunan lakton halkası bu molekülün alkali hidrolizine karşı hassas olmasını sağlamaktadır (Şekil 1.1) [39].



Şekil 1.1 Aflatoksinlerin kimyasal yapısı [5].

Günümüzde dünyada bütün ülkeler, aflotoksinin neden olduğu tehlikelerden korunmak ve ihraç ettikleri ürünlerin geri dönüşünü engellemek için yasal bazı sınırlamalar getirmektedirler. Ülkemizde Türk Gıda Kodeksi'nde (TGK) gıdalar, için aflatoksin limitleri belirlenmiştir. Tablo 1.2'de Türkiye'de gıdalarda bulunmasına izin verilen aflatoksin düzeyleri verilmiştir [61].

Avrupa ülkeleri başta olmak üzere tüm ülkelerde aflatoksin konusunda sıkı bir denetim yapılmaktadır. Aflatoksin oranı yüksek olan ürünlerin dış pazarlarda alıcı bulma şansı düşüktür [15, 50]. Antep fıstığı ihracatını engelleyen önemli problemlerden birisi olan aflatoksin *Aspergillus* türleri tarafından üretilmektedir [6].

Tablo 1.2 Türkiye ve Avrupa Birliği'nde gıdalarda bulunmasına izin verilen aflatoksin düzeyleri ($\mu\text{g kg}^{-1}$) [61].

No	Gıda Maddeleri	B1	Toplam (B1+B2+G1+G2)	M ₁
1	Fındık, Antep fıstığı gibi sert kabuklu meyveler, yerfıstığı, yağlı tohumlar, kuru meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	5	10	-
2	Fındık, Antep fıstığı gibi sert kabuklu meyveler (Doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan ve bunların işlenmiş ürünleri)	2	4	-
3	Yerfıstığı (Doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8	15	-
4	Tahıllar (Karabuğday (<i>Fagopyrum</i> spp.) dahil ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar (Doğrudan tüketilen veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	2	4	-
5	Baharatların aşağıdaki türleri için; - Kırmızıbiber (<i>Capsicum</i> spp.) (Bunların kurutulmuş meyveleri, kırmızıbiberin bütün ve toz hali dâhil) - Karabiber (<i>Piper</i> spp.) (Bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dâhil) - Hindistan cevizi / Muskat (<i>Myristica fragrans</i>) - Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>) - Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>)	5	10	-
6	Tahıl bazlı işlenmiş gıdalar, bebek ve küçük çocuk gıdaları	0,1	-	-
7	Kuru meyveler (Doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5	10	-
8	Kuru meyveler ve bunların işlenmiş ürünleri (Doğrudan insan tüketimine veya gıda bileşeni olarak kullanılması düşünülen ve bunların işlenmiş ürünleri)	2	4	-
9	Çiğ süt, ısıtılmış işlem görmüş süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	-	-	0,050

Aspergillus türleri tıp, tarım ve biyoteknolojide büyük önemi olan kosmopolit canlılar arasındadır. *Aspergillus* izolatları Ascomycota bölümünün Eurotiomycetes

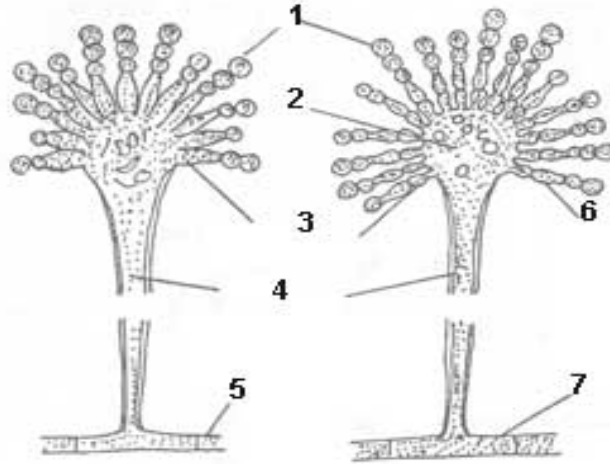
sınıfında yer almaktadır. Takımı Eurotiales olan türün familyası ise Trichocomaceae'dir. *Aspergillus*'lar Flavi grubu içinde 7 alt basamak altında toplanan 20'den fazla türü vardır [30].

Aspergillus'lar hifli yapıya sahiptir. Doğal yaşam alanları toprak ve çürüyen bitkilerdir. Doğada karbon ve azot döngüsünde rol alırlar. *Aspergillus*'lar ürettikleri enzimler ile tüm organik maddeleri ayrıştırarak kullanırlar ve saprofit olarak yaşarlar. Uygun koşullar altında bitki, hayvan ve insanda patojen hale geçebilirler. Sahip oldukları zengin enzim sistemleriyle hemen hemen tüm organik materyalleri ayrıştırarak kullanabilirler. Diğer mikroorganizmalar için çok düşük olan nem düzeylerinde bile gelişebilirler. Depolanmış kuruyemiş, tahıl ve tohumlarda, unlarda, deri ve tekstil ürünlerine kadar çeşitli gıda ve eşyalarda; ayrıca dış ortamlarda, hastane ve evlerde havada bol miktarda bulunurlar [33].

Aspergillus'lar mezofilik karakterli olup 6–8°C den 50–60°C ye varan sıcaklıklarda gelişebilirler. Optimum gelişme sıcaklıkları 35–38°C dir. Fakat *Aspergillus* türlerinin 10–13°C altında ve 41–42°C üzerinde aflatoksin oluşumu sınırlıdır. Maksimum toksin oluşumuna ise 25–30°C'de ulaşır. Özellikle tarlada gelişmekte olan ürünlerde oluşan mekanik hasarların *Aspergillus* türlerinin gelişmesine ve bunun sonucu olarak aflatoksin oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir [51].

Aspergillus spp. zincir şeklinde bol miktarda konidi üretirler ve bu konidiler olgunlaştıklarında ortama dağılırlar. Konidiler genelde 2–5 µm çapındadır ve hava ile taşınırlar. Türlerle ve gelişme koşullarına bağlı olarak beyaz, sarı, sarımsı kahverengi, siyaha yakın kahverengi, kırmızı veya yeşil tonlarındadır. Koloni rengi; vejetatif hiflerin, konidyumlu başların ve varsa eşeyli yapıların rengine bağlıdır. Besiyerine dağılan pigment üretebilirler. Bu pigmentin rengi koloninin hava miselli kısmının renginden farklı olabilir. Hifleri bölmelidir, ince veya kalın olabilir; hif hücreleri ekseri çok çekirdeklidir. Miselyumları birçok enzim ve bazı mikotoksinleri üretebilmektedir. Vejetatif hifin “ayak hücresi (food cell)” denen özelleşmiş bir hücresi bulunmaktadır. Bundan dik olarak çıkan konidiofor denen konidi taşıyıcı hiflerin ucu şişkinleşir. Yukarı doğru oluşturdukları yuvarlak veya oval biçimdeki baş kısmına “vezikül” denir (Şekil 1.2) [33].

Konidiler, yapıcı hücrelerden (fiyalidler) ya doğrudan vezikülün üzerinde (uniseriate) ya da metulaların üzerinde (biseriate) doğarlar ve altındaki sap (stibe) denilen hücre ile birlikte konidili baş denen tipik görünümü oluştururlar. Konidiler ardışık dizilerek tespah taneleri gibi zincirler oluştururlar ve böyle bir zincirde en genç hücre en diptekidir (Şekil 1.2). Konidiler bir hücreli, duvarları düz veya pürüzlü, dikenli; şeffaf veya pigmentli olabilirler. Bazı türler sklerot formunda hif kitleleri üretirler. Bu özellikler türlerin ayırımında önem taşır [34, 35].

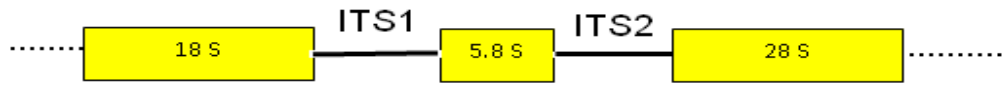


Şekil 1.2 Konodiofor yapısı 1-Konidi 2- Vezikül 3- Biseriate 4- Konidiofor 5- Vejetatif hif 6- Uniseriate 7- Ayak hücresi [29].

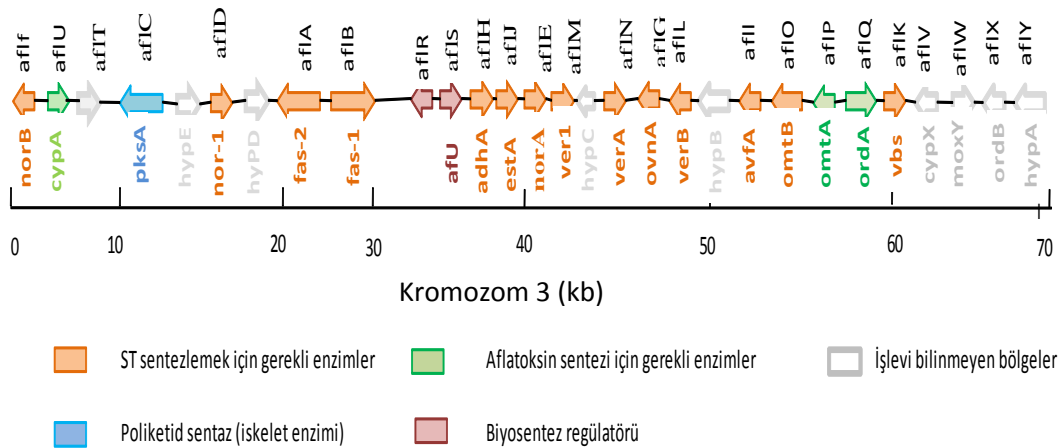
Flavi grubunda Circumdati alt cinsinde bulunan *Aspergillus* türlerinin morfolojik tanımlanmasında konodilerin rengi, uniseriate ve biseriate konidial başlıklarının bulunması, sclerotia içerip içermemeleri, kolonilerin çapı, kolonilerin şekli kullanılmaktadır. Çeşitli araştırmacıların bu konuda yaptıkları yoğun araştırmalara rağmen, bu grubun taksonomisi hala çok karışıktır. Çünkü türlerin genetik çeşitliliğinin yüksek olması ve tanımlamada kullanılan parametrelerin türlerde birbirine çok yakın olması gibi sebeplerden dolayı Flavi grubundaki türlerin tanımlanması zor olabilmektedir [36]. Flavi grubundaki *A. flavus* ile *A. parasticus* 'un fiziksel ve genomik yapıları birbiri ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Bu kadar birbirine benzeyen türlerin ayırımının morfolojik olarak tespitinin çok zor olmasının yanında, morfolojik tanımlama prosedürlerinin maliyetinin yüksek olması ve uzun zaman alması gibi dezavantajlarından dolayı pratik moleküler tanımlama metotları günümüzde önem kazanmaktadır.

Morfolojik çalışmaların sınırlılığını ortadan kaldırmak için birçok moleküler tanımlama yöntemi geliştirilmiştir. Tanımlama işlemi için birçok DNA bölgesi kullanılmıştır. Bunlar: ITS bölgesi, β -tubulin geni, kalmodilin genleri ve *aflR* gen bölgesidir [13, 20, 42, 57].

Çeşitli bilim adamlarının yoğun olarak çalıştığı ITS geni funguslarda bulunan ve genom dizilimi çıkarılmış bir bölgedir. Transkript üzerinde yer alan bu ara bölgeler, öncü ribozomal alt ünitelerinin arasında bulunmaktadır. Bu sekanslar rDNA'da bulunan dizilerdir. Organizmalarda iki adet ITS bölgesi bulunur (Şekil 1.3). ITS1; 18S ve 5,8S arasında, ITS2 ise 5,8S ve 28S arasında yer alır. Ribozomal genler ve bu ara bölgeler, binlerce kopyadan meydana gelmektedir. ITS bölgesi taksonomi ve moleküler filogenetikte geniş kullanım alanına sahiptir. Tür düzeyinde yapılan moleküler sistematik çalışmalarda güvenilir sonuçlar veren bir bölgedir. Çünkü diğer gen bölgelerindeki varyasyonlarından daha yüksek derecede varyasyona sahiptir ve bazı taksonların tanımlanmasında güvenilir sonuçlar vermektedir [22, 40].



Şekil 1.3 Ribozomal RNA (rRNA) genleri, ITS-1 ve ITS-2 primer lokalizasyonları [22].



Şekil 1.4 *Aspergillus flavus*'un aflatoksin gen kümesi. Her gen için yeni isimlendirmeler şeklin üst kısmında bulunmakta, eski isimlendirmeler ise şeklin alt kısmında yer almaktadır. Gri ile gösterilen genlerin işlevi ise tam olarak bilinmemektedir [3].

Şekil 1.4’de verilen *aflR* gen bölgesi, üçüncü kromozomun telomer bölgesine yakın bulunmaktadır. Bu gen kümesi yaklaşık olarak 30 farklı genden oluşmaktadır. *aflA*, *aflB* ve *aflC* genleri aflatoksin öncüsü olan norsolorinik asit (NOR) sentezlemek için gereklidir. Norsolorinik asitten sterigmatocystin, sterigmatocystin (ST) den ise aflatoksin sentezlenir [67].

Bitki türlerinden izole edilen *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinden aflatoksin sentez basamaklarında yer alan genlerin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır [18]. AF sentezi azot kaynağı, pH ve toprak nemliliği gibi faktörler yanında AF gen kümesinde yer alan transkripsiyon faktörleri tarafından da etkilenmektedir. AF, *Aspergillus* türlerinin gelişme ve yaşam döngüsünün tamamlanmasında herhangi önemli bir fonksiyona sahip olarak görülmemektedir, bununla birlikte bazı metabolik fonksiyonları olduğu rapor edilmiştir. *A. flavus* ve *A. parasiticus*’da AF biyosentezini sağlayan genlerin yüksek oranda homoloji gösterdiği rapor edilmiş ve bu genler türlerin tanımlanmasında kullanılmıştır [13, 20, 40, 42, 57].

Aspergillus türleri döllenmeyi takiben gelişen Antep fıstığı meyveleri üzerinde ilk enfeksiyonlara neden olmakta ve hasada kadar olan dönemde meyve üzerinde gelişmektedir. Hasatı takiben depolama esnasında da enfeksiyonlar devam etmektedir. Bu enfeksiyonlar meyvede aflatoksin oluşumuna neden olmakta, pazar değerini düşürmekte ve infekteli meyvelerin iç pazarda tüketilmesi insan sağlığını olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle bu konuda yapılacak çalışma, hasat öncesi ve depolama esnasında önlemlerin alınmasına destek olacaktır. Aflatoksin oluşumuna neden olan *Aspergillus* türlerinin bulaşma dönemlerinin belirlenmesi ve tür tanısının moleküler karakterizasyonunda ve kontrol yöntemlerinin geliştirilmesinde önemlidir. Bu çalışmada, Antep fıstığında aflatoksin üreten *Aspergillus* cinsinin Flavi grubuna bağlı türlerinin belirlenmesi üzerinde araştırmalar yapılmış ve Flavi grubunda bulunan ve aflatoksin oluşumuna neden olan *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin tanımlanmasına öncelik verilmiştir. Yapılan bu çalışmada aflatoksin üreten türlerin tanısının, klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETİ

Türkiye’de aflatoksin ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, saha taraması yapılarak, aflatoksin oluşumunun kontrol altına alınması ele alınmış, hasat sonrasında ve depolama sırasında dikkat edilmesi gereken hususlar üzerinde durulmuştur [15].

Mojtahedi vd. (1979), İran’da yetiştirilen antepfistıklarının farklı gelişme dönemlerinden örnekler almışlardır. Alınan örneklerde bulaşmanın daha çok fındık gelişiminin geç dönemlerinde olduğunu bulmuşlardır. En çok *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* türleri ile *Aspergillus fischeri* var. *spirosus* alt türlerine rastlamışlar ve bunları *Aspergillus terreus*, *Aspergillus tamarii* ve *Aspergillus nidulans*’ın takip ettiğini belirtmişlerdir [41].

Sommer vd. (1986), normal ve erken zamanda çitlamış antepfistıklarında aflatoksin bulaşma düzeyini araştırmışlar, erken çitlamış fındıklarda 20 µg/kg hatta 1000 µg/kg düzeyinin de üstünde aflatoksine rastlamışlardır. Normal zamanda çitlamış fındıkların ise 2 µg/kg’den daha düşük düzeyde aflatoksin içerdiğini tespit etmişlerdir [58].

Heperkan vd. (1994), çalışmalarında hasat, depolama ve işleme aşamalarında aldıkları 143 Antep fıstığı örneğinde aflatoksijenik türleri araştırmışlardır. Hasat ve depolama sırasında fungus konsantrasyonu sırasıyla 103-104 kob/g ve 105-106 kob/g olarak rapor edilmiştir. Kabuk yüzeyinde % 38,5-39,5, tane üzerinde ise % 6-16 oranında *A. flavus* gelişimi saptanmış ancak aflatoksine rastlanmamıştır. Antep fıstığının yumuşak kabuklarının elle soyulması ile tanenin *A. flavus* tarafından kontamine edilme riskini azalttığı saptanmıştır [26].

Shapira vd. (1996) tahıllarda aflatoksijenik türlerin tespitini yapmıştır. *omt*, *ver* ve *apa* genlerine ait primerleri kullanarak mısır ve yer fıstığından izole edilen *Fusarium moniliforme*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium sporotrichioides*, *A. niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *Penicillium islandicum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium expansum*,

Sitophilus oryzae, *Tribolium castaneum*, *Oryzaephilus surinamensis* türlerini birbiri ile kıyaslayarak ayırım yapmışlardır. Çalışmadan elde edilen veriler ışığında; *A. flavus* ve *A. parasticus*'un *omt*, *ver* ve *apa* primerleri ile yapılan amplifikasyon sonucu oluşan bant profilleri karşılaştırarak, *A. flavus* ve *A. parasticus* türlerini birbirinden ayırmışlardır [56].

Demirel ve Yıldırım (2000) Van yöresinde yetiştirici şartlarında depolanan kaba yemlerde aflatoksin oluşumunu saptamayı amaçlamışlardır. Ancak elde ettikleri verilere göre bu kuru yemlerin önemli bir mikrobiyolojik kontaminasyona ve aflatoksin oluşumuna maruz kalmadığını saptamışlardır [14].

Somashekar vd. (2003) mısırdan izole ettikleri *A. flavus* ve *A. parasticus*'un *aflR* genindeki farklılıklarına göre PZR analizine tabi tutmuşlardır. Çalışmalarında *aflR*-1 ve *aflR*-2 genlerine ait primerler sentezlenmiş ve bu primerler ile mısırdan izole edilen *A. parasticus* ve *A. flavus* türlerinin ayırımı PZR-RFLP metodu ile yapılmıştır. *aflR*-1 ve *aflR*-2 primerleri kullanılarak her iki tür için özgül dizilerin amplifikasyonunu sağlamışlardır. PZR ürünleri restriksiyon endonükleazlar; *HincII* ve *PvuII* ile kesimi sonucu oluşan bant farklılıkları ile *A. parasticus* ve *A. flavus* türlerinin ayırımı sağlamışlardır [57].

Yazdanpanah (2005) çalışmasında, Antep fıstığı işleme aşamalarının, aflatoksin miktarı üzerine etkilerini araştırmıştır. Çalışmasında, kavurma işleminin aflatoksinle kontamine olmuş antepfıstıklarında toksin degradasyonuna olan etkisi belirlenmiştir. Doğal yolla kontamine olmuş örneklerde kavurma işleminin 150°C'de 30 dk yapılmasının örneklerde aflatoksin düzeyini azalttığını tespit etmiştir. 150°C'de 120 dk kavurma işlemine tabi tutulan örneklerde aflatoksin B1'in % 95'ten fazlasının degrade olduğunu bulmuştur, ancak bu numunelerin yenilemez durumda olduğunu belirtmiştir. Doğal yolla bulaşan aflatoksinlerin ısıyla degradasyona daha dirençli olduğunu bildirmiştir [66].

Gazor ve Mineai (2005) çalışmalarında, kurutmada kullanılan sıcaklığın ve havanın hızının antepfıstıklarının kuruma süresine ve kalitelerine olan etkilerini araştırmışlardır. Tek tabaka antepfıstıkları, farklı sıcaklıklarda farklı hızlarda gönderilen havayla kurutulmuşlardır. Sıcaklığı 90°C'ye çıkartmanın kurutma süresini % 37 oranında azalttığını ve örneklerin aromasında değişime neden olduğunu

bulmuşlardır. Kurutma havasının hızının 1,5 m/s'den 2,5 m/s'ye çıkartılmasının kurutma süresini % 10 azalttığını tespit etmişlerdir. Sıcaklık ve havanın hızında yapılan değişikliklerin örneklerin protein ve yağ içerikleri üzerine etkilerinin olmadığını, ancak sıcaklığı 90°C'ye çıkartmanın örneklerin peroksit değerini 0.55 meq/kg'a çıkarttığını ancak bu peroksit değerinin, işlenmiş antepfıstıkları için kabul edilebilir limitler içinde olduğunu belirtmişlerdir [23].

Akbaş ve Özdemir (2006) çalışmalarında, Antep fıstığı tanelerindeki aflatoksinlerin ozon uygulamasıyla degradasyon etkinliğini belirlemişlerdir. Farklı konsantrasyonlardaki ozon belirli sıcaklık, süre ve nemde örnekler üzerine uygulanmış ve aflatoksin degradasyonu HPLC ile belirlenmiştir. Ozonlama işleminin tanelerdeki aflatoksinlerin degradasyonunda öğütülmüş antepfıstıklarındakinden daha etkili olduğu bulunmuştur [1].

Lee vd. (2006), Flavi grubundaki 34 *Aspergillus* türünü incelemiş ve bunlardan 23 tanesinde başarılı bir şekilde *aflR* genini elde ederek bu bölgeyi çoğaltılmıştır. Çalışmanın PZR-RFLP sonuçları; *A. sojae* ve *A. oryzae* suşlarında *aflR* geninin olmadığını ya da bu bölgenin önemli ölçüde farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir. *aflR* geni izole edilen bu 23 suşun % 96,6 oranında benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir [37].

Goltapeh vd. (2007), URP-1F, URP-2F, URP-4R, URP-6R, URP-9F, URP-13R primerlerini kullanarak *A. sulphureus*, *A. sydowii*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. japonicus*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. candidus*, *A. flavus*, *A. oryzae* ve *A. terreus* türlerini birbirlerinden ayırt etmeye çalışmışlardır. Çalışılan tüm izolatların % 70 oranında benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir [25].

Mirhendi vd. (2007), patojenik *Aspergillus* türlerinin restriksiyon enzimi ile PZR tabanlı belirlenmesine yönelik çalışmasında *A. niger*, *A. flavus* ve *A. fumigatus*'un ayrımı için ITS bölgesinin PZR-RFLP analizlerini yapmıştır. PZR ürünlerinin RFLP analizinde *HhaI* enzimi kullanılmış ve *A. niger*, *A. flavus* ve *A. fumigatus* türlerinde farklı band profili elde edilmiştir [40].

Criseo vd. (2008), *A. flavus* grubunda bulunan türlerden aflatoksin üreten ve aflatoksin üretmeyen türlerin tespiti için çalışmalarında kültürel ortamlar olarak; YES, MGA ve CAM kullanmıştır. Ayrıca; *aflR*, *nor*, *ver* ve *omt* gen bölgeleri

kullanarak PZR-RFLP metodunu uygulamışlardır. Çalışmada 11 *A. flavus* ve 1 *A. parasticus* izolatı kullanmışlardır. Çalışılan 12 *Aspergillus* izolatından sadece üçünün aflatoksin ürettiğini saptamışlardır. *A. flavus* aflatoksinin B tipini oluştururken, *A. parasticus* ise B ve G tipi aflatoksinleri oluşturduğunu belirtmişlerdir [10].

Set ve Erkmén (2010), Eylül 2008 – Şubat 2009 tarihleri arasında yapılan çalışmalarında çekilmiş ve kurutulmuş kırmızı biber ve Antep fıstıklarında, toplam aflatoksin ve aflatoksin B1 kontaminasyonu, pH, su aktivasyonu, küf ve maya sayımlarını yapmıştır. Paketlenmemiş kırmızı biberde, toplam aflatoksin ve aflatoksin B1 düzeylerinin yasal sınırlar üzerinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca paketlenmemiş Antep fıstığında, toplam aflatoksin ve aflatoksin B1 sırasıyla 0,007–7,72 ppb olarak saptanmıştır [52].

Varga vd. (2011), morfolojik tanılama metodunu kullanarak iki yeni *Aspergillus* türünün taksonomik analizlerini vermiştir. Bu yeni türler *A. pseudocaelatus* spp nov. ve *A. pseudonomis* spp. nov olarak belirtmiştir. Bu yeni türler morfolojik tanılamada diğer *Aspergillus* türlerinden farklılık göstermektedir. Ayrıca çalışmada da Flavi grubunda yer alan *Aspergillus* türleri ile ilgili genel bir değerlendirme yapılmıştır [63].

Amike vd. (2011), çalışmalarında tarımsal alanları ve insan sağlığını tehdit eden *A. flavus* türünü tartışmıştır. Saprotik olan *A. flavus* türünün genomik patojenite parametrelerini aydınlatarak, kontrol önlemlerini geliştirmeyi amaçlamışlardır [3].

Özaslan vd. (2011), çalışmalarında çeşitli yerlerden temin ettikleri 38 Antep fıstığında (*P. vera* L) aflatoksin miktarını tespit etmek için HPLC ve ELİSA yöntemini kullanmışlardır. ELİSA yönteminin HPLC yöntemine göre daha duyarlı sonuçlar verdiğini tespit etmişlerdir [45].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 *Aspergillus* İzolatları

Çalışmada, Antep fıstığı yetiştiriciliği yapılan alanlardan Antep fıstığı örneği ve toprak materyali temin edilmiştir. Bu toprak ve meyve örneklerinden elde edilen *Aspergillus* spp. izolatları çalışmada kullanılmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında TÜBİTAK MAM'dan temin edilen *Aspergillus flavus* (MAM/MRC327) izolatu da dâhil edilmiştir.

3.1.2 *Aspergillus* Türlerinin Kültürleri İçin Kullanılan Besin Ortamları

Kültür ortamları olarak çalışmanın amacına göre ilk olarak *Aspergillus* türlerinin gelişmesi için içerik bakımından zengin olan PDA (Patates Dekstroz Agar) ve CZ (Czapek Dox Agar) ortamları, daha sonra *Aspergillus* türlerinin tanımlanması için CYA25, CY20S, MEA, CZ ve AFPA ortamları kullanılmıştır. Ortam içerikleri Ek1'de verilmiştir.

3.1.3 Kullanılan Cihazlar

Kültürlerin hazırlanması, gelişmesi ve saklanması için; steril kabin (Bilser, Ankara), otoklav, hassas terazi (Presica 160M), mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye), etüv (Nüve), inkübatör (Nüve), karıştırıcılı ısıtıcı (Elektro-mag, Türkiye), derin dondurucu (Alaska), ters mikroskop (Optik Idyman System), ışık mikroskobu, fotoğraf makinası (Kodak Easy Share Z980 Digital Camera), buzdolabı (Profilo), güç kaynakları (Bio-rad, Amerika), santrifüjler, vorteks (Elektro-mag, Türkiye), 10X Buffer (Fermentas, Kanada), çalkalayıcı (Selecta, İspanya), PZR (Gene Amp, PZR System 9700, Amerika), 1000 µl'lik, 200, 100 ve 10 µl'lik mikropipet (Ependorf,

Almanya), elektroforez (Bio-rad, Amerika), pH metre (Hanna, Amerika) ve jel görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılmıştır. Bu tez kapsamında kullanılan kimyasallar ise Merck, Sigma ve Fermantas firmalarından temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Arazi Çalışmaları

Çalışmada kullanılan *Aspergillus* izolatları toprak ve meyveden izole edilmiştir. Bu amaçla Antep fıstığı yetiştiriciliği yapılan alanlardan döllenen hasada kadar olan aylarda (Nisan-Ekim 2011) belirli aralıklar ile toprak ve meyve örnekleri alınmıştır. Çalışmalarda kullanılan toprak ve meyve örnekleri Gaziantep Üniversitesi kampüsünden, Antep fıstığı Araştırma Enstitüsü bahçesinden, Nizip'ten (Gaziantep), Pazarcık'dan (Kahramanmaraş), Geçittepe'den (Şanlıurfa), Yukarıncirli'den (Şanlıurfa), Bozova'dan (Şanlıurfa), Kilis'den, Bozcayazı'ndan (Kilis), Tek Tek Dağları'ndan (Şanlıurfa), Surtepe'den (Adıyaman), Halfeti'de (Şanlıurfa), Gercüş'den (Batman), Midyat'tan (Mardin), Karakuyu'dan (Mardin) temin edilmiştir. Ayrıca Kasım-Aralık aylarında, Gaziantep ilinde dört farklı fıstık deposundan Antep fıstığı meyvesi alınmıştır.

3.2.2 Toprak ve Meyveden Fungus İzolasyonu

Topraktan fungus izolasyonu Maciejowska (1962)'e göre yapılmıştır. Bu amaçla 300 ml steril su-agar (% 0.1) içerisine 30 gr toprak ilave edilmiş, 1 dk. süre ile karıştırılmıştır. Bu karışımdan 1 ml alıp 99 ml steril su-agar (% 0.1) içerisine karıştırılmış, bu karışımdan 0,1 ml alıp PDA ortamı üzerine yayılmıştır. Petriler 25°C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Gelişen koloniler mikroskopik olarak incelenmiş ve *Aspergillus* spp. olarak belirlenen koloniler yeni ortama aktarılarak bu kültürlerden tek spor izolasyonları yapılmıştır [38].

Meyveden yapılan izolasyonlarda, hazırlanan örnekler öncelikle çeşme suyunda yıkanmıştır ve sterilizasyon amacı ile steril kabin içerisine alınmıştır. Yüzey sterilizasyonu için % 1'lik NaOCl (sodyum hipoklorit) çözeltisinde 2 dk bekletilen örnekler, sterilantların uzaklaştırılması için 2 kere sdH₂O ile yıkanmıştır. Örnekler steril filtre kâğıtlarının arasına alınarak kurumak üzere 15-20 dk boyunca steril kabin

içerisinde bekletilmişlerdir. Kuruyan bitki örnekleri steril pens yardımıyla alınarak her bir besi yerinde 4 adet olacak şekilde PDA veya CZ ortamı üzerine $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de kültüre alınmıştır. 5-7 gün sonunda gelişen kolonilerden *Aspergillus* spp. tek spor izolasyonları gerçekleştirilmiştir [9, 16].

3.2.3 Tek Spor İzolasyonu

Tür teşhisi çalışmalarında hassasiyet göz önüne alınarak *Aspergillus* türlerine ait saf kültürlerden tek spor izolasyonu yapılmıştır. Saf kültürlerin uç kısmından steril öze ile alınan örnek yeni bir PDA ortamına ekilmiş ve 24 saat $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen örnekler ışık mikroskopunda (X10) ve ters mikroskopta (X10) incelenerek tek spordan gelişen alanlar belirlenmiş ve bu alanlar petri kabının üzerinde işaretlenmiştir. Daha sonra steril bistüri yardımıyla, işaretlenen yerden küçük bir parça alınmış ve gelişmek üzere PDA ortamına aktarılmıştır. PDA ortamına alınan örnekler bir sonraki çalışma da kullanılmak üzere $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır [9, 16].

3.2.4 *Aspergillus* Türlerinin Makroskobik ve Mikroskobik Tanısı

Toprak, meyve ve depolardan izole edilmiş olan *Aspergillus* cinsi izolatların Flavi grubuna giren türlerinin klasik yöntemler ile morfolojik tanısı için CYA25, CYA37, CY20S, MEA ve CZ ortamları kullanılmıştır [34, 49]. Her bir örneğin yukarıda adı geçen ortamlara inokulasyonu için fungal inokulum tamponundan (Ek 2) 1 ml olacak şekilde ependorf tüpüne aktarılmıştır. Bu tüplerin içine spor plakları karıştırılmıştır. Bu karışımdan 2-5 µl alınarak üç noktadan 10 cm (içinde 25 ml ortam bulunan) petri kaplarına inokulasyon gerçekleştirilmiştir. Petriler 25 ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ortamlar üzerinde gelişen *Aspergillus* türlerinin morfolojik tanısı, koloni rengi, konodiofor büyüklüğü, vesicle tipi ve büyüklüğü, konodi büyüklüğü, vezikülde bulunan ve konidileri taşıyan yapıların uniseriate veya biseriate olması, spor büyüklüğü ve spor yapısı (düz-pütürlü) özelliklerine göre yapılmıştır. Mikroskobik incelemeler için spor plakları seyreltme tamponu (Ek 2) içerisinde 5-10 dk tutulmuştur. Bu işlem mikroskobik incelemeleri kolaylaştırmıştır. Bu uygulamayı takiben hazırlanan preparatlar mikroskobik olarak incelenmiştir [9, 16].

3.2.5 *Aspergillus* İzolatlarının Saklanması

Tek spor olarak çoğaltılan örnekler başka çalışmalarda da kullanılmak amacıyla uzun süreli muhafaza altına alınmıştır. Bunun için iki farklı yöntem uygulanmıştır. İlk olarak PDA ortamında gelişen kolonilerin uç büyüme noktalarından 3-5 küçük parça alınıp ependorf tüplerde gliserol stok (Ek 2) içine konularak -80 °C’de saklanmıştır. Diğer bir yöntem olarak ise, gelişen örneklerden steril bistüri yardımıyla küçük bir parça alınıp, PDA ortamının üzerine yerleştirilmiş steril Whatman kâğıdı üzerine ekilmiştir ve gelişmek üzere 25±2°C’de 3-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üzerinde gelişim gösteren türler Whatman kâğıdı steril pens yardımıyla ortamdan çekilerek alınmış ve steril petri kaplarına kurumak üzere konulmuştur. Son olarak kuruyan Whatman kâğıtları (No: 4) steril kağıt zarfların içerisine konulup -20°C’de saklanmıştır [9, 16].

3.2.6 Aflatoksin Üreten *Aspergillus* Türlerinin Tanısı

AFPA ortamına inoküle edilen izolatlardan turuncu renk meydana getirenler aflatoksin üreten türler olarak rapor edilmektedir [48]. Toprak, meyve ve depolardan izole edilmiş olan *Aspergillus* cinsi izolatların Flavi grubuna giren türlerinin aflatoksin oluşumunu gözlemlemek için AFPA ortamı kullanılmıştır. Her bir örneğin yukarıda adı geçen ortamlara inokülasyonu için fungal inokulum tamponundan (Ek 2) 1 ml olacak şekilde ependorf tüpüne aktarılmıştır. Bu tüplerin içine spor plakları karıştırılmış ve bu karışımdan 2-5 µl alınarak üç noktadan 10 cm (içinde 25 ml ortam bulunan) petri kaplarına inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Petrilerin 25 °C’de inkübasyonu takiben incelemesi yapılmıştır.

3.2.7 *Aspergillus* Türlerinin. Moleküler Tanısı

3.2.7.1 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonları amacı ile *Aspergillus* (Flavi grubu) izolatları, sıvı PDB ortamında çalkalayıcı üzerinde, 75 rpm’de, 3-5 gün süre ile kültüre alınmış ve bu süre sonunda gelişen miselyumlar DNA izolasyonlarında kullanılmıştır. Örneklerden genomik DNA izolasyonu için kitler (Intron Biotechnology, USA) kullanılmıştır.

3.2.7.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri

A. flavus ve *A. parasiticus* türlerinin ayrımı amacı ile kullanılan farklı markır sistemleri bulunmakta ve bu amaçla birçok bitki türünde aflatoksin sentez yollarında yer alan genlere dayalı tanı sistemleri kullanılmaktadır (Ehrlich vd., 2005). Bu çalışmada, *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin DNA markırlarına dayalı tanısı Mirhendi vd. (2007) ve Somashekar vd. (2004 a ve b)'e göre primerler kullanılmıştır. *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinde aflatoksin sentezinden sorumlu olan *aflR* (aflatoksin düzenleyici geni), ve ITS genlerinin çoğaltılması sağlanmıştır. Bu amaçla *aflR*-1, *aflR*-2, *aflR*-1a, *aflR*-2b, ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılmıştır. PZR koşulları Mirhendi vd. (2007) ve Somashekar vd. (2004 a ve b)'e göre düzenlenmiştir. PZR analizlerinde kullanılan bölgeler ve primer dizileri Tablo 3.1'de verilmiştir [40, 57].

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan primerler ve dizilimler [40, 57].

Bölge	Primer	Primer Dizisi
ITS	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
<i>aflR</i>	<i>aflR</i> 1 (ileri)	5'-AACCGCATCCACAATCTCAT-3'
	<i>aflR</i> 2 (geri)	5'-AGTGCAGTTCGCTCAGAACA-3'
<i>aflR</i>	<i>aflR</i> 1a (ileri)	5'-GCACCCTGTCTTCCCTAACA-3'
	<i>aflR</i> 2b (geri)	5'-ACGACCATGCTCAGCAAGTA-3'

3.2.7.3 PZR Protokolü

PZR prtokolü Freeman vd. (1992)'e göre yapılmıştır. Fungal DNA amplifikasyonu için *Aspergillus* türlerinden elde edilen 1µl DNA 20 µl reaksiyon hacmine tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımı 1×PZR buffer (10 mM Tris-HCl pH 9,0, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl ve 0.01% gelatin) ve 200 µM deoxynucleoside triphosphate, 4 pmol primer ve 1,0 U Taq DNA Polymeraz (Fermantas, Kanada) oluşmaktadır [21].

3.2.7.4 PZR Amplifikasyonu

PZR amplifikasyonu Freeman vd. (1992)'e göre yapılmıştır DNA ilk 5 dk için 94°C'de denatüre edilmiştir. Daha sonra 30 PZR döngüsü programlanmıştır. Her döngüde denatürasyon için 94°C'de 30 sn, primer bağlanması için 50°C'de 1,25 dk, uzama için 72°C'de 1,40 dk. ayarlanmıştır. En son döngüsü için 72°C'de 10 dk bir döngü izlenmiştir. Nested PZR da yukarıda belirtilen şartlar altında şablon olarak *afIR-1* ve *afIR-2* (dilüsyon 1:1000) PZR ürünü olarak, primerler *afIR-1a* ve *-2b* kullanılarak gerçekleştirilmiştir [21].

ITS bölgesinin için *HhaI* kesim enzimi, *afIR* bölgesinin için *HincII* ve *PvuII* kesim enzimi kullanılmıştır [40, 57]. Kesim için oluşturulacak karışımda 20 µl PZR ürünü, 14 µl ddH₂O, 4 µl tango, 2 µl enzim kullanılmıştır. Oluşan karışım 37°C' de 4 saat tutulmuştur. Daha sonra bant durumlarını görüntülemek için elektroforez işlemi uygulanmıştır.

3.2.7.5 Agaroz Jel Elektroforezi

PZR sonucu oluşan bantların belirlenmesi için % 1,5-2,0 oranında hazırlanan agaroz jel 1X TAE (Tris, Asetik asit, EDTA, Ek 2'de verilmiştir) solüsyonunda eritilmiştir. Agaroz jel içerisinde DNA'nın UV ışık altında görülmesi için etidium bromür (10 mg/ml) eklenmiştir. Çözelti 50-55°C'ye kadar soğuduktan sonra jel tankına dökülmüştür. Jel polimerize olduktan sonra 1X TAE tamponu içeren elektroforez tankına alınmış, 5 µl PZR ürünü 3 µl yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra jele yüklenmiştir. Elektroforez işlemi % 1,5-2,0 agaroz jelde 80-100 V/cm'de 2-4 saat süre ile uygulanmıştır. Bant sayısı ve büyüklüğü dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır. Markır olarak 1 kb veya 50 bç DNA (Fermantas, Kanada) kullanılmıştır. Elektroforez işlemlerinden sonra oluşan bantlar bilgisayarlı jel dokümantasyon ve görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Arazi Çalışmaları

Bu çalışma kapsamında 2011 yılının Nisan-Ekim (bahçe) ve Kasım-Aralık (depo) ayları arasında belirlenen lokalizasyonlardan örnekleme işlemi yapılmıştır. Yapılan örnekleme çalışmaları sonucunda hastalık belirtileri veren fıstık örnekleri toplanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Hastalık semptomu gösteren Antep fıstığı meyveleri

Belirlenen lokalizasyonlardan yapılan örnekleme sonucunda Nisan-Aralık aylarında toplanan örneklerin morfolojik tanılması sonucunda, Antep fıstığının çiçeklenme döneminden hasat öncesi döneme kadar *Aspergillus* popülasyonunun düşük olduğu, hasat döneminde ve depolarda ise *Aspergillus* popülasyonunun yükseldiği tespit edilmiştir (Tablo 4.1)

Tablo 4.1 2011 yılı aylara göre meyve ve topraktan izolasyonları yapılan türler

Aylar	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Aspergillus</i> <i>niger</i>	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	Toplam (%)
Nisan (Bahçe)	52	20	19	9	100
Mayıs (Bahçe)	45	21	31	3	100
Haziran (Bahçe)	37	0	59	4	100
Temmuz (Bahçe)	60	12	20	8	100
Ağustos (Bahçe)	15	77	8	0	100
Eylül (Bahçe)	28	28	20	24	100
Ekim (Bahçe)	33	13	49	5	100
Kasım (Depo)	19	54	16	11	100
Aralık (Depo)	3	51	17	29	100

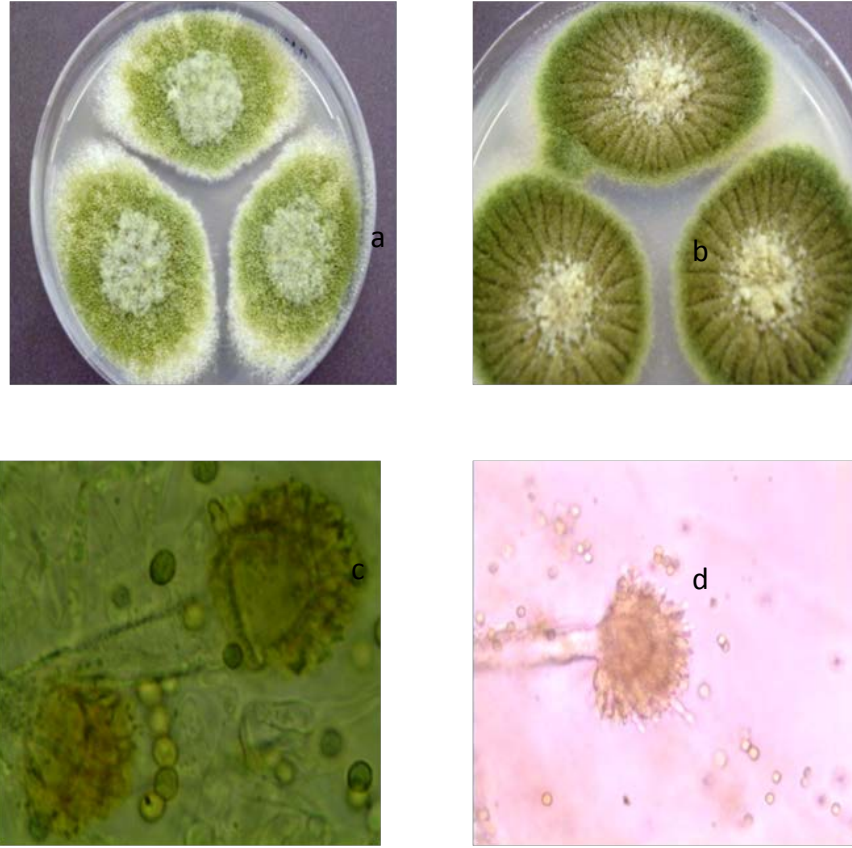
İzolasyon ve teşhis işlemlerinden sonra *Aspergillus* spp. genel olarak %16.6 oranında belirlenmiştir. Bu durum izolasyonu yapılan bitkilerde patojen olarak *Aspergillus* türlerinin önemli derecede bulunduğu bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. *Aspergillus* spp. yaygın olarak % 46.8 oranı ile Şanlıurfa ilinde tespit edilirken onu sırasıyla, Batman, Mardin, Kilis, Gaziantep, Kahramanmaraş ve Adıyaman illeri takip etmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 İzole edilen *Aspergillus* türlerinin lokalizasyonlara göre dağılımı ve % oranları

Lokalizasyonlar	Meyve Sayısı	Örneği	Toprak Sayısı	Örneği	<i>Aspergillus</i> spp.	Oran (%)
Gaziantep	79		21		4	5
Kahramanmaraş	20		15		1	2.8
Adıyaman	36		4		1	2.5
Şanlıurfa	40		24		30	46.8
Kilis	16		4		2	10
Batman	15		-		5	33.3
Mardin	15		-		5	33.3
Toplam	221		68		48	16.6

4.2 *Aspergillus* Türlerinin Morfolojik Tanısı

Hastalık simptome gösteren Antep fıstığı meyvelerinde yapılan izolasyonlarda gelişen fungal kolonilerin makroskobik ve mikroskobik incelemeleri sonucu *Aspergillus* izolatları belirlenmiştir (Şekil 4.2). *Aspergillus* türlerinin morfolojik tanısı, türlere ait koloni rengi, konodiofor büyüklüğü, vesicle tipi ve büyüklüğü, konodi büyüklüğü, vesiclede bulunan ve konidileri taşıyan yapıların uniseriate veya biseriate olması, spor büyüklüğü, spor yapısı gibi özelliklerine göre yapılmıştır [34, 49].



Şekil 4.2 *Aspergillus* türlerinin makroskobik ve mikroskobik yapısı a-b) Koloni morfolojisi, c-d) Konidiyofor yapısı (c) 100X, d) 40X)

Fungal kolonilerin makroskobik ve mikroskobik incelemeleri sonucunda behçe ve depodan 56 *Aspergillus* türü elde edilmiştir. Bu izolatların seçici ortamdaki tanımlamaları sonucunda 35 izolatın Flavi grubuna ait olduğu belirlenmiştir. Flavi grubunda bulunan 35 izolatın lokalizasyonları ve alındığı tarih tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.3 Morfolojik tanılamada kullanılan *Aspergillus* izolatları

No	Lokalizasyonlar	Tarih	Alındığı Yer
1	Kahramanmaraş (Pazarcık)	20.04.2011	Meyve
2	Şanlıurfa (Geçittepe)	20.05.2011	Toprak
3	Şanlıurfa (Geçittepe)	20.05.2011	Toprak
4	Şanlıurfa (Geçittepe)	20.05.2011	Toprak
5	Şanlıurfa (Geçittepe)	20.05.2011	Toprak
6	Adıyaman (Surtepe)	25.05.2011	Toprak
7	Adıyaman (Surtepe)	25.05.2011	Toprak
8	Şanlıurfa (Geçittepe)	03.06.2011	Toprak
9	Şanlıurfa (Geçittepe)	03.06.2011	Toprak
10	Şanlıurfa (Geçittepe)	03.06.2011	Toprak
11	Batman (Gercüş)	21.06.2011	Meyve
12	Batman (Gercüş)	21.06.2011	Meyve
13	Batman (Gercüş)	21.06.2011	Meyve
14	Batman (Gercüş)	21.06.2011	Meyve
15	Batman (Gercüş)	21.06.2011	Meyve
16	Mardin (Midyat)	21.06.2011	Meyve
17	Mardin (Midyat)	21.06.2011	Meyve
18	Mardin (Midyat)	21.06.2011	Meyve
19	Mardin (Karakuyu)	15.07.2011	Meyve
20	Mardin (Karakuyu)	15.07.2011	Meyve
21	Şanlıurfa (Halfeti)	21.07.2011	Meyve
22	Şanlıurfa (Halfeti)	21.07.2011	Meyve
23	Şanlıurfa (Bozova)	21.07.2011	Meyve
24	Şanlıurfa (Bozova)	21.07.2011	Meyve
25	Şanlıurfa (Bozova)	21.07.2011	Meyve
26	Şanlıurfa (Geçittepe)	23.07.2011	Meyve
27	Şanlıurfa (Geçittepe)	23.07.2011	Meyve
28	Gaziantep (Fıstık Araştırma Enstitüsü)	10.08.2011	Meyve
29	Gaziantep (Gaziantep Üniversitesi Kampüsü)	10.08.2011	Meyve
30	Kilis	08.09.2011	Meyve
31	Kilis (Bozcayazı)	08.09.2011	Meyve
32	Şanlıurfa (Halfeti)	09.09.2011	Meyve
33	Şanlıurfa (Halfeti)	09.09.2011	Meyve
34	Şanlıurfa (Geçittepe)	09.09.2011	Meyve
35	Şanlıurfa (Geçittepe)	09.09.2011	Meyve
36	Şanlıurfa (Bozova)	20.09.2011	Meyve

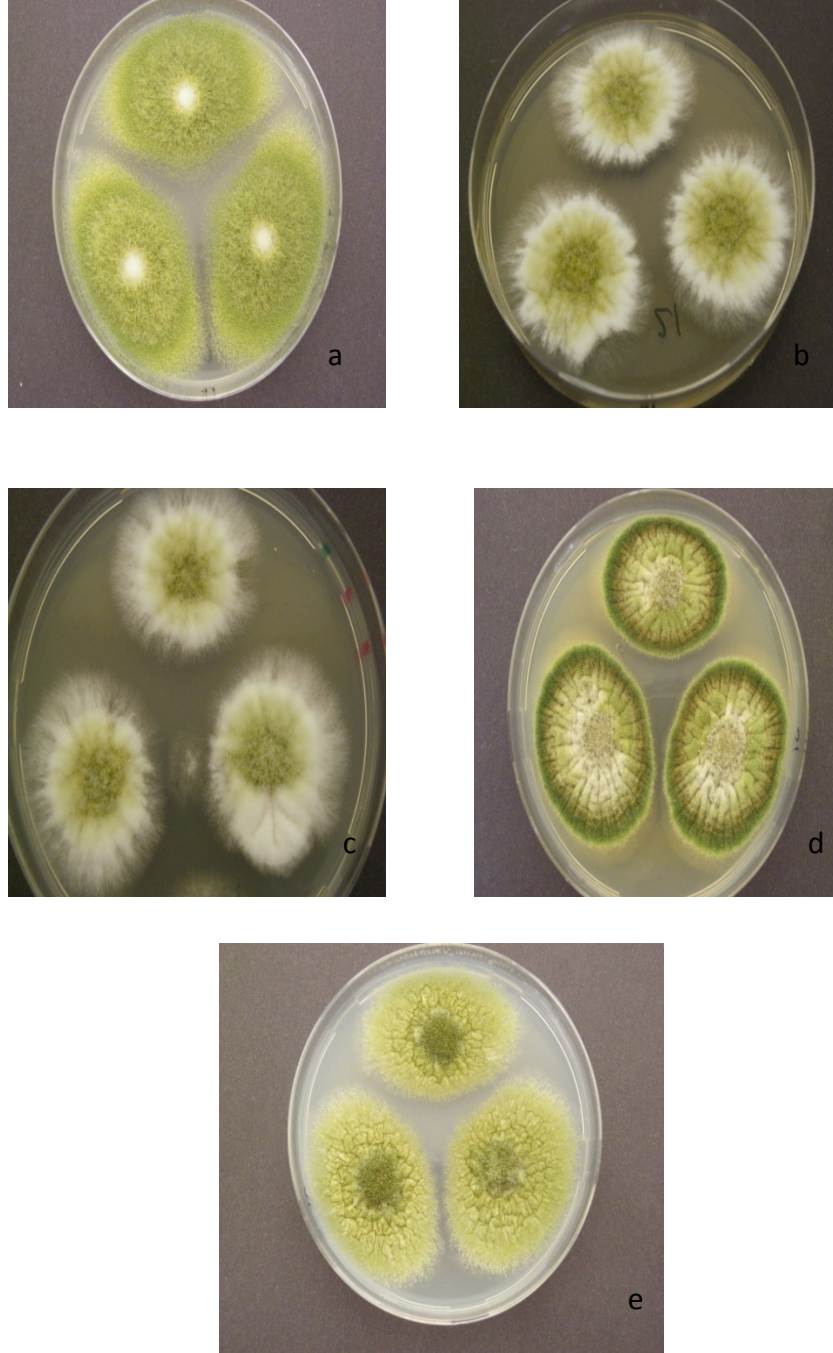
Talo 4.3 Devamı,

No	Lokalizasyonlar	Tarih	Alındığı Yer
37	Şanlıurfa (Bozova)	20.09.2011	Meyve
38	Şanlıurfa (Bozova)	20.09.2011	Meyve
39	Şanlıurfa (Halfeti)	20.09.2011	Meyve
40	Şanlıurfa (Halfeti)	20.09.2011	Meyve
41	Şanlıurfa (Tek Tek Dağları)	20.09.2011	Meyve
42	Şanlıurfa (Tek Tek Dağları)	20.09.2011	Meyve
43	Şanlıurfa (Tek Tek Dağları)	20.09.2011	Meyve
44	Şanlıurfa (Tek Tek Dağları)	20.09.2011	Meyve
45	Şanlıurfa (Yukarıincirli)	20.09.2011	Meyve
46	Şanlıurfa (Yukarıincirli)	20.09.2011	Meyve
47	Gaziantep (Nizip)	20.09.2011	Meyve
48	Gaziantep (Fıstık Araştırma Enstitüsü)	05.10.2011	Meyve
49	Depo (1)	31.10.2011	Meyve
50	Depo (1)	31.10.2011	Meyve
51	Depo (2)	31.10.2011	Meyve
52	Depo (2)	31.10.2011	Meyve
53	Depo (3)	12.11.2011	Meyve
54	Depo (3)	12.11.2011	Meyve
55	Depo (4)	06.12.2011	Meyve
56	Depo (4)	06.12.2011	Meyve



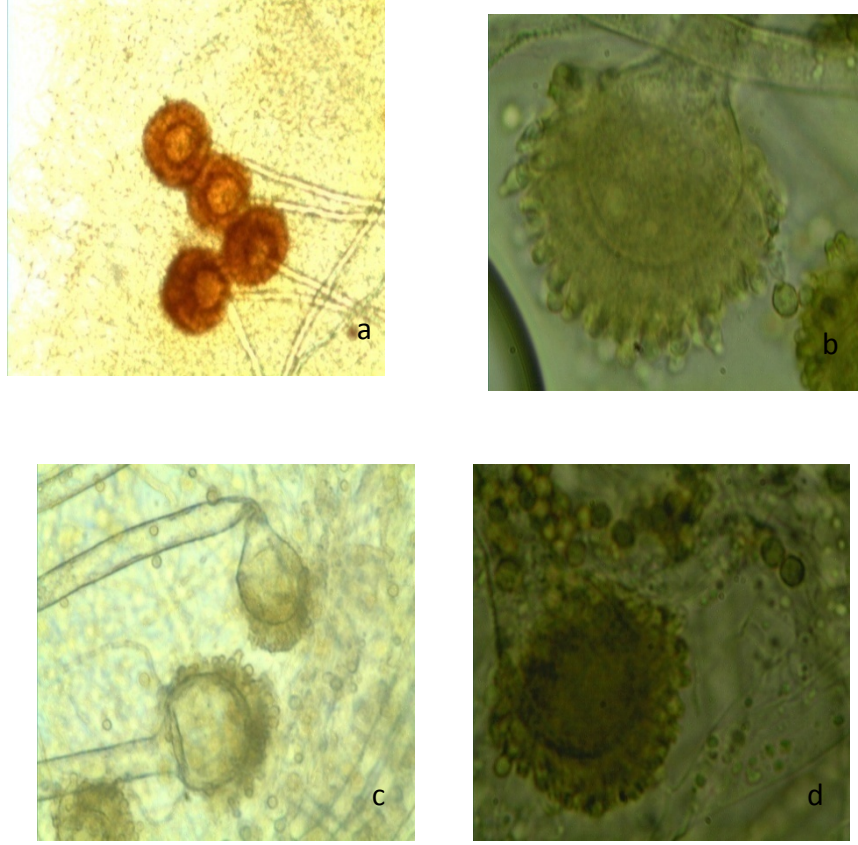
Şekil 4.3 *Aspergillus flavus*'un farklı ortamlardaki koloni morfolojisi a) MEA ortamı, b) CYA20S ortamı, c) CYA25 ortamı, d) CYA37 ortamı, e) CZ ortamı

A. flavus çoğunlukla uniseriate yapıda, CYA ortamında açık veya koyu yeşil (zeytini yeşil), MEA ortamında kolonilerin yarıçapı 30 mm büyük, CYA ortamında gelişim göstermekte, konidia duvarları pürüzsüz veya ince pürüzlü, konidia yarıçapı 3-6 μm 'dir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.5).



Şekil 4.4 *Aspergillus parasticus*'un farklı ortamlardaki koloni morfolojisi a) MEA ortamı, b) CYA20S ortamı, c) CYA25 ortamı, d) CYA37 ortamı, e) CZ ortamı

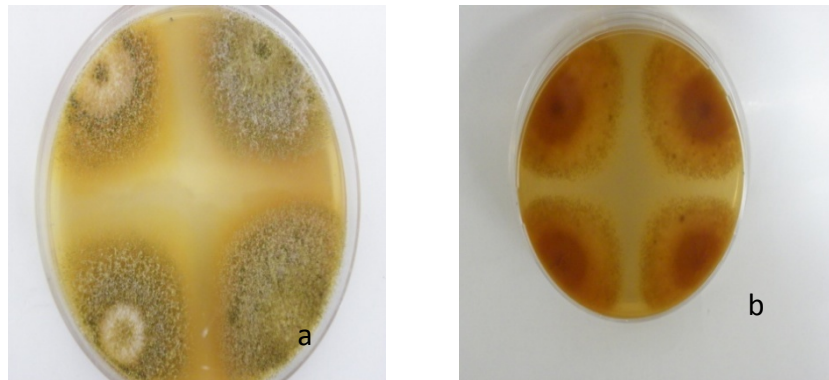
A. parasticus çoğunlukla biseriata, CYA 25 ve MEA ortamlarında koloni yarıçapı 45 mm'den büyük, CYA ortamındaki rengi mavimsi yeşil, vezikül yapısı 25 μ m'den büyük, geniş ve yuvarlak, konidi duvarı pürüzlü, konidi büyüklüğü 3-6 μ m'dir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).



Şekil 4.5 *Aspergillus* spp. vezikül formları a) *Aspergillus niger* (X10), b) *Aspergillus* spp. (X100) c) Uniseriate yapı (X40), d) Biseriate yapı (X100)

Flavi gurubunda olan 35 adet *Aspergillus* türünün morfolojik tanımlanması sonucunda 21 adedinin (%60) tanılması rahatlıkla yapılabılırken geriye kalan %40 lık (14 izolat) kısmın morfolojik tanılmasında *A. flavus* ile *A. parasiticus* arasında tam bir ayırım sağlanamamıştır. Teşhisi konan örneklerin 20 tanesi *A. flavus*, 1 tanesi *A. parasiticus* olarak tespit edilmiştir.

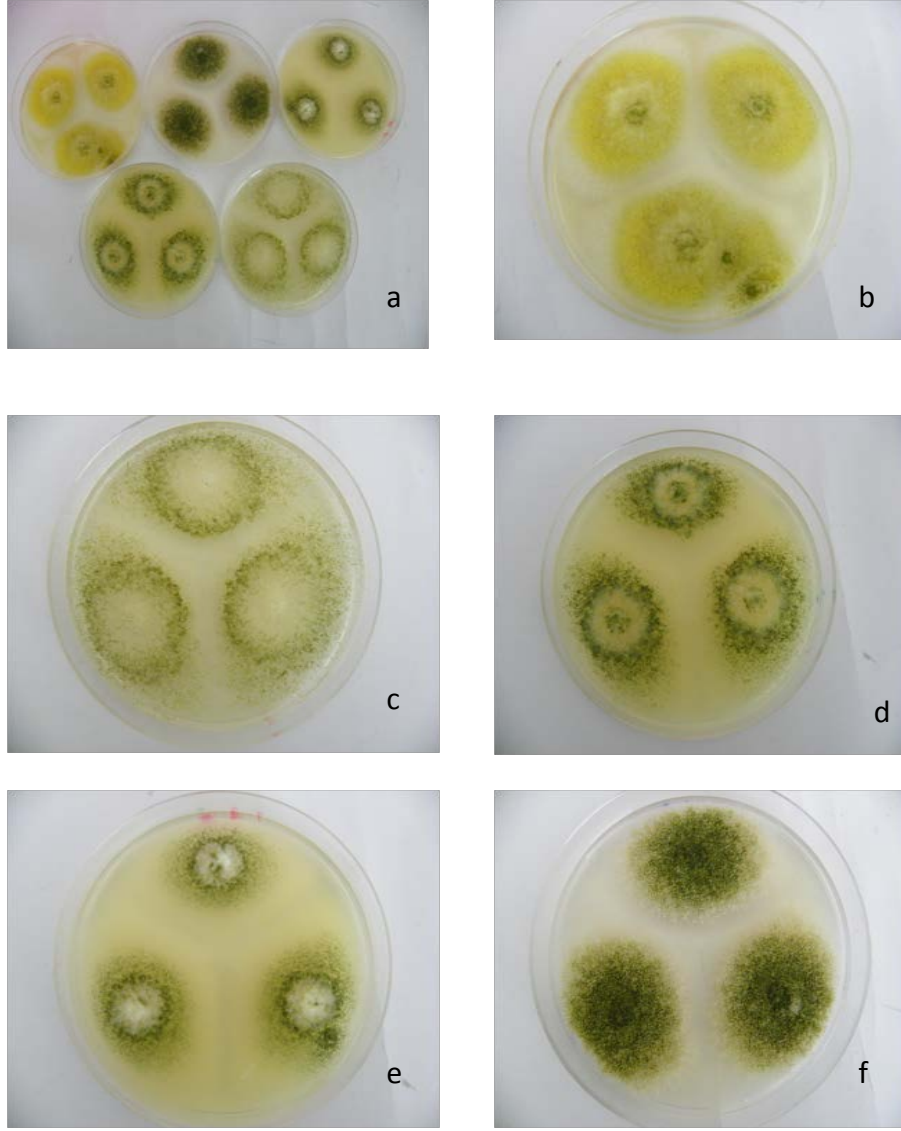
4.3 Aflatoksin Üreten *Aspergillus* Türlerinin Tanısı



Şekil 4.6 *Aspergillus* izolatlarının AFPA ortamında görüntüsü a) *Aspergillus* spp. koloninin üstten görüntüsü, b) Koloninin petri kabı altından görüntüsü

İzole edilen *Aspergillus* türlerinin aflatoksin üretip üretmediğinin tespiti için kullanılan AFPA ortamında *A. flavus* ve *A. parasticus* tanısı konmuş olan türlerin ortamda turuncu renk meydana getirdiği, *Penicillium* spp. ve *A. niger*'de ise renk oluşmadığı tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan *Aspergillus* izolatları AFPA ortama açık ya da koyu turuncu rengi vermiştir (Şekil 4.6).

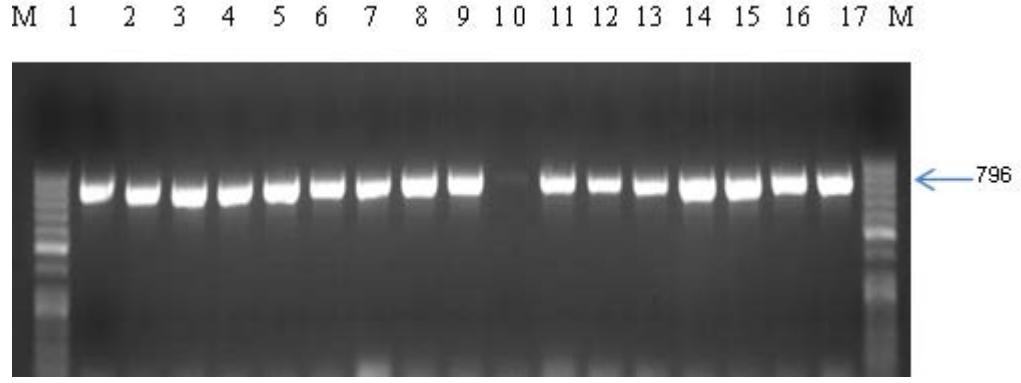
Ayrıca çalışmaya TÜBİTAK MAM'dan temin edilen *Aspergillus flavus* (MAM/MRC327) da dahil edilmiş ve seçici ortamlardaki makroskobik ve mikroskobik görüntüleri kayıt altına alınmıştır (Şekil 4.7). Kontrol olarak kullanılan *A. flavus* izolatu ile çalışmada kullanılan diğer izolatların koloni gelişimleri arasında benzerlik görülmüştür.



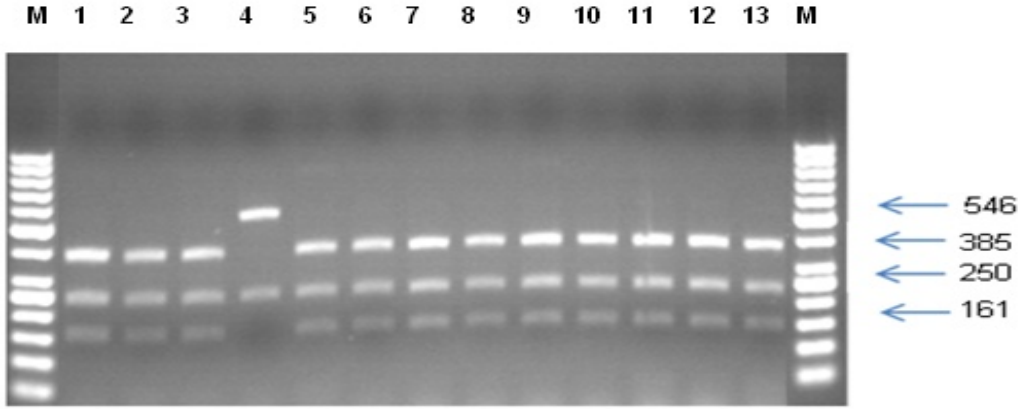
Şekil 4.7 *Aspergillus flavus*'un (MAM/MRC327) farklı ortamlardaki koloni morfolojisi a) Seçici ortamdaki koloni morfolojisine genel bakış b) MEA ortamı, c) CYA20S ortamı, d) CYA25 ortamı, e) CYA37 ortamı, f) CZ ortamı

4.4. *Aspergillus* Türlerinin Moleküler Tanısı

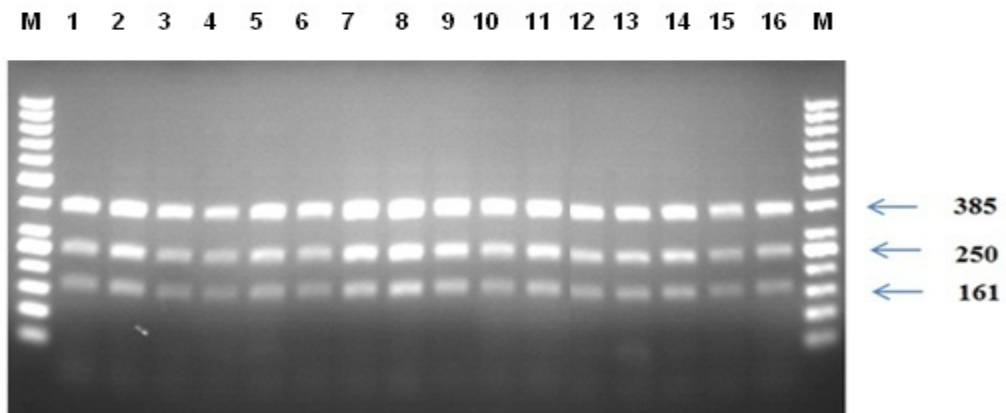
Çalışmaya araziden ve depolardan elde edilen Flavi grubunda olan 35 *Aspergillus* izolatu dahil edilmiştir. Tüm izolatlarda, *aflR* ve ITS1-5.8S rDNA-ITS2 bölgelerinde PZR amplifikasyonu sağlanmıştır. *aflR* bölgesinin PZR sonrası 796 bp büyüklüğünde tek bant elde edilmiştir (Şekil 4.8). Bu bölgede *HincII* enzim tanıma bölgesi bulunmaktadır [57]. PZR amplifikasyonu sonrası kesimde *A. flavus*' da 161 bp, 250 bp ve 385 bp büyüklüğünde üç bant, *A. parasticus*' da ise 250 bp ve 546 bp büyüklüğünde iki bant oluşturmuştur (Şekil 4.9; Şekil 4.10).



Şekil 4.8 *aflR* bölgesinin PZR sonrası elde edilen bant profili (M: 100 bç DNA markır; 1-17: örnek numaraları; 4: *A. parastictus*; 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17: *A. flavus*)

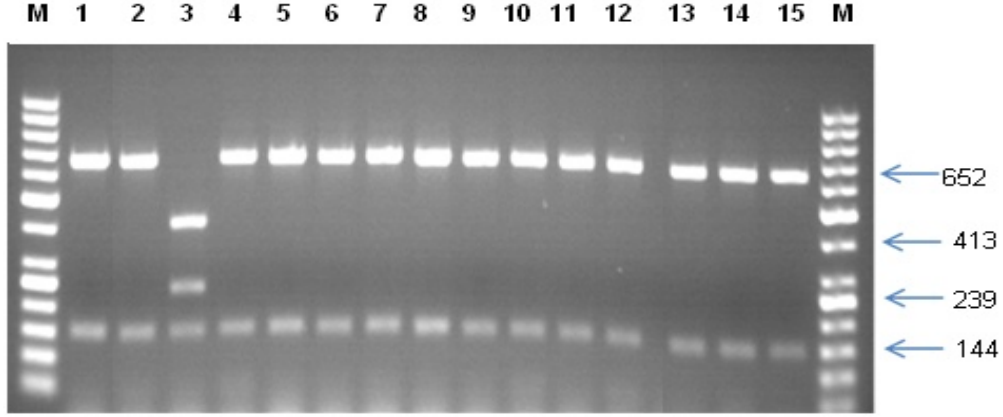


Şekil 4.9 *aflR* bölgesinin PZR sonrası *HincII* enzimi ile kesimi sonucu elde edilen bant profili (M: 50 bç DNA markır; 1-13: örnek numaraları; 4: *A. parastictus*; 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13: *A. flavus*)

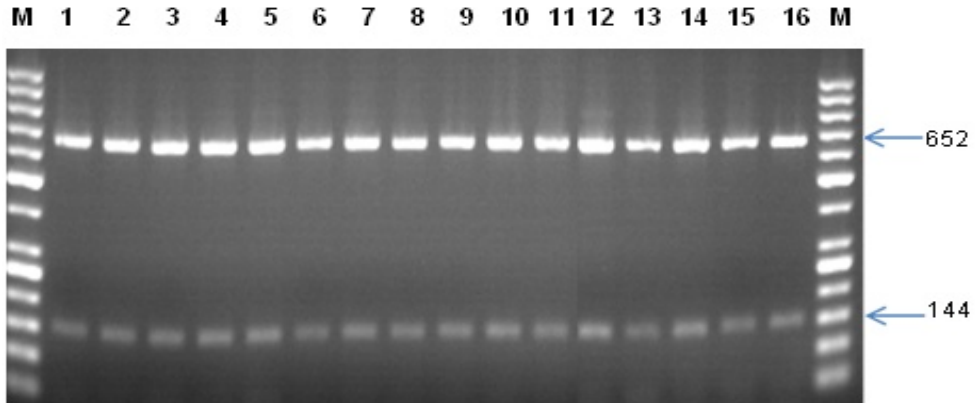


Şekil 4.10 *aflR* bölgesinin PZR sonrası *HincII* enzimi ile kesimi sonucu elde edilen bant profili (M: 50 bç DNA markır; 1-16: örnek numaraları; 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16: *A. flavus*)

aflR gen bölgesinin PZR sonrası oluşan 796 bç büyüklüğündeki bandın *PvuII* enzimi ile kesimi sonucunda *A. flavus*' da 144 bç ve 652 bç olmak üzere iki bnt meydana gelmiştir. *A. parasticus*' da ise 144 bç, 239 bç ve 423 bç büyüklüğünde üç bant oluşmuştur (Şekil 4.11; Şekil 4.12).



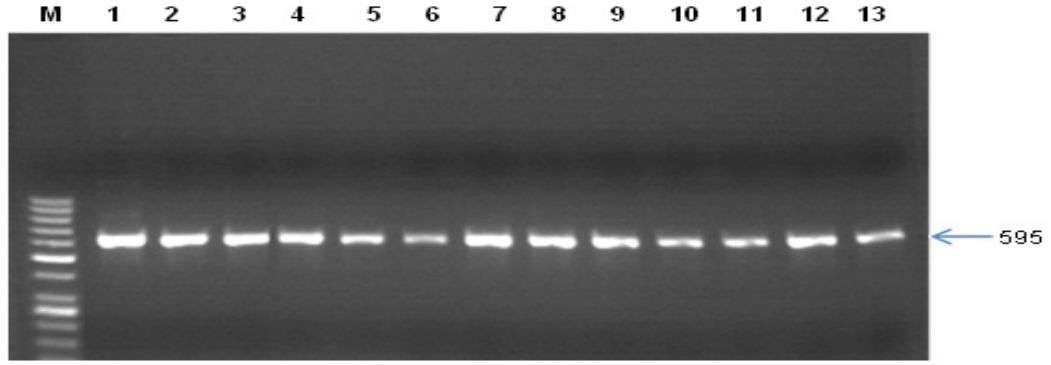
Şekil 4.11 *aflR* bölgesinin PZR sonrası *PvuII* enzimi ile kesimi sonucu elde edilen bant profili (M: 50 bç DNA markır; 1-15: örnek numaraları; 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15: *A. flavus*; 3: *A. parasticus*)



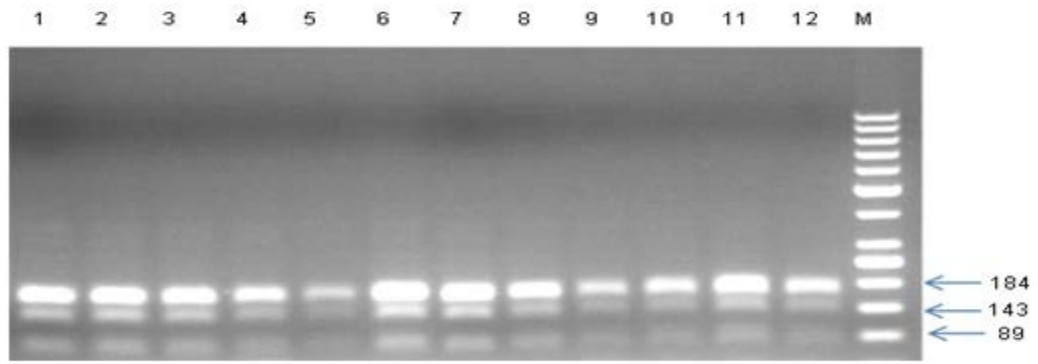
Şekil 4.12 *aflR* bölgesinin PZR sonrası *PvuII* enzimi ile kesimi sonucu elde edilen bant profili (M: 50 bç DNA markır; 1-16: örnek numaraları; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16: *A. flavus*)

aflR gen bölgesinin *PvuII* ve *HincII* kesim enzimleri ile kesimi sonucunda elde edilen bant profiline göre de *Aspergillus* spp. olarak belirlenen izolatların 34 tanesi *A. flavus* olarak belirlenirken 1 tanesi de *A. parasticus* olarak tespit edilmiştir.

Aspergillus türlerinin ITS bölgesinin çoğaltılması sonucu 595 bç büyüklüğünde bir bant elde edilmiştir (Şekil 4.13). Bu bandın *HhaI* ile kesimi sonucu *A. flavus*' da 89,143 ve 184 bç olmak üzere üç bant elde edilmiştir (Şekil 4.14).



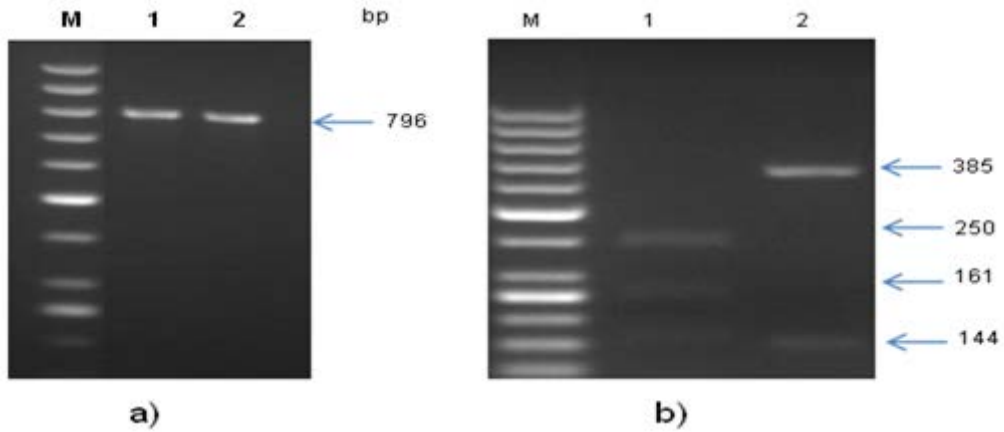
Şekil 4.13 ITS bölgesinin PZR sonrası elde edilen bant profili (M: 50 bç DNA markır; 2-13: örnek numaraları; *A. flavus*; 1:*A. parasticticus*)



Şekil 4.14 ITS bölgesinin PZR ürünlerinin *HhaI* ile kesimi sonucunda elde edilen bant profili (M: 50 bç DNA markır; 2-12: örnek numaraları; *A. flavus*; 1:*A. parasticticus*)

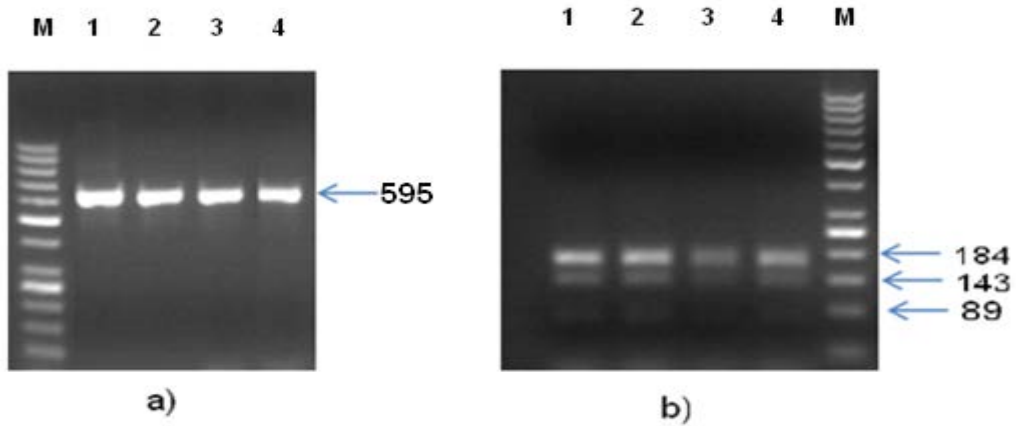
ITS gen bölgesine dayalı olarak yapılan tür tanılama işleminde PZR ürünlerinin *HhaI* kesimi sonucu beklenen *A. flavus* bant profili elde edilmiştir. Ancak *A. parasticticus*'un ITS bölgesi *HhaI* kesim profili bilinmediği için ITS gen bölgesine dayalı tanılama işlemi tam olarak sağlanamamıştır. Ayrıca *aflR* gen bölgesine dayalı yapılan tanılama işleminde *A. parasticticus* olarak belirlenen izolat ITS bölgesinin *HhaI* enzimi kesimi sonucu *A.flavus* bant profilini vermiştir.

TÜBİTAK MAM'dan temin edilen *A. flavus* izolatı (MAM/MRC327)'nin *aflR*, ITS1-5.8S rDNA-ITS2 bölgelerinde PZR amplikasyonu sağlanmıştır. *aflR* bölgesinin PZR sonrası oluşan 796 bç bölge *HincII* enzimi ile *A. flavus*' da iki bölgeyi keserek 161, 250 ve 385 bç büyüklüğünde üç bant oluştururken *PvuII* enzimi ile *A. flavus*' da tek bölgeyi keserek 144 ve 652 bç iki bant oluşturmuştur (Şekil4.15).



Şekil 4.15 *Aspergillus flavus*'un (MAM/MRC327) *aflR* bölgesinin PZR analizi a) Kesim öncesi M:100 bç DNA markır; 1, 2, *A. flavus* izolatı b) Kesim sonrası M: 50 bç DNA markır; 1: *A. flavus*' un *aflR* bölgesinin PZR ile çoğaltılan ürünlerinin *HincII* ile kesimi; 2: *A. flavus*' un *aflR* bölgesinin PZR ile çoğaltılan ürünlerinin *PvuII* ile kesimi

Kontrol olarak kullanılan *A. flavus*' un (MAM/MRC327) ITS bölgesinin çoğaltılması sonucu 595 bç bir bant elde edilmiştir. Bu bantın *HhaI* ile kesimi sonucu 89,143 ve 184 bç olmak üzere üç bant elde edilmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 *Aspergillus flavus*'un (MAM/MRC327) ITS bölgesinin PZR analizi a) Kesim öncesi M: 50 bç DNA markır; 1, 2, 3, 4 *A. flavus* izolatı b) Kesim sonrası M: 50 bç DNA markır; 1: *A. flavus*' un ITS bölgesinin PZR ile çoğaltılan ürünlerinin *HhaI* ile kesimi

Çalışmada kullanılan *Aspergillus* izolatlarının *aflR* ve ITS bölgelerinin çoğaltılması ve bu bölgelerin kesimi ile elde edilen bant profili ve büyüklükleri kontrol olarak kullanılan *A. flavus* izolatı ile aynı olduğu belirlenmiştir.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Türkiye’de Antep fıstığı yetiştiriciliği profesyonel olarak 1948 yılında Ceylanpınar Devlet çiftliğinde başlatılmıştır. Bugün bu kurum Antep fıstığı araştırmalarında önemli bir yere sahiptir [24]. Ülkemiz, ortalama 112.000 ton/yıl üretim ile dünyanın üçüncü büyük Antep fıstığı üreticisi konumundadır [19]. Ekonomik değere sahip Antep fıstığı üstün kalite özellikleri ile ulusal ve uluslar arası pazarlarda tercih edilmektedir. Antep fıstığının ihracatında son yıllarda önemli sıkıntılar yaşanmaktadır. Bunun en büyük nedeni ise aflatoksinden kaynaklanmaktadır. Bu amaçla fıstık ve yanı sıra, incir, üzüm vb. ekonomik değeri yüksek olan ürünlerde de mikotoksinin önlenmesine yönelik çalışmalar büyük önem kazanmıştır [64]. Aflatoksinler, özellikle *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* gibi *Aspergillus* türleri tarafından üretilen toksik ve karsinojenik maddelerdir. Yüksek dozları karaciğer kanseri yapmaktadır [64]. Bu türlerin ürettiği karsinojenik maddelerin insan, hayvan ve bitki sağlığı açısından önemi büyüktür. Ayrıca, zirai ürünlerde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle bu türlerin tespiti ve tanımlaması büyük önem taşımaktadır.

Dünyada, aflotoksinlerin insan sağlığına etkileri ile ilgili yapılan çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. Uganda ve Tayland’da ortaya çıkan akut aflotoksikozis sonucunda insanlarda kusma, karın ağrısı, akciğer ödemi, karaciğerde nekroz ve yağlanma gibi semptomlar görülmüştür. Hindistanın 200 köyünde 6-16 mg/l aflatoksin içeren mısırların tüketilmesi ile özellikle gastrointestinal kanamaya bağlı %25’in üzerinde ölüm vakası görülmüştür [54, 55, 62]. Akut aflotoksikozisin semptomları; karaciğer, böbrek ve kalpde gelişen yağlanma ve beyin ödemiyle ilişkili olan kusma, çarpınma, koma ve ölüm olup Reye’s Sendromundan ayırt edilememektedir. Tayland [53] ve Amerika Birleşik Devletleri’nde [43] Reye’s Sendromundan kaynaklandığı öne sürülen 23 ölüm vakasının 22’sinde karaciğer, böbrek, beyin, safra ve gastrointestinal sistemde AFB1 tespit edilmiştir [60].

Aflatoksinlere genellikle dünyanın ılıman iklim bölgelerinde sık rastlanmakta olup, belirli bir coğrafik bölge ve ürüne özgü değildir. Sert kabuklu meyveler, yağlı tohumlar, hububat, bazı kuru meyveler aflatoksin oluşumu açısından risk taşıyan ürünlerdir. Günümüzde dünya tarımsal üretiminin yaklaşık %30'unun mikotoksinlerden dolayı kayba uğradığı bildirilmektedir. Tarımsal ürünlerde hastalık gelişmesi ve aflatoksin oluşması hasat öncesi tarlada, hasat sırasında, yetersiz kuruma ve uygun olmayan depolama ve ambalaj koşullarında olabilmektedir. Aflatoksin oluşmasında en önemli faktörler; çevre bağıl nemi, ürün su aktivitesi, sıcaklık ve süredir [8]. Whitaker (2006) çalışmasında numune alma, numune hazırlama ve analiz işlemleri içinde en çok değişkenliğin örnekleme aşamasında meydana geldiğini belirtmiştir. Bunun sebeplerinin ise tanelerin küçük bir kısmının mikotoksinle kontamine olması ve tek bir tanenin kontaminasyon derecesinin çok fazla olmasından dolayı olduğunu belirtmiştir [64].

Çeşitli ülkeler gıda maddelerinde bulunabilecek maksimum aflatoksin düzeylerini resmi olarak belirlemiş ve bu oranın üzerinde aflatoksin içeren gıdaların ithalat ve pazarlanmasına izin verilmemektedir. Gıda standartlarının en üst düzeyde olduğu Avrupa Birliği ülkeleri için bu oran Antep fıstığı için 4 µg/kg'dir. Üstelik AB Antep fıstığının da aralarında bulunduğu Türkiye orijinli ürünler için özel düzenleme ile Antep fıstığının ihracatına sıkı kontroller getirmiştir. Bu uygulamadaki gerekçe, bu ürünlerin AB limitleri üzerinde aflatoksin içerdiği, bu durumun süreklilik gösterdiği ve Avrupalı tüketicinin sağlığını tehdit ettiği.

Aflatoksinlerin, zirai ürünlerde oluşturduğu ekonomik kayıplar ve canlılarda sebep olduğu sağlık problemleri düşünüldüğünde bu türlerin tespiti önemlidir. Bu tez çalışması kapsamında aflatoksin üreten türlerin: *A. flavus* ve *A. parasticus*'un Antep fıstığında tespiti ve tanımlanması için, Gaziantep, Kahramanmaraş, Adıyaman, Şanlıurfa, Kilis, Batman ve Mardin illerine arazi çalışmaları yapılarak hastalıklı meyve örnekleri toplanmıştır. Ayrıca Gaziantep'te bulunan üç Antep fıstığı deposundan da fıstık örnekleri alınmıştır. Woloshuk ve Prieto (1997), Sweeney ve Dobson (1999) ve bu tez kapsamında yapılan arazi çıkışları Mayıs-Aralık aylarında toplanan örneklerin morfolojik tanımlanması sonucunda, Antep fıstığının çiçeklenme döneminden hasat öncesi döneme kadar *Aspergillus* popülasyonunun düşük olduğu, hasat döneminde ve depolarda ise *Aspergillus* popülasyonunun arttığı tespit

edilmiştir (Tablo 4.1) [65, 60]. *Aspergillus*'a genel olarak % 16.6 oranında yaygınlık göstermektedir. Böylelikle; izolasyonu yapılan bitkilerde *Aspergillus* spp. patojen olarak önem taşımaktadır. Bu çalışma sonucunda; Antep fıstığı bitkisinde *A. flavus* ve *A. parasticus*'un yüksek derecede hastalık yapma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.2).

Gaziantep, Kahramanmaraş, Adıyaman, Şanlıurfa, Kilis, Batman ve Mardin illerinden elde edilen meyve örneklerinden 56 *Aspergillus* izolatu elde edilmiştir. Bunlardan sadece 35 tanesi Flavi grubunda yer almaktadır. Flavi grubunda yer alan izolatların 21'nin (%60) tanımlaması yapılmış geriye kalan % 40' lık (14 izolat) kısmın morfolojik tanılmasında *A. flavus* ile *A. parasticus* arasında tam bir ayırım sağlanamamıştır. Teşhisi yapılan örneklerin 20'si *A. flavus*, 1'i *A. parasticus* olarak tespit edilmiştir. Flavi grubundaki *A. flavus* ile *A. parasticus* 'un fiziksel ve genomik yapıları birbiri ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Bu kadar birbirine benzeyen türlerin ayırımının morfolojik olarak tespitinin çok zor olmasının yanında, morfolojik tanılama prosedürlerinin maliyetinin yüksek olması ve uzun zaman alması gibi dezavantajlarından dolayı pratik moleküler tanımlama metotları günümüzde önem kazanmaktadır.

Farber vd. (1997), Somashekar vd. (2004), Manonmani vd. (2005), Degola vd. (2006), Shapira vd. (1996), Mirhendi vd. (2007) ve bu çalışma sonucunda morfolojik tanımlama yöntemlerinin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için birçok moleküler tanımlama yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmamız kapsamında ITS gen bölgesi ve *afIR* gen bölgesi kullanılarak PZR-RFLP yöntemi ile pratik ve güvenilir sonuçlar elde edilmiştir [13, 20, 40, 42, 56, 57].

Shapira vd. (1996) mısır ve yer fıstığından *F. moniliforme*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *P. islandicum*, *P. digitatum*, *P. italicum*, *P. expansum*, *S. oryzae*, *T. castaneum*, *O. Surinamensis* türlerini izole etmiştir. Daha sonra bu türleri *omt*, *ver* ve *apa* gen bölgelerine göre birbiri ile kıyaslayarak ayırım yapmışlardır. Çalışmadan elde edilen verilere göre; *A. flavus* ve *A. parasticus*'un *omt*, *ver* ve *apa* primerleri ile yapılan amplifikasyon sonucu oluşan bant profilleri karşılaştırarak, *A. flavus* ve *A. parasticus* türlerini birbirinden ayırmışlardır. Özgün vd. (2012), PZR-RFLP yöntemi ile *A. flavus* ve *A. parasticus*'u birbirinden ayırmak için *omt*, *apa*, ve *ver* primerlerini

kullanmışlardır. *apa*, *ver*, *omt* gen bölgeleri baz alınarak yapılan tanımlamada izolatların çoğunlukla *A. parasticus* olduğu tespit edilmiştir. Ancak çalışmada kullanılan izolatlar *A. flavus*'dır. Çalışmalarında *A. flavus* için beklenen bant profillerini elde edememişlerdir. Çalışma sonuçları Shapira vd. (1996)'nin sonuçları ile paralellik göstermemiştir [47, 56].

Somashekar vd. (2003) çalışmalarında izole ettikleri *A. flavus* ve *A. parasticus* kullanmışlardır. *afIR* gen bölgesi kullanılarak her iki tür için özgül dizilerin amplifikasyonunu sağlamış ve PZR ürünlerini *HincII* ve *PvuII* enzimleri ile kesmişlerdir. Kesim sonucu oluşan bant farklılıkları ile *A. parasticus* ve *A. flavus* türlerinin ayrımını sağlamışlardır. Çalışmamız kapsamında kullanılan izolatların *afIR* gen bölgesinin çoğaltılması ve *PvuII* ve *HincII* kesim enzimleri ile kesimi sonucunda elde edilen verilere göre de *Aspergillus* spp. olarak belirlenen izolatların 34'ü *A. flavus* olarak belirlenirken 1'i *A. parasticus* olarak tespit edilmiştir. İki türün DNA tabanlı tanımlamasında *afIR* gen bölgesi pratik ve güvenilir sonuçlar vermektedir. Bu çalışma sonuçları ile Somashekar vd. (2003)'nin sonuçları paralellik göstermektedir [57].

Mirhendi vd. (2007) PZR-RFLP tabanlı moleküler tanımlama çalışmalarında, *A. niger*, *A. flavus* ve *A. fumigatus*'u izolatlarını kullanmıştır. Bu türleri birbirinden ayırmak için ITS bölgesinin PZR analizlerini yapmışlardır. PZR ürünlerini kesmek için *HhaI* enzimini kullanmış ve *A. niger*, *A. flavus* ve *A. fumigatus* türlerini birbiri ile kıyaslayarak tanımlama yapmışlardır. Bu araştırmada, ITS bölgesine dayalı olarak yapılan tanımlama işleminde PZR ürünlerinin *HhaI* enzimi ile kesimi sonucu beklenen *A. flavus* bant profili elde edilmiştir. Ancak *A. parasticus*'un ITS bölgesi *HhaI* kesim profili bilinmediği için ITS gen bölgesine dayalı tanımlama işlemi tam olarak sağlanamamıştır. Ayrıca *afIR* gen bölgesine dayalı yapılan tanımlama işleminde *A. parasticus* olarak belirlenen izolat ITS bölgesinin *HhaI* enzimi kesimi sonucu *A. flavus* bant profilini vermiştir. Dolayısı ile ITS gen bölgesinin bu iki türü ayırmada farklılık göstermediği düşünülmektedir. Çalışma verilerimiz değerlendirildiğinde *A. flavus* ile *A. parasticus*'un birbirinden ayırımında *afIR* gen bölgesinin ITS gen bölgesinden daha güvenilir sonuçlar verdiği düşünülmektedir [40].

Ayrıca bu tez kapsamında TÜBİTAK MAM'dan temin edilen *A. flavus* izolatı (MAM/MRC327) kontrol olarak kullanılmıştır. Bu izolatın morfolojik tanımlama

için kullanılan seçici ortamlardaki makroskobik ve mikroskobik görüntüleri kayıt edilerek (Şekil 4.7) çalışmada kullanılan diğer izolatların gelişimleri arasında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Moleküler tanımlama için de kullanılan ITS ve *aflR* bölgelerinin PZR amplikasyonu sağlanmıştır. Kontrol olarak kullanılan *A. flavus* (MAM/MRC327) izolatının *aflR* bölgesinin PZR ürününün *HincII* ve *PvuII* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bant profili ile ITS bölgesinin çoğaltılması sonucu oluşan ürünlerin *HhaI* ile kesimi ile oluşan bant profili çalışmada kullanılan diğer izolatlar ile benzerlik göstermiştir (Şekil 4.15; Şekil 4.16). Dolayısı ile çalışmada kullanılan *Aspergillus* izolatlarının *aflR* ve ITS bölgelerinin çoğaltılması ve bu bölgelerin kesimi ile elde edilen bant profili ve büyüklükleri kontrol olarak kullanılan *A. flavus* izolatı ile aynı olduğu belirlenmiştir.

Pitt ve Hocking (1997) AFPA ortamına inoküle edilen izolatlardan turuncu renk meydana getirenlerin aflatoxin üreten türler olduğunu rapor etmişlerdir [48]. Tarafımızca yapılan bu çalışmada kullanılan *Aspergillus* türlerinin aflatoxin üretilmediğinin tespiti için kullanılan AFPA ortamında, *A. flavus* ve *A. parastictus* tanısı konmuş olan türlerin ortamda turuncu renk meydana getirdiği, *Penicillium* spp. ve *A. niger*'de ise renk oluşmadığı tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm *Aspergillus* izolatları AFPA ortama açık ya da koyu turuncu rengi vermiştir. Dolayısıyla çalışmada kullanılan *Aspergillus* izolatlarının aflatoxin üreten türler olabileceği belirlenmiştir (Şekil 4.6).

Criseo vd. (2008) *A. flavus* grubunda bulunan türlerden aflatoxin üreten ve aflatoxin üretmeyen türlerin tespiti için çalışmalarında kültürel ortamlar kullanmıştır. Çalışmada 11 *A. flavus* ve 1 *A. parastictus* izolatı kullanmışlardır. Çalışılan 12 *Aspergillus* izolatından sadece üçünün aflatoxin ürettiğini saptamışlardır [10]. Bu çalışmada kullanılan izolatların HPLC yöntemi ile ürettikleri aflatoxin miktarıda tespit edilmiştir (Konukoğlu, vd., yayınlanmamış veri). Elde edilen verilere göre, çalışmada kullanılan izolatların yüksek oranda aflatoxin ürettiği belirlenmiştir. Dolayısı ile AFPA ortamının güvenilir sonuçlar verdiği desteklenmiştir.

Antep fıstığının hasat öncesi döneminde *Aspergillus* spp. ile bulaşması, bulaşma zinciri ve mekanizması bölgemizde daha önce başka araştırmacılarca çalışılmamıştır. Bu tez çalışması kapsamında aflatoxin üreten türlerin; *A. flavus* ve *A. parastictus*'un

PZR-RFLP yöntemi ile tanımlanması ülkemizde yapılan morfolojik tanımlama çalışmalarına önemli katkılar sağlayacağı aşikârdır. Bu çalışma Güneydoğu Anadolu Bölgesi için ilk ve orijinal bir çalışmadır. Bu araştırma sonuçlarının bundan sonraki çalışmalara ve araştırmacılara ışık tutacağı düşünülmektedir.

BÖLÜM 6

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, ülkemizde önemli bir ürün bitkisi ve ihracat kaynağı olan Antep fıstığında aflatoksin oluşturan *A. flavus* ve *A. parasticus* türleri izole edilmiştir. Yüksek düzeyde benzerlik gösteren bu iki türün tanımlanması amacı ile araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda;

- Nisan-Aralık aylarında toplanan örneklerin morfolojik tanılması sonucunda, Antep fıstığının çiçeklenme döneminden hasat öncesi döneme kadar *Aspergillus* popülasyonunun düşük olduğu, hasat döneminde ve depolarda ise *Aspergillus* popülasyonunun arttığı tespit edilmiştir
- İzolasyon ve teşhis işlemlerinden sonra *Aspergillus* genel olarak %16.6 oranında belirlenmiştir. Bu durum izolasyonu yapılan bitkilerde *Aspergillus* spp.'nin yaygın olduğunun göstergesi olarak kabul edilmiştir. *Aspergillus* spp. yoğun olarak %46.8 oranı ile Şanlıurfa ilinde tespit edilirken onu sırasıyla, Batman, Mardin, Kilis, Gaziantep, Kahramanmaraş ve Adıyaman illeri takip etmiştir.
- Hastalık belirtileri veren fıstık örneklerinden 56 *Aspergillus* izolatu elde edilmiştir. Bunlardan 35'nin Flavi grubunda olduğu saptanmıştır. Flavi grubunda bulunan izolatların 21'nin (%60) tanımlaması yapılmış geriye kalan 14'ünün (%40') morfolojik tanılmasında *A. flavus* ile *A. parasticus* arasında tam bir ayırım sağlanamamıştır. Teşhisi yapılan örneklerin 20'si *A. flavus*, 1'i *A. parasticus* olarak tespit edilmiştir.
- İzole edilen *Aspergillus* türlerinin aflatoksin üretilip üretilmediğinin tespiti için kullanılan AFPA ortamında *A. flavus* ve *A. parasticus* tanısı konmuş olan türlerin ortamda turuncu renk meydana getirdiği, *Penicillium* spp. ve *A. niger*'de ise renk oluşmadığı tespit edilmiştir.

- *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin ayrımı amacı ile kullanılan farklı markır sistemleri bulunmaktadır. Bu tez kapsamında *aflR* ve ITS gen bölgeleri kullanılmıştır. *aflR* gen bölgesinin *PvuII* ve *HincII* kesim enzimleri ile kesimi sonucunda elde edilen bant profiline göre de *Aspergillus* olarak belirlenen izolatların 34 tanesi *A. flavus* olarak belirlenirken 1 tanesi de *A. parasticus* olarak tespit edilmiştir. ITS gen bölgesine göre ise PZR ürünlerinin *Hhal* kesimi sonucu beklenen *A. flavus* bant profili elde edilmiştir. Ancak *A. parasticus*'un ITS bölgesi *Hhal* kesim profili bilinmediği için ITS gen bölgesine dayalı tanılama işlemi tam olarak sağlanamamıştır.
- Çalışma verilerimiz değerlendirildiğinde *A. flavus* ile *A. parasticus*'un birbirinden ayırımında *aflR* gen bölgesinin ITS gen bölgesinden daha güvenilir sonuçlar verdiği düşünülmektedir.

Elde edilen tüm bilgiler ve sonuçlar doğrultusunda;

- Antep fıstığında hasat döneminde *Aspergillus* popülasyonunun artması dolayısı ile bu dönemde toplanan meyvelerden hastalık belirtisi verenlerin uzaklaştırılması ile olası bir kontaminasyonun önüne geçebilir.
- Bahçe döneminde meydana gelen *Aspergillus* kontaminasyonlarının depo koşullarında ciddi bir şekilde artış göstermesi bölgemiz şartlarında ekonomik değeri fazla olan Antep fıstığının depo koşullarının iyileştirilmesi gerekliliğini tekrar ortaya çıkarmıştır.
- Günümüzde aflatoksin üreten *Aspergillus* türleri ile mücadele gelecek vaat eden yöntemlerden biri de aflatoksin üretmeyen *Aspergillus* türlerinin biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmasıdır. Yöntemin ucuz ve pratik olması nedeniyle özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki aflatoksin sorununu çözmek için uygun bir yöntem olabilir.
- Mikotoksinlerin ve özellikle de aflatoksinlerin ucuz, hızlı ve güvenilir bir şekilde, tarla, işleme, depolama ve transport koşullarında test edilebilmesini sağlayan kitlerin geliştirilmesi önem taşımaktadır.
- Dayanıklı hat ve çeşitlerin geliştirilmesi çalışmalarına ağırlık verilmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] Akbas, M .Y., Ozdemir, M. (2006). Effect of different ozone treatments on aflatoxin degradation and physicochemical properties of pistachios. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **86**, 2099-2104
- [2] Aksoy, A., Atsan, T., Yavuz, F. (2002). Türkiye atep fıstığı sektörünün ekonometrik analizi. *Türkiye V. Tarım Ekonomisi Kongresi*.
- [3] Amike, S., Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Reviews Phytopathology*. **49**, 107-133
- [4] Arpacı, S., Atli, H. S. (1999). TC Başbakanlık Dpt VII. Beş Yıllık Kalkınma Planı Özeli. Kom. Antep fıstığı Raporu-Ankara
- [5] Banwart, G. J. (1989). Basic food microbiology. Second Edition. Published By Van Nostiond Reinhold. New York-Tokyo. 399-320.
- [6] Bennett, J. W., Papa, K. E., (1988). The aflatoxigenic *Aspergillus* spp. *Advances in Plant Phytopatholog*. **6**, 263-280
- [7] Bilgen, A. (1973). Antep Fıstığı Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Basın Yayın ve Halkla İlişkiler Dairesi Başk.Yayınları. ANKARA.
- [8] Boutrif, E., (1997). Prevention of aflatoxin in pistachios. Pistachio '97 Conference. 27-28 October. Rome, Italy.
- [9] Can, C., Elekçioğlu, H., Yücel, S., Özaslan, M. (2003). Seralarda domates *Fusarium* solgunluğuna neden olan türlerin tanısı, hastalık oluşumunda nematodlar ile ilişkileri ve mücadele olanaklarının belirlenmesi. *TÜBİTAK-TOGTAG Proje No: TARP-237. Proje Kesin Raporu*.
- [10] Criseo, G., Racco, C., Romeo, O. (2008). High genetic variability in non-aflatoxigenic *A. flavus* strains by using Quadruplex PCR based assay. *International Journal of Food Microbiology*, **125**, 341–343.

- [11] Çolak, H, Bingol EB, Hampikyan H, Nazlı B. (2006). Determination of aflatoxin contamination in red-scaled, red and black pepper by ELISA and HPLC. *Journal of Food and Drug Analysis*. **14 (3)**, 292–6.
- [12] Çoksöyler, N., (1999). Farklı yöntemlerle kurutulan kırmızı biberlerde *Aspergillus flavus* gelişimi ve aflatoksin oluşumunun incelenmesi. *Gıda Dergisi* **24 (5)**, 297–306
- [13] Degola, F., Berni, E., Dal’asta, C., Spotti, E., Marchelli, R., Ferrero, I., Restivo, F.M. (2006). A Multiplex Rt-PCR approach to detect aflatoxinenic strains of *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology* **P**, 1365-2672
- [14] Demirel, M., Yıldırım, A. (2000). Van yöresinde yetiştirici şartlarında depolanan kaba yemlerde aflatoksin oluşumunun saptanması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi*. **10**, 77-83,
- [15] Denizel, T., Rolfe, E. J., Jarvis, B. (1976b). Moisture-equilibrium relative humidity relationships in pistachio nuts with particular regard to control of aflatoxin formation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **27**, 1027-1034.
- [16] Dolar, F. S. (2006). Nohutlarda solgunluğa neden olan *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*’ in Türkiye’deki mevcut patotiplerinin Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) yöntemi ile saptanması. *Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Proje No: 20030711072, Proje Kesin Raporu*
- [17] Commission Regulation (EC) No 2006/1881 Of 23.07.2008 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- [18] Erhlich, K. C., Yu, J., Cotty, P. J. (2005). aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology*, **99**, 518-527.
- [19] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2011). FAOSTAT
- [20] Farber, P., Giesen R., Holzapfel, W. H. (1997). detection of aflatoxigenic fungi in figs by aPCR reaction. *International Journal of Food Microbiology*. **36**, 215-220.
- [21] Freeman, S., Minz, D., Maymon, M. and Zveibil, A. (1992). Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. *Phytopathology*, **91**, 586-592.

- [22] Gardes, M. and Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**, 113-118
- [23] Gazor, H. R., and S. Minaei. (2005b). Influence of temperature and air velocity on drying time and quality parameters of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Drying Technology*. **23**, 2463–2475
- [24] Gezginç, Y., Duman, A.D. (2004). Antep fıstığı işleme tekniği ve muhafazasının kalite üzerine etkisi. *Gıda Dergisi* **29** (5), 373- 378.
- [25] Goltapeh, E.M., Aggarwal, R., Pakdaman, B., Renu S. (2007). Molecular characterization of *Aspergillus* species using Amplicon Length Polymorphism (ALP) and universal rice primers. *Journal of Agricultural Technology*. **3**(1), 29-37.
- [26] Heperkan, D., Aran, N., Ayfer, M. (1994). Mycoflora and aflatoxin contamination in shelled pistachio nuts. *Journal of Agricultural Technology*. **66**, 273–278.
- [27] <http://antepfistigi.blogspot.com> 08.12.2011
- [28] <http://faostat.fao.org>. 10.12.2012
- [29] <http://atsu.edu.org> 15.12.2012
- [30] <http://wikipedia.org> 30.11.2012
- [31] Jay, J. M. (1992). *Modern Food Microbiology*. Chapman and Hall. London. 675p.
- [32] Johnson, A. H., Peterson, M. S. (1974).The avi publishing company westport-connecticut. *Encyclopedia of Food Technology*. Vol. 2. **P**, 12-15.
- [33] Kantarcioğlu A. S, Yücel A. (2003). *Aspergillus* cinsı mantarlar ve invaziv aspergilloz: mikoloji, patogenez, laboratuvar tanımı, antifungallere direnç ve duyarlılık deneyleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. **34**, 140–157.
- [34] Klich M. A. (2002). *Aspergillus fumigatus*. In: Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, *The Netherlands*. **P**, 50–51

- [35] Klich, M. A., Pitt, J. I. (1988). A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Division of Food Processing.
- [36] Kumeda, Y., Asao, T. (1996). Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-Amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section Flavi. *Applied and Environmental Microbiology* **2**, 2947–2952.
- [37] Lee, C., Liou, G., Yuan, G. (2006). Comparison of the *aflR* gene sequences of strains in *Aspergillus* section Flavi. *Microbiology* **152**, 161–170.
- [38] Maciejowska, Z. (1962). Studies in soil microflora and biological control of damping off of apple. Ph. D. Thesis. Purdue University.
- [39] Mclean, M., Dutton, M.F. (1995). Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: An Update. *Pharmacology & Therapeutics*. Vol.65, P,163-192.
- [40] Mirhendi, H., Diba K., Kordbacheh P., Jalalizand N., Makimura K. (2007). Identification of pathogenic *Aspergillus* species by a PCR restriction enzyme method. *Journal Of Medical Microbiology*.**38**, 1568-1570.
- [41] Mojtahedi, H., Rabie, C. J., Lubben, A., Steyn, M., Danesh, D. (1979). Toxic *Aspergilli* from pistachio nuts. *Mycopathologia*. **67**, 123-127
- [42] Momonmani, H. K., Anand, S., Chandrashekar, A., Rati, E. R. (2005). Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. *Process Biochemistry*. **40**, 2859-2864.
- [43] Nelson, D. B., Kimbrough, R., Landrigan, P. S., Hayes, A. W., Yang, G. C., and Benanides, J. (1980). Aflatoxin and Reye's syndrome: a case control study. *Pediatrics*. **66**, 865-869.
- [44] Omaye, S. T. (2004). Food and nutritional toxicology. CRC Press.
- [45] Özaslan, M., Caliskan, I., Kilic, I.H., Karagoz, I.D. (2011) Application of the ELISA and HPLC test for detection aflatoxin in Pistachio. *Scientific Research and Essays*. **6(14)**, 2914-2917
- [46] Özbek, S. (1978). Özel meyvecilik. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. Adana Pediatrics. **66**, 865–869.

- [47] Özgün, E., Can, C., Sarpkaya, K., Konukoğlu, F., Kafadar, F. N. (2012). Güneydoğu Anadolu Bölgesi Antep fıstığı (*Pistacia vera* L.) yetiştiriliciliği yapılan alanlarda sorun olan *Aspergillus* spp'nin moleküler tanı yöntemleri ile belirlenmesi. *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*. 03-07 Eylül, İzmir.
- [48] Pitt, J. I., Hocking, A. D. (1997). Fungi and food spoilage. Great Britain At University Press, Cambridge, **P**, 593
- [49] Raper, K. B., Fennell, D. İ. (1973). The genus *Aspergillus*. Krieger, Huntington. New York: Robert E. Krieger Publishing Company **P**, 686.
- [50] International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (1996). Microorganisms in foods 5: characteristics of microbial pathogens. *Blackie Academic & Professional*. London.
- [51] Roberts, T. A., Baird-Parker, R. B., Tompkin, A. C. (1996). Toxigenic fungi in microorganisms in foods. characteristics of microbial pathogens, *Blackie Academic & Professional*. London, UK. **P**, 347-381
- [52] Set, E., Erkmen, O. (2010). The aflatoxin contamination of ground red pepper and pistachio nuts sold in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*. **48**, 2532–2537
- [53] Shank, R. C. (1971). Aflatoxins in autopsy of specimens from thai children with an acute disease of unknown etiology. *Food and Cosmetics Toxicology*. **9**, 501–507.
- [54] Shank, R. C. (1977). Epidemiology of aflatoxin carcino genesis, in environmental cancer (Kraybill, H.F. and Mehlman, M.A., Eds.). John Wiley & Sons, New York, **P**, 291–318.
- [55] Shank, R. C. (1981). Mycotoxins and N-Nitroso compounds: environmental risks I (Shank, R. C. ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, U.S.A. **P**, 107-140
- [56] Shapira, R., Paster, N., Eyal, O., Menasherov, M., Mett, A., Salomon, R. (1996). Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 3270– 3273.
- [57] Somashekar, D., Rati, E., Chandrashekar, A. (2003). PCR-restriction fragment length analysis of aflR gene for differentiation and detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize. *Internal Journal of Food Microbiology* **93**, 101-107.

- [58] Sommer, N. F., Buchanan, J. R., Foniage, R. J. (1986). Relation of early splitting and talcfring of pistachio nuts to aflatoxin in the orchard. *Phytopathology* **76**, 692-694.
- [59] Stark, A. A. (2001). Mechanisms of action of aflatoxin B1 at the biochemical and molecular levels. (Edited by Charles L. Wilson and Samir Droby.), *Microbial Food Contamination*. CRC Press. **P**, 81-94.
- [60] Sweeney, M., Dobson, A. D. W. (1999). Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*. **175**, 149-163.
- [61] Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ (Tebliğ No: 2008/26) Resmi Gazete Tarihi: 16 Şubat 2009 Sayı: 27143.
- [62] Van Rensburg, S. J. (1977). Role of epidemiology in the elucidation of mycotoxin health risk. İn 'Mycotoxins in Human and Animal Health', eds. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., and M. A., Mehlma. Park Forest South. Illinois: *Pathotox Publishers*. **P**, 699–711.
- [63] Varga, J., Frisvad, J. C., Samson, R. A. (2011). Two new aflalatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section Flavi studies. *Studies in Mycology* **69**, 57-80
- [64] Whitaker, T. B. (2006). Sampling foods for mycotoxins. *Food. Addit Contam.* **23**, 50-61
- [65] Woloshuk, C. P., Prieto, R. (1997). Genetic organization and function of the aflatoxin B1 biosynthetic genes. *FEMS Microbiology Letters*. **160**, 169-176.
- [66] Yazdanpanah, H., Mohammadi, T., Abouhossain, G., Cheraghali, A. M. (2005). Effect of roasting on degradation of aflatoxins in contaminated *Pistachio* nuts. *Food and Chemical Toxicology*. **43**, 1135-1139.
- [67] Yu, J., Whitelaw, C., Nierman, W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. (2004). *Aspergillus flavus* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops. *FEMS Microbiology. Letters*. **237**, 333–40
- [68] Zohary, D. (1996). The genus *Pistacia vera* L. In: S. Padulosi, T. Caruso and E. Barone, (eds.) Taxonomy, distribution, conservation and uses of *Pistacia* genetic

resources. Pp. 1-11. Report of a workshop, 29-30 June 1995, Palermo, Italy.
International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

EKLER

Ek 1 Fungal Besi Ortam İçerikleri

PDA (Patates Dekstroz Agar) Birim (gr/lt)

Patates Dekstroz Agar	39
Agar	12
(dH ₂ O ile 1 lt'lik ortam hazırlanır)	

Czapek konsantre Birim (gr/ml)

Na ₃ NO ₃	30
KCl	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,1
(dH ₂ O ile 100 ml tamamlanır)	

CZ (Czapek Dox Agar) Birim (gr/lt)

Czapek Concentrate	10
K ₂ HPO ₄	1
Sucrose	30
Agar	17,5
(dH ₂ O ile 1 lt'lik ortam hazırlanır)	

**CYA 25 °C, 37 °C (Czapek
Yeast Extract Agar)** **Birim (gr/lt)**

K ₂ HPO ₄	1
Czapek Concentrate	10
Powdered Yeast Extract	5
Sucrose	30
Agar	15

(dH₂O ile 1 lt'lik ortam hazırlanır)

**CY20S (Czapek Yeast Extract Agar
ile %20 Sakkaroz)** **Birim (gr/lt)**

K ₂ HPO ₄	1
Czapek Concentrate	10
Powdered Yeast Extract	5
Sucrose	200
Agar	15

(dH₂O ile 1 lt'lik ortam hazırlanır)

MEA (Malt Extract Agar) **Birim (gr/lt)**

Powdered Malt Extract	20
Peptone	1
Glucose	20
Agar	20

(dH₂O ile 1 lt'lik ortam hazırlanır)

AFPA	Birim (gr/lt)
Peptone	10
Yeast extract	20
Ferric ammonium citrate	0,5
Dichloran (0,2 % solition in ehanol)	1
Agar	15
(dH2O ile 1 lt'lik ortam hazırlanır)	
ph (25 °C)	6,3±0,2
Antibiyotikler	10

Antibiyotikler	Birim
1) Chloramphenicol	
Chloramphenicol	500 mg
Ethanol 95%	4 ml
ddH ₂ O (25 °C)	50 ml

(Chloramphenicol alkol içerisinde çözüldükten sonra su ile tamamlanır.)

2) Chlortetracycline	
Chlortetracycline	500 mg
ddH ₂ O (25 °C)	50 ml

Yukardaki iki antibiyotik solüsyonu karıştırılarak cam tüpe aktarılır ve buradan gereken miktar kullanılır. Karışım ortamlara otoklavlandıktan sonra ilave edilir.

Ek 2 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

% 1.5'lık Agaroz Jel

Birim

%1.5 Agaroz	1,5 g
0.25 mg/ml Etidyum bromür	20 µl
1X TAE	100 ml

Jel Yükleme Tamponu

6X Loading buffer

Mikroskobik İncelemelerde Birim

Kullanılan Spor Seyreltme

Tamponu

Su	100 ml
Hipo	3-6 ml(<i>Aspergillus</i> spp. yoğunluğuna bağlı olarak değişir)
Tween-80	1-3 ml

Farklı Tanı Ortamlarına Fungal Birim

İnokulumu Koymak İçin Kullanılan

Tampon

Agar	% 0,2
Tween	% 0,5 (20 veya 80)
(dH ₂ O ile 1lt' ye tamamlanır)	

Gliserol Stok

Birim (100ml)

Gliserol	%20
NaCl	%0.25
dH ₂ O	%80