Türkiye’de Yayılış Gösteren *Pleurotus ostreatus* Suşlarının Genetik Çeşitliliği

Melike KALAYCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2018

The Genetic Variation of *Pleurotus ostreatus* Strains Isolated From Turkey

Melike KALAYCI

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

May 2018

Türkiye'de Yayılış Gösteren *Pleurotus ostreatus* Suşlarının Genetik Çeşitliliği

Melike KALAYCI

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ

Mayıs 2018

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Melike KALAYCI'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Türkiye'de Yayılış Gösteren *Pleurotus ostreatus* Suşlarının Genetik Çeşitliliği" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ

İkinci Danışman : Doç. Dr. Can YILMAZ

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:
Üye : Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ

Üye : Doç. Dr. Halil BIYIK

Üye : Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Üye : Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ

Üye : Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Mustafa YAMAÇ danışmanlığında hazırlamış olduğum "Türkiye'de Yayılış Gösteren Pleurotus ostreatus Suşlarının Genetik Çeşitliliği" başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 18/05/2018

Melike KALAYCI

İmza

ÖZET

Ülkemizde kültürü yapılan *Agaricus bisporus* %86 üretim ile ilk sırada iken *Pleurotus* türleri %10 ile ikinci sırada yer almaktadır. *Pleurotus ostreatus* makromantar türü besin değeri olarak oldukça zengindir. Geçmişte mantarları sınıflandırmak için kullanılan yöntemler telomerik ve anamorfik sınıflandırmayla sınırlı kalmaktadır. Ancak bu sınıflandırmaların güvenilirlik düzeyi düşüktür. Moleküler çalışmalarla beraber genetik sınıflandırmalar ile daha doğru ve kesin kanıtlar elde edilmiştir. *Pleurotus ostreatus* türünün Türkiye genelinde genetik sınıflandırması ile ilgili bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle ülkemizden 43, ülke dışından temsilci olarak seçilen 4 *Pleurotus ostreatus* izolatı elde edilerek populasyonun yapısını belirlemek için dokuz mikrosatellit bölgesi çalışılmıştır. Sonuç olarak kullanılan lokusların polimorfik olup gözlenen ortalama heterozigotluk değeri en düşük Gb-Po-050a ve Gb-Po-097a (H_G=0.19) lokuslarında, en yüksek Gb-Po-011a (H_G=0.86) lokusunda tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Pleurotus ostreatus*, Mikrosatellit, Genetik çeşitlilik

SUMMARY

While *Agaricus bisporus* cultured in our country is the first with %86 production, *Pleurotus* species is the second with %10. *Pleurotus ostreatus* macrofungi species are quite rich as nutrients. In the past, the methods used to classify fungi were limited to telomeric and anamorphic classifications. However, the reliability of these classifications is low. Genetic classifications with molecular studies have provided more accurate and precise evidence. There is no any studies on the genetic classification about *Pleurotus ostreatus* in Turkey. For this reason, nine microsatellite regions were studied by selecting 43 *Pleurotus ostreatus* samples from Turkey and 4 *Pleurotus ostreatus* from abroad as representative to determine the structure of the population. As a result, the loci used are polymorphic and the observed average heterozygosity value was found at the highest Gb-Po-011a (H_G=0.86) at the lowest Gb-Po-050a and Gb-Po-097a (H_G=0.19) sites.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, Microsatellite, Genetic variation

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında benden yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ ve Doç. Dr. Can YILMAZ'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Örneklerin temini sağladıkları için Prof. Dr. Abdunnasır YILDIZ, Prof. Dr.H. Hüseyin DOĞAN, Prof. Dr. Halil SOLAK, Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA, Prof. Dr. İbrahim TÜRKEKUL, Prof. Dr. Kenan DEMİREL, Dr. Öğretim Üyesi Hakan ALLI, Dr. George ZERVAKIS ve Dr. Miha HUMAR'a teşekkür ederim.

Ayrıca yanımda olduklarını her zaman hissettiren aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vi
SUMMARY vii
TEŞEKKÜR viii
İÇİNDEKİLER ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
ÇİZELGELER DİZİNİ xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI 11
3. MATERYAL VE YÖNTEM 14
3.1. MATERYAL 14
3.1.1. Makrofungus Örneklerinin Eldesi 14
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler 16
3.2. YÖNTEM 20
3.2.1. Kültür Çalışmaları 20
3.2.2. Toplam Genomik DNA İzolasyonu 21
3.2.3. Genomik DNA'nin Kalitesinin ve Miktarının Belirlenmesi 233
3.2.4. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) 23
3.2.5 Mikrosatellit Veri Analizi 25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 277
4.1. *Pleurotus ostreatus* Örneklerinin Genetik Yapısı 27
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 388
KAYNAKLAR DİZİNİ 40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

1.1. Yıllara göre mantar üretim miktarı 2
1.2. Yıllara göre Türkiye mantar üretim miktarı 4
1.3. *P. ostreatus*'un doğal ortamındaki görüntüsü 5
1.4. *P. ostreatus* bazidiyokarp 6
1.5. Homozigot ve heterozigot bireylere ait canlıların jel elektroforez görüntüsü 9
3.1. Çalışmada kullanılan *Pleurotus ostreatus* bazidiyokarp örneklerinin temin edildiği iller 14
3.2. D100 kodlu *Pleurotus ostreatus* izolatına ait katı besiyerinde dikaryotik misel kültürü 20
3.3. M119 kodlu *Pleurotus ostreatus* izolatına ait sıvı besiyerinde dikaryotik misel kültürü 21
3.4. Kuru *Pleurotus ostreatus* bazidiyokarp örnekleri 22
3.5. Total DNA izolasyonu örnekleri 23
3.6. *Gb-Po-011a* ve *Gb-Po-064* lokusları PCR ürünleri 25
3.7. *Gb-Po-011a* lokus görüntüsü 25
3.8. Analizlerde kullanılan PCR cihazı 26
4.1. *Gb-Po-011a* lokusu allel ve allel sıklıkları 31
4.2. *Gb-Po-028a* lokusu allel ve allel sıklıkları 32
4.3. *Gb-Po-050a* lokusu allel ve allel sıklıkları 32
4.4. *Gb-Po-064a* lokusu allel ve allel sıklıkları 33
4.5. *Gb-Po-076* lokusu allel ve allel sıklıkları 33
4.6. *Gb-Po-079a* lokusu allel ve allel sıklıkları 34
4.7. *Gb-Po-097a* lokusu allel ve allel sıklıkları 34
4.8. *Gb-Po-115* lokusu allel ve allel sıklıkları 35
4.9. *Gb-Po-129* lokusu allel ve allel sıklıkları 35
4.10. *P. ostretus* örneklerinden elde edilen UPGMA uzaklık ağacı 37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

1.1. Ülkelerin yıllara göre mantar üretim miktarı 3
1.2. Türkiye'de kültür mantarı üretim ve tüketim miktarı 4
3.1. Çalşmada kullanılan *P. ostreatus* örneklerinin kod ve kaynakları 14
3.2. *P. ostreatus* örneklerinin analizlerinde kullanılan mikrosatellit lokusları 24
4.1. İncelenen lokuslardaki allellerin dağılımı 27
4.2. *Gb-Po-011a* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), allel sayısı (k) ve allel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri 28
4.3. *Gb-Po-028a* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), allel sayısı (k) ve allel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri 28
4.4. *Gb-Po-050a* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), allel sayısı (k) ve allel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri 29
4.5. *Gb-Po-064a* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), allel sayısı (k) ve allel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri 29
4.6. *Gb-Po-076* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), allel sayısı (k) ve allel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri 29
4.7. *Gb-Po-079a* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), allel sayısı (k) ve allel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri 30
4.8. *Gb-Po-097a* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), allel sayısı (k) ve allel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri 30
4.9. *Gb-Po-115* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), allel sayısı (k) ve allel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri 31
4.10. *Gb-Po-124* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), allel sayısı (k) ve allel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri 31
4.11. *P. ostreatus* popülasyonunun Hardy-Weinberg dengesine dayalı allel sıklığı anlamlılığı (p, olasık; ydö: yüksek derecede önemli 36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklama**
µl	Mikrolitre

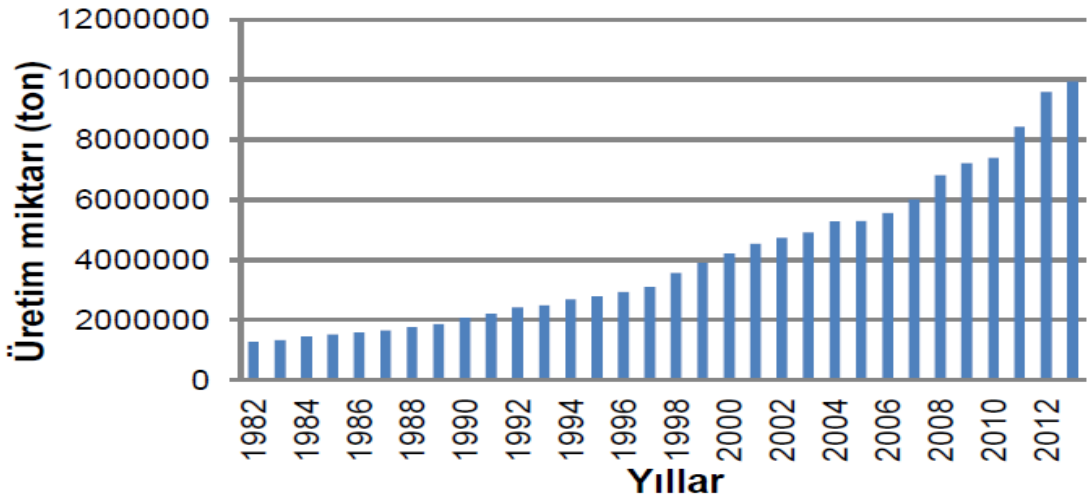
Kısaltmalar	**Açıklama**
bç	Baz Çifti
DNA	Deoksiribonukleik Asit
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate
EDTA	Etilen DiaminTetra Asetik Asit
CTAB	Cetil Trimethyl Ammonium Bomide Buffer
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Ziraat Örgütü
TE	Tris EDTA
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
k	Alel Sayısı
H_B	Beklenen Heterozigotluk (gen çeşitliliği)
H_G	Gözlenen Heterozigotluk
F_{st}	Genetik Uzaklık
P	Olasılık Değerleri
N	Örnek Sayısı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mantarlar klorofil içermeyen, kök, gövde, yaprak farklılaşması bulunmayan basit yapılı canlılardır. Buna karşın mantarlar farklı ekosistemlerde çok çeşitli işlevlere sahip bir organizma grubudur. Doğada ölü ya da canlı organik maddeleri parçalayarak karbon ve azot döngüsünde ve özellikle orman ekosisteminde önemli rol oynarlar. Makrofunguslar mevsime bağlı olarak daha çok ormanlık alanlarda rutubeti yüksek ve organik madde miktarının çok olduğu çevre koşullarında bolca bulunurlar (Gücin, 1993).

Makrofungusların insan sağlığı açısından sahip olduğu potansiyel özelliklerden bazıları; kan şekerini ve kolestrolü düşürmesi, bakteriyal, fungal viral ve parazitik enfeksiyonların önlenmesi, immün uyarıcıların aktive edilmesi ve makrofaj fonksiyonlarının düzenlenmesi olarak sıralanabilir (Manzi ve Pizzoferrato, 2000; Rajarathnam vd., 1998). Ayrıca düşük kalorili ve esansiyel yağ asitleri ile protein, vitamin, mineral içeriği iyi olan besin kaynaklarıdır (Yılmaz vd., 2006).

Bu özellikleri ile makrofunguslar, ideal besin kaynakları olarak kabul edilmektedir. Yenebilen makrofunguslar doğada kendiliğinden ortaya çıkabildiği gibi kültürü yapılan türler de bulunmaktadır. Mantar yetiştiriciliği 16. yy'da Fransa'da başlamıştır. Mantarlar bu yıllarda mevsime bağlı yetiştirilirken 19. yy başlarında sıcaklık ve nemin düzenli olduğu mağralarda ve taş ocaklarda yapılmaya başlanmıştır (Eren vd., 2016). Dünya kültür mantarı üretim miktarı 1961 yılında 495.127 ton iken bu rakam 2013 yılında 9.926.966 tona ulaşmıştır (Şekil 1.1). 2010-2013 yılları arasındaki kültür mantarı üretim değerleri incelendiğinde bu konudaki ilk 5 ülkenin Çin, İtalya, Amerika Birleşik Devletleri, Hollanda ve Polonya olduğu görülmektedir (FAO, 2015). (Çizelge 1.1).



Şekil1.1. Yıllara göre dünya mantar üretim miktarı (FAO, 2015)

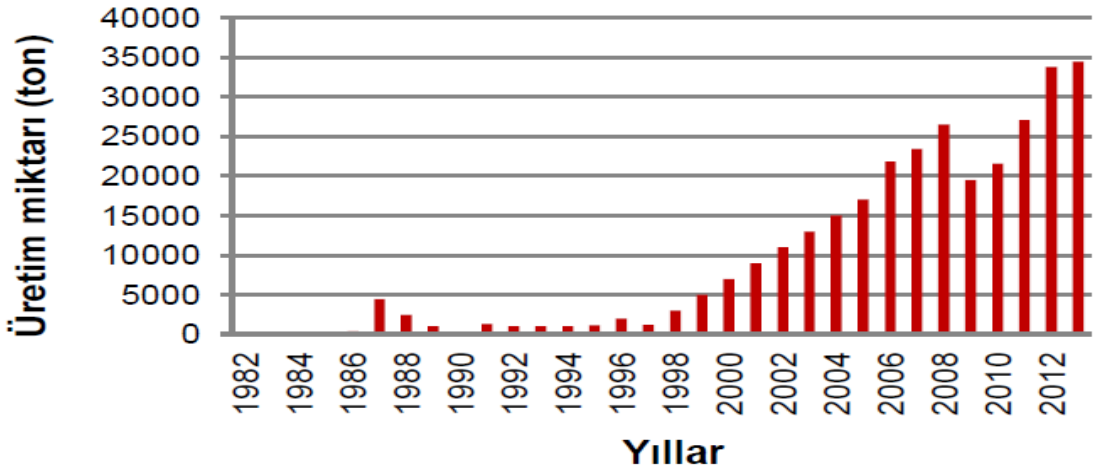
Dünyada önemli miktarda ticareti yapılan başlıca kültür mantarı türleri *Agaricus* spp., *Agrocybe aegerite*, *Auricularia polytricha*, *Flamulina velutipes*, *Ganoderma lucidium*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Lentinula edodes*, *Morchella* spp., *Volvariella volvacea* ve *Pleurotus* spp.'dir (TS 2410, 2005). Dünyada ve ülkemizde en fazla yetiştirilen tür *Agaricus* türleri olmakla beraber *Pleurotus* türleri son yıllarda %400 artışla takip etmektedir (Royse, 1992). Son 10 yıllık süre içinde *Auricularia*, *Lentinula* ve *Pleurotus* türlerinin üretim artışı %300-400 iken yaygın olarak üretimi yapılan *Agaricus bisporus* mantarının artışı %60'larda olduğu görülmektedir. Genel olarak bakıldığında dünyada ve ülkemizde kültür işlemleri kolay yapılabilen yemeklik mantarların üretimi protein açığının kapatılmasında büyük öneme sahiptir (Şen vd., 2010).

Çizelge 1.1. Ülkelerin yıllara göre mantar üretim miktarları (yıl/ton)*

Ülkeler	2000	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Çin	2400000	3400000	3675000	4060000	4702355	4672776	4826000	5658972	6527965	7068102
İtalya	72492	88361	100100	85911	342000	720100	650000	761858	1016886	792000
ABD	464071	467055	470172	432890	448581	437394	432399	469832	495844	487986
Hollanda	265000	245000	235000	240000	255000	230000	266000	304000	307000	323000
Polonya	113479	160000	153497	180000	185000	199148	230000	220000	220000	220000
İspanya	63254	137764	135419	131974	133548	131000	133000	146100	147400	149700
Fransa	203811	138541	115846	162450	29936	113851	119346	115696	116602	104621
İran	16000	27908	28000	28000	45000	60000	74000	82500	87675	87624
Kanada	80241	80071	87631	73260	79990	65550	72930	78930	87624	81788
İngiltere	89900	74000	68000	71500	70200	69400	69300	70740	78580	79500
Japonya	67224	66000	65000	67000	67500	63084	59550	60180	61500	61500

*FAO(2015)

Türkiye kültür mantarı üretimine 1960'lı yıllarda başlamıştır. Ancak bu üretimin ticari olarak önem kazanması 1990'lı yıllara uzanmaktadır. Türkiye'nin mantar üretim verileri 1982 yılından itibaren kaydedilmeye başlamış olup (Şekil 1.2), tüketim miktarı 2014 yılına kadar artış göstermiş 2014 yılında bir miktar azalmıştır (Çizelge 1.2). Son 5 yıla kadar Türkiye'de *Agaricus* cinsi mantarın kültürü yapılıp ticari olarak üretilmektedir. Ancak son yıllarda *Agaricus* cinsi %86 ile birinci sırada iken, *Pleurotus* türleri %10 oranı ile ikinci sırada gelmektedir. *Pleurotus* türlerinin ticari boyutta üretimi 2010 yılından sonra hız kazanmıştır. Orman ve Su İşleri Bakanlığı ve Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının ortak yürüttükleri proje çalışmasına göre gelecek yıllarda *Pleurotus* türlerine, özellikle *Pleurotus ostreatus* türünün farklı kompostlar kullanılarak üretime elverişli yapısından dolayı, talep artışı olacağını ön görülmektedir (Pekşen, 2014).



Şekil 1.2. Yıllara göre Türkiye mantar üretim miktarı (FAO, 2015; TÜİK, 2015)

Çizelge 1.2. Türkiye'de kültür mantarı tüketim miktarları (Eren vd., 2016)

Yıllar	Tüketim miktarı (g/kişi)
1983	36,8
1987	48,7
1991	53,5
1995	127,5
2000	327,3

Çizelge 1.2. Türkiye'de kültür mantarı tüketim miktarları (Eren vd., 2016) (devam)

2005	430,0
2010	591,5
2012	647,9
2014	579,2

Yenilebilen makrofunguslar arasında bulunan *P. ostreatus* türü baş kısmı istiridyeye benzediği için halk arasında çoğunlukla istiridye mantarı adıyla bilinir. Ayrıca değişik yörelerde kayın mantarı, kulak mantarı, ağaç mantarı, kavak mantarı, ladin mantarı, ceviz mantarı isimlerini de alır. Genç örneklerde şapka kısımları sapsız tatlı kaşığı büyüklüğündedir ve olgunlaştıkça yelpaze şeklini alır. Geliştiği bölgede üst üste merdiven şeklinde görülür. Yetiştiği yerin güneş veya gölge durumuna bağlı olarak rengi yeşilimsi griden açık kahveye kadar değişebilir. Genç mantarlarda lameller beyaz, olgunlarda sarımsı renk alır. Spor izleri soluk leylak rengindedir. Sporları üzerinde siyah çıkıntılar bulun durup elips şeklindedir ve ucunda hafif çıkıntı vardır (Kaşık, 2010).



Şekil 1.3. *P. ostreatus*'un doğal ortamındaki görüntüsü (M. Yamaç)

Yüksek besin değeri olan *P. ostreatus*, 70-76 g/100 g karbohidrat, 19-35 g/100 g protein, 4-20 g/100 g lif, az miktarda Ca, K, Mg, Na, P, Cu, Fe ve Mn mineralleri ve B1, B2, B12, niyasin, folik asit ve askorbik asit vitaminlerini içerir (Mattila vd., 2001; Rabinovich vd., 2007). İçerdiği lovastatin nedeni ile de tıbbi açıdan önemli bir mantardır. Lovastatin tıpta kolestrol düşürücü ilaçların içinde etken maddesi olarak yer almaktadır.

P. ostreatus et ve baklagillere eşdeğer bir protein içeriğine sahiptir. İnsan vücudu için gerekli olan demir fosfor ve kalsiyum gibi mineral tuzlar sığır ve tavuk etine göre iki kat daha fazladır. İçeriğinde düşük miktarda nişasta, yağ ve kalori bulunduğu için obezite, şeker ve hipertansiyon hastalarına, çok az miktarda sodyum içermesinden dolayı da kalp rahatsızlığı olanlara tavsiye edilmektedir. Antibiyotik, antiviral, bağışıklığa etkisi, iltihaplanmayı engelleyici ve kanseri engelleyici aktivitesi nedeniyle çok sayıda tedavide kullanılmaktadır (Pekşen, 2015). *P. ostreatus* türleri yüksek derecede lovastatin üretirler, doğal kolesterol düşürücü yeteneğiyle önemli bir gıdadır (Atlı vd., 2013).



Şekil 1.4. *P. ostreatus* bazidiyokarp (M. Yamaç)

Fungusların yaşam döngülerinde hem eşeyli hem eşeysiz üreme evresi görülür ve sınıflandırılmasında yaşam döngülerinde oluşturdukları eşeyli üreme evrelerindeki yapılar baz alınır (Moore-Landecker, 1996). Ancak bazı funguslarda eşeyli üreme yapıları henüz belirlenememiş ya da tamamen ortadan kalkmış olabilir. Bundan dolayı günümüzde iki çeşitte sınıflandırılmıştır. Bunlardan ilki telomorfik sınıflandırma; fungusların yaşam döngülerinin eşeyli evrelerinde oluşturdukları fruktifikasyon yapıları, eşeyli sporları ve tallus yapıları kriter alınarak gerçekleştirilen sınıflandırma, ikincisi ise anamorfik sınıflandırma; eşeyli üreme yapıları tespit edilemeyen fungusların, tallus yapıları ve eşeysiz sporları göz önüne alınarak sınıflandırma şeklidir (Sneh vd., 1991).

Anamorfik sınıflandırmada kullanılan yöntemler gözleme dayalı olması, fazla zaman alması ve hata payının yüksek olması nedeniyle çok güvenilir değildir. Hatta bu sınıflandırma kullanılarak aynı taksona farklı isim, farklı organizmalara da aynı isim verilmesine neden olmuştur. Bu tür karışıklıkların önlenmesi için günümüzde yaygın olarak moleküler teknikler yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler yöntemlerin populasyonun belirlenmesi için morfolojik veya fenotipik yöntemlerden daha kesin sonuçlar elde edildiği ortaya çıkmıştır. Evrimsel değişikliğin ilk görüldüğü molekül olan DNA ile yapılan çalışmalar daha hızlı ve güvenilir sonuç verdiği için bu yöntemde ağırlıklı olarak kullanılmaktadır (Taylor vd., 2000).

Biyolojik sınıflandırmanın amacı organizmaların birbirleri arasındaki bağlantının belirlenmesi ve arasındaki evrimsel geçmişin belirlenmesi olarak ifade edilebilir. Son 50 yılda yapılan en önemli gelişmelerden biri, sistematik çalışmalarıyla tüm yaşam formlarının tek bir filogenetik ağaçla birleştirilmesidir (Lipscomb, 1998).

Fungal sistematikte yaygın olarak kullanılan yöntemlerin başında PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gelmektedir. Bu yöntem fungalsuşların, türlerin ya da daha üst taksonların tanımlanmasında kullanılır. PZR çalışmaları ile elde edilen bilgiler doğrultusunda taksonlar için spesifik oligonükleotid primerlerin tasarlanması mümkün olmuştur (Dieffenbach vd., 1993).

Günümüzde populasyon varyasyonlarının belirlenmesinde morfolojik veya diğer fenotipik yöntemlerden daha faydalı olan genetik yöntemler kullanılmaktadır. Ribozomal RNA'ların kodlandığı genler PZR amplifikasyonu için seçilecek bölgenin özellikleri (Bruns ve Gardes, 1993) dikkate alındığında kapsamlı bir şekilde analiz edilebilirler. rRNA genlerinin kodlandığı DNA dizilerinin populasyonlarda taksonomik ilişkilerin ve genetik varyasyonun belirlenmesinde geniş oranda kullanılmaktadır.

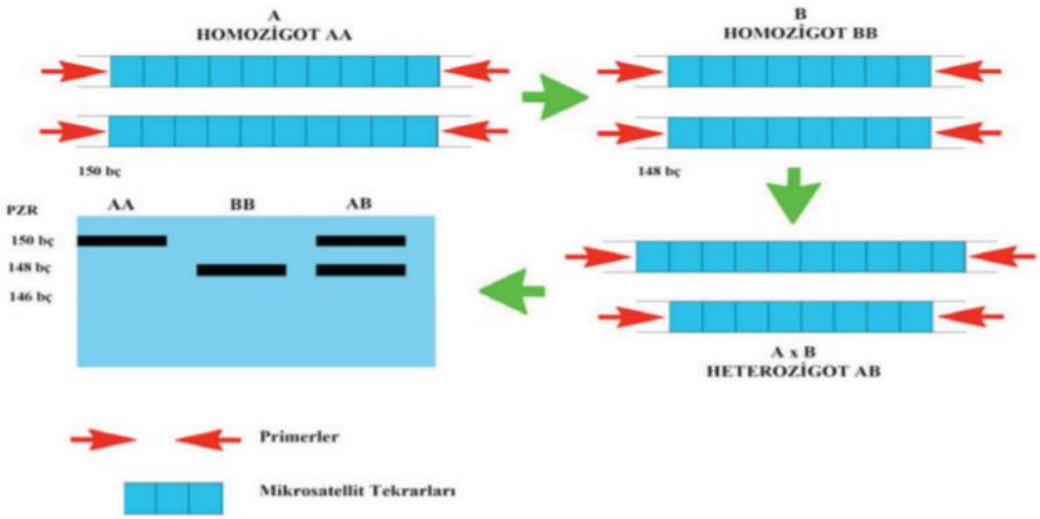
Son yıllarda DNA üzerinde yapılan çalışmalarda DNA'nın bazı baz bölgelerinin tekrarladığı belirlenmiştir. Özellikle karmaşık ökaryot genomlarının büyük bir kısmı, çok sayıda tekrarlanan ve kodlanmayan DNA dizilerinden oluşur. Bunlar DNA'da çok sayıda ardışık halde tekrarlardan oluşan dizilerdir. Ardışık halde bulunan diziler transkribe edilmemesi ve proteine çevrilememesine karşın kromozomda önemli yere sahiptirler. Bunlar; 100-6500 baz çifti tekrarından oluşan klasik satellitler, 10-20 baz çifti tekrarından oluşan minisatellitler ve 2-6 baz çiftinden oluşan mikrosatellitlerdir (Passarge, 1995).

Mikrosatellitler populasyon ve bireyler arasındaki farklılıkların tespiti için kullanılabilen belirteçlerdir (Bruford and Wayne, 1993). Basit baz dizileri olan mikrosatelitler (SSRs: simple sequence repeats) kodlama yapan ve kodlama yapmayan bölgelerde bulunan, bireyden bireye farklılık gösteren, tekrar sayısı değişken tekrarlı DNA dizileridir (Tautz, 1989). Yüksek seviyede polimorfik olan mikrosatelitler doğal popülasyonların genetik yapısını incelemek için kullanışlı belirteçlerdir (Toro vd., 2009). Popülasyonların genetik yapısı belirlenerek evrimsel geçmişinin belirlenmesi ve evrim geçirme potansiyelinin tespit edilmesine olanak sağlar (Frankham vd., 2004). Yüksek oranda mutasyon özellikleri ve PZR'a dayalı teknikler arasında populasyon ve bireyler arasındaki farklılıkları belirlemek açısından diğerlerine göre daha güvenilir ve daha kesin bilgi vermektedir (Ramamoorthi vd., 2009). Mikrosatelitlerin ko-dominant yapı göstermeleri belli lokus için bireylerin genotiplerini saptayabilme ye olanak sağladığı için populasyonların genetik çalışmalarında önemli rol oynar (Jayaraj vd., 2009).

Genetik belirteç olarak kullanılan mikrosatellitler ülkemizde ve dünyada farklı örneklerde de kullanılmıştır. Bunlardan bazıları ülkemizde üreticiliği yüksek olan çilekte hastalığa neden olan fungusların belirlenmesi için, populasyonun genetik çeşitliliğinin

tespit edilmesi ekonomik açıdan zararlara sebep olan funguslara karşı tedbirlerin alınması için oldukça önemlidir (Ün., 2015). Yirminci yüzyılda özelikle ıslah hayvanları ile ilgili çalışmalarda istatistik çalışmaları kullanılmaktaydı. (Beuzen vd., 2000). Günümüzde ıslah hayvanlarında özellikle hayvansal üretimde yüksek üretim yapabilmek için, hayvanların bireysel olarak tanımlanması gerekmektedir. DNA'da yüksek polimorfizim özelliği gösteren mikrosatellitler populasyonların tanımlanmasında, pedigri analizlerinde, hayvansal ürünlerin orjinlerinin belirlenmesinde, gen fonksiyonlarının belirlenmesinde, koruma programlarında genetik yapının korunup korunmadığının kontrolünde, kimlik tanımada, evrim hakkındaki bilgilerin ortaya çıkarılmasında veseleksiyonda kullanılmaktadırlar (Yılmaz vd., 2012).

Bir populasyon genetiğinin araştırılmasında kullanılan mikrosatellit yönteminde, sırasıyla PZR ve agaroz jel elektroforez yöntemi uygulanmasının ardından jelde heterozigot ve homozigot bireylere ait bantlar görülür. Molekül ağırlıklarına göre oluşan bantlar homozigot bireylerde tek, heterozigot bireylerde ise çift bant olarak görülür (Fatima., 2006; Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Homozigot ve heterozigot bireylere ait canlıların jel elektroforez görüntüsü

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen *Pleurotus ostreatus* türüne ait örneklerin genetik yapısı mikrosatellit belirteçleri kullanılarak ortaya koyulacaktır. Çalışmada mikrosatellit belirteçlerinin kullanılması, *P. ostreatus* türünün Türkiye

genelindeki genetik çeşitliliğinin belirlenmesi ve evrimsel geçmişi hakkında bilgi verecektir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Mikoloji bilimi, çok uzun dönemler boyunca ağırlıklı olarak morfolojik kriterlerin kullanımına bağlı kalmış durumdadır. Bu bilim dalında uygulanan moleküler biyolojik temelliyöntemlerinilklerinden biri White ve arkadaşlarının (1990) çalışmasıdır. Çalışmada rDNA'nın direkt çoğaltılarak ve nükleotid dizileri belirlenerek fungusların filogenetik ve taksonomik ilişkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Belirlenen nükleotid dizileri hem değişken hem de korunmuş bölgeleri içerdiği için, farklı taksonomik seviyedeki organizmaların karşılaştırma ve ayrılmasına olanak sağlanmıştır.

Alternaria radicina ile *A. carotiincultae* arasındaki filogenetik akrabağlığı Park ve ark. (2008) tarafından rDNA'nın sekans analizi, morfoloji, RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) analizleri ile incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda *A. carotiincultae*'nin *A. radicina* ile yakın ilişkili olduğu belirlenmiştir.

ISSR ve SRAP (Serve Asthma Research Program) belirteçleri kullanılarak, Tang ve ark. (2010) tarafından, Çin'de 34 adet *Auricularia auricularia* türüne ait örnek arasındaki DNA polimorfizmini belirlemiştir. 11 SARP primeri ile %96,1'i polimorfik olan 154 DNA fragmenti bunun tam tersine 30 ISSR primeri ile %96,9'u polimorfik olan toplam 129 DNA fragmenti tespit edilmiştir. Her iki yönteminde ayrım için son derece etkili olduğu belirtilmiştir. Çalışmada ISSR, SRAP ve ISSR/SARP kompleksleri ile birlikte UPGMA metodu kullanılarak filogenetik ağaçlar yapılmıştır. Elde edilen veriler ileride yapılacak olan ticari önemi olan mantarlardan bioaktif ürün elde etmeyi ve *A. auricula* ıslahını büyük ölçüde kolaylaştıracaktır.

Nüklear büyük alt birim ribozomal DNA dizilerini kullanılarak Moncalvo ve ark. (2000) *Agaricales* takımı içerisindeki mantarların filogenetik akrabalıklarını değerlendirmişlerdir. Çalışmada akrabalık ilişkilerini ortaya koymak için eşit ağırlıklı MP (Microprinting), ML (Maximum Likehood) ve NJ (Neighbor Joining) yöntemlerini içeren

birkaç metot kullanılmıştır. Çalışmanın Agaricales takımı için yapılacak olan sistematik çalışmalar için bir temel olacağı belirtilmiştir.

Araştırmaları için *Agaricus bisporus*'un yavaş büyüyen 10 protoklonlarını kullanan Nazrul ve ark. (2000), 40 ISSR primeri kullanmıştır. Çalışma sonunda kullanılan primerlerin %48,93'ü polimorfik olan 78 tekrarlanabilir parça elde edilmiştir ve morfolojik karakterler ile birlikte ISSR yönteminin kullanılması polimorfizmin daha çabuk ve daha kolay ayırt edilebileceği göstermiştir.

Ektomikorizal bir mantar olan *Tricholama matsutake* ile Lian ve ark. (2003)'nın yaptığı çalışmada, bitki türlerinin mikrosatelit belirteçlerini geliştirmek için ISSR yöntemi uygulanmıştır. Bu çalışmada geliştirilen 6 polimorfik belirteç ile beklenen heterozigotluk oranı 0,098'den 0,803'e değişebileceği hesaplanmıştır.

Çin'de toplanan 128 *Monilinia fructicola* izolatlarını araştırmak için Fan ve ark. (2010) ISSR yöntemini kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlar Yeni Zellanda ve Kaliforniya'daki örnekler ile karşılaştırılmıştır. 72 DNA bandının %87,5'inin polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda Çin bölgesine ait populasyonlar ile Kaliforniya bölgesine ait olan popülasyonların büyük ölçüde birbirine benzediği ancak küçükte olsa farklılıkların olduğu belirlenmiştir.

Guan ve ark. (2008), *Agaricus* türlerinin ticari olarak üretiminde önemli bir artış olduğunu ancak taksonomisi üzerinde bir fikir birliğinin olmadığını belirtmişlerdir. *Agaricus*'un sınıflandırılması için hızlı ve güvenilir bir metoda ihtiyaç duyulmuştur. Bu çalışmada Çin'deki 12 ticari *Agaricus* türleri arasındaki polimorfizmi ortaya çıkarmak için 6 ISSR primeri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda %80,6'sı polimorfik olan 124 bant elde edilmiştir.

Zhang ve ark. (2007), 2'si doğal ortamdan toplanmış 15'i de kültür ortamında yetiştirilmiş toplam 17 *Lentinula edodes* türünü ISSR yöntemi ile analiz etmişlerdir. Çalışmada kullanılan 32 DNA ürünlerinden 31'i (%96,9) polimorfik olarak değerlendirilmiştir. Yapılan ISSR analizine bağlı olarak 17 türün birbirinden ayırt

edilebileceğini ve suşun kendi içinde iki grupta gruplandırılabileceğini göstermiştir. Doğal ortamdan toplanan iki *L. edodes* türü arasındaki polimorfizmin yüksek olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu türe ilişkin bir diğer çalışmada Fu ve ark. (2010) RAPD, SRAP ve ISSR belirteçlerini kullanmışlardır. Araştırmada 16 RAPD, 23 SRAP ve 5 ISSR primeri kullanılmıştır. RAPD primerleri ile %58,8'i, SRAP primerleri ile 56,3'ü ve ISSR primerleri ile %73,5'i polimorfik sırasıyla 138, 144 ve 77 bant elde edilmiştir. UPGMA analizi ile her biri için dendogram oluşturulmuş ve bu üç dendogram 23 bireyden analizi yapılan *L. edodes* türünün 3 veya 4 grup içinde sınıflandığını göstermiştir.

Auricularia polytricha'nın 19 suşu arasındaki genetik farklılı ortaya çıkarmak için Yu ve ark. (2008), ISSR ve SRAP olmak üzere iki farklı moleküler belirteç kullanmışlardır. 14 SRAP primeri ile toplam 459 (%95,9), 13 ISSR primeri ile toplam 202 (%99,0) polimorfik bant elde edilmiştir. Parsimoni metodu ile her iki analize bağlı olarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur ve bu iki ağaç 19 *A. polytricha* suşunun 4 veya 5 grup içinde dağıldığını göstermişir. Çalışmanın sonunda *A. polytricha*'nın yüksek seviyede genetik çeşitliliği olduğunu ve diğerleri arasında akrabalık ilişkilerini ortaya çıkarmak için iki yönteminde uygun olduğunu göstermiştir.

Belirtilen örneklerde ifade edilen fungus türleri bir kenara bırakılırsa, mikrosatellitler makrofungusların genetik çeşitliliğini belirlenmek amacı ile günümüze dek oldukça sınırlı bir kullanıma sahiptir. Bu çalışmanın konusunu oluşturan *Pleurotus ostreatus* türünün Türkiye'de dağılım gösteren örneklerinin genetik çaşitliliğine ilişkin herhangi bir veri bulunmamaktadır. Doğal olarak moleküler belirteç olarak mikrosatellitlerin kullanımı da söz konusu değildir. Belirtilen nedenlerle bu çalışmada Türkiye'de dağılım gösteren *Pleurotus ostreatus* türüne ait örneklerin genetik çeşitliliği belirteç olarak mikrosatellit kullanılarak araştırılmıştır. Bu anlamda literatürde var olan bir boşluğun doldurulması amaçlanmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Makrofungus Örneklerinin Eldesi

Çalışmada Türkiye'nin farklı illerinden elde edilen *P. ostreatus* bazidiyokarp veya bu bazidiyokarplardan elde edilen dikaryotik misel kültüleri kullanılmıştır (Şekil 3.1) Bazidiyokarp örneklerinden bir kısmı farklı araştırıcılar tarafından bu çalışmada kullanılmak üzere tarafımıza sunulmuştur (Çizelge 3.1). Ayrıca, ülke dışından temsilci olarak seçilen 4 tane (Slovenya, Yunanistan (2), ve Çin) dikaryotik misel örnekleri de çalışmaya dahil edilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan *P. ostreatus* bazidiyokarp örneklerinin temin edildiği iller

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *P. ostreatus* örneklerinin kod ve kaynakları

Örnek Kodu	Lokalite	Örneğin Kaynağı
1	Diyarbakır	Abdunnasır YILDIZ
2	Adana	H. Hüseyin DOĞAN
3	Burdur	Halil SOLAK

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *P. ostreatus* örneklerinin kod ve kaynakları (devam)

4	Kütahya	Hakan ALLI
5	Antalya	Halil SOLAK
6	Konya	H. Hüseyin DOĞAN
7	Sivas	İbrahim TÜRKEKUL
8	Sakarya	H. Hüseyin DOĞAN
9	HK 35 Ticari Suşu	Agroma Mantar
10	Bursa	H. Hüseyin DOĞAN
11	Yalova	Halil SOLAK
12	Osmaniye	Halil SOLAK
13	Kastamonu	Mustafa YAMAÇ
14	Tokat	İbrahim TÜRKEKUL
15	Karabük	Mustafa YAMAÇ
16	Yozgat	İbrahim TÜRKEKUL
17	Ağrı	Kenan DEMİREL
18	Karaman	Kenan DEMİREL
19	Erzurum	Kenan DEMİREL
20	Erzincan	Kenan DEMİREL
21	Eskişehir	Mustafa YAMAÇ
22	Bolu	İbrahim TÜRKEKUL
23	Van	Kenan Demirel
24	Mersin	H. Hüseyin DOĞAN
25	Artvin	Kenan DEMİREL
26	Bayburt	Kenan DEMİREL
27	Isparta	Halil SOLAK
28	Batman	Kenan DEMİREL
29	Aydın	Hakan ALLI
30	Çin	Ticari Preparat
31	Yunanistan (Andros Adası)	George ZERVAKİS
32	Yunanistan (Peloponnese)	George ZERVAKİS

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *P. ostreatus* örneklerinin kod ve kaynakları (devam)

33	Diyarbakır/Kontrol	Kenan DEMİREL
34	Adana	H. Hüseyin DOĞAN
35	Karaman	H. Hüseyin DOĞAN
36	Eskişehir	Mustafa YAMAÇ
37	Adana	H. Hüseyin DOĞAN
38	Antalya	Hakan ALLI
39	Karaman	H. Hüseyin DOĞAN
40	Antalya	Halil SOLAK
41	Adana	H. Hüseyin DOĞAN
42	Karaman	H. Hüseyin DOĞAN
43	Slovenya (Ljubljana)	Miha HUMAR
44	Malatya	Özfer YEŞİLADA
45	Kars	Kenan DEMİREL
46	Samsun	Aysun PEKŞEN
47	Trabzon	Ertuğrul SESLİ

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

A. Besiyerleri

Çalışma süresince kullanılan tüm besiyerleri, aksi belirtilmedikçe besiyeri içeriğinin distile suda çözülüp otoklavda 1,2 atm basınç ve 121 ^{o}C sıcaklıkta 15 dakika süre işlem görmesi ile steril edilerek kullanılmıştır.

Besiyeri 1: Potato Dextrose Agar (PDA)

Ticari olarak alınan besiyerinden 39 g tartılarak 1000 ml distile suda çözme yolu ile hazırlanmıştır. PDA besiyeri kültüre alınan makrofungus izolatların misel gelişmi sağlanmıştır.

Besiyeri 2: Malt Extract Agar (MEA)

Malt Ekstrakt	30,0	g
Mikolojik Pepton	5,0	g
Agar-agar	15,0	g
Distile su	1000	ml
pH	5,4± 0,2	

Kültüre alınan makrofungus izolatlarının misel gelişmi için kullanılmıştır.

Besiyeri 3: Potato Dextrose Broth (PDB)

Potato infusion	4,0	g
D(+) glucose	20,0	g
Distile su	1000	ml
pH	3,5± 0,2	

Makrofungus izolatlarından inokulandt eldesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 3: Malt Extract Broth (MEB)

Malt Ekstrakt	30,0	g
Mikolojik Pepton	5,0	g
Distile su	1000	ml
pH	5,4± 0,2	

Makrofungus izolatlarının üretilmesinde kullanılmıştır.

B. Çözeltiler

Çözelti 1: Cetil Trimethyl Ammonium Bomide Buffer (CTAB)

Tris	2,42 g
NaCl	8,2 g
Na-EDTA	2 g
CTAB	2 g
Ultra saf su	100 ml
pH	7,5 ± 2

Çözelti içeriğinde yer alan maddeler tartılıp 100 ml su içerisinde çözdürülmüştür. Na-EDTA ve CTAB'ı çözmek için çözelti hafifçe ısıtılmıştır. Çözeltinin 1N HCl ile ayarlanmıştır. Çözelti hazırlandıktan sonra 121 ºC'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

Çözelti, örneklerin total DNA izolasyonunda hücrelerin liziz işlemi sırasında nükleazların inhibisyonu ve proteinlerin nükleik asitlerden ayrılması işlemi için kullanılmıştır.

Çözelti 2: Tris-EDTA Buffer

Tris	2,42 g
Na-EDTA	2 g
Ultra saf su	100 ml
pH	8,0 ± 2

Çözelti içeriğinde yer alan maddeler tartılıp 100 ml su içerisinde çözülmüş ve121 ºC'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

Çözelti total DNA izolasyonu son aşamasında DNA'ların çözünmesinde, DNAz'ların inhibisyonu ve ortam pH'sını dengelemek amacı ile kullanılmıştır.

Çözelti 3: 10X TBE (Tris-Borik asit_EDTA)

0,89 M Tris-Baz	108	g
0,88 M Borik asit	55	g
0,02 M EDTA.2H2O	9,3	g
pH	8,13 ± 8,30	

Bu çözelti elektroforez sırasında kullanılan bir tampondur. İyonik güç sayesinde PCR ürünlerinin jel üzerinde hareket etmesini sağlamaktadır. Maddeler tartılıp distile su ile 1L'ye tamamlanır. 1N HCL ile pH değeri 8,13 ile 8,30 arasında ayarlanmıştır.

Çözelti 4: 6X Loading Dye

%0,015 Bromfenol Mavisi
%0,015 Xylene Cyanol FF
%30 Gliserol

Çözeltinin içinde yer alan maddeler belirtilen oranda hazırlanarak son hacim 100ml olacak şekilde distile su ile tamamlanmış ve çözülmüştür. Çözelti genomik DNA ve PCR ürünlerinin elektroforez işlemi sırasında hazırlanan jelin kuyucuklarına çökmesi ve jelde hareketinin takibi için kullanılmıştır.

Çözelti 5: % 1'lik Agaroz Jel

Agaroz	1	g
SafeViewTM Classic		
(AppliedBiologicalMaterials, Inc.)	5 µl	
1XTBE	100	ml

1gram agaroz üzerine 100 ml 1X TBE eklendikten sonrakarıştırılarak ısıtılıp agaroz çözülmüştür. Biraz soğuması beklenerek içerisine SafeView TM Classic (Applied Biological Materials, Inc.) eklenmiş ve homojen şekilde dağılması sağlanmıştır. Daha

sonra hazırlanan karışım elektroforez jel tankına dökülmüş, taraklar yerleştirilmiş ve donmaya bırakılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kültür Çalışmaları

3.2.1.1. Katı Kültür Çalışmaları

Pleurotus ostreatus'un fruktifikasyonlarından doku parçaları alınarak potato dextrose agar (PDA) ve malt extract agar (MEA) besiyerlerine inoküle edilerek 27˚C'de 7 gün inkübe edilmişitir. Sekonder miselyumun ekimi besiyerinin merkezine yapıldıktan 48 – 96 saat sonra misel gelişimi gözlenmiştir. Miselyum gelişimi besiyerinin orta yüzeyi üzerinde değil petri kabının kenarında yoğunlaştığı gözlenmiştir. Pigmentasyon gözlenmemiştir. Yedi günlük inkübasyon sonunda miselyum petri kaplarını tamamen kaplamış ve kolonizasyon tamamlanmıştır.



Şekil 3.2. D100 kodlu *Pleurotus ostreatus* izolatına ait katı besiyerinde dikaryotik misel kültürü

3.2.1.2. Sıvı Kültür Çalışmaları

Gelişimini tamamlayan sekonder misellerden üçer misel diski alınarak potato dextrose broth (PDB) ve malt extract broth (MEB) besiyerlerinde 27˚C 120 rpm'de 7 gün inkübe edilmiştir. Katı besiyerinde olduğu gibi sıvı besiyerinde de pigmentasyon gözlenmemiştir.



Şekil 3.3. M119 kodlu *Pleurotus ostreatus* izolatına ait sıvı besiyerinde dikaryotik misel kültürü

3.2.2. Toplam Genomik DNA İzolasyonu

Elde edilen bazidiokarp veya dikaryotik misel örneklerininin toplam genomik DNA izolasyonu standart CTAB yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Soltis vd., 1991)

3.2.2.1. Dikaryotik Misellerden DNA İzolasyonu

Sıvı besiyerinde misel gelişimlerini tamamlamış izolatlar üzerlerine etiket numaraları verilmiş steril küçük cam kavanozlara steril kürdan yardımı ile alınmıştır. 1 gün -80ºC'de bekletildikten sonar 48 saat liyoflize edilmiştir. Liyoflize edilerek toz haline getirilen izolatlardan 1.5ml'lik ependorf tüpüne 0.05g alınmıştır. Sıvı azot yardımı ile ezilerek mekanik parçalama yapılmıştır. Örnek üzerine 500µl CTAB Buffer (pH 7,5) eklenmiş ve karıştırılmıştır. Buffer ile muamele edilen örnekler 65˚C su banyosunda 1

saatbekletilmiştir. Yine aynı tüpe 500 µl kloroform eklenmiş ve ters düz edilerek 5 dk 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Üstte kalan sulu faz yine etiket numaraları yazılmış temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. 4. ve 5. aşamalar tekrar edilmiştir. Buz üzerinde çalışılan bu aşama, sulu fazın 2 katı kadar hacimde (700 µl) %96'lık soğuk (-20˚C) etanol eklenmiştir. Tüp elde dikkatli bir şekilde karıştırılmış ve DNA'nın prespitasyonu için 1 gece boyunca -20˚C'de bekletilmiştir.Bir gece bekletilen tüpler 4˚C'de 14.000 rpm'de 5 dksantrifüj edilmiştir. Yine buz üzerinde çalışılan bu aşamada supernatant dikkatli bir şekilde atılmış ve pellet üzerine 500µl soğuk (-20˚C) %70'lik etanol ilave edilmiştir. 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve dikkatli bir şekilde supernatant atılarak pellet kurutulmuştur. Kurutulan pellet 50µl Tris-EDTA Buffer (pH8.0)'da çözülmüştür.

3.2.2.2. Kuru Bazidiokarp Örneklerinden DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan diğer kuru bazidiokarp örnekleri, öncelikle tek kullanımlık bistüriler ile küçük parçalara ayrılmıştır. Elde edilen küçük parçalar halindeki örnekler 1.5ml'lik Ependorf tüplerinin içinde sıvı azot yardımı ile parçalanmıştır. Daha sonra Total DNA izolasyonu CTAB yöntemi ile yukarıdaki basamaklar uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Kuru *Pleurotus ostreatus* bazidiyokarp örnekleri

3.2.3. Genomik DNA'nin Kalitesinin ve Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen genomik DNA örneklerinin miktarları Nanodrop Spektrofotometre (Thermo) ile 260 nm dalga boyunda belirlenmiş ve derişimleri hesaplanmıştır.

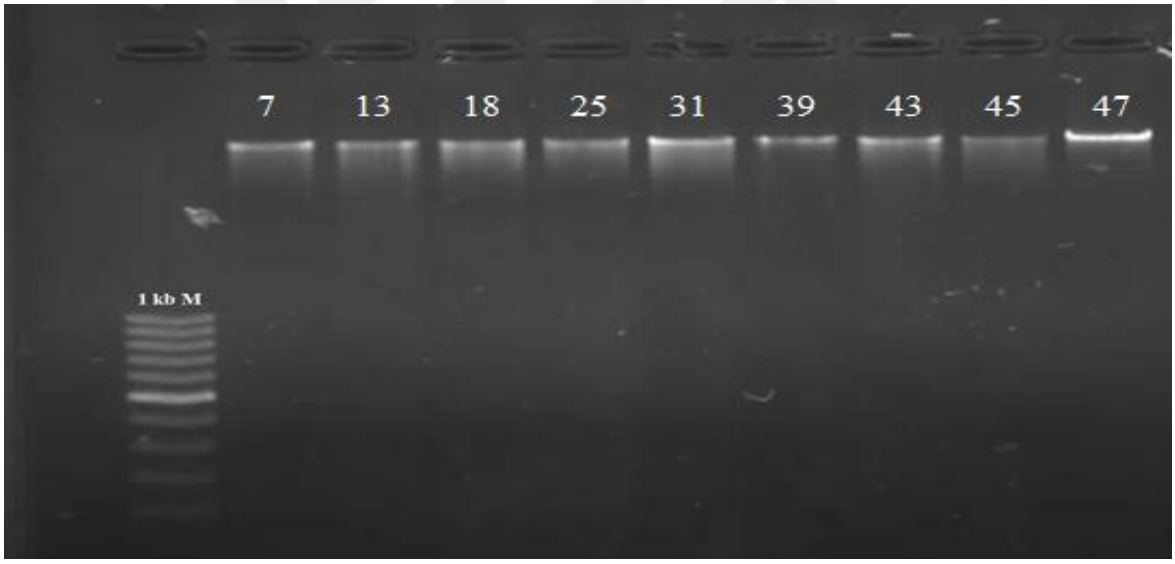
CDNA= OD 260 nm ×SK× 50

OD - Optik Dansite (260 nm'de okunan absorbans değeri).

SK - Sulandırma katsayısı.

50 - 260 nm'de 1 optik dansitenin içerdiği DNA miktarı.

Miktarları belirlenen DNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülerek UV görüntüleme sistemi (UVP- UVGL-58) ile kaliteleri belirlenmiştir (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Total DNA izolasyonu örnekleri

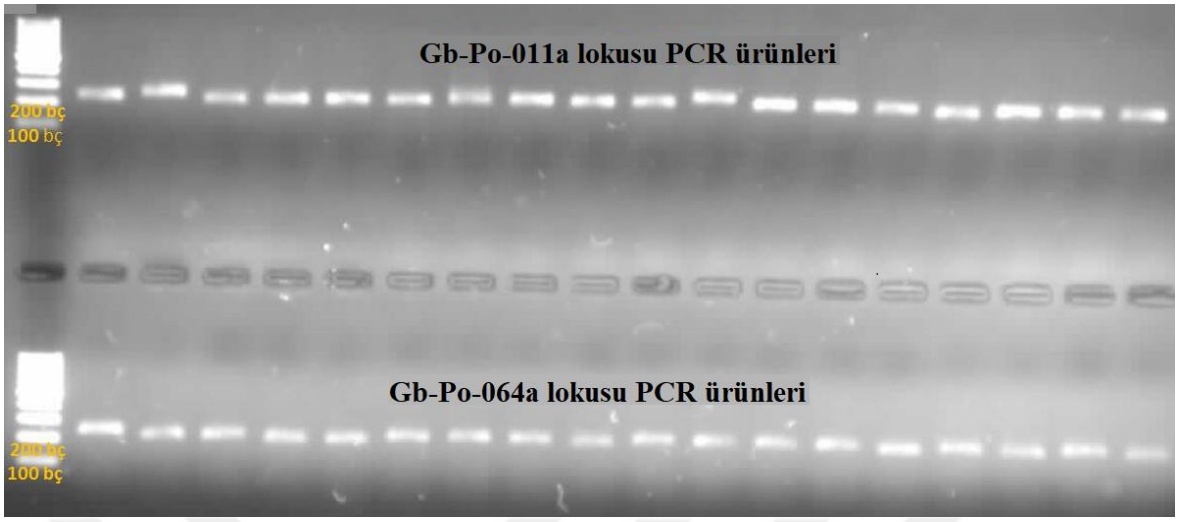
3.2.4. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Daha önceki çalışmalarda *Pleurotus ostreatus* için tanımlanmış dokuz primer lokusu çalışılmıştır (Kyung-Ho., 2009). Fam, Hex ve Tamra floresans boyaları ile 5' uçlarından işaretlenmiş olan oligonükletiler kullanılarak PZR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyonda kullanılan floresans boya etiketi, oligonükleotid dizisi ve baz uzunluğu Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge3.2. *P. ostreatus* örneklerinin analizlerinde kullanılan mikrosatellit lokusları

Lokuslar	Floresans Boya	Oligonükleotid Dizisi	Aralık (bç)
Gb-Po-011a	Hex	5′-AGGGAGGGTATGAGTGTGTA-′3 5′-TTGAGGAGGTGGAAGTTGTA-′3	220–281
Gb-Po-028a	Fam	5′-CATACACGTATTTCTTCCAA-′3 5′-TTTACGAGTGTTTTTGTTAG-′3	180–250
Gb-Po-050a	Hex	5′-GGATGAATCAGTTGTTTGTG-′3 5′-CACCTAGGTATTTCCTGGTA-′3	200–230
Gb-Po-064a	Tamra	5′-CATCTTCTGGGAACGCACAT-′3 5′-ATCCACCCCCAAACGATTGT-′3	98-130
Gb-Po-076	Tamra	5′-CGTTTTCCAGCATTTCAAGT-′3 5′-CATCTCATATTCGTTCCTCA-′3	150-170
Gb-Po-079a	Hex	5′-ACTAGATTCGAGATTCAGTT-′3 5′-AAGGTGGTATGAGCGGTTTA-′3	80-260
Gb-Po-097a	Fam	5′-CCAGTTTCGAGGAGGTCCAC-′3 5′-GCCTTAGCGGATGTGAGGTA-′3	115-140
Gb-Po-115	Tamra	5′-CTCGTCATAACCACGCAGAT-′3 5′-GCAAGGTCTCGATGTCGATC-′3	150-180
Gb-Po-124	Fam	5′-TCCTCTTCCCTCCCATCAAC-′3 5′-GGATCTGCGTGGTTATGACG-′3	160-210

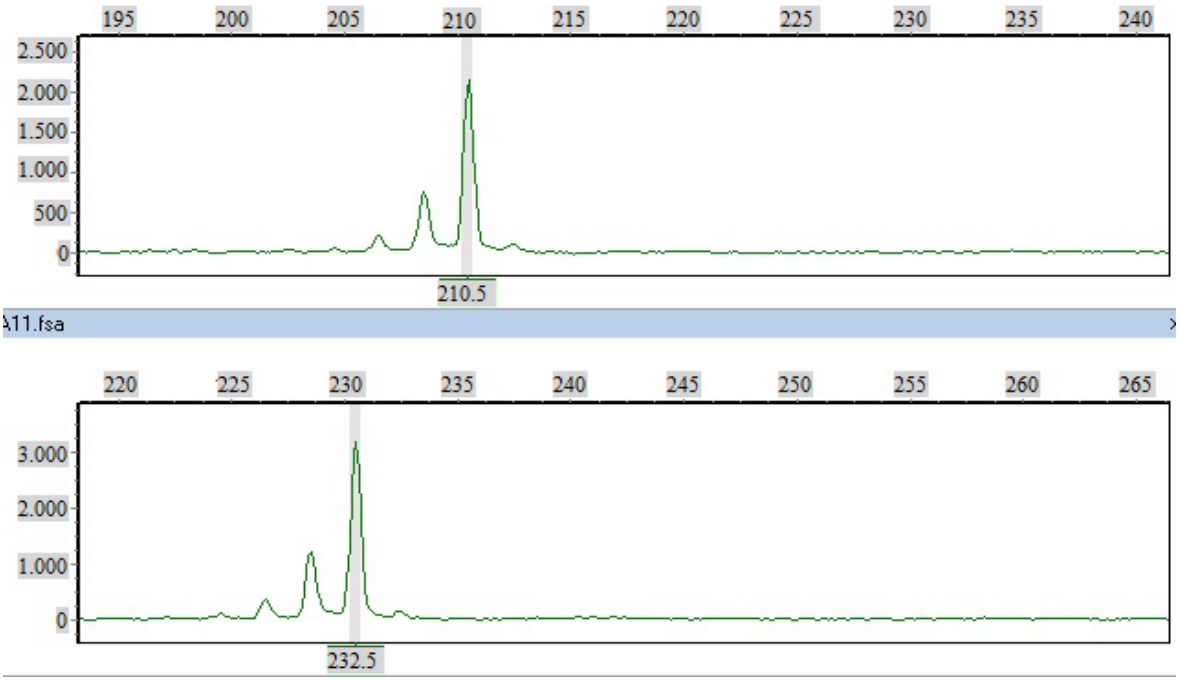
Pleurotus ostreatus için mikrosatellit lokusları son hacimde 2.5 µl Buffer [10x Taq Buffer; 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl2, % 0.01 jelatin; Sigma], 5 µl dNTP karışımı (herbir dATP, dTTP, dCTP, dGTP 0.5 mM; Fermentas, MBI), primer çiftlerinin her birinden 0.3 µl (her biri 20 pmol/µl) 0.1 U/µl Taq polimeraz (5 U/µl; Fermentas, MBI), 1 µl kalıp DNA (100 ng/µl), son hacim 25 µl reaksiyon hacminde steril distile su ile tamamlanarak PZR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltmak için 94˚C 30 sn, 52/55/59/45˚C45 sn (011a, 028a, 079a, 115, 124:52˚C; 64a ve 76:55˚C; 097a:59˚C; 050a:45˚C), 72˚C 45 sn PZR sıcaklık profili 35 döngü boyunca uygulanmıştır. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Gb-Po-011a ve Gb-Po-064 lokusları PCR ürünleri

3.2.5 Mikrosatellit Veri Analizi

ABI 3730 Automated DNA Analyzer (Applied Biosystems) ile *P. ostreatus* mikrosatellit allel büyüklükleri belirlenmiştir. Allel büyüklükleri Genemarker v1.8 (SoftGenetic LLC™) program kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.7. Gb-Po-011a lokus görüntüsü.



Şekil 3.8. Analizlerde kullanılan PCR cihazı

İncelenen örneklerin allel sayısı (k), beklenen heterozigotluk (H_B; gen çeşitliliği) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değeri hesaplanmıştır. Hardy Weinberg dengesinde olup olmadığı ve bağlantı dengesizliğinin varlığı test edilmiştir. Örnek çiftleri arasındaki farklılığı belirlemek için p (olasılık) değerleri Markov Chain randomination (Guo ve Thompson, 1992) ile hesaplanmıştır. Bütün istatiksel analizler Genepop v. 7.0 (Roussset, 2008) kullanılarak hesaplanmıştır.

P. ostreatus örnekleri arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koyabilmek için genetik uzaklık verilerine dayalı olan UPGMA uzaklık ağacı TFPGA (Tools for Population Genetic Analyses) (Version 1.3) (Miller, 1997) ile oluşturulmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Pleurotus ostreatus* Örneklerinin Genetik Yapısı

Ülkemizin farklı illerinden ve bazı diğer ülkelerden elde edilen 43 *Pleurotus ostreatus* izolatında 9 farklı mikrosatellit lokusu çalışılmıştır. Lokusların herbiri polimorfik olduğu anlaşılmaktadır. İncelenen lokusların alel sayıları 4 (Gb-Po-050a) ile 13 (Gb-Po-079a) arasında değişmektedir (Çizelge 4.1). Dokuz lokus için toplamda ortalama alel sayısı 8,89 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. İncelenen lokuslardaki alellerin dağılımı.

Lokuslar	N	Alel Sayısı
Gb-Po-011a	41	7
Gb-Po-028a	43	13
Gb-Po-050a	22	4
Gb-Po-064a	43	5
Gb-Po-076	40	10
Gb-Po-079a	41	13
Gb-Po-097a	42	9
Gb-Po-115	42	7
Gb-Po-124	40	12

Gözlenen ortalama heterozigotluk değerleri en düşük *Gb-Po-050a* ve *Gb-Po-097a* (H_G=0.19) lokuslarında en yüksek *Gb-Po-011a* (H_G=0.86) lokusunda tespit edilmiştir (Tablo 4.2, 4.4, 4.8). Beklenen ortalama heterozigotluk değerleri (gen çeşitliliği) ise en düşük *Gb-Po-050a* (H_B=0.30) lokusunda en yüksek *Gb-Po-097a* (H_B=0.83) lokusunda tespit edilmiştir (Çizelge4.4, 4.8). Toplamda bütün lokuslar için ortalama gözlenen heterozigotluk değeri **H_G=0.43**, beklenen heterozigotluk değeri (gen çeşitliliği) ise **H_B=0.63**'dür. Mikrosatellit lokuslarının toplam alel sıklıkları belirlenmiştir (Şekil 4.1 - 4.9).

Çizelge 4.2. Gb-Po-011a lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (k) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

Gb-Po-011a

N	**k**	**H_G**	**H_B**	**Alel Büyüklüğü**	**Alel Sıklıkğı**
41	7	0.86	0.71	**208**	0.012
				209	0.131
				210	0.405
				226	0.024
				231	0.083
				232	0.333
				253	0.012

Çizelge 4.3. Gb-Po-028a lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (k) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

Gb-Po-028a

N	**k**	**HG**	**HB**	**Alel Büyüklüğü**	**Alel Sıklığı**
43	13	0.60	0.76	**268**	0.024
				279	0.047
				280	0.012
				282	0.214
				284	0.012
				285	0.429
				286	0.012
				287	0.024
				288	0.048
				291	0.107
				296	0.012
				299	0.012
				300	0.048

Çizelge 4.4. Gb-Po-050a lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (k) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

Gb-Po-050a

N	**k**	**H_G**	H_B	**Alel Büyüklüğü**	**Alel Sıklıkğı**
22	4	0.19	0.30	**154**	0.063
				155	0.063
				165	0.844
				169	0.031

Çizelge 4.5. Gb-Po-064a lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (k) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

Gb-Po-064a

N	**k**	**H_G**	H_B	**Alel Büyüklüğü**	**Alel Sıklıkğı**
43	5	0.28	0.43	**199**	0.013
				205	0.013
				209	0.236
				212	0.725
				215	0.013

Çizelge 4.6. Gb-Po-076 lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (k) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

Gb-Po-076

N	**k**	**H_G**	H_B	**Alel Büyüklüğü**	**Alel Sıklıkğı**
40	10	0.52	0.65	**219**	0.012
				228	0.012
				233	0.012
				236	0.143
				237	0.548
				238	0.202
				239	0.012
				240	0.024
				245	0.024
				248	0.012

Çizelge 4.7. Gb-Po-079a lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (k) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

Gb-Po-079a					
N	**k**	**H_G**	H_B	**Alel Büyüklüğü**	**Alel Sıklıkğı**
41	10	0.39	0.61	**288**	0.026
				290	0.013
				291	0.039
				293	0.615
				294	0.077
				296	0.103
				299	0.039
				305	0.051
				308	0.026
				316	0.013

Çizelge 4.8. Gb-Po-097a lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (k) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

Gb-Po-097a					
N	**k**	**H_G**	H_B	**Alel Büyüklüğü**	**Alel Sıklıkğı**
42	9	0.19	0.83	**227**	0.024
				228	0.059
				231	0.345
				232	0.131
				234	0.107
				235	0.155
				238	0.036
				241	0.083
				244	0.059

Çizelge 4.9. Gb-Po-115 lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (k) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

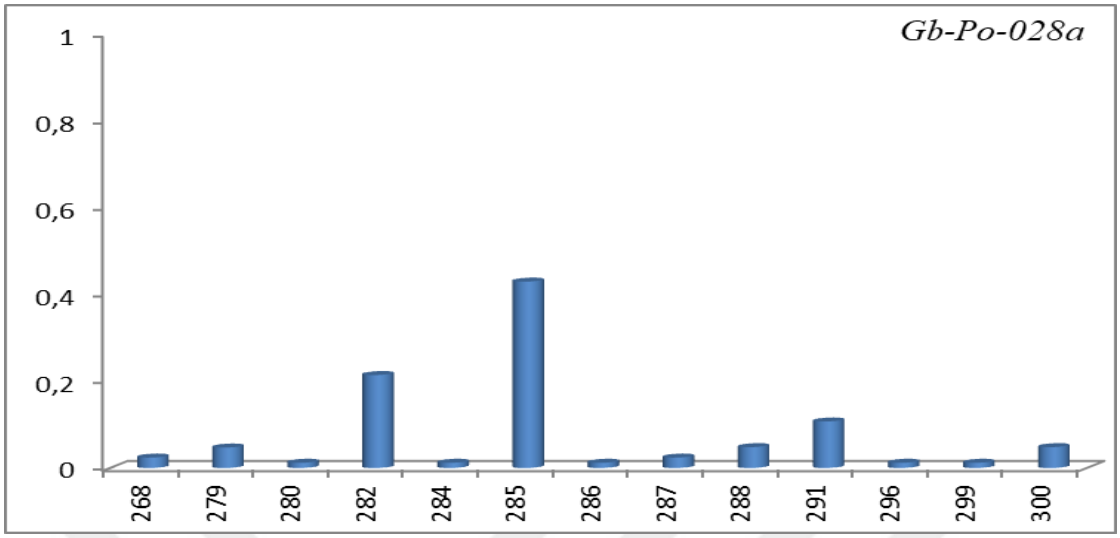
Gb-Po-115

N	**k**	**H_G**	H_B	**Alel Büyüklüğü**	**Alel Sıklıkğı**
42	7	0.22	0.50	**204**	0.024
				210	0.134
				211	0.695
				213	0.049
				214	0.073
				217	0.012
				218	0.012

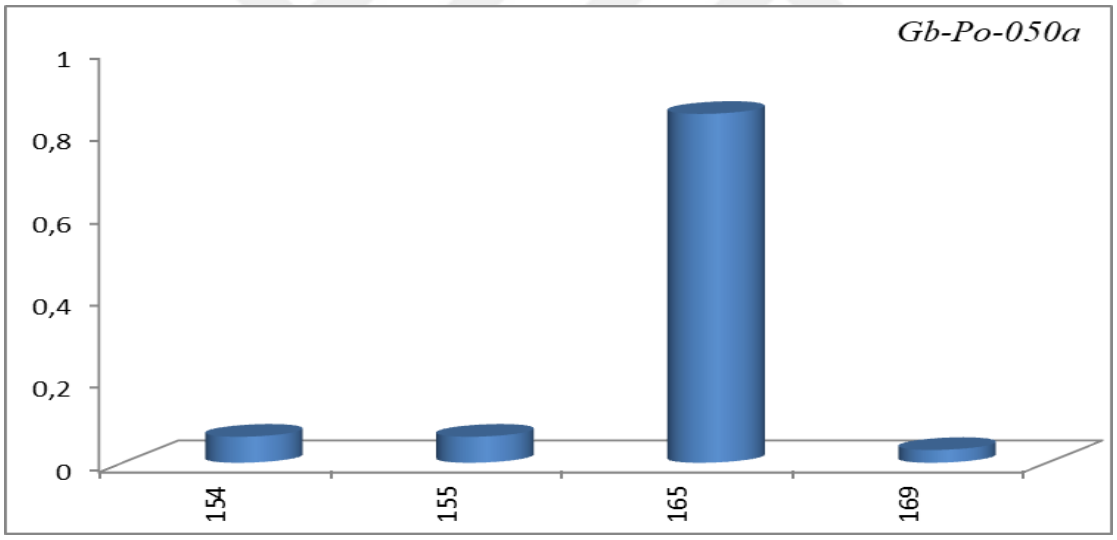
Çizelge 4.10. Gb-Po-124 lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (k) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

Gb-Po-124

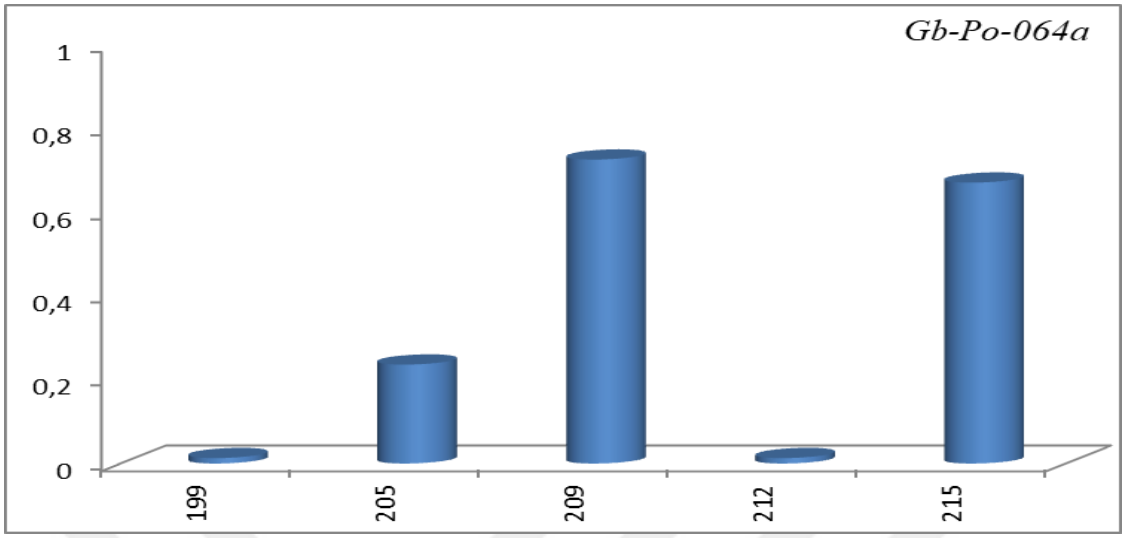
N	**k**	**H_G**	H_B	**Alel Büyüklüğü**	**Alel Sıklıkğı**
40	10	0.48	0.65	**246**	0.013
				248	0.025
				249	0.325
				250	0.025
				254	0.013
				255	0.500
				256	0.050
				261	0.013
				267	0.013
				281	0.025



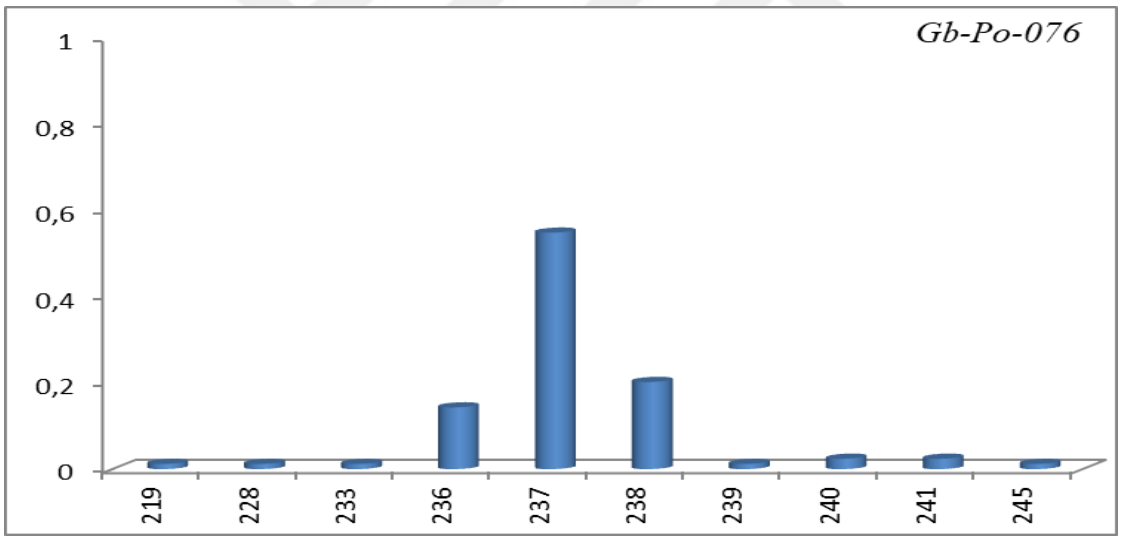
Şekil 4.2. *Gb-Po-028a* lokusu alel ve alel sıklıkları



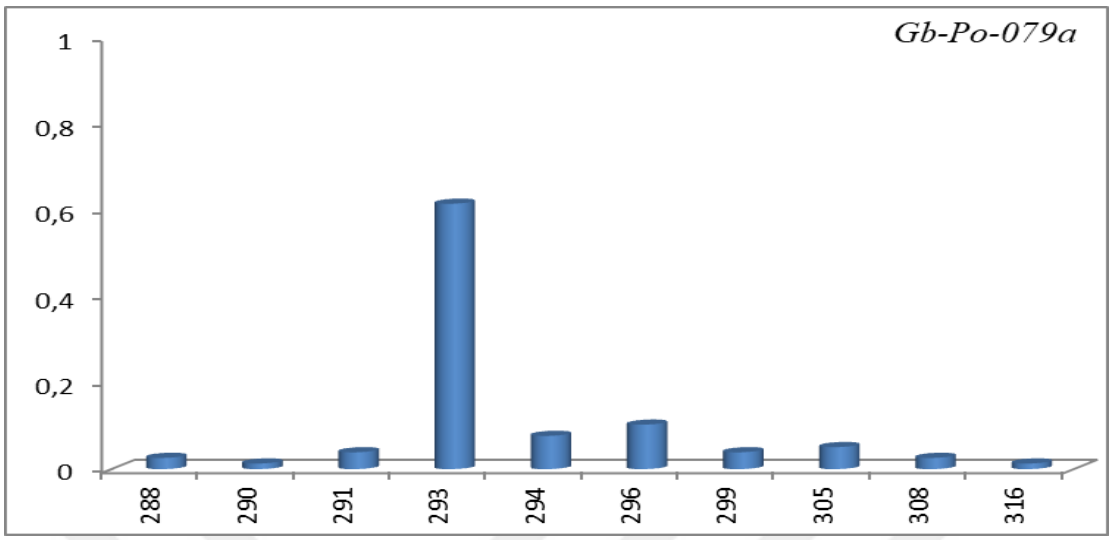
Şekil 4.3. *Gb-Po-050a* lokusu alel ve alel sıklıkları.



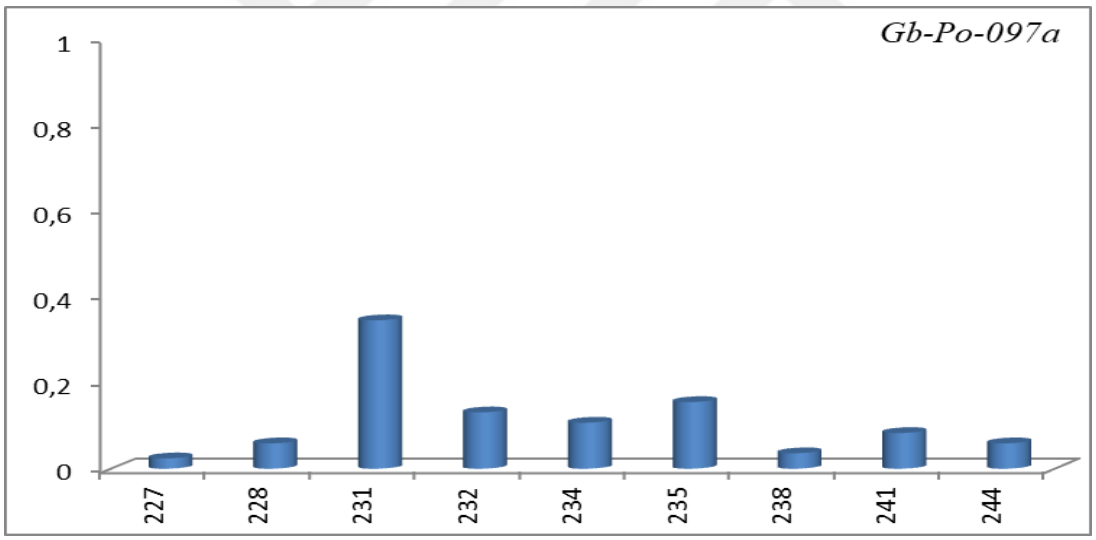
Şekil 4.4. *Gb-Po-064a* lokusu alel ve alel sıklıkları.



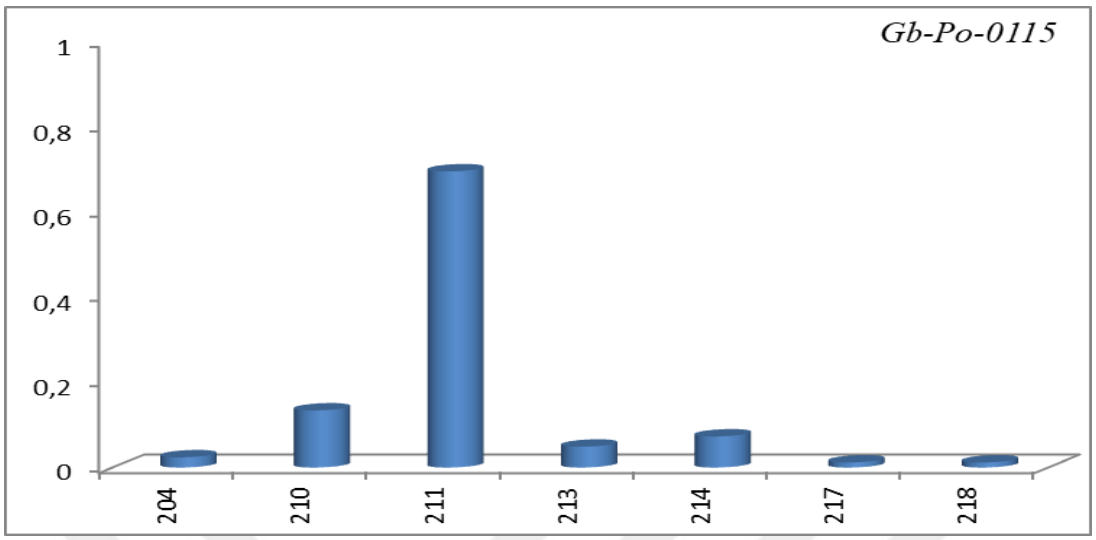
Şekil 4.5. *Gb-Po-076* lokusu alel ve alel sıklıkları.



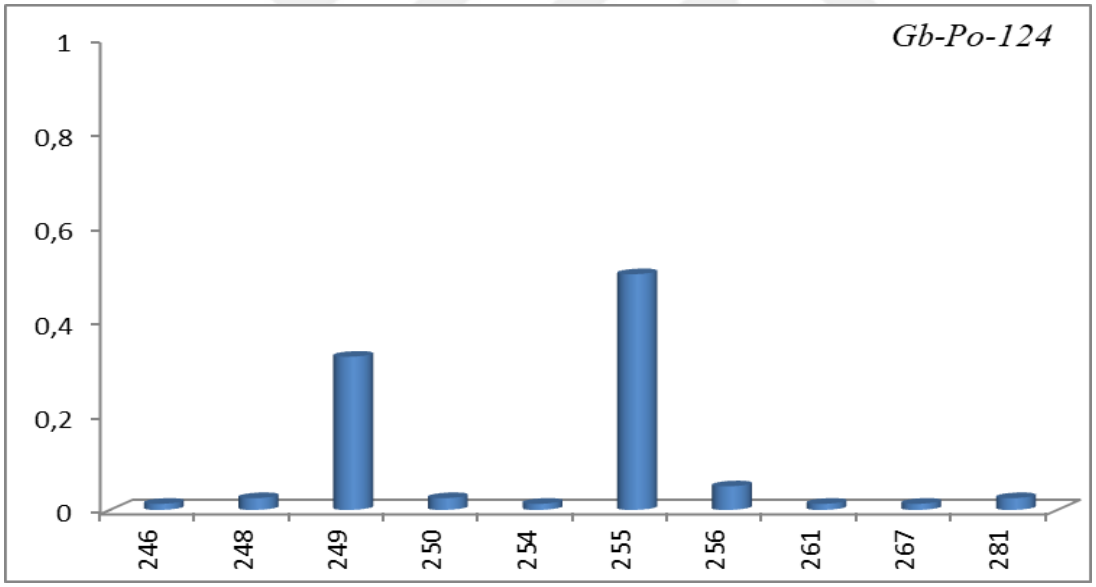
Şekil 4.6. *Gb-Po-079a* lokusu alel ve alel sıklıkları.



Şekil 4.7. *Gb-Po-097a* lokusu alel ve alel sıklıkları.



Şekil 4.8. *Gb-Po-115* lokusu alel ve alel sıklıkları.



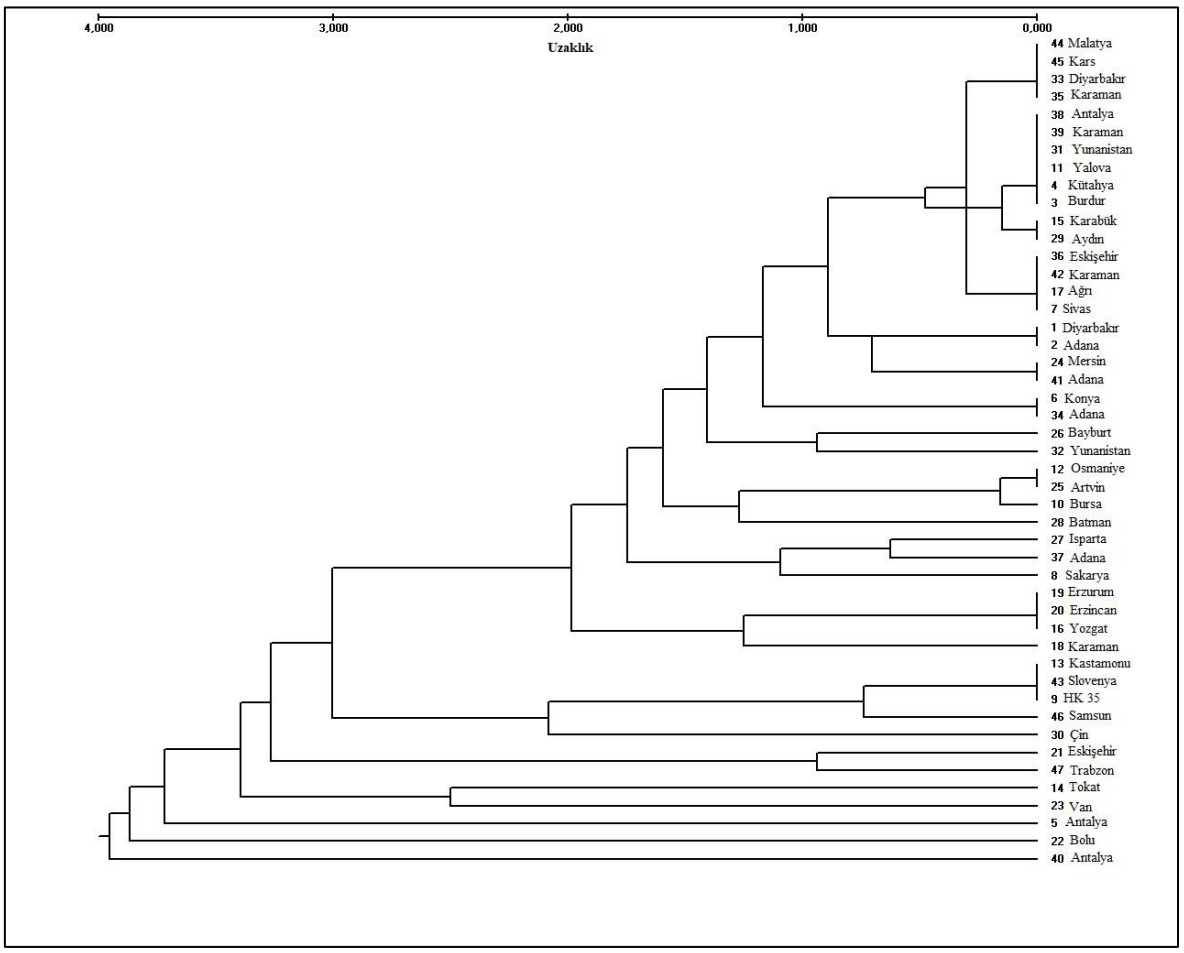
Şekil 4.9. *Gb-Po-124* lokusu alel ve alel sıklıkları.

Alel sıklıklarına dayalı X^2 testi kullanılarak populasyonun her bir lokus için Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadıkları test edildi (Çizelge 4.11). İncelenen lokuslar içinde *Gb-Po-050a* ve *Gb-Po-076* lokusları hariç bütün lokuslarda Hardy-Weinberg dengesinde sapma gözlendi. Bütün lokuslar için populasyonun toplamında Hardy-Weinberg dengesinden sapma gözlendi (X^2, **ydö,** Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. *P. ostreatus* populasyonunun Hardy-Weinberg dengesine dayalı allel sıklığı anlamlılığı (*p*, olasılık; ydö: yüksek derecede önemli).

Lokus	**Toplam**
Gb-Po-011a	**0.0001**
Gb-Po-028a	**0.0001**
Gb-Po-050a	0.0725
Gb-Po-064a	**0.0010**
Gb-Po-076	0.0755
Gb-Po-079a	**0.0001**
Gb-Po-097a	**0.0001**
Gb-Po-115	**0.0001**
Gb-Po-124	**0.0001**
Toplam	**ydö**

Ülkemizden elde edilen ve yabancı ülkelerden elde edilen örneklere (Çin, Yunanistan (2) ve Slovenya) dayalı tespit edilen alellere göre Nei (1972) modeli kullanılarak UPGMA uzaklık ağacı oluşturulmuştur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. *P. ostretus* örneklerinden elde edilen UPGMA uzaklık ağacı

Örnek toplanan lokalitelere göre yapılan UPGMA uzaklık ağacında coğrafik konumlarına göre bir genetik yapılanma görülmememiştir. Ancak UPGMA uzaklık ağacında ülkemiz genelindeki *P. ostretus* populasyonu iki soy hattına ayrılmaktadır (**Soy hattı 1:** Malatya, Kars, Diyarbakır, Karaman, Antalya, Yunanistan, Yalova, Kütahya, Burdur, Karabük, Aydın, Eskişehir, Ağrı, Sivas, Adana, Mersin, Konya, Bayburt, Osmaniye, Artvin, Bursa, Batman, Isparta, Sakarya, Erzurum, Erzincan, Yozgat, Kastamonu; **Soy hattı 2:** Slovenya, HK35, Samsun, Çin, Eskişehir, Tokat, Trabzon, Van, Antalya, Bolu). *P. ostretus*'un Yunanistan örneği soyhattı 1'de yer alırken, Slovenya ve Çin örnekleri soy hattı 2'de yer almaktadır. Ülkemiz genelinde bir coğrafik yapılanmanın görülmemesinin nedeni ise lokalitelerin 1'er örnekle temsil edilmesinden kaynaklanmış olabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünyada mantar yetiştiriciliği 1650 yılında Fransa'da başlamıştır. Türkiye'de ise kültür mantarı üretimi ile ilgili ilk çalışmalar 1960'lı yıllarda *Agaricus bisporus* mantar türü ile başlanmıştır. Ancak son yıllarda ekonomik olarak önem kazanan *Pleurots ostreatus* yetiştiriciliği de büyük önem kazanmıştır (Pekşen, vd., 2016). Bu duruma en büyük etken kompost hazırlama gerekmediği için, ağaç kütükleri kullanılarak yetiştirilebilmesinin yanında buğday sapı, mısır koçanı vb. gibi lignin ve selüloz açısından zengin tarımsal atıkların kullanılarak üretilebilmesidir (Aksu vd., 2005). Odun tahripçisi olan *P. ostreats* türü insan sağlığı açısından yüksek besin değerine ve tıbbi özelliklere sahip olması nedeniyle ülkemizde ve dünyada temel gıda maddeleri arasında yer almaktadır (Oei, 1996).Bu çalışmada Türkiye genelinde yayılış gösteren *P. ostreatus* mantar türünün populasyon genetiği araştırılmıştır.

P. ostreatus kültür mantarları ortam koşullarından kolayca etkilenerek ayırt edilmeleri zorlaşmaktadır. Bu nedenle, yenilebilir *Pleurotus* spp. suşlar büyük önem taşır. Basit dizi tekrarlama (SSR) işaretleyicileri kullanarak ticari *Pleurotus ostreatus* suşları için hızlı ve güvenilir bir ayrım sistemi geliştirilmiştir (Kyung-Ho vd., 2009).

Ülkemizde 47 lokaliteden 42 örnektte dokuz mikrosatellit lokusu çalışıldı. Lokuslar polimorfik olup alel sayıları 4 (Gb-Po-050a) ile 13 (Gb-Po-079a) arasında değişmektedir. Dokuz lokus için toplam alel sayısı 80 olup, ortalaması 8,89 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Ülkemiz genelinde *P. ostretus* populasyonunun varyasyonunu tespit edebilmek için incelenen lokuslara göre gözlenen ve beklenen (gen çeşitliliği) değerleri belirlendi (Çizelge 4.2 - 4.10). Gözlenen ortalama heterozigotluk değeri en yüksek Gb-Po-011a (H_G=0.86) lokusunda ve en düşük Gb-Po-050a ve Gb-Po-097a (H_G=0.19) lokuslarında tespit edilmiştir. Toplamda gen çeşitliliğinin yüksek olması ülkemiz genelinde *P. ostreatus* populasyonda soy içi üreme, darboğaz ve kurucu etkisi gibi olaylar sonucu bir genetik sürüklenme meydana gelmediği anlamına gelmektedir.

Alel sıklıklarına dayalı X^2 testi kullanılarak herbir lokusun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı test edildi (Çizelge 4.11). Bütün lokuslar için populasyonun toplamında Hardy-Weinberg dengesinden sapma gözlendi (X^2ydö). Hardy-Weinberg dengesinden sapma gözlenmesi *P. ostreatus* populasyonunun soy içi üreme, öncü etkisi ve darboğaz gibi genetik olaylar meydana gelmediği anlamına gelmektedir.

Populasyonda tespit edilen alellere göre UPGMA uzaklık ağacı oluşturuldu (Şekil 4.10). Uzaklık ağacına göre örnek toplanan lokalitelerde coğrafik bir genetik yapılanma gözlenmedi. Ülkemiz genelinde *P. ostreatus* populasyonu coğrafik konumlarına bakılmaksızın iki soy hatına ayrılmıştır. Coğrafik olarak bir genetik yapılanmanın gözlenmemesi lokalitelerden toplanan örnek sayılarının az olmasından kaynaklanmış olabilir.

Bu çalışma *P. ostreatus* mantar türünün Türkiye geneli populasyonunun mikrossatellit belirteçleri kullanılarak genetik yapılarının belirlenmesi ile ilgi yapılan ilk çalışmadır. Ülkemiz genelinde toplanan örneklerle yapılan bu çalışmada populasyon genetik çeşitliği yüksek ve Hardy-Weinberg dengesinden sapma gözlenmesi populasyonun geleceği için oldukça önemli bulgulardır. Bu çalışma yapılacak sonraki çalışmalar için öncü niteliğindedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Aksu, Z., 2005, Application of biosorption for the removal of organic pollutants Process Biochemistry Journal Rev, 40, 997–1026.

Atlı, Burcu., Yamaç, Mustafa., Yıldız, Zeki., 2013, Optimization of submerged fermentation conditions for lovastatin production by the culinary-medicinal oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Higher Basidiomycetes), International Journal Medicinal Mushrooms, 15(5), 487-95.

Beuzen, ND., Stear, MJ., Chang, KC., 2000, Review molecular markers and their use in animal breeding. Vet J, 16, 42-52, 2000.

Bruford MW, Wayne RK (1993) Microsatellites and their application to population genetic studies. Curr. Opin. Genet. Dev., 3, 939–943

Bruns, T.D., Gardes, M., 1993. Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi-taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. Molecular Ecology 2, 233-242.

Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J., Dveksler, G.S., 1993. General concepts for PCR primer design. PCR Methods and Applications 3, S30-S37.

Eren E, Pekşen A., 2014. Türkiye'de kültür mantarı üretimi, sorunları ve çözüm yolları. 1.Ulusal Mikoloji Günleri (1-4 Eylül 2014) Özet Kitabı, s. 29, Erzurum.

Eren E, Pekşen A., 2016. Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 4(3): 189-196, 2016

Fan, J.Y., Guo, L.Y., Xu, J.-P., Yong, L., 2010, Mıchailides T.J., Genetic Diversity of Populations of Monilinia fructicola (Fungi, Ascomycota, Helotiales) from China, J. Eukaryot. Microbiol 57(2), 206–212.

FAO. 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations. http://faostat.fao.org

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Fatima S, (2006). Study of genetic variability among Gohilwadi, Surti and Zalawadi Goats using microsatellite analysis. Master of Veterinary Science in Animal Genetics and Breeding. Department of Animal Genetics and Breeding, College of Veterinary Science & Animal Husbandry Anand Agriculture University, Anand. (Master of Science Thesis)

Fu, L.Z., Zhang, H.Y., Wu, X.Q., Li, H.B., Wei, H.L., Wu, Q.Q., Wang, L.A., 2010, Evaluation of genetic diversity in Lentinula edodes strains using RAPD, ISSR and SRAP markırs, World J Microbiol Biotechnol, 26, 709–716.

Guan, X.J., Xu, L., Shao, Y.C., Wang, Z.R., Chen, F.S., Luo, X.C., 2008, Differentiation of commercial strains of Agaricus species in China with intersimple sequence repeat markır, World J Microbiol Biotechnol, 24, 1617–1622.

Guo SW and Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics 48:361-372.

Gücin F 1993. Kozak Yaylasında (Bergama-İzmir)Yetişen ve İhraç Potansiyeli OlanKuzugöbeği(Morchella) Mantarları. Ekoloji Çevre Dergisi, 6:22-27.

Jayaraj, V. K. (2009). The phylogenetic relationships o f Megachiroptera in Malaysia inferred from morphological and DNA analyses. (MSc thesis dissertation). Universiti Malaysia Sarawak, Kota Samarahan

Kaşık G., Marifet Matbaa ve Kağıtçılık, Konya(2010).

Kyung-Ho, Ma & Lee, Gi-An & Lee, Sok-Young & Gwag, Jae-Gyun & Kim, Tae-San & Kong, Won-Sik & Seo, Kyoung-In & Lee, Gang-Seob & Park, Yong-Jin. (2009). Development and Characterization of New Microsatellite Markers for the Oyster

Lian, C., Hogetsu, T., Matsushita, N., Guerin-Laguette, A., Suzuki, K., Yamada, A., 2003, Development of microsatellite markırs from an ectomycorrhizal fungus, Tricholoma matsutake, by an ISSR-suppression-PCR method, Mycorrhiza, 27- 31.

Lipscomb, D., 1998. Basics of cladistic Analysis. Available from

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Mushroom (Pleurotus ostreatus). Journal of microbiology and biotechnology. 19. 851-7. 10.4014/jmb.0811.604.

Manzi, P. & Pizzoferrato L., (2000). Beta glucans in edible mushrooms, Food Chemistery, 68, 315-318.

Mattila et al., 2001P. Mattila, K. Könkö, M. Eurola, J.M. Pihlava, J. Astola, L. Vahteristo, et al.Contents of vitamins, mineral elements, some phenolic compounds in cultivated mushroomsJournal of Agricultural and Food Chemistry, 49 (2001), pp. 2343-2348

Mcdonald, B. A. 1997. The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques. Population Genetics of Soilborne Fungal Plant Pathogens Symposium. The American Phytopathological Society, Vol. 87, No. 4.

Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) [Documentation file]. Available with the program's installation files athttp://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm

Moore-Landecker, E., 1996, Fundementals of the Fungi, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. Sf 574.

Moncalvo, J.M., Lutzoni, F.M., Rehner, S. A., Johnson, J., Vilgalys, R., 2000, Phylogenetic Relationships of Agaric Fungi Based on Nuclear Large Subunit Ribosomal DNA Sequences, Syst. Biol, 49(2), 278–305.

Nazrul, M.I., Xiao, Lin F., Yin-Bıng, B., 2010, Screening Of Homokaryotic Protoclones Of Agaricus bisporus (J. Lge) Imbach By Colony Characters and Issr Markırs, Bangladesh, J. Bot. 39(1), 119-122.

Nei 1972 Am. Nat. 106:283-292.

Oei, P. (1996): Mushroom cultivation. With special emphasis on appropriate techniques for developing countries. TOOL publications, Leiden, Netherlands. P256.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Park, M., Romanoski, C.E., Pryor, B. M., 2008, A re-examination of the phylogenetic relationship between the causal agents of carrot black rot, Alternaria radicina and A. carotiincultae, Mycologia, 100(3), 511–527.

Passarge E (1995): Color Atlas of Genetics. (Second Edition). Thieme Press, New York.

Pekşen A. 2015. Mantarların insan hayatı ve sağlığındaki yeri. Bahçe Haber, 2(1): 10-15.

Pekşen A., Bulam S., Üstün N. Ş. 2016. Edible wild mushrooms sold in Giresun local markets. 1st International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2016) Çukurova University, Congress Center, October 26-28, 2016, Adana / TURKEY Pages: 3508-3512, Paper ID:931.

Rajarathnam S, Shashirekha MN, Banu Z 1998.Biodegradative and BiosynthetiCapaticies ofMushrooms: Present and Future Strategies. CriticalReviews in Biotechnology,18(2-3): 91-236.

Ramamoorthi J, Thilagam K, Sivaselvam SN, Karthickeyan SMK (2009): Genetic characterization of Barbari goats using microsatellite markers. J Vet Sci, 10(1): 73–76.

Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources, 8.1: 103-106. Erişim, [http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm]

Royse, D. J., Recycling of Spent Shii-take Substrate for Production of the Oyster Mushrooms Pleurotus sajor-caju, Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 179-182, 1992

Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A., 1991. Identification of Rhizoctonia species, APS PRESS The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, USA. Sf 133.

Soltis, D.E., Collõer, T.G., Edgerton, M.L., 1991, The Heuchera group (Saxifragaceae): Evidence for chloroplast transfer and paraphyly, Amer. J. Bot,. 78, 1091–1112.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Şen, S., Yalçın M., 2010, III. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi 20-22 Mayıs 2010 Cilt: III Sayfa: 1208-1216

Tang, L., Xiao, Y., Li, L., Guo, Q., Bian, Y., 2010, Analysis of Genetic Diversity Among Chinese Auricularia auricula Cultivars Using Combined ISSR and SRAP Markırs, Curr Microbiol, 61, 132–140.

Tamer, Ü. A., Gücin, F., Solak, H. M., 2006, Mikolojiye Giriş, Uludağ Üniversitesi FenEdebiyat Fakültesi Ders Notları, Manisa.

Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res. 17 (16), 6463–6471.

Toro MA, Fernández J, Caballero A (2009): Molecular characterization of breeds and its use in conservation. Livestock Science, 120, 174–195

Taylor, J. W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., Fisher, M. C., 2000. Phylogenetic species recognition and species concept in fungi. Fungal Genetic and Biology 31, 21-32.

TÜİK. 2015. Türkiye İstatistik Kurumu. www.tuik.gov.tr

TS 2410 Kasım 2005, Türk Standardı, ICS 67.080.20

Ün, Z., 2005, Aydın İlinde Çilekteki Fungal Kontaminasyonun Moleküler Tanısı ve *Botrytis cinerea* Türünün Genetik Yapısı, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor. J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, san Diego, pp. 315-322.

Yılmaz N, Solmaz M, Türkekul I, Elmastas M 2006.Fatty Acid Composition in SomeWild EdibleMushrooms Growing in The Middle Black SeaRegion of Turkey. Food Chemstry, 99: 168-174.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yılmaz O, Karaca O, 2012. Karya Koyunlarda Mikrosatellit İşaretleyicilerle Babalık Testi. Kafkas Univ Vet Fak Derg 18 (5): 807-813, 2012

Yu, M., Ma, B., Luo, X., Zheng, L., Xu, X., Yang, Z., 2008, Molecular Diversity of Auricularia polytricha Revealed by Inter-Simple Sequence Repeat and Sequence-Related Amplified Polymorphism Markers, Curr. Microbiol, 56, 240– 245.

Zhang, R., Huang, C., Zheng, S., Zhang, J., Ng, T.B., Jiang, R., Zu, X., Wang, H., 2007, Strain-typing of Lentinula edodes in China with inter simple sequence repeat markers, Appl Microbiol Biotechnol, 74, 140–145.