

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

COLLYBIA TÜRLERİNİN GENETİK KARAKTERİZASYONU

Ebru ORHAN

HAZİRAN 2018

Biyoloji Anabilim Dalında Ebru ORHAN tarafından hazırlanan *COLLYBIA* TÜRLEİNİN GENETİK KARAKTERİZASYONU adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Perihan GÜLER
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : () _____
Üye (Danışman) : () _____
Üye : () _____

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

COLLYBIA TÜRLERİNİN GENETİK KARAKTERİZASYONU

ORHAN Ebru

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Perihan GÜLER

Haziran 2018, 57 sayfa

Bu çalışmada, Kırıkkale ve ilçelerinde doğal olarak yetişen *Collybia* türlerinde moleküler çalışmalar yapılarak genetik yapıları belirlenmiştir.

Türlerin kültür çalışmaları patates dekstroz agarda sürdürülmüş, mantarlardan alınan doku parçaları katı besiyerinde geliştirilmiş ve miseller elde edilmiştir.

Çalışmada *Collybia*'ya ait örneklerin genetik farklılıklarını değerlendirmek için RAPD markörleri kullanılmıştır. RAPD analizi on adet primerle gerçekleştirilmiştir. RAPD analizi ile toplam 170 adet tekrarlanabilir fragment elde edilmiş ve tüm fragmentler polimorfik çıkmıştır. Fragmentlerin büyüklükleri 100 2500 bp arasında değişmiştir. Her bir primer ile elde edilen bant sayısı 12 ile 22 arasında olmuştur. Popülasyonlar arasındaki genetik ilişkileri belirlemek için benzerlik indeksleri hesaplanmış ve dendrogram elde edilmiştir. Dendrogram 4 ana gruba ayrılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kırıkkale ve ilçeleri, misel gelişimi, RAPD-PCR

ABSTRACT

GENETICAL CHARACTERIZATION OF *COLLYBIA* SPECIES

ORHAN Ebru

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Ms.C Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Perihan GÜLER

Jun 2018, 57 pages

In this study; genetic structures were determined by conducting molecular studies in *Collybia* species naturally grown in Kirikkale and its structures.

The culture studies of the species were carried out on potato dextrose agar, the tissues obtained from the fungi were cultivated in agar medium and mycelium were obtained.

In this study, RAPD markers were availed of in order to evaluate the genetic differences of *Collybia* samples. RAPD analysis was conducted with ten primers. In consequence of the RAPD analysis, 170 repeatable fragments were obtained and all fragments were found out to be polyphormic. The magnitude of the fragments varied between 100 and 2500 bp. The number of stripes obtained from each primer was between 12 and 22. Similarity indexes were also calculated to define the genetic relations between populations and dendrogram were acquired. The dendrogram is divided into 4 main groups.

Keywords: Kirikkale and its districts, mycelium cultivation, RAPD-PCR

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında hiçbir yardımcı esirgemeyen ve biz genç araştırmacılara büyük destek olan, bilimsel deney imkanlarını sonuna kadar bizlerin hizmetine veren, tez yöneticisi hocam, Sayın Prof. Dr. Perihan GÜLER'e, tez çalışmalarım esnasında, bilimsel konularda daima yardımını gördüğüm hocam Sayın Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN'e, bana her zaman olduğu gibi, tezimi hazırlamam esnasında da yardımlarını esirgemeyen eşim Fatih ORHAN'a teşekkür ederim.





Sevginin en güçlü halidir aile...

Her anım, sevgim, her şeyim, biricik eşim **Fatih ORHAN**

ve

Sevgili oğlum **Egemen ORHAN**'a

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın Amacı	2
1.2. Kaynak Özetleri.....	3
1.3. Genel Bilgiler	11
1.3.1. Türlerin Sistematikteki Yeri	11
1.3.2. <i>Collybia</i> Cinsinin Özellikleri.....	11
1.3.3. <i>Collybia dryophila</i> Morfolojik Mikroskopik ve Ekolojik Özellikleri	12
1.3.4. <i>Collybia tuberosa</i> Morfolojik Mikroskopik ve Ekolojik Özellikleri.....	13
1.3.5. Türlerin Türkiye'deki Yayılışı.....	13
1.4. Moleküler Sistematik	14
1.4.1. Moleküler Markörler	16
1.4.2. Hibridizasyona Dayalı Markörler.....	17
1.4.2.1. RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi / Restriction Fragment Length Polymorphism).....	17
1.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) Dayalı Markörler	18
1.4.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	18
1.4.3.2. RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA / Random Amplified Polymorphic DNA) - PCR Yöntemi	19
1.4.3.3. AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi / Amplified Fragment Length Polymorphism)	20
1.4.3.4. ISSR (Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm / Inter Simple Sequence Repeat)	20

1.4.3.5. SSR (Basit Tekrarlı Diziler veya Mikrosatelitler / Simple Sequence Repeat)	20
1.4.3.6. CAPS Markörleri (Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler/ Cleaved Amplified Polymorphic)	21
1.4.3.7. SCAR (Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler/ Sequence Characterized Amplified Regions) Yöntem.....	21
2. MATERYAL VE YÖNTEM	22
2.1. Materyal.....	22
2.2. Kültür Çalışmaları	23
2.2.1. Katı Besiyerindeki Çalışmalar	23
2.2.2. Sıvı Besiyerindeki Çalışmalar	23
2.3. Moleküler Çalışmalar	23
2.3.1. Tampon ve Çözeltiler	23
2.3.1.1. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Çözeltiler	23
2.3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Tampon Ve Çözeltiler	24
2.3.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler	24
2.4. DNA İzolasyonu.....	25
2.4.1. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR)	25
2.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi	26
2.4.3. Genetik Uzaklık Tayini.....	26
3.BULGULAR	27
3.1 Katı Besiyerindeki Gelişmeler	27
3.1.1. <i>Collybia dryophila</i> 'nın Kültür Özellikleri	27
3.1.2. <i>Collybia tuberosa</i> 'nın Kültür Özellikleri	28
3.2. Sıvı Besiyerinde Gelişmeler.....	28
3.3. Moleküler Çalışmalar	29
3.3.1. RAPD-PCR Yöntemi İle Elde Edilen Sonuçlar	29
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	44
KAYNAKLAR	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Collybia dryophila</i> 'nın Türkiye'deki yayılışı.....	13
1.2. <i>Collybia tuberosa</i> 'nın Türkiye'deki yayılışı.....	14
3.1. <i>Collybia droyhila</i> misellerinin katı besiyerindeki kolonizasyonu	27
3.2. <i>Collybia tuberosa</i> misellerinin katı besiyerindeki kolonizasyonu	28
3.3. <i>Collybia dryophila</i> misellerinin sıvı besiyerindeki kolonizasyonu.....	29
3.4. <i>Collybia tuberosa</i> misellerinin sıvı besiyerindeki kolonizasyonu	29
3.5. M13 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.....	31
3.6. OPI18 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi	32
3.7. OPW06 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.....	33
3.8. B18 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.....	34
3.9. BA1 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi	35
3.10. BA5 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.....	36
3.11. BC1 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi	37
3.12. BC2 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi	38
3.13. OPC02 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.....	39
3.14. OPB05 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.....	40
3.15. <i>Collybia</i> türlerinin RAPD-PCR sonuçlarına göre elde edilen genetik uzaklık dendrogramı	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Çalışmada kullanılan <i>Collybia</i> türleri	22
2.2. RAPD-PCR Çalışmalarında Kullanılan Primerler	24
3.1. Nei Benzerlik Katsayıları Kullanılarak Elde Edilen Benzerlik Matriksi Değerleri.....	41



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER DİZİNİ

bç	baz çifti
mM	milimolar
rpm	Dakikada Devir Sayısı
μ g	mikrogram
μ L	mikrolitre
UV	ultraviole
mg	miligram
μ m	mikron

KISALTMALAR DİZİNİ

dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA (Buffer)
Tris	Tris (Hidroksimetil) aminometan

1. GİRİŞ

Mantarlar, ökaryotik, klorofilsiz, spor oluşturan, kendi besinlerini yapamayan saprofit, parazit, simbiyotik ve mikorizal olarak yaşamaktadırlar. Gelişmeleri için hazır organik maddelere ihtiyaç gösteren heterotrofik organizmalardır (Gücin ve Tamer, 1997).

Günümüzde, mantarlar besin maddesi olarak, peynir, ekmek, bira, şarap yapımında kullanılmaktadır. Mantarların sentezledikleri alfa-amilaz, pektinaz, proteaz, lipaz, selüloz, intervaz gibi enzimler ile sitrik asit, fumarik asit, glukronik asit gibi asitler gıda ve kimya sanayisinde kullanılmaktadır (Sümer, 2006).

Mantarlar organik madde çözülmesinde, antibiyotik, toksin, besin üretiminde önemli rol oynarlar. Mantarlar morfolojilerine göre sınıflandırılıp tanımlansa da son zamanlarda bazı gen dizileri temel filogenetik ve taksonomik araç olarak kullanılmaya başlandı (Hibbett vd., 2007). Bir çalışmada kültür mantarı *Agaricus bisporus* türünün üç farklı varyetesinin yaşam döngülerinde spor sayıları ve basidiumlardaki ortalama spor sayısı farklılığı karyolojik olarak açıklanmıştır (Kamzolkin vd., 2006).

Collybia türleri retapamulin, tiamulin ve valnemulin gibi antibiyotiklerin ve antifungal, antiviral izolat eldesi için önem taşımaktadır (Engler vd., 1998). *Collybia maculata* antiviral aktiviteye sahiptir (Leonhardt vd., 1987). *Collybia dryophila* ve *Collybia maculata* antitümör polisakkkaritlere sahiptirler (Pacheco-Sanchez vd., 2006).

Ülkemizde doğal yayılış gösteren *Collybia* cinsinin morfolojik ve anatomik özellikleri ve miselyal gelişimleri (Marçais ve Delatour, 1996; Lim vd., 2004) ile ilgili olarak çalışmalar mevcuttur. Yapılan çalışmalarda *Collybia velutipes*'in (Kesarwani vd., 2000), *Collybia maculata*'nın (Lim vd., 2005) moleküler yapıları incelenmiştir.

Son yıllarda moleküler biyolojideki hızlı gelişmeler biyolojinin bütün alanlarını olumlu yönde etkilemiştir. Bu gelişmeler mantar sistematğinde de etkisini göstererek

hızlı ve güvenilir teşhislere olanak sağlamıştır. Moleküler biyoloji tekniklerindeki gelişmeler ve genom analizinin gerekliliğinin bir sonucu olarak çok sayıda moleküler DNA markör (belirleyici) ortaya çıkarılmıştır. Moleküler belirleyiciler primer bağlama bölgeleri ve restriksiyon enzimleri sayesinde farklı genotiplere ait DNA farklılığını ortaya koyan güçlü birer araçlardır ve böylece DNA'ya dayalı polimorfizmleri ortaya çıkarmak için kullanılırlar (Botstein, 1980; Bardakçı, 2001). Polimorfizmlerin kaynağı DNA dizi değişiklikleridir. Yer değiştirmeler, ters dönmeler, parça eksilmeleri ve parça eklenmeleri ile meydana gelirler ve genleri, onların düzenlenmelerini, biyokimyayı, gelişmeyi, morfolojiyi, davranışı etkileyeceğinden evrim sürecinde fenotipik varyasyonun da kaynağıdır (Britten 1986).

Moleküler çalışmalar yaygınlaşmadan önce morfolojiye ve biyokimyasal tekniklere dayalı araştırmalar yapılmaktaydı. Ayrıca, özellikle morfolojik olarak yapılan gözlemlerde iyi bir deneyim ve fazla zaman gerektirmekte ve sonuçlar araştırmacılara göre farklılıklar gösterebilmekteydi. Bu nedenlerle artık geleneksel yöntemlerin yanı sıra moleküler yöntemler de özellikle PCR'a dayalı teknikler ve DNA dizileme çalışmaları da mantar sistematğinde giderek yerini almaktadır. DNA'ya dayalı çalışmalar, hem güvenilir hem de hızlı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. DNA molekülünde organizmaların evrimini yansıtabilecek türe özgü bölgeler olduğu için taksonomik çalışmalar da tercih edilmektedir (Stajic vd., 2005; Singh vd., 2006; Chakraborty vd., 2010).

RAPD-PCR tekniği pek çok mantar cinsinde tür içi ve türler arası genetik farklılıklarını ve benzerliklerini belirlemek için başarıyla kullanılmıştır (Stajic vd., 2005; Singh vd., 2006; Chakraborty vd., 2010).

1.1. Çalışmanın Amacı

Ülkemizde henüz çok yeni çalışılmaya başlanan ancak dünyada oldukça fazla çalışılan, mantarlardaki genetik çalışmalara katkı sağlamak amacıyla Kırıkkale'de doğal olarak yetişen *Collybia* cinsine ait *Collybia dryophila* ve *Collybia tuberosa*

türlerinin moleküler çalışmalarını yapılarak tür içi ve türler arası genetik yapılarının belirlenmesidir.

1.2. Kaynak Özetleri

Çalışma materyalini oluşturan *Collybia* türleri ile moleküler genetik çalışmalar oldukça azdır. Ancak bu cins birçok alanda incelenmiştir.

Falanghe vd. (1964), çeşitli soya proteini ve peynir altı suyu ortamları ile hazırlanan kültürde *Collybia velutipes*'in dahil olduğu yedi tür mantar için substrat olarak test etmişlerdir. Mantarların miselyal büyümelerini incelemişler ve kullanılan ortamların hem yüksek protein içeriğine sahip ürün üretiminde hem de bu ürünlerin ekonomik değere sahip olabileceğini belirtmişlerdir.

Taylor (1977), meyve ağaçlarının ve diğer bitkilerin köklerinden izole edilen bazidiomycetes örneklerini, bazı misel kültürlerin biyokimyasal karakterizasyonu için, yirmi altı biyokimyasal test ile çalışmışlardır. Mantarların doku parça izolatları ile bunların biyokimyasal reaksiyonlarını eşleştirerek *Collybia druce*, *Membranicium utriculicum* ve *Heteroporus bienalin* olarak tanımlamışlardır.

Leonhardt vd. (1987), 6-Metilpurin, 6-metil-9-beta-D-ribofuranosilpurin ve 6-hidroksimetil-9-beta-D-ribofuranosilpurin'i *Collybia maculata*'nın kültürlerinden izole etmiş ve bunların antifungal, sitotoksik ve antiviral aktivitelerini belirtmişlerdir.

Vilgalys ve Johnson (1987), *Collybia dryophila* örnekleri ile yaptıkları çalışmada türleşme ile ilişkili geniş genetik sapmayı incelemişlerdir. Bu mantarlardaki türleşme ile ilişkili DNA sekans sapma seviyesinin çarpıcı olduğunu ve ökaryotların diğer gruplarında gözlenenlerden önemli ölçüde daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. DNA-DNA hibridizasyon yöntemleri temel olarak mantarlardaki taksonomik ilişkileri tanımlamak için kullanılsa da çalışmalarında elde ettikleri veriler funguslardaki türleşmenin muazzam genetik değişim ile birlikte olduğunu göstererek fungal evrim hakkında bilgi sağladığını vurgulamışlardır.

Steffen vd. (2002), orman artıklarını ve toprağı kolonize eden *Collybia dryophila* gibi bazidiomyceteslerin yüksek moleküllü kütle humik maddelerinin geri dönüşümü ile humus devresinde yer aldıklarını göstermişlerdir.

Tuomela vd. (2004), üç farklı ayrıştırıcı mantarın (LDF) lignin cevherleşme aktivitesini, kuzey orman toprağından alınan humus tabakası örnekleri ile incelemişlerdir. Örneklerdeki toplam Pb konsantrasyonu ve suda çözünür Pb konsantrasyonlarını tespit etmişlerdir. *Collybia dryophila* ve *Clitocybe (Lepista) nebularis* tarafından sentetik lignin cevherleşmesi kuvvetli bir şekilde inhibe edilirken, *Stropharia coronilla* toprak ve sıvı kültürlerde Pb stresine daha toleranslı olmuştur. Yüksek konsantrasyonlarda Pb LDF'nin büyümesini inhibe ettiğini ve ligninolitik enzimlerin aktivitesini etkilediğini belirtmişlerdir.

Lim vd. (2004), *Collybia maculata*'nın misel kültürü ve ekzopolisakkarit üretimi için ortogonal matris yöntemiyle ortalamanın optimizasyonu konusunu çalışmışlardır. Misel büyümesi için optimum ortam bileşenleri ve *C. maculata*'nın EPS üretimi başarıyla belirlenmiştir. Bu optimizasyon tekniğinin diğer süreçlere yaygın olarak uygulanabilirliğini vurgulamışlardır.

Mircea vd. (2004), Romanya, Savinesti Fibrex-naylon Kompleksi'nin yakınındaki Bistrita Vadisi'nde yetişen yenilebilir mantarlardan aralarında *Collybia butiracea*'nın olduğu 41 farklı örnekte nitrit miktarını belirlemişlerdir. Nitrit konsantrasyonlarını 2001 yılında toplanan ve 2002 yılında toplanan örneklerle karşılaştırmışlardır. Mantarlardaki nitrit konsantrasyonu Ekim 2001'de toplanan örneklerde 2.06 ile 49.88 arasında olduğunu, 2002 Eylül ayında toplanan örneklerde ise 1.98 ile 31.84 arasında olduğunu belirtmişlerdir.

McErlean vd. (2006), *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Collybia* sp. ve *Rhizoctonia solani* için toprak gereksinimleri potansiyelinin değerlendirilmesi ve toprak iyileştirme uygulamalarında ligninolitik enzimlerin üretimini çalışmışlardır.

Osono ve Takeda (2006), *Collybia* sp. örneklerinin çürümüş kalıntıları ve inkübasyon sıcaklığının, fungusların orta yükseklikteki dağlarda yetişen ağaçların yaprak altını ayrıştırma yeteneği üzerindeki etkisini saf kültür testi ile incelemişlerdir. Ayrıştırma kabiliyetinin basidiomyceteslerde daha yüksek olgunu belirtmişlerdir.

Yang vd. (2006), streptozotosin (STZ) ile indüklenmiş diyabetik sıçanlara *Collybia confluens* miselyal tozunun (CCMP) ağızdan verilmesinin plazma glikozu ve diğer biyokimyasal parametreler üzerindeki etkilerini araştırmışlardır.

Pacheco vd. (2006), gluklan (1→3) ve (1→4) bağ yapısı olan Beta-D gluklan, *Collybia dryophila* mantarından ekstrakte edilmiş olup *Collybia dryophila* polisakkarit (CDP) olarak adlandırmış, CDP'nin makrofajlarda güçlü bir inhibitör olarak nitrit oksit üretimi gösterdiği, polisakkaritin bir anti-inflamutuar etki sergilediğini göstermişlerdir.

Pacheco-Sanchez vd. (2007), *Collybia dryophila*'dan ekstrakte edilen bir polisakkaritin, makrofajlarda nitrik oksit sentez ekspresyonu ve nitrik oksit üretimi üzerine inhibe edici etkisini incelemişlerdir.

Gussem vd. (2007), Raman spektroskopisinin olanaklarını kullanarak *Collybia*, *Gymnopus*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Mycena* ve *Russula* cinslerinin sporlarının kemotaksonomik tanımlanmasını yapmışlardır.

Yang vd. (2007), streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, misel kültürleri tarafından üretilen *Ganoderma applanatum* ekzo-polimer (GAE) ve *Collybia confluens* ekzo-polimer (CCE)'nin hipoglisemik etkileri araştırmışlardır. Sonuç olarak, deney hayvanlarında diyabetle mücadelede GAE ve CCE potansiyelini güçlü bir şekilde göstermişlerdir.

Jeong vd. (2008), *Collybia confluens*, *Ganoderma applanatum* ve *Pleurotus eryngii*'den elde edilen misel kültürlerinden üretilen exo-(EX) ve endo-biyopolimerlerin (EN) anti-tümör etkilerini, Sarcoma 180 taşıyan fareler kullanarak incelemişlerdir.

Sesli vd. (2008), Karadeniz Bölgesi'nin farklı yerlerinden toplanan, aralarında *Collybia dryophila*'nın da bulunduğu mantar türlerinde iz metallerinin konsantrasyonları, nemli ve titreşimli elektromanyetik dalga sonrasında atomik absorpsiyon spektrometresi ile belirlemişlerdir. Bazı yenilebilir mantar örneklerinde analiz edilen kurşun seviyeleri normal sınırlardan daha yüksek bulunmuştur.

Zhu vd. (2011), Çin'in Yunnan Eyaleti'nden *Collybia velutipes* dahil 14 farklı yenilebilir tür için ağır metallerin değerlendirilmesini yapmışlardır. Yenilebilir mantar türlerinde çinko, kadmiyum ve kurşun düzeylerini yüksek bulmuşlardır.

Wang ve Hou (2011), atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanarak anti-influenza virüs mantarlarının eser element kompozisyonunu belirlemek için yaptıkları çalışmada, *Collybia maculata* örneklerinde demir, selenyum ve çinko tespit etmişlerdir.

Mujic vd. (2011), *Collybia platyphylla*'nın aralarında bulunduğu dört yabancı mantarın yağ asidi profilleri ve hipertansiyon tedavisinde potansiyel faydalarını araştırmak için mantarların lipit profilleri ve mantar lipitlerinin eritrosit membranının akışkanlığını değiştirme yeteneği, gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi, gaz kromatografisi-alev iyonizasyon dedektörü ve elektron paramanyetik rezonans eğirme probu tekniği kullanılarak incelemişlerdir.

Sarıkürkçü vd. (2012), Isparta, Muğla ve Osmaniye illerinden toplanan, aralarında *Collybia dryophila*'nın da bulunduğu yabancı yenilebilir mantarların metal konsantrasyonlarını inceledikleri çalışmalarında Zn, Fe, Cu, Mn, Co, Ni, Pb, Cd, Cr, Al, Ca, Mg ve K'nın içeriklerini, indüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi ile belirlemişlerdir.

Wang vd. (2014), *Collybia dryophila* türünün içerisinde bulunduğu on toprak mantarlarının, topraktaki karbon ve besin döngüsündeki mantar enzimatik farklılıkları ve toprak kolloidleri ile etkileşimlerini araştırmışlardır. *Collybia dryophila* yüksek aktiviteli 5 enzim salgılamıştır. Mantarlardaki farklılıklar, fonksiyonel grupların yüzey

görünümünün değişmesine ve toprak kolloidlerindeki element kompozisyonlarına katkıda bulunmuştur.

Wang vd. (2018), *Collybia radicata* mantarından izole edilen polisakkaritin makrofaj immünomodülatör aktivitesini incelemiştir.

Collybia türleri ile moleküler genetik çalışmalar oldukça azdır. Ancak birçok mantar türü ile yapılan moleküler çalışmalar mevcuttur.

Hopple ve Vilgalys (1994), *Coprinoid* taksonları ve bazı yakın akrabalarının filogenetik ilişkilerini, rDNA büyük alt birimi ve ITS-2 bölgelerinin PCR-RFLP ile çalışmışlardır. Çalışmalarında *Psathyrella* cinsinin *Coprinus* içine alınması gerektiğini ve *Bolbitius* cinsinin *Coprinus* cinsiyle yakın ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Gutierrez vd. (1995), *Terfezia claveryi*'nin identifikasyon ve karakterizasyonu için RAPD-PCR tekniğini kullanmışlardır. *Terfezia claveryi* MH ortamı ile mikorize edilmiştir. *Terfezia claveryi*'nin ektendomikoriza formuna girdiğini gözlemlemişlerdir.

Edel vd. (1995), *Fusarium* cinsinin morfolojik ve biyokimyasal kriterlere göre teşhisinin zor ve karışık olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada 28S rDNA ve ITS bölgesinin RFLP analizleriyle tür seviyesinde birkaç *F. oxysporum* suşu ayırt etmişlerdir.

Wipf vd. (1996), *Morchella esculenta* ve *Morchella conica* ile yaptıkları çalışmada ITS primerleri iki türde de 740 - 750 bp aralığında bant göstermiştir. Cins düzeyinde polimorfizm derecesi, ITS bölgesinin mantarlar arasında değiştiğini belirtmişlerdir.

Nicholson, vd. (1997), *Lentinula* türlerinin genetik polimorfizm çalışmalarında *Lentinula* türlerinin *P. ostreatus* ve *Collybia dryophila* gruplarından yaklaşık % 4.0 oranında uzaklaştığını belirtmişlerdir. *Lentinula. Boryana*'nın yaklaşık % 3.5 uzaklıkta olduğunu bulmuşlardır. *Lentinula boryana*, *Lentinula* cinsinden ayrılan en erken soy olarak kabul edilirken, bu moleküler filogenetik çalışmanın, *Lentinula*

türleri arasındaki filogenetik farklılıklarını vurgulamakta ve en son sınıflandırma tabanlı morfolojik karakterlerini desteklemektedir.

Ito vd. (1998), çalışmalarında 12 farklı RAPD primeri kullanarak *Coprinus* türleri arasındaki farklılıkları belirlemeye çalışmışlardır. Elde edilen RAPD profillerinin aynı türün örnekleri arasında benzer ve birçok ortak DNA bandının türe özgü olduğunu göstermişlerdir.

Park vd. (1999), *Coprinus* ve *Psathyrella* cinslerini içeren örneklerden rDNA genlerinde ITS-I ve ITS-II bölgelerini PCR ile çoğaltmışlar ve dizi analizlerini yapmışlardır. ITS dizilerini türlerin karşılaştırılmasında kullanarak türler arasında yüksek oranda homoloji tespit etmişlerdir.

Hopple ve Vilgalys (1999), *Coprinus* cinsi ve yakın akrabaları arasındaki filogenetik ilişkileri araştırmak için büyük alt birim (LSU) rDNA genlerindeki dizi bilgilerine dayanan bir çalışma yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre *Coprinus* cinsinin monofiletik olmadığını, polifiletik olduğunu göstermişlerdir.

Ito vd. (1999), *Coprinus* ve *Tricholama* cinslerinin misellerinden izole ettikleri DNA örneklerinde RAPD-PCR yöntemini kullanarak türe özgü DNA bantları elde ederek türlerin ayrımını belirlemeye çalışmışlar ve elde ettikleri 192 RAPD fragmenti ile oluşturdukları kümeleme analizi ile *Tricholama* türlerinin ayrımını doğrulamışlardır.

Kesarwani vd. (2000), *Collybia velutipes*'de oksalat dekarboksilaz enzimini elde ederek, transgenik tütün ve domateste mantar enfeksiyonuna direnç kazandırmak için moleküler çalışma yapmışlardır.

Glen vd. (2000), basidiomycetes mantarlarında PCR-RFLP tekniklerini kullanarak identifikasyonu sağlamışlardır. Avustralya bölgelerinde basidiomycetes fungusların nükleer ribozomal DNA'daki ITS primer çiftlerinin spesifikasyonu ITS-I-F/ITS-B'lerinkilerle karşılaştırmışlar, PCR ve RFLP yapmışlar ve bu bölge mantarlarının 28 familyaya ait 91 tür altında toplamalarını sağlamıştır.

Nuytinck vd. (2004), *Lactarius tesquorum* ile yaptıkları çalışmada türün anatomik ve moleküler özelliklerini, morfolojik olarak yakınlıklarını tanımlamışlardır. Ayrıca Avrupa'daki ilişkili *Lactarius tesquorum* ile birlikte *Piperites* subgenusunda sınıflandırılan *Lactarius* türlerini iki ana kümeye ayırmışlardır. *Lactarius mairei* ve *Lactarius spinosulus*'un diğer taksonlardan daha uzak olduklarını göstermişlerdir.

Shimono vd. (2004), *Russula* ve *Lactarius* cinslerinin moleküler filogenisini büyük alt ünite rDNA dizilerini kullanarak araştırmışlardır. Analizler sonucunda *Russulaceae* ailesini altı gruba bölmüşlerdir. *Lactarius* cinsi büyük ve monofiletik bir klad oluşturmuştur. Buna rağmen *Russula* cinsinin monofilisinin net olmadığını belirterek nükleer LSU rDNA bölgesi, *Russula* türlerinin tanınmasında faydalı bir araç olduğunu ve *Russula*, *Lactarius* cinsleri arasındaki filogenetik ilişkilerle ilgili bilgi sağlayabileceğini vurgulamışlardır.

JunZhi vd. (2004), Japonya, USA, Malezya, Filipinler, Kolombiya ve Çin'den elde edilen *Aschersonia*'nın dört türüne ait 11 izolat ile yapılan çalışmada 17 RAPD primeri karakterize etmişlerdir. Sonuç olarak *Aschersonia* izolatları arasındaki genetik çeşitlilik RAPD analizleriyle belirlenirken bu cinsin teşhis ve sınıflandırılmasında bu yöntemin kullanılabilirliğini ortaya çıkarmışlardır.

Stajic vd. (2005), *Pleurotus* cinsinden elde edilen genetik veriler için RAPD-PCR kullanmışlardır. Toplamda 260 farklı bant (en az bant 25 ve en fazla bant 59) elde etmişlerdir. Türlerin morfolojik ve moleküler gruplaması arasında iyi bir korelasyon gözlemişlerdir. Bazı türler arasında tutarsızlık gözlenmiştir. Bazı türler arasındaki moleküler genomik ilişkilerin morfolojik gruplandırma ile eşleşmediğini tespit etmişlerdir. Türlerin bir taksonomik gruba veya evrimsel soya hassas bir şekilde yansması için daha ileri moleküler kriterler uygulanmasını vurgulamışlardır.

Cui vd. (2008), *Albatrellus* cinsine ait türlerin teşhisinde morfolojik karakterlerin yanı sıra nükleer ribozomal DNA'daki ITS bölgelerinden de faydalanmışlardır. *Albatrellus piceiphullus*, *Albatrellus citrinus*, *Albatrellus ovinus*, *Albatrellus similis* arasında yakın ilişki olduğunu ve *Albatrellus syringae*'nin diğer türlerden uzaklaştığını

belirtmişlerdir. *Albatrellus syringae*'nin ITS dizilerinin diğer *Albatrellus* türlerinden belirgin bir şekilde farklı olduğunu söylemişlerdir.

Çebi vd. (2008), fungal sistematiğe moleküler gelişmeler hakkında bilgiler vermişlerdir. Mantar sistematiğinde değişikliğin meydana geldiği ilk moleküler olan DNA üzerinde yapılacak çalışmaların güvenilir sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir.

Jang vd. (2009), *Coprinus comatus* türünün genetik ilişkilerini değerlendirmek için 12 RAPD primeri kullanmışlar ve UPGMA analizi ile oluşturdukları dendrograma göre bu türü üç grupta toplamışlardır.

Isu vd. (2013), *Cholorophyllum molbdites*, *Lentinus squarrosulus*, *Daedalea elegans*, *Pleurotus ostreatus* ve *Agaricus bisporus*'un genetik özelliklerini RAPD-PCR yöntemini kullanarak çalışmışlardır. *A. bisporus* türünde 300-900 bç arasında değişen 37 bant, *L.squarrolus* türünde ise 19 bant elde etmişlerdir. *C. molbdites* türünde 66 bant *L. squarrosulus* 59 bant ve *D. elegans* 50 bant elde etmişlerdir. Sonuçlara göre 5 türün genetik uzaklık katsayılarının %52-72 arasında değiştiğini göstermişlerdir. Çalışmalarında RAPD-PCR yönteminin genetik ilişkilerin belirlenmesinde başarılı bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Çöl vd. (2017), *Schizophyllum* türünün DNA izolasyonunu yapmışlar ve ITS gen bölgesini PCR ile çoğaltarak saflaştırmışlardır. ITS geninin dizi analizlerinin verdiği sonuca göre *Schizophyllum commune* türüne % 100 benzerliğe sahip olduğunu göstermiştir. Örneğin *Schizophyllum commune* olduğunu moleküler yöntemlerle ortaya koymuşlardır.

1.3. Genel Bilgiler

1.3.1. Türlerin Sistematikteki Yeri

Divisio : *Basidiomycota*
Classis : *Agaricomycetes*
Ordo : *Agaricales*
Familya : *Omphalotaceae*
Genus : *Collybia*
Species : *Collybia dryophila* (Güncel isim: *Gymnopus dryophilus*, Index fungurum, Erişim tarihi 25.06.2018)

Divisio : *Basidiomycota*
Classis : *Agaricomycetes*
Ordo : *Agaricales*
Familya : *Tricholomataceae*
Genus : *Collybia*
Species : *Collybia tuberosa*

1.3.2. *Collybia* Cinsinin Özellikleri

Collybia'da şapka sap kısmına farklı şekillerde bağlanır ancak hiçbir şekilde aşağı sarkık olmayan alt kısma sahiptir, kısmi yüksükten ve sapta halkadan yoksundurlar. *Collybia* cinsinin sap yapısı kıkırdağımsı, ince etli, beyaz. Krem rengi veya pembemsi-tan renginde spor izine sahip olup boyutları küçük ile orta arasında değişir. Bu üyeler etleri parçalandığında çeşitli kokular yayar ancak hiçbiri nişasta benzeri bir kokuya sahip değildir. Sporlar genellikle amiloid olmakla birlikte çok azı dekstrinoid özellik gösterir. Her ne kadar bir kısmı yenilebilir olsa da bunların sayısı azdır ve büyük bir kısmının yenilebilirliği hakkında bir bilgi bulunmamaktadır (Bessette vd., 1997; Evenson 1997; Arora 1997).

1.3.3. *Collybia dryophila*'nın Morfolojik, Mikroskopik ve Ekolojik Özellikleri

Şapka: 1-5 (7) cm genişliğinde, kavisli, genişçe dışa doğru kabarık, zamanla yukarı kalkık ve hatta sıklıkla dalgalı kenarlı, bazen ise hafif kabarık; düz yüzeyi nemlidir. Gençken kestane kahverengi ile kırmızımsı kahverengi, sarımsı kahverengi veya koyu sarı arasında, kurduğunda ise sarımsı kahverengi veya koyu sarı arasında değişen renklere sahiptir. İnce etli, beyazdır.

Lamel: Çok yapılı, genellikle çentikli ve beyaz veya çok soluk sarı renklidir.

Sap: 2-8 cm uzunluğunda, 2-6 mm kalınlığında, sert ve eşit veya şişkin tabanlı, ince, düz, oyuk; soluk krem renğinde veya şapka kısmının rengine sahiptir. Tabanda veya toprağa yakın kısımda beyaz renklidir.

Spor İzi: Beyaz veya soluk krem renğinde, sporlar 5-7 x 2-3,5 µm, eliptik, düzdür.

Yenebilirlik: Yenilebilirdir. Ancak bazı insanlar bu türe karşı hassastır. Yalnızca baş kısımları yenilebilir düzeydedir. Civa topladığı bilinir ancak civa birikme sonucu zehirlenmeye neden olduğundan kazara yenmesi bir tehlike arz etmez.

Yetişme Yeri: Ormanlık alanlarda veya ağaç diplerinde toplu halde veya küçük öbekler halinde yaşarlar. Genellikle yay ve halka oluştururlar. Geniş bir çevreye yayılırlar. Genellikle ilk sonbahar yağmurlarıyla çokça ortaya çıkar ancak daha sonra iyice seyrekleşirler. Adından anlaşılacağı üzere, meşe ağacını oldukça severler ancak çam veya diğer kozalaklı ağaçların altında da yaşarlar. Bununla birlikte ağaç parçası birikintilerinin kenarlarında da görülür. Yüksek rakımlı yerlerde genellikle bahar, yaz ve sonbahar aylarında ortaya çıkarlar (Bessette vd., 1997; Evenson 1997; Arora 1997).

1.3.4. *Collybia tuberosa*'nın Morfolojik, Mikroskobik ve Ekolojik Özellikleri

Şapka: 3-10 mm çapında, dışa doğru kabarık, düz veya merkezden basık arasında değişir. Kuru, beyazımsı ya da ten renginde ve bazen de merkezinde koyu renklidir. Oldukça ince ve beyaz etlidir.

Lameller: Beyaz veya nadiren pembeye yakın bir renge sahiptir. Şapka kısmı ve sap kısmına bitişiktir. Birbirlerine yakın veya kalabalık bir şekilde görülürler.

Sap: 1-3 cm uzunluğunda, 1 mm'ye kadar kalınlıkta, eşit, kuru, çok az aşağıya kıvrık, beyaz veya ten rengine yakın, genellikle turuncu-kahverengiden kırmızımsı kahverengiye dönmekte ve yumruya benzer yapıdadır.

Spor İzi: Beyaz renkli, sporlar 3-6 x 2-3 µm ebatında, eliptik, düzdür.

Yetiştirme Yeri: Özellikle *Russula* ve *Lacratius* türleri ve eski mantarların kararmış kalıntıları üzerinde koloni şeklinde yaşamaktadır. Bazen humusta da görülür ve geniş yayılıma sahiptirler (Bessette vd., 1997; Evenson 1997; Arora 1997).

1.3.5. Türlerin Türkiye'deki Yayılışı



Şekil 1.1. *Collybia dryophila*'nın Türkiye'deki yayılışı

Balıkesir (Yılmaz, vd. 1997), Doğu Karadeniz (Sesli ve Tüzen, 1999, 2000), Samsun (Pekşen ve Karaca, 2000), Konya (Hadim) (Öztürk, vd. 2000), Bitlis (Kaya, 2001), Kayseri-Yeşilhisar (Kaşık, vd. 2002), Alanya (Öztürk, vd. 2003), Kayseri (Kaşık, vd. 2003), Konya-Bozkır (Aktaş, vd. 2003), Samsun (Pekşen ve Karaca, 2003), Artvin-Şavşat (Demirel, vd. 2004), Batı Anadolu (Öner ve Gezer, 2004), Samsun (Pekşen ve Karaca, 2003), Antalya (Aktaş, vd. 2006), Gaziantep (Kaya ve Akan, 2006), Gümüşhane (Uzun, vd. 2006), Kahramanmaraş (Kaya, 2006), Osmaniye (Bahçe) (Günay ve Demirel, 2006), Ankara (Akata, vd. 2009), Nevşehir (Gülşehir) (Türkecul, vd. 2010), Bolu (Avdan) (Türkecul ve Mersin, 2012).



Şekil 1.2. *Collybia tuberosa* 'nın Türkiye'deki yayılışı

İstanbul (Selik ve Sümer, 1982), Ankara (Akata, vd. 2009), Kahramanmaraş (Kaya, 2009), Çankırı (Öztürk, vd. 2010).

1.4. Moleküler Sistemik

Mantarların sınıflandırılmasında morfolojik, biyokimyasal ve mikroskopik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Gelişen moleküler yöntemler mantar sistematğinde

de etkisini göstermiştir (Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008). Morfolojik yöntemlerle teşhis edilen mantarların moleküler çalışmaları yapıldığında oldukça farklı sonuçlara ulaşılabilmektedir. Morfolojik ve moleküler yöntemlerin bir arada kullanılması daha güvenilir sonuçlara ulaşılmasını sağlayacaktır (Taylor vd., 2000).

Mantarlardaki moleküler çalışmalar gelişen teknolojiler ile hızla ilerlemiştir. Mantarların orjinlerinin belirlenmesinde, diğer canlılar aleminden hangi zamanda ayrıldığıнын belirlenmesinde, akrabalık derecelerinin belirlenmesinde, gen karakterizasyonunda moleküler filogenetik çalışmalar başarıyla kullanılmıştır (Blackwell vd., 2006; Taylor ve Berbee 2006; James vd., 2006).

Mantarlardaki filogenetik çalışmalarda 18S rDNA, 28S rDNA ve ITS gibi çekirdek ve mitokondriyel DNA bölgeleri ayrıca RPB1, RPB2, EF- 1 α gibi protein kodlayan baz dizileri yaygın olarak kullanılmaktadır (Taylor ve Berbee, 2006; Hibbett, 2006; Sugiyama vd., 2006).

Moleküler çalışmalarda genellikle DNA molekülü kullanılmaktadır. DNA evrimsel değişikliğin ilk ortaya çıktığı yapıdır ve bundan dolayı yapılan çalışmalar daha güvenilir sonuçlar verebilmektedir (Taylor vd.,2000).

Protein sentezi tüm organizmalarda görülen ortak bir özelliktir. Burada görevli rRNA lar evrimsel ilişkiyi ayırt edebilmek için kullanılan önemli moleküllerdir. Funguslarda rRNA gen kümesi (çekirdek rDNA) ardışık tekrarlanan rDNA birimleri olarak organize olmuştur. Her birimde küçük rRNA geni (18S vb.), 5.8S rRNA geni ve büyük rRNA geni (28S vb.) olmak üzere üç rDNA geni bulunmaktadır. Funguslarda moleküler çalışmalar için kullanışlı olan korunmuş diziler büyük alt birim (LSU) ve küçük alt birim (SSU) genlerinde bulunur. Alt birimler arasındaki bölgeleri, ITS (transkripsiyonu yapılamayan bölgeler) ve IGS (genler arası bölge) olarak isimlendirilir. Bunlar alt birim dizilerinde değişken olup cins içinde türler arası veya tür içi çalışmalarda kullanılmaktadır. ITS ve IGS (kodlanmayan bölge) daha hızlı evrim geçirmekte ve tür içindeki suşların karşılaştırılması için kullanışlıdır. ITS bölgesi dört nedenle fungusların karakterizasyonu için kullanışlıdır (White vd., 1990; Bruns vd., 1991; Lee ve Taylor, 1992).

1. Transkripsiyonu yapılamayan bölgeler (ITS) küçük bölgelerdir (500-800 bp) ve rRNA alt birimleri içindeki korunmuş bölgelerin komplementeri kullanılarak PCR tekniği ile kolaylıkla çoğaltılabilir.
2. Morfolojik olarak farklı türler arasında transkripsiyonu yapılamayan bölgeler (ITS) oldukça değişkendir ve ITS-RFLP restriksiyon verileri genetik uzaklığı tahmin etmek için kullanılabilir ve filogenetik, sistematik analizler için karakterler sağlayabilir.
3. ITS türe özgü problemleri, bir kromozomal kütüphane oluşturmaya gerek kalmaksızın hızlı bir şekilde PCR tekniği kullanılarak üretilir. Dizilerin tekrarlayan şekilde olması ve türler arasında değişken, tür içinde benzer olma eğiliminde olmasından dolayı türe özgü problemleri geliştirmek için diziler ITS bölgesinden seçilmektedir.
4. rDNA birimlerinin çok sayıda tekrarlarının olmasından dolayı, seyrek ya da aşırı DNA örneklerinden bile ITS bölgesi kolaylıkla çoğaltılabilir (White vd., 1990; Bruns vd., 1991; Lee ve Taylor, 1992; Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008).

1.4.1. Moleküler Markörler

Markör; tam yeri ve büyüklüğü bilinmeyen genlerin kalıtımını izlemede kullanılan, yeri ve etkisi bilinen bir gen ya da DNA parçasıdır. Moleküler markör genomda herhangi bir gen bölgesi veya gen bölgesi alakalı DNA parçasıdır (Ridout ve Donini, 1999).

Moleküler markörlerin güvenilir olması, tekrarlanabilir özellikte olması, genomda birden fazla bölgeyi belirlemesi, çevre koşullarından etkilenmemesi, kodominat ve dominant özellik göstermesi, bütün dokularda kullanılması gibi birçok özelliğe sahip olması gerekir (Bostein, 1980; Williams, 1990).

Moleküler markörler, moleküler yöntemlerle yapılamayan değerlendirmelerde tanımlanmamış olan taksonları ayırt etmede önemli bir fayda sağlar. Nadir ve nesli tükenmekte olan türler içinde aralarındaki filogenetik ilişkileri ortaya çıkararak koruma biyolojisi alanına hizmet eder. Moleküler markörler tarafından belgelenen hibridizasyon ve genetik girişimleri tehlike altındaki birçok türün durumuyla ilgili hem biyolojik hem de yasal sorunları gündeme getiren önemli araçlardır. Filogenetik ilişkilerin moleküler değerlendirmelerinde önemli yer tutar. Moleküler markörler melez organizmaların tanımlanmasında ve karakterize edilmesinde de önemli bir araçtır (Avice, 1993).

Kullanılan yöntemler bakımından moleküler markörler, Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) dayalı markörler ve Hibridizasyona dayalı markörler olarak iki ana gruba ayrılabilir (Kesawat ve Das, 2009).

1.4.2. Hibridizasyona Dayalı Markörler

İlk olarak DNA-DNA hibridizasyon tekniği geliştirilmiştir. Farklı türlere özgü DNA eksenlerinden oluşan sarmal bir hibrit DNA molekülünün oluşturulmasına dayanan bir tekniktir. 1980 yıllarında filogenetik ilişkilerin açıklanmasında kullanılmıştır. Genom hakkında ön bilgiye sahip olunması gerekliliği ve uygulamadaki zorluklar nedeniyle yerini PCR temelli yöntemlere bırakmıştır (Avice 2004).

1.4.2.1. RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi / Restriction Fragment Length Polymorphism)

Sarmal DNA molekülünü kesen restriksiyon enzimlerinin keşfedilmesi ile moleküler biyoloji alanında birçok gelişme yaşanmıştır. Bu teknik DNA düzeyinde polimorfizm elde etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır ve ilk olarak kullanılan moleküler markördür (Botstein vd., 1980).

Genomik DNA'nın özgün DNA dizilerini tanıyan restriksiyon enzimlerince kesilmesi ve DNA'nın meleziendiği DNA etrafındaki farklı kesim yapılarının saptanmasına dayanan bir yöntemdir. PCR temelli olmayan ilk markör sistemi olup kodominant özelliğindedir (Bark ve Havey, 1995). Kodominant özelliğinden dolayı heterozigot bireyler karakterize edilmektedir.

1.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) Dayalı Markörler

1.4.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, DNA'nın hücreden ayrı bir ortamda milyonlarca kopyasının sentezini içermektedir. PCR, oldukça basit, özgün, duyarlı bir yöntemdir (Saiki vd., 1985; Mullis, 1990).

PCR, DNA'nın denatüre olması (Denaturation), primerin açılan zincire yapışması (Annealing), primerin uzaması (primer extension) olmak üzere 3 temel aşamadan oluşmaktadır. Bu 3 aşama bir zincir reaksiyonu oluşturur ve DNA molekülü popülasyonların katlanan bir biçimde artmasını sağlar. PCR, otomosyonla birkaç saat içinde hedef DNA segmentinin milyarlarcasını yapabilir (Watson vd., 1992; Hadidi vd., 1995; Innis ve Gelfand 1990).

Mullis vd. tarafından 1985 yılında PCR kullanılarak yapılan ilk çalışmalardan bu yana, bu teknik biyolojik araştırmalarda ve biyoteknolojik alanlarda büyük etki yapmıştır.

PCR, DNA'ya dayalı yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. PCR tekniğinin gelişimi ile farklılıkların belirlenmesi ve tanımlanması için pek çok moleküler teknik geliştirilmektedir (Ayad vd., 1997).

Mantarların genetik karakterizasyonu ve sınıflandırılmasında kullanılan PCR temelli yöntemler bulunmaktadır. Mikoloji alanında PCR ile ilgili ilk çalışmalardan birini White ve arkadaşları 1990 yılında yapmışlardır. Bu çalışma mantarların taksonomik ilişkilerini araştırmak için rDNA'nın amplikasyonu ile ilgilidir (White vd.,1990).

Mantarların sınıflandırılmasındaki karışıklıklar kimi zaman aynı taksona farklı isim verilmesi ya da farklı organizmalara aynı isim verilmesine neden olabilmektedir. PCR ile genetik farklılıkların belirlenmesi ve tanımlanması ile bu karışıklıklar ortadan kalkmaktadır (Kılıçoğlu ve Özkoç 2008).

1.4.3.2. RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA / Random Amplified Polymorphic DNA) - PCR Yöntemi

Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) DNA dizilişi bilinmeyen DNA fragmentlerinin analizlerinin yapılmasında kullanılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonunu temel alan bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır (Williams vd., 1990).

RAPD tekniğinin önemli avantajlarından biri çalışılan örneğin genleri ile ilgili ön bilgi gerektirmemesidir (Welsh vd., 1990).

RAPD yöntemi çok sayıdaki örneğe uygulanabilen hızlı bir tekniktir. Rasgele seçilen primerler ile PCR yapılmakta, elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmekte, örnekler arasında görülen aynı ve farklı bantlar gözlenerek sonuçlara ulaşılabilmektedir. Genetik çeşitliliğin araştırılmasında önemli ölçüde kullanılmaktadır. Bu yöntem cinslerdeki populasyon genetiğini içeren genetik analizlerde kullanılır (Williams vd., 1990; Chalmers 1992; Cenis 1993; Ashburner 1997).

Mantar karakterizasyonu ve taksonomisinde RAPD-PCR uygulamaları yoğunlukla kullanılmaktadır. DNA dizisi bilinmesine ihtiyaç duyulmadan seçilen primerler mantar DNA bölgesini çoğaltmak için kullanılabilir. RAPD yöntemi türlerarası ve tür içi mantarların ayırt edilmesinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008).

1.4.3.3. AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi / Amplified Fragment Length Polymorphism)

Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP) yöntemi genomik DNA'nın iki restriksiyon enzimi ile kesilmesi ve kesilen parçacıkların, kullanılan enzimlere uygun bağlayıcılarla bağlanması temeline dayanmaktadır (Avisé 2004). AFLP'nin polimorfizmi oldukça yüksek olup genom hakkında herhangi bir bilgi olmadan uygulanabilen bir tekniktir. Teknik, genom haritalarının yapılmasında, genom değişikliklerinin belirlenmesinde, yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Vos vd., 1995).

1.4.3.4. ISSR (Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm / Inter Simple Sequence Repeat)

Polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı bir teknik olan ISSR birbirine yakın olan SSR'ler arasındaki nükleotitler çoğaltılır. Elde edilen ürünler elektroforezde yürütülerek karşılaştırılır. Dominant markörler üretirler ve heterozigotların homozigotlardan ayırt edilmesi güçtür (Zietkiewicz vd., 1994).

1.4.3.5. SSR (Basit Tekrarlı Diziler veya Mikrosatellitler / Simple Sequence Repeat)

Mikrosatelit olarak adlandırılan SSR, genom boyunca dağılmış olan birbiri ardına gelen tekrarlayan baz dizilerinin bir sınıfı olarak keşfedilmiştir. Tekrarlayan 2–6 bp uzunluğunda tüm genoma rastgele dağılmış dizilerdir, türlerde ve kromozomlarda dağılımı çeşitlidir (Chambers 2000). Her bir mikrosatelit lokusu, tekrarlanan alellerden oluşan, kopya sayısındaki varyasyonlarla birlikte ardışık dizilmiş özel kısa sekanslardan oluşur. Örneğin insanlarda yüzlerce mikrosatellit lokusu karakterize edilmiştir. Gen akışı tahmini mikrosatellitler, populasyonların tanımlanması, genom haritalaması, filogenetik ile evrim çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Avisé 2004).

1.4.3.6. CAPS Markörleri (Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler/ Cleaved Amplified Polymorphic)

DNA'nın PCR yöntemi ile çoğaltılıp, oluşan ürünlerin restriksiyon enzimleri ile kesilerek agaroz jelde elektroforez yardımıyla yürütülmesini, yürütme sonucu fragmentlerin karşılaştırılmasını ifade eder (Konieczny ve Ausubel, 1993).

1.4.3.7. SCAR (Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler / Sequence Characterized Amplified Regions) Yöntem

SCAR tekniğinde RAPD ile elde edilen DNA bantları kopyalanıp DNA baz dizileri belirlenir. Bu farklılık gösteren DNA'ya 18-24 baz uzunluğunda özgün primerler eklenerek PCR çalışmasında kullanılmaktadır (Weising vd., 1995).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışmada Basidiomycota - *Omphalotaceae* familyasından *Collybia dryophila* ve *Tricolomataceae* familyasından *Collybia tuberosa* türleri kullanıldı. Mantar örnekleri Kırıkkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden temin edildi. Kullanılan *Collybia* suşları Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan *Collybia* türleri

Sıra Numarası	Tür Adı
1	<i>Collybia dryophila</i> 144
2	<i>Collybia dryophila</i> 146
3	<i>Collybia dryophila</i> 152
4	<i>Collybia dryophila</i> 155
5	<i>Collybia dryophila</i> 156
6	<i>Collybia tuberosa</i> 158
7	<i>Collybia dryophila</i> 187
8	<i>Collybia tuberosa</i> 193
9	<i>Collybia dryophila</i> 196
10	<i>Collybia dryophila</i> 198
11	<i>Collybia dryophila</i> 199
12	<i>Collybia dryophila</i> 200
13	<i>Collybia dryophila</i> 212
14	<i>Collybia dryophila</i> 327
15	<i>Collybia dryophila</i> 356

2.2. Kltr alışmaları

2.2.1. Katı Besiyerindeki alışmalar

Kuru mantar rneklerinden alınan doku parçaları patates dekstroz agar (PDA) besiyeri merkezine inoküle edildi. 27°C de, karanlıkta, 7 gün inkübe edildi. Primer miseller elde edildi. Primer misellerden alınan 8 mm çapındaki miselyal agar diskleri 9 cm'lik petrillerdeki patates dekstroz agar (PDA) besiyeri merkezine inoküle edildi. Sekonder miseller elde edildi. Kültürler +4°C'de buzdolabında korundu (Fritsche, 1972).

2.2.2. Sıvı Besiyerindeki alışmalar

Sekonder misellerden alınan 8 mm çapında dört adet miselyal agar diski içerisinde 100 mL nutrient broth bulunan besiyerine ayrı ayrı olacak şekilde inoküle edildi. Miseller 27°C de 140 rpm'de 5 gün inkübe edildi (Rangkhawong vd., 2014).

2.3. Moleküler alışmalar

2.3.1. Tampon ve zeltiler

2.3.1.1. DNA İzolasyonu İçin Gerekli zeltiler

- Stok Tris zeltisi: 500 mM Tris (pH=8).
- Stok EDTA zeltisi: 500 mM EDTA (Etilendiamin-tetra-asetik asit disodyum tuzu) (pH=8).
- Ekstraksiyon tamponu (2xCTAB tamponu): 50 mM Tris-HCl (pH=8), 10 mM EDTA (pH=8), 0.7M NaCl, %2 (w/v) CTAB (Setiltrimetilamonyum bromid).
- Kloroform
- İzopropanol
- %70'lik Alkol
- TE tamponu: 10mM Tris-HCl (pH=8), 1mM EDTA (pH=8).

2.3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Tampon Ve Çözeltiler

- Taq polimeraz tamponu 10x: 100 mM Tris-HCl (pH= 8.3), 500 mM KCl, 1 mg/mL jelatin.
- MgCl₂: 25 mM
- Nükleotit Karışımı: 25 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
- Taq polimeraz: 5 u/ µL
- Primerler: Kullanılan primerler Çizelge 2.2.' de verilmiştir.

Çizelge 2.2. RAPD-PCR Çalışmalarında Kullanılan Primerler

Primerin Adı	Primerin Dizisi (5'-----3')
M13	GAGGGTGGCGGTTCT
OPI18	TGCCCAGCCT
OPW06	AGGCCCGATG
B18	CCACAGCAGT
BA1	AGTGGAAGGT
BA5	ACCGCGAAGG
BC1	CACCGTATCC
BC2	CACCTAGTCC
OPC02	GGTCTACACC
OPB05	TGCGCCCTTC

2.3.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler

- Agaroz: %2'lik (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.
- Tris asetat (TAE) tamponu (x50) (pH= 8): 242 g Tris base, 57.1 mL Glisial asetik asit, 0.5 M 100 mL EDTA (pH 8), saf su.

- Yükleme tamponu: % 40 sukroz, % 0.025 bromofenol mavisi, % 0.25 ksilen siyanol.
- Etidyum bromür: 10 mg/mL derişimde hazırlanmış ve koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

2.4. DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan mantarlara ait türlerin genomik DNA izolasyonları Sabir (2006)'e göre yapılmıştır.

- 1- Nutrient Broth besiyerinde geliştirilen her türe ait misel örnekleri, 7000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek besiyerinden ayrılmıştır.
- 2- Örnekler sıvı azotla ezilerek toz haline getirilmiş ve 50 mg örnek alınarak 1.5 mL ependorf tüpe konulmuş ve üzerine 700 µL 2XCTAB tamponu ilave edilmiştir.
- 3- 65°C'de 30 dak. inkübe edilmiş ve üzerine 700 µL kloroform ilave edilerek karıştırılmış ve 12 000 rpm'de 30 dak. santrifüjlenmiştir.
- 4- Süpernatant yeni bir tüpe alınmış ve üstüne 600 µL isopropanol ilave edilerek -20°C'de bekletilmiş ve 5 dak. yüksek devirde santrifüjlenmiştir.
- 5- Pelet iki kez 1 mL %70 etanol ile yıkanmış ve kurutulmuştur.
- 6- Üstüne TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=7.5) eklenerek -20°C'de saklanmıştır.

2.4.1. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR)

RAPD-PCR uygulamaları için Açık vd. (1997), tarafından önerilen yöntem kullanılmış olup Çizelge 2.2. 'de baz dizilimleri verilen 10 adet rastgele seçilmiş primerlerin her biri ile hedef DNA'nın herhangi bir bölümü rastgele çoğaltılmıştır.

PCR programı:

DNA zincirinin açılması; 96°C'de 40 saniye

Primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışması; 30°C'de 40 saniye

Primer uzaması; 72°C'de 40 saniye

DNA zincirinin açılması, primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışması ve uzama

aşamaları 45 döngü olacak şekilde tekrarlanmıştır. Elde edilen PCR örnekleri -20°C’de saklanmış olup agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir.

2.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Kullanılan elektroforez (BIORAD) yatay konumda olup jel plaklarının büyüklüğü 70x70 mm’dir. %2 (w/v) agaroz, TAE tamponu içinde kaynatılarak çözüldükten sonra etidyum bromür çözeltisi eklenmiş ve jel tabağına dökülmüştür (Welsh vd., 1991). Jel polimerleştikten sonra PCR ürünü ile yükleme tamponu karıştırılarak jelde oluşturulan kuyucuklara yüklenmiştir ve 90 V serbest akımda Nyzfch DNA Ladder, (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1600, 2000, 3000, bç) ile birlikte yürütülmüştür. Jeller UV translüminatör üzerinde görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

2.4.3. Genetik Uzaklık Tayini

Her suş için her bir primer ile elde edilen PCR ürününün jel üzerinde oluşturduğu DNA bantları birbirleriyle karşılaştırılarak, bant yokluğunda 0, varlığında ise 1 olarak sayılmıştır. Türlerin genetik uzaklıklarının belirlenebilmesi için, jel üzerinde elde edilen DNA bantları birbirleriyle karşılaştırılmış ve türlerin genetik uzaklıkları PHYLIP Version 3.5 bilgisayar programı ile Nei’nin benzerlik katsayıları kullanılarak hesaplanmıştır (Nei, 1972). Kümeleme analizi için UPGMA (Unweighted Pair Group Method using the Arithmetic Average) kullanılarak dendogram oluşturulmuştur.

3. BULGULAR

3.1. Katı Besiyerindeki Gelişmeler

Kültür çalışmalarında kuru mantar örneklerinden alınan doku parçaları patates dekstroz agar (PDA) besiyerine inoküle edilerek 27°C' de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası gelişen misellerin yapısı incelendi.

3.1.1. *Collybia dryophila* 'nın Kültür Özellikleri

Collybia dryophila miselleri PDA'ya inokulasyonun 3. günü gelişmeye başladı. Yavaş gelişen miseller zonlar göstererek, merkezden başlayarak kahverengimsi ve sarımsı-kremsi pigmentasyon gösterdi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. *Collybia droyhila* misellerinin katı besiyerindeki kolonizasyonu

3.1.2. *Collybia tuberosa*'nın Kültür zellikleri

Collybia tuberosa'nın miselleri inokulasyondan 2 gün sonra gelişmeye başladı. Miseller petri kabının tamamını saracak şekilde pamuksu beyazımsı şekilde gelişti. Misellerde pigmentasyon gözlenmedi. İnokulasyonun 7. günü miseller kolonizasyonlarını tamamladı (şekil 3.2.).



şekil 3.2. *Collybia tuberosa* misellerinin katı besiyerindeki kolonizasyonu

3.2. Sıvı Besiyerinde Gelişmeler

Gelişimini tamamlayan sekonder misellerden 4'er pelet alınarak nutrient broth'a inokule edildi. Miseller 27°C'de 140 rpm'de 5 günde çalkalamalı etüvde gelişimini tamamladı. *Collybia dryophila*'nın miselleri yoğun şekilde gelişti, herhangi bir pigmentasyon gözlenmedi (şekil 3.3.). *Collybia tuberosa*'nın miselleri yumaklaşarak gelişim gösterdi ve pigmentasyon oluşturmadı (şekil 3.4.).



Şekil 3.3. *Collybia dryophila* misellerinin sıvı besiyerindeki kolonizasyonu



Şekil 3.4. *Collybia tuberosa* misellerinin sıvı besiyerindeki kolonizasyonu

3.3. Moleküler Çalışmalar

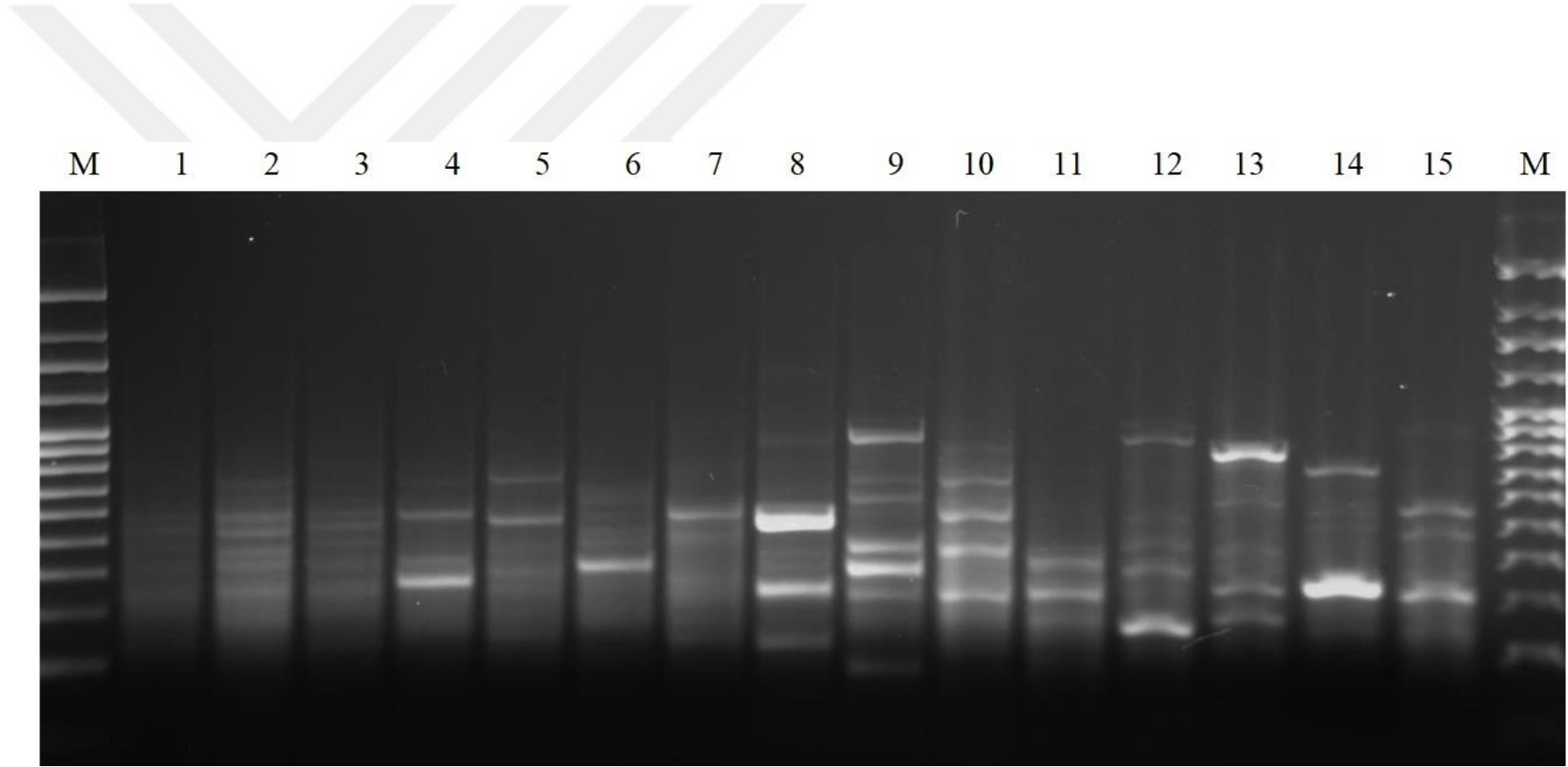
3.3.1. RAPD-PCR Yöntemi İle Elde Edilen Sonuçlar

Collybia cinsine ait *Collybia dryophila* ve *Collybia tuberosa* türlerinin yer aldığı 15 suş ile 10 adet RAPD primeri kullanılarak yapılan RAPD-PCR işlemleri sonucunda 170 farklı bant elde edilmiştir. Bu bantların hepsi polimorfik çıkmıştır. BC1 primeri

en yüksek polimorfik bant (22 bant) veren primer olmuştur. Her bir primer ile elde edilen çoğaltılmış DNA fragment sayısının 12-22 arasında olduğu gözlenmiştir ve fragment büyüklükleri 100 - 2500 bp arasında değişmiştir. Primerler ile değerlendirme yapıldığında en yüksek bant sayısının (22 bant) BC1 primeri verirken, en düşük bant sayısını (12 bant) B18 primerinde gözlenmiştir.

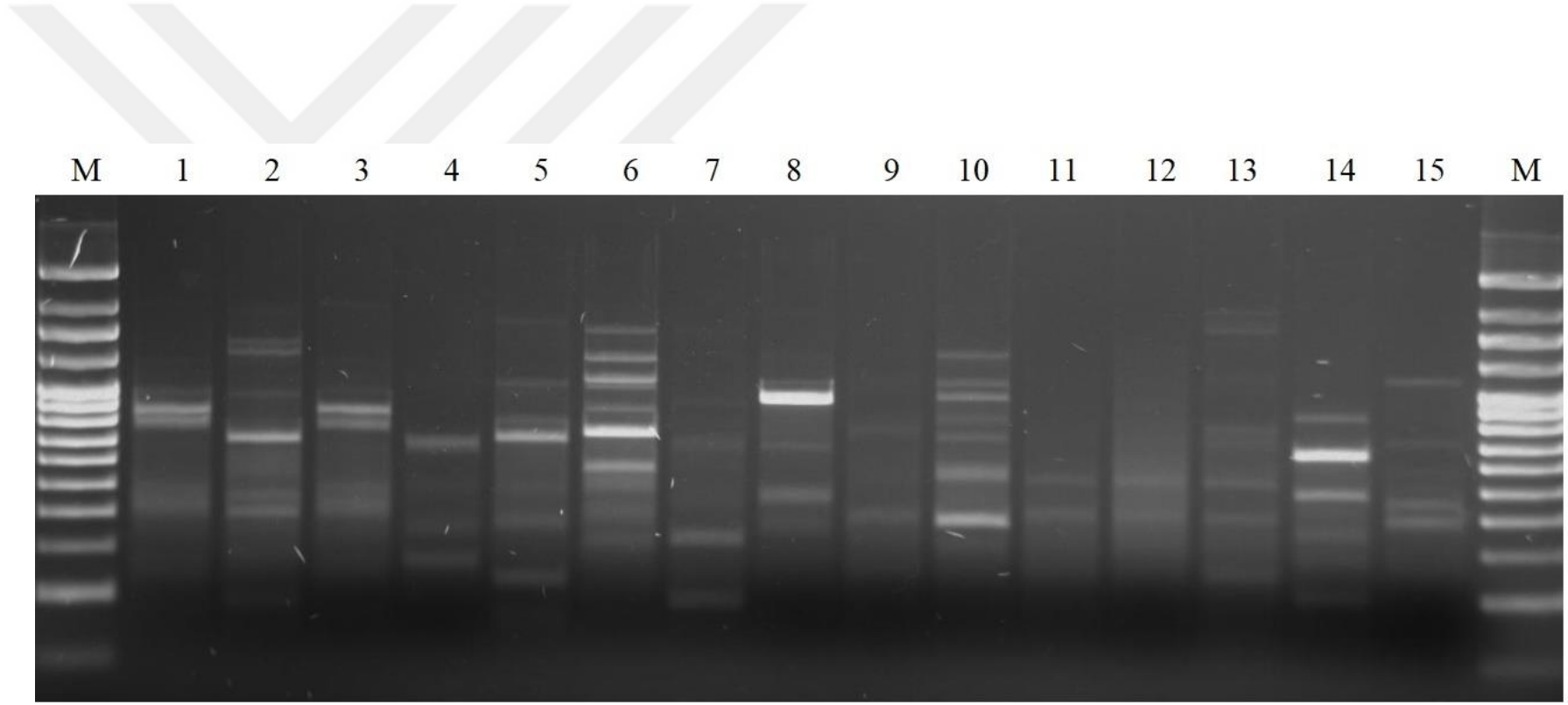
Amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüleri Şekil 3.5.- Şekil 3.14.'de verilmiştir.





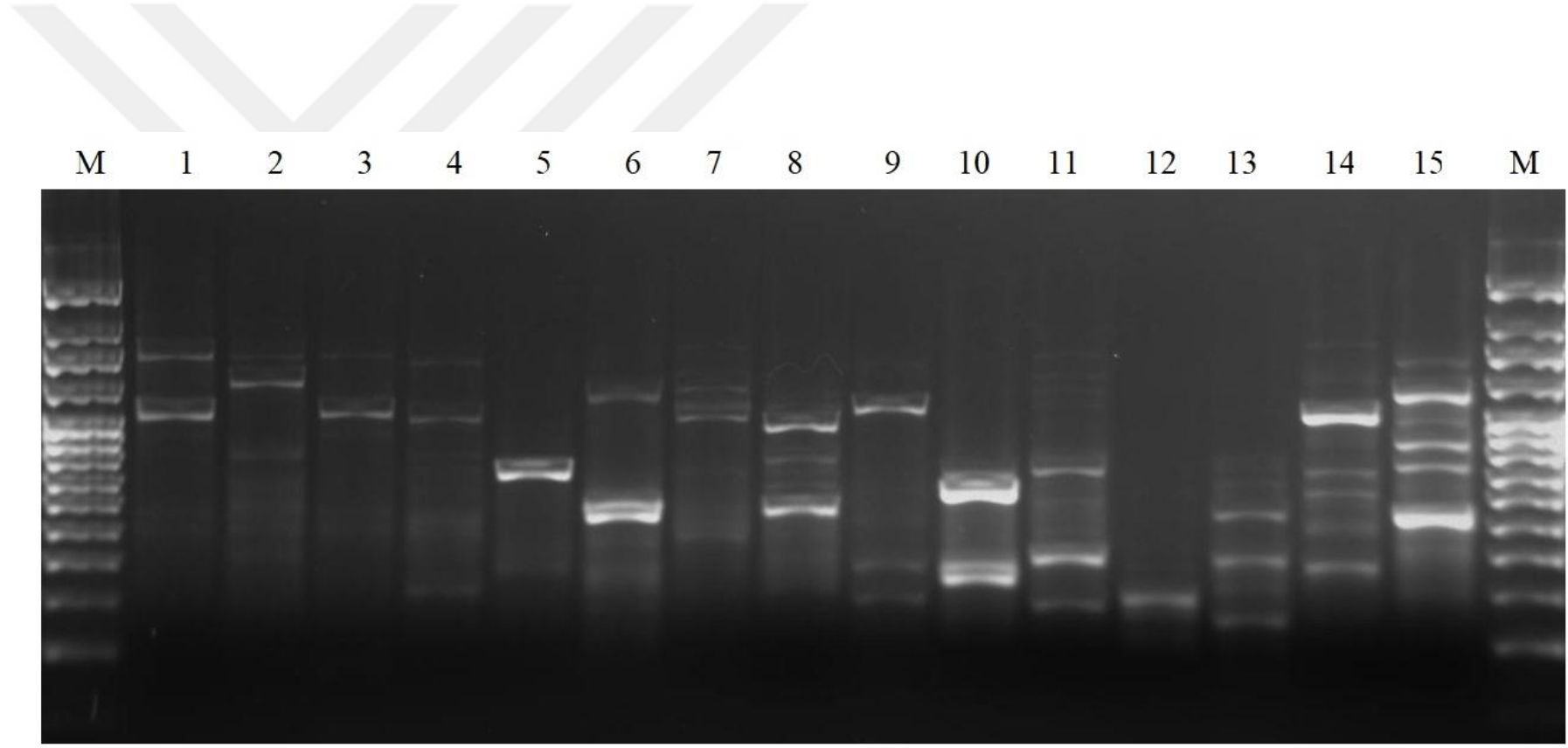
Şekil 3.5. M13 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.

M: Marker (Nyzftech DNA Ladder, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1600, 2000, 3000 bç), 1- *Collybia dryophila* – 356, 2- *Collybia dryophila* – 198, 3- *Collybia dryophila* – 199, 4- *Collybia dryophila*– 152, 5- *Collybia dryophila*– 327, 6- *Collybia dryophila*– 156, 7- *Collybia dryophila* – 187, 8- *Collybia dryophila*– 200, 9- *Collybia dryophila* – 144, 10- *Collybia dryophila* – 146, 11- *Collybia dryophila* – 155, 12- *Collybia dryophila* – 212, 13- *Collybia dryophila*– 196, 14- *Collybia tuberosa* – 193, 15- *Collybia tuberosa*– 158.



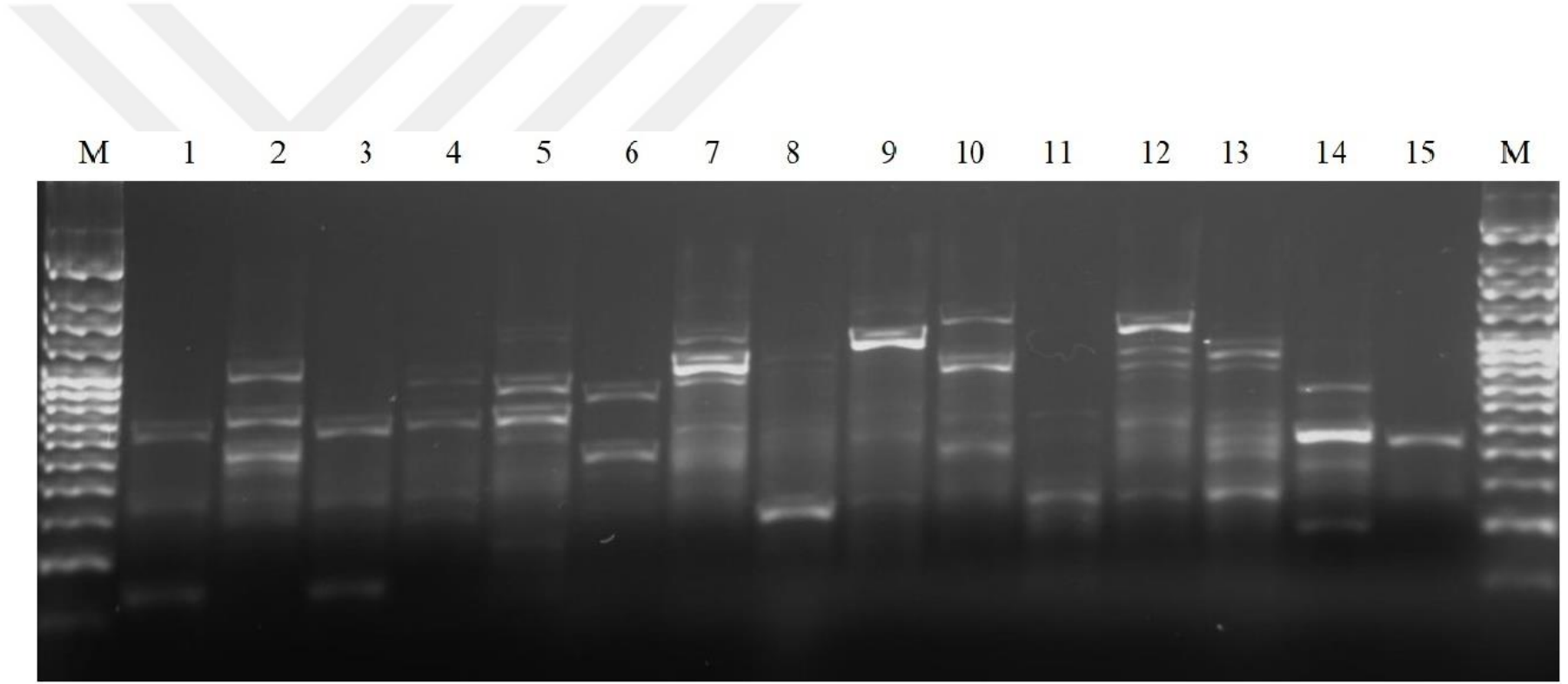
Şekil 3.6. OPI 18 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.

M: Marker (Nyzftech DNA Ladder, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1600, 2000, 3000 bç), 1- *Collybia dryophila* – 356, 2- *Collybia dryophila* – 198, 3- *Collybia dryophila* – 199, 4- *Collybia dryophila*– 152, 5- *Collybia dryophila*– 327, 6- *Collybia dryophila*– 156, 7- *Collybia dryophila* – 187, 8- *Collybia dryophila*– 200, 9- *Collybia dryophila* – 144, 10- *Collybia dryophila* – 146, 11- *Collybia dryophila* – 155, 12- *Collybia dryophila* – 212, 13- *Collyba dryophila*– 196, 14- *Collybia tuberosa* – 193, 15- *Collybia tuberosa*– 158.



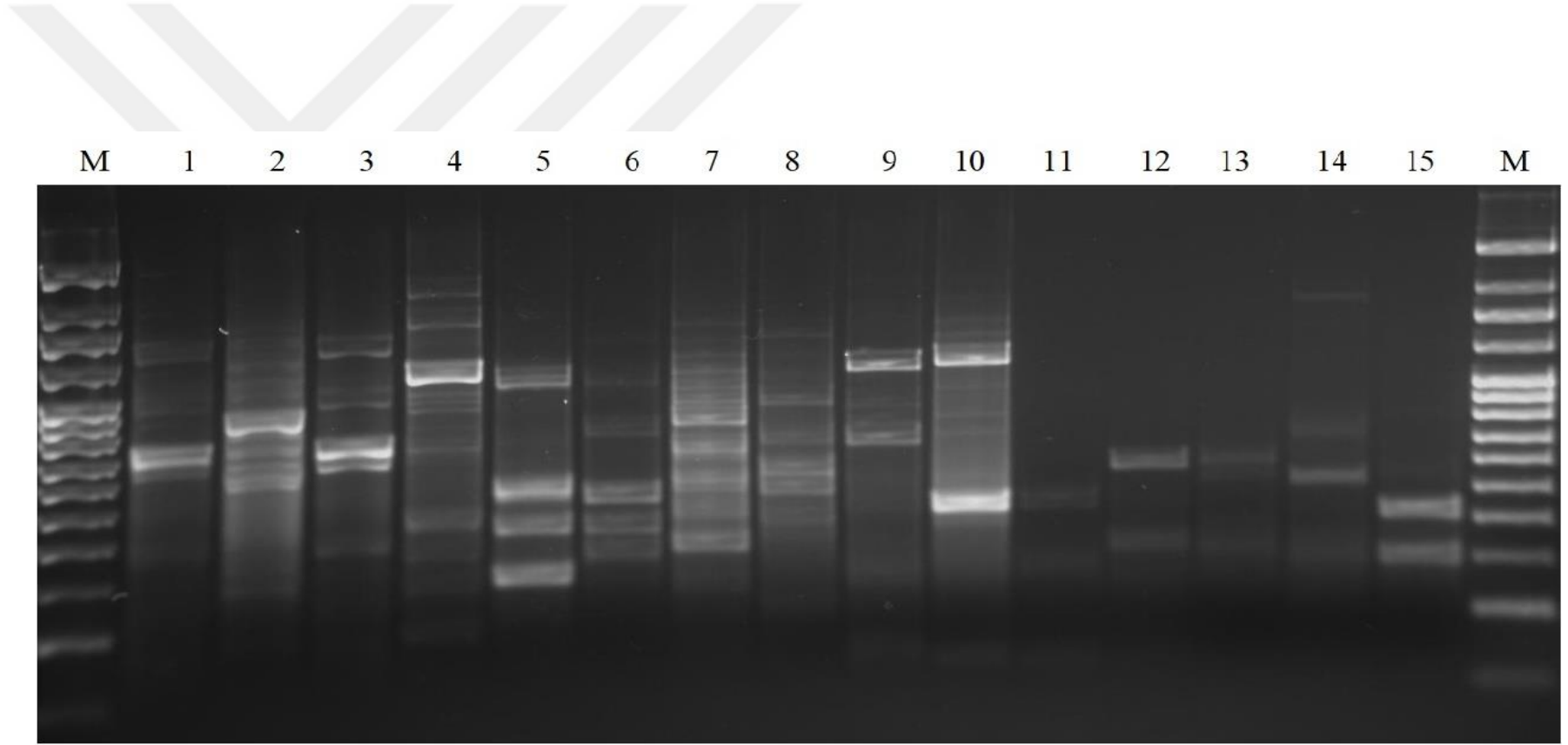
Şekil 3.7. OPW06 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.

M: Marker (Nyzftech DNA Ladder, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1600, 2000, 3000 bç), 1- *Collybia dryophila* – 356, 2- *Collybia dryophila* – 198, 3- *Collybia dryophila* – 199, 4- *Collybia dryophila*– 152, 5- *Collybia dryophila*– 327, 6- *Collybia dryophila*– 156, 7- *Collybia dryophila* – 187, 8- *Collybia dryophila*– 200, 9- *Collybia dryophila* – 144, 10- *Collybia dryophila* – 146, 11- *Collybia dryophila* – 155, 12- *Collybia dryophila* – 212, 13- *Collyba dryophila*– 196, 14- *Collybia tuberosa* – 193, 15- *Collybia tuberosa*– 158.



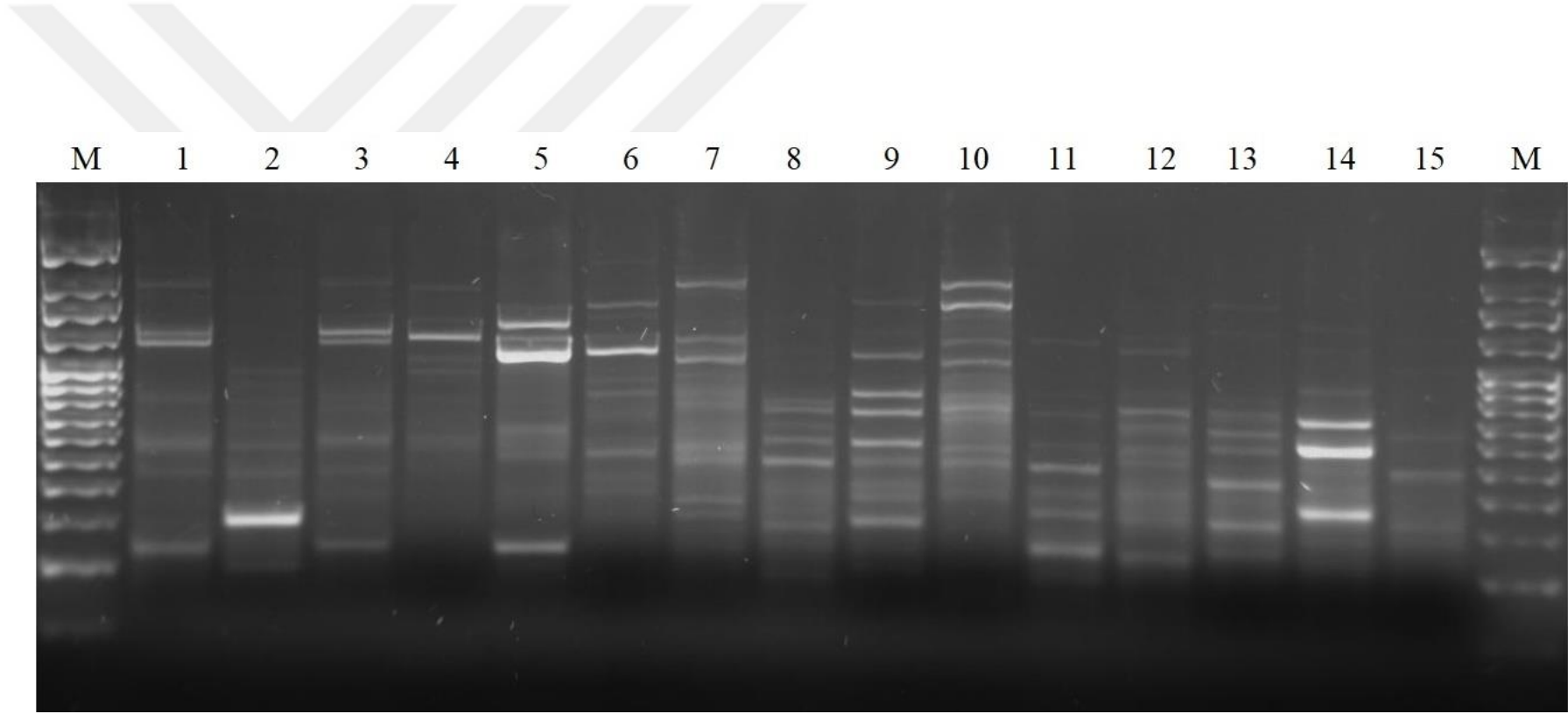
Şekil 3.8. B18 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.

M: Marker (Nyzftech DNA Ladder, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1600, 2000, 3000 bç), 1- *Collybia dryophila* – 356, 2- *Collybia dryophila* – 198, 3- *Collybia dryophila* – 199, 4- *Collybia dryophila*– 152, 5- *Collybia dryophila*– 327, 6- *Collybia dryophila*– 156, 7- *Collybia dryophila* – 187, 8- *Collybia dryophila*– 200, 9- *Collybia dryophila* – 144, 10- *Collybia dryophila* – 146, 11- *Collybia dryophila* – 155, 12- *Collybia dryophila* – 212, 13- *Collyba dryophila*– 196, 14- *Collybia tuberosa* – 193, 15- *Collybia tuberosa*– 158.



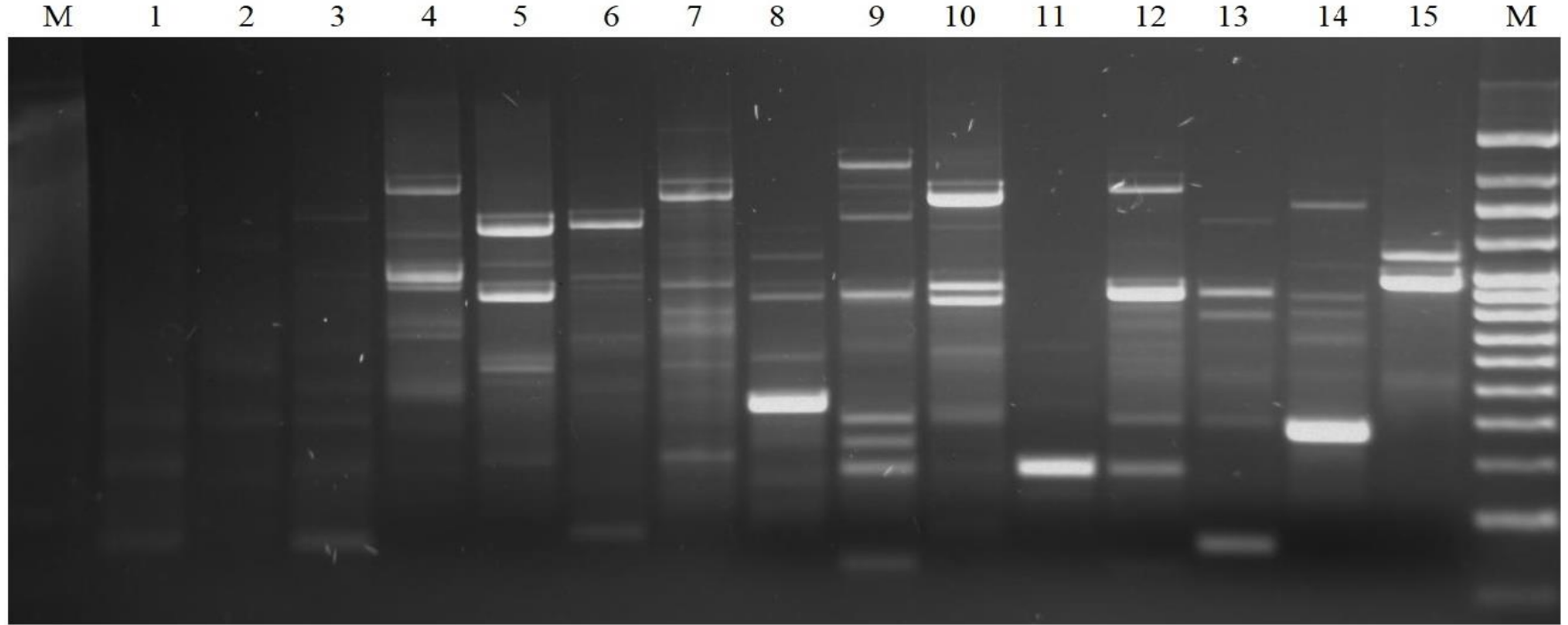
Şekil 3.9. BA1 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.

M: Marker (Nyzftech DNA Ladder, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1600, 2000, 3000 bç), 1- *Collybia dryophila* – 356, 2- *Collybia dryophila* – 198, 3- *Collybia dryophila* – 199, 4- *Collybia dryophila*– 152, 5- *Collybia dryophila*– 327, 6- *Collybia dryophila*– 156, 7- *Collybia dryophila* – 187, 8- *Collybia dryophila*– 200, 9- *Collybia dryophila* – 144, 10- *Collybia dryophila* – 146, 11- *Collybia dryophila* – 155, 12- *Collybia dryophila* – 212, 13- *Collybia dryophila*– 196, 14- *Collybia tuberosa* – 193, 15- *Collybia tuberosa*– 158.



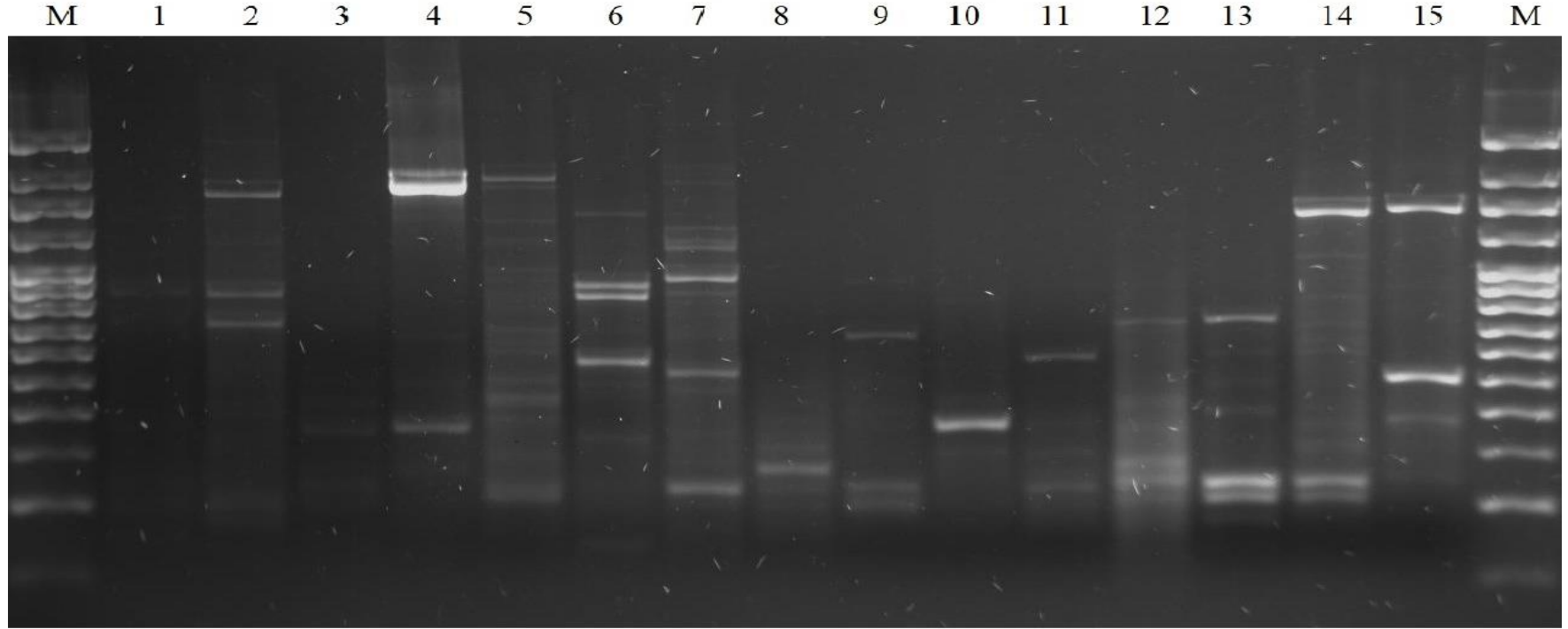
Şekil 3.10. BA5 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.

M: Marker (Nyzftech DNA Ladder, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1600, 2000, 3000 bç), 1- *Collybia dryophila* – 356, 2- *Collybia dryophila* – 198, 3- *Collybia dryophila* – 199, 4- *Collybia dryophila*– 152, 5- *Collybia dryophila*– 327, 6- *Collybia dryophila*– 156, 7- *Collybia dryophila* – 187, 8- *Collybia dryophila*– 200, 9- *Collybia dryophila* – 144, 10- *Collybia dryophila* – 146, 11- *Collybia dryophila* – 155, 12- *Collybia dryophila* – 212, 13- *Collybia dryophila*– 196, 14- *Collybia tuberosa* – 193, 15- *Collybia tuberosa*– 158.



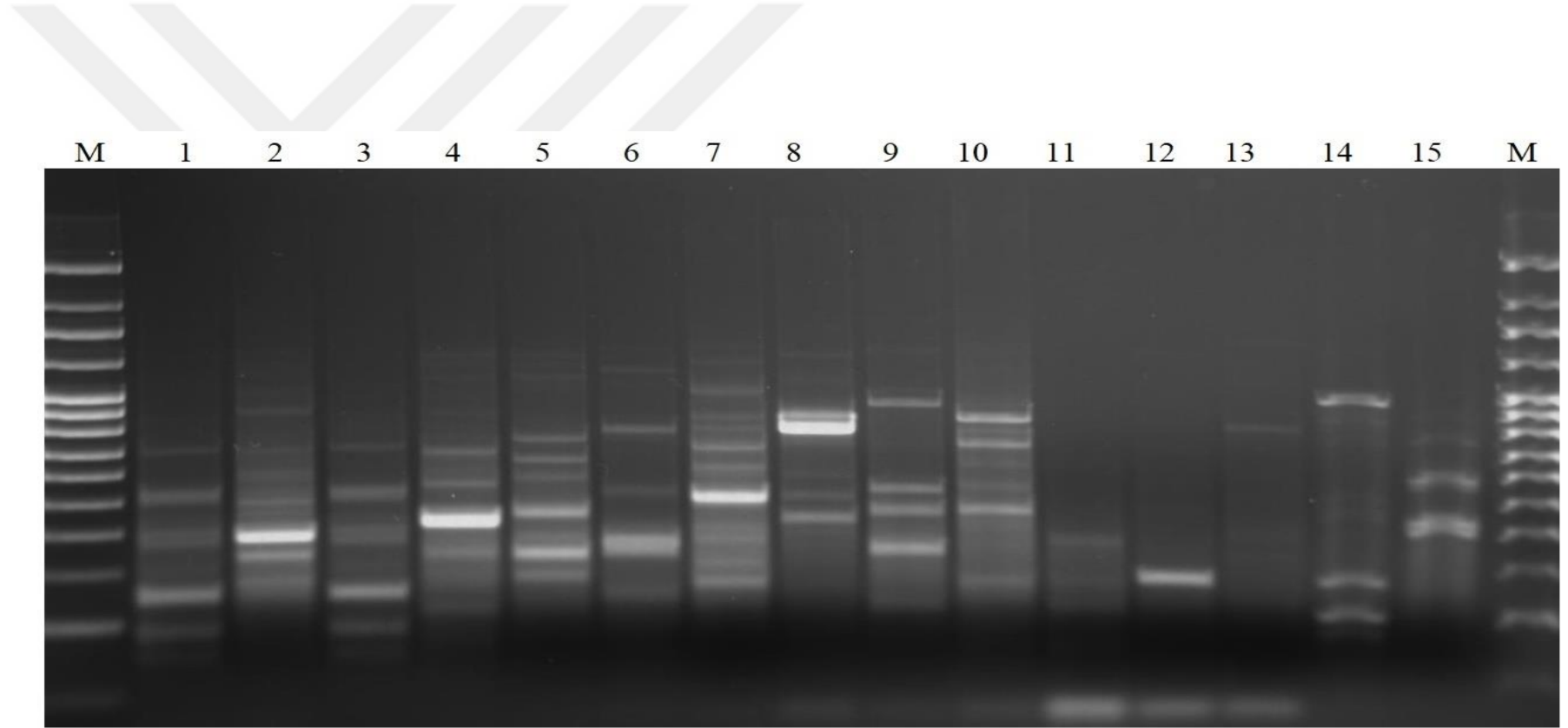
Şekil 3.11. BC1 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.

M: Marker (Nyzftech DNA Ladder, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1600, 2000, 3000 bç), 1- *Collybia dryophila* – 356, 2- *Collybia dryophila* – 198, 3- *Collybia dryophila* – 199, 4- *Collybia dryophila*– 152, 5- *Collybia dryophila*– 327, 6- *Collybia dryophila*– 156, 7- *Collybia dryophila* – 187, 8- *Collybia dryophila*– 200, 9- *Collybia dryophila* – 144, 10- *Collybia dryophila* – 146, 11- *Collybia dryophila* – 155, 12- *Collybia dryophila* – 212, 13- *Collyba dryophila*– 196, 14- *Collybia tuberosa* – 193, 15- *Collybia tuberosa*– 158.



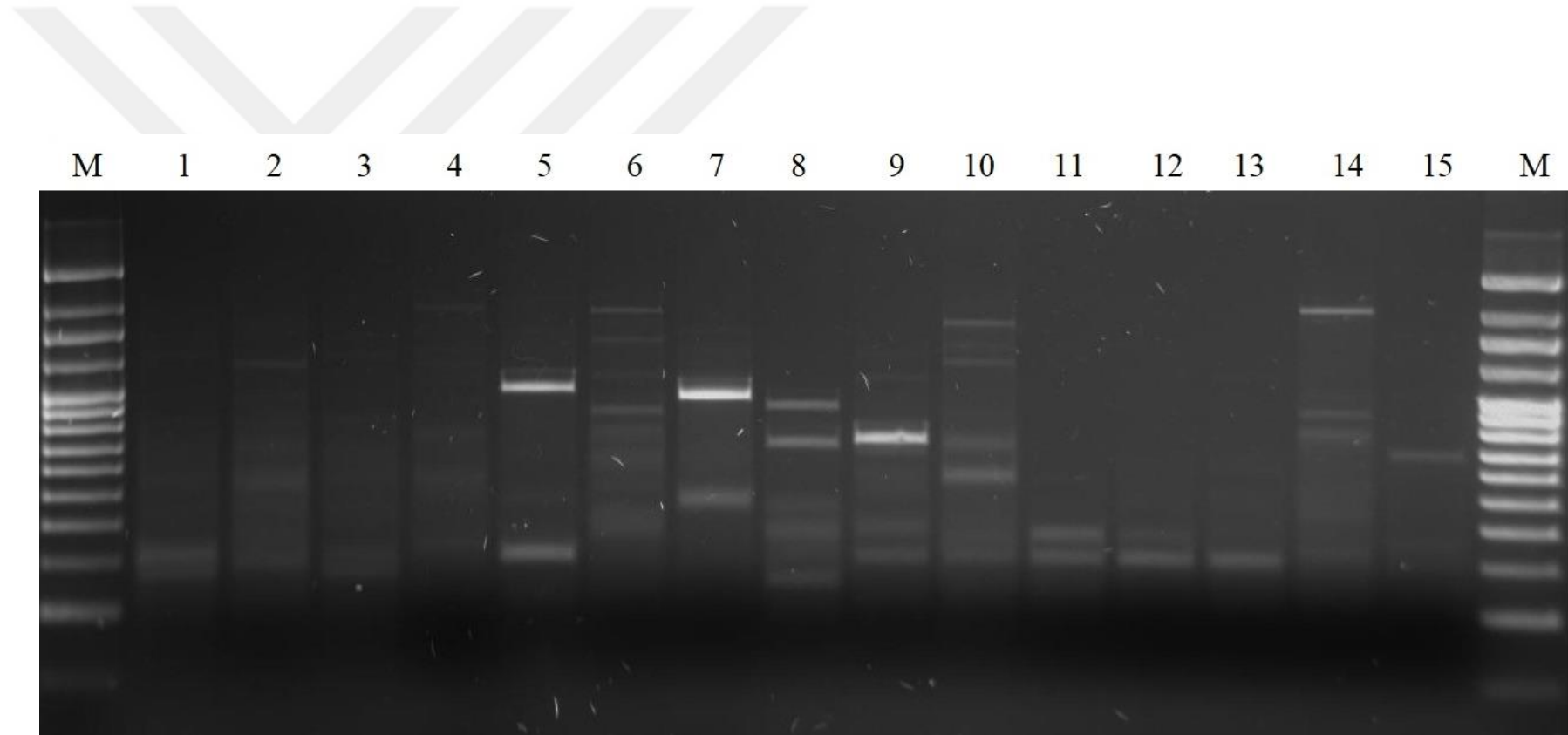
Şekil 3.12. BC2 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.

M: Marker (Nyzftech DNA Ladder, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1600, 2000, 3000 bç), 1- *Collybia dryophila* – 356, 2- *Collybia dryophila* – 198, 3- *Collybia dryophila* – 199, 4- *Collybia dryophila*– 152, 5- *Collybia dryophila*– 327, 6- *Collybia dryophila*– 156, 7- *Collybia dryophila* – 187, 8- *Collybia dryophila*– 200, 9- *Collybia dryophila* – 144, 10- *Collybia dryophila* – 146, 11- *Collybia dryophila* – 155, 12- *Collybia dryophila* – 212, 13- *Collyba dryophila*– 196, 14- *Collybia tuberosa* – 193, 15- *Collybia tuberosa*– 158.



Şekil 3.13. OPC02 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.

M: Marker (Nyzftech DNA Ladder, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1600, 2000, 3000 bç), 1- *Collybia dryophila* – 356, 2- *Collybia dryophila* – 198, 3- *Collybia dryophila* – 199, 4- *Collybia dryophila*– 152, 5- *Collybia dryophila*– 327, 6- *Collybia dryophila*– 156, 7- *Collybia dryophila* – 187, 8- *Collybia dryophila*– 200, 9- *Collybia dryophila* – 144, 10- *Collybia dryophila* – 146, 11- *Collybia dryophila* – 155, 12- *Collybia dryophila* – 212, 13- *Collyba dryophila*– 196, 14- *Collybia tuberosa* – 193, 15- *Collybia tuberosa*– 158.

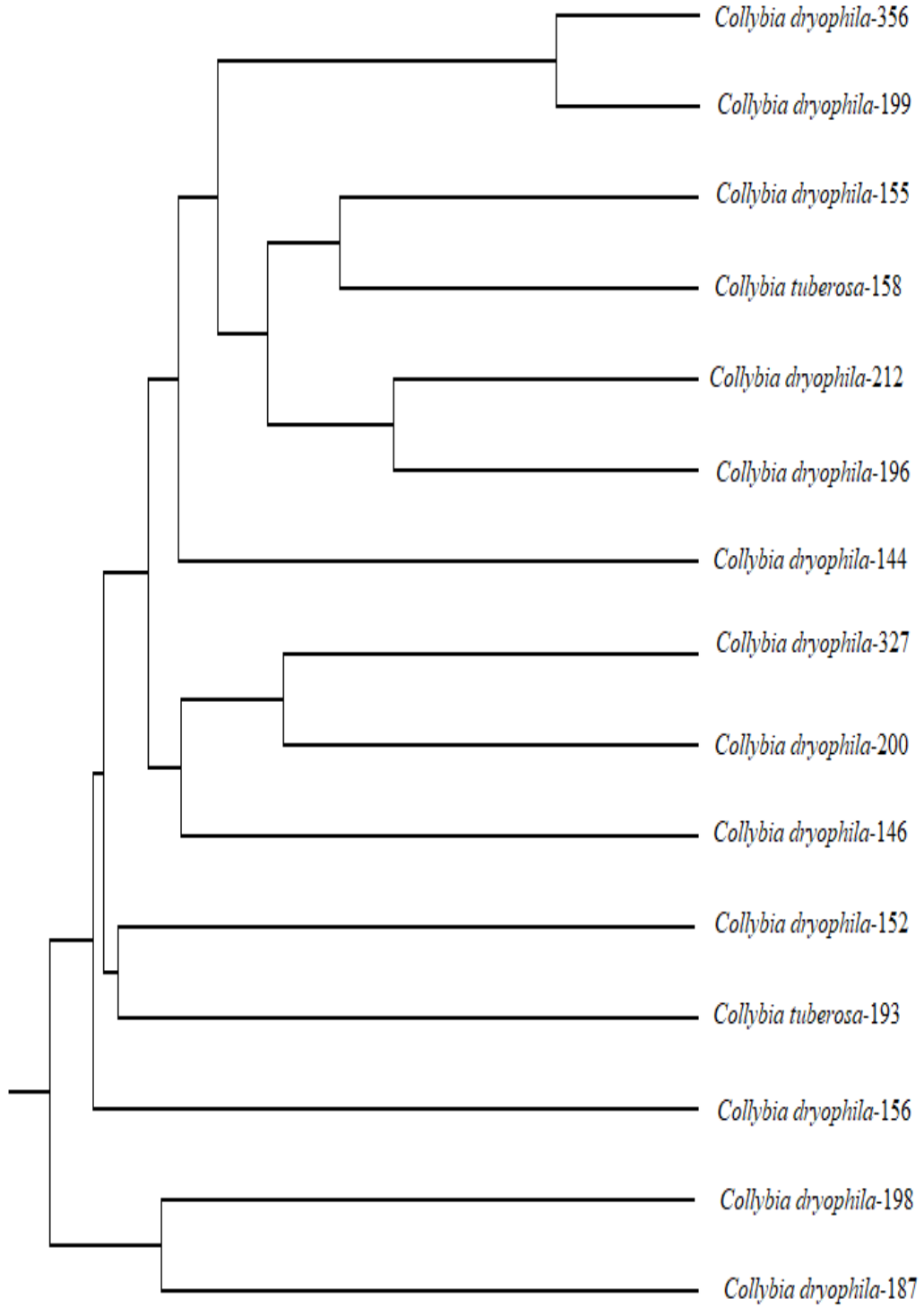


Şekil 3.14. OPB05 primeri ile elde edilen agaroz jel elektroforezi.

M: Marker (Nyzftech DNA Ladder, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1600, 2000, 3000 bç), 1- *Collybia dryophila* – 356, 2- *Collybia dryophila* – 198, 3- *Collybia dryophila* – 199, 4- *Collybia dryophila*– 152, 5- *Collybia dryophila*– 327, 6- *Collybia dryophila*– 156, 7- *Collybia dryophila* – 187, 8- *Collybia dryophila*– 200, 9- *Collybia dryophila* – 144, 10- *Collybia dryophila* – 146, 11- *Collybia dryophila* – 155, 12- *Collybia dryophila* – 212, 13- *Collyba dryophila*– 196, 14- *Collybia tuberosa* – 193, 15- *Collybia tuberosa*– 158

Çizelge 3.1. Nei Benzerlik Katsayıları Kullanılarak Elde Edilen Benzerlik Matriksi Değerleri

Pop ID	<i>C. dryophila</i> 356	<i>C. dryophila</i> 198	<i>C. dryophila</i> 199	<i>C. dryophila</i> 152	<i>C. dryophila</i> 327	<i>C. dryophila</i> 156	<i>C. dryophila</i> 187	<i>C. dryophila</i> 200	<i>C. dryophila</i> 144	<i>C. dryophila</i> 146	<i>C. dryophila</i> 155	<i>C. dryophila</i> 212	<i>C. dryophila</i> 196	<i>C. tuberosa</i> 193	<i>C. tuberosa</i> 158
<i>Collybia dryophila</i> 356	****	0.6706	0.8824	0.5824	0.5647	0.6000	0.5647	0.6118	0.6235	0.5941	0.6529	0.6412	0.6294	0.5941	0.7000
<i>Collybia dryophila</i> 198	0.3996	****	0.5882	0.5941	0.5647	0.5529	0.6235	0.5765	0.6235	0.6059	0.5941	0.5588	0.5824	0.5824	0.5941
<i>Collybia dryophila</i> 199	0.1252	0.5306	****	0.6059	0.5647	0.6000	0.5059	0.6118	0.6118	0.5471	0.6529	0.6176	0.6294	0.6294	0.7235
<i>Collybia dryophila</i> 152	0.5407	0.5207	0.5011	****	0.5941	0.5471	0.6059	0.5353	0.5706	0.5529	0.5882	0.6118	0.5882	0.6000	0.6471
<i>Collybia dryophila</i> 327	0.5715	0.5715	0.5715	0.5207	****	0.5412	0.5765	0.6941	0.6118	0.5941	0.6294	0.6529	0.6059	0.6412	0.6529
<i>Collybia dryophila</i> 156	0.5108	0.5925	0.5108	0.6032	0.6140	****	0.5059	0.5765	0.5765	0.5706	0.5706	0.6176	0.5941	0.5706	0.6882
<i>Collybia dryophila</i> 187	0.5715	0.4724	0.6815	0.5011	0.5508	0.6815	****	0.5059	0.5176	0.5353	0.5588	0.5353	0.5118	0.5471	0.5706
<i>Collybia dryophila</i> 200	0.4914	0.5508	0.4914	0.6249	0.3651	0.5508	0.6815	****	0.6000	0.6765	0.6882	0.6882	0.6176	0.6176	0.7000
<i>Collybia dryophila</i> 144	0.4724	0.4724	0.4914	0.5611	0.4914	0.5508	0.6585	0.5108	****	0.5588	0.6647	0.6765	0.6176	0.5353	0.6059
<i>Collybia dryophila</i> 146	0.5207	0.5011	0.6032	0.5925	0.5207	0.5611	0.6249	0.3909	0.5819	****	0.6118	0.6353	0.6118	0.5412	0.6118
<i>Collybia dryophila</i> 155	0.4263	0.5207	0.4263	0.5306	0.4630	0.5611	0.5819	0.3736	0.4084	0.4914	****	0.7412	0.6706	0.5882	0.7294
<i>Collybia dryophila</i> 212	0.4445	0.5819	0.4818	0.4914	0.4263	0.4818	0.6249	0.3736	0.3909	0.4537	0.2995	****	0.7647	0.5882	0.6824
<i>Collybia dryophila</i> 196	0.4630	0.5407	0.4630	0.5306	0.5011	0.5207	0.6699	0.4818	0.4818	0.4914	0.3996	0.2683	****	0.6000	0.6471
<i>Collybia tuberosa</i> 193	0.5207	0.5407	0.4630	0.5108	0.4445	0.5611	0.6032	0.4818	0.6249	0.6140	0.5306	0.5306	0.5108	****	0.6588
<i>Collybia tuberosa</i> 158	0.3567	0.5207	0.3236	0.4353	0.4263	0.3736	0.5611	0.3567	0.5011	0.4914	0.3155	0.3822	0.4353	0.4173	****



Şekil 3.15. *Collybia* Türlerinin RAPD-PCR Sonuçlarına Göre Elde Edilen Genetik Uzaklık Dendrogramı

Çizelge 3.1.'deki benzerlik matrisine göre birbirine en çok benzerlik gösteren örnekler 0.8824 oranı ile *Collybia dryophila*-356 ile *Collybia dryophila*-199, 0.7647 oranı ile *Collybia dryophila*-212 ile *Collybia dryophila*-199, 0.7412 *Collybia dryophila*-212 ile *Collybia dryophila*-155 ve 0.7294 oranı ile *Collybia dryophila*-155 ile *Collybia tuberosa*-158'dir. Birbirine en az benzerlik gösteren örnekler ise 0.5059 oranı ile *Collybia dryophila*-187 ile *Collybia dryophila*-200'dir.

Genel olarak genetik uzaklık matrisi incelendiğinde benzerlik oranlarının 0.8824–0.5059 aralığında olduğu görülmektedir.

Elde edilen dendrograma göre (Şekil 3.15.), çalışılan 15 suş 4 ana gruba ayrılmıştır. Dört ana gruptaki suşlarda kendi aralarında alt gruplar oluşturmuştur.

Birinci ana grubu; *Collybia dryophila* - 356, *Collybia dryophila* – 199, *Collybia dryophila* – 155, *Collybia tuberosa* – 158, *Collybia dryophila* – 212, *Collybia dryophila* – 196, *Collybia dryophila* – 144, suşlarından oluşmaktadır. Birinci ana grup içerisinde toplamda 7 suş ve 2 tür yer almaktadır.

İkinci ana grubu; *Collybia dryophila* – 327, *Collybia dryophila* – 200, *Collybia dryophila* – 146, suşlarından oluşmaktadır. İkinci ana grup içerisinde 3 suş ve 1 tür yer almaktadır.

Üçüncü ana grubu; *Collybia dryophila* – 152, *Collybia tuberosa* – 193, *Collybia dryophila* – 156, suşlarından oluşmaktadır. Üçüncü ana grup içerisinde 3 suş ve 2 tür yer almaktadır.

Dördüncü ana grubu; *Collybia dryophila* – 198, *Collybia dryophila* – 187, suşlarından oluşmaktadır. Dördüncü ana grup içerisinde 2 suş ve 1 tür yer almaktadır ve dendrogramın en küçük grubudur.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada, Kırıkkale ve ilçelerinde doğal olarak yetişen *Collybia* cinsine ait *Collybia drophila* ve *Collybia tuberosa* türlerinin moleküler tekniklerden RAPD-PCR kullanılarak tür içi ve türler arası akrabalık ilişkileri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Türlerin belirlenmesi için yapılan DNA temelli çalışmalarda RAPD moleküler tekniği için yüksek saflıkta DNA'ya ihtiyaç vardır (Aljanabi, 1999). Pek çok mantar türünde başarı ile uygulanan değişik izolasyon yöntemleri vardır. Çalışmamızda kullanılan mantarlara ait türlerin genomik DNA izolasyonları Sabir (2006)'e göre yapılmış ve uygun miktarda DNA elde edilmiştir.

Çalışmada *Collybia* cinsine ait *Collybia dryophila* ve *Collybia tuberosa*'nın genetik farklılıklarını değerlendirmek için RAPD markörleri kullanılmıştır. RAPD analizi on adet primer (M13, OPI18, OPWO6, B18, BA1, BA5, BC1, BC2, OPC02, OPB05) ile gerçekleştirilmiştir. RAPD analizi ile toplam 170 adet tekrarlanabilir fragment elde edilmiş ve tüm fragmentler polimorfik çıkmıştır. Analizlere alınan genotipler tanımlanmış ve aralarındaki genetik ilişkiler ortaya çıkarılmıştır. Fragmentlerin büyüklükleri 100-2500 bp arasında değişmiştir. Her bir primer ile elde edilen bant sayısı 12 ile 22 arasında olmuştur. Popülasyonlar arasındaki genetik ilişkileri belirlemek için benzerlik indeksleri hesaplanmış ve dendrogramları elde edilmiştir. Genetik benzerlik oranları 0.8824-0.5059 aralığında olup dendrogramda tür içi polimorfizm görülmüştür.

Elde edilen dendrograma göre *Collybia tuberosa* -158 ve *Collybia tuberosa* -193 aynı tür olmalarına rağmen genetik uzaklık göstermekte farklı ana grupta yer almaktadır. *Collybia tuberosa* -158 birinci ana grupta, *Collybia tuberosa* -193 üçüncü ana grupta yer almıştır. Bu gruplaşma türlerin farklı genetik karakter taşıdığı ile açıklanabilir.

Collybia tuberosa- 158 ve *Collybia tuberosa*- 193 farklı ana gruplarda yer alması konusunda ayrıca kullanılan DNA belirtecinin *Collybia* türlerini ayıracak kadar farklılaşmamış olması veya mantarların morfolojisinin çevrenin etkisiyle değişebilir

özelliğinde olmasından ve aralarındaki genetik uzaklığın yetişme yerine bağlı doğal seleksiyonunun bir sonucu olabileceği düşünülebilir.

RAPD-PCR moleküler markörü *Collybia dryophila* için uygun bir moleküler markör olduğu sonucuna ulaşılabilir. Ancak *Collybia tuberosa*'daki problemlerin çözülebilmesi için moleküler sistematik çalışmalarda türlerin temsil ettiği suş sayısının artırılması ve ITS, IGS, ISSR ve DNA dizi analizi gibi farklı moleküler belirteçlerin kullanılması önerilmektedir.

Çöl vd. (2017), *Gymnopus dryophilus* ve *Gymnopus ocior* türlerinin geleneksel yöntemlerle ayrımının oldukça zor olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarda iki türe ait örneklerin teşhisinde moleküler sistematik yaklaşımdan yararlanmışlardır. *Gymnopus dryophilus* ve *Gymnopus ocior* örneklerinin ayrımında ITS gen dizi analizinin tür teşhisinde etkili olduğunu göstermişlerdir. ITS gen dizilerinin BlastN analizi sonuçlarını değerlendirerek örneklerin teşhisini sağlamışlardır ve iki tür arasındaki ayrımı net olarak ortaya koymuşlardır.

Mantarlardaki moleküler çalışmalar, yapılan çalışmalarda güvenilir sonuçlara ulaşmak için fungal sınıflandırmada, morfolojik ve biyokimyasal vb. yöntemlerin yetersiz kaldığını göstermiştir. Moleküler temelli çalışmalarla daha, güvenilir sonuçlara ulaşılmıştır. Geleneksel yöntemlerle teşhisi yapılan türlerin moleküler olarak da incelenmesi çalışmaların güvenilir olmasını sağlayacaktır.

Bu çalışma Kırıkkale ve ilçelerinin doğal yapısında var olan *Collybia dryophila* ve *Collybia tuberosa* türlerinin gen potansiyelinin genetik düzeyde tanımlanması, teşhis yönteminin hızlı ve güvenilir olması açısından yapılan uygulamalardan biri olması nedeniyle önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Açık, L., Samancı, B., Duman, H., Ünal, F., Polymorphism and phylogenetic relations among Turkish species in the genus *Stembergia* as determined RAPD-PCR, Tr J of Botany. 21, 265-268. 1997.
- Aljanabi, S.M., Forget, L., Dookun, A., An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol free sugarcane DNA. Plant Mol. Bio. Repor. 17, 1-8, 1999.
- Arora, D., Mushroom Demystified. Berkeley-California. 1997.
- Ashburner, G. R., Thompson, W. K., Halloran, G. M., RAPD Analysis of south pacific coconut palm population. Crop, Sci, 37, 992-997, 1997.
- Avise, J.C., Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, 511 p., New York, 1993.
- Avise, J.C., Molecular Markers, Natural History and Evolution. 2nd Ed., Chapman and Hall, 684 p., New York, 2004.
- Ayad, W.G., Hodgkin, T., Jaradat, A., Rao, V.R., Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to Technologies, IPGRI Technical Bulletin, 2, 10, 1997.
- Bardakçı, F., Random amplified polymorphic DNA (RAPD) Markers, Turk. J. Biol. 25, 185-196, 2001.
- Bark, O. H., Havey, M.J., Similarities and relationship among population of the bulb onion as estimated by RFLPs. Theor. Appl. Genetics 90, 407-414, 1995.
- Bessette, A.E., Bessette A.R., Fischer, D.W., Mushroom of Northeastern North America Syracuse University Press. 1997.

- Blackwell, M., Hibbett, D.S., Taylor, J.W., Spatafora, J.W., Research coordination networks: a phylogeny for kingdom fungi (Deep Hypha). *Mycologia*, 98, (6), 829-837, 2006.
- Botstein, D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W., Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Amer. J. Human Genet.*, 32, 314-331, 1980.
- Britten, R.J., Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups, *Science*, 231, 1393-1398, 1986.
- Bruns, T.D., Gardes, M., Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi-taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. *Molecular Ecology* 2, 233-242, 1993.
- Buscot, F., Wipf, D., Battista, C.D., Munch, J.C., Botton, B., Martin, F., DNA polymorphism in morels: pcr/rflp analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-Primed PCR. *Mycology Res.*, (100), 43-71,1996.
- Cenis, J.L., Identification of four major *Melioidogyne* sp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology*, 83, 76-80, 1993.
- Chakraborty, B.N., Chakraborty, U., Saha, A., Dey, P.L., Sunar, K., Molecular Characterization of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* Isolated from Soils of North Bengal Based on rDNA Markers and Analysis of Their PCR-RAPD Profiles, *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 5 (1), 55-61, 2010.
- Chalmers, K., Waugh, J. R., Sprent, J. I., Simons, A. J., Powell, W., Detection of Genetic Variation between- and within- Population of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity*, 69, 465-472, 1992.

- Chambers, G.K., MacAvoy, E.S., Microsatellites: consensus and controversy. *Comp. Biochem. Physiol.*, 126, 455-476, 2000.
- Cui, B. K., Wang, Z., Dai, Y.C., *Albatrellus piceiphilus* sp. nov. on the basis of morphological and molecular characters. *Fungal Diversity* 28, 41-48, 2008.
- Çöl, B., Balcı, E., Güneş, H., Allı, H., *Schizophyllum commune* Fr. türünden misel eldesi, moleküler tanımlanması ve antitümör etkisinin araştırılması Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 21 (2), 586-591, 2017.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19, 11-15, 1987.
- Edel, V., Steinberg, C., Avelance, I., Laguerre, G., Alabouvette, C., Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* 85, 579-585, 1995.
- Engler, M., Anke, T., Sterner, O., Production of antibiotics by *Collybia nivalis*, *Omphalotus olearis*, *Favolaschia* and *Pterula* species on natural substrates. *Z Naturforsch C* 53 (5-6), 318-24, 1998.
- Evenson, V.E., Mushroom of Colorado. Denver Botanic Gardens. Denver-Colorado, 1997.
- Falanghe, H., Smith, A.K., Rackis, J.J., Production of fungal mycelial protein in submerged culture of soybean whey, Northern Regional Research Laboratory, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, 1964.
- Fritsche, G., Experiments on the maintenance of strains of cultivated mushrooms. III. Propagation of by multispore culture. *Mushroom News*, 20 (8), 4-19, 1972.

- Glen, M., Tommerup, I.C., Bougher, N.L., O'Brien, P.A., 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, 2000.
- Gussem, K., Vandenabeele, P., Verbeken, A., Moens, L., Chemotaxonomical identification of spores of macrofungi: possibilities of Raman spectroscopy, *Anal Bioanal Chem*, 387(8),2823-32. 2007.
- Gutierrez, A., Honrubia, M., Morte, A., Diaz, G., 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, 1995.
- Gücin, F., Tamer, A.Ü., Mikolojiye giriş, Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi ders notları, Bornova, 1997.
- Hadidi, A., Levy, L., Podleskis, E.V., Polymerase chain reaction technology in plant pathology. In: *Molecular Methods in Plant Pathology*, pp.167-187. Eds. R. P. Singh, U. S. Singh. Boca Raton: CRS Press. 1995.
- Hibbett, D.S., A phylogenetic overview of the Agaricomycotina, *Mycologia*. 98(6), 917-925, 2006
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol. Res.*, 111, 509-547, 2007.
- Hopple, J.S.Jr., Vilgalys, R., Phylogenetic Relationships among *Coprinoid* Taxa and Allies based on data from Restriction Site Mapping of Nuclear rDNA. *Mycologia* 86, 96-107, 1994.

- Hopple, J.S.Jr., Vilgalys, R., phylogenetic relationships in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: Divergent domains, outgroups, and monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13 (1), 1-19, 1999.
- Hortal, S., Pera, J., Galipienso, L., Parlade, J., Molecular identification of the edible ectomycorrhizal fungus *Lactarius deliciosus* in the symbiotic and extraradial mycelium stages. *Journal of Biotechnology*, 126, 123-124, 2006.
- Index Fungorum Website 2018. <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp> (Erişim Tarihi: 25.06.2018).
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., PCR protocols A guide to methods and applications. Academic Press. 3-12 pp. 1990.
- Iso, R.N., Nwordu M.E., Ogbadu G.H., deoxy-ribonucleic acid (DNA) profiles and evolutionary relationships of some mushrooms. (3):1, 32-38, 2013.
- Ito, Y., Fushimi T., Yanagi, S.O., discrimination of species and strains of basidiomycete genus *Coprinus* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Mycoscience* 39, 361-365, 1998.
- Ito, Y., Yanagi S. O., Discrimination of Basidiomycete Species and Strains by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. *JARQ*, 33, 149-154, 1999.
- James, T.Y., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Mozley-Standridge S.E., Powell, M.J., Griffith, G.W., Vilgalys, R., A molecular phylogeny of the flagellated fungi (chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*, 98,(6), 860-871 2006.
- Jang, M. J., Lee, Y. H., Liu, J.J., Ju, Y.C., optimal conditions for the mycelial growth of *Coprinus comatus* strains. *Mycobiology*, 37(2), 103-108, 2009.
- Jeong, Y.T., Yang, B.K., Li, C., Son, C.H., anti-tumor effects of exo- and endo-biopolymers produced from submerged cultures of three different mushrooms,

- The Korean Society of Mycology, *Mycobiology* 36 (2),106-109, 2008.
- JunZhi, Q., ZhiPeng, H., Jieru, P., XueQin, X., YanPing, Z., ShaoSheng, Z., XiOng, G., RAPD and LSU rDNA sequences analyses of entomogenous fungus *Aschersonia*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 12, 578-582, 2004.
- Kamzolkina, O.V., Volkova, V.N., Kozlova, M.V., Pancheva, E.V., Dyakov, Y.T., Karyological evidence for meiosis in the three different types of life cycles existing in *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 98 (5), 763-770, 2006.
- Kesarwani, M., Azam, M., Natarajan, K., Mehta, A., Datta, A., Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes* molecular cloning and its over expression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 7230-7238, 2000.
- Kesawat, M.S., Das, DK., Molecular markers: it's application in crop improvement. *J. Crop. Sci. Biotech.*, 12 (4), 169-181 2009.
- Kılıçoğlu Ç.M., Özkoç, İ., Fungal sistematikteki moleküler gelişmeler. *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(1), 65-72, 2008.
- Konieczny, A., Ausubel, F.M., A Procedure for mapping arabidopsis mutations using co-dominant ecotype- specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, 4 (2), 403-410, 1993.
- Lee, S.B., Taylor, J.W., Phylogeny of five funguslike protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* 9, 636-653, 1992.
- Leonhardt, K., Anke, T., Hillen-Maske, E., Steglich W., 6-Methylpurine, 6-methyl-9- β -D-ribofuranosyl-purine, and 6-hydroxymethyl-9- β -D-ribofuranosyl-purine as antiviral metabolites of *Collybia maculata* (basidiomycetes) *Z Naturforsch C.*, 42,420-424, 1987.

- Lim, J.M., Joo, J.H., Kim, H.O., Kim, H.M., Kim, S.W., Hwang, H.J., Yun, J.W.,
Structural analysis and molecular characterization of exopolysaccharides
produced by submerged mycelial culture of *Collybia maculata*. TG-1.
Carbohydrate Polymers 61, 296-303, 2005.
- Lim, J.M., Kim, S.W., Hwang, H.J., Joo, J.H., Kim, H.O., Ghoi, J.W., Yun, J.W.,
Optimization of medium by orthogonal matrix method for submerged mycelial
culture and exopolysaccharide production in *Collybia maculata*. Applied
Biochemistry and Biotechnology Applied Biochemistry and Biotechnology,
119 (2), 159-170, 2004.
- Marçais, B., Delatour, C., Inoculation of oak (*Quercus robur* and *Q. rubra*) with
Collybia fusipes. Plant Disease, 80 (12), 1391-1394, 1996.
- McErlean, C., Marchant. R., Banat. I.M., An evaluation of soil colonisation potential
of selected fungi and their production of ligninolytic enzymes for use in soil
bioremediation applications, 90 (2), 147-58, 2006.
- Mircea, C., Butnaru, C., Tanase, C., Agoroaei. L., Butnaru, E., Proca, M., The amount
of nitrites in edible mushrooms harvested from Bistrita Valley Rev Med Chir
Soc Med Nat Iasi. 108 (3), 708-11, 2004.
- Mujic, I., Zekovic Z., Vidovic S., Radojkovic M., Zivkovic, J., Godevac, D., Fatty
acid profiles of four wild mushrooms and their potential benefits for
hypertension treatment. Send to ,J Med Food. 14(11), 1330-7, 2011.
- Mullis K.B.. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American,
April:262 (4), 56-65. 1990.
- Nei, M. Genetic distance between population. Am. Nat.106. 283-292, 1972.

- Nicholson, S.H., Bunyard, B.A., Royse, D.J., Phylogeny of the Genus *Lentinula* Based on Ribosomal DNA Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Mycologia*, 89(3), 400, 1997.
- Nuytinck, J., Verbeken, A., Rinaldi, C.A., Leonardi, M., Pacioni, G., Comandini, O., Characterization of *Lactarius tesquorum* ectomycorrhizae on *Cistus* sp. and Molecular Phylogeny of Related European *Lactarius* Taxa. *Mycologia*, 96 (2), 272-282, 2004.
- Osono, T., Takeda, H., Fungal decomposition of *Abies* needle and *Betula* leaf litter. *Mycologia*. 98 (2), 172-9, 2006.
- Pacheco-Sanchez, M., Boutin, Y., Angers, P., Gosselin, A., Tweddell, R.J., Abioactive (1→3), (1→4)-β-D-glucan from *Collybia dryophila* and other mushrooms. *Mycologia*, 98, 180–185, 2006.
- Pacheco-Sanchez, M., Boutin, Y., Angers, P., Gosselin, A., Tweddell, R.J., Inhibitory effect of CDP, a polysaccharide extracted from the mushroom *Collybia dryophila*, on nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in macrophages, , 555 (1), 61-6. Epub, 2007.
- Park, D.S., Go, S.J., Kim, Y.S., Seok, S.J., Ryu J.C., Sung J.M., Phylogenetic Relationships of Genera *Coprinus* and *Psathyrella* on the Basis of ITS Region Sequences. *The Korean Journal of Mycology*, 27(4), 274-279, 1999.
- Rangkhawong, P., Issaranuwat, P., Gaensakoo, R., Mycelial fermentation in submerged culture of *Schizophyllum commune* and its properties. *Journal of Science and Technology Mahasarakham University*, 33 (5), 420-427, 2014.
- Ridout, C.R., Donini, P., Use of AFLP in cereals research. *Trends in Plant Science*. 4, 76-79. 1999.

- Sabir, J.S.M., Genotypic Identification for Some *Fusarium sambucinum* Strains Isolated from Wheat in Upper Egypt, *World Journal of Agricultural Sciences*, 2 (1), 06-10, 2006.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., Enzymatic amplification of B-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-1355, 1985.
- Sarikürkçü, C., Tepe, B., Solak, M.H., Cetinkaya, S., Metal concentrations of wild edible mushrooms from Turkey. *Send to Ecol Food Nutr.* 51(4), 346-63, 2012.
- Sesli, E., Tüzen, M., Soylak, M., Evaluation of trace metal contents of some wild edible mushrooms from Black sea region, Turkey, *Journal of Hazardous Materials*, 160, 462-467, 2008.
- Shimono, Y., Kato, M., Takamatsu, S., Molecular phylogeny of *Russulaceae* (Basidiomycetes; *Russulales*) inferred from the nucleotide sequences of nuclear large subunit rDNA. *Mycoscience*, 45(5), 303-316, 2004.
- Singh S.K., Doshi, A., Yadav, M.C., Kamal, S., Molecular characterization of specialty mushrooms of western Rajasthan, India, *Current Science*, 91:9, 10, 1225-1230, 2006.
- Stajic, M., Sikorski, J., Wasser S.P., Nevo, E., Genetic similarity and taxonomic relationships within the genus *Pleurotus* (higher Basidiomycetes) determined by RAPD analysis, *Mycotaxon*, 93, 247-255, 2005.
- Staub, J.E., Serquen, F.C., Gubta, M., Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*. 31, 729-740. 1996.
- Steffen, K.T., Hatakka, A., Hofrichter, M., Degradation of humic acids by the litter-decomposing basidiomycete *Collybia dryophila*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (7), 3442-3448, 2002.

- Sugiyama, J., Hosaka, K., Suh, S-Q., Early Diverging Ascomycota: Phylogenetic Divergence and Related Evolutionary Enigmas. *Mycologia*, 98,(6), 996-1005, 2006.
- Sümer, S., Genel Mikoloji. Nobel Yayın Dağıtım, İstanbul, 2006.
- Taylor J.W., Berbee, M., Dating divergences in the fungal tree of life: review and new analyses. *Mycologia*, 98,(6), 838-849 2006.
- Taylor, JB., Biochemical characterization of some additional mycelial cultures of basidiomycetes, *The Annals of Applied Biology*, 85 (2), 181-193, 1977.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibett, D. S., Fisher, M. C., Phylogenetic species recognition and species concept in fungi. *Fungal Genetic and Biology*. 31, 21-32, 2000.
- Tuomela, M., Steffen, K.T., Kerko, E., Hartikainen, H., Hofrichter, M., Hatakka, A., Influence of Pb contamination in boreal forest soil on the growth and ligninolytic activity of litter-decomposing fungi. *FEMS Microbiol Ecol*, 53 (1), 179-186, 2004.
- Vilgalys, R.J., Johnson, J.L., Extensive genetic divergence associated with speciation in filamentous fungi. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 84, 2355-2358, 1987.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Peleman, J., Kuper, M., Zabeau, M., AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucl. Acids Res.*, 23(21), 4407-4414, 1995.
- Wang, Y., Huo, F ., Fatty acid profiles of four wild mushrooms and their potential benefits for hypertension treatment, *Journal of Medicinal Food* 14(11), 2011.

- Wang, W., Li, Y., Wang, H., Zu, Y., Differences in the activities of eight enzymes from ten soil fungi and their possible influences on the surface structure, functional groups, and element composition of soil colloids, PLoS One. 9 (11), 111740, 2014.
- Wang, Y., Tian, Y., Shao, J., Jia, J., Ren, X., Guan, Y., Macrophage immunomodulatory activity of the polysaccharide isolated from *Collybia radicata* mushroom. International Journal of Biological Macromolecules 108, 300-306, 2018.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Meyer, W., DNA Fingerprinting in plants and fungi. CRS Press. Florida, 1995.
- Welsh, J., McClelland, M., Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, Nucleic Acids Research, 18, 7213-7218, 1990.
- Welsh, J., McClelland, M., Sobral, B.W.S., Parentage Determination in Maize Hybrids using Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR), Theor. Appl. Genet., 82, 473-476. 1991.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. Academic Press, san Diego, pp. 315-322, 1990.
- Wipf, D., Munch, J-C., Botton, B., Buscot, F., DNA polymorphism in morels: complete sequences of the internal transcribed spacer of genes coding for rRNA in *Morchella esculenta* (Yellow Morel) and *Morchella conica* (Black Morel), Applied And Environmental Microbiology, 62 (9) 3541–3543, 1996.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., DNA Polimorphism Amplified By Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers. Nucleic Acids Research, 18, 6531-6535, 1990.

Yang, B.K., Jung, Y.S., Song, C.H., Hypoglycemic effects of *Ganoderma applanatum* and *Collybia confluens* exo-polymers in streptozotocin-induced diabetic rats, *Phytother Res.* 21(11), 1066-9, 2007.

Yang, uK., Jeong, S.C., Lee, H.J., Sohn, D.H., Song, C.H., Antidiabetic and hypolipidemic effects of *Collybia confluens* mycelia produced by submerged culture in streptozotocin-diabetic rats, *Arch Pharm Res.* 29(1), 73-9, 2006.

Zhu, F., Qu, L., Fan, W, Qiao, M., Hao, H., Wang ,X., Assessment of heavy metals in some wild edible mushrooms collected from Yunnan Province, China, *Environmental Monitoring and Assessment*, 179(1-4), 191-199, 2011.

Zietkiewicz, E., Rafalski, J.A., Labuda, D., Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176–183, 1994.