



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRICHOLOMA ANATOLICUM VE
***TRICHOLOMA CALIGATUM*'UN**
MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNDEN
KARŞILAŞTIRILMASI

Şenay İLBAN

YÜKSEK LİSANS

Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık-2011
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Şenay İLBAN

Tarih:13.12.2011

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

***TRICHOLOMA ANATOLICUM VE TRICHOLOMA CALIGATUM*'UN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNDEN KARŞILAŞTIRILMASI**

Şenay İLBAN

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Sinan AKTAŞ

2011, 28 Sayfa

Jüri

Yrd. Doç. Dr. Sinan AKTAŞ

Doç.Dr.Abdullah KAYA

Doç.Dr.Tuna UYSAL

Bu çalışmada birbirleriyle yakın ilişkili olduğu düşünülen *Tricholoma anatolicum* ve *Tricholoma caligatum* türleri arasındaki akrabalık ilişkisi moleküler ISSR-PCR (Inter-Simple Sequence Repeat - Polymerase Chain Reaction) yöntemi ile ortaya konmuştur. Kontrol dış grup olarak ta *Lepista nuda* değerlendirmeye alınmıştır.

Araştırma konusu olan mantar türleri Ekim-Kasım aylarında Adana, Denizli, Antalya ve Konya illerinden toplanmıştır. Toplanan örneklerin bir kısmı fungaryum tekniklerine uygun olarak kurutulmuş bir kısmı ise derin dondurucuda yaş olarak saklanmıştır. Toplanan mantar örneklerinin her birinin sap, şapka ve lamel olmak üzere yaş ve kuru örneklerinden 0,01 gr alınarak havanda ezildikten sonra DNA izolasyonu işlemlerine tabi tutulmuştur.

DNA izolasyonu Doyle'ün metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışılan türlere ait farklı kısımlardan elde edilen DNA'ya ait konsantrasyon ve saflık derecesi ölçümleri ND 2000 spektrofotometri ile yapılmıştır.

Jel profillerindeki DNA fragment sayısı ve büyüklükleri belirlenmiştir. NTSYS 2.1 bilgisayar programı ile örneklerin birbirlerine olan genetik uzaklıkları hesaplanarak genetik uzaklıklara göre dendogramları çıkartılmıştır.

Anahtar Kelimeler: ISSR – PCR, *Lepista nuda*, *Tricholoma anatolicum*, *Tricholoma caligatum*

ABSTRACT

MS THESIS

THE COMPARISON OF *TRICHOLOMA ANATOLICUM* AND *TRICHOLOMA CALIGATUM* SPECIES BY MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS

Şenay İLBAN

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE BIOLOGY**

Advisor: Asst. Prof. Dr. Sinan AKTAŞ

2011, 28 Pages

Jury

Asst. Prof. Dr. Sinan AKTAŞ

Assoc. Prof. Dr. Abdullah KAYA

Assoc. Prof. Dr. Tuna UYSAL

In this study, the relative relationship between *Tricholoma anatolicum* and *Tricholoma caligatum* (thought to be closely related) was revealed by molecular ISSR-PCR (Inter-Simple Sequence Repeat - Polymerase Chain Reaction) process. *Lepista nuda* was evaluated as control group.

The mushrooms which were the subject of the investigation were collected between October and November in the vicinity Adana, Denizli, Antalya and Konya. Some of them were dried according to fungarium techniques, and some were kept as fresh in deep freezer. 0,01 gr samples from fresh and dry samples were taken from each one of their stalks, heads and lamels, and used for DNA isolation after powdered in havanna.

DNA isolation were performed by using Doyle's method. The concentration and purity degrees measurements of DNA, obtained from different parts if the studied samples, were carried out by ND-2000 spectrophotometer.

The number and size of DNA fragment in the jel profiles were determined. The genetic distance between samples were calculated and filogenetic maps were revealed by using Sintax computer program.

Keywords: ISSR – PCR, *Lepista nuda*, *Tricholoma anatolicum*, *Tricholoma caligatum*

ÖNSÖZ

Çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Sinan AKTAŞ'a içtenlikle teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Tuna UYSAL'a ve Abdullah KAYA'ya ve arkadaşlarım Meryem BOZKURT ile Mehmet Ali KARASELEK'e teşekkür ederim. Selçuk Üniversitesi 10201093 nolu proje ile çalışmamda maddi destek sağlayan Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğüne (BAP) teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bana maddi ve manevi destekte bulunan eşime, aileme ve özellikle uğur böceklerime ayrıca teşekkür ederim.

Şenay İLBAN
KONYA-2011

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-------------|
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| ÖNSÖZ | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | viii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1. Genel Bilgiler | 2 |
| 1.1.1. Tarihçe..... | 2 |
| 1.1.2. <i>Tricholoma anatolicum</i> , <i>Tricholoma caligatum</i> ve <i>Lepista nuda</i> | 3 |
| 1.1.3. Türlerin Sistematikteki Yeri | 4 |
| 1.1.4. Morfolojik Özellikleri | 4 |
| 1.1.5. Ekonomik Önemi | 8 |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI | 9 |
| 3. MATERYAL VE METOT | 15 |
| 3.1. DNA İzolasyonu | 15 |
| 3.2. DNA Konsantrasyonunun Tayini | 16 |
| 3.3. ISSR Tayini | 16 |
| 3.4. PCR Optimizasyonu | 16 |
| 3.5. Elektroforez..... | 17 |
| 3.6. Veri Analizi | 17 |
| 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA | 18 |
| 4.1. DNA Konsantrasyonları..... | 18 |
| 4.2. Morfolojik Karakterizasyon ve Skorlaması | 19 |
| 4.3. Moleküler Karakterizasyon ve Skorlaması | 21 |
| 4.3.1. DNA Bantlarının Skorlanması..... | 21 |
| 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... | 23 |
| 5.1. Sonuçlar | 23 |
| 5.2. Öneriler | 24 |
| KAYNAKLAR | 25 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 28 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|---------------|--------------|
| λ | : Lamda |
| μ | : Mikro |
| μm | : Mikrometre |
| μl | : Mikrolitre |

Kısaltmalar

| | |
|---------------|--|
| ap PCR | : Arbitrarily-Primed Polymerase Chain Reaction |
| bar | : bialaphos resistance |
| cm | : Cantimetre |
| cM | : Sentimorgen |
| CTAB | : Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide |
| CYM | : Complete Yeast Medium |
| DGGE | : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis |
| DNA | : Deoxyribonucleic Acid |
| EcoR1 | : pronounced "eco R one" restriction endonuclease enzyme |
| EDTA | : Ethylene Diamine Tetra Aceticacid |
| EF1- α | : Elongation Factor 1 |
| GPD | : glyceraldehyde-3-phosphate |
| gr | : Gram |
| ISSR | : Inter-Simple Sequence Repeat |
| ISSR-PCR | : Inter-Simple Sequence Repeat - Polymerase Chain Reaction |
| ITS | : Internal Transcribed Spacer |
| kb | : Kilobaz |
| ng | : Nanogram |
| NS1 | : Spesifik Primer |
| OTU | : Operational Taxonomic Units |
| PCR | : Polymerase Chain Reaction |
| QTL | : Quantitative Trait Loci |
| RAPD | : Random Amplification of Polymorphic DNA |
| rDNA | : Recombinant Deoxyribonucleic Acid |
| RFLP | : Restriction Fragment Length Polymorphism |
| RNA | : Ribonucleic Acid |
| rpm | : Revolutions per minute |
| SSCP | : Single-Strand Conformation Polymorphism |
| SSIs | : single-spore isolates |
| SSR | : Simple Sequence Repeat |

1. GİRİŞ

Doğadaki dengenin göstergesi olarak bilinen besin piramidinde mantarların önemli bir yeri vardır. Döngünün sürekliliğinin korunması için döngüde yer alan her grubun en iyi şekilde tanınması gerekir. Bir canlı grubunu en iyi tanımanın yolu ise o canlı grubunu sınıflandırmaktan geçer. Son yıllarda sistematikte moleküler yöntemler önem kazanmıştır. Problemlili olduğu düşünülen türler arasındaki akrabalıkların ve derecelerinin ortaya çıkarılması artık moleküler yöntemlerle yapılmaktadır. Mantarlarda bu yöntemlerin kullanımı son yıllarda başarıyla uygulanmaktadır.

Doğada organik maddelerin ayrıştırılması gibi önemli bir görevi üstlenen fungusların yaklaşık 69.000 tanımlanmış türü bulunmaktadır. Günümüzde fungal âlemin üyelerinden; tıp, eczacılık, gıda ve fermentasyon alanlarında yaygın şekilde faydalanılmaktadır. Yukarıda belirtilen tanımlanmış 69.000 mantar türünden yaklaşık 10.000 tür, makrofungus olarak kaydedilmiştir. Yürütülmekte olan veya ileride yürütülecek çalışmalarla bu sayının artacağı düşünülmektedir.

Ülkemizde de hem mikrofunguslar hem de makrofunguslar üzerinde yoğun şekilde çalışmalar yapılmaktadır. Üniversitelerin farklı bölümlerinde fungal organizmaların tanımlanması, fizyolojik özelliklerinden faydalanılması ve endüstriyel alanda kullanımları üzerine değişik araştırmalar devam etmektedir.

Makrofunguslar ile birçok bilim dalı değişik araştırmalar yapmaktadır. Başta biyoloji olmak üzere ziraat, gıda, eczacılık, çevre ve tıp bilim dallarında makrofunguslar ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Uzak Doğu ülkelerinde zehirli olmadığı bilinen birçok mantar türü çok yaygın bir şekilde halk tarafından tüketilmektedir. Marketlerde et, balık, sebze reyonunun yanında bir de mantar reyonu bulunmaktadır.

Mantarların ülkemizde kullanımı Uzak Doğu Ülkelerine oranla çok az olmasına rağmen her geçen gün rağbeti artan bir üründür.

Çalışmamızda kullandığımız *Tricholoma* (Fr.) Staude türleri ülkemizin bazı bölgelerinde doğal olarak yetişmekte ve yöre halkı tarafından toplanarak aracılar vasıtasıyla yurt dışına, özellikle Uzak Doğu Ülkelerine, pazarlanmaktadır. Bu mantarlar yaygın olduğu bölgelerde yöre halkı için iyi bir geçim kaynağı haline gelmiştir.

Literatürden türler arasındaki genetik farklılıkları ortaya çıkarmakta hangi moleküler DNA tekniğinin en uygun olduğunu belirlemek amacıyla RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), AFLP (Amplified Fragment Length

Polymorphisms), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeat) ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) gibi DNA işaretleyici teknikleri karşılaştırılmış ve polimorfizm bakımından SSR ve AFLP teknikleri, maliyet bakımından RAPD ve ISSR teknikleri, tekrarlanabilirlik bakımından RFLP, SSR, ISSR ve AFLP DNA tekniklerinin avantajlı oldukları belirlenmiştir. Bunların yanı sıra çalışılacak laboratuvar imkanları göz önünde bulundurulduğunda, RAPD ve ISSR yöntemlerinin radyoaktif madde kullanımının olmadığı ve koşulların sınırlı olduğu laboratuvarlarda rahatlıkla kullanılacak yöntemler olduğu bildirilmiştir (Yalım, 2005). Bundan dolayı çalışmamızda ISSR yöntemi tercih edilmiştir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Tarihçe

Tricholoma spp. mantarları ile ilgili ilk yazılı bilgilere çok eski çağlardan beri önem veren Japonya'da rastlanılmaktadır. *Tricholoma* türü mantarlar Japon halkı için çok değerlidir. Japon yemek kültüründe mantarlar 1000 yıldan daha fazla bir süredir yer almaktadır. *Tricholoma* türüne ait mantarlar sadece Japon sofralarını süsleyen bir mantar türü olmaktan ziyade, kültürel ve dinsel anlamda da öneme sahiptir.

Tricholoma spp. mantarlarının tarihi oldukça eskidir. Tarihsel olarak milattan sonra 759 yıllarında yazılmış bir şiirde *Tricholoma* spp. mantarlarının (Japonya'daki ismi "Matsutake") önemli ve insan sağlığı açısından faydalı bir gıda maddesi olduğundan övgüyle bahsedilmektedir. 13. ve 17. yüzyıllarda bu mantar asaletin ve zenginliğin bir göstergesi olmuştur. Toplumda önemli yere sahip kişiler birbirlerine özel günlerde veya yaptıkları özel ziyaretlerde bu mantarı hediye olarak götürmüşlerdir. "Matsutake", verilen kişi için çok özel bir hediyedir ve onu alan kişinin bu hediyeye ait anıyı uzun yıllar kalbinde yaşattığı belirtilmektedir. Aynı yüzyıllarda Japon sarayında sadece hükümdarın ve yakın çevresinin bu mantarı yemesine izin verilmiş, diğer saray çalışanlarına mantarı tüketmeleri yasaklanmıştır. 20. yüzyılın başlarına kadar *Tricholoma* mantarı verimliliğin, üretkenliğin ve mutluluğun bir simgesi olarak görülmüştür. Japon halkı günümüzde de bu mantar türüne çok önem vermektedir. Bu sebepten *Tricholoma* dünyanın birçok bölgesinden ve ülkemizden toplanarak Japonya'ya ihraç edilmektedir (Kalmış ve ark, 2009).

1.1.2. *Tricholoma anatolicum*, *Tricholoma caligatum* ve *Lepista nuda*

Yöresel adı “katran mantarı” ya da “gamalak mantarı” olarak bilinen *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini başta Adana olmak üzere Kahramanmaraş (Kaya ve ark, 2009), Antalya ve Alanya bölgelerinde sedir (katran) ağaçlarının bulunduğu yerlerde yetişmektedir. Henüz kültüre alınamamış bir türdür. Katran mantarı 2003 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Hasan Hüseyin Doğan tarafından bilim dünyasına kazandırılmış bir mantardır. Literatürdeki ismi *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini olarak geçmektedir.

Tricholoma caligatum (Viv.) Ricken doğu ülkelerinde, özellikle Japonya’da çok tutulan bir mantardır ve “matsutake” ismi ile bilinmektedir. Genelde ibrelili ormanlarda sonbahar aylarında yetişmektedir. İbrelili ormanlarda nadiren de *Abies* Mill. ve *Picea* L. türleri ile birlikte yetiştiği daha önceden rapor edilmiştir. Japonya’da çok eskiden beri tanınan ve yenen önemli mantarlardan biri olduğu belirtilmektedir (Doğan, 2001). Ülkemizde Ermenek, Manisa, Erzurum, Eğirdir, Adana, Batı Anadolu, İzmir ve Konya yörelerinde tespit edilmiştir.

Lepista nuda (Bull.) Cooke, *Tricholomataceae* familyasından yenilebilen bir mantar türüdür. Orman içinde veya dışında, park ve bahçelerde, yol ve patika kenarlarında, çimlerin arasında ilkbahar aylarında bol miktarda yetişmektedir (Doğan, 2001). Türkiye’de Bolu bölgesinde "Mavi cincile", Karaman civarında da "Mor mantar" olarak adlandırılır. Kesinlikle çiğ olarak yenmemelidir, hafif zehirlenmelere veya mide problemlerine yol açabilir. Tereyağında sote, makarna sosunda veya mangalda yapıldığı zaman oldukça lezzetlidir.

1.1.3. Türlerin Sistematikteki Yeri

Divisio : *Basidiomycota*
 Classis : *Agaricomycetes*
 Ordo : *Agaricales*
 Familya : *Tricholomataceae*
 Genus : *Tricholoma*
 Species : *T. anaticum* H.H. Doğan & Intini

Divisio : *Basidiomycota*
 Classis : *Agaricomycetes*
 Ordo : *Agaricales*
 Familya : *Tricholomataceae*
 Genus : *Tricholoma*
 Species : *T. caligatum* (Viv.) Ricken

Divisio : *Basidiomycota*
 Classis : *Agaricomycetes*
 Ordo : *Agaricales*
 Familya : *Tricholomataceae*
 Genus : *Lepista*
 Species : *Lepista nuda* (Bull.) Cooke

1.1.4. Morfolojik Özellikleri

Şapka Yapısı: *Tricholoma anaticum*'da 4-20 cm çapında, önce sapa birleşik topuz şeklinde, sonra açılarak yarı kubbe şeklinden düzgünleşir. Gençken beyaz-krem, gelişme ilerleyince sarımsı kreme döner. Yüzeyi ince yünümsü tüylü, kenarında yünümsü velar kalıntılar asılı bulunur.

Tricholoma caligatum'da 12-20 cm çapında, gençken yarı küre, kenarlar içe kıvrık, gelişme ilerleyince açılır ve şemsiye şeklini alır. Gençken sarı halkalı, gelişme ilerledikten sonra kırmızımsı kahverengi halkalı bir renge sahiptir. Ortasında küt bir

çıkıntı bulunur. Beyaz zemin üzerinde dairesel dizilmiş sarı veya kırmızımsı koyu kahverengi-kestane kahverengi pullar bulunur. Yüzey nemli iken yapışkan özellik taşır.

Lepista nuda'da 5-11 cm çapında, önce yarı küre şekilli, sonra düzgünleşir ve şemsiye şeklini alır, merkezi hafif umbonat veya içe çöküktür. Yüzey düz, nemli iken yapışkan, menekşe-menekşe mavi veya menekşe kahverengidir.

Etli kısım: *Tricholoma anatolicum*'da 2-5 cm kalınlığında, beyaz, sıkı yapılı ve dolgun, katran kokusunda ve tatlımsıdır.

Tricholoma caligatum'da beyaz, sıkı yapılı ve dolgun, yumuşak ve eti bol, az acımsı, katran kokusundadır.

Lepista nuda'da beyaz, sıkı yapılı ve dolgun, merkezde kalın kenarlarda ince, leylak renkte, kuvvetli aromatik, meyve kokusunda ve tatlımsıdır.

Lamel Yapısı: *Tricholoma anatolicum*'da krem, sapa girinti yaparak birleşir. Gelişme ilerlediğinde lamel rengi kırmızımsı kahverengi lekeli.

Tricholoma caligatum'da önce krem, gelişme ilerleyince kırmızımsı kahverengi lekeli şekil alır, sapa girinti yaparak bağlanır. Geniş ve sık dizilişlidir.

Lepista nuda'da menekşe, gelişme ilerlediği zaman menekşe-gri, bazen mavi renktedir. Sapa çentik şeklinde girinti yaparak bağlanır.

Sap Yapısı: *Tricholoma anatolicum*'da 4-10 × 2-5 cm, silindirik ve tabana doğru biraz incelmektedir. Önce beyaz, sonra krem beyazdan krem sarıya döner. Üzerinde ince yünümsü yapıda velar kalıntıları ve annulus bulunur.

Tricholoma caligatum'da 10-15 × 1,5-2,5 cm, silindirik, bazen ortası şişkin uzun bir fiçi şeklinde, taban kısmına doğru inceler. Önce beyaz, sonra krem beyazdan krem sarıya döner. Beyaz zarımsı annuluslu, sert yapılı, içi her zaman dolu ve lifsi yapıdadır.

Lepista nuda'da 5-10 × 1-3 cm, silindirik, tabanı şişkin çomak şeklindedir. Gençken yüzey menekşe, gelişme ilerleyince renk açılır, boyuna fibrilli yapıdadır.



Şekil 1.1. *Tricholoma anatolicum*'a ait bazidyokarp yapıları.



Şekil 1.2. *Tricholoma caligatum*'a ait bazidyokarp yapıları.

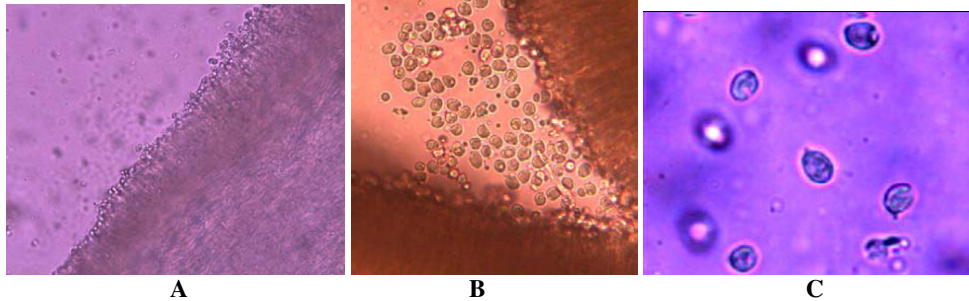


Şekil 1.3. *Lepista nuda*'ya ait bazidyokarp yapıları

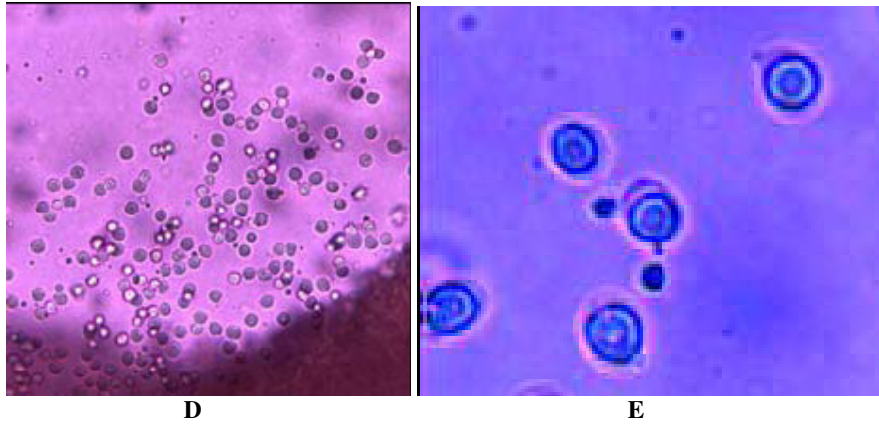
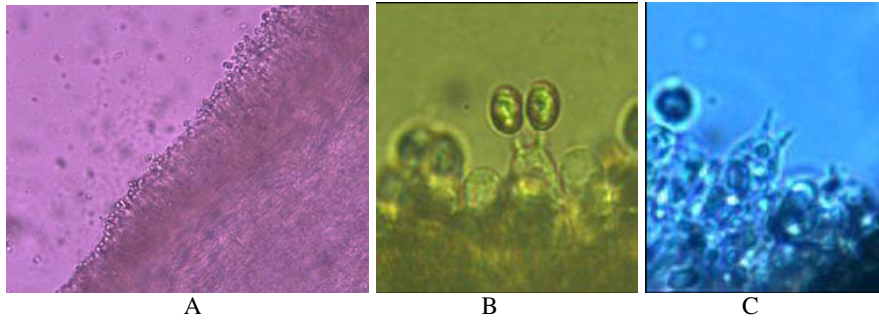
Spor Boyut ve Şekilleri: *Tricholoma anatolicum*'da geniş eliptik veya subgloboz, renksiz, siyanofilik, 6-7,5 × 4-5µ dur. Spor yüzeyi düzdür. Spor baskısı krem renktedir.

Tricholoma caligatum'da sporlar eliptik, hiyalin, $5-6 \times 4-5 \mu$ dur. Spor yüzeyi düzdür. Spor baskısı krem renktedir.

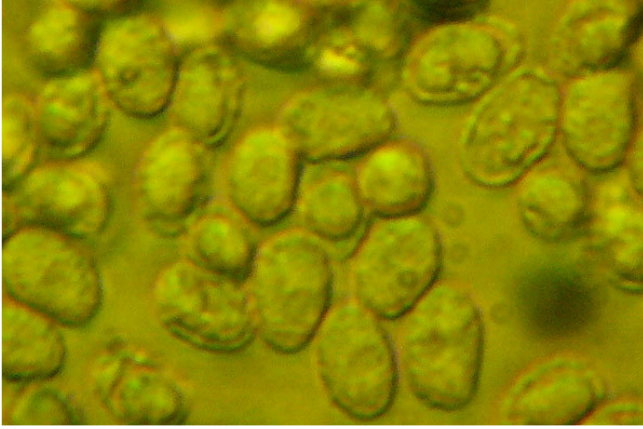
Lepista nuda'da sporlar eliptik, küçük siğilli, hiyalin, $6,5-8,5 \times 4,5 \mu$ dur. Spor baskısı pembe renktedir.



Şekil 1.4. *Tricholoma anaticum*'a ait mikroskop görüntüleri; A) Basidiumlar toplu halde, B) Basidiumlardan salınan sporlar, C) Organizmaya ait spor morfolojisi.



Şekil 1.5. *Tricholoma caligatum*'a ait mikroskop görüntüleri; A) Basidiumlar toplu halde, B-C) Basidium ve üzerinde sporlar, D) Sporların toplu görüntüsü, E) Organizmaya ait spor yapısı



Şekil 1.6. *Lepista nuda*'ya ait ait spor yapısı

1.1.5. Ekonomik Önemi

Fethiye ilçesinin dağ köylerinde katran mantarı ve Adana yaylalarında gamalak mantarı olarak bilinen *Tricholoma* mantarının iki türünün ekonomik değeri Japonya'ya uzanmaktadır. Biraz eski olmakla birlikte 1998 yılında Japon pazarında yaklaşık 3495 ton katran mantarı tüketilmiştir. Bu miktarın 247 tonunu Japonya'da toplanan mantardan karşılanmış, kalan kısmı ise farklı ülkelerden alınmıştır. Burada yaklaşık bir rakam vermek gerekirse bu ithal edilen mantarın parasal boyutu 156 milyon dolar civarındadır.

Ülkemizden katran mantarı kilogramı 100- 150 TL ye Avrupa ve Japonya'ya ihraç edilmektedir. İhracatı Antalya, Adana, İzmir, Muğla ve Çanakkale illerinde bulunan ihracatçı firmalar tarafından gerçekleştirilmektedir. Katran mantarı dağ köylerinde yaşayan halk tarafından toplandıktan sonra bir gün içinde ihracatçı firmaya ulaştırılmaktadır. Firmalarca yapılan özel paketlemeden sonra mantarlar uçakla Japonya'ya ulaştırılmaktadır (Kalmış ve ark, 2009).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Redman ve ark. (2006), Eylül-Kasım aylarında genetik analizler için *Cantharellus formosus* Corner örnekleri toplamıştır. Toplamda 96 bazidiyokarp 5 farklı kültürden seçilmiştir. rDNA sekansları ve 13 farklı gen bölgesinin PCR analizi ve genetik karakterizasyonu yapılmıştır. 15-25 arasında çeşitli kültürler içerisinde bazidiyokarp numaraları ve genetik analizleri 15 karakter ile şematize edilmiştir. 13 apPCR (Arbitrarily-Primed Polymerase Chain Reaction) genetik moleküler markır kullanılan analizler ve ribozomal ITS bölgesinin PCR amplifikasyonu kültürler arasında %81.41 ve kültür içinde %18.59 genetik çeşitliliğin olduğunu göstermiştir. Bir kültürdeki bazidiyokarp akrabalığı genotipik benzerliğin göstergesi değildir. Diğer kültürlerin moleküler yapısı farklıdır ve 2-6 gene sınırlanan nadir populasyonlar tanımlanmıştır.

Gherbawy, (2005), hasat zamanındaki 30 mısır örneğinden 15 fungus cinsi ve 29 tür toplamış ve %50'lik sükrözda Czapek agarında 27°C'de inkübe etmiştir. *Eurotium* en sık görülen cinslerdendir ve örneklerin %83.3'ün de bulunmuştur. Karakterizasyona ilaveten Avusturalya Zirai Bilim Üniversitesi Uygulamalı Mikrobiyoloji Enstitüsü kültür koleksiyonundan bazı ırklarla karşılaştırılan 5 farklı türle *Eurotium* cinsi tanımlanmıştır. Bu cinste genetik çeşitliliğin belirlenmesinde RAPD markırları kullanmıştır. Analizde kullanılan 3 primerle farklı fragmentler elde edilmiştir. Tür için uygun soy dendogramı çıkartılmıştır.

Duong ve ark. (2006), yaptıkları çalışmalarda *Magnolia liliifera* (L.) Baillon'nun ayırımının fungal çeşitlilikteki önemi için 18S RNA geni sekans analizi ile DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)'de birleştirilmiş moleküler metotları kullanmışlardır. Bunu sağlamak için toplam genomik DNA'yı ekstrakte etmiş ve fungal sekansı elde etmek için fungal spesifik primerler (NS1 ve GCFung) kullanmışlardır. PCR-DGGE analizi için çalışılan farklı kısımlardan 14 kullanılmaya hazır taksonomik birim (OTU) elde etmişlerdir.

Hoi-Shan ve Hai-Lou, (2002), *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler'in L-54 bazidiyokarpından tek spor izolatları (SSIs) toplanmıştır. L-54'ün iki parental çeşidi monokaryotizasyon yolu ile rejenere edilmiştir. Bunun anlamı RAPD, L-54'ten DNA örnekleri, onun 2 parental tipi ve 32 SSI'ı rastgele primerlerle çoğaltılmıştır. Dekaryotizasyonu gerçekleştirebilmek için 91 RAPD moleküler markır kullanılmıştır. 1/1 oranında ayrılmış olan RAPD markırları *L. edodes*'in zincirleme haritasını

oluşturmak için kullanmışlardır. Bu zincirleme RAPD haritası diğer kalıtsal haritalar, kararlı markırlar [bunlar gibi her fenotipe (mating tipi) zincirlenmiş bilinen bir gen (priA) ve düzenlenmiş DNA parçaları (MAT)] ve mating testleri, bulked-segregant analizleri ve PCR-tek zincir polimorfizm yapısı ile çoğaltmışlardır. Bu markırların toplam uzunluğu 622.4 cM (sentimorgen) olan zincirleme grubu olan *L. edodes*'in genetik haritasını kapsamaktadır.

Stajic Skorski ve ark. (2005), dünyadaki farklı coğrafya ve ekolojik bölgelerden 10 *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. türünün 37 ırkından elde edilen genetik veriler için RAPD-PCR kullanılmıştır. RAPD dendogramı için bir UPGMA bilgisayar programı kullanılmıştır.

Boletus edulis Bull. ticari yönden önemli yenilebilen bir mantardır. rDNA ITS sekansı filogenetik analizinde diğer mantarlardan ayırt edilmesinde bir çift spesifik primer tasarlanmıştır. PCR, 56-60°C'de bütün DNA kullanılarak yapılmıştır. DNA'nın çoğaltılmasında bu ısıda misel kitlesinden ve bazidyokarpından olumlu sonuç alınmıştır. Fakat diğer türlerde bu sıcaklık 60°C'dir. Sonuç olarak göstermiştir ki *Boletus edulis*, PCR'la diğer mantarlardan kesinlikle farklılık göstermektedir (Lian ve ark., 2007).

Cui ve ark. (2008), *Albatrellus piceophilus* B.K. Cui & Y.C. Dai'un teşhisinde morfolojik karakterlerin yanı sıra nükleer ribozomal DNA'daki ITS bölgelerinden de faydalanmışlardır.

Hendolin ve ark. (2000), mantar dokularının keşfi için bütün mantarların ve multiplex liquid hibridizasyonların temel alındığı bir yöntem geliştirerek PCR'la ITS bölgesi çoğaltmışlardır.

ITS bölgesi çalışmaları ile *Botryoshaeria obtusa* (Schwein.) Shoemaker'nın filogenetik varyasyonları ortaya çıkartılmıştır (Phillips ve ark., 2007).

Plaza ve ark. (2003), hızlı ve basit bir yöntemle mantar DNA'sının izolasyonunda, PCR amplifikasyonu ve diğer moleküler analizler için tek bir sıcaklığın kullanımına karar vermişlerdir. Bu metodun avantajı;

1. Miseller doğrudan petri kabındaki kültürden elde edilebilir.
2. Bu teknik daha hızlı ve daha kolay çalışılabilmektedir.
3. Bir gün boyunca 50 örnekle çalışılabilir.
4. Hesaplıdır.
5. Moleküler analizler için kaliteli ve bol miktarda DNA elde etmek için uygundur.
6. Özel ekipman ya da tehlikeli kimyasallara ihtiyaç duymaz.

Le ve ark. (2007), *Lactarius Pers.* cinsi ile çalışmışlardır. Bilim için 5 yeni takson tanımlamışlardır. Filogenetik analizlerde ITS sekans analizleri kullanmışlardır.

Barry (1996), filamentöz mantar kromozomlarını incelemek için belirlenmiş 5 metot üzerinde durmuştur. Bunlar:

1. Rekombinasyon analizleri ile grupların bağlantıları için genlerin haritalanması,
2. Mayoz sırasında kromozomların ışık mikroskopunda incelenmesi,
3. Mayoz profazında homolog kromozomlar arasındaki sinaptonemal komplekslerin elektron mikroskopunda incelenmesi,
4. Ayrılmış kromozomların pulsed field jel elektroforezinde tek bandlarının oluşturulması,
5. Moleküler seviyede kromozomların karakterizasyonunda DNA sekanslanması.

Karadeniz, (2007), çalışmasında *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Kumm.'un sporlarını çimlendirerek elde edilen monokaryonların yüksek sıcaklıklara olan toleranslarını ve *G. lucidum* Türkiye izolatlarından ekstrakte edilen DNA'ların EcoRI enzimi kullanılarak RFLP analizlerinin yapılmasıyla izolatlar arasındaki farkın saptanmasını amaçlamıştır. *G. lucidum*'un sporları, sulandırma yoluyla CYM katı besiyerine, yayma yöntemi ile ekilmiş ve 25°C sıcaklıkta inkübe edilerek, tek düşen spordan çimlenenler, CYM katı besiyerine inoküle etmiştir. *G. lucidum*'un sporlarından elde edilen monokaryonların sıcaklığa olan toleransları 27°C, 32°C, 35°C, 37°C, 40°C sıcaklıklarda CYM katı besiyerinde denemiş, en fazla gelişim hızının 27°C ve 32°C sıcaklıklarda meydana geldiği, 35°C ve 37°C sıcaklıklarda gelişmenin olduğu ancak, 27°C, 32°C sıcaklıklara oranla gelişme hızının oldukça yavaş olduğu, 40°C sıcaklıkta ise hiçbir monokaryonun gelişmediğini belirlemiştir. Genom analizlerinin güvenilirlerinden olan kromozomal separasyon ve total genom büyüklüğü hesaplama tekniğinin eldeki farklı *Ganoderma* suşlarına uygulanması amacıyla yaptığı çalışmada ise, bu *Basidiomycet*'in birkaç mb büyüklükte kromozomlara sahip olduğunu, sadece iki kromozomun 200 kb dolayında büyüklüğe sahip olabileceğini düşünmüştür.

Çebi ve ark. (2008), fungal sistematikte moleküler gelişmeler hakkında bilgiler vermişlerdir.

Tricholoma magnivelare ve *T. ponderosum* türleri Kuzey Amerika'da, *T. caligatum* Avrupa'da yayılış gösteren türlerdir. Doğal ortamlarından toplanan bu mantar türleri Uzak Doğu ülkelerine ihraç edilmektedir. *Tricholoma caligatum*'un ülkemizde

Ege ve Akdeniz bölgelerinde yayılış gösterdiği bilinmektedir. Kalmış ve ark. (2009), ekonomik öneme sahip *T. caligatum* makrofungusunu birçok açıdan incelemiştir. Muğla ilindeki belirli orman sahalarında organizmaya ait populasyonların dağılımını belirlemiş ve arazi çalışmaları sırasında bu popülasyona ait örnekleri toplamışlardır. Makrofungusa ait ekolojik ve coğrafi bulgular elde etmiş, fiziksel ve kimyasal özelliklerin analizi için toprak örnekleri toplamışlardır. Bununla beraber toprak örneklerinin mikrobiyolojik analizini yapmışlardır. Toplanan şapka formlarından misel elde etmiş ve elde edilen misellerin farklı mikrobiyolojik ortamlarda misel büyüme hızlarını belirlemiştir.

Sparsitubus L.W. Hsu & J.D. Zhao'un *Polyporaceae*'deki yeri önceden morfolojik karakterler temel alınarak tespit edilmişti. *Sparsitubus*'un diğer *Homobasidiomycetes*'lerle arasındaki akrabalıklar, *Sparsitubus*'un rDNA sekansları ve onu temsil eden polyporların gen bankasından elde edilmesiyle araştırılmıştır (Dai ve ark., 2007).

Miyazaki ve ark. (2008), *Lentinula edodes*'ten tetrad analizi ile bir *Basidiomycet* mantarının genetik haritasını çıkartmışlardır. Haritada 23 tetrad içerisinde; farklı 264 RAPD markırı, 14 yapısal gen, 1 EST markırı, 2 haritalama faktörü ve 92 basidiosporik yapı boyunca 8 SCARs bölgesi bulunmaktadır.

Nugent ve Saville, (2003), halusinojenik mantarlarda rDNA ve nLSUrRNA ya da 28S bölgelerinin amplifikasyon ve sekans analizini yapmışlardır.

Larraya ve ark. (2001), endüstriyel olarak üretimi yapılan *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.'un mating prosesinin kontrol edildiği tetrapolar genetik sistemler içerisinde yer alan β -lokusunun identifikasyonunu sağlayan moleküler markırların vermiş oldukları sonuçlara dayanarak iki genetik alt birimin varlığını göstermişlerdir. Bu alt birimlerle birlikte monokaryotik büyüme hızlarında farklılıklar gösteren bazı spesifik allellerin varlığını göstermişlerdir. Gerekli olan markırların temini ve monokaryonların büyüme hızlarının bağlı olduğu mating tipi etkisinin ortaya çıkarılmasında hızlı büyüyen monokaryonları seçerek, bunlardan uygun dikaryonlar üretip gerek substratı hızla kuşatma, besin ortakçalarına yaşam imkanı vermeme ve son olarak da kısa sürede bol ürün elde edebilen yeni suşlar geliştirmişlerdir.

Glen ve ark. (2000), ektomikorizal birlikteliklerde rastlanılan *Basidiomycet* mantarların PCR-RFLP tekniklerini kullanarak bunların identifikasyonunu sağlamışlardır. Ökalyptus ormanlarının oluşturduğu Avustralya bölgelerinde *Basidiomycet* fungusların nükleer ribozomal DNA'daki ITS primer çiftlerinin

spesifikasyonu ITS-I-F/ITS-4-B'lerinkilerle karşılaştırılmıştır. PCR ve RFLP yapılmış ve bu bölge, mantarları 28 familyaya ait 91 tür altında toplamalarını sağlamıştır. Bu çalışmada fungusların identifikasyonu için 3 tanesi mitokondriyal bölgeden, 3 tanesi de nükleer hedeflere uydurularak hazırlanmış 6 farklı primer çifti morfolojik olarak tanımlanmış türlerin PCR-RFLP kalıplarını oluşturmak için kullanılmıştır. Primerlerin 2 setten birisi yeni düzenlenmiş ve nükleer ribozomal DNA'daki ITS, iyi hedef olan diğeri ise mitokondriyal large subunit ribozomal DNA'nın amplifikasyonu ile elde edilmiş olan bu primer setleri çok yüksek hassasiyet ve spesifikasyon göstermiştir.

Tello ve ark. (2001), bir *Basidiomycet* olan beyaz küf mantarı *Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát) Gilb. & Ryvardeen'nin homokaryotik (monokaryon) suşların izolasyonu ve karakterizasyonu konusunda çalışmışlardır. Bu çalışmada *Ceriporiopsis subvermispora* FP105752'nin homokaryotik suşları rejenerasyona sokulmuş protoplastlardan homokaryotik izolatları elde edilmiştir. CSA ve CSB adı verilen bu suşların homokaryotik yapıları PCR ile ve 3 farklı birbirine allel olan MnP geninin (manganaz peroksidaz enziminin oluşumundan sorumlu gen) amplifikasyon ve sekans analizi yapılmıştır. Ebeveyn suşlarla karşılaştırıldıklarında homokaryon kültürlerin filtratlarında daha az sayıda MnP izoenzimleri bulunduğu tespit edilmiştir.

Hseu ve ark. (1996), geleneksel taksonomik metotlarla ayrılamayan *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.'un izolatları arasındaki farkları ITS denilen rDNA genlerini inceleyip, ITS sekanslarında RAPD tekniğini uygulamışlardır. Bu çalışmanın sonucunda bazı izolatların ITS sekansları identik olmasına rağmen, RAPD tekniğiyle genetik Finger Prints'lerin birbirinden farklı şekilde oluştuğu görülmüştür.

Larraya ve ark. (2002), *Pleurotus ostreatus*'u monokaryon ve dikaryon miseller halinde Eger besiyerinde ve buğday samanında yetiştirerek analizler yapmışlardır. Analiz sonuçlarına göre bu mantarın genetik haritasında Quantitative Trait Loci (QTL) adı verilen bazı genomik bölgelerin gösterilebileceğinin mümkün olduğunu ve bazı durumlarda monokaryotik ve dikaryotik QTL'ler haritada aynı bölgede yığıldığını göstermişlerdir. QTL'leri kapsayan böyle genetik haritalarının oluşturulabilmesinin mümkün olmasıyla birlikte genetik informasyona dayanarak yeni ıslah programlarının oluşturulacağını araştırmışlardır.

Castle ve ark. (1987), *Agaricus L.*' un iki türü olan *Agaricus brunnescens* Peck. ve *Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc. RFLP yoluyla araştırmıştır. Bu çalışmada *EcoRI* enzimi ile parçalanmış proplar southern DNA-DNA hibridizasyonuna sokulmuşlardır. Klonlanmış fragmentlerin her iki tür içinde büyük çoğunluğu polimorfik bulunmuştur

ve *A. brunnescens*' te beklenilenden daha az sayıda fenotiplere rastlanılmıştır. Aynı zamanda homokaryotik suşlardan elde edilen DNA'larda, heterokaryotik suşların DNA'larına göre daha az sayıda bant görülmüştür.

Larraya ve arkadaşları, (1999), *Pleurotus ostreatus*' un 1.4-4.7 Mbp büyüklüğü arasında değişen 11 tane kromozomunu PFGE (Pulsed Field Gel Elektrophoresis) yoluyla kolayca ayrıştırılabildiğini göstermişlerdir.

Nouhra ve ark. (2005), Arjantin'nin Yunga eyaletinde yapılan arazi çalışmaları, bir hypogeous mantarı *Alnus acuminata* Kunth. ssp. *acuminata* ile ilişkili *Alpova austroalnicola* sp. nov.'u ortaya çıkarmıştır. Amplifikasyon ve nükleer LSU rDNA geni sekanslamasını temel alan morfolojik ve moleküler çalışmalar *Alpova* içerisinde bunun nadir bir tür olduğunu göstermiştir. Analizler *Boletus edulis* Bull., *Rhizopogon* Fr. spp., *Suillus luteus* (L.) Russel ve *Truncocolumella citrina* ile ilişkili bir cins olduğunu göstermektedir. Etraftaki hayvan dışkılarına ve 9 çizgili armadillonun (*Dasyus novemcinctus novemcinctus*) dışkısının mikroskopik incelemesi *A. austroalnicola*'nın tüketildiğini ve sporlarını hayvanların yaydığını göstermektedir.

Eggert ve ark. (1998), beyaz küf mantarı *Pycnoporus cinnabarinus*'ta ki Laccase geninin moleküler analizini çalışmışlardır.

Krupa (1999), kayın ağacı ile mikoriza oluşturduğunu düşündüğü *Amanita muscaria* (L.) Lam., *Xerocomus badius* (Fr.) Gilbert, *Amanita citrina* (Schaeff.) Pers., *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. ve *Hebeloma crustuliniforme* (Bull.) Quél. mantarlarında PCR-RFLP yöntemi ile identifikasyonlarını yapmıştır.

Gutierrez ve ark. (1994), *Terfezia clavaryi* Chatin'nin identifikasyon ve karakterizasyonu için RAPD-PCR tekniğini kullanmışlardır.

Intini ve ark. (2003), Türkiye'nin Akdeniz bölgesinden toplanan *Tricholoma anatolicum*'un yeni bir tür olduğuna karar verdi. Bu mantarın matsutake grubunun yeni bir üyesi olduğu düşünüldü.

3. MATERYAL VE METOT

Araştırma konusu olan mantar türleri Ekim-Kasım aylarında Adana, Denizli, Antalya ve Konya illerinden toplanmıştır. Toplanan örneklerin bir kısmı fungaryum tekniklerine uygun olarak kurutulmuş bir kısmı ise derin dondurucuda yaş olarak saklanmıştır. Toplanan örneklere ait bireylerin örnek numaraları ve izolasyon tarihleri çizelge 3.1'deki gibidir.

Çizelge 3.1. Bireylere verilen örnek numaraları ve izolasyon tarihleri

| Örnek No | Tür İsmi | Mantar Dokusu | DNA İzolasyon Tarihi |
|----------|--|---------------|----------------------|
| TTC1 | <i>Tricholoma caligatum</i> (Viv.) Ricken | Şapka (Yaş) | 30.09.2010 |
| TTC2 | <i>Tricholoma caligatum</i> (Viv.) Ricken | Lamel (Yaş) | 30.09.2010 |
| TTC3 | <i>Tricholoma caligatum</i> (Viv.) Ricken | Sap (Yaş) | 30.09.2010 |
| TLD01 | <i>Lepista nuda</i> (Bull.) Cooke | Şapka (Kuru) | 30.09.2010 |
| TLD02 | <i>Lepista nuda</i> (Bull.) Cooke | Lamel (Kuru) | 30.09.2010 |
| TLD03 | <i>Lepista nuda</i> (Bull.) Cooke | Sap (Kuru) | 30.09.2010 |
| TTA1 | <i>Tricholoma anatolicum</i> H.H. Doğan & Intini | Şapka (Yaş) | 04.01.2011 |
| TTA2 | <i>Tricholoma anatolicum</i> H.H. Doğan & Intini | Lamel (Yaş) | 04.01.2011 |
| TTA3 | <i>Tricholoma anatolicum</i> H.H. Doğan & Intini | Sap (Yaş) | 04.01.2011 |

3.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu Soltis tarafından modifiye edilen Doyle'un metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Soltis ve ark., 1991). Genomik DNA'nın elde edilmesi için toplanan mantar örneklerinin her birinin sap, şapka ve lamel olmak üzere yaş ve kuru örneklerinden 0,01 gr alınıp havanda ezilerek eppendorf tüpüne konulmuştur. Daha sonra 65°C'de ısıtılan DNA ekstraksiyon tamponundan (2 X CTAB) 500 µl ilave edilip, aralıklarla karıştırılarak 65°C'de inkübe edilmiş ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Üzerine 500 µl kloroform ilave edilmiş, 5 dakika 14.000 rpm'de santrifüjden

sonra sıvı kısım yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Üzerine tekrar 500 µl kloroform ilave edilmiştir. 5 dakika 14.000 rpm' de santrifüj edilip açık krem renkli sıvı kısım (süpernatant) tekrar yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Elde edilen süpernatant kısım üzerine amonyum asetat ve izopropanol eklenip 3 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilmiş daha sonra sıvı kısım atılıp eppendorf tüpünün dibindeki pellete 1 ml %70'lik etanol eklenmiştir. 3 dakika 14.000 rpm de santrifüj edilip sıvı kısım tekrar atılıp pellet kısmının kuruması için eppendorf tüpü 30 dakika vakumda bekletilmiştir. Bunun sonunda eppendorf tüpüne 50 µl 1 x TE (Tris-EDTA) ilave edilip 15 dakika 65°C'de su banyosunda tutulmuştur.

3.2. DNA Konsantrasyonunun Tayini

Çalışılan türlere ait farklı kısımlardan elde edilen DNA'ya ait konsantrasyonlar ve saflık derecesi ölçümleri ND 2000 spektrofotometri ile yapılmıştır.

3.3. ISSR Tayini

ISSR tayini için UBC808, UBC809, UBC840, UBC856, UBC826 ve UBC818 ISSR primerleri kullanılmıştır.

3.4. PCR Optimizasyonu

Öncelikli olarak seçilen primerlerden her biri için MgCl₂, Primer ve Taq polimeraz enzim miktarlarını kullanılacak en uygun yöntem araştırılmış ve araştırmalar sonucunda Zietkiewicz ve ark. (1994)'nın belirttiği ISSR protokolü kullanılmıştır. Denemelerde Tm sıcaklıklarına göre gradient uygulanmıştır.

ISSR analizi 25 Mikrolitre amplifikasyon reaksiyon çözeltisi; 75 mM Tris-HCl, pH=8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 100 mM dATP, 100 mM dTTP, 100 mM dGTP, 100 mM dCTP, 0,2 mM primer, 1.0 unite Taq DNA polymerase ve 10 ng DNA içermektedir. Sıcaklık ve döngü koşulları olarak, 94°C'de 2 dk ön denatürasyon işleminden sonra, 36 döngü boyunca örnekler denatürasyon için 94°C'de 1 dk, primerin DNA'ya yapışması için primere göre değişmek üzere 45-55°C'de 1 dk ve uzama safhası

için 72°C’de 2 dk tutulmuştur. Ayrıca, örnekler son uzama safhası için 72°C’de 10 dk bekletilmişlerdir.

3.5. Elektroforez

Mini yatay elektroforezde elde edilen PCR ürünlerinin elektroforezi 5 µl etidyum bromür ile hazırlanan %1.2 (w/v) agaroz jele 5 µl PCR ürünü ve 2 µl yükleme solüsyonundan toplam 6 µl yükleyerek 1 X TAE tampon çözeltisinde içinde 100 V’da 1 saat yürütülmüş ve jeller UV transilluminatör yardımı ile görüntülenmiş ve UV ışığı altında fotoğrafları çekilmiştir.

3.6. Veri Analizi

Bantların yorumlanmasıyla oluşturulan matriksler, NTSYSpc 2.1 bilgisayar programı kullanılarak soy ağacı elde edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. DNA Konsantrasyonları

Çalışılan mantar türleri; *Tricholoma anatolicum*, *Tricholoma caligatum* ve *Lepista nuda*'nın şapka, sap ve lamel kısımlarından elde edilen DNA konsantrasyonları ve saflık derecesi ölçümleri NanoDROP 2000 ile yapılmış olup çizelge 4.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Örneklerin Spektral Sonuçları

| ÖRNEKLER | ÇALIŞILAN KISIM | A260 λ | A280 λ | 260/280 λ | 260/230 λ | NÜKLEİK ASİT KONSANT RASYONU | ÜNİT |
|---|-----------------|---------|---------|-----------|-----------|------------------------------|-------|
| <i>Tricholoma anatolicum</i> H.H. Doğan & Intini | Şapka (yaş) | 4,465 | 2,244 | 1,99 | 2,21 | 223,3 | ng/μl |
| | Lamel (yaş) | 4,266 | 2,145 | 1,99 | 2,53 | 213,3 | ng/μl |
| | Lamel (yaş) | 4,289 | 2,171 | 1,98 | 2,33 | 214,5 | ng/μl |
| | Sap (yaş) | 140,368 | 68,622 | 2,05 | 2,22 | 7018,4 | ng/μl |
| | Sap (yaş) | 136,093 | 66,103 | 2,06 | 2,24 | 6804,6 | ng/μl |
| <i>Tricholoma caligatum</i> (Viv.) Ricken | Şapka (yaş) | 3,281 | 1,698 | 1,93 | 1,58 | 164,0 | ng/μl |
| | Lamel (yaş) | 55,152 | 26,972 | 2,04 | 2,15 | 2757,6 | ng/μl |
| | Sap (yaş) | 26,724 | 13,121 | 2,04 | 2,14 | 1336,2 | ng/μl |
| <i>Lepista nuda</i> (Bull.) Cooke | Şapka (kuru) | 30,782 | 14,425 | 2,13 | 1,96 | 1539,1 | ng/μl |
| | Lamel (kuru) | 338,183 | 172,303 | 1,96 | 2,03 | 16909,2 | ng/μl |
| | Sap (kuru) | 62,275 | 30,158 | 2,06 | 2,16 | 3113,7 | ng/μl |

NanoDROP spektrum ölçümlerine göre farklı mantar türlerinden ve onlara ait farklı kısımlardan yüksek saflıkta ve genelde yüksek konsantrasyonda DNA izolasyonunun CTAB yöntemi ile gerçekleştirebildiği görülmektedir. Yaş ve kuru olarak seçilen örneklerin DNA izolasyonunun kalitesinde herhangi bir olumsuz sonuç oluşturduğu görülmemiştir. Ancak kuru lamellerden yapılacak izolasyonların daha uygun olabileceği spektral sonuçlardan açıkça görülmektedir. DNA konsantrasyonu açısından örnekler kıyaslandığında en yüksek oran, kuru örneğe ait lamelden çalışılan *Lepista nuda* türünde tespit edilmiştir (K=16909). En düşük konsantrasyon ise yaş örneğe ait şapkadan yapılan izolasyonda *Tricholoma caligatum* türünde belirlenmiştir (K=164). Bu türde DNA saflığı ise üst seviyededir. Genelde kuru örneklerde ve farklı

kısımlarında yapılan izolasyon sonuçlarından yüksek konsantrasyonlu DNA eldeleri gerçekleşmiştir. Yaş örneklerde yapılan izolasyonlarda ise konsantrasyonu nispeten kuru örneklerle göre daha düşük oranlar tespit edilmiştir. Sonuç olarak fungusumlarda saklanan iyi kurutulmuş örneklerin lamellerinden bu yöntemle kolayca DNA izolasyonu yapılabilmesi mümkün ve yararlı gözükmetedir. Yine bu yöntemle daha önce fungusumlarda saklanan çok sayıda ve çeşitli mantar türlerinde genetik moleküler çalışmalar böylece kolaylıkla yapılabilecektir.

4.2. Morfolojik Karakterizasyon ve Skorlaması

Tricholoma anatolicum, *Tricholoma caligatum* ve *Lepista nuda* türlerine ait örneklerin çizelge 4.2’te nicel morfolojik karakterlerin karşılaştırması, çizelge 4.3’te nicel morfolojik karakterlerin skorlaması, çizelge 4.4’te nitel morfolojik karakterlerin karşılaştırılması ve çizelge 4.5’de da nitel morfolojik karakterlerin skorlaması verilmiştir.

Çizelge 4.2 Nicel/Kantitatif Morfolojik Karakterler

| Morfolojik Karakterler | <i>T. anatolicum</i> | <i>T. caligatum</i> | <i>Lepista nuda</i> |
|-------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| Şapka Çapı (en çok) | 20 cm | 20 cm | 11 cm |
| Sap Boyu (en çok) | 10 cm | 15 cm | 10 cm |
| Sap Genişliği (en çok) | 5 cm | 2.5 cm | 3 cm |
| Spor Boyu (en çok) | 7.5 µ | 6 µ | 8.5 µ |
| Spor Genişliği (en çok) | 5 µ | 5 µ | 5 µ |

Çizelge 4.3 Nicel/Kantitatif Morfolojik Karakterlerin Skorlaması

| Morfolojik Karakterler | <i>T. anatolicum</i> | <i>T. caligatum</i> | <i>Lepista nuda</i> |
|-------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| Şapka Çapı (en çok) | 0 | 0 | 1 |
| Sap Boyu (en çok) | 0 | 1 | 0 |
| Sap Genişliği (en çok) | 0 | 0 | 1 |
| Sap Genişliği (en çok) | 0 | 1 | 0 |
| Sap Genişliği (en çok) | 1 | 0 | 0 |
| Spor Boyu (en çok) | 1 | 0 | 0 |
| Spor Boyu (en çok) | 0 | 1 | 0 |
| Spor Boyu (en çok) | 0 | 0 | 1 |
| Spor Genişliği (en çok) | 0 | 0 | 0 |

Çizelge 4.4. Nitel/Kalitatif Morfolojik Karakterler

| Morfolojik Karakterler | | | |
|------------------------------|----------------------------------|--|--|
| Gençken Şapka Şekli | Topuz (0) | Yarı Küre (1) | |
| Gelişmişken Şapka Şekli | Yarı Kubbe (0) | Şemsiye (1) | |
| Gençken Şapka Rengi | Krem Beyaz (0) | Sarı Halkalı (1) | Menekşe Mavi (2) |
| Gelişmişken Şapka Rengi | Sarı Krem (0) | Kırmızimsı Kahverengi Halkalı (1) | Menekşe Mavi veya Menekşe kahverengi (2) |
| Şapka Yüzeyi | Tüylü (0) | Pullu (1) | Düz(2) |
| Etili Kısım Rengi | Beyaz(0) | | |
| Etili Kısım Tadı | Tatlımsı (0) | Az Acımsı (1) | |
| Etili Kısım Kokusu | Nergiz kokusunda (0) | Aromatik Meyve Kokusunda (1) | |
| Etili Kısım Yapısı | Dolgun Sıkı Yapılı (0) | | |
| Gençken Lamel Rengi | Krem (0) | Menekşe (1) | |
| Gelişmişken Lamel Rengi | Kırmızimsı kahverengi Lekeli (0) | Gri Menekşe Bazen Mavi (1) | |
| Lamelin Sapla birleşim Şekli | Sapa Girinti Yaparak (0) | Sapa Çentik Şeklinde Girinti Yaparak (1) | |
| Sap Şekli | Silindirik (0) | | |
| Sap Tabanı | Taban kısma doğru incelir (0) | Tabanı şişkin çomak şeklinde (1) | |
| Sap Rengi | Beyaz, Krem Beyaz (0) | Menekşe (1) | |
| Spor Şekli | Eliptik (0) | | |
| Spor Yüzeyi | Düz (0) | Küçük Sığilli (1) | |
| Spor Rengi | Renksiz, Siyanofilik (0) | Hiyalin (1) | |
| Spor Baskı Rengi | Krem (0) | Pembe (1) | |
| Annulus varlığı | Var (0) | Yok (1) | |

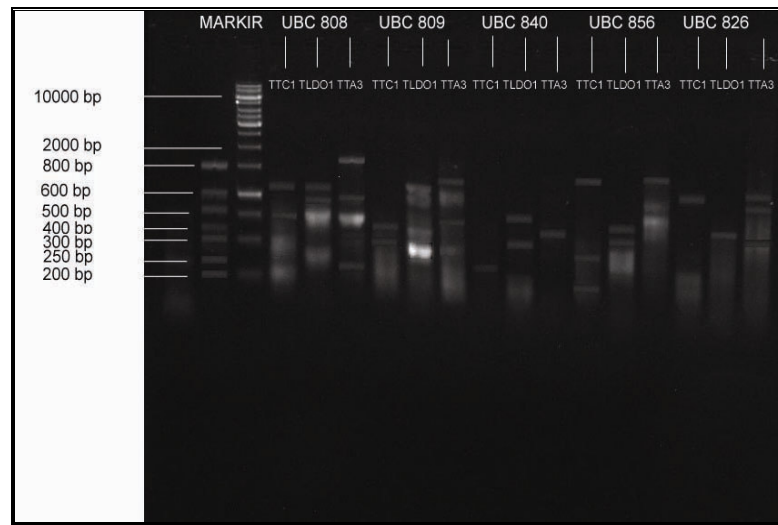
Çizelge 4.5. Nitel/Kalitatif Morfolojik Karakterlerin Skorlaması

| Morfolojik Karakterler | <i>T. anatolicum</i> | <i>T. caligatum</i> | <i>Lepista nuda</i> |
|------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| Gençken Şapka Şekli | 0 | 1 | 1 |
| Gelişmişken Şapka Şekli | 0 | 1 | 1 |
| Gençken Şapka Rengi | 0 | 1 | 2 |
| Gelişmişken Şapka Rengi | 0 | 1 | 2 |
| Şapka Yüzeyi | 0 | 1 | 2 |
| Etili Kısım Rengi | 0 | 0 | 0 |
| Etili Kısım Tadı | 0 | 1 | 0 |
| Etili Kısım Kokusu | 0 | 0 | 1 |
| Etili Kısım Yapısı | 0 | 0 | 0 |
| Gençken Lamel Rengi | 0 | 0 | 1 |
| Gelişmişken Lamel Rengi | 0 | 0 | 1 |
| Lamelin Sapla birleşim Şekli | 0 | 0 | 1 |
| Sap Şekli | 0 | 0 | 0 |
| Sap Tabanı | 0 | 0 | 1 |
| Sap Rengi | 0 | 0 | 1 |
| Spor Şekli | 0 | 0 | 0 |
| Spor Yüzeyi | 0 | 1 | 1 |
| Spor Rengi | 0 | 1 | 1 |
| Spor Baskı Rengi | 0 | 0 | 1 |
| Annulus Varlığı | 0 | 0 | 1 |

4.3. Moleküler Karakterizasyon ve Skorlaması

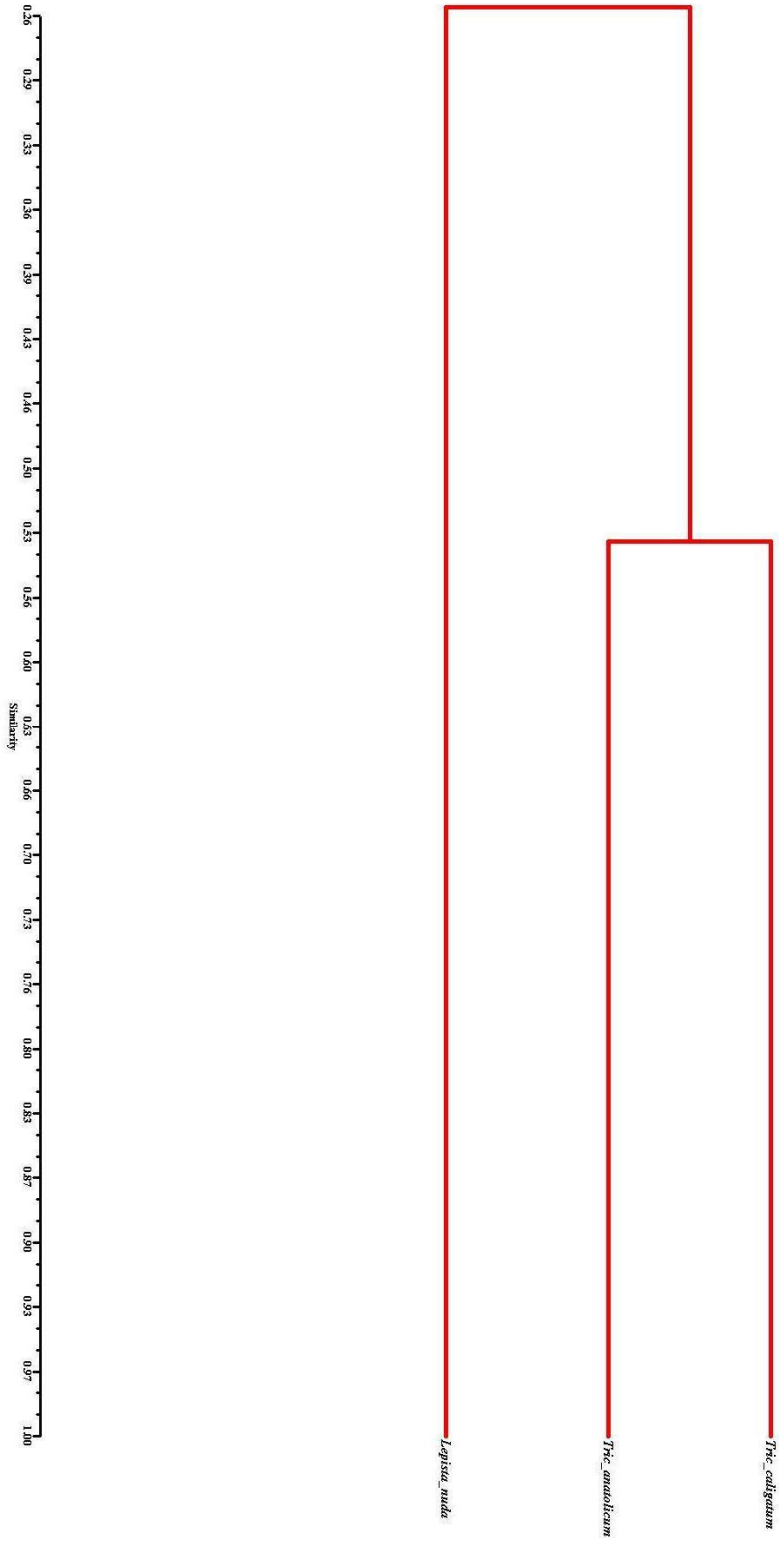
4.3.1. DNA Bantlarının Skorlanması

Bu çalışmada kullanılan 3 farklı bireyin genotipinden elde edilen DNA bantları genotipler arasında karşılaştırıldı ve aynı hizada bulunanlar benzer bölge olarak düşünülen bant varlığında 1, farklı hizalarda bulunanlar 0 olarak kodlandı. Elde edilen PCR ürünleri 200-1750 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.1).



Şekil. 4.1. DNA bantları

Yapılan optimizasyon doğrultusunda bant sayısı ve bantlardaki parlaklık dikkate alınarak en iyi ürünün elde edildiği T_m sıcaklıkları her örneğe ayrı ayrı uygulanarak ISSR-PCR'in gradient sonuçlarına göre en fazla bant oluşturan sıcaklıklar seçilmiştir. En fazla bant oluşturan sıcaklıklarda denenen primerlerin beş tanesi UBC808, UBC809, UBC840, UBC856 ve UBC826 tüm örneklere cevap vermiştir.



Şekil 4. 2. Türler arasındaki genetik ilişkileri gösteren dendrogram.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Doğan ve arkadaşları tarafından *T. anaticum* ITS analizleri ve morfolojik farklılıklara dayandırılarak yakın zamanda yeni bir tür olarak yayınlanmıştır. *Tricholoma anaticum* ülkemiz için endemik olduğu düşünülen ve halk tarafından toplanıp yenilen, hatta ticareti yapılan bir mantar olduğu için önem taşımaktadır.

Çalışmamızda 5 primer kullanımı ile elde edilen verilere göre *Tricholoma caligatum* ve *Tricholoma anaticum* türlerinin birbirlerine % 55 oranında benzerlik gösterdiği bulunmuştur. 3. tür olan *Lepista nuda* ise bu iki türe oldukça uzak görülmektedir. Bu çalışma süresince mikromorfolojik karakterler esas olmak üzere moleküler markırlar ile birlikte veri matrisine 70 adet veri girilmiştir. Mikromorfolojik karakterlerden ölçülen 5 karakterden 8 adet veri skorlamaya dahil edilmiş olup geri kalan 22 adet skorlanan veri ise ölçülemeyen nitel özelliklere aittir. Türler üzerine denenen 6 primerin 5'inden pozitif sonuçlar alınmış olup, 40 bant elde edilmiştir. Primerlerin tamamı türlerimiz için polimorfiktir.

Tricholoma anaticum morfolojik olarak başlıca aşağıdaki karakteristik özellikleri ile *Tricholoma caligatum* türünden farklılıklar gösterir. Şapka rengi açısından; *Tricholoma anaticum*'un şapka merkezi *Tricholoma caligatum*'a kıyasla daha açık renklidir. Şapka merkezi *Tricholoma anaticum*'da sarı-krem iken *Tricholoma caligatum*'da kırmızımsı kahverengidir. *Tricholoma anaticum*'da sap daha kısa ve geniş, annulus özellikle gelişmiş evrede daha az belirgindir. *Tricholoma caligatum*'da ise sap daha uzun ve dar annulus ise ileri devrede daha belirgindir. Dahası iki türün yetiştirme yerlerinin farklı olması da ayırt edici bir karakter olarak değerlendirilmesi gerekir.

Sonuç olarak ele alınan bu iki taksonun morfolojik ve genetik açıdan farklı taksonlar olduğu açıkça görülmektedir. Çoğunlukla genetik açıdan belirgin farkları olan taksonlar ayrı türler olarak değerlendirilse de aradaki genetik farklılığın yetiştirme yerine bağlı doğal seleksiyonun bir sonucu olabileceğinin de düşünülmesi gerekmektedir. Bu durumda bu iki taksonun aynı türe ait farklı varyeteler olması da mümkün görülmektedir.

5.2. Öneriler

Tricholoma anatolicum ülkemiz için endemik olduğu düşünölen ve halk tarafından toplanıp yenilen, hatta ticareti yapılan bir mantar olduğu için önem taşımakta olduğunu belirtmiştik. Bundan dolayı, bu türün korunması ve kültüre alınması yönünde çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Barry, E. G., 1996, Fungal Chromosomes. Department of Biology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599-3280, USA. *F. Genet.*, Vol. 75, Number 3, December 1996, pp. 255-263.
- Castle, A. J., Horgen, P. A. ve Anderson, J. B., 1987, Restriction Fragment Length Polymorphisms in the Mushrooms *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 816-822.
- Cui, B. K., Wang, Z. ve Dai, Y. C., 2008, *Albatrellus piceiphilus* sp. nov. on the basis of morphological and molecular characters. *Fungal Diversity* 28: 41-48.
- Çebi Kılıçoğlu, M., Özkoç, İ., 2008, Fungal Sistematikteki Moleküler Gelişmeler. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2008, 23 (1): 65-72.
- Dai, Y.C., Yuan, H.S., Zhang, X.Q. and Wang, Z. 2007, Systematic revisit of *Sparsitubus* (Basidiomycota, Aphyllophorales), an unusual cyphelloid-like polypore from China. *Fungal Diversity* 25: 37-47.
- Doğan, H.H., 2001, Karaman Yöresinin Makrofungusları Üzerinde Taksonomik Araştırmalar. Doktora tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya.
- Duong, L.M., Jeewon, R., Lumyong, S. ve Hyde, K.D., 2006, DGGE coupled with ribosomal DNA gene phylogenies reveal uncharacterized fungal phylotypes. *Fungal Diversity* 23: 121- 138.
- Eggert, C., Lafayette, P. R., Temp, U., Erikson, K. E. L. ve Dean, J. F. D., 1998, Molecular Analysis of a Laccase Gene from the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology*, May 1998, Vol. 64, No. 5, p. 1766–1772.
- Gherbawy, A. M. H. Y., 2005, Use of RAPD-PCR to Characterise *Eurotium* Strains Isolates From Date Fruits. *Botany Dept, Faculty of science, South Valley University, Qena, Egypt*.
- Glen, M., Tommerup, I. C., Bougher, N. L. ve O'brien, P. A., 2000, Specificity, Sensitivity and Discrimination of Primers for PCR-RFLP of Larger *Basidiomycetes* and Their Applicability to Identification of Ectomycorrhizal Fungi in Eucalyptus Forests and Plantations, *Mycorrhiza* 13:101–105.
- Gutierrez, A., Honrubia, M., Morte, A. ve Diaz, G., 1994, Edible Fungi Adapted to Arid and Semi-arid Areas. Molecular Characterization and In Vitro Mycorrhization of - Micropropagated Plantlets. *Dpto. De Biología Vegetal Facultad De Espinardo Universidad De Murcia. Murcia Spain*.
- Hendolin, P. H., Paulin, L., Koukila-Kahköla, P., Anttila, V., Malmberg, H., Richardson, M. ve Ylikoski, J., 2000, Panfungal PCR and Multiplex Liquid

- Hybridization for Detection of Fungi in Tissue Specimens. *Journal of Clinical microbiology*. Nov. 2000, p. 4186–4192.
- Hoi-Shan, K., Hai-Lou, X., 2002, Construction of a Genetic Linkage Map of Shiitake Mushroom *Lentinula Edodes* Strain L-54. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 35, No. 5, September 2002, pp. 465-471.
- Hseu, R. S., Wang, H. H., Wang, H. F. ve Moncalvo, C. M., 1996, Differentiation and Grouping of Isoetes of the *Ganoderma lucidum* Complex by Random Amplified Polymorphic DNA-PCR Compared on the Basis of Internal Transcribed Spacer Sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 1354-1363.
- Intini, M., Doğan, H. H. ve Riva, A., 2003, *Tricholoma anatolicum* spec. Nov.: un nuovo membro del gruppo matsutake. *Micol. e Veget. Medit.*, 18 (2): 135-142.
- Kalmış, E., Eltem R., Işıloğlu, M., Solak, M. H., Kalyoncu, F. ve Gezgin, Y., 2009, Muğla ilindeki *Tricholoma caligatum* populasyonlarının Belirlenmesi ile İnvivo İnvitroda Kültürel Özelliklerinin Açığa Çıkarılması. *TÜBİTAK Projesi Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir*.
- Karadeniz, E., 2007, Yüksek Sıcaklığa Dayanıklı *Ganoderma lucidum* Monokaryon Misel Üretimi ve *Ganoderma sp.*' Nin Türkiye İzolatlarında RFLP Kalıplarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Kaya, A., Uzun, Y., Karacan, İ. H., 2009, Göksun (Kahramanmaraş) Yöresi Makrofungusları. *Türk J. Bot* 33 (2009) 131-139.
- Krupa, P., 1999, Identification by PCR-RFLP of a Fungus Isolated from Mycorrhizal Roots of a Distinguishable Birch Growing in Areas Disturbed by Industry. *Polish Journal of Environmental Studies Vol. 8, No. 3 (1999)*, 161-163.
- Larraya, L. M., Idareta, E., Arana, D., Ritter, E., Pisabarro, A. G., ve Ramirez, L., 2002, Quantitative Trait Loci Controlling Vegetative Growth Rate in The Edible Basidiomycetes *Pleurotus Ostreatus*.
- Larraya, L. M., Pe'rez, G., Iribarren, I., Blanco, J. A., Alfanso, M., Pisabarro, A. G. ve Rami'rez, L., 2001, Relationship Between Monokaryotic Growth Rate and Mating Type in the Edible Basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3422-3426.
- Larraya, L. M., Pe'rez, G., Penas, M. M., Baars, J. J. P., Mikosch, T. S. P., Pisabarro, A. ve Rami'rez, L., 1999, Molecular Karyotype of White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3413-3417.
- Le, H. T., Stubbe, D., Verbeken, A., Nuytinck, J., Lumyong, S. ve Desjardin, D. E., 2007, *Lactarius* in Northern Thailand: 2. *Lactarius* subgenus *Plinthogali*. *Fungal Diversity* 27: 61-94.
- Lian, B., Zang, J., Hou, W., Yuan, S., ve Smith, D. L., 2007, PCR-based sensitive detection of the edible fungus *Boletus edulis* from rDNA ITS sequences.

Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458. DOI: 10.2225/vol11-issue3-fulltext-4.

- Miyazaki, K., Huang, F., Zhang, B., Shiraishi, S., Sakai, M., Shimaya, C. ve Shishido, K., 2008, Genetic map of a basidiomycete fungus, *Lentinula edodes*(shiitake mushroom), constructed by tetrad analysis. *Breeding Science* 58: 23-30.
- Nouhra, E. R., Dominguez, L. S., Becerra, A. G. ve Trappe, J. M., 2005, Morphological, Molecular and Ecological Aspects of the South American Hypogeous Fungus *Alpova austroalnicola* sp. nov. *Mycologia*, 97(3), 2005, pp. 598–604.
- Nugent, K. G. ve Saville, B. J., 2003, Forensic Analysis of Hallucinogenic Fungi: a DNA-based Approach. *Forensic Science International* 140 (2004) 147–157.
- Phillips, A. J. L., Crous, P. W. ve Alves, A., 2007, *Diplodia seriata*, the anamorph of “*Botryosphaeria*” *obtusa*. *Fungal Diversity* 25: 141-155.
- Plaza, G. A., Upchurch, R., Brigmon, R. L., Whitman, W. B. ve Ulfig, K., 2003, Rapid DNA Extraction for Screening Soil Filamentous Fungi Using PCR Amplification. *Polish Journal of Environmental Studies* Vol. 13, No. 3 (2004), 315-318.
- Redman, R. S., Radson, J. ve Rodriguez, J., 2006, Genetic structure of *Cantharellus formosus* populations in a second-growth temperate rain forest of the Pacific Northwest. *Pacific Northwest Fungi* 1(7): 1-13.
- Soltis, P. S., and Soltis, D. E., 1991, Genetic variation in endemic and widespread plant species: examples from Saxifragaceae and Polystichum (Dryopteridaceae). *Aliso* 13:215–223.
- Stajic, M., Sikorski, J., Wasser, S. P. Ve Nevo, E, 2005, Genetic similarity and taxonomic relationships within the genus *Pleurotus* (higher *Basidiomycetes*) determined by RAPD analysis. *Mycotaxon* 93: 247-255.
- Tello, M., Seelenfreund, D., Lobos, S., Gaskell, J., Cullen, D. ve Vicuna, R., 2001, Isolation and Characterization of Homokaryotic Strains from the ligninolytic *Basidiomycete Ceriporiopsis subvermispora*. *FEMS Microbiology Letters* 199: 91-96.
- Yalım, D., 2005, Türkiye’de Yetişen Arpa Çeşitlerinde Genetik Çeşitliliğin ISSR (Basit Dizilim Tekrarları) Moleküler Markör Tekniği ile Saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. ve Labuda, D., 1994, Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics* 20, 176-183.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Şenay İLBAN
Uyruğu : TC
Doğum Yeri ve Tarihi : Konya 1985
Telefon :
Faks :
e-mail :

EĞİTİM

| Derece | Adı, İlçe, İl | Bitirme Yılı |
|---------------|-----------------------------------|--------------|
| Lise | : Konya Özel İdeal Anadolu Lisesi | 2003 |
| Üniversite | : Selçuk Üniversitesi | 2008 |
| Yüksek Lisans | : | |
| Doktora | : | |

İŞ DENEYİMLERİ

| Yıl | Kurum | Görevi |
|-----|-------|--------|
|-----|-------|--------|

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR