



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Helvella L. VE YAKIN İLİŞKİLİ MANTAR TÜRLERİ ARASINDAKİ GENETİK AKRABALIK İLİŞKİLERİNİN ISSR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Mehmet Ali KARASELEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık-2012
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

Mehmet Ali KARASELEK

Tarih:07.12.2012

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Helvella L. VE YAKIN İLİŞKİLİ MANTAR TÜRLERİ ARASINDAKİ GENETİK AKRABALIK İLİŞKİLERİNİN ISSR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Mehmet Ali KARASELEK

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Sinan AKTAŞ

2012, 33 Sayfa

Jüri
Doç. Dr. Dursun YAĞIZ
Doç. Dr. Tuna UYSAL

Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmeler biyolojinin bütün alanlarını olumlu yönde etkilemiştir. Bu gelişmeler fungal sistematikte de etkisini göstererek hızlı ve güvenilir teşhislere imkan sağlamıştır. Moleküler çalışmalar yaygınlaşmadan önce morfolojiye ve biyokimyasal tekniklere dayalı araştırmalar daha yoğun olarak yapılmaktaydı. Ancak bu çalışmalarda özellikle morfolojik olarak yapılan gözlemlerle sonuçlara ulaşmak hem fazlasıyla deneyim hem de oldukça fazla zaman gerektirmekte, ayrıca sonuçlar zaman zaman araştırıcılara göre farlılıklar gösterebilmekteydi. Moleküler tekniklerin ilerlemesi ile mantarların sistematikteki yeri kesin olarak belirlenmektedir.

Bu çalışmada birbirleriyle yakın ilişkili olduğu düşünülen *Helvella*, *Peziza*, *Gyromitra*, *Verpa* ve *Sarcoscypha* cinsleri arasındaki akrabalık ilişkileri moleküler ISSR-PCR (Inter-Repeat-Polymerase Chain Reaction) yöntemi ile ortaya konmuştur. Kontrol dış grup olarak da *Morchella esculenta* (L.) Pers. kullanılmıştır.

Çalışmamızı oluşturan mantar türleri Sonbahar ve İlkbahar aylarında Adana, Antalya, Isparta, Konya ve Amasya illerinden toplanmıştır. Toplanan örneklerin tayini teşhis kitaplarından yararlanılarak yapılıp mantarlar fungaryum tekniklerine uygun olarak kurutulmuştur. Toplanan mantarların askokarplarından 0,01 gr alınarak havanda ezildikten sonra DNA izololasyon işlemlerine tabi tutulmuştur.

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

Jel profillerindeki DNA fragment sayısı ve büyüklüklerine dayalı olarak $NTSYS_{PC}$ bilgisayar programı ile örneklerin birbirlerine olan genetik uzaklıkları belirlenmiş ve bu genetik uzaklıklara göre filogenetik haritaları çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Genetik akrabalık, *Helvella*, ISSR-PCR, mantar, moleküler.

ABSTRACT

MS THESIS

THE DETERMINATION OF GENETIC RELATIONSHIP AMONG *Helvella* L. AND CLOSELY RELATED FUNGI BY ISSR METHODS

Mehmet Ali KARASELEK

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

Advisor: Assist. Prof. Dr. Sinan AKTAŞ

2012, 33 Pages

Jury
Assoc. Prof. Dr. Dursun YAĞIZ
Assoc. Prof. Dr. Tuna UYSAL

Developments in molecular biology have affected whole fields of biology positively in recent years. These developments have also showed their effects on fungal systematic and provided fast and reliable identifications. Before molecular studies, morphologic and biochemical techniques have been extensively used in researches. But it was hard to obtain results, especially with the morphological examinations, and lots of times, experience have been required in these studies. The results of these studies have also been subjective, sometimes showing inconsistencies among the researchers. With the advancement of molecules techniques the place in systematic of fungi precisely determined.

In this study, the relative relationship between *Helvella*, *Peziza*, *Gyromitra*, *Verpa* ve *Sarcoscypha* was revealed by molecular ISSR-PCR (Inter-Simple Sequence Repeat-Polymerase Chain Reaction) process. *Morchella esculenta* (L.) Pers.was used as control group.

The mushrooms which were the subject of investigation were collected between autumn and spring in the vicinity Adana, Antalya, Isparta, Konya and Amasya. Diagnosis of collected samples were identified by using books and samples, which are collected, were dried in accordance with fungarium techniques. 0,01 gr samples from ascocarp of collected fungi were subjected for DNA isolation after powdered in havana.

DNA isolation were performed by using Doyle's method. The concentration and purity degrees measurements of DNA were carried out by ND-2000 spectrophotometer.

Genetic distances were determined based on fragment number and size of DNA in gel profiles by a computer program $NTSYS_{PC}$ and phylogenetic maps were enacted according to genetic distance.

Keywords:, Genetic relationship, *Helvella*, ISSR-PCR, fungus molecular.

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen başta danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Sinan AKTAŞ'a ve Doç. Dr. Tuna UYSAL olmak üzere Arş. Gör. Sinan ALKAN'a, Uzm. Meryem BOZKURT'a ve Arş. Gör. Ela Nur ŞİMŞEK'e içtenlikle teşekkür ederim. Ayrıca Selçuk Üniversitesi 11201012 nolu proje ile çalışmama maddi destek sağlayan BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri) koordinatörlüğüne de teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Mehmet Ali KARASELEK
KONYA-2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **viii**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Fungal Sistematik 3
1.1.1. Türlerin Arazideki Fotoğrafları ve Sistematikdeki Yeri 4

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **8**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **12**

3.1. DNA İzolasyonu 13
3.2. DNA Konsantrasyonunun Tayini 14
3.3. Optimizasyon 14
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bütün Örneklere Uygulanması 15
3.5. Elektroforez 15
3.6. DNA Bantlarının Skorlanması 15
3.7. Veri Analizi 16

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **16**

4.1. Moleküler araştırma sonuçları 16
4.1.1. DNA Konsantrasyonları 16
4.1.2. PCR Amplifikasyon Sonuçları 17
4.2. Morfolojik Karakterlerin Sınıflandırılması 18

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER **20**

KAYNAKLAR **22**

ÖZGEÇMİŞ **25**

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μ : Mikro
μm : Mikrometre
μl : Mikrolitre
λ : Lamda
ºC : Santigrat

Kısaltmalar

bp : Baze pair(s)
CTAB : Cetyl Trimthyl Ammonium Bromide
dATP : Deoksiadenozin Trifosfat
dTTP : Deoksitimidin Trifosfat
dGTP : Deoksiguanozin Trifosfat
dCTP : Deoksisistidin Trifosfat
DNA : Deoxyribonucleic Acid
gr : Gram
ISSR : Inter-Simple Sequence Repeat
ISSR-PCR : Inter-Simple Sequence Repeat-Polymerase Chain Reaction
ITS : Internal Transcribed Spacer
kb : Kilo baze pairs
$MgCl_2$: Magnezyum Klorür
ml : Mililitre
ML : Maximum Likelihood
MP : Maximum Parsimony
NJ : Neighbor-Joining
ng : Nanogram
$(NH_4)_2SO_4$: Amonyum Sülfat
PCR : Polymerase Chain Reaction
RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA
rDNA : Ribozomal DNA
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm : Revolutions Per Minute
SSR : Simple Sequence Repeat
TAE : Tris-Asetat-EDTA
UPGMA : Unweighted Pair Group Method Algorithm
UV : Ultraviyole

1. GİRİŞ

Mantarlar insanlık açısından büyük öneme sahip organizmalardır. Bu organizmalar ekosistemin önemli bir parçasıdırlar. Son 2 milyar yıldır bitki ve hayvansal yapıları çürüttükleri bilinmektedir. Bu yapılardaki elementlerin (azot, fosfor, potasyum, sülfür, demir, kalsiyum, magnezyum, çinko vb.) serbest bırakılmaları mantarlar tarafından sağlanır. Ayrıca toprağın yapısını bitki gelişimi için uygun hale getirir (Tamer ve ark., 2006).

Doğada organik maddelerin ayrıştırılması gibi önemli bir görevi üstlenen fungusların, bitkiler ile karşılaştırıldığında tohumlu bitkilerden sonra yaklaşık tanımlanmış 100.000-120.000 türü bulunmaktadır. Yukarıda belirtilen yaklaşık 100.000-120.000 türden 8.000'i makrofungus olarak kaydedilmiştir. Günümüzde mantarlar tıp, ziraat, ormancılık, veterinerlik, eczacılık ve gıda sanayinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Kaşık, 2010).

Doğadaki dengenin göstergesi olarak bilinen mantarların besin piramidinde önemli bir yeri vardır. Döngünün sürekliliğinin korunması için döngüde yer alan her grubun en iyi şekilde tanımlanması gerekir. Bir canlı grubunu en iyi tanımanın yolu ise o canlı grubunu sınıflandırmaktan geçer. Problemli olduğu düşünülen türler arasındaki akrabalıkların ve akrabalık derecelerinin ortaya çıkarılması moleküler yöntemlerle yapılmaktadır. Mantarlarda moleküler yöntemlerin kullanımı son yıllarda başarıyla uygulanmaktadır. Moleküler çalışmalar yaygınlaşmadan önce morfolojiye ve biyokimyasal tekniklere dayalı araştırmalar yoğun olarak yapılmaktaydı. Ancak bu çalışmalarda özellikle morfolojik olarak yapılan gözlemlerle sonuçlara ulaşmak hem fazlasıyla deneyim hem de oldukça fazla zaman gerektirmekte, ayrıca sonuçlar zaman zaman araştırıcılara göre farlılıklar gösterebilmekteydi. Bu nedenlerle artık geleneksel yöntemlerin yanı sıra moleküler yöntemler de fungal sistematikte sıkça kullanılmaya başlanmıştır (Çebi Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008).

Bilimsel yöntemler kullanılarak, canlıların bireysel benzerlik ve farklılıklarını geniş bir bakış açısı ile incelenmesi ve sınıflandırılması asırlar önce başlanmış ve günümüzde de devam eden bir süreçtir. Hayatın çeşitliliği ve yayımıyla ilgili olayların modelini ortaya çıkaran ve ilgili ağacın yeniden yapılandırılmasını içine alan alana sistematik adı verilir (Quicke, 1993). Sistematiğin amacı, organizmalar arasındaki evrimsel geçmişin ve birbirleriyle olan ilişkilerinin belirlenmesi ve daha sonra

organizmaların sınıflandırılmasında bu bilgilerin kullanılmasıdır. Sistematik alanında yapılan çalışmalarda, tüm yaşam formlarının filogenetik bir ağaçla bağlantısının kurulması, son 50 yılın en önemli keşiflerinden birini oluşturmaktadır (Lipscomb, 1998).

Canlılar sınıflandırılırken jeolojik devirlerde kalmış tarihsel hikayeyi de hesaba katmak zorundayız. Bu nedenle her benzerliğin gerçek bir benzerlik olmadığını, ortak ata ve evrimsel tarihi paylaşıp paylaşmadıklarını sınıflandırmada temel kriter olarak ele almak durumundayız (Başıbüyük ve ark., 2000).

Son yıllarda moleküler biyoloji ve genetik alanında yaşanan gelişmeler sistematik alanında yeni tekniklerin ortaya çıkışını kaçınılmaz hale getirmiş, bu gelişmeler fungal sistematikte de etkisini göstermiştir. Fungusların morfolojik karakterlerine göre yapılan sınıflandırmalar, moleküler sistematikle belirlenen filogenetik ilişkilerle yeniden değerlendirilmelidir. Taksonlar arasında morfolojik karakterlerin birbirine anlamlı olmayan benzerliği, indirgenmiş olabileceği ya da taksonlar arasında ortadan kalkmış durumlarda filogenetik analiz için moleküler karakterlerin kullanımı önem kazanmaktadır (Blackwell ve ark., 2007).

Geleneksel olarak fungusların sınıflandırılmasında temel kriter eşeyli üreme yapılarıdır. Moleküler karakterlerin kullanımının bir avantajı da, aseksüel fungusların sınıflandırılmasındaki belirsizliği ortadan kaldırıp onların en yakın akrabaları içinde sınıflandırılmasını sağlamasıdır (Blackwell ve ark., 2007).

1970'lerden günümüze kadar fungal sistematikte moleküler veriler tüm taksonomik seviyelerde kullanılmakta olup son yıllarda kullanım oranında önemli derecede artış olmuştur. Moleküler veriler mantarlar alemdeki yüksek seviyeli taksonomik grupların ve büyük evrimsel soyların belirlemesinde, düşük taksonomik seviyelerde ise türlerin, kısmi populasyonların ve bireylerin teşhisinde kullanılmaktadır. Ancak moleküler verilerin yaygın kullanımında bazı sınıflandırmalar da mevcuttur. Bunlardan bazıları, farklı fungal gruplar arasında yöntemlerin karşılaştırılabilirliği ve uyumluluğuyla ilişkiliyken bazıları fungusun adapte olduğu hayat döngüsünün çeşitliliğiyle ilişkilidir. Moleküler verilerdeki mevcut sınırlandırmalara rağmen, fungal sistematiği anlamamızı kolaylaştırdığı ve bu konuyla ilgili verilerdeki artışa bağlı olarak gelecekteki uygulamalarda daha açıklayıcı olabileceği düşünülmektedir (Bridge ve ark., 2005).

1.1. Fungal Sistematik

Fungi alemi içinde yer alan organizmaların yaşam döngülerinde hem eşeyli hem de eşeysiz üreme safhaları yer alır. Fungusların sınıflandırılmasında kullanılan temel kriter, yaşam döngülerinin eşeyli safhasında oluşturdukları üreme yapılarıdır (Moore-Landecker, 1996). Ancak eşeyli üreme yapıları özel koşullar altında oluştuğu için bazı fungusların eşeyli üreme yapıları ya henüz belirlenememiş ya da bazı funguslarda bu safha tamamen ortadan kalkmış olabilir. Bundan dolayı günümüzde funguslar iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Bunlardan fungusların yaşam döngülerinin eşeyli safhalarında oluşturdukları fruktifikasyon yapıları, eşeyli sporları ve tallus yapıları kriter alınarak gerçekleştirilen sınıflandırma teleomorfik sınıflandırma olarak adlandırılır. Eşeyli üreme yapıları tespit edilemediği için bazı funguslar tallus yapıları ve eşeysiz sporları göz önüne alınarak sınıflandırılır ki bu sınıflandırma biçimi de anamorfik sınıflandırma olarak adlandırılır. Anamorfik sınıflandırma kullanılan yöntemlerin ortak özelliği gözlemlere dayalı olması, fazla zaman alması ve hata yapma olasılığının fazla olmasıdır. Bazı fungusların sınıflandırılmasındaki bu belirsizlik, çoğu zaman aynı taksona iki farklı ismin veya iki farklı taksona aynı ismin verilmesine sebep olabilmektedir (Sneh ve ark., 1991).

Bu karışıklıkların önlenmesi ve türler arasındaki akrabalık derecelerinin ortaya konulması için günümüzde, güvenilirliğinden dolayı moleküler yöntemler sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler yöntemlerde ağırlıkla kullanılan molekül DNA molekülüdür. Evrimsel değişikliğin ilk olarak yansıdığı moleküller olan DNA ile yapılan çalışmalar daha güvenilir ve hızlı sonuçlara ulaşmamızı sağlayabilmektedir (Taylor ve ark., 2000).

Literatürden türler arasındaki genetik farklılıkları ortaya çıkarmakta hangi moleküler DNA tekniğinin en uygun olduğunu belirlemek amacıyla RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeat) ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) gibi DNA işaretleyici teknikleri karşılaştırılmış ve polimorfizm bakımından SSR ve AFLP teknikleri, maliyet bakımından RAPD ve ISSR teknikleri, teklarlanabilirlik bakımından da RFLP, SSR, ISSR ve AFLP DNA tekniklerinin avantajlı olduğu belirlenmiştir. Bunların yanı sıra çalışılacak laboratuar imkanları göz önünde bulundurulduğunda, RAPD ve ISSR yöntemlerinin radyoaktif madde kullanımının olmadığı ve koşulların sınırlı olduğu

laboratuarlarda rahatlıkla kullanılabilecek yöntemler olduğu bildirilmiştir (Yalım, 2005). Bundan dolayı çalışmamızda ISSR yöntemi tercih edilmiştir.

1.1.1. Türlerin Arazideki Fotoğrafları ve Sistematikteki Yeri

Divisio: Ascomycota

Classis: Pezizomycetes

Ordo: Pezizales

Familia: Helvellaceae

Genus: Helvella

1. **Species**: *Helvella ephippium* Lév. (Şekil 1.1a, 1b)
2. **Species**: *Helvella lacunosa* Afzel. (Şekil 1.2a, 2b)
3. **Species:** *Helvella leucomelaena* (Pers.) Nannf. (Şekil 1.3a, 3b)
4. **Species:** *Helvella queletii* Bres. (Şekil 1.4a, 4b)
5. **Species:** *Helvella acetabulum* (L.) Quél. (Şekil 1.5a, 5b)
6. **Species:** *Helvella spadicea* Schaeff. (Şekil 1.6a, 6b)

Genus: Peziza

1. **Species:** *Peziza michelii* (Boud.) Dennis(Şekil 1.7a, 7b)
2. **Species:** *Peziza varia* (Hedw.) Fr. (Şekil 1.8a, 8b)

Familia: Discinaceae

Genus: Gyromitra

Species: *Gyromitra esculenta* (Pers.) Fr. (Şekil 1.9a, 9b)

Familia: Morchellaceae

Genus: Verpa

Species: *Verpa conica* (O.F. Müll.) Sw. (Şekil 1.10a, 10b)

Familia: Sarcoscyphaceae

Genus: Sarcoscypha

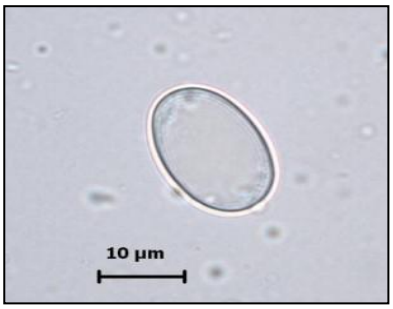
Species: *Sarcoscypha coccinea* (Gray) Boud. (Şekil 1.11a, 11b)

Genus: Morchella

Species: *Morchella esculenta* (L.) Pers. (Şekil 1.12a, 12b)



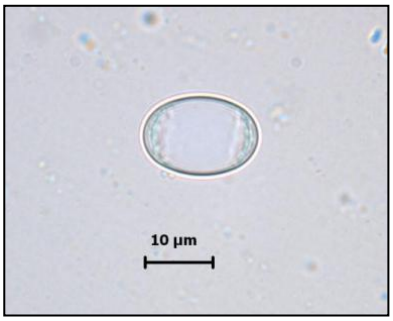
Şekil 1.1a *Helvella ephippium* Lév.



Şekil 1.1b Spor Şekli



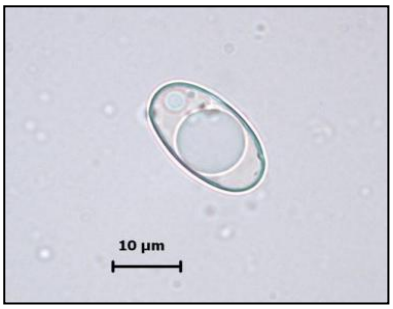
Şekil 1.2a *Helvella lacunosa* Afzel.



Şekil 1.2b Spor Şekli



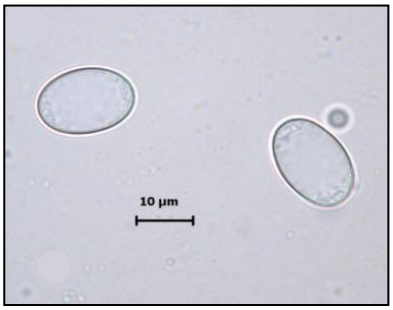
Şekil 1.3a *Helvella leucomelaena* (Pers.) Nannf.



Şekil 1.3b Spor Şekli



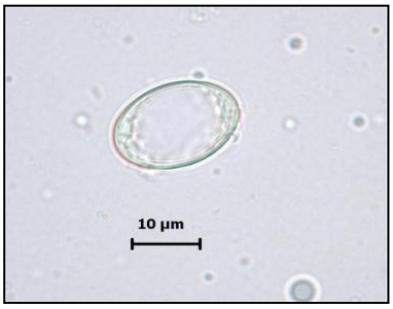
Şekil 1.4a *Helvella queletii* Bres.



Şekil 1.4b Spor Şekli



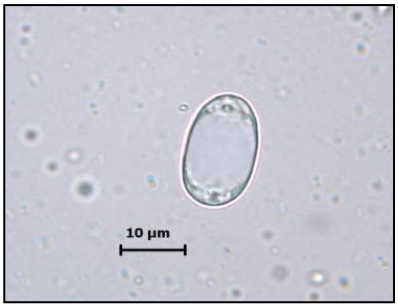
Şekil 1.5a *Helvella acetabulum* (L.) Quél.



Şekil 1.5b Spor Şekli



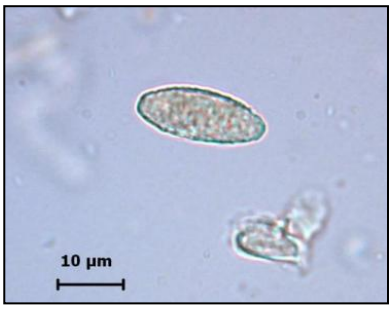
Şekil 1.6a *Helvella spadicea* Schaeff.



Şekil 1.6b Spor Şekli



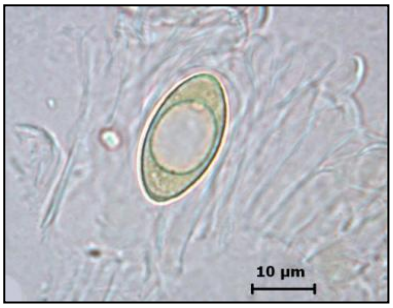
Şekil 1.7a *Peziza michelii* (Boud.) Dennis



Şekil 1.7b Spor Şekli



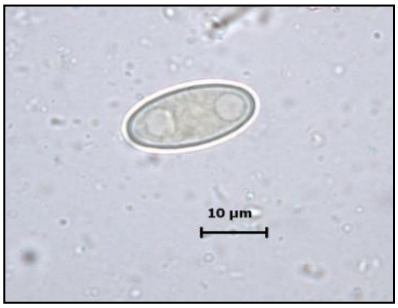
Şekil 1.8a *Peziza varia* (Hedw.) Fr.



Şekil 1.8b Spor Şekli



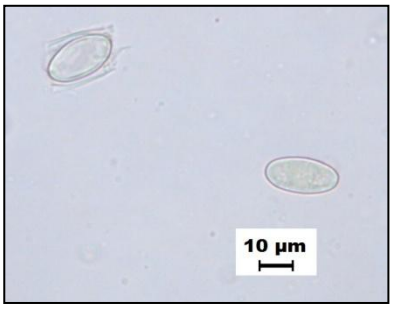
Şekil 1.9a *Gyromitra esculenta* (Pers.) Fr.



Şekil 1.9b Spor Şekli



Şekil 1.10a *Verpa conica* (O.F. Müll.) Sw.



Şekil 1.10b Spor Şekli



Şekil 1.11a *Sarcoscypha coccinea* (Gray) Boud.



Şekil 1.11b Spor Şekli



Şekil 1.12a *Morchella esculenta* (L.) Pers**.**



Şekil 1.12b Spor Şekli

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Fan ve ark. (2010), Çin'den toplanan 128 *Monilinia fructicola* izolatları arasındaki genetik farklılığı araştırmak için ISSR yöntemi kullanılmıştır. ISSR yöntemi ile elde edilen sonuçlar Kaliforniya ve Yeni Zelanda'daki örnekler ile karşılaştırılmıştır. Toplam % 87,5'i polimorfik olan 72 DNA bandı bulunmuştur. Bu çalışma ile Çin bölgesine ait populasyonlar ile Kaliforniya bölgesine ait olan populasyonların büyük ölçüde birbirine benzediği ortaya çıkarılmıştır. Ancak bu benzerliklerin yanı sıra küçük de olsa bazı farklılıkların olduğu da belirlenmiştir.

Fu ve ark. (2010), Çin'deki *Lentinula edodes*'ler arasındaki genetik çeşitliliği değerlendirmek için RAPD, ISSR ve SRAP markırlarını kullanmışlardır. Bu çalışma da 16 RADP, 5 ISSR ve 23 SRAP primeri kullanılmış ve RAPD ile %58,8'i polimorfik, ISSR ile %73,5'i polimorfik ve SRAP ile % 56,3'ü polimorfik sırasıyla toplam 138,77 ve 144 bant elde edilmiştir. UPGMA ile her bir analize bağlı olarak bir dendogram oluşturulmuş ve bu üç dendogram, 23 bireyden analizi yapılan *L. edodes* türünün 3 ya da 4 grup içinde sınıflandığını göstermiştir.

Guan ve ark. (2008), son yıllarda *Agaricus* türlerinin üretiminde önemli bir derece artış olmasına rağmen taksonomisi üzerinde bir fikir birliğinin olmadığını belirtmişlerdir. Bu yüzden *Agaricus*'un sınıflandırılması üzerine hızlı ve güvenilir bir metoda acilen ihtiyaç olmuştur. Bu araştırmada, Çin'deki 12 ticari *Agaricus* türleri arasındaki genetik farklılığı ortaya çıkarmak için 6 ISSR primeri kullanılmıştır. Bu çalışma ile %80,6'sı polimorfik olan 124 bant elde edilmiş ve benzerliklerin 0,69'dan 0,98'e kadar değişmekte olduğu ifade edilmiştir.

Kauserud ve ark. (2003), ağaçlarda çürümeye neden olan *Trichaptum abietinum'*un 11 farklı coğrafik bölgedeki populasyonlarının yapısını PCR-RFLP, ISSR ve melezleme çalışmaları ile değerlendirmişlerdir. Moleküler veriler *T.abietinum'*un yüksek derecede outcrossing bir fungus olduğunu ortaya çıkarmıştır. ISSR markırları, sistematik altyapının olmadığını ve populasyonlar arasındaki varyans bileşiklerinin düşük olduğunu ortaya çıkarmıştır (% 6,1).

Lian ve ark. (2003), bitki türlerinin mikrosatellit markırlarını geliştirmek için uygulanan ISSR yöntemini ektomikorhizal bir mantar olan *Tricholama matsutake*'ye uygulamışlardır. Bu çalışma ile 6 polimorfik ISSR markırı geliştirilmiştir. Bu çalışmada, beklenen heterezigotluk oranı 0,098'den 0,803 kadar değişebileceği hesaplanmıştır.

Moncalvo ve ark. (2000), *Agaricales* takımı içerisindeki mantarların filogenetik akrabalıklarını nükleer büyük alt birim ribozomal DNA dizilerini kullanarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada akrabalık ilişkilerini ortaya çıkarmak için eşit ağırlıklı MP, ML ve NJ metotlarını içeren birkaç metot kullanılmıştır. Bu çalışmanın *Agaricales* takımı için yapılacak olan gelecekteki sistematik çalışmalar için bir temel teşkil edeceği belirtilmiştir.

Nazrul ve ark. (2010), *Agaricus bisporus*'un yavaş büyüyen 10 protoklonlarını kullanmışlardır. Bu çalışmada 40 ISSR primeri kullanılmış ve %48,93'ü polimorfik olan 78 tekrarlanabilir parça elde edilmiştir. Yapılan çalışma, morfolojik karakterler ile birlikte ISSR yönteminin kullanılması polimorfizmin daha kolay ve daha çabuk ayırt edilebileceğini göstermiştir.

Park ve ark. (2008), bu çalışma ile *Alternaria radicina* ile *A. carotiincultae* arasındaki filogenetik akrabalığı morfoloji, rDNA'nın sekans analizi (ITS ve mitokondriyal küçük alt ünite (mtSSU), protein kodlayan genler, aktin (ACT), beta tubulin, kitin sentaz (CHS)), RAPD ve ISSR analizleri ile birlikte tekrar incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucu, *A.carotiincultae*'nin *A. radicina* ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir.

Sesli ve ark. (2008), bu çalışma Myxomycetes, Ascomycetes ve Basidiomycetes'lere ait Türkiye'den yayınlanan 1915 ile 2010 Mart ayı arasında yayımlanan 401 yayını derlemek için yapılan bir çalışmadır. Mycomycetes, Ascomycetes ve Basidiomycetes'e ait 3 temel liste doğru isimleri ile birlikte alfabetik olarak verilmiştir. Bu makalede Myxomycetes, Ascomycetes ve Basidiomycetes'e ait toplam 2151 tür verilmiştir. Bu türlerin 222'si Myxomycetes'e, 144'ü Ascomycetes'e ve 1785'i Basidiomycetes'e aittir. Her bir takson için referanslar belirtilmiştir.

Tang ve ark. (2010), Çin'e ait 34 *Auricularia auricula* türleri arasındaki DNA polimorfizmi, ISSR ve SRAP markırları kullanılarak analiz edilmiştir. 30 ISSR primeri ile %96,9'u polimorfik olan toplam 129 DNA fragmenti ortaya çıkartılmıştır. Bunun tam tersine, 11 SRAP primeri ile %96,1'i polimorfik olan toplam 154 DNA fragmenti ortaya çıkartılmıştır. Her iki yönteminde ayırımda son derece etkili olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada filogenetik ağaçlar ISSR, SRAP ve ISSR/SRAP yöntemleri kompleksleri ile birlikte UPGMA metodu kullanılarak yapılmıştır. Bu 34 şuşun içinden 4 ile 5 major grup belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler ileride yapılacak olan *A. auricula* ıslahını ve ticari önemi olan mantarlardan bioaktif ürün elde etmeyi büyük ölçüde kolaylaştıracaktır.

Vandenkoornhuyse ve ark. (2001), arazi çalışmaları sonucunda üç farklı toprakta ve kanalizasyon çamurlarından elde edilen iki *Glomus* türünün genetik farklılığını incelemişlerdir. Toprakta bulunan *Glomus claroideum* (W2537) ve kanalizasyon çamurunda bulunan *Glomus* DAOM (W2538) üç farklı populasyonu mikrosatellit primerler kullanılarak analiz edilmiştir. *G. claroideum* için 39 polimorfik bant ve *Glomus* DAOM için 42 polimorfik bant bulunmuştur. Bu çalışma ile tür içi genetik çeşitliliğin çok yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. Bu çalışmanın sonuçları sadece birkaç multilokus profillerin *G. claroideum* türünün iki populasyonu tarafından paylaşıldığını *Glomus* DAOM türününe ait populasyonlarda da hiç paylaşılmadığını ortaya çıkarmıştır.

Wipf ve ark. (1996), bu çalışmada Siyah Kuzugöbeği mantarı (*Morchella conica*) ve Sarı Kuzugöbeği mantarı (*M. esculenta*)'ında gen yürüme tekniği ile rRNA kodlayan genin ITS bölgeleri her iki yön için de dizilenmiştir. Bu çalışma türlerdeki ITS bölgelerinin uzunluklarını ortaya çıkarmak için yapılmıştır. Siyah Kuzugöbeği mantarı *M. conica*'da 750 bp ve Sarı Kuzugöbeği mantarı *M. esculenta*'da 1,150 bp olduğu belirlenmiştir.

Yu ve ark. (2008), bu çalışmada ISSR ve SRAP olmak üzere iki farklı moleküler markır sistemi kullanmışlardır. Bu markırlar *Auricularia polytricha*'nın 19 suşu arasındaki genetik farklılığı ortaya çıkarmak için kullanılmıştır. 13 ISSR primeri ile toplam 202 (% 99,0) polimorfik bant ve 14 SRAP primeri ile toplam 459 (%95,9) polimorfik bant elde edilmiştir. Parsimoni metodu ile her bir analize bağlı olarak bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu iki filogenetik ağaç 19 *A. polytricha* şuşunun 4 ya da 5 grup içinde dağıldığını göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları, kullanılan bu iki yöntemin *A. polytricha* şuşları arasındaki farklılığı ortaya çıkarmak için uygun bir yöntem olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu araştırma, *A. polytricha*'nın yüksek seviyede genetik çeşitliliğini ve diğerleri arasındaki akrabalık ilişkilerini ortaya çıkarmak için bu iki yöntemin uygun bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Zhang ve ark. (2007), bu çalışmada 15'i kültür ortamında yetiştirilmiş ikisi de doğal ortamdan toplanmış toplam 17 *Lentinula edodes* türünü ISSR yöntemi ile analiz etmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan iki ISSR primeri ile toplam 32 DNA ürünü elde edilmiştir. Bu elde edilen 32 DNA ürünlerinden 31'i (%96,9) polimorfik olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan iki ISSR primeri, analize tabi tutulan 17 *L. edodes* türünü birbirinden ayırt edebileceğini göstermiştir. ISSR analizini bağlı olarak yapılan ayrımda 17 şuşun kendi içinde iki grupta gruplandırılabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmanın sonucunda doğal ortamdan toplanan iki *L. edodes* türü arasındaki genetik çeşitliliğin benzerlik katsayısının analizine bağlı olarak, genetik çeşitliliğin çok zengin olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Zhou ve ark. (1999), ektomikorhizal mantarlar vejetatif miselyum ya da sporları vasıtasıyla yeni alanlarda kolonize olabilmesine rağmen doğadaki bu mikorhiza oluşum sürecinin önemi hakkında tam olarak bir şey bilinmediğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada, bir ektomikorhizal fungus olan *Suillus grevillei*'nin sporokarpı haritalanmıştır. Her bir sporokarptan DNA elde edilmiştir ve DNA polimorfizmi $(GTG)_5$, $(GCC)_5$ ve $(GACA)_4$ primerleri kullanılarak ISSR bölgeleri PCR reaksiyonu ile analiz edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırma konusunu oluşturan mantar türleri Adana, Amasya, Antalya ve Isparta illerinden toplanmıştır. Toplanan örneklerin tayini teşhis kitaplarından faydalanılarak yapılmıştır (Breitenbach ve Kränzlin, 2005; Dennis, 1981; Dähncke, 1993; Medardi, 2006 ve Sesli ve Denchev, 2008). Toplanan örneklerin bir kısmı fungaryum tekniklerine uygun olarak kurutulmuş bir kısmı da derin dondurucuda saklanmıştır. Çalışmaya dahil edilen örnekler şunlardır;

Helvella ephippium Lév. Adana, çam ormanı, 30.10.2011, Aktaş 1112; Isparta, çam ormanı, 17.12.2011, Aktaş 1128; Amasya, çam ormanı, 20.04.2012, Aktaş 1130; Amasya, çam ormanı, 22.04.2012, Aktaş 1145; Amasya, çam ormanı, 23.04.2012, Aktaş 1152; Amasya, çam ormanı, 11.06.2012, Aktaş 1154; Amasya, çam ormanı, 12.06.2012, Aktaş 1158.

Helvella lacunosa Afzel. Antalya, köknar ormanı, 26.11.2011, Aktaş 1122; Amasya, köknar-çam ormanı, 21.04.2012, Aktaş 1142; Amasya, köknar-çam ormanı, 22.04.2012, Aktaş 1146.

Helvella leucomelaena (Pers.) Nannf. Adana, çam ormanı, 28.10.2011, Aktaş 1111; Antalya, çam ormanı, 25.11.2011, Aktaş 1119; Antalya, çam ormanı, 26.11.2011 Aktaş 1121; Isparta, çam ormanı, 16.12.2011, Aktaş 1125; Amasya, çam ormanı, 20.04.2012, Aktaş 1131; Amasya, çam ormanı, 21.04.2012, Aktaş 1141; Amasya, çam ormanı, 22.04.2012, Aktaş 1147; Amasya, çam ormanı, 10.06.2012, Aktaş 1153; Amasya, çam ormanı, 11.06.2012, Aktaş 1155.

Helvella queletii Bres. Antalya, köknar ormanı, 27.11.2011, Aktaş 1123; Amasya, köknar-çam ormanı, 20.04.2012, Aktaş 1132; Amasya, köknar-çam ormanı, 12.06.2012, Aktaş 1157.

Helvella acetabulum (L.) Quél. Amasya, çam ormanı, 21.04.2012, Aktaş 1140; Amasya, çam ormanı, 22.04.2012, Aktaş 1148.

Helvella spadicea Schaeff. Isparta, kavaklık, 16.12.2011, Aktaş 1124; Amasya, kavaklık, 20.04.2012, Aktaş 1133; Amasya, kavaklık, 21.04.2012, Aktaş 1139.

Peziza michelii (Boud.) Dennis Amasya, çam ormanı, 23.04.2012, Aktaş 1153.

Peziza varia (Hedw.) Fr. Amasya, çam ormanı, 22.04.2012, Aktaş 1149.

Gyromitra esculenta (Pers.) Fr. Antalya, çam ormanı, 25.11.2011, Aktaş 1120; Amasya, köknar-çam ormanı, 21.04.2012, Aktaş 1138; Amasya, çam ormanı,

20.04.2012, Aktaş 1134; Amasya, çam ormanı, 21.04.2012, Aktaş 1143; Amasya, çam ormanı, 12.06.2012, Aktaş 1156;

Verpa conica (O.F. Müll.) Sw. Amasya, kavaklık, 21.04.2012, Aktaş 1136.

Sarcoscypha coccinea (Gray) Boud Isparta, çam ormanı, 16.12.2011, Aktaş 1126; Isparta, çam ormanı, 17.12.2011, Aktaş 1127; Isparta, çam ormanı, 18.12.2011, Aktaş 1129; Amasya, çam ormanı, 23.04.2012, Aktaş 1150.

Morchella esculenta (L.) Pers. Amasya, çam ormanı, 20.04.2012, Aktaş 1135; Amasya, çam ormanı, 21.04.2012, Aktaş 1137; Amasya, çam ormanı, 22.04.2012, Aktaş 1144.

3.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için toplanan mantar türleri, HM1, HM2, HM3, HM4, HM5, HM6, HM7, HM8, HM9, HM10, HM11, HM12 olarak isimlendirilmiş ve bu isimlere ait olan mantar türleri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan mantar türleri

HM1	*Helvella ephippium* Lév.
HM2	*Helvella lacunosa* Afzel.
HM3	*Helvella leucomelaena* (Pers.) Nannf.
HM4	*Helvella queletii* Bres.
HM5	*Helvella acetabulum* (L.) Quél.
HM6	*Helvella spadicea* Schaeff.
HM7	*Peziza michelii* (Boud.) Dennis
HM8	*Peziza varia* (Hedw.) Fr.
HM9	*Gyromitra esculenta* (Pers.) Fr.
HM10	*Verpa conica* (O.F. Müll.) Sw.
HM11	*Sarcoscypha coccinea* (Gray) Boud.
HM12	*Morchella esculenta* (L.) Pers.

DNA izolasyonu Soltis tarafından modifiye edilen Doyle'nin metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Soltis ve ark., 1991). Mantar materyalinden genomik DNA'nın elde edilmesi için, toplanan mantar örneklerinin her birinden 0,01 gr alınıp havanda ezilerek toz haline getirilmiş, ependorf tüpüne konulmuş daha sonra 65 ºC'de ısıtılmış DNA ekstraksiyon tamponundan 500 µl ilave edilip aralıklarla karıştırılarak 65°C'de inkübe edilmiş ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Üzerine 500 µl kloroform ilave edilmiş, 5 dakika 14.000 rpm'de santrifüjden sonra sıvı kısım yeni bir ependorf tüpüne aktarılmıştır. Üzerine tekrar 500 µl kloroform ilave edilmiştir. 5 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilip açık krem renkli sıvı kısım (süpernatant) tekrar yeni bir

eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Elde edilen süpernatant kısım üzerine amonyum asetat, izopropanol eklenip 3 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve sıvı kısım atılıp eppendorf tüpünün dibindeki pellete 1 ml %70'lik etanol eklenmiştir. 3 dakika 14.000 rpm de santrifüj edilip sıvı kısım tekrar atılmış pellet kısmının kuruması için ependorf tüpü 30 dakika vakumda bekletilmiştir. Bunun sonunda ependorf tüpüne 50 µl 1 x TE (Tris-EDTA) ilave edilmiş ve 15 dakika 65 ºC'de su banyosunda tutulmuştur.

3.2. DNA Konsantrasyonunun Tayini

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

Çalışmada Çizelge 3.2'de gösterilen ve British Colombia Üniversitesinden elde edilen ISSR primerleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan Primerler, Primerlerin No'su, Nükleotid Dizilimleri, Baz Sayıları ve Yapışma Sıcaklıkları

Sıra No	Primer No	Nükleotid Dizilimi (5'-3')	Baz Sayısı	Yapışma Sıcaklıkları (°C)
1	UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	17	52
2	UBC809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	17	52
3	UBC824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	17	52
4	UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	17	52
5	UBC834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	18	53
6	UBC840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	18	53
7	UBC847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	18	55
8	UBC857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	18	55

Çizelge 3.2'de verilen 8 primer seçilmiştir. Bu 8 primer içinden 6 tanesi (UBC809, 827, 834, 847, 857, 840) çalıştığımız örneklerin tümüne cevap vermiştir.

3.3. Optimizasyon

Öncelikli olarak seçilen primerlerden her biri için $MgCl_2$, Primer ve Taq polimeraz enzim miktarlarını kullanılacak en uygun yöntem araştırılmış ve araştırmalar

sonucunda Zietkiewicz ve ark. (1994)'nın belirttiği ISSR protokolü kullanılmıştır. Denemelerde en uygun Tm sıcaklıklarını bulmak için gradient uygulanmıştır.

ISSR analizi 25 µl amplifikasyon reaksiyon çözeltisi**;** 75 mM Tris-HCl, pH=8.8, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM dATP, 100 mM dTTP, 100 mM dGTP, 100 mM dCTP, 0.2 mM primer, 1.0 unite Taq DNA polimeraz ve 10 ng DNA içermektedir**.** Sıcaklık ve döngü koşulları olarak, 94 °C'de 2 dk ön denatürasyon işleminden sonra, 36 döngü boyunca örnekler denatürasyon için 94 °C'de 1 dk, primerin DNA'ya yapışması için primere göre değişmek üzere 50-55°C 'de 1 dk ve uzama safhası için 72°C 'de 2 dk tutulmuştur. Ayrıca, örnekler son uzama safhası için 72°C 'de 10 dk bekletilmişlerdir.

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bütün Örneklere Uygulanması

Yapılan optimizasyon doğrultusunda bant sayısı ve bantlardaki parlaklık dikkate alınarak en iyi ürünün elde edildiği Tm sıcaklıkları her örneğe ayrı ayrı uygulanarak ISSR-PCR'ın gradient sonuçlarına göre en fazla bant oluşturan sıcaklıklar seçilmiştir.

3.5. Elektroforez

Elde edilen PCR ürünlerinden 3 µl alınarak, 2 µl yükleme solüsyonu ile karıştırılmıştır. %1.2 (w/v) agaroz jele yüklenmiştir. Üzerine 1 X TAE yürütme tamponu eklenerek 100 V'da 1-1,5 saat mini yatay elektroforezde yürütülmüştür. Jeller UV transilluminatör yardımı ile görüntülenmiş ve UV ışığı altında fotoğrafları çekilmiştir(Şekil 4.1).

3.6. DNA Bantlarının Skorlanması

Bu çalışmada kullanılan 12 farklı türün genotipinden elde edilen DNA bantları genotipler arasında karşılaştırıldı ve aynı hizada bulunanlar benzer bölge olarak düşünülerek bant varlığında 1, farklı hizalarda bulunanlar 0 olarak kodlandı (Iqbal ve ark. 1997; Zhang ve ark. 2005; Gutierrez ve ark. 2002; Abdalla ve ark. 2001; Senior ve ark. 1998; Rahman ve ark. 2002; Rana ve Bhat 2005; Tabar ve ark. 2004). Elde edilen bütün izler bağımsız olarak ikili değişken seklinde (1 ve 0) değerlendirildi.

3.7. Veri Analizi

Jeller üzerindeki bantların yorumlanmasıyla oluşturulan matrikslere göre, NTSYSpc 2.1 (Rohlf, 1997) programı ile benzerlik indeksine göre dendrogram oluşturulmuştur. Burada ölçüt; bir genotipteki herhangi bir bölgedeki bandın, soyundan geldiği başka bir genotipteki ve aynı bölgedeki bant ile benzeme ihtimalinin tahmin edilmesidir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Moleküler araştırma sonuçları

4.1.1. DNA Konsantrasyonları

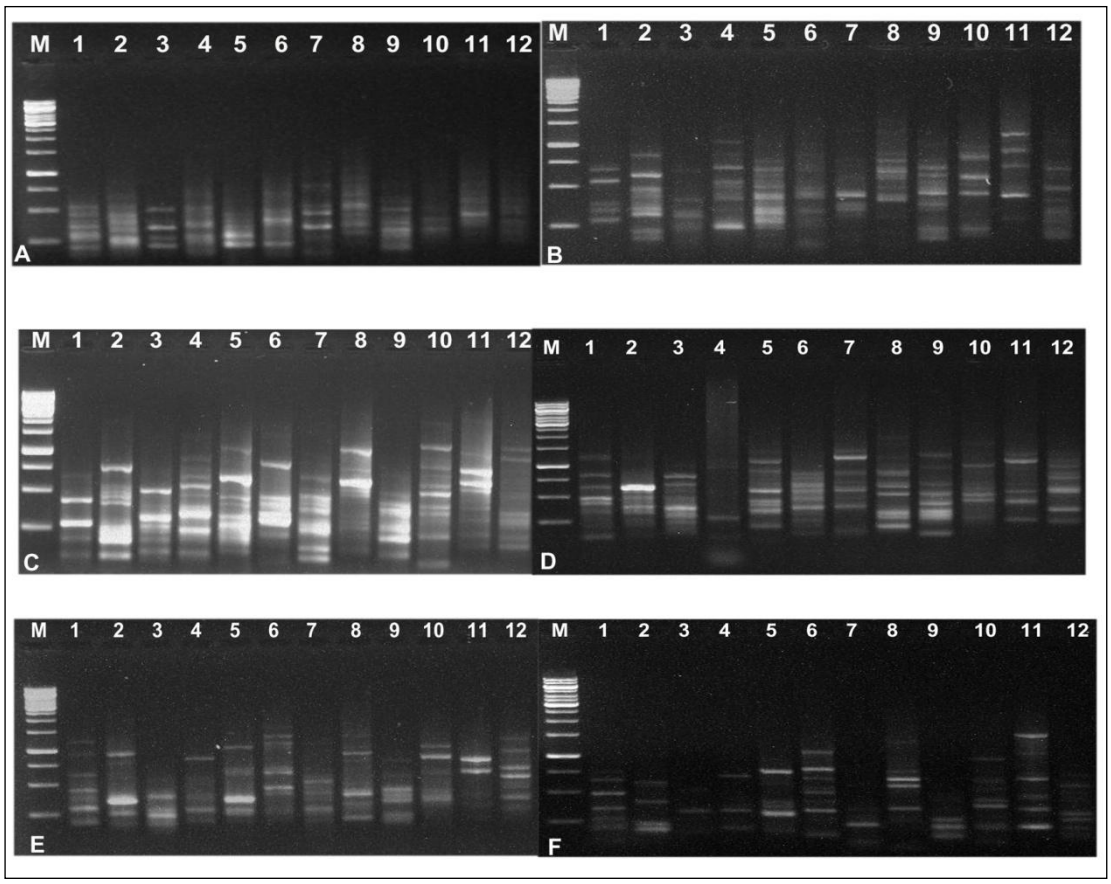
Helvella ephippium Lév., *H. lacunosa* Afzel., *H. leucomelaena* (Pers.) Nannf., *H. queletii* Bres., *H. acetabulum* (L.) Quél., *H. spadicea* Schaeff., *Peziza michelii* (Boud.) Dennis, *P. varia* (Hedw.) Fr., *Gyromitra esculenta* (Pers.) Fr., *Verpa conica* (O.F. Müll.) Sw., *Sarcoscypha coccinea* (Gray) Boud. ve *Morchella esculenta* (L.) Pers. türlerinin askokarplarından elde edilen DNA konsatrasyonları ve saflık derecesi ölçümleri çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Örneklerin Spektral Sonuçları

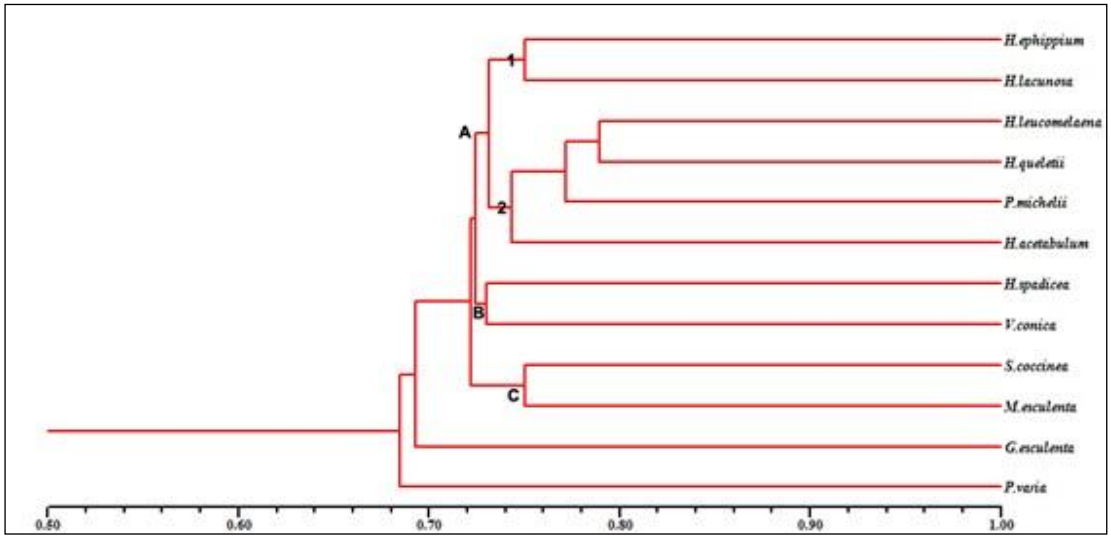
ÖRNEKLER	A260 λ	A280 λ	A260/A280	A260/A230	Konsantrasyon	Unit
HM1	35,888	18,072	1,99	1,83	1794,4	ng/µl
HM2	75,986	36,942	2,06	1,90	3799,3	ng/µl
HM3	38,582	18,761	2,06	1,86	1929,1	ng/µl
HM4	23,850	12,037	1,98	1,71	1192,5	ng/µl
HM5	48,347	24,166	2,00	1,73	2417,4	ng/µl
HM6	39,448	19,178	2,06	1,96	1972,4	ng/µl
HM7	35,593	17,103	2,08	2,23	1779,6	ng/µl
HM8	59,647	28,784	2,07	1,80	2982,3	ng/µl
HM9	50,924	24,510	2,08	1,98	2546,2	ng/µl
HM10	50,146	24,432	2,05	2,05	2507,3	ng/µl
HM11	6,835	3,860	1,77	0,78	341,8	ng/µl
HM12	83,425	38,951	2,14	2,21	4117,3	ng/µl

4.1.2. PCR Amplifikasyon Sonuçları

Elde edilen temiz DNA örneklerinden PCR amplifikasyonları yapılmıştır. PCR'da çoğaltma işleminde 8 farklı primer denenmiş olup bunlardan 6 tanesi tüm örneklere cevap vermiştir. Bu primerler sırasıyla UBC809, UBC827, UBC834, UBC840, UBC847 ve UBC857 primerleridir. Elde edilen ürünler jele yüklenmiş, monomorfik ve polimorfik bantlar skorlanarak yaklaşık 204 karakterli bir veri matriksi oluşturulmuştur. Amplifikasyon ürünlerine ait jel resmi aşağıda verilmiştir. Veri matriksi yardımıyla elde edilen dendogram Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Kullanılan primerler A. UBC 809, B. UBC 827, c. UBC 834, D. UBC 840, E. UBC 847, F. UBC 857 ve çalışılan türlerin amplifikasyon sonrası ürünlerine ait jel resimleri (M.Markır, 1. *Helvella ephippium*, 2. *H. lacunosa*, 3. *H. leucomelaena* 4. *H. queletii* 5. *H. acetabulum*, 6. *H. spadicea*, 7. *Peziza michelii*, 8. *P. varia*, 9. *Gyromitra esculenta*, 10. *Verpa conica*, 11. *Sarcoscypha coccinea* ve 12. *Morchella esculenta*)



Şekil 4.2 Türlerin genetik ilişkilerini gösteren dendogram

4.2. Morfolojik Karakterlerin Sınıflandırılması

Helvella ephippium Lév., *H. lacunosa* Afzel., *H. leucomelaena* (Pers.) Nannf., *H. queletii* Bres., *H. acetabulum* (L.) Quél., *H. spadicea* Schaeff., *Peziza michelii* (Boud.) Dennis, *P. varia* (Hedw.) Fr., *Gyromitra esculenta* (Pers.) Fr., *Verpa conica* (O.F. Müll.) Sw., *Sarcoscypha coccinea* (Gray) Boud. ve *Morchella esculenta* (L.) Pers. Türlerine ait nicel karakterlerin karşılaştırılması çizelge 4.2'de, nitel karakterlerin karşılaştırılması çizelge 4.3 ve çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Türlerin nicel karakterlerinin karşılaştırılması

Mantarlar	Spor Boyu	Spor Eni	Askokarp Genişliği	Sap Boyu	Askus Boyu	Askus Genişliği	Askusdaki Spor Sayısı
Helvella ephippium	22 µm	13 µm	25 mm	50 mm	300 µm	15 µm	8
Helvella lacunosa	20 µm	12µm	50 mm	80 mm	350µm	16 µm	8
Helvella leucomelaena	22 µm	14 µm	40 mm	15 mm	300 µm	16 µm	8
Helvella queletii	17 µm	12 µm	70 mm	15 mm	225 µm	16 µm	8
Helvella acetabulum	22 µm	14 µm	60 mm	40 mm	320 µm	20 µm	8
Helvella spadicea	22 µm	15 µm	30 mm	80 mm	300 µm	18 µm	8
Peziza michelii	17,5 µm	8 µm	50 mm	Yok	280 µm	12 µm	8
Peziza varia	16 µm	11 µm	60 mm	Yok	300 µm	14 µm	8
Gyromitra esculenta	21 µm	10 µm	150 mm	50 mm	350 µm	20 µm	8
Verpa conica	20 µm	15 µm	40 mm	130 mm	350 µm	23 µm	8
Sarcosypha coccinea	39 µm	13 µm	70 mm	20 mm	450 µm	16 µm	8
Morchella esculenta	23µm	14 µm	100 mm	100 mm	380 µm	22 µm	8

Çizelge 4.3 Türlerin nitel karakterlerinin karşılaştırılması

MORFOLOJİK KARAKTERLER				
Mantarlar	**Spor Şekli**	**Spor Yüzeyi**	**Spor Rengi**	**Askus Şekli**
Helvella ephippium	Genişçe Eliptik	Düz	Şeffaf	Silindirik
Helvella lacunosa	Genişçe Eliptik	Düz	Şeffaf	Silindirik
Helvella leucomelaena	Genişçe Eliptik	Düz	Şeffaf	Silindirik
Helvella queletii	Genişçe Eliptik	Düz	Şeffaf	Silindirik
Helvella acetabulum	Genişçe Eliptik	Düz	Şeffaf	Silindirik
Helvella spadicea	Eliptik	Düz	Şeffaf	Silindirik
Peziza michelii	Eliptik	Siğilli	Şeffaf	Silindirik
Peziza varia	Eliptik	Düz	Şeffaf	Silindirik
Gyromitra esculenta	Eliptik	Düz	Şeffaf	Silindirik
Verpa conica	Genişçe Eliptik	Düz	Şeffaf	Silindirik
Sarcosypha coccinea	Eliptik	Düz	Şeffaf	Silindirik
Morchella esculenta	Eliptik	Düz	Şeffaf	Silindirik

Çizelge 4.4 Türlerin nitel karakterlerinin karşılaştırılması

MORFOLOJİK KARAKTERLER						
Mantarlar	**Askokarp Tipi**	**Askokarpın Rengi**	**Himenyum Rengi**	**Askokarp Yüzeyi**	**Sap Şekli**	**Sap Rengi**
Helvella ephippium	Apothecium	Soluk Kahverengi	Kahverengimsi Gri	Tüysüz	Silindirik	Beyazım Gri
Helvella lacunosa	Apothecium	Gri	Siyahımsı Gri	Tüysüz	Silindirik	Kahverengimsi Gri
Helvella leucomelaena	Apothecium	Beyazımsı Gri	Koyu Gri	Tüysüz	Silindirik	Beyaz
Helvella queletii	Apothecium	Beyazımsı Gri	Soluk Kahverengi-Koyu Gri	Tüylü	Silindirik	Gri-Koyu Sarı
Helvella acetabulum	Apothecium	Soluk Kahverengi	Kırmızımsı Kahverengi	Tüysüz	Silindirik	Beyazım Gri
Helvella spadicea	Apothecium	Koyu Kahverengi	Siyahımsı Gri	Tüysüz	Silindirik	Beyaz
Peziza michelii	Apothecium	Kırmızımsı Kahverengi	Kırmızımsı Kahverengi	Tüysüz	Yok	Yok
Peziza varia	Apothecium	Kahverengimsi Gri	Kırmızımsı Kahverengi	Tüysüz	Yok	Yok
Gyromitra esculenta	Apothecium	Kırmızımsı Kahverengi	Kırmızımsı Kahverengi	Tüysüz	Silindirik	Beyaz-Bal Sarısı
Verpa conica	Apothecium	Koyu Sarı	Koyu Sarı	Tüysüz	Silindirik	Beyaz-Bal Sarısı
Sarcosypha coccinea	Apothecium	Pembe	Kırmızı	Tüysüz	Silindirik	Beyaz
Morchella esculenta	Apothecium	Sarı	Sarı	Tüysüz	Silindirik	Beyaz-Bal Sarısı

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

ISSR kombine edilmiş analiz sonuçlarımıza göre NTSYSpc programı aracılığı ile oluşturduğumuz dendogramda üç ana kladın oluştuğu görülmektedir. Birinci ana klad (A) 2 alt gruba ayrılır. Birinci alt grupta *Helvella* cinsine ait türlerin büyük çoğunluğu (1 tür hariç) ile birlikte *Peziza michelii* türü yer alır (A2). Bu tür *H. leucomelaena* ve *H. queletii* türlerine % 76 oranında benzerlik göstermektedir. Klasik sınıflandırmalarda her iki cinsin *Pezizales* ordosunda yer alması ve anahtarda ayrımlarının yalnızca sap varlığı veya yokluğu esasına göre yapılmış olması dikkate alındığında *Helvella* ve *Peziza* cinsi türleri arasında görülen bu yakın genetik ilişki şaşırtıcı olmayacaktır. Bu klad içerisinde yer alan türlerden *H. leucomelaena* ve *H. queletii* birbirlerine % 78 oranında benzerlik göstermektedir. Bu iki tür morfolojik olarak askokarpın çanak biçiminde oluşu ve saplarının oluklu olması ile benzerlik gösterir. Bu kladda en dışta *H. acetabulum* türü yer alır. Bu kladdaki diğer türlere % 74 oranında benzerlik gösterir. Diğer alt kladda *H. ephippium* ile *H. lacunosa* türü birlikte yer alır. Bu iki tür birbirlerine % 75 oranında benzerlik gösterir. A kladında yer alan türlerin genetik açıdan birbirine oldukça benzediğini ve aralarındaki uzaklığın en fazla % 27 olduğu görülmektedir. B kladında *H. spadicea* ve *Verpa conica* türleri yer almakta ve bu iki tür birbirine % 73 oranında benzerlik göstermektedir. Daha önceki sınıflandırmalarda *V. conica* *Helvella* cinsi içerisinde değerlendirilmiş bir türdür. Analizlerimizde bu türün *Helvella* kümesi içerisinde yer alması oldukça anlamlıdır. Çünkü morfolojik olarak *V. conica* türü sap ve askokarp şekli ile *Helvella* türlerine oldukça benzemektedir. Böylece genel bir bakış açısıyla A ve B kladlarına Helvella kümesi veya grubu diyebiliriz. C kladında *Helvella* kümesine yakın ilişkili olan *Morchella* ve *Sarcocypha c*inslerine ait türler yer almaktadır. Bu iki cinse ait türler *Helvella* kümesine ait türlere kıyasla birbirlerine daha yakın bulunmuştur (% 75 benzerlik). Üç ana klada en dıştan sırasıyla *Gyromitra esculenta* (% 69 benzerlik) ve *Peziza varia* (% 67 benzerlik) türleri bağlanmıştır. *P. varia* türünün diğer *Peziza* türü ile oldukça uzak bir konumda yer alması oldukça şaşırtıcı bir sonuçtur. Çalışmamızda dış grup olarak kullandığımız *M. esculenta* (L.) Pers. türü nisbeten *Helvella* cinslerini ile yakın ilişkili çıkması da şaşırtıcı bir durumdur.

Sonuç olarak *Helvella* ve yakın ilişkili cinsleri içeren moleküler analizlerimiz *Pezizales* ordosu içerisinde yer alan taksonların familya ve cins seviyesinde yeni düzenlemelere ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. Bu sebeple bu ordo içerisinde

sınıflandırılmış taksonların büyük bir bölümünü içeren taksonların yer aldığı uygun gen ve moleküler yaklaşımlar ile revizyon niteliğinde bir çalışmanın yapılması gerekmektedir. Biz bu noktada gelecekte yapılacak çekirdek (rDNA) DNA'sına ait ITS ve benzeri gen bölgelerine ait dizileme analizlerinin bu problemleri çözmede yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Abdalla, A.M., Reddy, O.U.K., El-Zik, K.M., Pepper, A.E., 2001, Genetic Diversity and Relationships of Diploid and Tetraploid Cottons Revealed Using AFLP, *Theor Appl Genet*., 102, 222-229.

Başıbüyük, H.H., Bardakçı, F. Belshaw, R., Quicke, D.L.J., 2000, Phylogenetic Systematics: A Practical Guide to Theory and Practice, Önder Matbaa, Sivas.

Blackwell, M., Vilgays, R., James, T.Y., Taylor, J.W., 2007, *Fungi* [online], http://www.tolweb.org/Fungi/2377/2007.07.13 [Ziyaret Tarihi: 27 Mayıs 2012].

Breitenbach, J., Kränzlın, F., 1984–2005. Fungi of Switzerland (Volume 1)., Andrlag Mykologia.

Bridge, P.D., Spooner, B.M., Roberts, P.J., 2005, The Impact of Molecular Data in Fungal Systematics, *Advances in Botanical Research*, 42, 33-67.

Çebi Kılıçoğlu, M., Özkoç, İ., 2008, Fungal Sistematikdeki Moleküler Gelişmeler, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi,* 23 (1), 65-72.

Dennis, R.W.C., 1981, British Ascomycetes, A. R. Gantner Verlag K. G., FL-9490 Vaduz Germany.

Dähncke, R.M., 1993, 1200 Pilze, AT Verlag Aarau, Stuttgart.

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.

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 inter-simple sequence repeat markır, *World J Microbiol Biotechnol,* 24, 1617–1622.

Gutierrez, O.S., Basu, S., Saha, S., Jenkins, J.N., Shoemaker, D.B., Cheatham, C.L., McCarty, J.C.Jr., 2002, Genetic Distance Among Selected Cotton Genotypes and its Relationship with F2 Performance, *Crop Sci.*, 42, 1841-1847.

Iqbal, M.J., Aziz, N., Saeed, N.A., Zafar, Y., Malik, K.A., 1997, Genetic Diversity Evaluation of Some Elite Cotton Varieties by RAPD Analysis, *Theor Appl Genet*., 94, 139-144.

Kaşık, G., 2010, Mantar Bilimi, Marifet Matbaa ve Kağıtçılık, No; 8, Konya.

Kauserud, H., Schumacher, T., 2003, Regional and local population structure of the pioneer wood-decay fungus *Trichaptum abietinum*, *Mycologia*, 95(3), 416–425.

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* [online], http:// www.gwu.edu/~clade/faculty/lipscomb/Cladistics.pdf [Ziyaret Tarihi: 22 Mayıs 2012.]

Medardi, G., 2006, Ascomiceti d'Italia, Via G. Mazzini, 21-25086 Rezzato (BS) Italy.

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.

Moore-Landecker, E., 1996, Fundementals of the Fungi, *Upper Saddle River,* 574.

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.

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.

Quicke, D. L.J., 1993, Principles and Techniques of Contemporary Taxonomy, Blackie Academic & Professional, London.

Rahman, M., Hussian, D., Zafar, Y., 2002, Estimation of Genetic Divergence among Elite Cotton Cultivars-Genotypes by DNA Fingerprinting Technology, *Crop Sci*., 42, 2137-2144.

Rana, M.K., Bhat, K.V., 2005, A Comparison of AFLP and RAPD Markers for Genetic Diversity and Cultivar Identification in Cotton, *J Plant Biochem Biotechnol.,* 13 (1), 19-24.

Rohlf, F. J., 1997, NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system user guide, Exeter Software, New York, 0-925031-28-3.

Senior, L.M., Murphy, J.P., Goodman, M.M., Stuber, C.V., 1998, Utility of SSRs for Determining Genetic Similarities and Relationships in Maize Using an Agarose Gel System, *Crop Sci*., 38, 1088-1098.

Sesli, E., Denchev, CM., 2008, Checklist of the myxomycetes, larger ascomycetes, and larger basidiomycetes in Turkey, *Mycotaxon,* 106, 65-67.

Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A., 1991, Identification of *Rhizoctonia* species, *The American Phytopathological Society St.,* 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.

Tabar, M. V., Chandrashekaran, S., Rana, M.K., Bhat, K.V., 2004, RAPD Analysis of Genetic Diversity in Indian Tetraploid and Diploid Cotton (*Gossypium* spp.), *J Plant Biochem Biotechnol*., 13, 81-84.

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

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.

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*, 21-32.

Vandenkoornhuyse, P., Leyval, C., Bonnin, I., 2001, High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events, *Heredity*, 87, 243-253.

Wipf, D., Munch, J. C., Botton, B., Buscot, F., 1996, 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, 3541–3543.

Yalım, D., 2005, Türkiye'de Yetişen Arpa Çeşitlerinde Genetik Çeşitliliğin ISSR (Basit Dizilim Tekrarları) Moleküler Marker Tekniği İle Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana.

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, J.F., Lu, Y.Z., Yu, S.X., 2005, Cleaved AFLP (cAFLP), a Modified Fragment Length Polymorphism Analysis for Cotton, *Theor Appl Genet*., 111(7), 1385-1395.

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 markırs, *Appl Microbiol Biotechnol*, 74, 140–145.

Zhou, Z., Miwa, M., Hogetsu, T., 1999, Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR), *New Phytol*., 144, 55-63.

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

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Mehmet Ali KARASELEK
Uyruğu	**:**	T.C
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Konya/1986
Telefon	**:**	0 505 924 44 21
Faks	**:**	
e-mail	**:**	malikaraselek@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Muhittin Güzelkılınç Lisesi, Meram, Konya	2004
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Selçuklu, Konya	2009
Yüksek Lisans	:		
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2009-2010	Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezi	Biyolog
2011-	Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Terapötik Aferez Merkezi ve Kök Hücre Nakil Ünitesi	Biyolog

UZMANLIK ALANI

Mikoloji

YABANCI DİLLER

İngilize

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

Bozkurt, M., Karaselek, M.A., Aktaş, S. , Uysal, T., 2011, DNA isolation of macrofungi, XVI. *Congress of European Mycologists*, Halkidiki, Yunanistan, 213-214.