

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Buğday Tanelerinden Aflatoksijenik *Aspergillus* section *Flavi*
İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu**

Muhammed Nur HACCAR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Aralık, 2024

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

**Buğday Tanelerinden Aflatoksijenik *Aspergillus section Flavi*
İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu**

Muhammed Nur HACCAR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans 23/12/2024 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. Işıl VAR (Danışman)
: Prof. Dr. Ebru KAFKAS
: Doç. Dr. Sinan UZUNLU

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2023-15715

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
3. MATERYAL VE METOT	11
3.1. Materyal.....	11
3.1.1. Kimyasallar, Kitler, Kültür Ortamları	11
3.2. Metot.....	11
3.2.1. Buğday Tohumlarından A. section Flavi İzolasyonu	11
3.2.2. Klasik Yöntemle Fungal Tür Tanımlamaları.....	12
3.2.3. A. section Flavi İzolatlarından DNA izolasyonu.....	13
3.2.4. PCR Yöntemiyle A. section <i>Flavi</i> İzolatlarının Belirli Gen Bölgelerinin Gösterilmesi.....	14
3.2.5. A. section Flavi Üyesi Türlerin RFLP Yöntemiyle Tanımlanması	16
3.2.6. A. section Flavi Üyelerinin Hedef Genlerinin Doğrulanması ve Filogenetik Çalışmalar.....	17
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	19
4.1. Buğday Tohumlarından A. section Flavi İzolasyonu	19
4.2. Klasik Yöntemle Fungal Tür Tanımlamaları.....	19
4.3. Moleküler Yöntemle Fungal Tür Tanımlamaları.....	21
4.3.1. PCR Yöntemiyle A. section <i>Flavi</i> İzolatlarının Belirli Gen Bölgelerinin Gösterilmesi.....	21
4.3.2. A. section Flavi Üyesi Türlerin RFLP Yöntemiyle Tanımlanması	23
4.3.3. A. section Flavi Üyesi Türlerin ITS ve β -tubulin gen bölgelerinin dizilenmesi ve NCBI veri tabanı ile karşılaştırılması	25
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	27
KAYNAKLAR	29
ÖZGEÇMİŞ	35

Buğday Tanelerinden Aflatoksijenik *Aspergillus section Flavi* İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu

Muhammed Nur HACCAR

Danışman: Prof. Dr. Işıl VAR
2. Danışman: Dr. Işıl LAVKOR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Türkiye'de en çok üretilen tahıl olan buğday, hasat, taşıma, depolama ve işleme süreçlerinde *Aspergillus section Flavi* üyeleri (*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nominus*, *A. niger*) tarafından kontamine olmaktadır. Bu çalışmada *A. section Flavi* üyelerinin buğdaylarda yaygınlığı ve toksin üretme potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla *A. section Flavi* üyelerine ait türlerin izolasyonu, morfolojik ve moleküler olarak tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk olarak buğday taneleri PDA besiyerine yerleştirilmiş ve 25°C'de 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından şüpheli *Aspergillus* izolatları PDA besiyerinde saflaştırılmıştır. Morfolojik olarak tanımlamalar sonucunda elde edilen 25 izolatın tamamı şüpheli *A. flavus* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların moleküler tanımlamaları ITS, β -tubulin, IGS gen bölgeleri taranarak gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra aflatoksin üretim genleri olarak *norA*, *norB*, *pksA*, *ver-1*, *afIR* de değerlendirmeye alınmıştır. PCR analizleri sonucunda, ITS, β -tubulin ve IGS gen bölgesi için sırasıyla 600 bp, 340 bp, 674 bp; *norA*, *norB*, *pksA*, *ver-1* ve *afIR* genleri için ise sırasıyla 759 bp, 452 bp, 416 bp, 785 bp, 798 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir. Çalışmaya RFLP analizi ile devam edilmiş ve bu amaçla ITS1/ITS4 primerleriyle çoğaltılan 25 PCR ürünü *HhaI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Sonuç olarak ITS gen bölgesinden farklı boyutlarda dört fragman elde edilmiştir. Bu PCR ürünleri *A. flavus* olarak değerlendirilmiştir. Rastgele seçilen beş *A. flavus* izolatının β -tubulin ve ITS gen bölgeleri amplifiye edilerek BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizine tabi tutulmuş ve GenBank veri tabanındaki türlerle karşılaştırıldığında %99-100 aralığında nükleotid benzerliği göstermiştir. β -tubulin ve ITS gen bölgelerinden elde edilen DNA dizilerinin, MEGA X programı yardımıyla Neighbor-Joining metodu kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçta filogenetik ilişkileri gösterilmiştir. Bu çalışmada, buğday tanelerinden elde edilen *Aspergillus* izolatlarının yapılan analizler sonucunda *A. flavus* olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra aflatoksin üretim gen bölgelerinin gösterilmesi, bu izolatların aflatoksijenik *A. flavus* olma ihtimalini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Aspergillus section Flavi*, buğday, aflatoksin, aflatoksin biyosentez genleri

**Molecular Characterization of Aflatoxigenic *Aspergillus*
section *Flavi* Isolates from Wheat Grains**

Muhammed Nur HACCAR

Advisor: Prof. Dr. Işıl VAR

2. Advisor: Dr. Işılav LAVKOR

Department of Biotechnology

ABSTRACT

Wheat, the most extensively produced cereal in Turkey, is subject to contamination by members of *Aspergillus* section *Flavi* (*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomenus*, *A. niger*) during harvesting, transportation, storage, and processing. This study aimed to determine the presence and toxin-producing potential of *A. section Flavi* members in wheat. For this purpose, wheat grains were first placed in PDA medium and incubated at 25°C for 5-7 days. After incubation, suspected *Aspergillus* isolates were purified in PDA medium. Morphological identification determined that all 25 isolates were presumptive as *A. flavus*. Molecular identification of these isolates was conducted by screening ITS, β -tubulin, and IGS gene regions. Additionally, aflatoxin biosynthesis-related genes (*norA*, *norB*, *pksA*, *ver-1*, and *aflR*) were evaluated. PCR analyses yielded bands of 600 bp, 340 bp, and 674 bp for the ITS, β -tubulin, and IGS gene regions, respectively, while *norA*, *norB*, *pksA*, *ver-1*, and *aflR* genes produced bands of 759 bp, 452 bp, 416 bp, 785 bp, and 798 bp, respectively. The study was continued with RFLP analysis and for this purpose, 25 PCR products amplified with ITS1/ITS4 primers were cut with *HhaI* restriction enzyme. As a result, four fragments of different sizes were obtained from the ITS gene region. These PCR products were evaluated as *A. flavus*. Subsequently, β -tubulin and ITS gene regions of five randomly selected *A. flavus* isolates were amplified and subjected to BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analysis. When compared with the species in the GenBank database, these isolates exhibited 99-100% nucleotide similarity. DNA sequences of the β -tubulin and ITS gene regions were used to construct a phylogenetic tree employing the Neighbor-Joining method in MEGA X software to determine phylogenetic relationships. Based on the analyses, *Aspergillus* isolates obtained from wheat grains were identified as *A. flavus*. Furthermore, the presence of aflatoxin biosynthesis-related gene regions suggested the potential aflatoxicity of these isolates.

Keywords: *Aspergillus* section *Flavi*, wheat, isolation, aflatoxin biosynthesis genes

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması ve yürütülmesinde değerli katkılarıyla bana yol gösteren ve her daim destek olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Işıl VAR’a en içten teşekkürlerimi sunarım. Kendisi yalnızca akademik bir rehber değil, aynı zamanda bu süreçte ilham kaynağım olmuştur. Bitmek bilmeyen sabrı, anlayışı ve sevgisi sayesinde bu süreci başarılı ve huzurlu bir şekilde tamamlayabildim. Her zaman yanımda olan, bana inanan ve en zor anlarımda destekleyen danışman hocama gösterdiği değerli rehberlik için minnettarlığımı ifade etmek istiyorum.

Çalışma konusunun belirlenmesinde ve çalışmanın hazırlanma sürecinin her aşamasında bilgilerini, tecrübelerini ve değerli zamanını esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan değerli hocam sayın Dr. Işıl LAVKOR’a teşekkürü bir borç bilirim. Tezimi değerlendiren saygıdeğer jüri üyeleri Prof. Dr. Ebru KAFKAS ve Doç. Dr. Sinan UZUNLU’ya sonsuz saygı ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bilgi ve birikimlerimin oluşmasında maddi ve manevi her türlü desteği esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve güvenlerini her daim hissettiren sevgili aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunmak istiyorum. Ayrıca gerek laboratuvarında gerek tezimin her aşamasında gösterdiği desteği ve cesaretlendirmesi için değerli arkadaşım Berfin SUCU’ya teşekkürlerimi sunarım.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kimyasalların, kitlerin, kültür ortamlarının ve temel öğelerin listesi.....	11
Çizelge 3.2. PCR çalışmalarında kullanılan primerler ve baz dizilimleri.....	15
Çizelge 3.3. PCR için kurulum programı ve döngü sayısı.....	16
Çizelge 3.4. RLFP yönteminde kullanılan reaksiyon karışımının içeriği.	17
Çizelge 4.1. Seçilen beş izolatın ITS gen bölgelerinin GenBank veri tabanında yüksek genetik benzerlik gösterdikleri izolatlarla karşılaştırıldığında çıkan benzerlik oranları.	25



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Morfolojik yöntemle tanımlanan <i>Aspergillus</i> izolatları	19
Şekil 4.2. <i>Aspergillus flavus</i> izolatına ait konidial başlık ve konidyoforun mikroskop görüntüsü.....	20
Şekil 4.3. DNA izolasyonları yapılan 25 <i>Aspergillus</i> izolatının hedeflenen genleri olan A) Tub (340 bp), IGS (674 bp), ITS (600 bp), <i>aflR</i> (798 bp), B) <i>norA</i> (759 bp), <i>norB</i> (452 bp), <i>pksA</i> (416 bp) ve <i>ver-1</i> (785 bp) genlerinin PCR ürünlerinin DNA jel elektroforezi sonuçları.....	21
Şekil 4.4. ITS1/ITS4 primerleri ile çoğaltılan 13 PCR ürününe <i>HhaI</i> restriksiyon enzimiyle kesim sonuçlarının %2 agaroz jel elektroforez görüntüsü.	23
Şekil 4.5. ITS1/ITS4 primerleri ile çoğaltılan 12 PCR ürününe <i>HhaI</i> restriksiyon enzimiyle kesim sonuçlarının %2 agaroz jel elektroforez görüntüsü.	24
Şekil 4.6. Neighbor-joining yöntemine dayalı filogenetik ağaç.....	26

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA	: Deoksiriboznükleik Asit
PDA	: Potato Dekstroz Agar
g	: Gram
kg	: Kilogram
µl	: Mikrolitre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
ITS	: Internal Transcribed Spacer
IGS	: Intergenic Spacer Bölgesi
dH ₂ O	: Steril Su
ddH ₂ O	: Ultra saf ve steril su

1. GİRİŞ

Tarım ürünleri içerisinde tahıllar önemli bir yer teşkil etmektedir. Tahıllar gerek Türkiye ve gerekse dünyada insan ve hayvan beslenmesi açısından çok büyük önem arz etmektedir. Buğday (*Triticum spp.*) ülkemizde üretimi yapılan tahıl ürünleri içerisinde en büyük paya sahip olup, ülkemiz için önemli bir tahıl ürünüdür (TMO, 2021). Buğday, buğday ürünleri ve ekmek hem geçmişte hem günümüzde Türk insanının en önemli besin kaynaklarından biri olmuştur (Lavkor, 2019a). Buğday ve ekmeğin beslenmenin yanı sıra kültürel, sosyal ve tarihi değeri çok büyüktür. Buğday taşıdığı büyük değere bağlı olarak saygı duyulan, kutsal sayılan bir üründür ve sadece Türkiye için değil aynı zamanda dünya insanının beslenmesinde de giderek artan bir öneme sahiptir (Özberk ve ark., 2016). Bugün en fazla buğday ihracatı yapan ülkeler; Rusya, ABD ve Kanada'dır. Üretim olarak bakıldığında ise en fazla buğday üretebilen ilk üç ülke; Çin, Hindistan ve Rusya olarak bilinmektedir. Bu üç ülkenin dünya buğday üretimindeki payları sırasıyla %17, %14 ve %11'dir (TMO, 2021).

Türkiye yüzölçümünün %29,5'inde tarımsal üretimin yapılabileceği elverişli şartlara sahiptir. Tarım alanlarının nadas alanları hariç %67,5'inde tarla ziraatı yapılmaktadır ve bu alanın da %71'inde hububat ekilmektedir. Hububat ekim alanı içinde %62 ile ilk sırada buğday gelmektedir. Buğdayı sırasıyla, %28 ile arpa ve %6,2 ile mısır takip etmektedir (TMO, 2021). Türkiye'de buğday 55,4 milyon alanda ve dekara 266 kg verim ile 14,5 milyon ton toplam buğday üretilmektedir. 2021 yılı verilerine göre, Türkiye 6.623.061 hektar alanda 17.650.000 ton buğday üretimi gerçekleştirmiştir. Bu üretim dünyadaki toplam üretimin %2,29'una karşılık gelmekte olup, dünyada en fazla buğday üretimi yapan 11 ülkeden biridir (Ken ve Semerci, 2023).

Tarımsal üretimin ülke ekonomisinde önemli bir paya sahip olduğu ülkemizde, biyotik ya da abiyotik faktörlerin neden olduğu ürün kayıplarıyla karşılaşmakta ve bunların önlenmesi ya da en aza indirilmesi önem arz etmektedir. Yüksek verimli buğday çeşitlerinin geliştirilmesi amacıyla yapılan yoğun ıslah çalışmaları kültür formlarının genetik çeşitliliğinin giderek azalmasına neden olmuş ve böylece zararlılara, çevresel streslere ve değişik hastalıklara karşı hassasiyetleri de artmıştır (Hajjar ve Hodgkin, 2007).

Ayrıca tahıl taneleri hasat, taşıma, depolama ve işleme süreçlerinde sıklıkla funguslar ile kontamine olmaktadır (Riba ve ark., 2010). *Aspergillus* section *Flavi* üyesi içindeki bu funguslar tarafından üretilen mikotoksinler başta buğday olmak üzere tahıl ve tahıl ürünlerinde bulunabilmekte ve sağlık riskleri oluşturmaktadır. Bu süreçlerde oluşan toksinler canlılarda alerjik ve toksijenik reaksiyonlara sebep olmaktadır (Miraglia ve Brera, 2000; Abdallah, 2019). Saprofit olarak tanımlanan *Aspergillus*'lar, tarla koşullarından itibaren depolama süresi boyunca çeşitli tahılları substrat olarak kullanıp üzerinde gelişimlerini sürdürebilirlerken, bir yandan da toksin üretimleri devam edebilmektedir (Scheidegger ve Payne, 2003).

Aspergillus'lar mikotoksin üretmelerinin yanı sıra bitki ve depo hastalıklarına da neden olabilmektedirler. Fakat insan ve hayvan sağlığını tehdit emesi açısından üretilen mikotoksinler gıda endüstrisi ve hayvan besleme açısından ön plana çıkmaktadır. Mikotoksinler, özellikle *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsi funguslar tarafından sentezlenen düşük moleküler ağırlığa sahip ikincil metabolitlerdir (Abd-Elsalam ve Rai, 2020). Mikotoksin terimi ilk kez 1960'larda kullanılmıştır. İngiltere'de yaklaşık 100.000 hindi, *A. flavus* tarafından üretilen bir mikotoksinle kontamine olmuş yer fıstığı içeren hayvan yemleri nedeniyle "Turkey-X hastalığı"na yakalanarak hayatını kaybetmiştir (Ismail ve Papenbrock, 2015). Sonraki yıllarda laboratuvarlarda ve sahada gerçekleştirilen deneyler sonucunda gıdaların bozulmasına ve bitkilerde görülen hastalıklara neden olan yaygın birçok fungusun toksik özellik gösterebilen çok sayıda metabolit sentezleyebildiği gösterilmiştir (Pitt, 2013).

Gıda ve yemlerde gelişen fungusların oluşturdukları misellerin içinde bulundukları ürüne salgıladıkları bu toksik metabolitler, insan ve hayvan sağlığını tehdit ettiğinden, küflenme ekonomik boyutun ötesinde önem taşımaktadır. Bugüne kadar yaklaşık 400 mikotoksin tanımlanmıştır. Tanımlanmış 400'den fazla mikotoksin içerisinde aflatoksinler, fumonisinler, okratoksinler, deoksinivalenol, zearalenon ve patulin hem ticari etki hem de insan ve hayvan sağlığı riski açısından en önemlileridir. Bu sayının artmasında mikotoksinler üzerinde yapılan yoğun araştırmaların yanı sıra, yeni antibiyotik ve kemoterapötik ajanların keşfi için çeşitli laboratuvarlarda yapılan çalışmalarda metabolitlerin mikotoksin olarak tanımlanmasının da önemli bir rolü bulunmaktadır (Reddy ve ark., 2010; Zain, 2011).

Mikotoksinler arasında ise aflatoksinler daha çok öne çıkmaktadır. Aflatoksinler *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* gibi çeşitli toksijenik *Aspergillus* tarafından sentezlenen mikotoksinlerdir (Rao ve Chopra, 2001). Aflatoksinler, fungus türleri tarafından üretilen poliketidlerden türetilen oldukça toksik ikincil metabolitlerdir. Bu maddeler, insanlar ve hayvanlar için ciddi sağlık riskleri oluşturmaktadır (Özkaya, 2001). Ana aflatoksinler B₁, B₂, G₁ ve G₂ olarak adlandırılır ve bu maddeler solunum, mukoza veya deri yoluyla vücuda girdiğinde inflamatuvar yanıtın aşırı aktivasyonuna sebep olabilir. Bu durum, vücudun savunma mekanizmalarının aşırı tepki vermesine ve zararlı etkilere maruz kalmasına neden olabilmektedir. (Kumar ve ark., 2017). Gıdalarda da doğal olarak bulunmakta olan Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ arasında en toksik olanı aflatoksin B₁'dir ve Uluslararası kanser araştırmaları ajansı tarafından Grup 1 karsinojen olarak sınıflandırılmıştır (IARC, 1993).

Aflatoksin, insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaının yanı sıra, birçok ülke için ekonomik açıdan da sorunlar yaratabilmektedir (Özkaya, 2001). Dünyadaki tarım ürünlerinin %25'i aflatoksin ve diğer mikotoksinlerle bulaşmış olarak bilinmektedir (Bennett ve Klich, 2003; Bryden, 2007). Aflatoksinlerin varlığı doğal olarak tarımsal ürünler içerisinde daha çok buğday, soya fasulyesi (Vaamonde ve ark., 2003), yerfıstığı (González-Salgado ve ark., 2008), mısır (Giorni ve

ark., 2007; Atehnkeng ve ark., 2008), pamuk (Cotty, 1997) ve bademde (Rodrigues ve ark., 2007) görülmektedir.

Aflatoksin B₁ ve G₁'in biyolojik aktivitesi genellikle toksijenik *Aspergillus flavus* kültürleri ve aflatoksin ile kontamine olmuş ürünlerde gözlemlenmiştir (Groopman, 1988). Gıdalar ve hayvan yemleri; işleme, depolama ve satış süreçlerinde aflatoksinlerle kirlenme riski taşımaktadır. Aflatoksin kontaminasyon düzeyleri ise iklimsel ve bölgesel özelliklere ve gıda türüne bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Şener, 2006). Başlangıçta, aflatoksin B ve G üreten türler *A. flavus* olarak tanımlansa da (Christensen ve ark., 1973), Buchanan ve Ayres'in 1979'da yaptığı çalışmalar, iki grubu da üreten türlerin *A. parasiticus* olduğunu ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra, *A. flavus* türlerinin aflatoksin B₁ ve B₂ üretebildiği ancak G grubu aflatoksinleri üretmediği de tespit edilmiştir. Bu bulgular, mikotoksin üretiminin doğru türlerle ilişkilendirilmesinin önemini vurgulamaktadır (Varga ve ark., 2009; Amaike ve Keller, 2011).

Aflatoksin gibi ikincil metabolitler, çok çeşitli yollarla sentezlenebilmekte, hem genetik olarak farklı üretici suşlar hem de farklı çevresel koşullar bu metabolitlerin üretimini etkileyebilmektedir. Aflatoksin oluşumunu ürün nemi, kurutma hızı, ortamın nisbi nemi, sıcaklık, ortamda bulunan fungus veya 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 etkileyebilmektedir (Çoksöyler, 1999). Özellikle aflatoksinlerin oluşumunda nispi nem ve sıcaklığın kritik parametreler olduğu bilinmektedir. Araştırmalar, aflatoksin üreten fungusların en uygun gelişme koşullarının 24-35°C sıcaklık ve %70'in üzerinde nispi nem olduğunu göstermektedir. Bu koşullar altında, aflatoksin oluşumu daha hızlı ve yoğun bir şekilde gerçekleşebilmektedir (Amaike ve ark., 2011; Odoemelam ve Osu, 2009).

Mikotoksin üreticileri de olan bu *Aspergillus section Flavi* üyeleri koloni yapısı, çapı, renk ve konidial yapıları içeren morfolojik özellikleri ile tanımlanmaktadır (Klich, 2002). *A. section Flavi* grubuna ait birçok türün tanımlanmasında, morfolojik özellikler tek başına yeterli olmamaktadır (Frisvad ve ark., 2006; Samson ve ark., 2006). Bu nedenle, *A. section Flavi* üyelerinin tanımlanmasında moleküler analizler de kullanılmaktadır (Godet ve Munaut, 2010).

Moleküler tanımlama için yapılan analizlerde kullanılan çeşitli teknikler arasında Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (qRT PCR), Çoklu PCR ve İç İç PCR gibi yöntemler bulunmaktadır. Bu teknikler, genetik analizlerde ve moleküler biyoloji çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Söz konusu yöntemler, genetik çeşitliliği belirlemeden gen ifadesinin niceliksel analizine kadar geniş bir yelpazede kullanılmaktadır (Sambrook ve ark., 1989; Katan, 2000; Nelson ve ark., 1997). Bu moleküler analiz teknikleri, genetik araştırmalarda ve tıbbi tanıda büyük önem taşımaktadır ve genetik yapıların ayrıntılı analizinde değerli bilgiler sağlamaktadır. Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA molekülünün farklı

büyükteki fragmanlara ayrılması ve elde edilen DNA parçalarının jel elektroforez tekniği ile görüntülenmesi işlemi RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism/Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) olarak bilinir. Bu teknik, ilk kez Simian Virüs 40 (SV40) DNA'sının HindIII enzimi ile kesilmesiyle oluşturulan restriksiyon haritasıyla başlamıştır. Analiz sonucunda elde edilen 11 özgül parça, virüs DNA'sı üzerinde biyolojik olarak önemli bölgelerin belirlenmesine imkân tanımıştır. RFLP tekniği, ökaryotik hücre genom analizlerinde ve birçok genetik hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılmaktadır. Bu yöntem, genetik araştırmalarda ve tıbbi uygulamalarda önemli bir araç olmaya devam etmektedir (Klug ve ark., 2011; Özerdem, 2009; Yağcı, 2001).

RFLP yöntemi, DNA dizilerindeki varyasyonları incelemek için kullanılan etkili bir moleküler parmak izi tekniğidir. Bu yöntemde, organizmanın DNA'sı belirli restriksiyon enzimleri ile kesilmekte ve farklı dizi ve/veya boyutlardaki PCR ürünleri bir jel veya kapiller üzerinde farklı hareketlerle ayrıştırılmaktadır (Gilbride ve ark., 2006, Türedi ve Şeker, 2023). Her bir bandın veya pikin farklı mikrobiyal bir türü temsil ettiği varsayılarak, oluşan DNA paternlerinin topluluğun çeşitliliğini doğrudan yansıttığı kabul edilmektedir. Bu parçaların farklı uzunluklarda olması ve farklı organizmalar arasında değişkenlik göstermesi, genetik farklılıkların tespitinde bu yöntemin kullanımını mümkün kılmaktadır. Ayrıca, ilgilenilen bant veya piklere ait DNA fragmanları seçilip dizi analizleri yapılarak, dizinin uzunluğuna bağlı olarak değişen çözünürlüklerde elde edilen veriler filogenetik araştırmalar için kullanılabilir. Bu yöntem, mikrobiyal çeşitliliği incelemek ve filogenetik ilişkileri anlamak için önemli bir araç olarak da kullanılmaktadır (Gilbride ve ark., 2006; Kim ve ark., 2013, Türedi ve Şeker, 2023).

Aspergillus türlerinin PCR tabanlı tanımlamaları, genellikle 18S rDNA, mitokondriyal DNA, Intergenic Spacer Bölgesi (IGS) ve Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgelerine dayanmaktadır. Bu yöntemler, *A. section Flavi* üyelerinin tanımlanmasında özellikle *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. oryzae* ve *A. sojae* türlerine odaklanmıştır. PCR teknolojisi, *Aspergillus* türlerinin doğru ve hızlı bir şekilde tanımlanması ve karakterizasyonunda kritik bir rol oynayarak bu alanda yapılan çalışmalara önemli katkılar sağlamaktadır (Rodrigues ve ark., 2007; González-Salgado ve ark., 2008; Niessen, 2007).

Günümüzde aflatoksin biyosentezinde görevli genler hedef alınarak da *Aspergillus* türlerinin belirlenmesine yönelik moleküler çalışmalar yapılabilmektedir (González-Salgado ve ark., 2008). *A. section Flavi* üyesi fungus türlerinin aflatoksin biyosentezinde görevli 20'nin üzerinde gen bulunduğunu bildirilmiştir. Bu genler arasında *aflR*, *aflS* (*aflJ*), *aflA*(*fas-2*), *aflB*(*fas-1*), *aflC*(*pksA*), *aflD* (*nor-1*), *aflE* (*norA*, *adh-2*), *aflF* (*norB*), *aflG*(*avnA*, *ord-1*), *aflH*(*adhA*), *aflI* (*avfA*), *aflK* (*vbs*), *aflL* (*verB*), *aflM* (*ver-1*), *aflN* (*verA*), *aflO* (*dmtA*, *omtB*), *aflP* (*omtA*, *omt-1*), *aflQ* (*orda*, *ord-1*), *aflT*, *aflU* (*cypA*), *aflV* (*cypX*), *aflW*(*moxY*), *aflX* (*ordB*), *alfY* (*hypA*) bulunmaktadır (Verheeecke, 2014).

Yapılan çalışmalarda, PCR tekniği ile *Aspergillus* 'un norosolorinik asit reduktazı kodlayan geni *nor1*, versicolorin A dehidrogenaz kodlayan geni *ver1*, sterigmatosistin O-metiltransferaz kodlayan geni *omtA* olarak tanımlanmıştır (Geisen, 1996; Criseo ve ark., 2001; Chen ve ark., 2002). Birbiri ardına sıralanmış olan *aflR* ve *aflJ* genlerinin aflatoksin biyosentezini düzenleyen genler olduğu, bu genlerin aflatoksin biyosentezini başlattığı ve aflatoksin üretimini arttırdığı (Ehrlich ve Cotty, 2002; Georgianna ve Payne, 2009), ayrıca aflatoksin biyosentezinde yer alan *pksA*, *nor-1*, *ver-1*, *uvm8* ve *omtA* gibi birçok yapısal genin aflatoksin oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir (Yu ve ark., 1995; Geiser ve ark., 2000).

Aflatoksin biyosentezinde görevli genler hedef alınarak *Aspergillus* türlerinin belirlenmesine yönelik yöntemlerden biri de PCR-RFLP tekniğine dayanan moleküler analiz yöntemidir (El Khoury ve ark., 2011; Kana ve ark., 2013). Kamerun'da yapılan bir araştırmada farklı tarım bölgelerinden toplanan hayvan yemlerinde PCR-RFLP analiz yöntemi kullanılarak IGS-F/R primer çifti ile IGS bölgesi hedef alınmış ve *Aspergillus* türleri belirlenmiştir. Tüm IGS-PCR ürünleri *Bgl*II enzimi ile kesilerek 362, 210 ve 102 bp de bant vermiştir. Çalışmada üç fragmana bölünen PCR ürünlerinin *A. flavus* olarak tanımlandığı ve aflatoksin B₁ ürettiği bildirilmiştir (Kana ve ark., 2013).

Bölgemizde buğday tanelerinde *A. section Flavi* üyelerine ait türlerin baskın olduğu ve türlerin toksijenite bilgisi özellikle mikotoksinlere yönelik hasat öncesi önleyici tedbirlerin alınması yönünden önem taşımaktadır. Aflatoksin ile mücadele mikrobiyolojik ajanların tespitinde güvenli bir yöntem oluşturulması açısından da ayrıca önemlidir. *A. section Flavi* üyeleri koloni yapısı, çapı, renk ve konidial yapılarını içeren morfolojik özellikleri ile tanımlanmaktadır. *A. section Flavi* grubuna ait birçok türün tanımlanmasında, morfolojik özellikler tek başına yeterli olmamaktadır. Bu nedenle, bu türlerin tanımlanmasında moleküler düzeyde DNA analizleri de yapılmaktadır. Bu çalışmada Adana ilinde buğday yetiştiriciliği yapılan tarım alanları, depolar ve silolardan alınan buğday örneklerinden *A. section Flavi* üyelerine ait türlerin izolasyonları yapılarak *A. section Flavi* üyelerinin morfolojik tanımlamalarının ardından tür bazında moleküler tanımlamaları ile aflatoksin üretiminde rol alan gen bölgeleri taranmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Dünya’da üretilen tahıllar, hasat, taşıma, depolama ve işleme süreçlerinde *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria* gibi çeşitli küflerle kontamine olmaktadır. Bu küfler içerisinde en çok çalışılan küflerden biri de *Aspergillus*’lardır.

***Aspergillus* Türlerinin Morfolojik Olarak Tanımlanması Çalışmaları**

Cotty (1997) Amerika Birleşik Devletleri'ndeki pamuk ekili tarım alanlarında *Aspergillus* section *Flavi* topluluklarının varlığını ve aflatoksin üretim potansiyelini belirlemeyi amaçladığı çalışmada *A. flavus* ve *A. tamarii* türlerinin bölgeler arasında görülme sıklığındaki farklılığı göstermiştir. *A. flavus* türünün görülme sıklığının sıcaklıkla birlikte arttığı gözlenmiştir. İzolatların sadece %1'den azı *A. nomius* ve *A. parasiticus* türlerine ait olduğu görülmüştür. *A. flavus* izolatları sklerotiyal morfolojiye dayanarak S veya L suşlarına ayrılmıştır. S suşuna ait izolatlar çok sayıda küçük (<400 µm) sklerotia üretmişken, L suşuna ait izolatlar daha az sayıda ancak daha büyük sklerotlar üretmiştir. Korelasyonlar, L türünün toksisitesinin coğrafi olarak değiştiğini, ancak S türünün toksisitesinin değişmediğini göstermiştir. Çoğu izolatin toksisitesi tek konidial transfer yoluyla sabit kalmış, ancak izolatların %28'i toksisite seviyelerinde değişiklikler göstermiştir. Çalışma sonuçlarına göre, topluluklar arasında gözlemlenen farklılıkların, coğrafi izolasyonu ve/veya adaptasyonu yansıtabileceği ve farklı yerlere ekilen ürünler arasında aflatoksin kontaminasyonuna karşı farklı hassasiyetlere de neden olabileceği ifade edilmiştir.

Giorni ve ark (2007) tarafından yapılan çalışmada Kuzey İtalya'da ilk kez hayvan yemi olarak kullanılan mısırdan izole edilen *A. section Flavi* izolatları ve ürettikleri aflatoksinler (AF) üzerinde detaylı bir inceleme gerçekleştirilmiştir. Toplam 70 izolat incelenmiş ve bu izolatlar 2003 ve 2004 yıllarında İtalya'nın farklı bölgelerinden toplanmıştır. İzole edilen suşlar toksijenik türler olan *A. flavus* ve *A. parasiticus* olarak belirlenmiştir. İncelenen popülasyonlarda *A. flavus* baskın bulunmuş ve suşların %93'ünü temsil ettiği belirtilmiştir.

Afzal ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışmada, Pakistan'ın Sindh eyaletindeki Larkana bölgesinden izole edilen *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasını ele alan çalışmada, Czapek Solution Agar (CZA) ve Malt Extract Agar (MEA) olmak üzere iki farklı besiyeri kullanılarak makroskopik (koloni büyümesi, konidyum rengi, koloninin ters yüzü) ve mikroskopik (konidiofor, vezikül, matulae, fialid ve konidyum) özellikleri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, *Aspergillus ficcum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus flavus* var. *columnaris*, *Aspergillus terreus* var. *aureus*, *Aspergillus fumigatus*, *Emericella nidulans*, *Emericella rugulosa* ve *Aspergillus terricola* var. *americana* olmak üzere sekiz farklı *Aspergillus* türü ilk kez Larkana bölgesinden rapor edilmiştir. Bu çalışmanın, bölgesel mikolojik çeşitliliğin anlaşılmasına önemli katkılar sağladığı belirtilmiştir.

Thathana ve ark (2017) tarafından, Kenya'da mısır ve toprak örneklerinden izole edilen *Aspergillus flavus* suşlarının morfolojik karakterizasyonuna odaklanan bir çalışmada, izolatların

PDA ortamındaki belirgin koloni özellikleri tanımlanmıştır. Koloniler, zeytin yeşili ve koyu yeşil renk oluşturmuştur. Morfolojik olarak koloniler, kenarlarında düz ve sade bir yapıya sahipken, merkezde yüksek ve kırışık, beyin kıvrımı benzeri (cerebriform) bir desen sergilemiştir. Tüm izolatlarda renksiz veya kahverengi olabilen sıvı damlacıkları şeklinde eksüdatlar gözlemlenmiştir. Ayrıca, 16 izolat derin kahverengi renkte sertleşmiş miselyal kütleler (sklerotlar) üretmiştir. Koloniler beyaz bir sınırla çevrelenmiş olup çapları 65-75 mm arasında değişmiştir. Yapılan bu çalışmada, geleneksel morfolojik yöntemlerin gelişmekte olan ülkelerde hızlı tanımlama aracı olarak kullanımının önemi vurgulanmıştır.

***Aspergillus* Türlerinin PCR ile Moleküler Olarak Tanımlanması Çalışmaları**

Geisen (1996) yaptığı çalışmada aflatoksin biyosentetik genlerini amplifiye etmek için multipleks bir PCR reaksiyonu geliştirmiş ve aflatoksin biyosentetik yolunun üç yapısal genine (*norsolorinik asit redüktaz (nor-1)*, *versicolorin A dehidrojenaz (ver-1)*, ve *sterigmatosistin O-metiltransferaz (omt-A)*) özgü üç set primer ile multipleks PCR kullanarak *A. flavus* ve *A. parasiticus*'u ayırt edebilmiştir.

Shapira ve ark (1996) tarafından yapılan çalışmada aflatoksin biyosentezinde görevli *ver-1*, *omt-1* ve *apa-2* genlerinin tespiti amacıyla yer fıstığı ve mısır örneklerinde uygun primer çiftleri kullanılarak PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* türleri gibi çeşitli küf türlerinden elde edilen DNA'lar PCR şablonu olarak kullanılmıştır. Ayrıca, yer fıstığı, mısır ve depolanan tahıllardan elde edilen DNA'lar da test edilmiştir. Bu çalışmada, söz konusu genlerin varlığı yalnızca aflatoksijenik *A. parasiticus* ve *A. flavus* suşlarında tespit edilmiştir. Sonuç olarak, PCR yöntemiyle tahıl ve gıdalardaki aflatoksijenik suşların doğru, hassas ve özgün bir şekilde tespitinde, aflatoksin biyosentezinden sorumlu genlerin önemli bir referans noktası oluşturduğu ortaya konmuştur.

Criseo ve ark (2001) tarafından yapılan çalışmada, *A. flavus* grubunun aflatoksin üreten ve üretmeyen suşlarını ayırt etmek amacıyla, dört gene (*aflR*, *nor-1*, *omt-1* ve *ver-1*) özgü primer setlerini içeren yeni bir multipleks PCR prosedürü (Quadruplex PCR) geliştirilmiştir. Çalışmanın sonuçları, Quadruplex-PCR analizinin, aflatoksijenik suşlarda dört banlı bir desen ortaya koyduğunu ve bu desenin, aflatoksin biyosentetik yolunda yer alan ve fonksiyonel ürünlerin sentezinden sorumlu tüm genlerin varlığını doğruladığını göstermiştir.

Manonmani ve ark (2005) Hindistan'da gerçekleştirdikleri bir çalışmada yer fıstığı ve mısır örneklerinde bulunan aflatoksijenik funguslarda *aflR* genini tespit etmek amacıyla PCR analizi gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada aflatoksijenik fungusların gıdalarda hızlı bir şekilde tespit edilmesi için *aflR* geni için yerel olarak tasarlanmış bir primer çifti kullanılarak PCR yapılmıştır. Spesifiklik, 28 farklı fungus suşundan elde edilen DNA'nın saf ve karışık kültür sistemlerinde PCR şablonu olarak kullanılarak test edilmiştir. Pozitif amplifikasyon yalnızca aflatoksijenik *A. flavus* ve *A. parasiticus*'tan elde edilen DNA ile elde edilmiştir.

Ehrlich ve ark (2007) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, Tayland'ın on farklı bölgesinden alınan toprak örneklerinden aflatoksin üreten *Aspergillus* türleri izole edilmiştir. Tüm toprak örneklerinde *A. flavus*'un baskın tür olduğu saptanmıştır. *A. pseudotamarii* ise dört toprak örneğinde tespit edilmiştir. İki örnekte, *A. nomius*'un en fazla aflatoksin üreten tür olduğu belirlenmiştir. Üç farklı DNA bölgesine [Taka-amilaz A (taa), rRNA dahili transkribe spacer (ITS) ve aflatoksin biyosentez genleri *aflJ* ve *aflR*'nin intergenik bölgesi] yönelik sekans analizleri, *A. nomius* izolatlarının iyi desteklenmiş üç sınıfa ayrıldığını göstermiştir. Bu sınıflardan birine ait izolatların, morfolojik olarak B ve G aflatoksin üretimi yapabilen S-tipi izolatlarla benzerlik gösterdiğinden kolayca karıştırılabileceği vurgulanmıştır. Bu sonuçlar, araştırmacılara Tayland'da aflatoksin kontaminasyonuna neden olabilecek daha önce tanımlanmamış bir *A. nomius* varyantının var olabileceğini düşündürmüştür.

Gallo ve ark (2012) tarafından yapılan çalışmada, 2003 yılında Kuzey İtalya'da kaydedilen ilk aflatoksin kontaminasyonu salgını sırasında mısırdan izole edilen *Aspergillus* popülasyonu (67 suş) genetik olarak incelenmiştir. Bu inceleme sırasında, β -tubulin ve kalmmodulin gen bölgeleri ile aflatoksin biyosentezini düzenleyen *aflR* ve *aflS* (*aflJ*) genleri ile *aflD*, *aflM*, *aflO*, *aflP* ve *aflQ* yapısal genlerine yönelik PCR analizleri yapılmıştır. Gen dizileme sonuçları, incelenen tüm suşların *A. flavus* olduğunu ortaya koymuştur. Suşlar, amplifikasyon ürünlerine göre dört gruba ayrılmıştır: Grup I (40 suş) yedi gen bölgesinin tamamını taşıırken, Grup II (iki suş) dört (*aflM*, *aflP*, *aflO*, *aflQ*) ve Grup III (dokuz suş) üç (*aflO*, *aflP*, *aflQ*) gen bölgesine sahip olarak tanımlanmıştır. Grup IV (16 suş) ise genlerin tümünün eksikliği ile karakterize edilmiştir. Sadece Grup I'deki suşların aflatoksin B₁ üretebildiği (40 suştan 37'si) belirlenmiştir; diğer gruplara ait olan ve bazı gen bölgelerinden yoksun olan suşlar aflatoksin üretmemiştir. Bu çalışma, 2003 yılında Kuzey İtalya'da aflatoksin kontaminasyonundan sorumlu tek türün *A. flavus* olduğunu ve bu popülasyonlardaki aflatoksin gen kümesi farklılıklarının, toksikolojik risk değerlendirmesi ve biyokontrol ajanlarının seçimi açısından önemli olabileceğini göstermiştir.

Midorikawa ve ark (2014), Brezilya'nın Amazon bölgesinde fındıklardan izole ettikleri 137 adet *A. section Flavi* üyesi türün rDNA ITS, β -tubulin ve kalmmodulin gen bölgelerini spesifik primer çifti kullanarak PCR yöntemi ile çoğaltmış ve *DraI* enzimi ile bu gen bölgelerinde restriksiyon analizleri gerçekleştirmiştir. Yapılan PCR-RFLP analizleri sonucunda, aflatoksin biyosentez genlerine sahip olan *A. flavus*, *A. nomius* ve *A. tamarii* türlerinin varlığı tespit edilmiştir.

Kesmen ve ark (2014) standart olarak kullanılan 13 adet *A. flavus* NRRL izolatu ve farklı ürünlerden izole edilmiş 66 adet *A. flavus* izolatını aflatoksin biyosentezinden sorumlu poliketid sentaz (*pksL 1*) yapısal genine özgül primer çifti kullanarak PCR analizi gerçekleştirmişlerdir. Aflatoksinjenik *A. flavus* türlerinin tespitinde ve aflatoksin biyosentez mekanizmasının aydınlatılmasında *pksL 1* genine özgü primer çiftinin başarılı bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Lavkor (2019b) tarafından yapılan bir çalışmada, Adana ve Osmaniye illerinden toplanan yerfıstığı örneklerinden izole edilmiş 50 *A. section Flavi* üyesi izolatın morfolojik ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle tanımlamaları yapılmıştır. *Aspergillus* türlerinin tanımlanması için DNA ekstraksiyonları yapılmış ve β -*tubulin* gen bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. Tür tanımlamasında β -*tubulin* gen bölgesine ait sekans sonuçları Blast (Basic Local Alignment Search Tool)'da bilinen ribozomal sekanslar ile karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, fungal izolatların 33'ü *A. flavus*, 17'si ise *A. parasiticus* olarak tanımlanmıştır. Blast analizi sonuçlarında, *A. flavus* ve *A. parasiticus* türüne ait β -*tubulin* gen sekansı karşılaştırmaları sırası ile %89-100 ve %96-100 oranları arasında benzerlik göstermiştir.

Lavkor (2019c) bir diğer çalışmasında, *Aspergillus*'un tür tanımlamasında aflatoksin biyosentezini düzenleyen genleri belirlemek için PCR-RFLP yöntemini kullanmıştır. Adana ilinde ikinci ürün yerfıstığı deneme alanında topraktan, havadan ve hastalık belirtisi gösteren yerfıstığı bitkilerinden toplam 325 (%100) adet *A. flavus* izolatının morfolojik ve moleküler (PCR) yöntemlerle tanımlamasını gerçekleştirmiştir. Yapılan çalışmada izolatların 254 (%78) adedinin *aflR* ve *aflJ* (*aflS*) aflatoksin biyosentez genlerine sahip *A. flavus* olduğu belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada, buğday üretim alanlarından, depolardan ve silolardan temin edilen toplamda 40'ı ithal (Ukrayna, Rusya, Suriye, Romanya) ve 10'u yerel (Denizli, Afyonkarahisar, Siirt) 50 buğday örneği materyal olarak kullanılmıştır. Bu 50 örneğin her biri için, ürün yığının farklı yön ve derinliklerinden yaklaşık 5 kg tane örneği oluşturmak üzere, yığın büyüklüğüne göre 5-15 noktadan birincil örnekler alınıp karıştırılmıştır. Bu karışımdan 1 kg alt örnek temiz plastik poşetlere konularak etiketlenip uygun koşullarda laboratuvara getirilmiştir (Lavkor, 2013). Örnekler, analiz aşamasına kadar etiketli kâğıt torbalar içerisinde 4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.1.1. Kimyasallar, Kitler, Kültür Ortamları

Çizelge 1'de çalışmada kullanılan kimyasallar, kitler ve temel malzemeler listelenmiştir.

Çizelge 3.1. Kimyasalların, kitlerin, kültür ortamlarının ve temel öğelerin listesi

Materyal Adı	Kullanım Gerekçesi
Potato Dextrose Agar (PDA)	A. section <i>Flavi</i> izolasyonu için besiyeri
Sodium Hypochloride (NaOCl)	Buğday tanesi sterilizasyonu
Agar	Tek spor izolasyonunda su agarı hazırlığı
Fungi/Yeast Genomic DNA İzolasyon kiti	Fungal DNA izolasyonu
Sodium Chloride (NaCl)	DNA izolasyonu
10X DreamTaq Master Mix buffer	Hedef genlerin çoğaltıldığı PCR aşaması
Agaroz	DNA jel elektroforezde jel hazırlığı
TBE (Tris/Borate/EDTA) buffer	DNA jel elektroforez için tampon
DyeAll Staining Solution	DNA jel elektroforezde jel hazırlığı
100 bp DNA Ladder	DNA jel elektroforezde DNA standardı
<i>HhaI</i> , <i>MwoI</i> , <i>AlwI</i> Fast Digest enzimleri	RFLP tekniğinde kullanılan restriksiyon enzimleri

3.2. Metot

Temin edilen buğday örneklerinden A. section *Flavi* izolasyonu yapılmıştır ve elde edilen izolatlarda baskın A. section *Flavi* üyelerine ait türlerin morfolojik ve moleküler olarak tanımlamaları yapılmıştır. A. section *Flavi* üyesi fungus türlerinin ITS, IGS ve β -tubulin gen bölgeleri ile aflatoxin biyosentezinde görevli *NorA*, *NorB*, *pksA*, *ver-1*, *AflR* gen bölgeleri taranmıştır.

3.2.1. Buğday Tohumlarından A. section *Flavi* İzolasyonu

Her bir buğday örneğinden rastgele seçilen 20 adet buğday tanesi %2'lik Sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonunda 2 dakika süreyle yüzeysel olarak dezenfekte edilmiştir. Daha sonra 2 kez

steril distile suda çalkalanıp steril kurutma kağıtlarında kurumaya bırakılmıştır. İzolasyonlarda Potato Dextrose Agar (PDA) besi ortamı kullanılmıştır. Otoklavın ardından bakteri kontaminasyonunu önlemek amacıyla PDA besiyerine 50 µg ml⁻¹ ampisilin eklenmiştir. Yüzeysel olarak dezenfekte edilen ve kurutulan buğday tanelerinden bir petriye 5 adet buğday tanesi olacak şekilde petrilere ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler 25°C’de, karanlık koşullarda 5-7 gün arası inkübe edilmiştir. PDA ortamında gelişen koloniler üzerinde büyüme, sporulasyon oluşumu yönünden incelenen kolonilerden *A. section Flavi* ailesine ait olabilecek izolatlar PDA besiyerine ekilerek saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiş ve 25°C’de 5-7 gün inkübe edilmiştir.

A. section *Flavi* Tek Spor İzolasyonu

Tek spor izolasyonunda %2’lik su agarı, 100 ml distile su ile 2 g agar çözdürülerek hazırlanmıştır. İzolasyondan sonra saflaştırılmış ve henüz orijinalliğini kaybetmemiş kolonilerden, aseptik koşullarda, steril bir lam üzerine 100 µl steril distile su damlatılmış ve öze iğne ucu ile bir miktar miselyum alınıp bu suyun içerisine batırılarak spor süspansiyonu elde edilmiştir. Daha sonra, içerisinde antibiyotikli su agarı bulunan petri kaplarındaki agar yüzeyine, çember uçlu öze (lup) ile bir öze dolusu spor süspansiyonu çizilerek dağıtılmış ve bu petriler 12 saat süreyle 25°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir.

Yaklaşık 12-24 saat sonra çimlenen tek spor, mikroskopta belirlenerek bir öze iğne veya pipet ucu yardımıyla çevresindeki 2-3 mm’lik agar bloğu ile birlikte yeni PDA besi ortamına taşınmış ve 25°C’de 5-7 gün arası inkübe edilmiştir. Elde edilen tek spor izolatlarının koloni gelişimi, morfolojik büyüme özellikleri izlenerek kaydedilmiştir.

Tek spor izolasyonu sonrasında yatık agar ve kâğıt izolasyonu yapılarak elde edilen izolatlardan daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stok hazırlanmıştır. Bunun için öncelikle, gelişen fungal kolonilerden PDA besiyeri içeren yatık agarlara alınarak 25°C’de 5-7 gün arası inkübe edilmiştir. Her örnek 3 tekerrürlü olarak hazırlanmıştır. Aynı şekilde tek spor izolasyonu sonrasında PDA besiyerine aktarılan ve gelişen kolonilerden antibiyotikli PDA besiyeri içeren petrilerin kenarlarına steril 4 kâğıt parçası koyulmuştur ve ortasına ekim yapılmıştır. Kağıtlar, üstlerine kadar gelişen sporlarla birlikte, daha önce hazırlanmış her örnek için 2’şer olacak şekilde steril edilmiş zarf şeklinde kağıtlar içerisine koyulmuştur ve etiketlenip -20°C’ye kaldırılmıştır.

3.2.2. Klasik Yöntemle Fungal Tür Tanımlamaları

Aspergillus izolatlarının tanımlanması için kültürel ve morfolojik özellikler esasından özel tanı anahtarları kullanılmıştır. Fungus tanımında *Aspergillus* türleri için PDA ve Czapek agar besi ortamı kullanılmıştır. *Aspergillus* türleri için; koloni rengi, yapısı, çapı ve ters yüzey rengi, konidyal başlığın yapısı, sklerotların varlığı, sterigmanın gelişimi (uniseriate ve biseriate oluşum), konidyofor yapısı gibi özellikler incelenmiştir.

Aspergillus tür teşhisinde, Raper ve Fennel (1977), Samson ve Pitt (1990), Ruiqian ve ark (2004), Rodrigues ve ark (2007), Varga ve ark (2011) tarafından geliştirilmiş spesifik tür teşhis anahtarları kullanılmıştır. İlk olarak izolatlar sterigma serilerinin uniseriate veya biseriate sıralanma durumuna göre ayrılmış, konidyal başlığın çapı ve şekli, konidyal başlığın rengi göz önüne alınarak ikinci ayırım değerlendirilmiştir. Daha sonraki ayrımlarda ise, sklerotların varlığı ya da yokluğu, konidyofor duvarının karakterleri ve renklenmesine dikkat edilmiştir. Bu amaçla, öncelikle izolatların bu gibi morfolojik özellikleri PDA ve Czapek agar ortamlarında, sıralanan basamaklar takip edilerek tanımlamalar yapılmıştır.

- a. 15-20 ml Czapek agar ortamları dökülen steril petrilerde gelişen tek spor izolatları 25°C’de 10-12 gün inkübe edilmiştir.
- b. İzolatlar, 4. günden başlanarak 12. güne kadar koloni gelişim oranını belirlemek amacıyla koloni çapı ölçülmüştür.
- c. Miselyumun rengi ve yapısı, kolonide kültür kabı tersinde oluşan renk belirlenmiştir.
- d. Konidyal başlığın oluşumu, rengi, şekli ve genişliği mikroskopta incelenerek kaydedilmiştir.
- e. Konidyoforun düz ya da pürüzlü olması, şekli, uzunluğu ve çapı değerlendirilmiştir.
- f. Sterigmanın gelişimi, uniseriate veya biseriate dizilim not edilmiştir.
- g. Sklerotların varlığı ya da yokluğu belirlenmiştir.

3.2.3. A. section *Flavi* İzolatlarından DNA izolasyonu

Moleküler olarak tür tanımlamaları Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi (Lavkor, 2019c) ve Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluğu Çeşitliliği (RFLP) yöntemi kullanılarak Krulj ve ark (2020)’nın bildirdiği yöntemle göre yapılmıştır.

İlk olarak A. section *Flavi* İzolatlarından DNA izolasyonu yapılmıştır. Tek spor izolasyonu sonrasında *Aspergillus* izolatlarının PDA besiyerine ekimi yapılmıştır ve 25°C’de 5-7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Fungal DNA izolasyonu Fungi/Yeast Genomic DNA İzolasyon kiti (Norgen Biotek Corp.) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Fungi/Yeast Genomic DNA İzolasyon kitin talimatlarına göre, içerisinde yer alan yıkama solüsyonu A (wash solution A) şişesine 42 ml %96-%100 etanol eklenmiştir. 1 litre toplama solüsyonu (% 0.9’luk NaCl – Distile su çözeltisi) hazırlanmıştır. Kit içerisindeki DNA İzolasyon basamakları aşağıda verilmiştir.

- a. 5 ml toplama solüsyonu petriye dökülmüş ve fungus sporları ve miselyumları alacak şekilde 1 ml’si bir 1.5 ml eppendorf tüpe aktarılmıştır.
- b. 14.000 g’de (12.358 rpm) 2 dakika santrifüj edilip oluşan süpernatant kısım (üstte kalan sıvı) pipetle alınıp atılmıştır.

- c. Altta kalan pellet üzerine 500 µl Liziz Buffer eklenmiştir ve vortekslenmiştir.
- d. İyice çözünmüş olan lizat, test kitinin içinden çıkan boncuk içeren tüpe aktarılmıştır.
- e. Maksimum hızda 10 dakika boyunca vortekslenmiştir.
- f. 65°C’de 10 dakika ısıtıcı blokta inkübe edilmiştir ve o esnada 2-3 dakika arayla Eppendorf tüpler ters düz edilerek karıştırılmıştır.
- g. Eppendorf tüplere kısa bir spin (5-10 sn) yapılarak boncuklar dibe çöktürülmüştür ve üstteki sıvı pipetle yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Bu aşamada boncuk almamaya özen gösterilmiştir.
- h. Örnekler 2 dakika 14.000 g’de santrifüj edilmiştir.
- i. Oluşan üst faz (süpernatant) yeni bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiştir. Ne kadar sıvı alındığı not edilerek aynı miktarda etanol (%96-%100 Etanol, 1’e 1 oranda, yaklaşık 500 ya da 600 µl olabilmektedir.) eklenmiştir. Ardından vortekslenmiştir.
- j. Üzerine test kitin içerisinde bulunan 300 µl solution BX eklenerek yavaşça vortekslenmiştir. Lizat, bu aşamadan sonra bağlanma aşaması için hazır hale gelmiştir.
- k. Test kitinin içinden çıkan filtre tüpü toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- l. 650 µl lizat filtre tüpüne pipetle aktarılmıştır.
- m. 1 dakika 10.000 g’de santrifüj edilmiştir. (10.445 rpm)
- n. Toplama tüpü içindeki sıvı dökülüp, filtre tüpü aynı toplama tüpüne yerleştirilip kalan lizat 10.000 g’de bir kez daha 1 dakika santrifüjle filtreden geçirilmiştir.
- o. 500 µl wash A solüsyonu filtre tüpüne eklenmiş ve 10.000 g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- p. Toplama tüpü içindeki sıvı dökülüp, filtre tüpü aynı toplama tüpüne yerleştirilip bir kez daha 500 µl wash A solüsyonu eklenmiştir ve 10.000 g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- q. 14.000 g’de 2 dakika filtre tüpü tekrar santrifüj edilerek iyice yıkama solüsyonundan iyice arındırılarak kuruması sağlanmıştır ve toplama tüpündeki sıvı dökülmüştür.
- r. Filtre tüpü kitin içinden çıkan elution tüpüne yerleştirilmiştir ve üzerine 50 µl Elution Buffer B eklenmiştir.
- s. Elution buffer eklenen elution tüpü, 10.000 g’de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Sonrasında altta kalan sıvı içerisinde DNA elde edilmiştir. DNA içeren Eppendorf tüpler kullanma aşamasına kadar -20°C’ye kaldırılmıştır.

3.2.4. PCR Yöntemiyle *A. section Flavi* İzolatlarının Belirli Gen Bölgelerinin Gösterilmesi

A. section Flavi izolatlarının belirli gen bölgelerinin PCR yöntemiyle gösterilmesi için ITS1/4 (White, 1990), IGS-F/R (El Khoury ve ark., 2011), Tub-F/R (Lavkor, 2020), norB-F/R, pksA-F/R, AfIR-F/R, NorA-F/R, ver-1-F/R (Dorner, 2008), AfIJ-F/R, CypX-F/R primer çifti kullanılmıştır (Chang ve ark., 2005). Çalışmada kullanılan primer çiftlerinin baz dizilimleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. PCR çalışmalarında kullanılan primerler ve baz dizilimleri

Primer Adı	Baz dizilimleri	Bant büyüklüğü (bp)
ITS1	TTCGTAGGTGAACCTGCGG	600
ITS4	CCTCCGTCTATTGATATGC	
IGS-F	AAGGAATTCAGGAATTCTCAATTG	674
IGS-R	TCCACCGGCAAATCGCCGTGCG	
Tub-F	CTCGAGCGTATGAACGTCTAC	340
Tub-R	AAACCCTGGAGGCAGTCGC	
norB-F	GTGAGGGATAGCAATAAGTGT	452
NorB-R	TCCTGGATTTCGCGCATAC	
pksA-F	GCTGGGATTCTGCATGGGTT	416
pksA-R	CCATCTGAGGCATCGCACA	
AflR-F	GGAAACAAGTCTTTTCTGG	766
AflR-R	CAGAGCGTGTGGTGGTTGAT	
NorA-F	GGAGCACCTCAAGGAGAACA	759
NorA-R	GGAACCTTGCGTCGATTCTA	
ver-1-F	AGCCAAAGTCGTGGTGAAC	785
ver-1-R	CCATCCACCCCAATGATCT	
AflJ-F	CTTCAACAACGACCCAAGGTT	435
AflJ-R	AGATGAGATACACTGCCGCA	
CypX-F	GGAGCCTACCATTGCAACA	393
CypX-R	GGCTTTGACGAACAGATTCCG	

PCR aşamasında, PCR reaksiyon karışımı toplam 25 µl olacak şekilde; 1 µl *A. section Flavi* izolatından elde edilen genomik DNA, 12.5 µl Master Mix buffer (Thermo Science, 10X Dream Taq Green Buffer), 1 µl primer F (forward, 10 pmol), 1 µl primer R (reverse, 10 pmol), 9.5 µl ddH₂O olarak hazırlanmıştır. Karışımın bulunduğu tüpler thermocycler cihazına koyulmuştur ve primerler için belirlenen döngü programı kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

Elde edilen PCR ürünleri % 1.5'lik agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak gözlenmiştir. %1.5'lik jel hazırlanması için 1.5 g Agarose 100 ml TBE (Tris/Borate/EDTA) buffer ile mikrodalgada çözdürülmüştür. Oda sıcaklığında biraz bekletildikten sonra jel solüsyonu içerisine 5 µl DyeAll Staining Solution eklenerek hafifçe karıştırılmıştır. Jelin donması için tanka döküldükten sonra karanlık ortamda bekletilmiştir. Donmuş jele 5 µl DNA Ladder (100 bp, Solis BioDyne) ve 10 µl PCR ürünü yüklenmiştir ve 90 voltta 60 dakika yürütülmüştür.

Çizelge 3.3. PCR için kurulum programı ve döngü sayısı

ITS1/4	
94°C'de 5 dakika	
94°C'de 60 saniye	
55°C'de 60 saniye	40 döngü
72°C'de 60 saniye	
72°C'de 2 dakika	
IGS-F/R	
94°C'de 4 dakika	
94°C'de 60 saniye	
57°C'de 40 saniye	35 döngü
72°C'de 1 dakika	
72°C'de 10 dakika	
Tub-F/R	
95°C'de 3 dakika	
95°C'de 30 saniye	
60°C'de 30 saniye	40 döngü
72°C'de 1 dakika	
72°C'de 10 dakika	
<i>norB, pksA, AflR, NorA, ver-1</i>	
95°C'de 5 dakika	
95°C'de 30 saniye	
55°C'de 20 saniye	38 döngü
72°C'de 30 saniye	
72°C'de 10 dakika	

3.2.5. A. section Flavi Üyesi Türlerin RFLP Yöntemiyle Tanımlanması

ITS1/ITS4 primerleriyle çoğaltılan PCR ürünlerinin *HhaI* ve *MwoI*, Bt2a/Bt2b primerleriyle çoğaltılan PCR ürünlerinin *AlwI* restriksiyon enzimleri kullanılarak belirli bölgelerden kesim işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak 10 µl PCR ürünü, 2 µl 10x Fast Digest tamponu, 2 µl Fast Digest enzimi ve 16 µl Nuclease-free dH₂O karışımı hazırlanmıştır. *HhaI* ve *MwoI* enzimlerinin inkübasyonu 37 °C'de 10 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.4). Kesim işlemi, *MwoI* ile gerçekleştirilen inkübasyonun ardından 80 °C'de 20 dakikada sonlandırılırken, *HhaI* ile kesilen PCR ürünlerine termal inaktivasyon uygulanmamıştır (Krulj ve ark., 2020). Çalışmada diğer gen bölgesi olan *β-tubulin* için amplikonlar (primerler Bt2a/Bt2b), *AlwI* (BspPI) enzimi (Thermo Scientific, ABD) ile 4 saat boyunca 55 °C'de kesilmiş ve 80 °C'de 20 dakika süreyle termal inaktivasyon uygulanmıştır (Nasri, 2015). Tüm inkübasyonlar PCR cihazında (thermal cycler) gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon fragmanları %2'lik DNA jel elektroforezde görselleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. RLFP yönteminde kullanılan reaksiyon karışımının içeriği.

Reaktifler (konsantrasyon)	Miktar (µl)
PCR Ürünü	10
Tampon Buffer (10X)	2
Fast Digest Enzim (15 U/µl)	2
ddH ₂ O	16
Toplam Hacim	30

3.2.6. A. section *Flavi* Üyelerinin Hedef Genlerinin Doğrulanması ve Filogenetik Çalışmalar

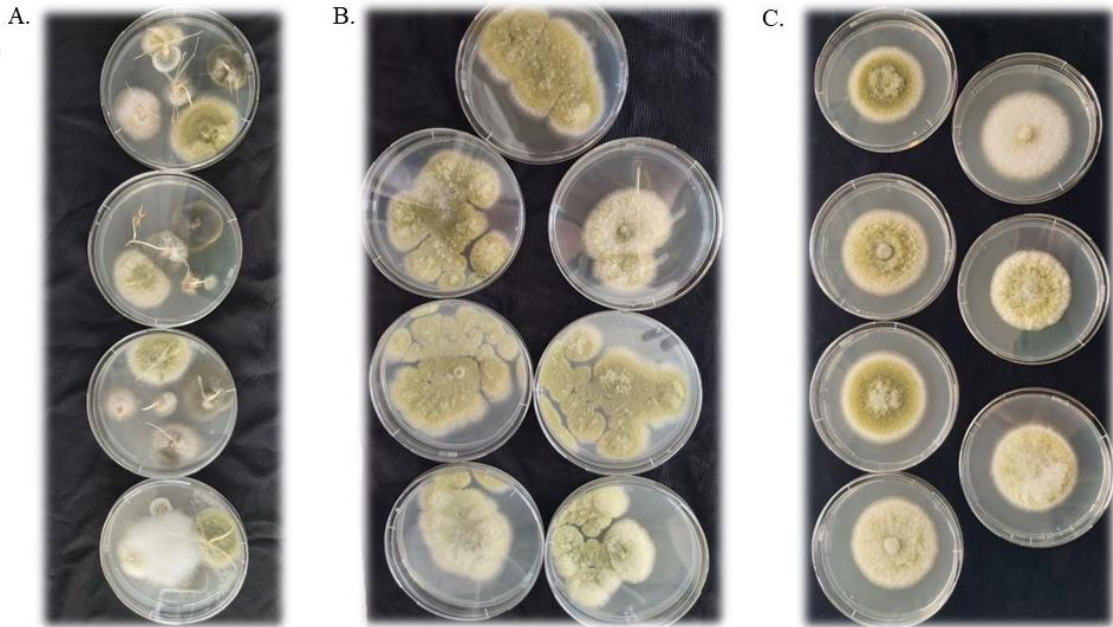
Bu çalışmada, A. section *Flavi* üyesi beş örneğin β -tubulin gen bölgesi Bt2a/Bt2b primer çiftiyle ve ITS gen bölgesi ITS4/ITS5 primer çiftiyle amplifiye edilmiş ve DNA dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen β -tubulin gen dizileri, CLUSTAL X (Chenna vd., 2003) programı kullanılarak çoklu nükleotid dizilim analiziyle hizalanmıştır. Tür tayini ise, GenBank veri tabanının BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) aracı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) kullanılarak nükleotid dizilerinin benzerlik analizleri ile yapılmıştır. DNA dizileri, MEGA X programı yardımıyla Neighbor-Joining metodu (Saitou ve Nei, 1987) kullanılarak sınıflandırılmış ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Buğday Tohumlarından *A. section Flavi* İzolasyonu

Toplamda çalışılan 40'ı ithal (Ukrayna, Rusya, Suriye, Romanya) ve 10'u yerel (Denizli, Afyonkarahisar, Siirt) 50 buğday örneğinin yerel olan örneklerde *A. section Flavi* ailesinden izolata rastlanmamıştır. İthal olan örneklerin ise 16'sından 25 adet *Aspergillus* izolatu elde edilmiştir. Elde edilen bu izolatların tür bazında tanımlamaları klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). Ayrıca bu 16 ithal buğday örneğinde *Aspergillus* dışında farklı küflerle de karşılaşmış ve koloni morfolojileri incelendiğinde bunların *Penicillium* cinsi küfler olduğu görülmüştür. Aynı zamanda *Penicillium* cinsi küfler farklı 10 yerel örnekten de izole edilmiştir.



Şekil 4.1. Morfolojik yöntemle tanımlanan *Aspergillus* izolatları. A . Buğday tanelerinin 5-7 gün boyunca 25°C'de PDA besiyerinde gelişen *Aspergillus* izolatları. B. Tek spor izolasyonu sonrasında gelişen *Aspergillus* izolatları. C. PDA besiyerinde saflaştırılan *Aspergillus* izolatları.

4.2. Klasik Yöntemle Fungal Tür Tanımlamaları

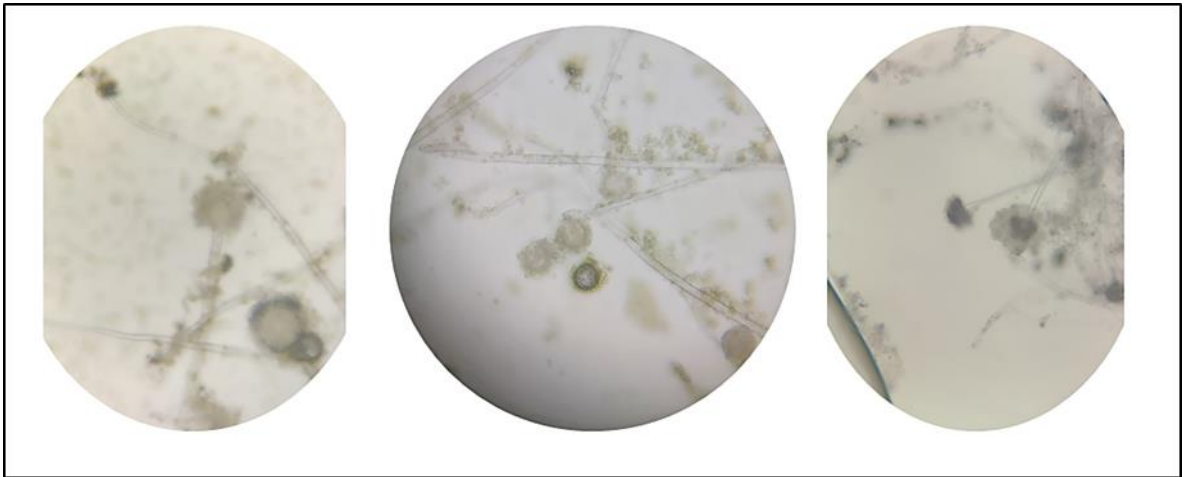
Mikolojik izolasyonlar sonucunda, yoğun olarak belirlenen *Aspergillus* izolatları kültürel ve morfolojik özellikler esassından özel tanı anahtarları kullanılarak tanımlanmıştır. İzolatlar, 25°C'de 10-12 gün boyunca PDA ortamında inkübe edilmiş ve koloni çapı ölçümleri yapılmıştır. Tüm izolatlarda koloni çapı 60-70 mm arasında değişim göstermiştir. Kolonilerin üst yüzeyi sarımsı-yeşil tonlarında olup, ters çevrildiğinde alt kısımlarda sarımsı kahverengi pigment oluşumu gözlemlenmiştir. Konidial başlıklar küresel yapıda olup, çapları 20-50 µm arasında ölçülmüştür. Başlıklarda biseriate (çift sıra) sterigma dizilimi tespit edilmiştir. Sklerot varlığı, tüm izolatlarda koyu kahverengi-siyah renkte düzensiz yapılar olarak gözlemlenmiştir. Konidiyoforlar düz yapıda

olup, yüzeyleri pürüzsüz görünümündedir. Gözlemlenen bu özellikler, 25 izolatın da *Aspergillus flavus* olduğunun önemli bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Bu bulgular, *A. flavus*'un karakteristik özellikleriyle uyumlu bulunmuştur ve literatürde daha önce bildirilen sonuçlarla tutarlılık göstermektedir.

Cotty (1997), Amerika Birleşik Devletleri'ndeki pamuk ekili tarım alanlarında *Aspergillus* section *Flavi* topluluklarının varlığını ve aflatoksin üretim potansiyelini belirlemeyi amaçladığı çalışmasında, *A. flavus* türünün sıcak bölgelerde baskın olduğunu ve bu durumun sıcaklık ile birlikte görülen bir artışla ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen izolatların da tamamının *A. flavus* olarak tanımlanması, bölgenin sıcak ve nemli koşullarına uygun tür dağılımını destekler niteliktedir. Cotty'nin (1997) çalışmasında belirtildiği gibi, sıcak bölgelerde *A. flavus* türünün baskın olduğu gözlenmiştir.

Giorni ve arkadaşları (2007), Kuzey İtalya'da hayvan yeminden izole edilen *Aspergillus* section *Flavi* topluluklarının %93'ünün *A. flavus* türüne ait olduğunu rapor etmiş ve bu türün diğer üyelere kıyasla baskın olduğunu ortaya koymuştur. Bu tez çalışmasında da buğdaydan izole edilen izolatların yalnızca *A. flavus* türüne ait olması, bu türün gıdalarda baskın bir tür olduğunu göstermektedir.

Thathana ve ark (2017), *A. flavus* izolatlarının PDA besiyerinde koloni büyüklükleri, pigment oluşumu ve sklerot yapıları gibi özelliklerini detaylı şekilde tanımlamış ve bu özelliklerin hızlı tanı için önemli olduğunu vurgulamıştır. Bu tez çalışmasında gözlemlenen koloni özellikleri (örneğin koloni çapı ve pigment oluşumu), Thathana'nın yaptığı çalışmada belirttiği *A. flavus* özellikleriyle aynı sonuçlar göstermiştir.



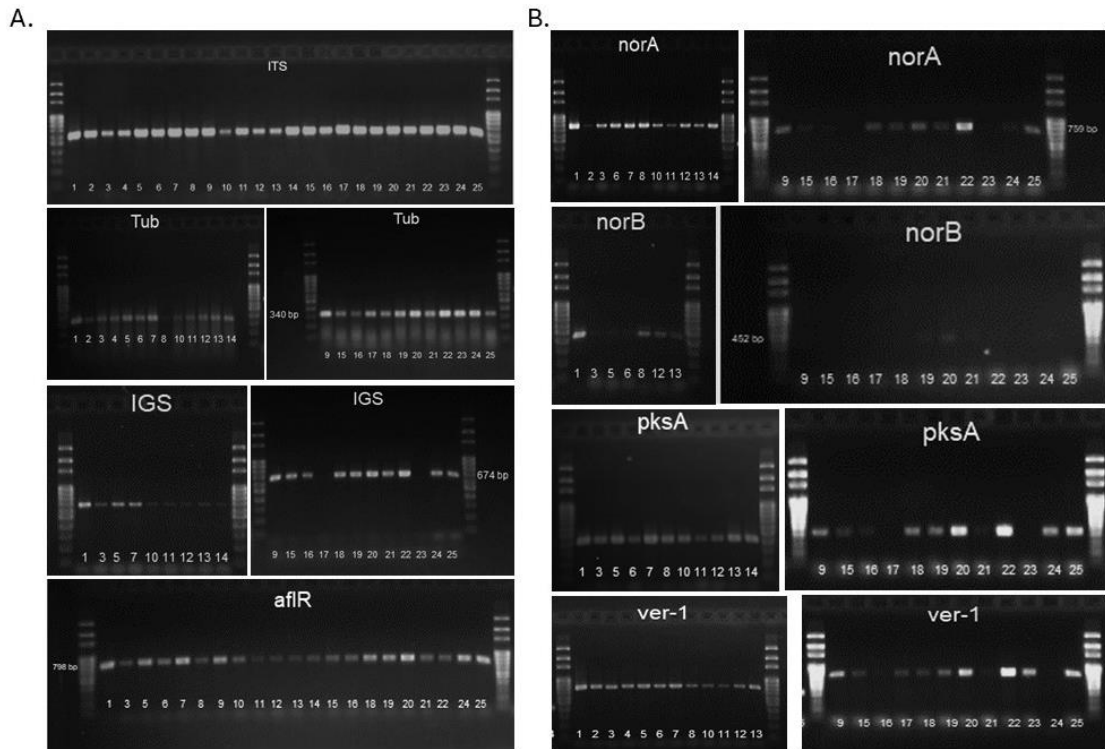
Şekil 4.2. *Aspergillus flavus* izolatına ait konidyal başlık ve konidiyoforun mikroskop görüntüsü (40X büyütme). Görüntüde, küresel/yarı küresel şekilli ve yeşilimsi renkteki konidyal başlıklar, biseriate (çift sıra) sterigma dizilimiyle birlikte görülmektedir. Konidiyoforlar, pürüzsüz yüzeyli ve uzun yapıda olup konidyal başlıklarla birleştiği noktada belirginleşmektedir. Bu yapılar, *A. flavus* türüne özgü karakteristik morfolojik özellikleri göstermektedir.

4.3. Moleküler Yöntemle Fungal Tür Tanımlamaları

Mikotoksin üreticileri de olan bu *Aspergillus* section *Flavi* üyeleri koloni yapısı, çapı, renk ve konidial yapıları içeren morfolojik özellikleri ile tanımlanmasının (Klich, 2002) yanı sıra türler arası benzerliklerden dolayı morfolojik özellikler tek başına yeterli olmamakta (Frisvad ve ark., 2006; Samson ve ark., 2006) ve bu nedenle, *A. section Flavi* üyelerinin tanımlanmasında moleküler analizler de kullanılmaktadır.

4.3.1. PCR Yöntemiyle *A. section Flavi* İzolatlarının Belirli Gen Bölgelerinin Gösterilmesi

DNA izolasyonları yapılan 25 *Aspergillus* izolatının hedeflenen Tub (340 bp), IGS (674 bp), ITS (600 bp), *aflR* (798 bp), *norA* (759 bp), *norB* (452 bp), *pkSA* (416 bp), *ver-1* (785 bp) gen bölgeleri PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Gen bölgelerinin konsantrasyon ve saflığını kontrol etmek için görselleştirme amacıyla tüm PCR ürünlerinde DNA jel elektroforezi (%1.5) gerçekleştirilmiştir. Jel görüntüleri, her bir gen için sadece bir belirgin bant göstermiştir, bu da her amplifikasyon işleminin başarılı bir şekilde tamamlandığını doğrulamaktadır. Şekil 4.3'te %1.5'lik jel elektroforez görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.3. DNA izolasyonları yapılan 25 *Aspergillus* izolatının hedeflenen genleri olan A) Tub (340 bp), IGS (674 bp), ITS (600 bp), *aflR* (798 bp), B) *norA* (759 bp), *norB* (452 bp), *pkSA* (416 bp) ve *ver-1* (785 bp) genlerinin PCR ürünlerinin DNA jel elektroforezi sonuçları.

Toplamda, ITS gen bölgesine sahip 25 PCR ürününde 600 bp büyüklüğünde bant gözlenmiştir. β -tubulin (Tub) gen bölgesine sahip 24 PCR ürünü 340 bp büyüklüğünde bant oluşturmuştur. IGS gen bölgesine sahip 19 PCR ürününde 674 bp, *aflR* gen bölgesine sahip 21 PCR ürününde 798 bp, *norA* gen bölgesine sahip 21 PCR ürününde 759 bp ve *norB* gen bölgesine sahip 8 PCR ürününde 452 bp büyüklüğünde bantlar tespit edilmiştir. Ayrıca, *pksA* gen bölgesine sahip 21 PCR ürünü 416 bp büyüklüğünde bant oluşturmuş, *ver-1* gen bölgesine sahip 21 PCR ürününde ise 785 bp büyüklüğünde bant gözlenmiştir.

Bu çalışmada, *Aspergillus flavus* izolatlarının aflatoksin biyosentezinde rol oynayan gen bölgelerinin varlığı ve amplifikasyon başarısı PCR yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bulgularımız, farklı gen bölgelerinde gözlenen amplifikasyon oranlarının, gen varlığı ve genetik çeşitlilik ile ilişkilendirilebileceğini göstermektedir. Örneğin, ITS ve Tub gen bölgelerinin amplifikasyon oranlarının yüksekliği (%100 ve %96) bu bölgelerin evrimsel olarak daha korunmuş olduğunu işaret etmektedir. Bu durum, Ehrlich ve ark. (2007) ile benzer şekilde, ITS gen bölgesinin *Aspergillus* türlerinin moleküler tanımlanmasında güvenilir bir biyobelirteç olduğunu vurgulamaktadır.

Aflatoksin biyosentezinde doğrudan rol oynayan *aflR*, *norA*, *norB*, *pksA* ve *ver-1* gibi genlerin bazı izolatlarda amplifiye olmaması, aflatoksijenik olmayan suşların varlığına işaret edebilmektedir. Benzer şekilde, Gallo ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada, Kuzey İtalya'da mısırdan izole edilen 67 *Aspergillus* izolatının β -tubulin ve calmodulin gen bölgelerinin yanı sıra *aflR*, *aflS* (*aflJ*), *aflD*, *aflM*, *aflO*, *aflP* ve *aflQ* gibi aflatoksin biyosentez genleri hedef alınarak PCR analizi yapılmıştır. Çalışmada, gen bölgeleri farklılıklarına bağlı olarak *Aspergillus* suşlarının aflatoksin üretme potansiyelinin gruplandırıldığı ve sadece tüm gen bölgelerine sahip olan suşların (Grup I) aflatoksin üretebildiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda, bazı genlerin (örneğin *norB*) izolatların bazılarında gösterilememesi, izolatlarımız arasında genetik çeşitliliğin bulunduğunu ve bu durumun toksin üretme kapasitesini etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Manonmani ve ark. (2005) tarafından *aflR* geni üzerine yapılan çalışmada, yalnızca aflatoksijenik *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinde pozitif amplifikasyon elde edilmiştir. Çalışmamızda ise *aflR* geni izolatların %84'ünde amplifiye edilmiştir. Bu sonuç, *aflR* geninin aflatoksijenik potansiyele sahip *A. flavus* izolatları için önemli bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir.

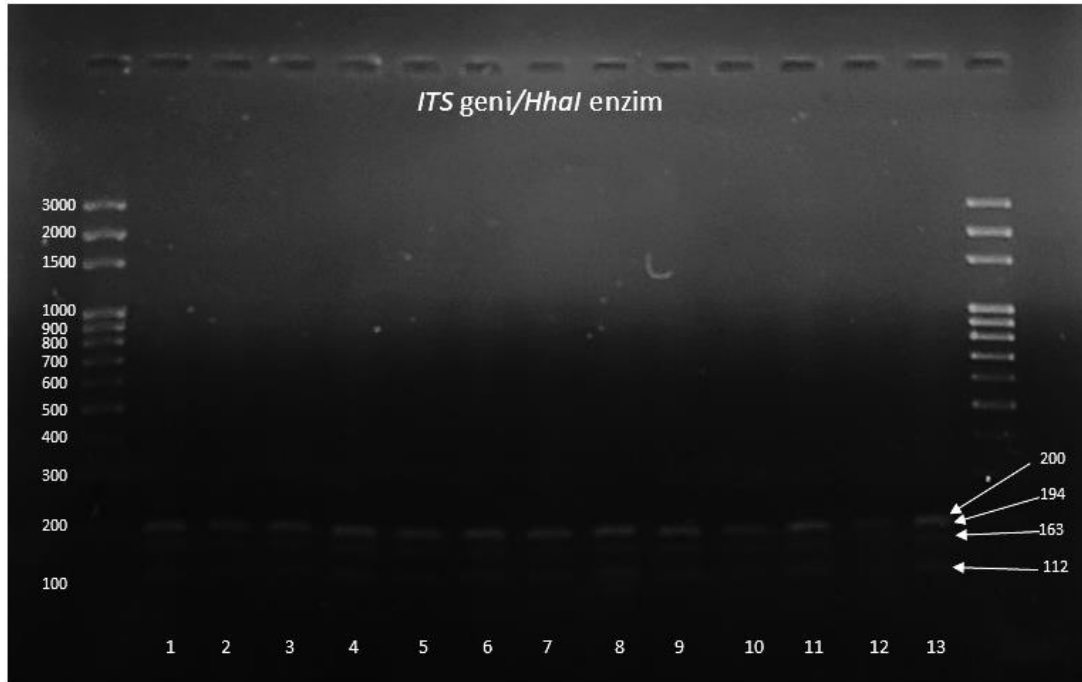
Lavkor (2019c), Adana'da yerfıstığı örneklerinden izole edilen *A. flavus* suşlarının %78'inde *aflR* ve *aflJ* genlerinin varlığını tespit etmiştir. Bu tez çalışmasında da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu bulgular, bölgesel ve çevresel koşulların (örneğin sıcaklık, nem, tarım uygulamaları gibi) *A. flavus*'un genetik yapısını şekillendirebileceğini ve aflatoksin biyosentezinden sorumlu genlerin varlık oranlarını etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bu tez çalışmasında *aflR* geninin amplifikasyon oranı (%84), Lavkor'un bulgularıyla uyumlu bulunmuştur. Farklı coğrafi bölgelerde yapılan çalışmaların sonuçları karşılaştırıldığında benzer gen amplifikasyon oranlarının gözlemlenmesi, *A. flavus*'un genetik yapısının bazı seçici baskılara karşı dirençli olabileceğini

düşündürmektedir. Ancak bununla birlikte, lokal çevresel koşulların etkisi ve popülasyon içindeki genetik çeşitliliğin sınırları da dikkate alınmalıdır. Bu noktada daha kapsamlı popülasyon genetiği analizleri bu gözlemi destekleyecektir.

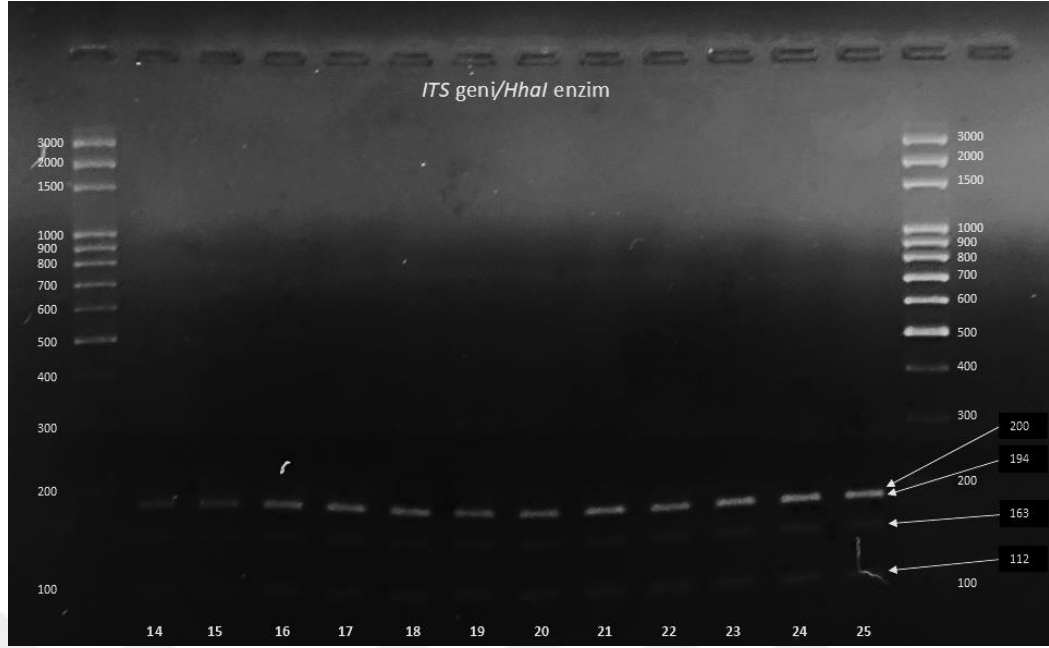
Sonuç olarak, çalışmamız, *A. flavus* izolatlarının aflatoksin biyosentezinden sorumlu genlerinin varlığı açısından yapılan önceki çalışmalarla tutarlılık göstermektedir. Bulgularımız, genetik çeşitliliğin ve gen dağılımının hem çevresel hem de bölgesel faktörlerin etkisi altında olabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak düşük amplifikasyon oranlarına sahip bazı genler için, bu sonuçların doğrulanması adına daha ileri moleküler analizlere ihtiyaç vardır. Gelecekteki çalışmalar, gen ekspresyon seviyelerinin yanı sıra toksin analizleriyle desteklenerek aflatoksijenik potansiyelin daha ayrıntılı bir şekilde ortaya konmasını sağlayabilir.

4.3.2. A. section Flavi Üyesi Türlerin RFLP Yöntemiyle Tanımlanması

ITS1/ITS4 primerleriyle çoğaltılan 25 PCR ürünü *HhaI* ve *MwoI* restriksiyon enzimleriyle kesilmiş; Bt2a/Bt2b primerleriyle çoğaltılan 25 PCR ürünü ise *AlwI* restriksiyon enzimiyle kesilmiştir.



Şekil 4.4. ITS1/ITS4 primerleri ile çoğaltılan 13 PCR ürününe *HhaI* restriksiyon enzimiyle kesim sonuçlarının %2 agaroz jel elektroforez görüntüsü.



Şekil 4.5. ITS1/ITS4 primerleri ile çoğaltılan 12 PCR ürününe *HhaI* restriksiyon enzimiyle kesim sonuçlarının %2 agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Bu çalışmada, elde edilen 25 izolatın *HhaI* enzimiyle yapılan kesim işlemi sonucunda ITS gen bölgesinin sırasıyla 200 bp, 194 bp, 163 bp ve 112 bp boyutlarında dört fragmana ayrıldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.5). Bu bant profili, hedeflenen bölgelerin başarılı bir şekilde kesildiğini ve *A. flavus* türü ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Krulj ve ark (2020) çalışmasında, *A. flavus* türünün tanımlanmasında ITS gen bölgesinin PCR-RFLP yöntemiyle kesildiği belirtilmiştir. Bu çalışmada, *HhaI* enzimiyle yapılan PCR ürünlerinin kesilmesi sonucunda, *A. flavus* türüne ait DNA'nın 200 bp, 194 bp, 163 bp ve 112 bp boyutlarında dört fragmana ayrıldığı tespit edilmiştir. Bu bant profilleri, *A. flavus* için karakteristik bir RFLP profili oluşturmuştur. Bu tez çalışmasında da kullanılan PCR-RFLP yöntemi, *A. flavus* türünün tanımlanmasında benzer doğrulukta sonuçlar vermiştir.

Ćurčić ve ark (2024) tarafından yapılan çalışma, *A. flavus* türünün genetik varyasyonlarını anlamak amacıyla ITS1-5.8S rDNA-ITS2, β -tubulin ve calmodulin gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu ve bu ürünlerin *MwoI* ve *HhaI* gibi restriksiyon enzimleriyle kesilmesini içermektedir. Elde edilen PCR-RFLP profilleri, literatürle uyumlu olarak *A. flavus* türünün tanımlanmasında etkili bir yöntem olarak öne çıkmıştır. Bu yöntemin, gıda endüstrisinde *A. flavus* ve diğer aflatoksin üreten türlerin izlenmesinde faydalı bir araç olduğunu belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında da PCR-RFLP yöntemiyle *A. flavus* türünün tanımlanmasında benzer doğrulukta sonuçlar elde edilmiştir.

Restriksiyon enzimleri ile yapılan kesimlerin, izolatların doğru bir şekilde tanımlanmasında önemli bir rol oynadığı anlaşılmaktadır. Bunun yanı sıra, literatürdeki çeşitli çalışmalarda da PCR-RFLP yöntemi ile elde edilen bulgular, çevresel ve klinik izolatlar arasında genetik varyasyonların bulunduğunu ve bu varyasyonların aflatoksin üretimi ile ilişkilendirilebileceğini göstermektedir.

Gelecekteki çalışmalar, bu yöntemlerin doğruluğunu daha da artırarak, *A. flavus* ve diğer *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında daha geniş çaplı uygulamalara olanak tanıyacaktır.

4.3.3. *A. section Flavi* Üyesi Türlerin ITS ve β -tubulin gen bölgelerinin dizilenmesi ve NCBI veri tabanı ile karşılaştırılması

Yirmi beş izolattan rastgele seçilen beş izolatin (şüpheli *A. flavus*) genomik DNA'sındaki hedef gen bölgelerine ait (ITS ve β -tubulin) dizileme işlemi iki primerle (Forward ve Reverse) belirlenmiştir. Bu hedef gen dizilerinin doğrulanması ve ilgili genlerin dizileme sonuçları Chromas programı ile açılarak FASTA formatlarında indirilmiştir. Ardından tüm bu diziler, NCBI veri tabanındaki referans dizileriyle NCBI Nükleotid BLAST kullanılarak karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.1'de seçilen beş izolatin ITS gen bölgelerinin erişim numaraları, gen bölgesi, Gen Bankasında yüksek genetik benzerlik gösterdikleri izolatlarla karşılaştırıldığında çıkan benzerlik oranları gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Seçilen beş izolatin ITS gen bölgelerinin GenBank veri tabanında yüksek genetik benzerlik gösterdikleri izolatlarla karşılaştırıldığında çıkan benzerlik oranları.

İzolat No	Gen bölgesi	İzolat Erişim numarası	Gen Bankasında En Çok Genetik Benzerlik Gösterdikleri İzolat İsimleri	Benzerlik Oranı (%)	Erişim Numarası
7ITSWUIBI	ITS	PQ686748.1	<i>A. flavus</i> isolate L-808/2013 internal transcribed spacer 1	100	MN533875.1
9ITSWUIBI	ITS	PQ686749.1	<i>A. flavus</i> strain CTd-R-EPI-9C small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99.65	OQ732719.1
15ITSWUIBI	ITS	PQ686750.1	<i>A. flavus</i> strain IBB_17 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene	100	MH793837.1
19ITSWUIBI	ITS	PQ686751.1	<i>A. flavus</i> isolate L-808/2013 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene	99.81	MN533875.1
20ITSWUIBI	ITS	PQ686752.1	<i>A. flavus</i> clone 7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer	100	PQ687575.1

Bu çalışmada, 25 *Aspergillus* izolatından rastgele seçilen beş izolatin (şüpheli *A. flavus*) moleküler olarak tanımlanmasında, ITS ve β -tubulin gen bölgelerine yönelik dizileme yapılmış ve bu izolatlar NCBI veri tabanındaki referans dizileriyle karşılaştırılmıştır. Yapılan dizileme analizleri sonucunda, beş izolatin şu aşamada sadece ITS gen bölgelerinin analizi yapılabilmış ve bu analize göre *A. flavus* benzerlik oranının %99-100 olduğu görülmüştür. β -tubulin gen bölgelerine yönelik dizileme işlemi devam etmektedir. Beş izolatin β -tubulin gen bölgelerinin NCBI Genbankası'ndan erişim numaraları vaktinde tarafımıza iletilmediğinden analiz sonuçları teze eklenememiştir.

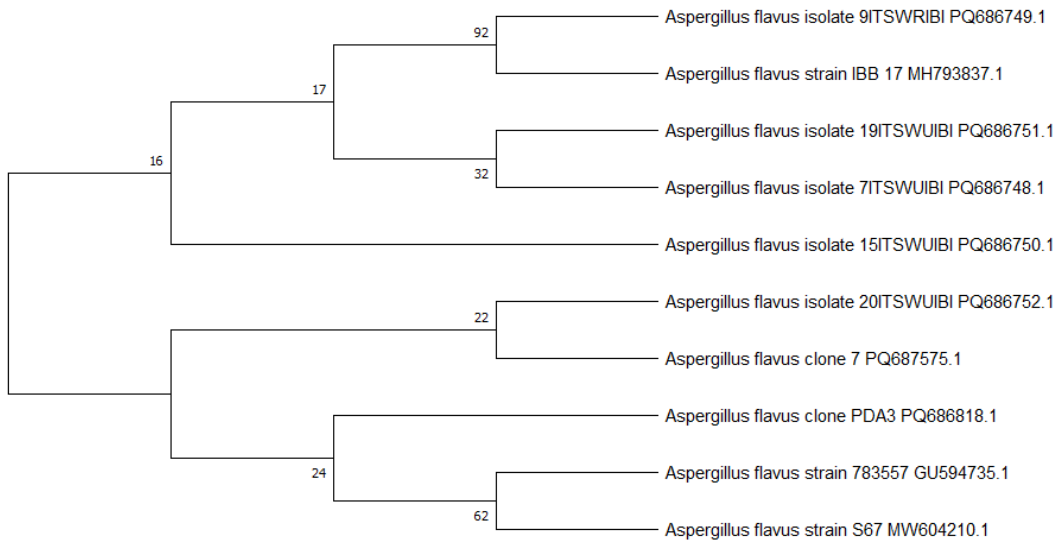
Lavkor (2019b) tarafından yapılan bir çalışmada, Adana ve Osmaniye illerinden toplanan yarfıstığı örneklerinden izole edilen *A. section Flavi* üyeleri üzerinde yapılan moleküler tanımlamalar, β -tubulin gen bölgesi PCR ürünlerinin BLAST analizi yapılarak GenBank veri

tabayıyla karşılaştırılması sonucunda, *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerine ait izolatların sırasıyla %89-100 ve %96-100 oranında benzerlik gösterdiğini bildirmiştir. Bu da β -tubulin gen bölgesinin *Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında oldukça güvenilir bir genetik işaretleyici olduğunu ortaya koymaktadır. Bu tez çalışmasında *A. flavus* türünün GenBank veri tabayıyla karşılaştırılması sonucunda %99-100 benzerlik göstermesi, bu durumun tür içi varyasyonun sınırlı olabileceğini düşündürmektedir.

Lavkor (2019b) çalışmasında, *A. section Flavi* üyesi izolatlar arasında *A. flavus* türünün en sık tespit edilen tür olduğunu belirtmiştir ve benzer şekilde bu tez çalışmasında da yoğun olarak *A. flavus* türü tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma, *A. flavus* türünün moleküler tanımlamasında ITS ve β -tubulin gen bölgeleri kullanılarak elde edilen dizileme sonuçlarının güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır.

Filogenetik Analiz Çalışmaları

Yürütülen filogenetik analiz çalışmalarında, DNA dizi analizinden elde edilen ITS gen bölgesi dizisi CLUSTAL X (Chenna vd., 2003) programında hizalanmıştır. *A. flavus* olarak tanımlanan izolatların ITS geninin DNA dizileri ile NCBI veri tabanından yüksek benzerlik gösteren beş *A. flavus*'un ITS geninin DNA dizileri MEGA X programı kullanılarak, Neighbourhood Joining metodu (Saitou ve Nei, 1987) ile sınıflandırılmış ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 5). β -tubulin gen bölgelerine yönelik dizileme işlemi devam etmektedir. Beş izolatın β -tubulin gen bölgelerinin NCBI Genbankası'ndan erişim numaraları vaktinde tarafımıza iletilmediğinden filogenetik ağaç henüz oluşturulamamıştır.



Şekil 4.6. Neighbor-joining yöntemine dayalı filogenetik ağaç, *A. flavus* izolatlarının ITS gen bölgelerinin arasındaki ilişkileri göstermektedir. 1000 bootstrap tekrarıyla oluşturulmuş olup dallar üzerindeki sayılar, bootstrap değerlerini/destek seviyelerini göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada buğdaydan izole edilen *Aspergillus* section *Flavi* üyelerinin morfolojik ve moleküler tanımlamaları gerçekleştirilmiş ve aflatoksin biyosentezinde yer alan *aflR*, *norA*, *norB*, *pksA*, *ver-1* genleri taranmıştır.

Sonuç olarak, izole edilen tüm *Aspergillus* türlerinin *A. flavus* olduğu ve bu izolatların aflatoksin biyosentezinde rol oynayan gen bölgelerine sahip olduğu görülmüştür. Morfolojik özellikler literatürde bildirilen *A. flavus* karakteristik özellikleriyle uyumlu bulunurken, ITS ve β -tubulin gibi korunmuş gen bölgelerine yönelik moleküler analizler de izolatların kimliklendirilmesini desteklemiştir. PCR-RFLP ve gen dizileme sonuçları, izolatların *A. flavus* türüne ait olduğunu doğrulamıştır.

Bu araştırma, buğday tanelerinden *A. section Flavi* üyelerinin izolasyonu ve tanımlamalarına odaklanmış ve tanımlamalar sonucunda sadece *A. flavus*'un örneklerde varlığı gösterilmiştir. Mikotoksin üreticileri de olan *A. flavus*'lar için aflatoksin üretiminde yer alan gen bölgelerinin taranması ve bu izolatların potansiyel toksijenik kapasitelerinin belirlenmiş olması önem taşımaktadır. Özellikle *aflR*, *norA*, *norB*, *pksA* ve *ver-1* gibi genlerin varlığı, bu izolatların aflatoksin üretme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Aflatoksin üretiminde rol oynayan genler bu izolatların toksijenik potansiyele sahip olduğunu gösterse de toksin üretiminin gerçek anlamda gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için daha ileri analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Real-Time PCR veya aflatoksin seviyesini doğrudan belirlemeye yönelik kromatografik ya da serolojik analizler, bu konudaki eksikliklerin giderilmesine katkı sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- Abdallah M.F, Girgin G, Baydar T., 2019. Mycotoxin Detection in Maize, Commercial Feed, and Raw Dairy Milk Samples from Assiut City, Egypt. Vet. Sci. 6(2): 57.
- Abd-Elsalam, K. A., Rai, M. 2020. An introduction to nanomycotoxicology. In Nanomycotoxicology (pp. 1-7). Academic Press.
- Afzal, H., Shazad, S., Qamar, S., Nisa, U. 2013. Morphological identification of *Aspergillus* species from the soil of Larkana District (Sindh, Pakistan). Asian Journal of Agriculture and Biology, 1(3), 105-117.
- Amaiike, S., Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. Annual review of phytopathology, 49(1), 107-133.
- Atehnkeng, J., Ojiambo, P. S., Ikotun, T., Sikora, R. A., Cotty, P. J., Bandyopadhyay, R. 2008. Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. Food additives and Contaminants, 25(10), 1264-1271.
- Bennett, J. W., Klich, M. 2003. Clinical microbiology reviews. Mycotoxins, 16(1), 497-516.
- Bryden, W. L. 2007. Mycotoxins in the food chain: human health implications. Asia Pacisif J. Clin. Nutr., 16, 95–101.
- Buchanan Jr, R. L., Ayres, J. C. 1976. Effect of sodium acetate on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. Journal of Food Science, 41(1), 128-132.
- Chang, P. K., Horn, B. W., Dorner, J. W. 2005. Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. Fungal Genet. Biol., 42, 914–923.
- Chen, R. S., Tsay, J. G., Huang, Y. F., Chiou, R. Y. Y. 2002. “Polymerase chain reaction mediated characterization of molds belonging to the *Aspergillus flavus* group and detection of *Aspergillus parasiticus* in peanut kernels by a multiplex polymerase chain reaction. J. FoodProtect., 65, 840-844.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G., Thompson, J. 2003. Multiple sequence alignment with the clustal series of programs. Nucleic Acids Research, 31,3497-3500.
- Codner, R. C., Sargeant, K., Yeo, R. 1963. Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. Biotechnology and Bioengineering, 5(3), 185-192.
- Cotty, P. J. 1997. “Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States”, Mycological Research, 101, 698–704.
- Criseo, G., Bagnara, A., Bisignano, G. 2001. Differentiation of aflatoxin-producing and nonproducing strains of *Aspergillus flavus* group. Lett. Appl. Microbiol., 33, 291-295.

- Christensen C. M., Nelson G. H., Speers G. M., Mirocha, C. J. 1973. Results of feeding tests with rations containing grain invaded by a mixture of naturally present fungi plus *Aspergillus flavus* NRRL 2999. *Feedstuffs*, 45(14): 20–41.
- Ćurčić, N., Miljanić, J., Stančić, A. B., Vukelić, I. 2024. PCR-RFLP method in combination with on-chip electrophoresis as a tool for determining of variability between important species of *Aspergillus*. *Food and Feed Research*, 31-39.
- Çoksöyler N. 1999. Farklı yöntemlerle kurutulan kırmızıbiberlerde *Aspergillus flavus* gelişimi ve aflatoksin oluşumunun incelenmesi. *Gıda*, 24 (5): 297-306.
- Dorner, M., 2008. Distribution and molecular characterization of aflatoxin-producing and nonproducing isolates of *Aspergillus* section *Flavi* for biological control of aflatoxin contamination in maize in Nigeria. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz, Doktor der Agrarwissenschaften der, 99 s.
- El Khoury, A., Atoui, A., Rizk, T., Lteif, R., Kallassy, M., Lebrihi, A. 2011. Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from pure culture and aflatoxin contaminated grapes using PCR-RFLP analysis of *aflR-aflJ* intergenic spacer. *Journal of Food Science*, 76, 247-253.
- Ehrlich, K. C., Cotty, P. J. 2002. Variability in nitrogen regulation of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 174–178.
- Ehrlich, K. C., Kobbeman, K., Montalbano, B. G., Cotty, P. J., 2007. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. *Int J Food Microbiol*, 114, 153–159.
- Frisvad, J. C., Thrane, U., Samson, R. A., Pitt, J. I. 2006. Important mycotoxins and the fungi which produce them. *Advances in food mycology*, 3-31.
- Gallo, A., Stea, G., Battilani, P., Logrieco, A. F., Perrone, G. 2012. Molecular characterization of an *Aspergillus flavus* population isolated from maize during the first outbreak of aflatoxin contamination in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 51, 198–206.
- Geisen, R. 1996. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Appl. Microbiol.*, 19, 388-392.
- Geiser, D. M., Dorner, J. W., Horn, B. W., Taylor, J. W. 2000. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 31, 169–179.
- Georgianna, D. R., Payne, G. A. 2009. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 113–125.
- Gilbride, K. A., Lee, D. Y., Beaudette, L. A. 2006. Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *Journal of microbiological methods*, 66(1), 1-20.

- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., Battilani, P. 2007. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 330-338.
- Godet, M., Munaut, F. 2010. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*”, *FEMS Microbiology Letters*, 304, 157-168.
- González-Salgado, A., González-Jaén, T., Vázquez, C., Patiño, B. 2008. Highly sensitive PCR-based detection method specific for *Aspergillus flavus* in wheat flour. *Food Additives and Contaminants*, 25(6), 758-764.
- Groopman, J.D. and Kensler, T.W. 1988. Aflatoxin Exposure in Human Populations: Measurements and Relationship to Cancer. *CRC Critical Review in Toxicology*, 19(2), 113-145.
- Hajjar, R., Hodgkin, T. (2007). The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*, 156:1-13.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. 1993. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 56). Lyon, France: World Health Organization.
- Ismaiel, A. A., Papenbrock, J. 2015. Mycotoxins: producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. *Agriculture*, 5(3), 492-537.
- Kana, J. R., Gbemenou, B., Gnonlonfin, J., Harvey, J., Wainaina, J., Wanjuki, I., Skilton, R. A., Tegua, A. 2013. Mycobiota and toxigenicity profile of *Aspergillus flavus* recovered from food and poultry feed mixtures in Cameroon. *Journal of Animal and Poultry Sciences*, 2(4), 98–107.
- Katan, T. 2000. Vegetative compatibility in populations of *Verticillium*: an overview. In: Tjamos EC, Rowe R, Heale JB, Fravel DR (eds) *Advances in Verticillium: research and disease management*. Proc. 7th Int Verticillium Symp. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 69–86.
- Ken, E., Semerci, A. 2023. Türkiye’de Buğday Üretimi ve Destekleme Politikaları. *International Congresses of Turkish Science and Technology Publishing*, 54-63. ISO 690.
- Kesmen, Z., Yetiman A. E., Güllüce, A., Arslan, H. 2014. *pksL 1* genine özgül PCR yöntemi ile aflatoksikojenik *Aspergillus flavus* türlerinin tespiti. 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 4-7 Haziran 2014, Ankara, 142s.
- Kim J, Lim J, Lee C. 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in waste water treatment systems: applications and considerations. *Biotechnol. Adv.*, 31, 1358–1373.
- Klich, M. A. 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

- Klich, M. A. 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular plant pathology*, 8(6), 713-722.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A. 2011. Genetik kavramlar, (Çeviri Ed: Prof Dr. Cihan Öner, Prof. Dr. Sibel Sümer, Prof. Dr. Reyhan Öner, Prof. Dr. Ay Ögüş, Prof. Dr. Leyla Açık), Palme Yayıncılık, Ankara.
- Kumar, P., Mahato, D.K., Kamle, M., Mohanta, T.K., Kang, S.G. 2017. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Aflatoxins Impact on Agriculture and Human Health*, 7, 2170.
- Krulj, J., C'určić, N., Stancić, A.B., Kojic, J., Pezo, L., Tukuljac, L.P., Solarov, M.B. 2020. Molecular Identification and Characterisation of *Aspergillus flavus* Isolates Originating from Serbian Wheat Grains. *Acta Aliment.* 49, 382–389.
- Lavkor, I. 2013. Yerfıstığı tarımında Uygun Kültürel İşlemler ve Hastalık Yönetim Pratikleri ile Hastalık ve Aflatoksin Oluşumunun Önlenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Adana, 300 s.
- Lavkor, I. 2019a. Mısırdaki koçan çürüklüğüne neden olan fungal türler ve mısırdaki oluşan mikotoksinler. *Gıda*, 44 (6): 1197-1209 doi: 10.15237/gida.GD19094.
- Lavkor, I. 2019b. Yerfıstığından İzole Edilen *Aspergillus* section *Flavi* Türlerinin Tanımlanması ve Mikotoksijenik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Akademik Gıda*, 17(4), 450-457.
- Lavkor, I. 2019c. Molecular characterization of aflatoxin biosynthesis genes of *Aspergillus flavus* from peanuts production area. *Legume Res.* 42: 609-614.
- Lavkor, I. 2020. Quantitative Detection of Aflatoxin and Species Identification of *Aspergillus* section *Flavi* Isolates from Peanuts using Molecular Approaches. *Legume Research*, 43(2): 195-199.
- Manonmani, H. K., Anand, S., Chandrashekar, A., Rati, E. R. 2005. Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. *Process Biochemistry*, 40(8), 2859-2864.
- Midorikawa, G. E. O., Sousa M. L. M., Silva, O. F., Dias, J. S. A., Kanzaki, L. I. B., Hanada, R. E., Mesquita, R. M. L. C, Gonçalves, R. C., Alvares, V. S., Bittencourt, D. M. C., Miller, R. N. G. 2014. Characterization of *Aspergillus* species on Brazil nut from the Brazilian Amazonian region and development of a PCR assay for identification at the genus level. *BMC Microbiology*, 14, 1-9.
- Nasri, T., Hedayati, M. T., Abastabar, M., Pasqualotto, A. C., Armaki M. T., Hoseinnejad, A., Nabili, M., 2015. PCR-RFLP on β -tubulin gene for rapid identification of the most clinically important species of *Aspergillus*. *J Microbiol Methods*, 117:144-7.
- Niessen, L. 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin-producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 38–46.
- Nelson, A. J., Elias, K. S., Arévalo, E. G., Darlington, L. C., Bailey, B. A. 1997. Genetic characterization by RAPD Analysis of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. associated with an emerging epidemic in Peru. *Phytopathology*, 87, 1220-1225.

- Miraglia, M., Brera, C. 2000. Mycotoxins in Grains and Related Products. In “Food Analysis by HPLC”. Leo ML Nollet 2nd eds. Marcel Dekker, Inc. New York, 12, 493-522.
- Odoemelam, S. A., Osu, C. I. 2009. Aflatoxin B1 Contamination of Some Edible Grains Marketed in Nigeria. *Journal of Chemistry*, 6(2), 308-314.
- Özberk, F., Karagöz, A., Özberk, İ., ve Ayhan, A. T. L. I. 2016. Buğday genetik kaynaklarından yerel ve kültür çeşitlerine; Türkiye’de buğday ve ekmek. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25(2), 218-233.
- Özerdem, D. N. 2009. Kala-Azarlı hastalarda etken türlerin PCR-RFLP yöntemi ile tanımlanması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 63 s.
- Özkaya, Ş. 2001. Ülkemizde aflatoksin sorunu yaşanan bazı gıdalarda AFB₁’in azaltılması veya giderilmesinde *Flavobacterium aurantiacum*’un etkinliğinin araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bil. Enst., Ankara, 86 s.
- Pitt, J.I. 2013. Mycotoxins. In *Foodborne Infections and Intoxications*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 409–418 s.
- Rao, S. N., Chopra, R. C. 2001. Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M₁ excretion in milk of goats. *Small Ruminant Research*, 41(3), 203-213.
- Raper, B. K., Fennel, D. I. 1977. *The Genus Aspergillus*. New York: Robert, E. Krieger Publishing Company.
- Reddy, K. R. N., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H. K., Abel, C. A., Shier, W. T. 2010. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin reviews*, 29(1), 3-26.
- Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A. 2010. *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2772–2777.
- Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R., Lima, N., Venâncio, A. 2007. Identification and Characterization of *Aspergillus flavus* and Aflatoxins. In *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*; Formatex: Badajoz, Spain, 527–534 s.
- Ruiqian, L., Qian, Y., Thanaboripat, D., & Thansukon, P. (2004). Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *KMITL Sci J*, 4(1), 1685-2044.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425.
- Sambrook, E., Fritsch, F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samson, R. A., Pitt, J. I. 1990. Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification (Vol. 185). Springer Science & Business.

- Samson, R. A., Hong, S. B., Frisvad, J. C. 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. Medical Mycology., 44, 133-148.
- Shapira, R., Paster N., Eyal, O., Menasherov, M., Mett, A., Salomon, R. 1996. Detection of aflatoxinogenic molds in grains by PCR. Applied Environmental Microbiology, 62, 3270–3273.
- Scheidegger, K. A., Payne, G. A. 2003. Unlocking the secrets of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. Journal of Toxicology-Toxin Review, 22, 423-459.
- Şener S. 2006. Gıda güvenliği açısından mikotoksinler. Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci, 2 (46): 135–9.
- Thathana, M. G., Murage, H., Abia, A. L. K., Pillay, M. 2017. Morphological characterization and determination of aflatoxin-production potentials of *Aspergillus flavus* isolated from maize and soil in Kenya. Agriculture, 7(10), 80.
- TMO. 2021. 2020 Yılı Hububat Sektör Raporu, <https://www.tmo.gov.tr/bilgi-merkezi/raporlar>
- Türedi, O. K., Şeker, E. 2023. Mikrobiyolojide En Yaygın Moleküler Tanı Yöntemi: Polimeraz Zincir Reaksiyonu. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 12(1), 118-125.
- Vaamonde, G., Patriarca, A., Ferná'ndezPinto, V., Comerio, R., Degrossi, C. 2003. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. International Journal of Food Micobiology, 88, 79-84.
- Varga, J., Frisvad, J., Samson, R. 2009. A reappraisal of fungi producing aflatoxins. World Mycotoxin Journal, 2(3), 263-277.
- Varga, J., Frisvad, J. C., Samson, R. 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. Studies in Mycology, 69(1), 57-80.
- Verheecke, C. 2014. Modulation of aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus*. Doktora Tezi. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, 223 s.
- White, T.J., 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, 315-322.
- Yağcı, A. 2001. Restriction fragment length polymorphism ve polimeraz zincir reaksiyon bazlı tiplendirme yöntemleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 2, 149-60.
- Yu, J., Chang, P. K., Cary, J. W., DeepakBhatnagar, M. W., Cleveland, T. E., Payne, G. A., Linz, J. E. 1995. Comparative mapping of aflatoxin pathway gene clusters in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*”, Applied and Environmental Microbiology, 61, 2365–2371.
- Zain, M. E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi chemical society, 15(2), 129-144.

ÖZGEÇMİŞ

Muhammed Nur HACCAR, Evli ve iki çocuğu vardır. 2016 yılında Halep Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2022 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programını kazandı, eğitimine devam ediyor.

