

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**TUNCELİ'DE YAYILIŞ GÖSTEREN RUMİNANT HAYVANLARDAKİ
ANAEROBİK FUNGUSLARIN MOLEKÜLER TANIMLANMASI**

Murat ÜSTÜNTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR

TUNCELİ-2022

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**TUNCELİ'DE YAYILIŞ GÖSTEREN RUMİNANT HAYVANLARDAKİ
ANAEROBİK FUNGUSLARIN MOLEKÜLER TANIMLANMASI**

Murat ÜSTÜNTAŞ
(190090007)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR

TUNCELİ-2022

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**TUNCELİ'DE YAYILIŞ GÖSTEREN RUMİNANT HAYVANLARDAKİ
ANAEROBİK FUNGUSLARIN MOLEKÜLER TANIMLANMASI**

**Murat ÜSTÜNTAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 14/12/2021 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

İmza

Dr. Öğr. Üyesi
Selahaddin KİRAZ
(Harran Üniversitesi)

BAŞKAN

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Bülent
KAR
(Munzur Üniversitesi)

DANIŞMAN

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Altuğ
KARAMAN
(Munzur Üniversitesi)

ÜYE

Bu tez, Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Doç. Dr. Murat KORUNUR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma, Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: YLMUB021-10

NOT: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı “Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu”ndaki hükümlere tabidir.

14/12/2021

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İmza
Murat ÜSTÜNTAŞ

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sürecinde desteklerini benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR'a

Çalışmalarım süresince ihtiyaç duyduğum her türlü bilgi, kaynak vb. durumlar için destek olan, gerek kişisel gerekse bilimsel tecrübeleriyle bana bakış açısı kazandıran değerli hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ferit Can YAZDIÇ ve Dr. Öğr. Üyesi Altuğ KARAMAN'a ayrıca her türlü manevi desteklerinden dolayı eşim, oğlum ve kızıma çok teşekkür ederim.

Murat ÜSTÜNTAŞ
TUNCELİ - 2022



İÇİNDEKİLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ŞEKİLER LİSTESİ.....	V
TABLolar LİSTESİ	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Rumen.....	1
1.2. Rumen Mikroorganizmaları	2
1.2.1. Rumen bakterileri	2
1.2.2. Rumen arkeaları.....	2
1.2.3. Rumen protozoaları	3
1.2.4. Rumen bakteriyofajları	3
1.2.5. Rumen fungusları	3
1.3. Rumen Funguslarının Keşfi ve Tarihçesi.....	4
1.4. Rumen Funguslarının Özellikleri	4
1.4.1. Morfolojileri	4
1.4.2. Yaşam döngüleri.....	4
1.4.2.1. Monosentrik Fungusların yaşam döngüsü.....	5
1.4.2.2. Polisentrik Fungusların yaşam döngüsü	5
1.5. Rumen Funguslarının Moleküler Düzeyde Tanımlanması.....	6
1.6. Anaerobik Gut Fungus Cinsleri ve Özellikleri	7
1.6.1. Caecomyces sp.....	7
1.6.2. Neocallimastix sp.....	8
1.6.3. Piromyces sp.	8
1.6.4. Orpinomyces sp.	8
1.6.5. Anaeromyces sp.....	8
1.6.6. Cylamyces sp.	8
1.6.7. Feramyces sp.	8
1.6.8. Pecaromyces sp.....	9
1.6.9. Oontomyces sp.....	9
1.6.10. Buwchfawromyces sp.	9
1.6.11. Liebetanzomyces sp.....	9
1.6.12. Ghazallomyces sp.	9
1.6.13. Aklioshbomyces sp.....	9
1.6.14. Agriosmyces sp.....	9
1.6.15. Capellomyces sp.	10
1.6.16. Joblinomyces sp.....	10
1.6.17. Khoyollomyces sp.	10
1.6.18. Tahromyces Sp.	10
1.6.19. Aestipascumyces sp.	10
1.6.20. Paucimyces sp.....	10
1.7. Anaerobik Gut Fungusların Tanımlanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler	11
1.7.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (Pzr)	11
1.7.2. Dna dizi analizi.....	11

1.7.3. Its (Internal transcribed spacer) bölgesi.....	11
1.7.4. Rflp (Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm).....	12
1.7.5. Rapd (Randomly amplified polymorphic dna).....	12
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	13
3. TEZİN AMACI VE ÖNEMİ	15
4. MATERYAL VE METOT	17
4.1. Materyal.....	17
4.1.1. Kullanılan kimyasalar.....	17
4.2. Metot.....	17
4.2.1. Fungus izolasyonu için gerekli dışkı örneklerinin toplanması ve saklanması	17
4.2.2. Rumen ıvısının hazırlanması ve muhafaza edilmesi	18
4.2.3. Anaerobik besiyerinin hazırlanması	18
4.2.4. Dışkıdan fungus izolasyonu ve inkübasyonu	19
4.2.5. Anaerobik gut fungusların saflaştırılması.....	20
4.2.6. Antibiyotik etkisi	20
4.2.7. Rumen funguslarının gözlemlenmesi	21
4.2.8. Rumen funguslarının cins düzeyinde tanımlanması.....	21
4.2.9. Anaerobik fungusların alt kültüre alınması	22
4.2.10. Rumen funguslarda stok Oluşturma	22
4.3. Moleküler Metotlar.....	23
4.3.1. Dna izolasyonu	23
4.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu uygulaması.....	23
4.3.3. Jel elektroforez uygulaması	24
4.3.4. Dna örneklerinin dizilenmesi.....	25
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
5.1. Bulgular.....	26
5.1.1. Dışkı toplama ve rumen fungusların izolasyonu	26
5.1.2. Rumen fungusların cins düzeyinde tanımlanması	27
5.1.3. Rumen fungusların moleküler tanımlanması ve filogenetik ağaç modeli	29
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
7. KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ	
EKLER	

ŞEKİLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Monosetrik Anaerobik Gut Fungi (AGF) yaşam döngüsü (Wulff, 2001)	5
Şekil 4.1 Tunceli çevresinde bulunan ruminantlardan dışkı örneği toplama	17
Şekil 4.2. Rumen sıvısının hazırlanması.	18
Şekil 4.3. Dışkıdan Anaerobik Gut Fungus izolasyonu sırasında dışkı materyalinin boş besi ortamında seyreltilmesi.....	20
Şekil 4.4. Rumen funguslarının mikroskop altında gözlemlenmesi ve morfolojik izolasyon basamağı.	21
Şekil 4.5. Rumen funguslarının morfolojik düzeyde sınıflandırılması için gerekli olan vejetatif evre.	22
Şekil 4.6. Poimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) hazırlanması sırasında cihazın PZR protokülüne göre ayarlanması.....	24
Şekil 4.7. Jel elektroforez uygulaması.....	25
Şekil 5.1. MUBAM_6 stok numarasına ait dışkıdan izolasyon ve saflaştırma sonucu elde edilen <i>Neocallimastix</i> sp'ye ait zoospor.	27
Şekil 5.2. MUBAM_AGF 7 (A) ,8 (B) ve 10(C) stok numaralı dışkılarında saflaştırılan <i>Orpinomyces</i> sp'ye ait mikroskop görüntüleri	28
Şekil 5.3. MUBAM_AGF 9'a stok numaralı dışkılarında saflaştırılan <i>Piromyces</i> sp'ye ait mikroskop görüntüsü.	28
Şekil 5.4. Rumen Funguslarına ait CTAB metodunu sonucu elde edilen DNA'ların %1'lik (w/v) agaros jel görüntüsü ve stok numaraları	29
Şekil 5.5. MUBAM_AGF'lere ait genomik DNA'lardan elde edilen ITS bölgesinin PZR agaros jel görüntüsü.....	31
Şekil 5.6. AGF-1 (A), AGF-2 (B) ve AGF-3 (C) örneklerine ait ITS bölgelerinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.	31
Şekil 5.7. İzole edilen rumen funguslarının MEGA 6 programı kullanılarak Neighbour Jonining yöntemi ile oluşturulan filogenetik ağacı.....	33
Şekil 5.8. ITS bölgesine göre yapılan filogenetik ağaç MEGA 6 programı yardımıyla ve Neighbour Jonining yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.	34

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Günümüz kadar tanımlanması yapılmış Anaerobik Gut Fungusların cins düzeyindeki taksonomisi	7
Tablo 4.1. Anaerobik Gut Fungusların in vitro koşullarda çalışması için gerekli olan besi ortamı	19
Tablo 4.1. Antibiyotik çeşitleri ve son konsatrasyonları	21
Tablo 5.1. İzolasyonu yapılan rumen fungusları stok numaraları ve dışkı kaynakları	26
Tablo 5.2. Rumen Fungal DNA'larından ITS bölgesi için yapılacak olan PZR çalışma şartları.	30
Tablo 5.3. Çalışmada izole edilen rumen fungusların NCBI-Blast homoloji sonuçları	32



SİMGELER VE KISALTMALAR

AGF	: Anaerobik Gut Fungi
CTAB	: Hexadecyltrimethylammonium bromide
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dH₂O	: Distile su
g	: gram
HCl	: Hidroklorik asit
ml	: Mililitre
Mg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
sp.	: Tür
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
LSU	: Büyük Alt Birim
SSU	: Küçük Alt Birim
ITS	: İnternal Transcribed Spacer
RFLP	: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm
RAPD	: Randomly amplified polymorphic DNA

ÖZET

Anaerobik Gut Funguslar (AGF) herbivor hayvanların sindirim kanalının bir parçası olan rumen içerisinde bulunan mikroorganizmalar arasında sahip olduğu fibrolitik enzim aktivitesi ve biyoteknolojik potansiyeli oldukça yüksek bazı enzimlerinden dolayı oldukça önemli bir gruptur. Aynı zamanda AGF'lerin zorunlu anaerobik özelliği bu mikroorganizmaların kültüre alınma çalışmalarını da değerli olduğunu göstermiştir. Günümüzde AGF'lerin cins düzeyinde yeni keşifleri devam ederken bu mikroorganizmaların bazı endsüstriyel alanlarda da çalışma sahaları genişlemektedir. Bu çalışmada Türkiye'de bulunan kültür koleksiyonuna ek olarak bugüne kadar çalışmamış bazı coğrafi bölgelerden olan Tunceli iline ait kırsal alanlardan elde edilen rumen dışkı örneklerinden AGF izolasyonu ve tanımlanması yapılmıştır. Bu tanımlama işlemi hem morfolojik hem de moleküler düzeyde gerçekleştirilmiştir. Moleküler düzeyde tanımlama yapılırken bu mikroorganizmaların internal transcribed spacer (ITS) bölgesi tercih edilmiştir. Elde edilen ITS agaroz jel görüntülemesinden sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ürünlerinin dizi analizi yapılmıştır. Sekans analizi ve morfolojik gözlemler sonucu AGF'lerin MUBAM_AGF 1,2,3,4,5,6,11 ve 12 stok numarası verilerek *Neocallimastix* sp., MUBAM_AGF 7,8 ve 10 stok numaralı *Orpinomyces* sp. ve MUBAM_AGF 9 stok numarası verilerek kültüre alınmıştır. Sonuç olarak Tunceli bölgesinde ilk defa yapılan bu çalışma ile hem fungus kültür koleksiyonu hem de bu canlılarla ait DNA kütüphanesi oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: ITS, anaerobik funguslar, filogenetik, DNA dizileme

ABSTRACT

Molecular Identification of Anaerobic Fungi in Ruminant Animals Distributed in Tunceli

Anaerobic Gut Fungus (AGF herbivores is an important group among the microorganisms in the part of the society, some of the enzymes with fibrolytic enzyme activity and biotechnological potential. At the same time, the anaerobic feature of AGFs is an application used in culturing these scanners. Today, AGFs are new in their classes. These passengers can visit the trainings and use the fields in some industrial usage areas. In addition to the culture collection in Turkey in this study, AGF isolation and samples were made from the samples from the samples that did not work. This process was performed both morphologically and at the molecular level. ITS) preferred site. After the obtained ITS agarose gel, polymerase chain reaction (PCR) sequence analysis was performed. Sequence analysis and logical observations, stock of AGFs MUBAM_AGF,3,4,5,6,11 and 12 were selected k 1,2 Neocallimasti sp., MUBAM_AGF 7,8 and 10 stock images *Orpinomyces* sp. and MUBAM_AGF 9 stock images were cultured into modelk. As a result, both the mushroom culture collection and the DNA collection study of these living things with this one, which was done for the first time in the Tunceli region.

Key words: ITS, anaerobic fungi, filogenetic, DNA sequence

1. GİRİŞ

1.1. Rumen

Herbivorlar arasında ruminant ve ruminant olmayan çok sayıda canlılar bulunmaktadır. Bu herbivor canlılar arasında sindirim kanalı ve bu kanalda bulunan bazı kısımlarda farklılıklar gözlemlenmektedir. Anatomik olarak ruminant hayvanların mide yapıları tek bölmeli diğer herbivorlardan farklı olarak dört bölmeden oluşur ve bunlar rumen, retikulum, omasum ile abomasum olarak bilinmektedir (Hungate, 1966). Hetetrof olarak bitkisel besin tüketimi yapan bu herbivorların sindirim kanalı ağız, ösafagus, mide, ince bağırsak ve kalın bağırsak şeklinde oluşmakta ve bitkisel ürünlerin mekanik olarak ilk sindirime başladığı ağız kısmında sahip oldukları güçlü azı dişleri sayesinde sindirimin ilk basamağı gerçekleşmektedir (Kutlu ve ark., 2005). Ösafagustan peristaltik hareketler sonucu mideye ulaşan lokma adı verilen bitkisel besin tek bölmeli herbivorlarda dört bölmeli ruminantlara göre alınan besinin yaklaşık olarak $\frac{1}{2}$ sindirime uğradığı bilinmektedir. Çünkü bitki hücre duvarının yapısını oluşturan selüloz, hemiselüloz gibi organik kompleks bileşikler uzun süreli sindirim kanalında kalmalı ve burada bulunan mikrobiyal ekosistemin etkisinin süresinin uzatılması gerekmektedir (Colemon, 1975; Orpin, 1977; Pettipher ve Latham 1979; Julliand ve ark., 1998). Dört bölmeli mideye sahip olan herbivorların alınan besini daha etkili bir şekilde hidrolize etmeleri (Julliand ve ark., 1998) rumen adı verilen ve sindirim kanalında en fazla hacme sahip olan kısım sayesinde olmaktadır (Hobson ve Wallace, 1982). Bu kısım sahip olduğu kompleks mikrobiyal ekosistem (Selinger ve ark., 1996) dışında, besin maddelerini indirgenme ve yükseltegenme (redoks) potansiyelinde bulunması (Kamra, 2005), ortam sıcaklığının ortalama olarak 40°C olması ve pH'sı 5,5-7,0 arasında değişmesi (Patterson, 1992) konak herbivor tarafından kullanılan enerjinin korunmasını gerçekleştirir. Rumenin devamı olarak biline retikulumun ruminasyonda, omamasum su ve bazı minerallerin emiliminde, abomasum ise sindirim enzimi salgılanmasını ve pH ayarlanmasında görevlidir (Kutlu ve ark., 2005).

1.2. Rumen Mikroorganizmaları

Rumen içerisinde simbiyotik olarak yaşayan kompleks bir ekosistem mevcuttur (Al-Galbi ve Usur, 2021). Ancak bu ekosistemin oluşması için herbivor canlının beslenmesi ve sahip olduğu mevcut yaşda önemlidir. Yeni doğmuş herbivor bir memeli canlı ilk besin olarak anne sütü tükettiği için sindirim kanalında *Sterptococcus* ve *Lactobacillus* gibi bakteriler daha fazla bulunmaktadır (Hobson ve Wallace, 1982).Emzirme dışında ruminant memelinin yavru bireye gerekli olan sindirim kanalında bulunan mikroorganizmaları salya, ortak kullanım alanlarındaki su kanalları ve bulaşık dışkı ile aktardığı düşünülmektedir (Lowe ve ark., 1987; Cholewińska ve ark., 2020). Ancak rumen mikroorganizmalarının fizyolojik etkileri ve sahip oldukları karmaşık metabolizma yolları rumen ekosisteminin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır (Kobayashi,2006). Rumende bulunan ekosistem içerisinde genel olarak bakteriler (10^{10} - 10^{11} cfu/ml),arkea (10^7 - 10^9 hücre/ml), protozoa (10^4 - 10^6 hücre/ml), fungus (10^3 - 10^5 zoospor/ml) ve bakteriyofaj(10^8 - 10^9 virus/ml) topluluğu bulunmaktadır (Hungate, 1966; Theodorou ve ark., 1990; Kamra, 2005).

1.2.1. Rumen bakterileri

Populasyon olarak en fazla yoğunluğa sahip olan bakteriler topluluğu (Ozel ve Sarıççek, 2009) şekillerine göre (Krause ve Russell, 1996), gram boyamasına göre (Alataş ve Umucalı, 2011) ve etki ettikleri substrat ile son ürün çeşitlerine göre (Omigoto ve Imai, 1981) sınıflandırılabilirler. Herbivor memeli yeni doğan canlıda ilk bakteri populasyonu yaklaşık olarak 30-40 saat sonra gözlemlenmiştir (McAllister ve ark., 1994). Ruminant bakteriler genel olarak anaerobik bir yapıya sahiptir (Russel, 2009). Ancak bazı bakteri toplulukları fakültatifdir (Özel ve Sarıçelik, 2009). Bu mikroorganizmaların enzimatik yolları ile bitki hücre duvarının ana maddesi olan organik polimer selülozdan önemli uçucu yağ asitleri elde edildiği bilinmektedir (Liang ve ark., 2021).

1.2.2. Rumen arkeaları

Canlıların sınıflandırılmasında bakteri,arkea ve ökaryotlar domaini bulunmakta ve arkea domaini ise ökaryotlar ve bakterilerden farklı bazı özellikleri bulunmaktadır (Eckburg ve ark., 2003).Arkea grubu içerisinde yaklaşık olarak 28 cins düzeyinde izolasyon yapılmış

bunun içersinden sadece 5 cins düzeyi rumenden izole edilmiş ve kültüre alınabilmiştir (Jannsen ve Kirs., 2008). Rumen arkealarının en önemli görevleri ise metajenez olayını gerçekleştirerek (Steward ve ark., 1995) rumen içerisinde diğer mikroorganizmaların açığa çıkardığı H^+ ve CO_2 gibi bileşikler CH_4 (Metan)'na dönüştürerek rumen fermantasyonunun devamlılığını sağlamaktır (Kamra, 2005).

1.2.3. Rumen protozoaları

Protozolar sınıflandırılırken sahip oldukları sil ve kamçılılarına göre farklı taksonomik basamaklara ayrılabilir. Özellikle rumen içerisinde silli protozoaların miktarı (10^5 - 10^6 hücre/ml) oldukça fazladır (Ogimoto ve İmai, 1981). Protozoaların rumen içerisinde farklı görevleri bulunmaktadır. Bunlar arasında bakteri popülasyonunu denge tutma (Colemon, 1975; Dehority, 1998), asidosu engelleme (Van Zwieten ve ark., 2008), bitki hücre duvarında bulunan polisakkaritin hidrolizi ve fermantasyona yardımcı olmaları (Yanez ve ark., 2004) bilinmektedir. Ayrıca hayvan ağırlık artışını pozitif bit şekilde etkiledikleri (Williams, 1986) ve protozoların rumen uzaklaştırılması sonucu rumen içi homeostasinin gözlemlendiği bilinmektedir (Kamra, 2005).

1.2.4. Rumen bakteriyofajları

DNA virüsü olduğu bilinen ve bakteriler üzerinde etkili olan zorunlu hücre içi bir parazittir. Bakteriyofajlar rumen içerisinde bakteri popülasyonunu istenilen düzeyde tutabilme özelliğine sahiptir (Klopatek ve ark., 2021).

1.2.5. Rumen fungusları

Rumen içerisinde yaklaşık olarak %7-%9 oranında bulunan rumen fungusları (Orpin, 1984) rumen ekosisteminde kuvvetli fibrolitik enzim aktivitesi ve bitki materyali üzerine kolonize olmaları bu canlı grubunun önemini arttırmıştır (Bauchop, 1984). Özellikle selüloz ve ksilan gibi organik bileşikler sayıca fazla olan bakterilere oranla daha çok miktarda hidrolize ettikleri gözlemlenmiştir (Bernalier ve ark., 1992).

1.3. Rumen Funfuslarının Keşfi ve Tarihçesi

Liebetanz (1910) ve Braune (1913) tarafından ilk olarak kamçılı protozoa olduğu düşünülen rumen fungusları (Anaerobik Gut Fungi) *Sphaeromonas communis* ve *Caliilmastix frontalis* olarak binominal adlandırılmaları yapılmıştır. Rumen fungusların sınıflandırmada kendine ait sistematik basamağa geçişi Orpin (1975) sayesinde olmuş ve *Neocallimastix frontalis* şeklinde isimlendirilmiştir. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar sayesinde hücre duvarının kimyasal yapısında kitin bulunması bu canlıların Fungi alemine ait olduğunu göstermiştir (Orpin, 1977). İlk olarak kamçılı protozoa olarak bilinen anaerobik gut fungusların (AGF) keşfinin netlik kazanmasının bu kadar uzun sürmesi arasında hayvanların besleme ile geçici saprofit mikroorganizmalarda besin olarak alabilceğinden dolayı (Bauchop, 1983) rumen mikroorganizmaları ile ilgili çalışmalarda katı parçacıkların uzaklaştırılması büyük bir etken olduğu düşünülmektedir (Orpin, 1994).

1.3.1. Rumen funguslarının özellikleri

1.3.1.1. Morfolojileri

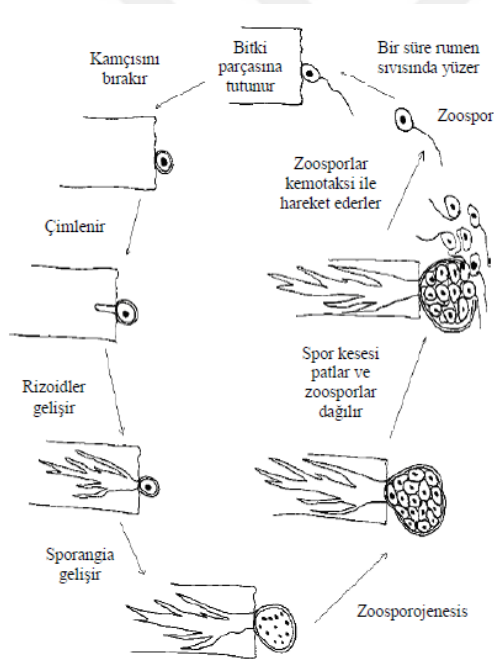
Anaerobik Gut Funguslar (AGF) aseksüel üreme özelliğine sahip olup zoospor oluşturan filamentli ve küresel morfolojiye sahip, spor kesesinin durumuna göre monosentrik veya polisentrik karakterde ve zoosporları kamçı sayısına göre tek kamçı ya da çok kamçı olacak şekilde morfolojik olarak ışık mikroskobu sayesinde gözlemlenebilirler (Li ve ark., 1997; Voigt ve ark., 2021).

1.3.1.2. Yaşam döngüleri

Anaerobik Gut Funguslar (AGF)'ın sahip olduğu morfolojik özelliklerinden dolayı yaşam döngüleri monosentrik bireylerde ve polisentrik bireylerde olmak üzere ayrı ayrı incelenmiştir. Ancak genel olarak AGF'ların yaşam döngüleri zoospor (hareketli) evresi ve tallus/vejetatif (hareketsiz) evresi olarak iki basamaktan oluşmaktadır (Arreola ve ark., 2021). Hareketli evre olan zoospor evresi bitki hücre duvarına tutunduktan sonra vejetatif evreye geçerek yeni sporların salınmasına yardımcı olur (Barr ve ark., 1989).

1.3.1.2.1. Monosentrik fungusların yaşam döngüsü

Monosentrik yapılı funguslarda zoosporogenes sonucu oluşan zoosporlar sıvı içerisinde belli bir süre serbest bir şekilde yüzebilir (Heath ve ark., 1986) daha sonra taksis hareketi sayesinde bitki hücre duvarına doğru yönelim yaparlar (Orpin ve Bountiff, 1978). Kemotaksis sonucu hücre duvarına tutunan sporlar vejetatif evreye geçerler (Şekil 1.1). Sahip oldukları çekirdekleri hücre bölünmesi geçirmeye başlar ve yeni zoosporların oluşumu gerçekleşir (Gordon ve Phillips, 1998). Zoosporogenez olayına etki eden birden fazla faktörler bulunmaktadır. Bunlar arasında bu olayı aktive eden enzimlerin yapısına katılan kofaktör yapılı hem ve hemin gibi aktivatör bileşikler besin yolu ile hayvanlara geçebilmekte ve spor salınımı hızlandırmaktadır (Orpin ve Greenwood, 1986).



Şekil 1.1. Monosetrik Anaerobik Gut Fungi (AGF) yaşam döngüsü (Wulff, 2001)

1.3.1.2.2. Polisentrik Fungusların Yaşam Döngüsü

Polisentik yapılı funguslarda serbest spor salınımı çok nadir görülmektedir (Ho ve Bauchop, 1991). Çünkü sahip oldukları çekirdeğin sporla beraber hareketi için taksis olayından farklı olarak sporun oluşturduğu rizoit yapıya doğru hareketi bulunmaktadır. Bu

sayede anaerobik gut fungusun farklı yerlerine göç eden çekirdek yeni spor keselerini oluşturur (Barr ve ark., 1989).

1.4. Rumen Funguslarının Moleküler Düzeyde Tanımlanması

Anaerobik Gut Funguslar (AGF)'in sınıflandırılması yapılırken morfolojik özellikleri ve moleküler çalışmalar yardımıyla taksonomik basamaktaki yeri tespit edilmektedir (Smith ve ark 2020). Günümüzde AGF'ların bulunduğu sistematik basamaklar aşağıdaki gibidir.

Alem: Fungi

Filum: Neocallimastimycota

Sınıf: Neocallimastigales

Famılya: Neocallimastigaceae

Cins: Neocallimastix

Tür: N.Frontalis

Morfolojik özellikleri kullanılarak yapılan sınıflanma biçimi genellikle bu canlıların cins düzeyinde taksonomik basamaktaki yerini bulmaya yardımcı olmakta ancak AGF'ların zorunlu anaerobik yapılı olması ve çevresel faktörlerin morfoloji üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı bazı durumlarda sağlıklı bir sınıflandırma biçimi olmamaktadır (Heath, 1988). Günümüzde moleküler çalışmaların hız kazanması ile güvenilir bir sınıflandırılma yapılmaya başlamıştır. Bu çalışmalar arasında GC(Guanin/Sitozin) veya AT(Adenin/Timin) kıyaslaması (Brownlee, 1989), ITS (Internal Transcribed Sequence) bölgesi (Brookman ve ark., 2000; Sihori ve ark., 2013), rRNA (ribozomal RNA) bölgeleri (Dore ve Stahl, 1991) ve PCR-RFLP (Ozköse ve ark., 2003) gibi çok farklı moleküler tanımlama bulunmaktadır. Aynı zamanda Kar (2013) yaptığı çalışmada 18S rRNA, ITS, 28S rRNA sekans dizilemesi ile AGF'ların filogenetik ağaçlandırmasını yapmış ve buna bağlı olarak bu fungusların metabolitlerini karşılaştırmıştır. Filogenetik sınıflandırma için DNA'da bulunan ITS ve rRNA gibi korunmuş bölgelerin sekans analizinin önemini vurgulamasıyla çalışmalar artmaya başlamış ve AGF'ların sınıflandırılmasında kullanılan morfolojik ve moleküler özellikler sonucunda günümüzde 20 cins tespiti yapılmış ve Tablo 1.1'de verilmiştir (Hanafy ve ark., 2021).

Tablo 1.1. Günümüz kadar tanımlanması yapılmış Anaerobik Gut Fungusların cins düzeyindeki taksonomisi (Hanafy ve ark., 2021)

Alem	Fungi
Filum	Neocallimastigomycota
Sınıf	Neocallimastigomycetes
Takım	Neocallimastigales
Familya	Neocallimastigaceae
Cins	Caecomycetes (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor) Neocallimastix (Monosentrik, Çok kamçılı zoospor) Piromyces (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor) Orpinomyces (Polisentrik, Çok kamçılı zoospor) Anaeromyces (Polisentrik, Tek kamçılı zoospor) Cyllamyces (Polisentrik, Tek kamçılı zoospor) Feramyces (Monosentrik, Çok kamçılı zoospor) Pecaromyces (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor) Oontomyces (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor) Buwchfawromyces (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor) Liebetanzomyces (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor) Ghazallomyces (Monosentrik, Çok kamçılı zoospor) Aklioshbomyces (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor) Agriosmyces (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor) Capellomyces (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor) Joblinomyces (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor) Khoyollomyces (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor) Tahromyces (Monosentrik, Tek kaçmış zoospor) Aestipascumyces (Monosentrik, Çok kamçılı zoospor) Paucimyces (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor)

1.5. Anaerobik Gut Fungus Cinsleri ve Özellikleri

1.5.1. Caecomycetes sp.

Gold ve ark. (1988) tarafından inek rumeninden elde edilen bu cins monosentrik bir tallus ve tek kamçılı bir zoospora sahiptir.

1.5.2. Neocallimastix sp.

Barr (1981) tarafından bulunan ve Monosentrik vejatif evresi olan çok kamçılı bir yapıya sahip olan bu cins düzeyindeki mikroorganizma zoosporik funugusların temelini atmıştır.

1.5.3. Piromyces sp.

Barr ve ark. (1989) tarafından inek rumenine ait sıvıdan izole edilmiştir. Morfolojik olarak monosentrik tallus yapılı ve tek kamçılı bir zoospora sahiptir.

1.5.4. Orpinomyces sp.

Barr ve ark. (1989) ve Breton ve ark. (1989) tarafından yapılan çalışmalarda polisentrik tallus ve çok kamçılı zoospora sahip olan bu cins koyun rumeninden izole edilmiştir.

1.5.5. Anaeromyces sp.

Breton ve ark. (1990) koyun rumeninden izole ettiği polisentrik tallus ve tek kemçili bir zoospora sahiptir.

1.5.6. Cyllamyces sp.

Ozkose ve ark. (2001) tarafından sığır dışkılarından izole edilen küresel rizoid yapılı olan bu cins polisentrik tallus ve tek kamçılı zoospora sahiptir.

1.5.7. Feramyces sp.

Hanafy ve ark. (2018) tarafından koyun dışkılarından izole edilen monosentrik tallus ve çok kamçılı zoospora sahiptir.

1.5.8. Pecaromyces sp.

Hanafy ve ark. (2017) tarafından sığır ve koyun dışkısından izole edilmiş ve monosentrik vejajatif evresi ile tek kamçılı zoospora sahiptir.

1.5.9. Oontomyces sp.

Dagar ve ark. (2015) tarafından devenin ön midesiden izole edilen bu cins monosentrik tallus ile tek kamçılı zoosporu bulunur.

1.5.10. Buwchfawromyces sp.

Callaghan ve ark. (2015) ile birlikte Buffolo dışkısından izole edilmiştir. Tallus yapısı monosentrik, zoospor olarak tek kamçılıdır.

1.5.11. Liebetanzomyces sp.

Joshi ve ark. (2018) tarafından keçi dışkısından izole edilmiş ve monosentrik tallus, tek kamçılı zoosporu bulunur.

1.5.12. Ghazallomyces sp.

Hanafy ve ark. (2019) tarafından geyik dışkısından izole edilen bu cins monosentrik tallus ile çok kamçılı zoospora sahiptir.

1.5.12. Aklisobomyces sp.

Hanafy ve ark. (2019) ile bir birlikte geyik dışkısından izole edilmiştir. Tallus yapısı monosentrik olup zoospor kamçısı ise tek olarak bilinir.

1.5.13. Agriosmyces sp.

Hanafy ve ark. (2019) tarafından yaban domuzu ve keçi dışkısından izole edilen bu mikroorganizma monosentrik yapı ve zoosporu tek kamçılıdır.

1.5.14. Capellomyces sp.

Hanafy ve ark. (2019) tarafında keçi dışkılarından izole edilmiştir. Monosentrik tallus ile tek kamçılı bir zoospora sahiptir.

1.5.15. Joblinomyces sp.

Hanafy ve ark. (2019) tarafından koyun ve keçi dışkılarından elde edilmiştir. Tek kamçılı zoospor ve monosentrik yapılı tallusa sahiptir.

1.5.16. Khoyollomyces sp.

Hanafy ve ark. (2019) at ve zebra'ya ait dışkıdan izole etmişlerdir. Vejetatif safhası monosentrik tallus hareketli evresi ise tek kamçılı zoospor ile meydana gelir.

1.5.17. Tahromyces sp.

Hanafy ve ark. (2019) tarafından endemik bir tür olan *Nilgiritragus hylocrius*'dan (Ovis cinsine yakın bir tür) izole edilmiştir. Monosentrik tallus ve tek kamçılı zoospora sahiptir.

1.5.18. Aestipascumyces sp.

Stabel ve ark. (2020) tarafından koyun rumeninden izole edilen filamentli yapıya sahip olan bu cins monosentrik tallus ve çok kamçılı zoospora sahiptir.

1.5.19. Paucimyces sp.

Hanafy ve ark. (2021) tarafından antilop dışkılarından izole edilmiştir. Monosentrik tallus ve tek kamçılı zoospora sahiptir.

1.6. Anaerobik Gut Fungusların Tanımlanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler

1.6.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) sayesinde istenilen gen bölgesi üzerinde spesifik primerler kullanılarak o bölgenin çoğaltılması sağlanmaktadır. Elde edilen gen bölgesi üzerinde gerekli DNA dizi analizleri, özellikle rumen funguslarının filogenetik analizinde kullanılan İnternal Transcribed Spacer (ITS) bölgesi teşhisi gibifarklı alanlarda ve çok sayıda moleküler çalışmalar yapılmaktadır (Dieffenbach ve ark., 1993).

1.6.2. DNA dizi analizi

Filogenetik bir analiz yapılırken güvenilirlik düzeyinin artırılması aynı zamanda canlılar arasında çekirdek DNAsı, mitokondriyal DNA ve proteinleri kodlayan gen bölgelerinin kıyaslanması için DNA dizi analizi tercih edilen bir yöntemdir (Bridge ve ark., 1998). DNA dizi analiz yapılırken özellikle mutasyona karşı korunmuş bölgeler tercih edilmektedir. Bu bölgeler arasında 18S rRNA, 5,8S rRNA ve 28S rRNA bölgeleri gibi. Bu bölgeleri çevreleyen büyük alt birim (LSU) ile küçük alt birim (SSU) kısımlarında sekanslamada kullanılır. Günümüzde bu bölgeler dışında kodlanmayan ama korunaklı bölge olarak bilinen internal transcribed spacer (ITS) ara bölgeleride sekanslaması yapılarak filogenetik çalışmalarda kullanılmaktadır (Tuckwell ve ark., 2005; Nicholson ve ark., 2009). Hanafy ve ark. (2021) filogenetik sınıflandırmada LSU bölgesinde bulunan D1 ve D2 (Domain) bölgelerinin sekanslaması sonucu anaerobik gut fungusların filogenetik olarak sınıflandırılmasında gerçekleştirmektedirler.

1.6.3. ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi

Anaerobik Gut Fungus (AGF)'ların filogenetik analizi yapılırken en fazla kullanılan dizilime metodudur. İnternal Transcribed Spacer (ITS) bölgesi korunaklı olmakla beraber AGF'lar arasındaki farklılıkları bu bölge üzerindeki çalışmaların önemini artırmıştır. ITS bölgesi genel olarak 18S rRNA bölgesi ile 5,8S rRNA bölgesi arasında kalan ITS1 ve 5,8S rRNA ile 28S rRNA bölgesi arasında kalan ITS2 olmak üzere iki kısımdan oluşmuştur (Paul

ve ark., 2018). ITS bölgesi ortalama olarak 800 baz çifti uzunluğunda kısmen küçük bir bölge olması ve bu bölgenin hasarlı DNA parçasından bile kolaylıkla teşhis edilmesi AGF'ların filogenetik açıdan incelenmesi için kolaylık sağlamaktadır. ITS bölgesi için her canlıya ait özel primer tasarlanmaya gerek olmaması ve kromozomal kütüphaneye gerek duyulmaması da bu bölgenin tercih edilmesinde önemli bir etkidir.

1.6.4. RFLP (Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm)

Filogenetik sınıflandırmada morfolojik olarak fazla farklılığı olmayan aynı cinsin farklı türleri arasındaki homoloji ortaya çıkarmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem genel olarak farklı kesme enzimleri kullanılarak çalışılan bölge üzerinde polimorfizmin olup olmadığını tespit etmek ve türler arası genetik uzaklığın teşhisi için tercih edilmektedir (Eckart ve ark., 2010).

1.6.5. RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA)

DNA parçası üzerinde spesifik olmayan yaklaşık olarak 8-10 baz çifti uzunluğundaki primerlerin kullanılması sonucu yapılan basit ve hızlı bir yöntemdir. Bu yöntemde genel olarak düşük bir polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sıcaklığı seçilmekte ve primerlerin bağlanması sağlanmaktadır. Elde edilen ürünler daha sonra agaros jel elektroforezi sonucu yorumlanarak genetik haritalama, türler arası kalıtsal varyasyon ve seleksiyon işlemlerinde kullanılmaktadır (Ozköse ve ark., 2015).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bowman ve ark. (1992), *Neocallimastix*'in taksonomik olarak basamağını netleştirmek için yaptığı filogenetik analizde rRNA bölgesine ait sekans dizisini kullanmıştır.

Hausner ve ark. (2000), ITS bölgesi içerisinde 18S rRNA ile 5,8S rRNA sekans bölgesi arasında bulunan ITS1 bölgesi ile ilgili polimorfik çalışmada (RFLP) kullanılan suşların birbrinden yırt edşlmesinin zor olduğu ve bu bölge ile ilgili çalışmaların desteklenmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Chen ve ark. (2003), *Neocallimastix frontalis* türüne ait farklı suşlar üzerinde hem ITS1 bölgesi hem de RAPD polimorfik yaklaşımı üzerinde yoğunlaşmış ve sonuç olarak bu suşların genetik varyasyon bakımından farklılıklarının olmadığını göstermişlerdir.

Yücel (2010) yaptığı çalışmada *Ava* II kesme enziminin güvenilirliği göstermek için *Orpinomyces* sp.'ye ait Likenaz gen bölgesinin kesme işlemini gerçekleştirmiştir.

Wang ve ark. (2017), *Neocallimastix frontalis*, *Orpinomyces joyoni* ve *Caecomycetes* sp.'ye ait farklı suşlarına ait LSU ve ITS1 bölgelerinin sekanslanması sonucu yaptıkları filogenetik sınıflandırma çalışmasında tek başına ITS1 bölgesinin kullanılmasının yeterli olmadığını göstermişlerdir.

Ozköse ve ark. (2015), Türkiye'nin farklı yerlerinde yayılış gösteren ruminant herbivorlardan izole edilen AGF arasında RAPD analizi gerçekleştirmişlerdir. %92 oranında polimorfizm gözlemlenmiş ve filogenik olarak varyasyon netlik kazanmıştır.

Hanafy ve ark. (2018) *Neocallimastigomycota* filumuna ait yeni cins keşiflerinden bir tanesi olarak bilinen *Anaeromyces* sp.'nin filogenetik sınıflandırılmasında ITS bölgesi ile domain bölgeleri olarak bilinen D1/D2 sekans bölgeleri kullanılmıştır.

Edwards ve ark. (2019), *Neocallimastigomycota* filumuna ait olan filogenik sınıflandırma işleminde kullanılan ITS bölgelerinin güvenilirliği ile ilgili olarak anaerobic fungal community analysis (AFCA) yöntemi ile bu bölgelerin sahte veya güvenli olmayan ITS dizilerinin kıyaslanmasını dizileme yöntemi yardımıyla sekans kütüphanesine benzer bir yapı oluşturmuşlardır.

Hanafy ve ark. (2020), PacBio SMRT dizilimi yardımıyla domain bölgeleri olan D1/D2- LSU sekans tabanlı çeşitlilik araştırmasında daha önce var olan D1/D2-LSU sekans bilgileri ve ITS1 bölgesi sekans bilgileri ile kıyaslama yapılmış. Sonuç olarak D1/D2 değişken bölgelerin etkisi sonucu *Neocallimastigomycota* filumuna ait olan cins sayısının

günümüzdekinden (20 cins) farklı olabileceği ve toplamda bu filuma ait 28 farklı cins bulunabileceğini rapor etmişlerdir.

Stabel ve ark. (2020), *Aestipascuomyces dupliciliberans*'nin keşfinde D1/D2-LSU bölgelerinin filogenik araştırmasında bu AGF'un *Orpinomyces*–*Neocallimastix*–*Pecoramyces*–*Feramyces*–*Ghazallamyces* supragenus grubu içinde yeni bir monofiletik dal şeklinde olduğunu rapor etmişlerdir.



3. TEZİN AMACI VE ÖNEMİ

Anaerobik fungusların en az 25 yeni cins-taksonu herbivorların sindirim sisteminde belirlenmiştir, ancak hala eksik anaerobik fungus cins ve türü bulunmaktadır. Cins ve tür seviyelerindeki anaerobik fungus çeşitliliğinin çoğu şu anda mevcut olan ITS1 dizileriyle belirlenmiştir, ancak bu türlerin çoğu yalnızca doğrudan mikrobiyom örneklerinden elde edilen ITS1 dizileri ile temsil edilmektedir. Bu çalışmada, GenBank'ta bulunan tüm bağırsak anaerobik mantar dizisi ITS1 ve 28S dizileri kullanılarak kolektif çeşitlilik anaerobik mantar çeşitliliği incelenecektir. Bu çalışmanın amacı, GenBank nükleotit veri tabanından ilave sekanslar dayanarak, Tunceli'de yayılış gösteren ruminat hayvanlardaki (sığır, keçi, koyun, at, eşek vb.), anaerobik funguslar arasındaki filogenetik bağlamdaki çeşitliliği incelemek ve anaerobik funguslar arasındaki cins düzeyinde filogenetik ilişkileri değerlendirmektir. 1975'teki keşiflerinden bu yana (Orpin, 1975), anaerobik funguslar geleneksel olarak izolasyon, yetiştirme, morfolojinin mikroskopik karakterizasyonu ve metabolizmanın biyokimyasal karakterizasyonu dahil olmak üzere kültür bazlı yöntemler ile karakterize edilmiştir (Ho ve Barr, 1995). Bunun için mikroskopik özelliklerinin yanında nuc rDNA gibimarker genleri kullanılarak filogenetik analizine dayanan taksonomik analizler yapılmıştır. En az 50 farklı otçul hayvan türünde bulunurlar (Ljungdahl, 2008). Halen bilinen tüm AF'lar, yeni kurulan filum Neocallimastigomycota dahil, tek bir ailede Neocallimasticaceae olarak sınıflandırılmıştır (Hibbett ve ark., 2007). Şimdiye kadar 18 farklı cins ve ~38 farklı tür tanımlanmıştır (Heath ve ark., 1983; Gold ve ark., 1988; Barr ve ark., 1989; Breton ve ark., 1990 ; Özköse ve ark., 2001; Ariyawansa, 2015; Callaghan ve ark., 2015; Dagar ve ark., 2015; Hanafy ve ark., 2017). DNA barkod verilerinin miktarı (çoğunlukla ITS1 ve ITS2'ye dayanarak), hem saf kültürler hem de çevresel DNA dizileme projelerinden dolayı arttıkça, mevcut 18 cinsin anaerobik fungus çeşitliliğinin sadece bir alt kümesini temsil ettiği ortaya çıkmıştır (Griffith ve ark., 2010). Örneğin, Liggenstoffer ve arkadaşları tarafından (2010) yapılan bir çalışmada, çok çeşitli konakçı türden 250.000 ITS1 sekansı oluşturmuş ve potansiyel olarak sekiz yeni bölüm tanımlamıştır. Ayrıca, morfolojik özelliklerin ve DNA barkod verilerinin incelenmesiyle, bazı taksonların yeniden atanmasına neden olmuştur (Fliegerová ve ark., 2012). Farklı cins ve anaerobik mantar türleri arasında morfolojide önemli farklılıklar vardır, bu da çoğu zaman morfolojik ve fenotipik sınıflandırmayı zorlaştırır.

Ek olarak, birçok anaerobik mantar, hâlihazırda mevcut kültür yöntemleri kullanılarak yetiştirilemeyebilir. Bu nedenle, kültürden bağımsız metotlar, en son kullanılan çalışmalarda anaerobik mantar çeşitliliğini incelemek için öncelikle, en çok kullanılan yaklaşım olan internal transcribed spacer'in (ITS1) (Liggenstoffer ve ark., 2010) PCR ampliconlarının sekanslanması ve filogenetik analizi ile kullanılmalıdır. Son tanımlanan cins ve tür örneklerinin birçoğunda, rRNA lokusundaki internal transcribed spacer 1 (ITS1) ve büyük ribozomal alt ünite (28S rRNA D1-D2 alanları) bölgelerine dayanan filogenetik analizler etkili olmuştur, moleküler veriler AF'de cins ve tür seviyesi tanımlanmasında giderek daha önemli bir rol oynamaktadır (Griffith ve ark., 2010; Liggenstoffer ve ark., 2010). Bu açıdan değerlendirildiğinde bu çalışma ile bu bölgedeki dağ keçilerindeki AF hakkında hiçbir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma ile bu bilimsel boşluk doldurulmaya çalışılacaktır.

4. MATERYAL VE METOT

4.1. Materyal

4.1.2. Kullanılan kimyasalar

Bu çalışmada Sigma (Almanya) ve Merck (Almanya)'dan temin edilen ticari olarak yüksek saflıktaki kimyasallar kullanılmıştır. Farklı bir kimyasal kullanımı olduğu zaman belirtilmiştir.

4.2. Metot

4.2.1. Fungus izolasyonu için gerekli dışkı örneklerinin toplanması ve saklanması

Tunceli çevresinden toplanan ruminat hayvanlara ait dışkı örnekleri uygun saklama kaplarına konularak en az 1 saat içerisinde laboratuara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen dışkı örnekleri hemen izolasyon işlemine tabi tutulmuş ve kalan örnekler tekrar kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

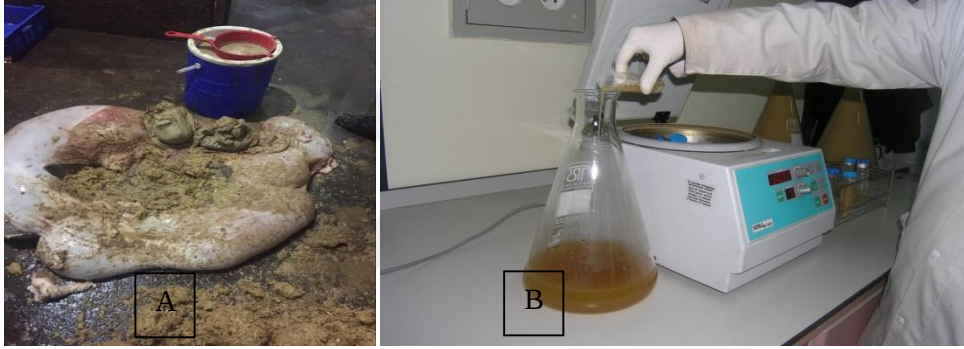


Şekil 4.1. Tunceli çevresinde bulunan ruminantlardan dışkı örneği toplama

4.2.2. Rumen sıvısının hazırlanması ve muhafaza edilmesi

İzolasyon, tanımlama ve çalışma sırasında kullanılacak olan besiyeri için gerekli olan rumen sıvısı Tunceli mezbahanesinde kesilen ruminant hayvanların rumen içeriğinden elde edilmiştir.

Elde edilen rumen içeriği çift katlı bir tülbent yardımı ile süzülerek erlenmayer içerisinde yaklaşık olarak bir saat boyunca çökmesi beklenmiş daha sonra 50ml'lik plastik falcon tüplerine aktararak 3500g'10 dk santrifüj yapılmıştır (Santrifüj işlemi iki tekrarlanmıştır). Santrifüj sonucu üst sıvı başka bir falcon tüpüne aktararak -20°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 4.2. Rumen sıvısının hazırlanması. a) Mezbahaneden alınan rumen örneği b) Rumen sıvısının santrifüjleme basamağı

4.2.3. Anaerobik besiyerinin hazırlanması

In vitro çalışmalarda anaerobik gut fungusların gelişimi gözlemlemek için gerekli olan besiyeri yapımı Orpin (1976) esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Besiyeri için gerekli olan bileşik ve miktarları Tablo 4.1' de verilmiştir.

Tablo 4.1. Anaerobik Gut Fungusların in vitro koşullarda çalışması için gerekli olan besi ortamı

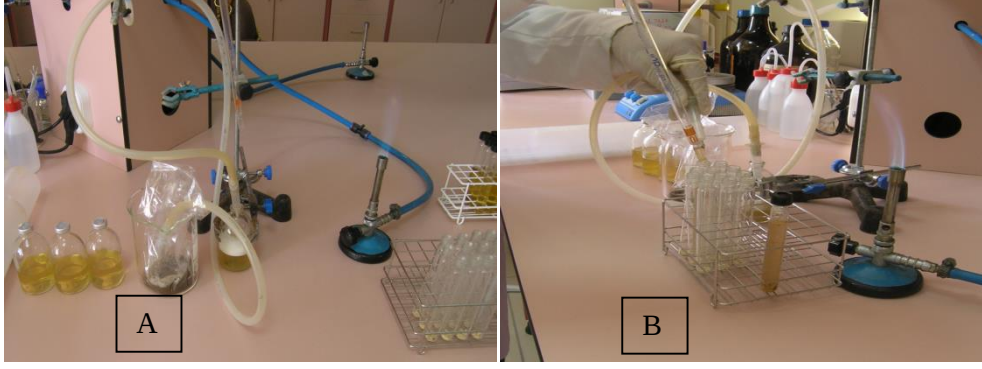
İçerik	Sıvı besiyeri
Mineral Solusyon-1	150ml/L
Mineral Solusyon-2	150ml/L
Rumen sıvısı	150ml/L
NaHCO ₃	6 g/L
Yeast Extract	2,5g/L
dH ₂ O	550ml/L
Mineral Solusyon-1	Sıvı besiyeri
K ₂ HPO ₄	3g/L
Mineral Solusyon-2	Sıvı besiyeri
KH ₂ PO ₄	3g/L
(NH ₄)SO ₄	6g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6g/L
CaCl ₂	0,4g/L
NaCl	6g/L

Besiyeri için verilen bütün kimyasallar (Sistein-HCl ve Resazurin hariç) verilen miktarda erlen içerisinde kaynatılmış bu sırada besi ortamı bol miktarda CO₂ gazı ile doyurulmaya başlanmış ve Sistein-HCl eklenerek oksijenin bağlanması sağlanmıştır. Ortama eklenen resazurin ise ortamda oksijenin için bir indikatör görevi üstlenmiştir. Kaynama süresi olarak besiyerinin rengi açık sarı oluncaya kadar devam etmiştir.

Yapılan besiyeri daha sonra Hungate tüplerine veya serum şişelerine istenilen hacimde dağıtılır ve bu işlem yapılırken ortama CO₂ gazı verilmeye devam eder. Sonuç olarak dolumu yapılan serum şişeleri veya Hungate tüpleri dikkatli bir şekilde kapakları kapatılarak otoklavlanmıştır (110°C’de 10dk). Tez çalışması için samanlı, glikozlu, sellobiyozlu olmak üzere 3 farklı besiyeri yapılmıştır. Enerji kaynağı litreye 5 gr olacak şekilde ayarlanmıştır.

4.2.4. Dışkıdan fungus izolasyonu ve inkübasyonu

Theodorou ve ark. (1993) göre yapılan fungus izolasyonuna göre; 10 gr dışkı örneği 100 ml anaerobik besiyeri içerisinde çözündürülür ve bu çözünmüş süspansiyon sıvısından 10 ml alınarak içerisinde saman bulunan boş Hungate tüplerine anaerobik koşullara dikkat edilerek aktarılır. Seyreltme işlemi bu şekilde 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ olacak şekilde 10⁻⁷ye kadar devam eder. En son 3-7 gün 39°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında gelişme gözlenen tüplerdeki fungusların saflaştırılması için Rolling tüp yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 4.3. Dışkıdan Anaerobik Gut Fungus izolasyonu sırasında dışkı materyalinin boş besi ortamında seyreltilmesi (A). Dilüsyon işlemi sırasında örneklerden 10^{-1} ve diğer alt dilüsyon basamaklarının hazırlanması (B)

4.2.5. Anaerobik gut fungusların saflaştırılması

Joblin (1981)'e ait 'Roll Tüp' yöntemine göre yapılan saflaştırma basamağında %0,5 (g/ml) glikoz ve %1,5(g/ml) agar bulunan anaerobik şartlar altında hazırlanan besiyerleri 110°C 'de 10dk sterilizasyona bırakılır. Toplam hacmi 4ml olacak şekilde hazırlanan bu besiyeri yaklaşık olarak sıcaklığı 40°C olunca (Otoklavdan çıktıktan sonra) saflaştırma işlemi için tüplere alt kültüre alınan funguslardan 0,5ml'lik inokülasyonu yapılır. Daha sonra bu tüpler buz veya soğuk su ile dolu bir kap içersinde yatay hale getirilerek hızlı bir şekilde döndürülür ve agarın donması sağlanır. Bu basamaklar gerçekleştirilirken bakterilerin defaunası için ortama uygun miktarda antibiyotik ekimi yapılmalıdır.

4.2.6. Antibiyotik etkisi

Anaerobik Gut Fungus (AGF) izolasyonu yapılırken bakteri kontaminasyonun engellenmesi için farklı konsantrasyonlarda ve farklı yapılarda antibiyotikler hazırlanmıştır. Hazırlanan antibiyotiklerin sterilizasyonu aksi belirtilmediği sürece $0,22\mu\text{m}$ çaplı enjektör filtresi ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan antibiyotikler ve son konsantrasyonları çizelgede verilmiştir.

Tablo 4.2. Antibiyotik çeşitleri ve son konsatrasyonları

Antibiyotik	Son konstrasyon (µg/ml)
Kloramfenikol	100 µg/ml
Ampisilin	100 µg/ml
Streptomisin	140 µg/ml
Eritromisin	200 µg/ml

4.2.7. Rumen funguslarının gözlemlenmesi

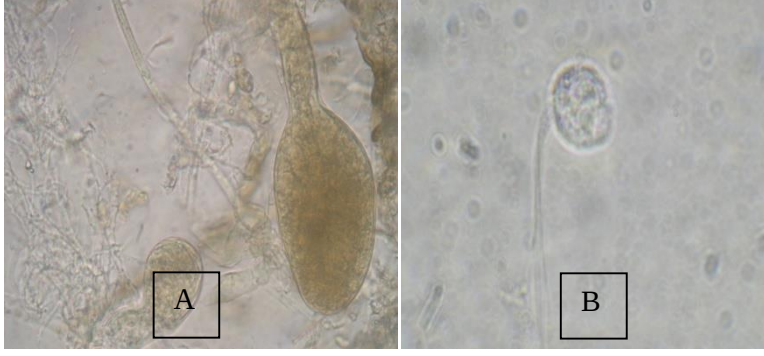
Roll tüp basamağı gerçekleştirildikten sonra uygun sıcaklık ve çevre şartları altında bu tüpler inverted mikroskop yardımıyla gözlemi yapılır ve istenilen fungusların morfolojik özelliklerine bağlı olarak hem izolasyonu hemde görüntülenmesi gerçekleştirilir.



Şekil 4.4. Rumen funguslarının mikroskop altında gözlemlenmesi ve morfolojik izolasyon basamağı

4.2.8. Rumen funguslarının cins düzeyinde tanımlanması

Anaerobik Fungusların cins düzeyinde tayini için hem vejatatif evre hem de hareketli spor evresinin mikroskopisi gözlemlenir. Vejataif evrede monosentrik veya polisentrik özelliği spor evresinde ise tek veya çok kamçılı olması önemlidir.



Şekil 4.5. Rumen funguslarının morfolojik düzeyde sınıflandırılması için gerekli olan vejetatif evre (A) ve spor evresinin (B) mikroskopik görüntüsü

4.2.9. Anaerobik fungusların alt kültüre alınması

Anaerobik Gut Fungus (AGF)'lar ile yapılan çalışmalarda ortamın oksijen ile teması kesilmeli ve anaerobik koşullara dikkat edilmesi gerekmektedir. Ho ve Bauchop (1991)'göre AGF'in zoospor salınımı için optimum süre ve ortam şartlarının önemi vurgulanmıştır. Bundan dolayı izolasyon basamağı bitene kadar yada saflaştırılmanın gerçekleşmesine kadar yapılan alt kültür çalışmasında çevresel koşullara dikkat edilmelidir. Bunun için Hungate (1969) ve Bryant (1972) dayalı alt kültür alma yöntemi geçerliliği devam ettirmektedir. İzolasyon basamağında gelişimi gözlemlenen AGF tüplerinden steril enjektör yardımıyla 0,5ml alınarak enerji kaynağı içeren besiyerine inoküle edilerek inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem stok kültür veya saflaştırma oluncaya kadar devam edilmiştir.

4.2.10. Rumen funguslarda stok oluşturma

Saflaştırılma işlemi ve cins düzeyinde tespiti yapılan Anaerobik Gut Fungus (AGF)'ların kültür koleksiyonu veya stok oluşturulmasında samanlı besiyerinde gelişimi sağlanan AGF'lar ortam koşulları anaerobik olacak şekilde %15'lik (v/v) 1ml lik steril karyoviyal tüplerine aktarılır. Aktarma işlemi sırasında alınan samanın miktarına göre birden fazla karyoviyal tüplerine aktarılabilir. Anaerobik koşullarda aktarımı sağlanan örnekler öncelikle -20°C'ye sonra sıvı azot tankına konularak uzun süreli muhafazası sağlanmıştır.

Daha sonra çalışılmak istenen örnekler sıvı azot kültür tankından alınır, oda koşullarda çözünmeye bırakılır ve anaerobik koşullar altında samanlı Hungate tüpüne aktarılır. Duruma göre uygun miktarda antibiyotik eklenebilir.

4.3. Moleküler Metotlar

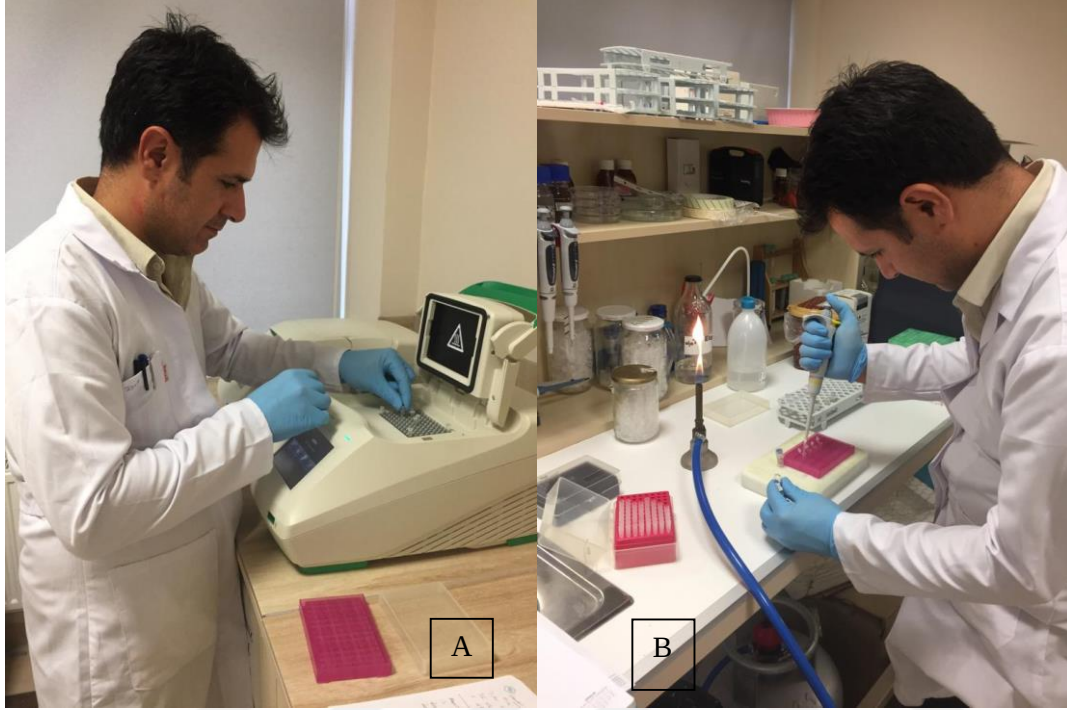
4.3.1. DNA izolasyonu

Anaerobik Gut Fungus (AGF)'lar ökaryot yapılı bir mikroorganizma olmalarından dolayı DNA izolasyon basamakları Doyle ve Doyle (1987) tarafından ortaya çıkarılan CTAB (hexa-decyltrimethylammonium bromide) metodunun modifikasyon ile gerçekleştirilmiştir. Çalışılması planlanan saflaştırılma sonucu elde edilen AGF'lar yaklaşık olarak 48 saatlik uygun besi ortamında inkübasyonu tamamlandıktan sonra hücrelerin toplanması için Hungate tüpleri 1000 g' 15 dk santrifüj edilerek üst sıvı dökülür ve hücreler 3 defa saf su ile yıkanır. Yıkama işlemi sonrası elde kalan hücre peleti 2 ml'lik steril ependorf tüplerine aktararak sıvı azot yardımı ve hücre öğütücü cihaz ile hücre duvarının mekanik kırma işlemi gerçekleştirilir. Kırma sonucu elde edilen hücre üzerine 700µl CTAB izolasyon tamponu eklenir. Tampon solusyonu eklenen örnekler inkübasyon işlemi için 65°C de 60dk bekletilmiştir. İnkübasyon sonucu 500µl kloroform eklenerek kısa bir vorteksleme yapılmıştır. Daha sonra 5dk 65°C'de kısa süre bekletilir. Isıtma işleminden sonra örnekler 10000g'de 10dk mikrosantrifüj ile santrifüje tabi tutularak üst sıvıdan alınan 500µl çözelti başka bir steril ependorfa dikkatli bir şekilde aktarılır. Ependorfa aktarılan çözeltiye 300µl isopropanol ilave edilerek tekrar santrifüj işlemine tabi tutulur. Santrifüj sonrası üst sıvı dökülerek pelet kısmına tuzların parçalanması için etanol (%70 etanol, 1ml) eklenir. Etanolün sistemden uzaklaşması için 70°C'de 20dk ısıtma işlemi uygulanır. Etanolün tamamen uzaklaşması sonucu ependorf içerisinde bulunan DNA peletine 50µl TE tamponu veya dH₂O eklenerek -20°C saklanır. İzolasyon sırasında kullanılan CTAB kimyasalı 0.1M TrisHCl, pH8.0; 1,4M NaCl; 0.02 M EDTA; %2 CTAB olacak şekilde hazırlanmıştır. TE tamponu ise 1mM TrisHCl, pH 8.0; 0.1mM EDTA olacak şekilde ayarlanmıştır.

4.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu uygulaması

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) için planlanan protokol basamakları ve PZR şartları belirlenmiştir. PZR ile çoğaltılması istenen internal transcribed spacer (ITS) bölgesi için ileri primer (Forward) 5-CTA CCG ATT GAA TGG CTT AGT G-3, geri primeri (revers) için 5-AGT TCA GCG GGT ACT CTT ATC TG-3 kullanılacaktır. Buna göre PZR için hazırlanacak olan karışımda toplam hacim 50µl olacak şekilde sırası ile 41µl dH₂O, 1µl

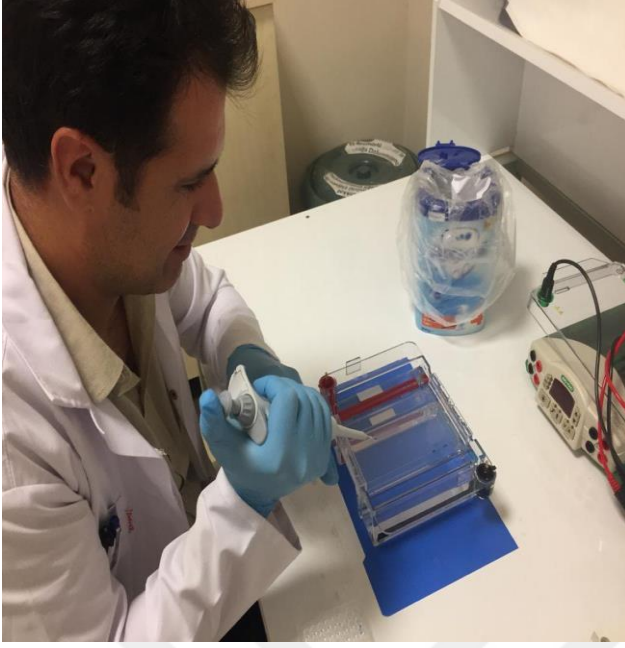
forward (ileri) primeri, 1µl revers (geri) primeri, 1µl Fungal DNA örneği, 1 µl dNTP ve 0,5µl Taq DNA Polimeraz eklenerek hazırlanmıştır.



Şekil 4.6. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) hazırlanması sırasında cihazın PZR protokülüne göre ayarlanması (A) ve PZR için reaksiyon karışımının hazırlanması (B)

4.3.3. Jel Elektroforez Uygulaması

Sambrook ve ark. (2001) göre Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonucu oluşan PZR ürünü %1,5'lik agaros (1X TBE buffer içerisinde çözülerek) jel hazırlanmıştır. PZR ürün görüntüsü UV ışığı yardımıyla görüntülenmiştir. Elektroforez işlemi sırasında kullanılan jele uygun miktarda PZR ürünü (5µl) ile yükleme tamponu karıştırılarak (1µl) inoküle yapılmıştır.



Şekil 4.7. Jel elektroforez uygulaması

4.3.4. DNA Örneklerinin Dizilenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonucu elde edilen ürünlerin dizi analizi yapılabilmesi için Cycling PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem Yazdıç (2011)'ın çalışmasında yaptığı protokol esasına göre yapılmıştır.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Bulgular

5.1.1. Dışkı toplama ve rumen fungusların izolasyonu

Tunceli’de yayılış gösteren koyun, keçi, sığır ve at olmak üzere 4 farklı herbivor hayvanlardan dışkı örnekleri toplanmıştır. Bu işlem sırasında dikkat edilmesi gereken en önemli yapının bu mikroorganizmaların oksijen ile fazla temas etmemesidir. Theodorou ve ark. (1990) bu mikroorganizmaların oksijen karşı tolerans seviyesinin fazla olmadığı rapor etmiştir. Bundan dolayı toplanan dışkılar uygun bir kese kağıdı içerisinde alındıktan sonra laboratuara götürülmüş ve izolasyon basamağının başlayacağı zamana kadar -20°C muhafaza edilmiştir.

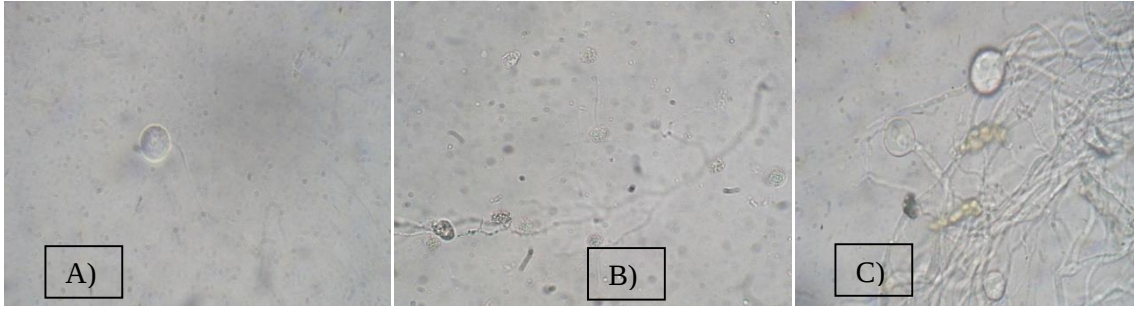
Dışkı örneklerinin toplanması sırasında alınan örneğin taze ve hangi hayvana ait olduğuna dikkat edilmiş ve hayvan ile dışkılar numara verilerek raporlanmıştır. Rumen fungusların izolasyonu Theodorou ve ark. (1993)’na ait olan yöntemle göre yapılmış izolasyon ve saflaştırma işlemi ise Hungate (1969) motodu yardımıyla Joblin (1981)’e ait olan Roll tüp yöntemi kullanılmıştır. İzole edilen rumen funguslar ve dışkı örnekleri tablo 5.1’de verilmiştir.

Tablo 5.1. İzolasyonu yapılan rumen fungusları stok numaraları ve dışkı kaynakları

Stok No	Dışkı Kaynak	İzolasyon Tarihi
MUBAM_AGF-1	Keçi	25.12.2020
MUBAM_AGF-2	Keçi	10.01.2021
MUBAM_AGF-3	Keçi	10.01.2021
MUBAM_AGF-4	Sığır	10.01.2021
MUBAM_AGF-5	Sığır	10.01.2021
MUBAM_AGF-6	Sığır	14.01.2021
MUBAM_AGF-7	Sığır	14.01.2021
MUBAM_AGF-8	Sığır	14.01.2021
MUBAM_AGF-9	At	16.01.2021
MUBAM_AGF-10	Koyun	16.01.2021
MUBAM_AGF-11	Koyun	16.01.2021
MUBAM_AGF-12	Koyun	16.01.2021

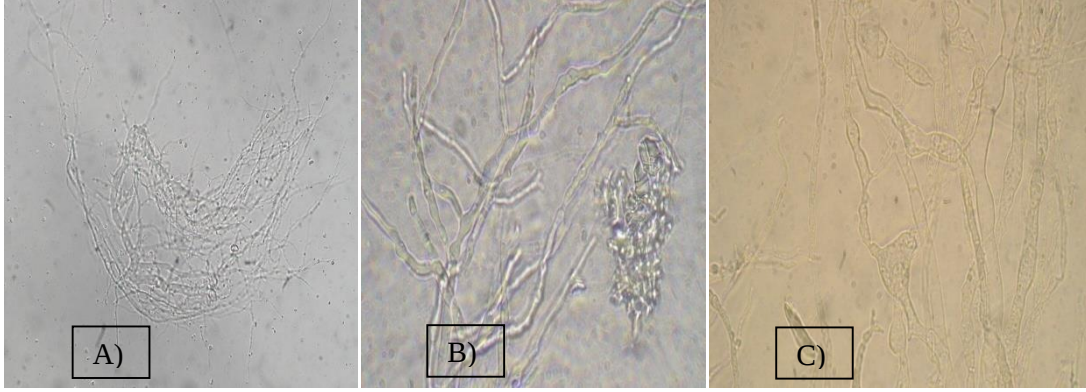
5.1.2. Rumen fungusların cins düzeyinde tanımlanması

Rumen fungusları taksonomik olarak morfolojik özellikleri ve moleküler kimliğine göre sınıflandırılarak filogenetik ağaçlandırılması yapılmaktadır. Morfolojik karakterine göre monosentrik ve polisentrik olarak iki kısımda incelenen rumen fungusları sahip oldukları spor kesesinin yapıları da farklılık göstermektedir (Li ve ark., 1997). İzolasyon ve saflaştırma basamağında rumen funguslarının cins düzeyinde tanımlanması (Barr ve ark., 1989) oldukça önemli olduğu için yapılan ışık mikroskobu tarama sonucunda *Neocallimastix* sp, *Orpinomyces* sp ve *Piromyces* sp'ye ait rumen fungusların ilk tespiti yapılmıştır. Buna göre MUBAM_AGF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11 ve 12 stok numarası verilen dışkılardan izolasyonu yapılan rumen fungus için spor kesesinin tek olması, fazla miktarda bir bölgeden dallanma göstermesi ve zoosporlarındaki kamçı sayısının çok olması (4'den fazla) bu fungusun *Neocallimastix* sp olabileceğini göstermiştir (Şekil 1.9).



Şekil 5.1. MUBAM_6 stok numarasına ait dışkıdan izolasyon ve saflaştırma sonucu elde edilen *Neocallimastix* sp'ye ait zoospor (A ve B) ve vejetatif yapının (C) ışık mikroskobu görüntüsü

MUBAM_AGF 7,8 ve 10 stok numaralı dışkılardan yapılan izolasyon ve saflaştırma işlemi sonucu polisentrik yapıda bir vejetatif görüntü ve zoosporlarındaki kamçı sayısının çok olması aynı zamanda polisentrik yapıyı Breton ve ark. (1990) polinükleer yapılı rizomselyum yapısına uyması sonucu bu rumen fungusun *Orpinomyces* sp'ye ait olduğunu göstermiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.2. MUBAM_AGF 7 (A) ,8 (B) ve 10(C) stok numaralı dışkılarında saflaştırılan *Orpinomyces* sp'ye ait mikroskop görüntüleri

MUBAM_AGF 9 stok numaralı dışkı örneğinden ise polisentrik tallusa sahip, farklı konumlarda bulunan spor keselerinin bulunması ve zoospora ait kamçı sayısının tek kamçılı(4'den az) olarak bulunması sonucu bu fungusun ise *Piromyces* sp. olduğunu göstermiştir (Şekil 5.2).



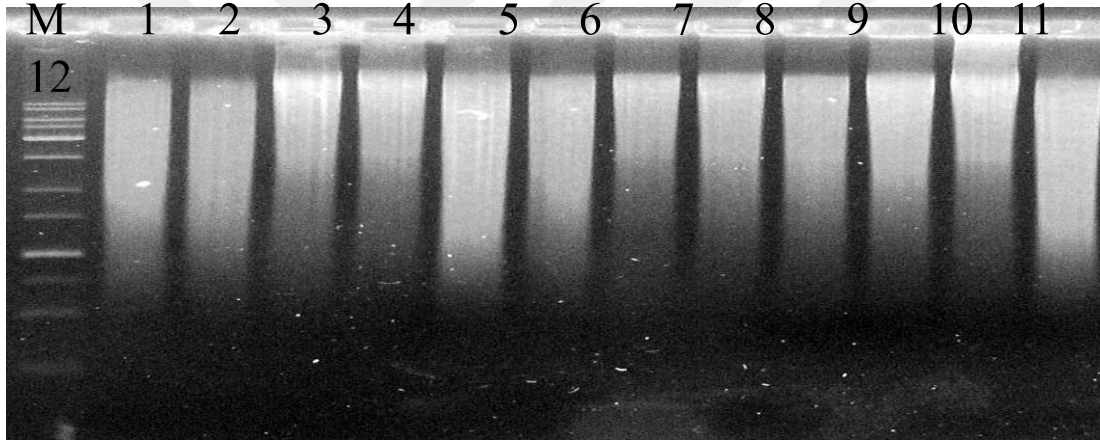
Şekil 5.3. MUBAM_AGF 9'a stok numaralı dışkılarında saflaştırılan *Piromyces* sp'ye ait mikroskop görüntüsü.

Örneklerin cins düzeyinde tespiti yapıldıktan sonra elde edilen rumen fungusların DNA izolasyonları ile DNA dizi analizi için kullanılacak olan ITS bölgeleri için polimeraz zincir reaksiyon (RZR) basamağı gerçekleştirilmiştir.

5.1.3. Rumen Fungusların Moleküler Tanımlanması ve Filogenetik Ağaç Modeli

Wubahh ve ark. (1991)'larına göre rumen fungusların cins düzeyinde tespiti sırasında ışık mikroskop görüntülerinin yetersiz olabileceği ve bunun için moleküler bir desteğe ihtiyaç olduğunu söylemişlerdir. Bundan dolayı rumen fungusları için yapılacak moleküler tanımlama işlemi sırasında DNA izolasyonu önemli bir yere sahiptir.

Elde edilecek DNA molekülünün miktarı ve saflığı gibi durumlar sonraki basamakları da etkilemektedir. DNA izolasyonu için CTAB (Doyle ve Doyle, 1987) yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen rumen funguslarına ait DNA molekülleri %1 (w/v)'lik agaros jelde görüntülenmiştir (Şekil 5.4).



Şekil 5.4. Rumen Funguslarına ait CTAB metodunu sonucu elde edilen DNA'ların %1'lik (w/v) agaros jel görüntüsü ve stok numaraları gösterilmiştir. M:1kb 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 ve 12 numaralı örnekler sırası ile Mubam_AGF'ye aittir.

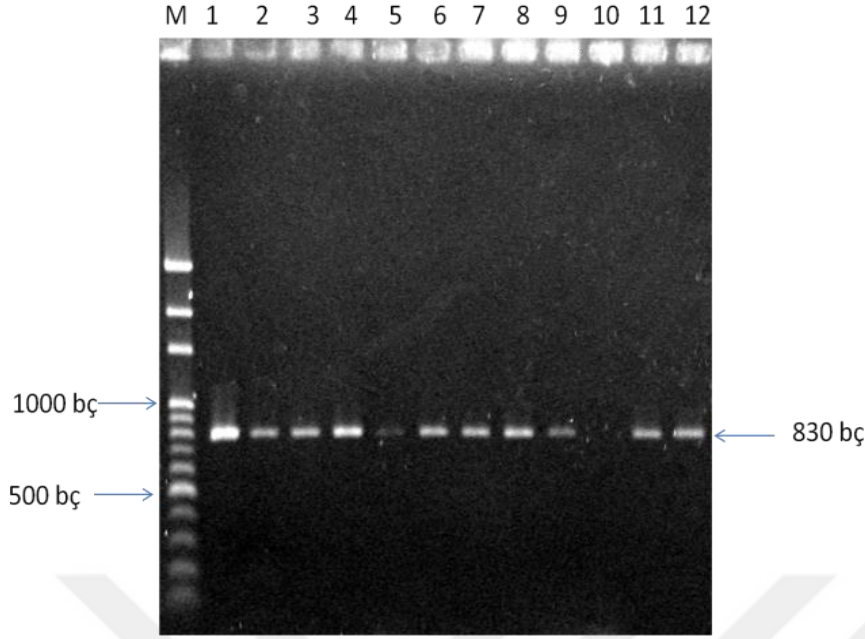
DNA izolasyon basamağından sonra moleküler tanımlamada kullanılacak olan ITS bölgesinin tespiti için yapılacak olan PZR basamağının çalışma koşulları hazırlanmış ve tablo 5.4.'de verilmiştir.

Tablo 5.2. Rumen Fungal DNA’larından ITS bölgesi için yapılacak olan PZR çalışma şartları.

	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk denatürasyon	94°C	3 dak	1
Denatürasyon	94 °C	50 sn	25
Yapışma	57 °C	45sn	
Uzama	72 °C	1 dak	
Denatürasyon	94 °C	40 sn	30
Yapışma	61 °C	45 sn	
Uzama	72 °C	1 dak	
Son Uzama	72 °C	10 dak	1
Bekleme	4 °C	∞	

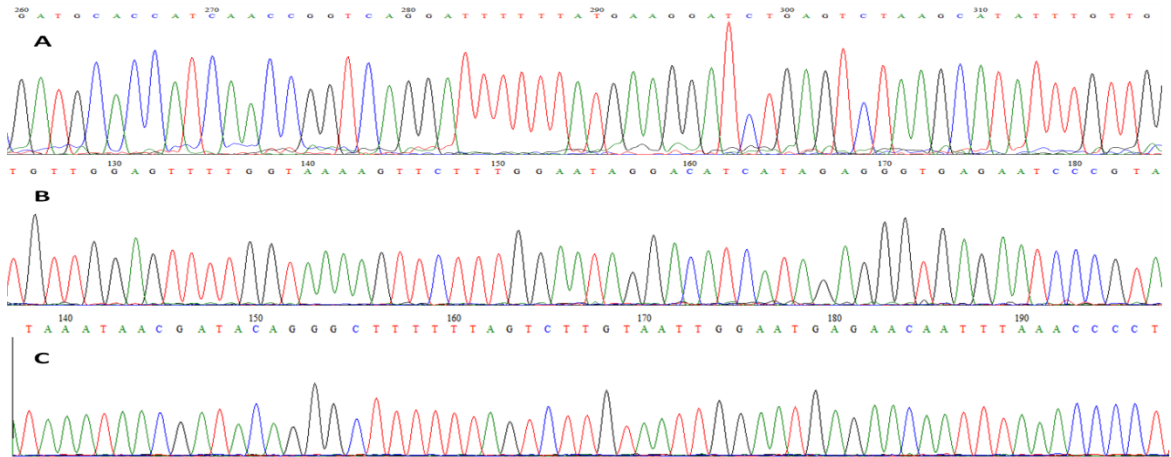
Rumen fungusların moleküler sistematüğinde kullanılan mutasyona karşı korumalı bölgeler arasında 5.8S rRNA (185 bç) , ITS1(215bç), ITS28S rRNA(225bç) ve 18S rRNA (175bç) bulunmaktadır. Bu bölgelerinin tamamını kapsayan ITS adı verilen bölge ortalama olarak 800 bç uzunluğunda olduğü bilinmektedir.

Bütün bölgeleri kapsayan ITS primerleri ile yapılan PZR sonuçları %1,5 (w/v)’luk agaros jelde görüntülenmiş ve buna göre MUBAM_AGF 1-12 (arası) stok numaralı funguslardan sadece 10 numaralı örneğü ait jel görüntüsü elde edilememiştir (Şekil 5.5). MUBAM_AGF 10 stok numaralı rumen fungusu sadece moleküler düzeyde incelenmiştir.



Şekil 5.5. MUBAM_AGF'lere ait genomik DNA'lerden elde edilen ITS bölgesinin PZR agaros jel görüntüsü. Jel görüntüsüne göre MUBAM_AGF 5 ve 10 stok numaralı DNA örneğinden ITS bölgesine ait bir bant görüntüsü elde edilememiştir (Marker-M: 1kb)

PZR agaros jel görüntülemesi sonucu MUBAM_AGF 5 ve 10 numaralı örnek dışındaki diğer bütün örnekler ITS bölgesi dizilemesi yapılmış ve gelen sonuçlar NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanı yardımıyla sisteme kayıtlı olan ITS dizileri ile homolojisi yapılmıştır (Şekil 5.6).



Şekil 5.6. AGF-1 (A), AGF-2 (B) ve AGF-3 (C) örneklerine ait ITS bölgelerinin ileri primer ile elde edilen nükleotid dizisine ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir

Tablo 5.3’de rumen funguslarının ait ITS bölgelerinin NCBI veri tabanına blastlama sonucu izole edilen rumen funguslarının sisteme kayıtlı olan funguslara benzerlik yüzdesi. MUBAM_AGF-1 stok numaralı anaerobik gut fungusun saflaştırılması sonucu elde edilen ITS sekans dizisinin NCBI veri tabanında %97,38’lik oranla *Neocallimastix* sp.’ye ait olduğu ve sonuç olarak bu izolatın sekans analizi sonucu *Neocallimastix* sp. olabileceği gösterilmiştir.

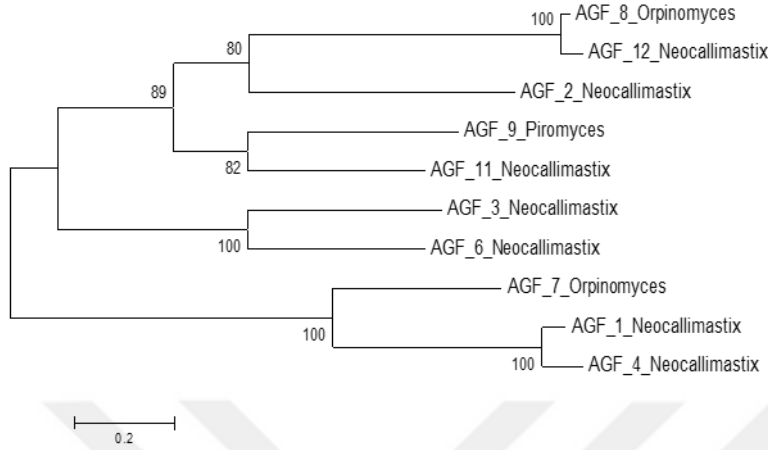
Tablo 5.3. Çalışmada izole edilen rumen fungusların NCBI-Blast homoloji sonuçları

Rumen Fungus	Morfolojik Tanımlaması	NCBI-Blast (Benzerlik -%)
MUBAM_AGF-1	<i>Neocallimastix</i> sp.	97.38%
MUBAM_AGF-2	<i>Neocallimastix</i> sp.	92 % (Uncultured <i>Neocallimastigales</i>)
MUBAM_AGF-3	<i>Neocallimastix</i> sp.	96 %(Uncultured <i>Neocallimastigales</i>)
MUBAM_AGF-4	<i>Neocallimastix</i> sp.	98.01%
MUBAM_AGF-5	<i>Neocallimastix</i> sp.	DNA dizisi elde edilemedi
MUBAM_AGF-6	<i>Neocallimastix</i> sp.	97.99%
MUBAM_AGF-7	<i>Orpinomyces</i> sp.	96.77%
MUBAM_AGF-8	<i>Orpinomyces</i> sp.	91.54%
MUBAM_AGF-9	<i>Piromyces</i> sp.	96.67%
MUBAM_AGF-10	<i>Orpinomyces</i> sp.	DNA dizisi elde edilemedi
MUBAM_AGF-11	<i>Neocallimastix</i> sp.	98.65%
MUBAM_AGF-12	<i>Neocallimastix</i> sp.	98%

NCBI veri tabanı yardımı ile benzerlik yüzdesi bulunan rumen funguslarının filogenetik analizi yapılırken MEGA X isimli yazılım programı kullanılmıştır. Sekansların yazılıma girilmesi sonucu yapılan korelasyon hesaplaması sonucu filogenetik bir ağaç elde edilmektedir.

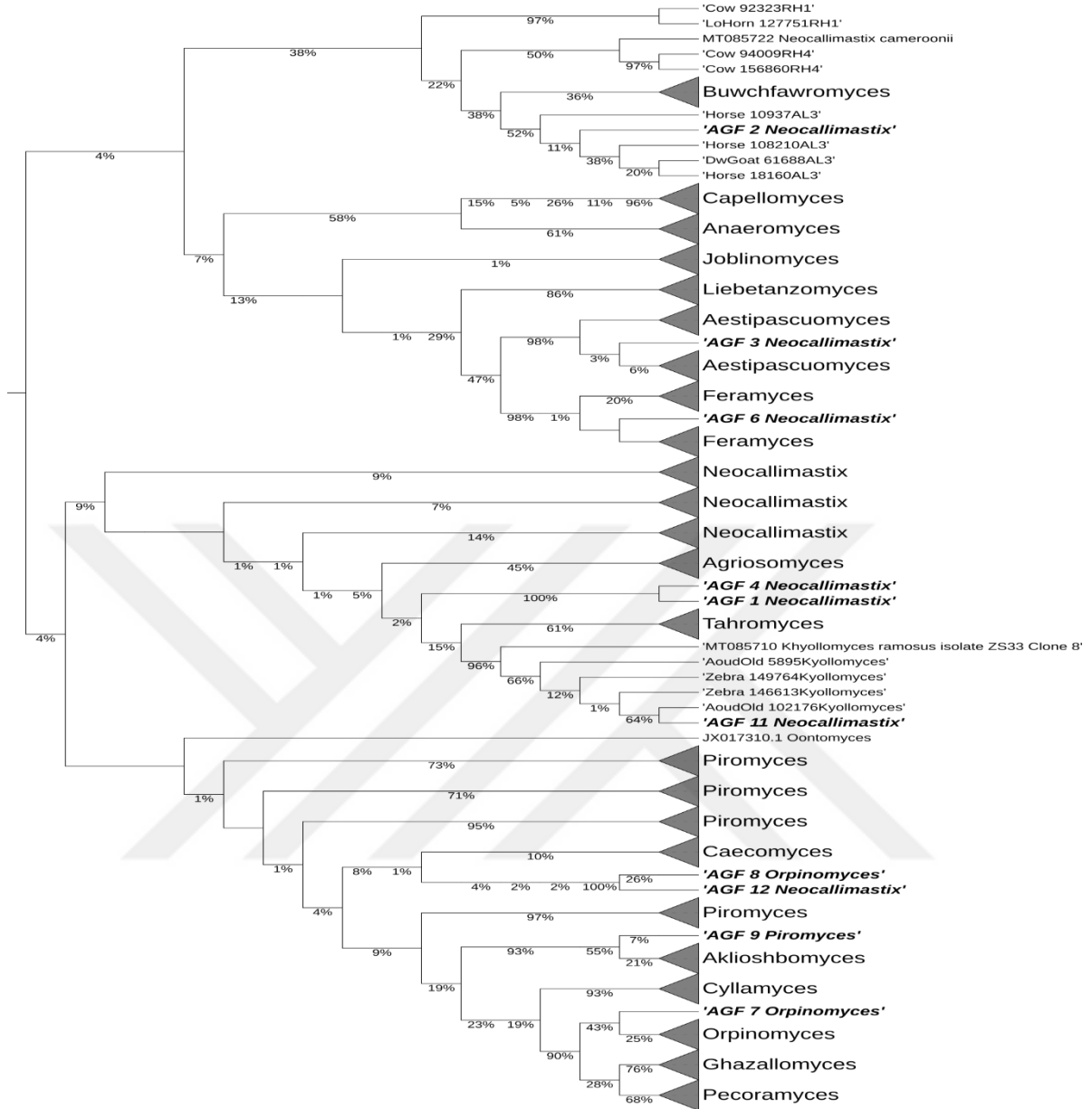
Sekans sonuçları sisteme iki farklı şekilde yorumlanması için ayrı ayrı girilmiştir. İlk girilen sekans sonrası elde edilen sonuçlarda rumen fungusların kendi aralarındaki değerlendirilmesi yapılmıştır. Daha sonra yapılan değerlendirmede ise izole edilen rumen

fungusların günümüzde mevcut olan diğer cins ve türleri arasındaki sistematik durumunu göstermiştir.



Şekil 5.7. İzole edilen rumen funguslarının MEGA 6 programı kullanılarak Neighbour Joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik ağacı

Elde edilen sonuçlar bölgedeki herbivor örneklerinde önceki çalışmalara benzer olarak yaygın olan cinsin *Neocallimastix* sp. olduğunu göstermiştir. Bunun yanında *Orpinomyces* sp ve *Piromyces* sp.'nin daha az görülmesi hatta *Piromyces* sp. cinsinin tek bir dışkı örneğinde görülmesi izolasyon yönteminden kaynaklanacağı gibi bölgede yaygın bir cins olmama ihtimalinde de olabilmektedir.



Şekil 5.8. ITS bölgesine göre yapılan filogenetik ağaç MEGA 6 programı yardımıyla ve Neighbour Joining yöntemi ile gerçekleştirilmiştir

Elde edilen filogenetik ağaçlandırma modeli sonucu MUBAM_AGF-1 ve MUBAM_AGF-4 stok numaralı *Neocallimastix* sp.'lerin birbirine daha yakın olduğu hem şekil 5.7. hem de Şekil 5.8'de verilen analiz sonucu ortaya çıkmıştır. MUBAM_AGF-8 ve 12 stok numaralı anaerobik gut fungusların farklı cins olmasına rağmen benzer bir dalda olması bu canlılar için Dagar ve ark., (2015) tarafından Hint deveşinin ön midesinden izole edilen *Oontomyces* sp.'nin filogenetik ağaçlandırma modeline benzerlik göstermiştir. Dagar ve ark. (2015)'ların yaptığı çalışmada morfolojik inceleme sonucu *Oontomyces* sp.'nin *Piromyces* sp.'ye benzerlik gösterdiğini filogenetik analiz sonucu farklı bir yerde

bulunmasına rağmen *Oontomyces* sp.'nin *Anaeromyces* sp.'ye yakın bir dalda olduğu göstermiş ve bu cinsin farklı bir adlandırılmasını yapmışlardır.

Callaghan ve ark. (2015)'nin *Neocalimastimycota* ailesine yeni eklediği *Buwchfawromyces* sp.'ninde morfolojik olarak *Piromyces* sp.'ye benzediği ancak ITS ve LSU dizi analizi sonucunda *Anaeromyces* sp.'ye daha yakın olduğunu ancak yapılan zoospor incelemesi sonucu bu anaerobik fungusun farklı bir cins seviyesinde olduğu göstermiştir.

Hanafy ve ark. (2017) anaerobik gut fungusların morfolojik ve bazı sekans dizilerinin benzerlik göstermesi ama yapılan daha detaylı inceleme sonucu tallus yapısındaki farklılıkların dahi önemli olduğunu aynı zamanda filogenetik sekanslamalarda ITS bölgesine alternatif bölgelerin gerektiğini rapor ederek *Pecaromyces* sp.'nin yeni cins düzeyinde keşfini gerçekleştirirken *Orpinomyces* sp ve *Neocallimastix* sp.'ye yakın olduğunu ancak saflaştırma basamağında roll tüp metodolojisi sırasında noktasal koloniler oluşturarak sıvı besi ortamında biofilm şeklinde geliştiği için farklı bir filogeneik basamakta olduğunu ispatlamışlardır.

Hanafy ve ark. (2018) ITS bölgesine alternatif olarak domain1 (D1) ve domain2 (D2) olarak bilinen korunaklı bölgelerin sekans analizi yardımıyla *Feromyces* sp.'nin keşfini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında morfolojik ve diğer filogenetik analizler sonucu bu anaerobik gut fungusun tamamen farklı bir karakterizasyona sahip olduğunu göstermişlerdir. Şekil 2.7'de verilen filogenetik analize göre MUBAM_AGF-6 stok numaralı *Neocallimastix* sp. ile *Feromyces* sp.'nin aynı filogenetik küme içinde olması ITS bölgeleri için yapılan sekanslama da benzerlik yüzdelerin fazla olduğu anlamına gelmektedir. MUBAM_AGF-6 stok numaralı fungusun roll tüp gelişimi *Feromyces* sp.'den tamamen farklılık göstermektedir.

Joshi ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmalarda ise morfolojik olarak *Piromyces* sp, *Buwchfawromyces* sp, *Oontomyces* sp ve *Pecoromyces* sp cinslerine filogenetik analiz olarak *Anaeromyces* sp.'ye benzerlik gösteren *Liebetanzomyces* sp.'nin keşfinde de benzer çalışmalar yapılmıştır.

Hanafy ve ark. (2019) tarafından aynı anda keşf edilen *Tahromyces* sp., *Khoyollomyces* sp., *Joblinomyces* sp., *Capellomyces* sp., *Agriosmyces* sp., *Aklioshbomyces* sp., *Ghazallomyces* sp. anaerobik gut fungusların izolasyonunda D1, D2 ve ITS bölgelerinin filogenetik analizlerinin değerlendirilmesi yapılmıştır. Şekil 14'de verilen ITS filogenetik analizine göre MUBAM_AGF-11 stok numaralı *Neocallimastix* sp.'nin *Khoyollomyces* sp. ile benzer bir kümede olduğu görülmüştür.

Stabel ve ark. (2020) *Aestipascuomyces* sp.'nin keşfi sırasında D1,D2 ve ITS bölgelerinin filogenetik farklılığı ile morfolojik gelişim farklılığı değerlendirilmişler ve bu mikroorganizmanın yeni bir cins olduğunu göstermişlerdir. Bu anaerobik gut fungusun sıvıbesi ortamı içerisinde ağır bir biofilm şeklinde gelişmesi ve roll tüp ile saflaştırılması sonucu beyaz filamentli bir gelişim göstermiştir. D1–D2 ve LSU filogenetik analizi sonucu *Orpinomyces* sp., *Neocallimastix* sp., *Pecoromyces* sp., *Feromyces* sp. ve *Ghazallamyces* sp. cinslerinin bulunduğu grubun içinde yeni bir monofiletik dal olarak gruplandırmışlardır. Şekil 2.7’de ITS bölgesi için verilen filogenetik analizde yapılan çalışma sonucu MUBAM_AGF-3 stok numaralı anaerobik gut fungus ile *Aestipascuomyces* sp.'nin aynı yerde dallanma gösterdiği tespit edilmiştir.

Hanafy ve ark. (2021) tarafından D1,D2,LSU ve ITS bölgeleri kullanılarak yapılan filogenetik analiz ile morfolojik incelemeler ile sıvı besi ortamı gelişimi sonucu *Paucimycetes* sp.'nin *Orpinomyces* sp. ile *Joblinomyces* sp.'ye benzerlik gösterdiği ancak sıvı besi ortamındaki gelişimlerin farklı olması ile bu anaerobik gut fungusun yeni bir cins olmasının değerlendirilmesini istemişlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Rumen fungusları herbivor canlıların sindirim kanalında bulunan selülotik enzim aktivitesi oldukça önemli bir canlı grubudur. Sahip oldukları enzimsel özellikleri sayesinde hem bitki hücre duvarının hidrolizinde hem de farklı biyoteknolojik basamaklarda görevleri bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarla ile her geçen gün sistematik basamaktaki sayısı artan ve güncellenen bu mikroorganizma grubu için ülkemizde de kültür koleksiyonlarının oluşturulması ve izolasyonu yapılarak farklı cins düzeyinde yeni rumen fungusların keşfine ihtiyaç vardır. Anaerobik koşullarda yaşıyan bu mikroorganizmaların ökaryotik DNA izolasyonu ile oluşturulacak DNA kütüphanesi ile farklı alanlarda çalışma yapan bilim insanları için de veri kaynağı oluşturulabilir.

Tunceli bölgesinde yapılan bu çalışma ile hem fungus kültür koleksiyonu hemde bu canlılarla ait DNA kütüphanesi oluşturulmaktadır. Aynı zamanda bu bölgedeki rumen funguslarını filogenetik analizleri sonucunda farklı bir dallanma göstermeleri bölgedeki herbivorların sahip olduğu rumen fungus çeşitliliğinin olabilme potansiyelini ortaya koymuştur. Ancak bu sonucu doğrulamak için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Yaptığımız bu çalışma ile bölgedeki rumen fungusların tanımlanması ve izolasyonu için öncü bir çalışma olması çalışmanın önemin ortaya koymuştur.

7. KAYNAKLAR

- Alataş, M.S., Umucalılar, H.D.,** 2011. Bacteria of the rumen ecosystem and their roles. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(1):71-83.
- Al-Galbi, H.A.J., Usur, J.O.,** 2021. In vitro digestion products of ration contain different levels of faba beans treated with formaldehyde using arabi sheep rumen liquid. *Plant Archives*, 21(1):1256-1261.
- Ariyawansa, H.A., Hyde, K.D., Jayasiri, S.C., Buyck, B., Chethana, K.T., Dai, D.Q., Spirin, V.,** 2015. Fungal diversity notes 111–252 taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal diversity*, 75(1):27-274.
- Arreola, A.X., Meili, C.H., Youssef, N.H.,** 2021. Discovery and characterization of novel fungal diversity in the equine alimentary tract.
- Barr, D.J.S., Kudo, H., Jakober, K.D., Cheng, K.J.,** 1989. Morphology and development of rumen fungi: *Neocallimastix* sp., *piromyces communis*, and *orpinomyces bovis* gen. nov., sp. nov. *Canadian journal of botany*, 67(9):2815-2824.
- Bauchop, T.,** 1984. Rumen anaerobic fungi and the utilization of fibrous feeds. *Biotechnology and Recombinant DNA Technology in the Animal Production Industries, Reviews in Rural Science*, (6):118-123.
- Bernalier, A., Fonty, G., Bonnemoy, F., Gouet, P.,** 1992. Degradation and fermentation of cellulose by the rumen anaerobic fungi in axenic cultures or in association with cellulolytic bacteria. *Current microbiology*, 25(3):143-148.
- Bowman, B.H., Taylor, J.W., Brownlee, A.G., Lee, J., Lu, S.D., White, T.J.,** 1992. Molecular evolution of the fungi: relationship of the Basidiomycetes, Ascomycetes, and Chytridiomycetes. *Molecular biology and evolution*, 9(2):285-296.
- Breton, A., Bernalier, A., Dusser, M., Fonty, G., Gaillard-Martinie, B., Guillot, J.,** 1990. *Anaeromyces mucronatus* nov. gen., nov. sp. A new strictly anaerobic rumen fungus with polycentric thallus. *FEMS microbiology letters*, 70(2):177-182.
- Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A., Elander, R.P.,** 1998. Application of PCR in Mycology. Cab International, New York, 357s.
- Brookman, J.L., Ozkose, E., Rogers, S., Trinci, A.P., Theodorou, M.K.,** 2000. Identification of spores in the polycentric anaerobic gut fungi which enhance their ability to survive. *FEMS microbiology ecology*, 31(3):261-267.
- Brownlee, A.G.,** 1989. What determines the amino acid composition of rumen microbes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2(3):441-443.
- Bryant, M.P.,** 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *The American journal of clinical nutrition*, 25(12):1324-1328.

- Callaghan, T.M., Podmirseg, S.M., Hohlweck, D., Edwards, J.E., Puniya, A.K., Dagar, S.S., Griffith, G.W., 2015.** Buwchfawromyces eastonii gen. nov. sp. nov.: A new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from buffalo faeces. *MycoKeys*, 9:11-28.
- Chen, Y.C., Hseu, R.S., Cheng, K.J., 2003.** The genetic similarity of different generations of *Neocallimastix frontalis* SK. *FEMS microbiology letters*, 221(2):227-231.
- Cholewińska, P., Czyż, K., Nowakowski, P., Wyrostek, A., 2020.** The microbiome of the digestive system of ruminants—a review. *Animal health research reviews*, 21(1):3-14.
- Coleman, G.S., 1975.** The interrelationship between rumen ciliate protozoa and bacteria: Digestion and Metabolism in the Ruminant, University of New England Publishing Unit, Armidale, Australia. 149-164s.
- Dagar, S.S., Singh, N., Goel, N., Kumar, S., Puniya, A.K., 2015.** Role of anaerobic fungi in wheat straw degradation and effects of plant feed additives on rumen fermentation parameters in vitro. *Beneficial microbes*, 6(3):353-360.
- Dehority, B.A., 1998.** Microbial interactions in the rumen. *Rev. Fac. Agron.(LUZ)*, 15:69-86.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M., Dveksler, G.S., 1993.** General concepts for PCR primer design. *PCR methods appl*, 3(3):30-S37.
- Dore, J., Stahl, D.A., 1991.** Phylogeny of anaerobic rumen Chytridiomycetes inferred from small subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *Canadian Journal of Botany*, 69(9):1964-1971.
- Eckart, M., Fliegerová, K., Hoffmann, K., Voigt, K., 2010.** Molecular identification of anaerobic rumen fungi. In *Molecular identification of fungi*, Springer, Berlin, Heidelberg, 297-313s.
- Eckburg, P.B., Lepp, P.W., Relman, D.A., 2003.** Archaea and their potential role in human disease. *Infection and immunity*, 71(2):591-596.
- Edwards, J.E., Hermes, G.D., Kittelmann, S., Nijse, B., Smidt, H., 2019.** Assessment of the accuracy of high-throughput sequencing of the ITS1 region of *Neocallimastigomycota* for community composition analysis. *Frontiers in microbiology*, 10:2370.
- Fliegerová, K., Mrázek, J., Kajan, M., Podmirseg, S.M., Insam, H., 2012.** The effect of maize silage as co-substrate for swine manure on the bacterial community structure in biogas plants. *Folia microbiologica*, 57(4):281-284.
- Gold, J.J., Heath, I.B., Bauchop, T., 1988.** Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe, *Caecomycetes equi* gen. nov. sp. nov. assigned to the *Neocallimasticaceae*. *Biosystems*, 21(3-4):403-415.

- Gordon, G.L., Phillips, M.W.,** 1998. The role of anaerobic gut fungi in ruminants. *Nutrition Research Reviews*, 11(1):133-168.
- Griffith, G.W., Baker, S., Fliegerova, K., Liggenstoffer, A., Van Der Giezen, M., Voigt, K., Beakes, G.,** 2010. Anaerobic fungi: neocallimastigomycota. *IMA fungus*, 1(2):181-185.
- Hanafy, R.A., Elshahed, M.S., Liggenstoffer, A.S., Griffith, G.W., Youssef, N.H.,** 2017. *Pecoramyces ruminantium*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic gut fungus from the feces of cattle and sheep. *Mycologia*, 109(2):231-243.
- Hanafy, R.A., Johnson, B., Elshahed, M.S., Youssef, N.H.,** 2018. *Anaeromyces contortus*, sp. nov., a new anaerobic gut fungal species (Neocallimastigomycota) isolated from the feces of cow and goat. *Mycologia*, 110(3):502-512.
- Hanafy, R.A., Lanjekar, V.B., Dhakephalkar, P.K., Callaghan, T.M., Dagar, S.S., Griffith, G.W., Youssef, N.H.,** 2020. Seven new Neocallimastigomycota genera from wild, zoo-housed, and domesticated herbivores greatly expand the taxonomic diversity of the phylum. *Mycologia*, 112(6):1212-1239.
- Hanafy, R.A., Youssef, N.H., Elshahed, M.,** 2021. *Paucimyces polynucleatus* gen. nov, sp. nov., a novel polycentric genus of anaerobic gut fungi from the feces of a wild blackbuck antelope. *bioRxiv*. 1(2):18-20.
- Hausner, G., Inglis, G.D., Yanke, L.J., Kawchuk, L.M., McAllister, T.A.,** 2000. Analysis of restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA of a selection of anaerobic chytrids. *Canadian Journal of Botany*, 78(7):917-927.
- Heath, I.B.,** 1988. Recommendations for future taxonomic studies of gut fungi. *BioSystems*, 21(3-4):417-418.
- Heath, I.B., Bauchop, T., Skipp, R.A.,** 1983. Assignment of the rumen anaerobe *Neocallimastix frontalis* to the Spizellomycetales (Chytridiomycetes) on the basis of its polyflagellate zoospore ultrastructure. *Canadian Journal of Botany*, 61(1),295-307.
- Heath, I. B., Kaminskyj, S. G., Bauchop, T.,** 1986. Basal body loss during fungal zoospore encystment: evidence against centriole autonomy. *Journal of cell science*, 83(1), 135-140.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Zhang, N.,** 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5):509-547.
- Ho, Y.W., Barr, D.J.S.,** 1995. Classification of anaerobic gut fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. *Mycologia*, 87(5):655-677.

- Ho, Y.W., Bauchop, T.,** 1991. Morphology of three polycentric rumen fungi and description of a procedure for the induction of zoosporogenesis and release of zoospores in cultures. *Microbiology*, 137(1):213-217.
- Hobson, P.N., Wallace, R.J., Bryant, M.P.,** 1982. Microbial ecology and activities in the rumen: Part II. *CRC critical reviews in microbiology*, 9(4):253-320.
- Hungate, R.E.,** 1966. The Rumen and Its Microbes. Academic Press, London, 28-31s.
- Janssen, P.H., Kirs, M.,** 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and environmental microbiology*, 74(12):3619-3625.
- Joblin, K.N.,** 1981. Isolation, enumeration, and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Applied and environmental microbiology*, 42(6):1119-1122.
- Joshi, A., Lanjekar, V.B., Dhakephalkar, P.K., Callaghan, T.M., Griffith, G.W., Dagar, S.S.,** 2018. Liebetanzomycespolymorphus gen. et sp. nov., a new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from the rumen of a goat. *Mycology*, (40):89.
- Julliand, V., Riondet, C., de Vaux, A., Alcaraz, G., Fonty, G.,** 1998. Comparison of metabolic activities between Piromyces citronii, an equine fungal species, and Piromyces communis, a ruminal species. *Animal feed science and technology*, 70(1-2):161-168.
- Kamra, D.N.,** 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current science*, (4):124-135.
- Kar, B.,** 2013. Anaerobik rumen fungusların filogenetik analizi ve lipid metabolizmasındaki rollerinin incelenmesi. *Doktora tezi*, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş, 56-59s.
- Klopatek, S., Callaway, T.R., Wickersham, T., Sheridan, T.G., Nisbet, D.J.,** 2021. Bacteriophage utilization in animal hygiene. *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*, 1(2):891-917.
- Kobayashi, Y.,** 2006. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: need for basic and applied science. *Animal Science Journal*, 77(4):375-385.
- Krause, D.O., Russell, J.B.,** 1996. How many ruminal bacteria are there?. *Journal of dairy science*, 79(8):1467-1475.
- Li, X.L., Chen, H., Ljungdahl, L.G.,** 1997. Monocentric and polycentric anaerobic fungi produce structurally related cellulases and xylanases. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2):628-635.
- Liang, J., Zhang, H., Zhang, P., Zhang, G., Cai, Y., Wang, Q., Zubair, M.,** 2021. Effect of substrate load on anaerobic fermentation of rice straw with rumen liquid as inoculum: Hydrolysis and acidogenesis efficiency, enzymatic activities and rumen bacterial community structure. *Waste Management*, 124:235-243.

- Liebetanz, E.,** 1910. Die parasitischen protozoen des wiederkäuermagens. *Archiv für Protistenkunde*, 19:19-80.
- Liggenstoffer, A.S., Youssef, N.H., Couger, M.B., Elshahed, M.S.,** 2010. Phylogenetic diversity and community structure of anaerobic gut fungi (phylum Neocallimastigomycota) in ruminant and non-ruminant herbivores. *The ISME journal*, 4(10):1225-1235.
- Ljungdahl, L.G.,** 2008. The cellulase/hemicellulase system of the anaerobic fungus Orpinomyces PC- 2 and aspects of its applied use. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 308-321.
- Lowe, S.E., Theodorou, M.K., Trinci, A.P.,** 1987. Isolation of anaerobic fungi from saliva and faeces of sheep. *Microbiology*, 133(7):1829-1834.
- McAllister, T.A., Bae, H.D., Yanke, L.J., Cheng, K.J., Muir, A.,** 1994. Effect of condensed tannins from birdsfoot trefoil on endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. *Canadian journal of microbiology*, 40(4):298-305.
- Nicholson, M.J., Koulman, A., Monahan, B.J., Pritchard, B.L., Payne, G.A., Scott, B.,** 2009. Identification of two aflatoxin biosynthesis gene loci in *Aspergillus flavus* and metabolic engineering of *Penicillium paxilli* to elucidate their function. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23):7469-7481.
- Ogimoto, K., Imai, S.,** 1981. *Atlas of rumen microbiology*. Japan Scientific Societies Press.
- Orpin, C.G., Bountiff, L.,** 1978. Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *Microbiology*, 104(1):113-122.
- Orpin, C.G.,** 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Microbiology*, 91(2):249-262.
- Orpin, C.G.,** 1976. Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. *Microbiology*, 94(2):270-280.
- Orpin, C. G.,** 1977. Invasion of plant tissue in the rumen by the flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Microbiology*, 98(2):423-430.
- Orpin, C.G.,** 1984. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Animal Feed Science and Technology*, 10(2-3):121-143.
- Orpin, C.G.,** 1994. Anaerobic fungi: taxonomy, biology, and distribution in nature. In *Anaerobic fungi*. CRC Press, 1-46.
- Orpin, C.G., Greenwood, Y.,** 1986. Nutritional and germination requirements of the rumen chytridiomycete *Neocallimastix patriciarum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 86(1):103-109.

- Ozkose, E., Thomas, B.J., Davies, D.R., Griffith, G.W., Theodorou, M.K., 2001.** Cyllamyces aberensis gen. nov. sp. nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. *Canadian Journal of Botany*, 79(6):666-673.
- Özel, O., Sarıçiçek, B., 2009.** Ruminantlarda rumen mikroorganizmalarının varlığı ve önemi (derleme). *Tübbav Bilim Dergisi*, 2(3):277-285.
- Özköse, E., Ekinci, M.S., Akyol, İ., 2003.** Biyoteknolojik potansiyel olarak anaerobik funguslar: Kültüre alınmaları ve morfolojileri. *KSU Fen ve Mühendislik Dergisi*, 6(1):129-139.
- Özköse, E., Kar, B., Akyol, İ., Çömlekçiöğlu, U., Ekinci, M.S., 2015.** Anaerobik rumen fungus izolelerinin rastgele çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) Metodu ile Filogenetik Analizi. *Hayvansal Üretim*, 56(2):14-21.
- Patterson, J.A., 1992.** Rumen microbiology in-Chief Lederberg, J. Encyclopedia of Microbiology. Academic press. Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers, 3:623-542.
- Paul, S.S., Bu, D., Xu, J., Hyde, K.D., Yu, Z., 2018.** A phylogenetic census of global diversity of gut anaerobic fungi and a new taxonomic framework. *Fungal diversity*, 89(1):253-266.
- Pettipher, G.L., Latham, M.J., 1979.** Characteristics of enzymes produced by Ruminococcus flavefaciens which degrade plant cell walls. *Microbiology*, 110(1):21-27.
- Selinger, L.B., Forsberg, C.W., Cheng, K.J., 1996.** The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe*, 2(5):263-284.
- Sirohi, S.K., Choudhury, P.K., Puniya, A.K., Singh, D., Dagar, S.S., Singh, N., 2013.** Ribosomal ITS1 sequence-based diversity analysis of anaerobic rumen fungi in cattle fed on high fiber diet. *Annals of Microbiology*, 63(4):1571-1577.
- Smith, P.E., Waters, S.M., Expósito, R.G., Smidt, H., Carberry, C.A., McCabe, M.S., 2020.** Synthetic sequencing standards: a guide to database choice for rumen microbiota amplicon sequencing analysis. *Frontiers in microbiology*, 11.
- Stabel, M., Hanafy, R.A., Schweitzer, T., Greif, M., Aliyu, H., Flad, V., Youssef, N.H., 2020.** Aestipascuomyces dupliciliberans gen. nov, sp. nov., the first cultured representative of the uncultured SK4 clade from aoudad sheep and alpaca. *Microorganisms*, 8(11):1734.
- Stewart, C.S., Duncan, S.H., Richardson, A.J., Calder, A.G., Dewey, P.J., 1995.** The effect of the presence of glucose on the fermentation of mannose by the anaerobic fungus Neocallimastix frontalis strain RE1. *FEMS microbiology letters*, 127(1-2):57-63.

- Theodorou, M.K., Davies, D.R., Jordan, M.G., Trinci, A.P., Orpin, C.G., 1993.** Comparison of anaerobic fungi in faeces and rumen digesta of newly born and adult ruminants. *Mycological research*, 97(10):1245-1252.
- Theodorou, M.K., Gill, M., King-Spooner, C., Beever, D.E., 1990.** Enumeration of anaerobic chytridiomycetes as thallus-forming units: novel method for quantification of fibrolytic fungal populations from the digestive tract ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4):1073-1078.
- Tuckwell, D.S., Nicholson, M.J., McSweeney, C.S., Theodorou, M.K., Brookman, J.L., 2005.** The rapid assignment of ruminal fungi to presumptive genera using ITS1 and ITS2 RNA secondary structures to produce group-specific fingerprints. *Microbiology*, 151(5):1557-1567.
- Van Zwieten, J.T., Van Vuuren, A.M., Dijkstra, J., 2008.** Effect of nylon bag and protozoa on in vitro corn starch disappearance. *Journal of dairy science*, 91(3):1133-1139.
- Voigt, K., James, T.Y., Kirk, P.M., Santiago, A.L.D.A., Waldman, B., Griffith, G.W., Lee, H.B., 2021.** Early-diverging fungal phyla: taxonomy, species concept, ecology, distribution, anthropogenic impact, and novel phylogenetic proposals. *Fungal Diversity*, 1-40.
- Wang, X., Liu, X., Groenewald, J.Z., 2017.** Phylogeny of anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota), with contributions from yak in China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110(1):87-103.
- Williams, A.G., 1986.** Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiological reviews*, 50(1):25-49.
- Wubah, D.A., Fuller, M.S., Akin, D.E., 1991.** Resistant body formation in *Neocallimastix* sp., an anaerobic fungus from the rumen of a cow. *Mycologia*, 83(1):40-47.
- Wulff, C., 2001.** Untersuchungen zum Thiamin-und Thiaminderivatgehalt im Pansensaft des Rindes nach Verfütterung von mit *Mucor racemosus* Fresenius verpilztem Heu. *Doctoral dissertation Thesis*, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, 313s.
- Yanez Ruiz, D.R., Moumen, A., Martin Garcia, A.I., Molina Alcaide, E., 2004.** Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *Journal of animal science*, 82(7):2023-2032.
- Yazdıç, C.F., 2011.** Anaerobik fungus *Orpinomyces* sp.'ye ait selülaaz geninin klonlanması karakterizasyonu ve enzim aktivitesinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş, 27-29s.
- Yücel, H., 2010.** Sakız koyunlarında çoğuzluğa neden olan major genler üzerine bir çalışma. *Yüksek Lisans Tezi*, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş, 47s.

ÖZGEÇMİŞ



EKLER

Ek 1. AGF ITS bölgesine ait DNA dizileme sonuçlarının ve kendi aralarında karşılaştırılmaları (T-COFFEE, Version_11.00 (Version_11.00))

AGF_1 TCGGAGAGATTGAGGTCTGCAGC-GTAGAT-CCTTC-GGGGT---T---AGATA-----CAT-T

AGF_2 ----GTGGGGGCTGTCTTTCTG-----T-CTCA-TATGCC---G---TTGCTG-CAA-----A

AGF_3 CGGGGGGGTGGCCAGTCGGC--A-----T-AGTT-TATGGT---T---AGACTA-CGACGG-TA-TC

AGF_4 -----GGTGGACGGTCTGCAGGTGTCTTA-CTGT-----A-----

AGF_6 ----GCCGGGAACGATCGTGGG---GTTA-CGTGCCGATAC---AC---GCT-CA-TTTAGACACCACA

AGF_7 ----C-AA---CCGTCTACGGTCCTTGAA-ATCCT-GGGGA---A---TAATAA-TTTTCA-TA-CC

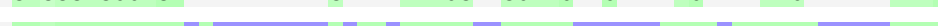
AGF_8 GCGGGCCACAAAGTATTTA-CGGGTAACGGA-GAAT-TAGGGT---T---CGATTC-CGG-----A

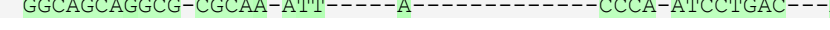
AGF_9 -----GGACATCATATCAGGAAAGAAC-TAACT-AGGAT---T---CC-CT-----CAG-T

AGF_11 ----ATAAAGGCGAATTCTTTAGATTTATGAAGACT--AACTTCTGCGAAAGCATTGTGCCAA-----G

AGF_12 --CCGTACATAGTATTTACGGGTAACGGA-GAAT-TAGGGT---T---CGATTC-CGG-----A

cons

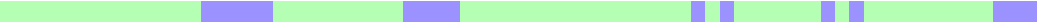
AGF_1	TGTGCTAAGTTA-TA-----GCCTTTCATA--GACAA-----CTTG-TTGACTATGATCAGTCA----
AGF_2	GATGGGCCCCCTTGGACATTAAA---GGAAG--TTAAA-GTCGTAA-----CAA-----GGTTT--CC
AGF_3	TGATCGTCTTCG-----ATCCC-CTAAC--T-----T-----
AGF_4	-GTAGAGCGTCA-TC-----GC--GGATG--GCTGA-----TGTC-TTGCATGTGATTT--CG----
AGF_6	AAAGGT--GT--T-----GGTTCTTCTA--AACAG-----CAG--GACGGTGCCCATGGA--A-
AGF_7	TAGC----CG--T-----ACTCAT--AACCG-----CAG--CAG-GTCTCCAAGGT--T-
AGF_8	GAGGGAGCCTGA-----G--AAACG--GCTAC--C--TC--ATC-----TAAGG--AA
AGF_9	AACGCGGAGTGA-AG-----CG--GGAAG--AGCT-----CAAATTGA-AATCTTCAAGGT----
AGF_11	GATGTTTTTCATTAA-----TC--AAGAACGAAAG--TTA--GGG-----GATCGAAGACG
AGF_12	GAGGGAGCCTGA-----G--AAACG--GCTAC--C--AC--ATC-----TAAGG--AA
cons	

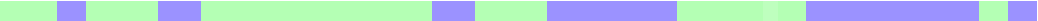
AGF_1	TGTAGCTTACT-CGCTT-AT-----GCTA-TTTTA-CCTACGCTTAGG---A----
AGF_2	GTAGGTGAACC-TGCGG-AAG----GATCATT-----AAAA-ATGAGACC-TCT-TGAA--AG----
AGF_3	-----T-CGT----TCTTGATT-----AATGAAAACATCC--T--TGGCAAATGCCTTT
AGF_4	TGTTGAATAGC-GAC---AT-----GAAA-TATAG-TCTTTGGTAAAG---A----
AGF_6	GTCGGAATCCC-C---T-AAGGAGTGT-----GTAACA ACTCA-C-CTGCCG--A-ATGA---ACT--
AGF_7	AAC-AGCCTCT-A-----G-----TTGATAGAACA-ATGTAGATA-----AGGG--A----
AGF_8	GGCAGCAGGCG-CGCAA-ATT----A-----CCCA-ATCCTGAC--AC-AGGG-----
AGF_9	TCTA----CCT-TG----A-----CGAA-TTGTA-GTT----TAAAG---A----
AGF_11	ATCAGATACCGTCGTAGTCTT----A-----ACCATA-AACT-ATGCCGAC-T--AG-G--G----
AGF_12	GGCAGCAGGCG-CGCAA-ATT----A-----CCCA-ATCCTGAC--AC-AGGG-----
cons	

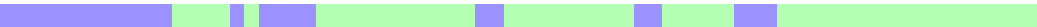
AGF_1 -----TGTTGAC-AAAAT-G-----GTTT-TAAAC-GACCCGT-CT-----TG-----
AGF 2 -----GCCTTTTA-T-TATC-CCT-----CCCCT-TGGGAAATTGG-----TG-----

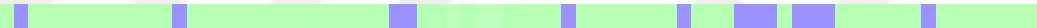
AGF_3 CGCAGAAGTTAGTCTTTCA-T-AAAT-CTAA--GAATTTACCTC--TGAC-AA-----
AGF_4 -----TGTCTC-AAATT-G-----GTTA-CTCAT-ACCCGT--CT-----TG--
AGF_6 -----AGCCCTG-AAAAT-G-----GATG-G-----
AGF_7 -----AGTCGGC-AAAAT-A-----GATC-CGTA-----
AGF_8 -----AGGTAGTG-ACAA-T-AAAT-AACG--ATAC-AGGGCTT--TTT-----TAG-----TC--
AGF_9 -----AGTGTTT-TCTGTTGGAGT-TTTGG-TAA--AAGTTC--TT-----TG--
AGF_11 -----ATCGGACG-ACGT-T-TAATTATTGACTCGTTC--GGCACCTTAT-----GAGAAATCAAAGTTT
AGF_12 -----AGGTAGTG-ACAA-T-AAAT-AACG--ATAC-AGGGCTT--TTT-----TAG-----TC--
cons 

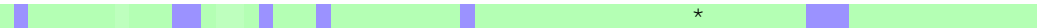
AGF_1 -----AA-ACACG-----GACCAAGGAGTCTAAC--AAAT-----ATGCGAGTA-----TTTGAGT
AGF_2 -----GTTG--GAA-----TTATTTTTTTCCCCAAAAAATTAAAGAT--CTTTCCC-C-----
AGF_3 -----T--TAA-----ATACTAATGCCCCCACTATCCCTATTAAT--CATT-A-C-T-----
AGF_4 -----AA-ACACG-----GACCAAGGAGTCTAAC--AAAT-----ATGCGAGTA-----TTTGAGT
AGF_6 -----CGCTCAAGCGTGTAC--TCAT-----ACCCACCGTTA-GGGTAAAA
AGF_7 -----ACTTC-----GGGATAAGGATTGGCTC--TAAG-----GGTTGGGT--TATTGGGC
AGF_8 -----TTGTAATTGG--AATGAGAACAATTAAACCCCTTAT--CGAG--GAACA-A-T-----
AGF_9 -----GA-ATAGG--ACATCATAGAGGGTGAG--AA-T-----C--CCGTA-----TTTGACC
AGF_11 TTGGGTTCCGG-GGGGAGTATGGTCG-CAAGGCTGAA-ACTT-----AAAG--GAATT-G-A-----
AGF_12 -----TTGTAATTGG--AATGAGAACAATTAAACCCCTTAT--CGAG--GAACA-A-T-----
cons 

AGF_1 GGAAAACATCATATG-----CGTAATGAA--AGTGATTTTGGTGGGA-T-TT-TCG--AT-GCACC--
AGF_2 -----C-CT-----TG--GT-----GGAG-C-A-T-----
AGF_3 -----TCGGT-----CCTAGAAA--CCAA-C-A-A-----AA--
AGF_4 GGAAAACATCATATG-----CGTAATGAA--AGTGATTTTGGTGGGA-T-TT-TCG--AT-GCACC--
AGF_6 GCGAAGCTCTAACGA--GTAGGAG-----GGCGTGAGG-T-TT-GTG--AA-GAA--
AGF_7 TTCTATTCTGCAACT--TTGGGACCGAC--TTGAGGATTTCTGGGC-C-TT-TCG--GG-GCTCG--
AGF_8 -----T-GG--AG--GG-----CAAG-T-C-T--GG--TGCCAGCA--
AGF_9 ATTATTTCCAGCTT-----TGTGATACA--CTTCAAAGAGTCGGA-T-TGTTTGGGAAT-GCAGT--
AGF_11 -----C-GG--AA--GG-----GCACCACC-A--GGAGTGAGCCTGCG
AGF_12 -----T-GG--AG--GG-----CAAG-T-C-T--GG--TGCCAGCA--
cons 

AGF_1 -----ATCAACCGGTCA--GG-----ATTTTTTAT-----GA--
AGF_2 GTTG--AAAAGAAGCCACCAGGGGG-----ATGGC-----GGACAATAATTATTTTTTTAAAAAA
AGF_3 TAGA--ACCAA--AGTCCTATTCTA--TTATT-----CCATGCTAA-----TG--
AGF_4 -----ATCAACCGGTCA--GG-----ATTTTTTAT-----GA--
AGF_6 -----GCTTAGG-ATGTA-----AATCCGAGT--GA--
AGF_7 -----GAGAACTTCTCG--TTGG-----ATTGGAAGT-----GA--
AGF_8 GCCG--CGGTA--ATTCCAGCTCCA-----ATAGC-----GTATATTAA--AG--
AGF_9 -----CCAAAATGGGTG--GT-----AAATTT-----
AGF_11 GCTTAATT-TG--ACTCAACACGGG--GAACTTACCAGGTCCAGACATAGTAA-----GG--
AGF_12 GCCG--CGGTA--ATTCCAGCTCCA-----ATAGC-----GTATATTAA--AG--
cons 

AGF_1 -----AGGA-----TCTGAGTCTA---AGCATATT---TGT-----TGGGACCCGA-AAGAT
AGF_2 CTTTTTTTTTTTAA--AACTTTTGCTTTTTTTT---TTTC-TTAT--ATTAT---TT-----TT-TT-TATA-
AGF_3 ---TATTCAAGCA--AATG---GCCGGTTTTAAATTTC-CAATTTT-TTTCAAAG-----TA-AA-GGCC-
AGF_4 -----AGGA-----TCTGAGTCTA---AGCATATT---TGT-----TGGGACCCGA-AAGAT
AGF_6 -----AACA-----GCCTCTAGTG---CAGATCTT---GGT---GGTAGTAGCAAA-TATTTC
AGF_7 -----ACGAA-----TTTTAGCTTG---TCGGCCTC---GGT-----CGGCATCCGG-TATAC
AGF_8 -----TT-GT---TGCAGTTAAA---AAGC-TCGT--A-GTT--GA-----AT-TT-TGGAC
AGF_9 -----CA-----TCTAAAGCTA---A-ATATT---G-G-----C---GAGAGA-CCGAT
AGF_11 -----AT-T---GACAGATTGAG---AGC-TCTT--T-CTT--GA-----TT-CTATGGGT
AGF_12 -----TT-GT---TGCAGTTAAA---AAGC-TCGT--A-GTT--GA-----AT-TT-TGGAC
cons 

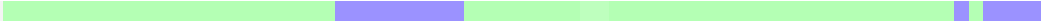
AGF_1 --GG-TGAACTA-TGCCTGAATAGG---GTGAAGT-CA-GAGGAAA-CTC-----TGATGG
AGF_2 -TAAA-A-ACAACTAACG--ACT--TT---GGA---TCTC---TT-GGTT-CT-TG-CTTCC-C-----
AGF_3 -CAAACCCCCG-GTCCC--CCT--AT---GGAA--TG-G---AT-TAAGGT-AA-CTTAAAA-----
AGF_4 --GG-TGAACTA-TGCCTGAATAGG---GTGAAGT-CA-GAGGAAA-CTC-----TGATGG
AGF_6 --AA-ATG-----AGAACTTTGAAGACTGAAGT-GG-AGAAAGG-TTC-----CATG-TGAACAG
AGF_7 --AA-TTAA-----CAACCAACTTAGAACTGGTACGG-AC-AAGGGGA-ATC-----
AGF_8 TTAGCTGTACGG-TACCG--CGTAAGT---GGTTTACT-GT-TCTT-GGC--TT-TGTCTTTC-C-----
AGF_9 --AG-CGAACAA-GTACCGTGA-GG---GAAAGAT-GA-AAAGA-A-CTT-----TGAAAA
AGF_11 GGTGGTGCATGG-CCGTT--CTTAGTT---GGTGGA--GT-GATTTGTC--TGGTTAATTCC-G-----
AGF_12 TTAGCTGTACGG-TACCG--CGTAAGT---GGTTTACT-GT-TCTT-GGC--TT-TGTCTTTC-C-----
cons 

AGF_1 A-GGCTCGTA----GCGG-TTC-T-GACGTGC-AAATCGAT-CGTCAAATTTG-GG---TATAGGGGCGAAA
AGF_2 -----TCAAC-AACGA-AGC-ACAC--AGC-AAAAAGTAATG-TGTAT-----T-----
AGF_3 -----GGAAG-AACAAACCC-AAAACCAGT-AAACCCTTTCCCCGGAC-----C-----
AGF_4 A-GGCTCGTA----GCGG-TTC-T-GACGTGC-AAATCGAT-CGTCAAATTTG-GG---TATAGGGGCGAAA
AGF_6 C-AGTTGGAC----A-----TGGGT-AAGTCGAT-CCTAAGAGATA-GGG---AAGCTC---CG
AGF_7 -----T-GACTGTCT-AATTTAAACAT-AGCATTGCGATGGCCAGA
AGF_8 -----TTCTA--GTTA-ACC-TTTA--TGC-ACTTCATTGTG-TGTACTGGCGA--TCT-----
AGF_9 GAGAGTTA-A---ACAG-T-----ACGTG-----AAAT-TGTCAAAA---GG---GA-A---GCGT--
AGF_11 -----ATAACGAACGA-GACCTTAACCTGCTAAATAGTTACG-CGAATTTT-TT--ATT-----
AGF_12 -----TTCTA--GTTA-ACC-TTTA--TGC-ACTTCATTGTG-TGTACTGGCGA--TCT-----
cons 

AGF_1 GACTAATCGAACCATCTAGTAGC-----TGGTCCCTCCGA--AGTTCCCTCAG-----
AGF_2 -----GCGAATTGCATAAAT--C---AT---CAAT-C---
AGF_3 -----CGAC-TACTTAAG--C---CC---AAATTT---
AGF_4 GACTAATCGAACCATCTAGTAGC-----TGGTCCCTCCGA--AGTTCCCTCAG-----
AGF_6 TTTTAAAGTGAACGATTTTTCGT-----TCCACCTTATCGA--AAGGGAATCCGG--T-TAATA
AGF_7 AAGTGGTGTGACGCAATGTGAT-----TTCTGCCAGTGC--TCTGAATGTCAA--AG--
AGF_8 -----AG-----GACTTTTACTTTGAAAAA--T--TA---GAGT-G---
AGF_9 --TTGAC-----ACCAGTGT-----TGTTTTCT-CGA-AAA-T-C---AA-----

AGF_11 ----CG-TGGCTAACTTCTTAGAGGGACTATAGATTTTAACTCTATGGAAG--T--TT--GAGG-C----

AGF_12 -----AG-----GACTTTTACTTTGAAAAAA--T--TA--GAGT-G----

cons 

AGF_1 -----G-----ATAGCAGAACTCAAT-----CAGTTTTATGAGGT-AAAGCGAATGATT

AGF_2 C--TT--CAA--T-----C-GC-----CT-A-----

AGF_3 CACTT--CCA--A-CTT--T-----TT--A-A-----CT-G-----

AGF_4 -----G-----ATAGCAGAACTCAAT-----CAGTTTTATGAGGT-AAAGCGAATGATT

AGF_6 T--TCCGGAAGTAGGCT--AT-GGATATT--TATT-ACGGTAACGTAAATGAACT-AGGAGACACCAGT

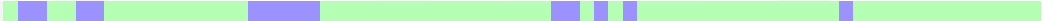
AGF_7 -----T-----GAAGAAATTCAACCAAGCGCGGGT-----AAACGGCG

AGF_8 T--TT--AAAGCAGGCA--T-----TT--G-CT-----TG-G-----

AGF_9 -----TTAAAAAGACTGGAT-----TTTGTGTGT-ATTG-ACTTTATC

AGF_11 A--AT--AA--CAGGTCTGTGAT-----GC--C-CT-----TAGA-----

AGF_12 T--TT--AAAGCAGGCA--T-----TT--G-GT-----TG-G-----

cons 

AGF_1 AGAGGT-----CTTA--GG-----ACTGAAAC-----AGTC--TTAACCT

AGF_2 -----ATGC-A-CTTTT--TTCTTTTACTAATAAAAAA--TG-AAGG-T-----TGGAGTAT--CAA

AGF_3 -----GCAC-CACTTT--TATATCCCTTTTGGAAGT--GG-GATT-----TCC-CC--CGG

AGF_4 AGAGGT-----CTTA--GG-----ACTGAAAC-----AGTC--TTAACCT

AGF_6 AGGAAT-----CCTG--GG-----A-----AGAGTT

AGF_7 GGAGTA-----ACTA--TG-----A-----CTC--TCTTAAG

AGF_8 -----ATAC--CTTT--ACTTGAATAATA-AAATA--A--GAATT-----TGGG--TC--CTT

AGF_9 AGCTTTCTGC--ACTCT--TTT-----CTTGTCTTTTAAATGC-----ACTT--TTCG--

AGF_11 -----TGTTCT--GGGCCGCACGCG--CGCTACACT-GA--T--GAAGTCAACGAGTTTCA--TC--CTT

AGF_12 -----ATTC--CTTT--ACTTGGAAAAATT-AAATA--A--GGATT-----TGGT--TC--CTT

cons 

AGF_1 ATTCTCAAACCTTA-AATATGT--AAG-AAGCTTA--AGTTACTTA-----ATTT-----

AGF_2 TAAAATATT-CTCATAAAACAAAGATTT-----TTTGGTTTGGAGGTTTAAAGTC-A--TTA--

AGF_3 T--GGTGG-----CT--CCC--AAATTGG--CCT-TCTATTGGTCCT-----CC-A--TTA--

AGF_4 ATTCTCAAACCTTA-AATATGT--AAG-AAGCTTA--AGTTACTTA-----ATTT-----

AGF_6 ATCTTTTCTTTTAA-ACAACCT--AGT-CA--CC--CTGAAATCA-----GATT--AACTGG

AGF_7 GTAG-----CCA-AATGCCT--CGT-CA-----TCT--AATTAG

AGF_8 TTTGGTGGGTCCA-AGAACCA--AAG-T--ATG--GTTAATTAG-----GATT--AGT--

AGF_9 -----TTT--AAC-AAGTCAACATCAATTCTTT-----TGTT-----

AGF_11 GATCGGAAGGTCCGGTAATCTT--TT-GA--AA-----CTTCATCG-----TGCTGGG--

AGF_12 TTTGTTGGTTTCT-AGAACCA--AAG-T--ATG--GTTAATTAG-----GATT--AGT--

cons 

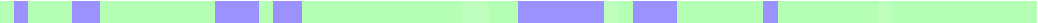
AGF_1 ----G--AACTTGGG--C--ATTTGAATGAGAGTT-----TC--T--AGT-GGGCCATTTTGGTAAGC

AGF_2 --AAA--ACG-ATGT--TCCAAT-----TTTATTCTTTGT-----CTTCT-TAAT-----A-----

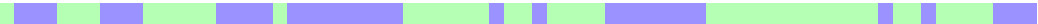
AGF_3 --AGG--GGTTAAATTGGT-----CCTTTTCTATTT-----CCAAAATAAA-----A-----

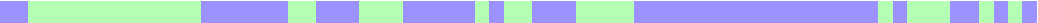
AGF_4 ----G--AACTTGGG--C--ATTTGAATGAGAGTT-----TC--T--AGT-GGGCCATTTTGGTAAGC

AGF_6 AGAAA--GGGTAGTA--T--GGTTGGCAAAGCATT-----CC-----TCTTTT-----

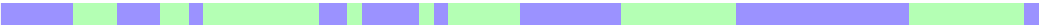
AGF_7 TGACG--CGCATGAA---T--GGATTAACGAGATTC-----CCACTG-----TCCCTATCTACTATC
AGF_8 G-GGG--GGTTT TAG--A--TT-----TTATTG--G-----CTAAA-GGGAAATTTTTA-----
AGF_9 ---G--TAAAAGGG--TC--ATTGGAAGGTGGCTT-----TC--TTTTCG-GAGAAAGTGTATAGCC
AGF_11 --GATAGTCCCTTGC-----AAT-----TTTGGAC--T-----TTAAC-GAGGAATTCCTA-----
AGF_12 G-GGG--GGTTT TAG--A--TT-----TAATTG-----G-----CTAAA-GGGAAATTTCTT-----
cons 

AGF_1 AG--AACTGGCGAT-GCGGGATGAACC-G-----A--TCGTGGGG--TT-A-ACGCGCC
AGF_2 -----AAATCATTAAT-CACTAATT-TTAAAGAT-TTTTG-AT--TTTTG
AGF_3 -----AAA-CCCTGGT-TCCGTTTT-TAATG-GCTC--CACCC--TCCTG
AGF_4 AG--AACTGGCGAT-GCGGGATGAACC-G-----A--TCGTGGGG--TT-A-ACGTGCC
AGF_6 -G--GAATGTCCGGTGC-G-TTCCTAAC-G-----G--TC-C-TTG--AA-AATCC---T
AGF_7 TA--GCGAAACCAC-AGCCAAGGGAAC-G-----G--GCTTGCA--TA-A-TCAGCGG
AGF_8 -----AAATTTGAAA-A--AATTA-CTTCCGCA--AA-GC--TTTTG
AGF_9 TTTGGCCTCTGCAA-TCGGAGAGATTGAGG-----TCT-----GC-AGCGTAGAT--CC-T-TCGGGGT
AGF_11 -----GTAAGCGT-GAGT--CATCAACTCGCGTTG-----ATTA
AGF_12 -----AATTTTAA-A--AATTA-CTTTCGCA--AA-AC--TTTTG
cons 

AGF_1 G--GAA--TRCAC--G-----TTCACA-TA-GCCA-----CCACCAC--CGT-Y-G-----
AGF_2 GA-----T--AAAG-----T-TT-ACCC--GT--TT-CCCGG-AAAA---
AGF_3 GGGCCAGGTTGGGGA-A--TTTT-----G-CC-CCCCGGCG--GC-----TTCCT--T-AAAA---
AGF_4 G--GAA--TACAC--A-----CTCAT-TA-GACA-----CCACAAA--AGG-T-G-----
AGF_6 G--GG--GAAA--T-----AATA-A-TT-T-T-----
AGF_7 G--GAA--AGAAG--A-----CCCTGT-TG-AGCT-----TGACTCT--AGT-T-T-----
AGF_8 G--CTA--GGGAG--GTTTCT-----T-TT-ATCC-----AA--AACCA-AA-AGTA---
AGF_9 T--AGA--TACAT--TT--GTGCTAAGTTA-TA-GCCT-----TTCATAGA-CAAC-----
AGF_11 C--GTC--CCTGCCCTTTGTACA-----CACCGCCG--TCGCTAC--TACCG-ATTGAATGGC
AGF_12 C--CTA--AGGAG--GTTTCT-----T-TT-ATTT-----AA--AATCA-AA-AGTA---
cons 

AGF_1 --GTG-TCC-----A-ATT--CG-
AGF_2 --AGGAAAACCTT--TA-CAATT-TT--TAAA-ATT-GAATTGT--T-----TT-T-TTC--T-TT
AGF_3 --GGGGGTGCCCGTTCCT-TAGGT-TC--CTCC-CCC-GAATTGGAAT-----CCCA-ATT-C-C-
AGF_4 --TTG-GTT-----C-ATC--TA-
AGF_6 -----C-----ATAC-CTAG--CC-G-TAC--TCA-
AGF_7 --GAC-ATTGTGAAA--GAAGTT-AGAG--GGTG--TAG-----CA-T-AAG--TGG-
AGF_8 --AGGG-AATCAAAA-A--CAATT-AAT--TCCG-GCC-GAAG-----CT-T-TAC--C-A-
AGF_9 --TTG-----T-TGA--CT-
AGF_11 TTAGTG-AATCCTTCGATTGGCTTTCTTTTCTGGCAACAGAATTTGATAGCTGAAAAGT-TGGGCAAA-CT
AGF_12 --AGGG-AATCAAAA-A--CAATT-AAA--TCCC-GCC-GTAG-----CC-T-TAT--C-A-
cons 

AGF_1 -----CAGCTGGAGGG-----TGTC-----ACGGAAGT-----GTCCCCTGC
AGF_2 TTTCTTGAGAGAA--A-AA--GGAAAAATTAAC-----TTG-----

AGF_3 -TCC-GTT--TC--C-GG--T--TA-AACC-----TAG-----
AGF_4 -----GA---CAGCAGGACGG-----TGGCC-----ATGGAAGT-----CGGAATCCAC
AGF_6 -----TA---ACCGCAGCAGG-----TCTCC-----AAGGTTAACAGCCTCTA--GTTGATAGAA
AGF_7 -----GA---GCTTCGGC-GA-----TCTTG-----AAATACCACTACCTTTATTGTTTTTTTAC
AGF_8 -----TTA---AC--T-AT--G---G-CCACC-----AAG-----
AGF_9 -----ATGATC-AGT-----CATGTAGCTTACTCGCTTAT-----GCTATTTTAC
AGF_11 -----TG---GT--C-ATTTAGA--G-GAAGT-----AAA-----
AGF_12 -----TTA---AT--T-AA--T---G-CCACT-----AAG-----
cons 

AGF_1 TAA----CCCGT-AA-----C-AACACCGCA-CCGC-AGCGAG-----
AGF_2 -T-----TTCT-CT-----A-ATCTCATATCAGTA--CCCCGACTGTATCT-----CT-----
AGF_3 -GG-----AAGGCTCCTTTCTTCTA-TCAA-AAGT-----GATT-----A-----
AGF_4 TAAGGAGTGTGT-AA-----C-AACTTCACC-TGCCGAATGAACTAGCCCCTGAACAATAGATGGCGCTCA
AGF_6 -----CAA-T-----GTAGATA-AGGG-AAGTCGGCAAAATAG--ATC-----
AGF_7 TTA----TTCAA-TA-----A-ATGTGGAAT-TGGA-CTTCACGGTCCACTT--TTC-----
AGF_8 -GA---TCCGA-AC-----A-ACGTTTATT-TTTG-GCTCCGTCCGGACCT-----TA-----
AGF_9 CTA---CGCTT-AG-----G-ATGTTGACA-AAAT-GGTTTTAAACGACCC--GTC-----
AGF_11 -AG---T-CGT-AA-----CAAGGT-T--T-CCGT-----AGGTGAAC-----CT-----
AGF_12 -GG---TTCGA-CC-----A-ACGTTTATT-ATTG-ACTTCGTCCGCACCC-----TG-----
cons 

AGF_1 -----ATCAGACCT-----ACCAG
AGF_2 -----T-G---AACTA
AGF_3 -----GGG---TGG-A
AGF_4 AGCGTGTTACTCATACCC----CATATAA
AGF_6 -CGTAA--CTTCGGGATAA-GGATTGGCA
AGF_7 -TAGCG-----A
AGF_8 -----G
AGF_9 -TTGAA--ACACGGAC-----CAAGGA
AGF_11 -----G---CGGAA-G---GG-AA
AGF_12 -----G---A
cons 