

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI



TÜRKİYE'NİN FARKLI BÖLGELERİNDE YAYILIŞ
GÖSTEREN SCLERODERMATACEAE CORDA (1842)
ÜYELERİNİN MOLEKÜLER FİLOGENİSİ

Doktora Tezi

Amir SAGHAFIAN

Danışman

Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

II. Danışman

Prof. Dr. Ilgaz AKATA

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.FEN.1904.19.020 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Amir SAGHAFIAN tarafından, Prof. Dr. İbrahim Özkoç danışmanlığında hazırlanan “TÜRKİYE’NİN FARKLI BÖLGELERİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN SCLERODERMATACEAE CORDA (1842) ÜYELERİNİN MOLEKÜLER FİLOGENİSİ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 31.1.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Zeynep Kolören Ordu Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof.Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Dr. Öğretim Üyesi Mustafa EVREN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Doç. Dr. Cem Tolga GÜRKANLI Ordu Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ali BOLAT
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet

Hayır

27/09/ 2023
Amir SAGHAFIAN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı :TÜRKİYE'NİN FARKLI BÖLGELERİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN SCLERODERMATACEAE CORDA (1842) ÜYELERİNİN MOLEKÜLER FİLOGENİSİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 29.08.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 10

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

27 /09/ 2023
Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

ÖZET

TÜRKİYE'NİN FARKLI BÖLGELERİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN SCLERODERMATACEAE MOLEKÜLER FİLOGENİSİ ÜYELERİNİN MOLEKÜLER FİLOGENİSİ

Amir SAGHAFIAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
Yüksek Lisans, Ağustos/2023
Danışman: Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

Makrofunguslar çıplak gözle görülebilen fruktifikasyon yapıları oluşturan organizmalar grubudur. Bu organizmaların yenilebilir formları olduğu gibi oldukça zehirli formları da mevcuttur. Makrofunguslar denilince akla Basidiomycota ve Ascomycota üyeleri gelmektedir. Bu araştırmanın konusunu oluşturan Sclerodermataceae üyeleri Basidiomycota içinde Boletales takımı içerisinde değerlendirilmektedir. Ancak söz konusu familyanın taksonomik durumuna ilişkin hem familya seviyesinde hem de içerdiği cins ve türleri bakımından belirsizlikler hala devam etmektedir. Yakın zamana kadar fenotipik olarak değerlendirilen ilişkiler günümüzde gelişen moleküler ve filogenetik teknikler sayesinde moleküler filogenilerle değerlendirilmektedir. Ayrıca bu tip organizmalarla ilgili fungoryum materyalleri giderek önem kazanmakta ve bunların moleküler filogenilerle yeniden değerlendirilmesi güvenilir veriler oluşturmaktadır. Çalışmamızın amacını da bu değerlendirme oluşturmuştur. Sonuçta ülkemizin değişik bölgelerinde toplanan örnekler yukarıda belirtilen metodolojiye göre değerlendirilerek K01'in (ve diğerleri) *Sc. verrucosum* , K07'nin (ve diğerleri) ise *Sc. meridionalr* , K11'in (ve diğerleri) ise *Sc. geaster* , K15'in (ve diğerleri) ise *Sc. citrinum* , K18'in (ve diğerleri) ise *Sc. cepa* , K21'in (ve diğerleri) ise *Sc. bovista* ve K21'in (ve diğerleri) ise *Sc. areolatum* ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Makrofungus, Moleküler Filogeni, *Scleroderma*

ABSTRACT

MOLECULAR PHYLOGENE OF MEMBERS OF SCLERODERMATACEAE CORDA (1842) DISTRIBUTED IN DIFFERENT REGIONS OF TURKEY

Amir SAGHAFIAN
Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department BIOLOGY Programme
Ph.D., August/2023
Supervisor: Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

Macrofungi are a group of organisms that form fructification structures visible to the naked eye. These organisms have edible forms as well as highly toxic ones. When mentioning macrofungi, members of Basidiomycota and Ascomycota come to mind. The members of the Sclerodermataceae, which are the subject of this study, are evaluated within the Boletales order in Basidiomycota. However, uncertainties still persist regarding the taxonomic status of this family both at the family level and in terms of the genera and species it contains. Relationships that were evaluated phenotypically until recently are now assessed with molecular phylogenies thanks to advanced molecular and phylogenetic techniques. Moreover, fungal materials related to these types of organisms are becoming increasingly important, and their re-evaluation with molecular phylogenies is producing reliable data. The aim of our study was to conduct this evaluation. As a result, samples collected from different regions of our country have been evaluated according to the aforementioned methodology. It was shown that K01 (and others) is related to *Sc. verrucosum*, K07 (and others) to *Sc. meridionalr*, K11 (and others) to *Sc. geaster*, K15 (and others) to *Sc. citrinum*, K18 (and others) to *Sc. cepa*, K21 (and others) to *Sc. bovista*, and K21 (and others) to *Sc. areolatum*.

Keywords: Macrofungus, Molecular Phylogeny, *Scleroderma*

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında her konuda bilgi ve deneyimi ile yol gösteren, destek olan danışman hocam Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ hocama, her zaman her konuda olduğu gibi tez çalışmamda da büyük emekleri olan Prof. Dr. Ilgaz AKATA hocama eğitim hayatım boyunca hep bilgilerini ve deneyimlerini paylaşan tüm değerli hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Bu süreç boyunca bana büyük sabır gösterip katlandığı için değerli eşim Matin Sohrabi ye teşekkürlerimi sunarım. Hayatım boyunca yanımda olan, beni destekleyen aileme; özellikle sevgili anneme, babama ve kardeşlerime teşekkürlerimi sunarım.

Amir SAGHAFIAN

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Makrofungusun Kısımları	9
2.2. Kaynak Özetleri	19
2.3. Türkiyede Sclerodermataceae üzerinde yapılan çalışmalar	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Örneklerin Liyofilizasyonu	22
3.2.2. DNA Ekstraksiyonu	23
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi	27
3.2.4. DNA Saflık ve Konsantrasyon Ölçümü	28
3.2.5. ITS , 28S ve RPB2 Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	28
3.2.6. DNA Dizileme	31
3.2.7. Dizi Verilerinin Analizi ve Filogenetik Analiz	31
3.2.8. Örneklerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri (SEM)	32
3.2.9. Kullanılan Çözeltiler	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	35
4.1. Sclerodermataceae Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu	35
4.2. İzole edilen genomik DNA ların PCR ve dizileme işlemleri	39
4.3. Belirlenen türler ile dünyada yayılım gösteren benzer örneklerin yakınlığı karşılaştırılması	54
4.4. Taramalı Elektron Mikroskop çalışmaları	57
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	64
KAYNAKÇA	65
ÖZGEÇMİŞ	69

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ark	: Arkadaşları
dNTP	: Deoxynucleotide Triphosphate
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
ITS	: Internal Transcribed Spacer
PCR	: Polymerase Chain Reaction
SEM	: Scanning Electron Microscope
TBE	: Tris/Borate/EDTA
TE	: Tris-EDTA
SEM	: Scanning Electron Microscope



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Toplanan Sclerodermataceae üyelerine ait bir numune	22
Şekil 3.2. Liyofilizatör cihazı.....	23
Şekil 3.3. PCR Protokolü	29
Şekil 4.1. Agaroz gel üzerinde yürütülen DNA örnekleri.....	36
Şekil 4.2 Agaroz gel üzerinde yürütülen bazı ITS PCR örnekleri	40
Şekil 4.3 Diagen firmasından gönderilen örneğe ait ham dizi veri görüntüsü.....	41
Şekil 4.4. K18 izolatının BLAST sonucu	42
Şekil 4.5. DnaSP programı ile ITS veri setinin haplotipleri.	46
Şekil 4.6. Makrofungusların rDNA ITS numuneler arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren NJ ağacı.	48
Şekil 4.7. 28S bölgesinden elde edilen veri tabanından NJ filogenetik ağaç.....	50
Şekil 4.8. RPB2 bölgesinden elde edilen veri tabanından NJ filogenetik ağaç	51
Şekil 4.9. Dünyanın değişik yörelerine ait <i>S. areolatum</i> örneklerinin ilişkilerini gösteren NJ filogenetik ağacı	54
Şekil 4.10. Dünyanın değişik yörelerine ait <i>S. verrucosum</i> örneklerinin ilişkilerini gösteren NJ filogenetik ağacı	55
Şekil 4.11. Dünyanın değişik yörelerine ait <i>S. meridionale</i> örneklerinin ilişkilerini gösteren NJ filogenetik ağacı	56
Şekil 4.12. Scleroderma areolatum'a ait taze mantar ve SEM görüntüleri.	57
Şekil 4.13. Scleroderma bovista ait taze mantar ve SEM görüntüleri.....	58
Şekil 4.14. Scleroderma citrinum ait taze mantar ve SEM görüntüleri.....	59
Şekil 4.15. Scleroderma cepa ait taze mantar ve SEM görüntüleri.....	60
Şekil 4.16. Scleroderma geaster ait taze mantar ve SEM görüntüleri.....	61
Şekil 4.17. Scleroderma meridionale ait taze mantar ve SEM görüntüleri.	62
Şekil 4.18. Scleroderma verrucosum ait taze mantar ve SEM görüntüleri.	63

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1 PCR reaksiyonunda çözeltilerin konsantrasyonu ve hacmi.....	30
Tablo 4.1. DNA Saflık ve Konsantrasyon oranları	37
Tablo 4.2. Bu çalışmada kullanılan veri setini oluşturan dizilerin özellikleri	43
Tablo 4.3. Haplotip analizi sonucu benzer olan diziler ve analiz için seçilenler	47
Tablo 4.4. Çalışmadaki örnekler ve belirlenen türleri.....	53



1. GİRİŞ

Mantarlar, en gizemli hayat formları arasında yer alırlar. Yağmurlardan sonra görülüp üredikleri için, eski Yunan'lılar onların Zeus'un yıldırımlarından oluştuğuna inanırlardı. Makrofunguslar tarafından oluşturulan daire şeklindeki annuluslar Orta Çağ'da peri halkaları olarak adlandırılmıştı. Peri halkaları geceleri sihirli ayınlar düzenleyen küçük insanların çevrelerinde dans ettikleri yapılar olarak düşünülürdü. Yeni Dünya'da, bazı sanrı (halüsinasyon) oluşturan mantarlar, "Tanrıların Yiyecekleri" olarak adlandırılırdı ve doğa üstü güçlere sahip oldukları düşünülürdü.

Sclerodermataceae, boletelere çok az benzeyen birkaç olağandışı mantar türü içeren Boletales takımındaki bir mantar ailesidir. Yaygın olarak "sert derili baloncuklar", "toprak topları" veya "dünya yıldızları" olarak bilinen türleri içeren taksonlar, hem ılıman hem de tropikal bölgelerde yaygındır. (Cannon ve Kirk, 2007). En iyi bilinen üyeler arasında dünya küresi *Scleroderma citrinum*, boya mantarı *Pisolithus tinctorius* ve *Calostoma cinsinin* "güzel ağızlıları" yer alır.

Meyve gövdeleri çoğunlukla epigen (yer üstü), nadiren hipogen (yeraltı), şekil olarak az ya da çok küresel, gövdesiz veya düzensiz kök benzeri gövdelidir. Peridium (dış duvar) çoğunlukla basit, nadiren 2 katmanlı, sert, nadiren ince, zarlı, düzensiz veya loblarda kırılarak veya çürüyerek glebayı açığa çıkarır. Gleba, tipik olarak, steril damarlarla birbirinden ayrılan ve basidiumların doku boyunca düzenli olarak dağıldığı, keskin bir şekilde tanımlanmış basidiumları taşıyan sektörlere-bölmelere sahiptir. Genç örneklerde kahverengi veya beyaz olan gleba, yaşlandıkça koyu mordan kahverengimsi mora döner ve olgunlukta spor ve parçalanarak dokulardan oluşan bir toz halinde parçalanır. Basidiumlar genel olarak klava şeklindedir. Sporlar kahverengi, kabaca küre şeklinde, kalın duvarlı, dikenli veya siğilli veya ağ benzeri bir görünüme sahiptir. Sporlar rüzgar ve başka hayvanlar tarafından yayılır veya yağmur suyuyla toprağa yıkanır.

Son yıllarda, organizmalarda temel ve uygulamalı çalışmalar için moleküler belirteçler kullanılmıştır ve farklı tipte belirteçlerin keşfi, genetik çalışmalarda birçok ilerlemeye yol açmıştır. Bu belirteçler, bireyler arasındaki DNA dizilerindeki kalıtsal farklılıkları yansıtır. Bu nedenle çoğu zaman çevresel koşullardan etkilenmezler ve organizmaların büyümesinin herhangi bir aşamasında kullanılabilirler. Ribozomal RNA'yı kodlayan DNA dizileri, mantarlar arasındaki filogenetik ve taksonomik ilişkileri incelemek için uygun bölgelerdir. Nükleer

ribozomal genler iki gruba ayrılır: 18 S (küçük ribozomal alt birimler) ve 5.8 S ve 28 S (büyük ribozomal alt birimler).18 S ve 28 S arasında, 5.8s genlerini içeren ITS1 ve ITS2 adlı bolge bulunur. Heterojen mantar türlerinin genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde bu alanların çoğaltılması ve amplifikasyon ürünlerinin nükleaz enzimlerle kesilmesi özel bir önem taşımaktadır.

Bu tez ile ülkemizde sadece morfolojik olarak çalışılmış fakat moleküler olarak hiç değerlendirilmemiş olan ve uluslararası literature göre de genetik belirteç olarak sadece ITS ile kısmen, bir kaç türde ve farklı gen bölgeleri açısından ise sadece az sayıda ve yetersiz olarak çalışmıştır. Bu çalışma ile söz konusu organizmaların taksonomik durumuyla ilgili veriler netlik kazanmış ve yeni türlerin özellikle kriptik türlerin tesbiti mümkün hale gelebilmiştir. Bu verilere ek olarak ülkemiz örnekleriyle ilgili genetik veriler üretilmiş ve gerekli olduğunda karşılaştırma imkanı elde edilmiştir.

Moleküler çalışmaların fungus taksonomisinde uygulanabilir hale gelmesiyle, tüm fungus cinsleri ülkesel, ülkelerarası ve kıtalararası olarak değerlendirilmeye başlanmış ve fungus taksonomisinde yeni düzenlemelere gidilmiştir. Günümüze kadar morfolojik ve mikroskopik yöntemlerle yapılan tür belirleme çalışmaları, farklı gen bölgelerinin DNA dizi analizine dayalı moleküler yöntemlerle, tekrar gözden geçirilmekte ve moleküler yöntemlerle morfolojik-mikroskopik yöntemlerin birleştirilmesi sonucu daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir (Hawksworth, D. L. 2011).

Mantarlar, günümüz biyologları tarafından fungi taksonunda sınıflandırılan az gelişmiş ökaryotlardır ve bazen absorptif beslenme biçimlerine dayanarak "Beşinci Alem" olarak gruplandırılmışlardır. Mantarlar çevreye bir çok güçlü enzim salgılar ve daha sonra bu "önceden sindirilmiş" gıda maddelerini hücrelerine geri emerler. Morfoloji, fizyoloji ve ekoloji bakımından çeşitlilik gösteren en iyi bilinen mantarların çoğu, bitki hastalıklarının (ör. pas, yanıklık, solgunluk, pas), biyolojik bozulmanın sebebi (çürüme ve küf) veya hayvan patojenleri (ör. toksin ve mikoz üreticileri) olarak zararlı olmaktadır. Mantarlar, mikroskopik küfler ve mayalardan makroskopik mantarlara ve yer mantarlarına kadar büyük bir çeşitlilik gösterir. Çeşitli makrofungus türlerinin oldukça lezzetli oldukları bilinmekte olup gıda olarak tüketmek üzere toplanıp bazıları yetiştirilmektedir (Bennett, 1998).

Makromantarlar eşeyli sporların oluşumunu içeren bir hücre döngüsü ile Basidiomycetes ve Ascomycetes'e ait çok büyük ve çeşitli bir makrofungus

grubudur. Bu iki grup için mantar sporları, basidium (Basidiomycetes için) veya ascus (Ascomycetes için) adı verilen özel bir yapıda oluşturulur ve bu tür mantarlar, temel olarak basidiosporları içeren şemsiye benzeri yapılar vererek, yerin üzerinde (epigeous macrofungi) veya toprak yüzeyinin 10-20 cm altındaki derinliklerde (aşırı makrofunguslar veya trufes) gelişebilirler (Elsayed, vd., 2014).

Her iki mantar grubu da zengin karbonhidrat, protein, serbest amino asit ve vitamin kaynakları ve ayrıca farklı temel mineraller ve eser elementler içerdikleri için önemli bir besin değerine sahiptir. Ayrıca lektinler, polisakkaritler, fenolikler ve polifenolikler, terpenoidler, ergosteroller ve uçucu organik bileşikler gibi yüksek tıbbi değeri olan birçok biyoaktif metabolit açısından da zengindirler. Bu nedenle mantar özleri, immünomodülatör, antitümör/antikanser, antibakteriyel ve antiviral, antioksidan ve antihipoglisemik uygulamalarda, antiaterosklerotik ajanlar olarak etkileri yoluyla kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde aktif ilaçlar bağlamında tıbbi olarak kullanılmıştır (smith, J. ve johnson, L. 2020).

Toplu olarak mushrooms olarak adlandırılan makrofunguslar, dünya çapında yaklaşık 14.000 türle dünya çapında dağılmıştır (Chang, S.T., ve Miles, P.G. 2004). Dünyada yaklaşık 350 mantar türü tüketilmektedir. Dünya çapında en çok yetiştirilen yenilebilir mantarlar *Agaricus bisporus* (düğme mantarı), *Flammulina velutipes* (Enoki mantarı), *Lentinula edodes* (Shiitake mantarı) ve *Pleurotus* spp., özellikle istiridye mantarıdır. Son on yılda Çin, yenilebilir mantarların üretme ve yetiştirme tekniklerinde ve ayrıca mantar üretiminin artmasına yol açan ürün yeniliklerinde bazı önemli atılımlar yapmıştır. Birçok mantar, sağlığı geliştirici faydaları nedeniyle tüketilmektedir. En az 270 makrofungus türü, önemli ikincil metabolit kaynakları olarak araştırılmış olup tıbbi uygulamalar için gıda takviyeleri olarak geliştirilme potansiyeline sahiptir. Makrofungus üretimi ve ekonomik değeri küresel olarak artmıştır. Artan mantar talebi nedeniyle, küresel mantar pazarının yıllık toplam değerinin önümüzdeki birkaç yıl içinde 50 milyar ABD dolarını aşması beklenmektedir. Yenilebilir mantarların küresel piyasa değerinin 2023 yılında 62,19 milyar ABD dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir (Niego, vd., 2021).

Makrofungusların hem gıda maddesi hem de diğer yararlanım şekillerinin güvenli olabilmesi için teşhislerinin doğru bir şekilde yapılması gerekmektedir. Günümüzde mantar sistematigi bu problemin çözümüne yönelik bazı uygulamalar geliştirmektedir. Mantar sistematigi, tüm mantar soyları arasındaki doğal ilişkileri yeniden kurmayı amaçlayan bir disiplindir. Bu disiplinin, başlangıçta fenotipik esaslı

gelişmesine karşın, son yıllarda moleküler filogeni, mantar sistematigi oluşturmak için güçlü bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Zhang, vd., 2017). Makrofunguslar, çıplak gözle görülebilen meyve veren yapılar üreten bir tür grubudur. Birçok makrofungus türü, yoğun bir şekilde araştırılan tıbbi özellikleri ile dünya çapında ünlüdür (Wu ve diğerleri, 2019). Buna göre, bu türler yaygın olarak yetiştirilir ve fermente edilir ve elde edilen meyve gövdeleri ve miseller ticari olarak işlenir. Bu nedenle makrofunguslar, geleneksel Çin tıbbi endüstrisi için önemli mantar kaynaklarıdır. (Zhou, 2020).

Dikarya grubunda (Ascomycota ve Basidiomycota'dan oluşur), birçok tür, sporları mekana (milimetreden kilometreye) ve zamana (saatlerden yıllara) aktif olarak yaymak için üreme yapıları olan makroskopik meyve yapıları (sporokarp) oluştururlar. Sporokarplar, boyutları milimetreden yüzlerce metreye kadar değişebilen, yer altının veya substrat içi vejetatif misellerin yerüstündeki tezahürleri olan "buzdağlarının uçları"dır. Görünür varlıkları nedeniyle, mantar biyologları, mantar sistematigini ve ekolojisini gözlemlemek ve analiz etmek için sporokarlara güvenmişlerdir. 1990'ların başında benimsenen DNA tabanlı çıkarımlar, daha sonra substratlarında yaşayan mantarlara ilişkin yeni anlayışlara izin vermiş olup şimdi çoğu mantar biyolojisi araştırmasının merkezinde yer almaktadır. Bununla birlikte, mantar oluşumları, dağılımları ve çeşitliliği hakkında bilgi söz konusu olduğunda, mantarlardaki (herbaria'nın mikolojik eşdeğeri) sporokarp örneklerinin koleksiyonları, dünya çapında benzersiz örnekleme konumlarında DNA tabanlı bilgilerden çok daha fazladır.

Sporokarplar, birkaç yüz yıldır doğa bilimcileri, amatör mikologlar ve araştırmacılar tarafından mantarlarda toplanmış ve fungoriumlarda biriktirilmişlerdir. Bu materyaller günümüzde giderek daha çok önem kazanmaktadır. Ancak bu örneklerin sadece fenotipik değil günümüzde gelişen genomik tekniklerle değerlendirilmesi son derece önemlidir. Bu bağlamda bu çalışmanın konusunu oluşturan Sclerodermataceae üyelerinin moleküler tekniklerle değerlendirilmesi ve bu verilerin literatüre kazandırılması gelecekte yapılacak değerlendirmeler açısından önemli veriler sağlayacaktır (Kirk PM, vd., 2008).

2. GENEL BİLGİLER

Moleküler filogeni, organizmaların DNA, RNA veya protein sekanslarına dayanarak evrimsel ilişkilerini saptamak için kullanılan bir yöntemdir. Moleküler yaklaşımın uygulanması, filogenetik ağaçların oluşturulmasında daha önce kullanılan morfolojik veya fizyolojik özelliklere dayalı yöntemlerden daha kesin ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlar.

Moleküler Filogenisinin Temel Prensipleri:

1. **Sekans Karşılaştırma:** Organizmalar arasındaki evrimsel ilişkileri anlamak için genetik materyalin (genler, proteinler vb.) sekansları karşılaştırılır.
2. **Zaman Tahmini:** Ortak bir atadan ne zaman ayrıldıklarını tahmin etmek için moleküler saat yaklaşımı kullanılır. Bu, evrim sürecinde mutasyonların oranının sabit olduğu varsayımına dayanır.
3. **Filogenetik Ağaçların Oluşturulması:** Sekans bilgisi, organizmalar arasındaki evrimsel ilişkileri gösteren filogenetik ağaçların oluşturulmasında kullanılır (Felsenstein, J. 2004).

Moleküler Filogeninin Önemi:

1. **Sistematğin Geliştirilmesi:** Moleküler filogeni, canlıların sınıflandırılmasında ve evrimsel ilişkilerinin belirlenmesinde önemli bir araç haline gelmiştir. Bu, taksonomik kararlar alırken ve yeni türler keşfederken bilim insanlarına rehberlik eder.
2. **Evrimin Anlaşılması:** Evrimin mekanizmalarını, hızını ve sürecini anlamak için moleküler verilere dayanarak yapılan analizler kullanılır.
3. **Tıbbi Uygulamalar:** Virüslerin ve bakterilerin evrimini anlamak, hastalıkların tedavisinde ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemlidir. Özellikle dirençli mikroorganizmaların evrimini takip etmek için moleküler filogenetik yöntemler yaygın olarak kullanılır.
4. **Biyocoğrafya ve Evrimsel Ekoloji:** Organizmaların coğrafi dağılımlarının nasıl evrimleştiğini anlamak için moleküler verilere dayalı filogenetik analizler kullanılır. Aynı zamanda, belirli ekolojik nişlerde evrimleşen adaptasyonların kökenini de belirlemek için kullanılır.

5. **Koruma Biyolojisi:** Nesli tükenmekte olan türlerin genetik çeşitliliğini ve evrimsel özgünlüğünü anlamak için moleküler filogenetik araştırmaları kullanılır. Bu bilgiler, koruma önceliklerini belirlemede ve nesli tükenmekte olan türlerin genetik çeşitliliğinin korunmasında önemlidir (Avisé, J. C. 2009).

Moleküler filogeni, evrimsel biyolojiden tıbbı, ekolojiden koruma biyolojisine kadar birçok alanda derinlemesine bilgi ve anlayış sağlar. Modern biyolojik araştırmaların temel taşlarından biri olarak, evrimsel süreçleri ve canlıların birbiriyle olan ilişkilerini anlamamızı büyük ölçüde derinleştirir.

Moleküler filogeni ve morfolojik filogeni, organizmaların evrimsel ilişkilerini belirlemek için kullanılan iki temel yöntemdir. Her iki yaklaşımın amacı, canlılar arasındaki evrimsel bağlantıları ortaya çıkarmak olsa da, bu iki yöntem arasında temel farklar vardır:

Veri Kaynakları:

- **Moleküler Filogeni:** DNA, RNA ve protein sekansları gibi genetik bilgilere dayanır. Organizmaların genomlarındaki benzerlikleri ve farklılıkları analiz ederek evrimsel ilişkileri tespit etmeye çalışır.
- **Morfolojik Filogeni:** Organizmaların fiziksel ve anatomik özelliklerine (örneğin kemik yapısı, diş yapısı, deri tipi vb.) dayanır. Bu özelliklerin varlığı veya yokluğuna dayanarak evrimsel akrabalık ilişkileri belirlenir (Wiley, E. O., ve Lieberman, B. S. 2011).

Tarihçe:

- **Moleküler Filogeni:** Teknolojik ilerlemenin bir sonucu olarak 20. yüzyılın ikinci yarısından itibaren geliştirilen bir yöntemdir. Modern gen sekanslama teknolojilerinin gelişimiyle birlikte hızla popülerlik kazanmıştır.
- **Morfolojik Filogeni:** Bilimsel sınıflandırma ve evrimsel biyoloji tarihinin başlangıcından beri kullanılmaktadır. Moleküler tekniklerin ortaya çıkmasından önce, bilim insanları sadece bu yönteme dayanarak evrimsel ilişkileri belirlemeye çalışıyordu.

Avantajlar ve Sınırlamalar:

- **Moleküler Filogeni:** Genellikle daha objektif ve kesin sonuçlar sağlar. Ancak, bazen hızlı evrim geçiren gen bölgeleri veya türlü türlü genetik olaylar (örneğin, yatay gen transferi) yanıltıcı sonuçlara neden olabilir.
- **Morfolojik Filogeni:** Daha önce moleküler verisi olmayan fosil örnekleri gibi malzemelerle çalışabilme avantajına sahiptir. Ancak, konvergent evrim gibi olaylar sonucunda farklı atalardan gelen türler benzer morfolojik özellikler geliştirebilir, bu da yanıltıcı akrabalık ilişkilerine yol açabilir (Scotland, R. W., vd., 2003).

Her iki yaklaşım da kendi avantajlarına ve sınırlamalarına sahiptir. Genellikle en doğru ve kapsamlı sonuçları elde etmek için moleküler ve morfolojik verilerin birleştirilmesi önerilir. Bu, özellikle fosil kayıtlarının ve modern DNA verilerinin bir arada kullanıldığı paleontolojik çalışmalarda yaygın bir uygulamadır.

Günümüzde moleküler filogenisinin artan popülerliği, birçok faktöre dayanmaktadır. İşte moleküler filogenisinin neden daha sık kullanıldığına dair bazı temel nedenler:

Teknolojik İlerlemeler: DNA ve RNA'nın hızla ve ucuz bir şekilde sekanslanabilmesi, genetik bilginin büyük miktarlarda toplanmasını kolaylaştırmıştır. Bu ilerlemeler, genetik verinin daha geniş bir şekilde kullanılmasına olanak tanır.

Objektiflik: Moleküler filogeni genellikle morfolojik yaklaşımlara göre daha objektif sonuçlar sunar. Morfolojik benzerlikler konvergent evrim gibi olaylarla yanıltıcı olabilirken, genetik veriler genellikle daha doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlar.

Daha Fazla Veri: Bir organizmanın genomu, morfolojik verilere kıyasla daha fazla bilgi içerir. Bu, daha fazla evrimsel olayın ve ilişkinin tespit edilmesine olanak tanır.

Fosil Kayıtsız Evrimsel Tarih: Bazı organizmaların fosil kayıtları yoktur veya çok azdır. Bu tür durumlarda, moleküler veriler evrimsel ilişkileri aydınlatmada çok değerlidir.

Zaman Tahmini: Moleküler saat yaklaşımı, genetik mutasyonların oranına dayanarak evrimsel olayların zamanlamasını tahmin etmeye olanak tanır. Bu, organizmaların ne zaman ayrıldığını belirlemek için kullanılır.

Mikroorganizmaların İncelenmesi: Birçok mikroorganizma, morfolojik özellikleriyle kolayca sınıflandırılmaz, bu nedenle genetik verilere dayalı sınıflandırmalar çok daha bilgilendiricidir.

Evrimin Hızı ve Dinamikleri: Moleküler veriler, evrimin dinamikleri ve hızı hakkında daha derinlemesine bilgi sağlar. Bu, adaptif evrim, gen dönüşümü ve diğer evrimsel süreçlerin anlaşılmasında kritiktir.

Bu avantajlara rağmen, moleküler filogeni kendi başına her zaman tamamlayıcı ve kesin değildir. Bu nedenle, en kapsamlı ve doğru sonuçları elde etmek için genellikle morfolojik verilerle birleştirilmesi önerilir. Ancak, genel olarak moleküler filogeni, modern biyolojik araştırmaların çoğunda morfolojik yaklaşımlara üstün gelmektedir (Wiens, J. J. 2004).

Son yıllarda sürdürülebilir gelişme politikalarında biyolojik çeşitliliğin ön plana çıktığı ve ekonomik gelişmenin ana kaynağının biyolojik çeşitliliğe dayandığına ilişkin tartışmalar gündeme taşınmıştır. Biyolojik çeşitliliğin korunmasında ve kullanımında sürdürülebilir gelişme modelinin benimsenmesi, koruma politikalarının ekonomik politikalara dahil edilmesi bugünün ve gelecek kuşakların ihtiyaçlarının karşılanmasında önemli rol oynamaktadır (Demir 2013). Ülkemiz önemli bir bitki tür zenginliğine sahiptir. Bitkilerle funguslar özellikle de makrofunguslar arasında önemli bir etkileşim söz konusudur. Bu ilişkiler simbiyozdan parazitizme kadar değişebilmektedir (Watling, 2006).

Funguslar, doğada bulunan ve geniş bir biyolojik çeşitliliği barındıran bir ökaryotik organizma grubudur. Mantarlar, bakterilere benzer şekilde saprotrofik beslenen organizmalardır, yani ölü organik maddenin parçalanması ve ayrıştırılmasıyla enerjilerini elde ederler. Fakat bazı funguslar simbiyotik ya da parazitik yaşam sürer. Mantarların hücre duvarları tipik olarak kitin adlı molekülle oluşur, bu onları bitkilerden (hücre duvarlarında selüloz bulunur) ve hayvanlardan (hücre duvarı bulunmaz) ayırır.

Fungusların büyük bir kısmı mikroskopik boyuttadır ve çıplak gözle görülemeyen bu mantarlara mikro mantar denir. Ancak, çıplak gözle görülebilen ve bazen etli yapıya sahip olan mantar türleri de mevcuttur. Bunlara makro mantar adı verilir. Makro mantarlar, doğada kolayca gözlemlenebilir ve genellikle spor üretme organları olan meyve yapıları nedeniyle dikkat

çekerler. Mantarlar arasında en iyi bilinen makro mantarlar, yemek olarak tüketilen ve birçok kültürde değerli olan yenilebilir mantar türleridir (Hawksworth, D. L. 2001).

Makro mantarların, doğada çeşitli ekosistemlerde önemli rolleri vardır. Ayrıştırıcılar olarak, ölü organik materyalin parçalanmasına yardımcı olurlar, bu sayede besin döngüsüne katkıda bulunurlar. Bununla birlikte, makro mantarlar arasında bazı zehirli türler de bulunmaktadır ve bu türler, yanlışlıkla tüketildiğinde ciddi sağlık sorunlarına neden olabilir.

Bazı makro mantarlar, simbiyotik ilişkiler kurarak bitkilerle birlikte yaşarlar. Örneğin, mikoriza oluşturan mantarlar, bitki kökleriyle etkileşimde bulunarak su ve mineral alışverişi yapar. Bu, hem mantar için hem de bitki için faydalıdır. Mantar, bitkiye su ve besin sağlarken, bitki de mantara fotosentez yoluyla ürettiği şekerleri sağlar.

Son yıllarda, mantarların ekolojik ve ekonomik öneminin yanı sıra tıbbi ve biyoteknolojik potansiyelleri de araştırılmaktadır. Bazı makro mantar türleri, antibiyotik, anti-kanser ajanları ve diğer farmasötik bileşiklerin kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Funguslar ve özellikle makro mantarlar, doğal dünyanın kritik bir parçasıdır ve hem ekosistemlerin işleyişi hem de insanlık için çeşitli avantajlar sağlar. Bu nedenle, bu organizmaların korunması ve sürdürülebilir bir şekilde kullanılması büyük önem taşımaktadır (Money, N. P. 2016).

2.1. Makrofungusların Biyolojisi

Şapka, bir makrofungusun en çok göze çarpan bölümü olup, cinslerin ayırdedilmesinde önem taşır. Çoğu makrofungusun şapkası hemen hemen yuvarlak, konik, zil şeklinde veya konvektir. Çoğu tür, olgunlaştığı zaman, şapkası geniş-konveks, düz veya yukarıya doğru kıvrık kenarlı bir şekil alır. Bazı makrofunguslar, başlangıçta veya olgunlaştığında vazo şeklindedir. Şapkanın merkezi genişçe veya keskin bir şekilde tepeli veya çökmüş olabilir. Kenarı ise, içe kıvrık, aşağıya kıvrık, düz veya yukarıya kıvrık olabilir. Şapkalar, taze oldukları zaman kuru nemli, yapışkan veya sümüksü olabilirler. Şapkanın nemli olduğu zamanki rengi, nem oranı azaldıkça solar. Şapka yüzeyi düz ve tüysüz, tozlu, tanecikli veya radyal çizgilerle, tüylerle, pullarla veyahutta perde kalıntılarıyla donatılmış olabilir (Webster, J., & Weber, R. 2007).

Lamelli makrofungusların çoğunluğu, şapkanın merkezine yerleşmiş bir sapa sahiptir. Bir bölümünde sap, merkezin dışında bir yerde veya kenardadır. Bazı durumlarda da ya hiç bulunmaz ya da çok küçüktür. Sapsız makrofunguslar spor dağılımını garantilemek için

genellikle yerden yüksek ağaçlarda yaşarlar. Saplar, değişik şekillere sahiptir. Bir bölümü tepeden tabana kadar hemen hemen aynı kalınlıktadır. Tabani soğansı, gittikçe incelen bir yapıda veya dışı doğru büyüyen uzantılara sahip olabilir . Yüzeyi düz, benekli, çizgili, pullu, tozlu veya tüylü olabilir. Bazı türlerde sap büküldüğü zaman kopmasına karşın az bir bölümünde oldukça esnektir. İç kısımları boş, katı veya pamuksu bir dokuyla dolu olabilir. Çoğu tür, halka, etek veya şeritsi bir doku veya mantarın büyümesi sırasında sap üzerinde örtü zarı tarafından bırakılan bir lif bölgesine sahiptir. Diğerleri, tabana çok yakın bir yerde, volva adını alan, fincan şeklinde bir yapıya veya doku parçalarına sahiptir. Volva ve doku parçaları, universal örtünün kalıntılarıdır (Yılmaz , A. ve Çelik , M. 2020).

Bazı makrofunguslar , olgunlaşmamış evrede bütün vücutlarını veya lamellerin çevresini sarıp koruyan zarlara sahiptirler. Mantar büyüüp genişlediği zaman , zarlar yırtılarak şapka veya sap üzerinde izler bırakırlar. Eğer zar, bütün makrofungusu kuşatırsa, universal zar olarak bilinir ve yırtılması sırasında şapka üzerinde bazı parçalar, tabanda kese şeklinde bir yapı veya doku bantları bırakır.Olgunlaşmamış lamellari kuşatan zara , kısmi zar denir (Kirk, P.M. 2008).

Şapka genişlediği zaman kısmi zar parçalanır ve şapka kenarlarında veya sap üzerinde bazı kalıntılar bırakır. Kalıntılar çoğunlukla sap çevresinde bir halka (annulus) veya etek olarak görülür. Kısmi zar tarafından bırakılan halkamsı yapı, genellikle tek olmakla birlikte bazı türlerde iki tabakalıdır.birkaç türde halkalar gevşetilip hareket ettirilebilir (Demir, B. ve Kaya, E. 2021).

Sporlar, yeşil bitkilerin tohumlarında olduğu gibi şekil ve büyüklük yönünden birbirlerinden oldukça farklı olmalarına karşın, benzer bir üreme görevi üstlenirler. Yüksek bitkilerin tohumlarının çeşitli dokuları ve hücreleri içermelerine karşın, makrofungusların sporları oldukça küçük olup, genellikle bir hücre içerirler. Hücre, genellikle 5-10 mikron uzunluğunda olup, ender olarak 30 mikronu geçer. Sporlar, çeşitli şekillerde olabilir. Yüzeyleri düz veya çeşitli yapılarla donatılmıştır.

Şapkalı mantarların çoğunda sporları taşıyan ve hymenium adını alan bir yüzey (örneğin; Polyporus' un porları, lamelli makrofungusların lamelleri gibi) oluşur. Sistidium adını alan çeşitli steril hücreler çoğunlukla basidiumlar boyunca himenium tabakasında bulunur. Sistitlerin özellikleri türlerin teşhisinde gereklidir. Sistitler, aynı zamanda şapka üzerinde veya sap üzerinde de bulunup birbirine yakın türlerin teşhisinde kullanılırlar (Webster, J. 2007).

Makrofungus toksinleri , makrofungusların çeşitli familyalarında bulunur. Çoğu zehirli tür, insan için öldürücü değildir. Fazla miktarda yendikleri zaman mide bulantısı, ishal ve sancıya neden olurlar. Sadece birkaç tür makrofungus insanı öldürecek derecede zehire sahiptir. Diğerleri merkezi sinir sistemini etkiler. Ancak, az sayıda makrofungusun test edildiği unutulmamalıdır. Makrofunguslara ait zehirler; Phallotoksinler, amatoksinler, muscarine, muscimol, ibotenic asit, pantherin, tricholomic asit, psilocybin, psilocin, gyromitra toksinleri, gastrointestinal ve diğer toksinlerdir.

Tezimizin konusunu oluşturan funguslar içinde de benzer ilişkileri gösteren organizmalar bulunmaktadır. Sclerodermataceae, Basidiomycota içindeki Boletales takımının bir üyesidir. Bu aile dünya çapında dağılımı olan 6 cins (*Calostoma – Chlorogaster- Favillea – Horakiella – Scleroderma -Veligaster*) ve 72 ektomikorizal tür içermektedir. Türkiye mikrobiyotası ile ilgili literatüre göre, şimdiye kadar Türkiye'den 8 Sclerodermataceae üyesi ((*Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert, *Scleroderma areolatum* Ehrenb., *S. bovista* Fr., *S.citrinum* Pers., *S. meridionale* Demoulin ve Malençon, *S. polyrhizum* (J.F. Gmel.) Pers.ve *S. verrucosum* (Bull.) Pers.)) bildirilmiştir. Bu ailenin üyeleri epigin ya da subhipogin, globoz-subgloboz, sesil ya da pseudospitat basidiomata ile sert ya da kırılğan peridium, bazen pseudoperioller oluşturan pulverulent gleba, 2-8 sporlu, klavat-piriform basidium, globoz, pürüzsüz ya da süslü sporları ile karakterize edilmektedir (Akata, 2017).

Sclerodermataceae, mantarlar aleminde yer alan bir aileye verilen isimdir. Bu aile, genellikle toprakta yaşayan veya çürümekte olan bitki materyalleri üzerinde bulunan mantarları içerir. Sclerodermataceae ailesine ait mantarlar, genellikle yuvarlak veya küresel şekilli meyveleriyle tanınır. Bu aileye ait mantarlar, çoğunlukla mikorizal bir ilişki içinde yaşarlar. Mikoriza, mantarlar ve bitkiler arasında karşılıklı fayda sağlayan bir simbiyotik ilişkidir. Mantarlar, bitki köklerine bağlanarak bitkilerin su ve mineral emilimini artırırken, bitkiler de mantarlar için organik besin üretir. Sclerodermataceae mantarları da bu şekilde bitkilerle birlikte yaşayarak karşılıklı faydalar elde ederler.Sclerodermataceae ailesine ait mantarlar bazıları toprak altında yaşarlar ve genellikle çürümekte olan bitki materyalleri üzerinde bulunurlar. Bu mantarlar, toprakta organik madde ayrışımına yardımcı olurlar ve böylece ekosistemin döngüsüne katkıda bulunurlar. Ayrıca, bu mantarlar bazı böcek türlerinin beslenme kaynağı olabilirler.Sclerodermataceae ailesine ait mantarların meyveleri genellikle yuvarlak veya küresel

şekildedir. Bu meyveler, dış tabakadan oluşan bir kabukla kaplıdır. Kabuğun altında ise mantarın sporlarını içeren iç tabaka bulunur. Bu sporlar, mantarın üreme hücreleridir ve rüzgar veya hayvanlar tarafından taşınarak yayılırlar. Sclerodermataceae mantarları genellikle toprakta bulunurlar ve bazı türlerinin insan sağlığı üzerinde etkileri olabilir. Örneğin, Scleroderma citrinum türü zehirli bir mantardır ve tüketildiğinde ciddi zehirlenmelere neden olabilir. Bu nedenle, bu mantarların doğada toplaması veya tüketilmesi önerilmez. Sclerodermataceae mantarları ayrıca tıbbi amaçlar için de kullanılabilir. Örneğin, bazı türleri antibakteriyel veya antifungal özelliklere sahip olabilir ve bu nedenle ilaç endüstrisinde kullanılabilirler. Aynı zamanda, bu mantarlar doğal pigment kaynakları olabilir ve gıda veya tekstil endüstrisinde kullanılabilirler. Sclerodermataceae ailesi, toprakta yaşayan ve bitkilerle simbiyotik bir ilişki içinde olan mantarları içeren bir mantar ailesidir. Bu mantarlar, toprakta organik madde ayrışımına yardımcı olurlar ve bazı türleri insan sağlığı üzerinde etkileri olabilir. Aynı zamanda, tıbbi ve endüstriyel amaçlar için de kullanılabilirler.

Mantarların morfolojik karakterizasyonu için sporların ince detaylarının gözlemlenmesi son derece önemlidir ve türlerin tanımlanması için gereklidir. Genellikle yapılan optik mikroskopik gözlem, renksiz veya kalın dokular için uygun değildir. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) renksiz dokuları görselleştirmeyi mümkün kılar ve aynı zamanda sporlar gibi örneklerin uygun karakterizasyonları için üç boyutlu görüntüler oluşturur (Khaund ve Joshi 2013). Elektron mikroskopik yaklaşımı, ön görsel sınıflandırma ile üretilen mantarların bulanık kimliğinin çözülmesine yardımcı olmuş ve tür ayrımlarında belirleyici olmuştur (Khaund ve Joshi 2013). Bununla birlikte bu ve benzeri organizmaların taksonomik durumu netlik kazanmamıştır. Moleküler çalışmalar ise organizmaların ilişkileriyle ilgili detaylı ve tamamlayıcı veriler oluşturmaktadır.

Yaklaşık 1,5 milyon tür olduğu tahmin edilen Fungi aleminin, yaklaşık % 5'i resmi olarak sınıflandırılmıştır. Geleneksel fenotipik yöntemlere dayanan tür tanımlaması genellikle zaman alıcı ve zahmetlidir ve kültür koşullarından kolayca etkilenen fenotipik özelliklerin dengesiz ve öznel doğası tarafından engellenmektedir. Bu fenotipik yaklaşımların kültürde büyümeyen mantarlar üzerinde açık bir sınırlaması söz konusudur. Organizmaların taksonomik statüsünü kazanmak için genlerin kullanılmasını içeren moleküler sistematik ve bunların evrimsel ilişkileri,

geleneksel sistematik kavramlarında önemli değişikliklere neden olmuştur (Katoock ve Kapoor 2014).

Sistematığın amacı, organizmalar arasındaki evrimsel geçmişin ve birbirleriyle olan ilişkilerin belirlenmesi (filogeni) ve daha sonra organizmaların sınıflandırılmasında bu bilgilerin kullanılmasıdır. Sistematik alanında yapılan çalışmalarla, tüm yaşam formlarının filogenetik bir ağaçla bağlantısının kurulması, son 50 yılın en önemli keşiflerinden birini oluşturmaktadır (Lipscomb, vd., 2008).

Mantar sistematığı, tüm mantar soyları arasındaki doğal ilişkileri yeniden kurmayı amaçlayan bir disiplindir. Bu disiplinin, Carl Linnaeus ve onun ünlü kitabı *Species Plantarum*'un 1753'te yayınlanmasıyla başladığı yaygın olarak kabul edilir. Bundan sonra, makromorfolojik, mikromorfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, filogenetik ve filogenomik kanıtlar, mantar sistematığı için art arda veya eşzamanlı olarak gerekli kabul edilmiştir. Bunlardan moleküler filogeni, özellikle yüksek dereceli taksonlar arasındaki ilişkiyi araştırmak için mantar sistematığı oluşturmak için güçlü bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Zhang, vd., 2017).

Geleneksel olarak fungusların sınıflandırılmasında temel kriter eşeyli üreme yapılarıdır. (Blackwell, vd., 2008). 1970'lerden günümüze değin fungal sistematikte moleküler veriler tüm taksonomik seviyelerde kullanılmakta olup son yıllarda kullanım oranında önemli ölçüde artışlar olmuştur. Moleküler veriler Fungi alemindeki yüksek seviyeli taksonomik grupların ve büyük evrimsel soyların belirlenmesinde, düşük taksonomik seviyelerde ise türlerin, kısmi popülasyonların ve bireylerin teşhisinde kullanılmaktadır. Ancak moleküler verilerin yaygın kullanımında da bazı sınırlandırmalar da mevcuttur. (Bridge, vd., 2005, Kılıçoğlu ve Özkoç 2008).

Morfolojiye dayalı fungal taksonomisi ile yapılan teşhisler önemlidir, ancak hibridizasyon, kriptik türleşme ve yakınsak evrim gibi çeşitli faktörler nedeniyle yanıltıcı sonuçlar alınabilir. Sonuç olarak, çok farklı fungus grupları içindeki çeşitli filumlar arasında türler arasında ayırım yapmak için dizi veya DNA tabanlı tanımlama yöntemleri (barkodlama) ortaya çıkmıştır (Stajich, vd., 2009) (Raja, vd., 2017).

DNA barkodlama sistemleri, türleri tanımlamak için kısa bir standart bölge (400 ile 800 baz çifti arasında) kullanır. DNA barkodlamanın öncülü, türler arası varyasyonun, tür içi varyasyonu aşması gerektiğidir. Bu nedenle, standartlaştırılmış bir bölgenin bu farkı (yani barkod boşluğu), tür düzeyinde tanımlama için kullanılabilir (Hebert, vd., 2003). Temel bilim

perspektifinden bakıldığında, fungusların tanımlanmasında moleküler verilerin kullanımı, White, vd., (1990) tarafından nükleer mantar ribozomal operon primerleri üzerinde çığır açan çalışma ile yaklaşık 20 yıl önce ortaya çıkmıştır. Büyük alt birim (nrLSU-26S veya 28S), küçük alt birim (nrSSU-18S) ve 5.8S rRNA geni (Dahili Transkripsiyonlu Aralayıcı bölge, ITS1 ve ITS2 dahil) için bu primerlerden üretilen mantar dizileri, fungi taksonunda moleküler filogenetik dizi tanımlamasında yeni dönem başlatmıştır (Bruns, vd.,1991; Seifert, vd., 1995) (Raja, vd., 2017) .

ITS bölgesinin bu amaçla tercih edilmesinin birkaç nedeni vardır:

Evrimin Hızı: ITS bölgesi, nispeten hızlı bir evrimsel değişime uğrar. Bu, yakın akraba türler arasındaki farkları belirlemek için bu bölgeyi özellikle yararlı kılar.

Konservatif Sınır Bölgeleri: ITS1 ve ITS2 bölgeleri, genellikle daha konservatif olan 18S ve 28S ribozomal RNA genleri arasında yer alır. Bu konservatif bölgeler, PCR için özgül primerlerin tasarlanmasına olanak tanır, böylece ITS bölgesi kolayca amplifiye edilebilir.

Tür Özgüllüğü: ITS bölgesinin hızlı evrimsel değişimi sayesinde, birçok tür için özgül dizilim farklılıkları vardır. Bu, tür teşhisini ve filogenetik analizleri kolaylaştırır.

Büyük Veritabanı: ITS bölgesi, birçok çalışmada sıkça kullanılmıştır, bu nedenle bu bölgeye ait geniş bir dizi veritabanı bulunmaktadır. Bu, yeni çalışmaların önceki bilgilerle karşılaştırılmasını ve entegre edilmesini kolaylaştırır.

Teknik Kolaylık: ITS bölgesi, genellikle başarılı bir şekilde amplifiye edilir ve dizilendir. Bu, bu bölgenin rutin laboratuvar çalışmalarında kullanılmasını kolaylaştırır.

Geniş Taksonomik Kapsam: ITS bölgesi, geniş bir taksonomik yelpazede, farklı mantar grupları arasında iyi bir çözünürlük sağlar.

PCR uygulaması ile herbarium örnekleri artık moleküler genetik verilerin elde edilmesi için önemli bir kaynak haline gelmiştir. Sistematikçiler için bunun birkaç önemli sonucu vardır. Moleküler sistematik çalışmalar artık kültürde yaygın veya mevcut olan taksonlarla sınırlı kalmayacaktır. Tür adlarının doğrudan uygulanması, artık tip malzemesinin dizi analizi ile ele alınabilir. Popülasyon yapısında zaman içinde meydana gelen değişiklikler, oldukça değişken DNA bölgelerinin analizi ile incelenebilir. Küratörler için, moleküler genetik araştırmalar için herbarium örneklerinin kapsamlı kullanımı, yakında, tür koleksiyonlarının örneklenmesi için kılavuzlar geliştirmeyi ve ekstrakte edilmiş DNA'ların saklanması ve geri alınması için yöntemler geliştirmeyi arzu edilebilir kılabilir (Bruns, vd., 1990; Kılıçoğlu ve Özkoç 2008).

Makromantarlar, Basidiomycetes ve Ascomycetes'e ait çok büyük ve eşeyli sporların oluşumunu içeren bir hücre döngüsü olan fungus grubudur. Bu iki grup için mantar sporları, basidium (Basidiomycetes için) veya ascus (Ascomycetes için) adı verilen özel bir yapıda bulunur ve bu tür mantarlar, temel olarak basidiosporları içeren şemsiye benzeri yapılar vererek, yerin üstünde (epigen macrofungi) veya toprak yüzeyinin 10-20 cm altındaki derinliklerde (hipogen makrofunguslar veya trüfler) büyüyebilir (Elsayed, vd., 2014).

Filum Basidiomycota R.T. Moore (1980) 16 sınıf, 52 takım, 177 familya, 1589 cins ve 30.000'den fazla tür içermektedir. Tanımlanan mantar taksonlarının yaklaşık %32'sinin bu filuma ait olduğu tahmin edilmektedir. Basidiomycota, iyi bilinen bazı makromantarları ve ayrıca paslar, rastık mantarları ve mayalar gibi bazı mikro mantarları içerir. Bu grup içinde olağanüstü bir çeşitlilik olmasına rağmen, moleküler çalışmalar henüz tanımlanmamış çok sayıda takson olduğunu göstermektedir (Zhao, vd., 2017).

Geleneksel olarak Basidiomycota tipik olarak basidiumlar ve basidiosporların varlığı ile karakterize edilir. Son araştırmalar, bazı değişken morfolojik karakterlerin, hifal sistemlerdeki hücresel yapıların çeşitliliği, meiosporangiumlar, basidiokarplar ve septal gözenekler gibi ultrastrüktürel karakterler Basidiomycota'nın farklı düzey taksonlarında uzun bir evrimsel tarihin ifadesi olduğunu göstermektedir. Bu, benzersiz veya oldukça sınırlı morfolojik karakterler kullanarak daha yüksek taksonların (örneğin sınıflar, takımlar) tanımlanmasının öznel olduğunu gösterir.

Basidiomycota filumunun Ascomycota'nın monofiletik bir grup kardeş olduğu gösterilmiştir. Halihazırda Basidiomycota, Agaricomycotina (mantarlar, jöle mantarları, dirsek mantarları ve diğerleri), Pucciniomycotina (paslar) ve Ustilaginomycotina (Pas ve diğerleri) ve Wallemiomycetes olmak üzere üç ana dal içermektedir. Basidiomycota'nın daha üst düzey bir sınıflandırması, yaklaşık on yıl önce, esas olarak Deep Hypha ve AFTOL projeleri gibi bir dizi filogenetik çalışmaya dayalı olarak yayınlanmıştır (Zhao, vd., 2017).

Boletales, Agaricomycetes sınıfında (filum Basidiomycota, Fungi) bazı boletler, earthball, puffball (puf mantarı) ve sahte yer mantarı içeren mantar takımınıdır. Çoğu üye saprobiktir, öncelikle yere düşen ağaçların üzerinde veya ağaçların tabanındaki toprakta bulunurlar. İlgili bir puffball ve earthstar grubu olan Sclerodermataceae, Boletales takımına yerleştirilir. Toprakta ve çürüyen odun üzerinde bulunan bu türlerin bireyleri, olgunlaştıklarında sert bir dış çepere ve

koyu renkli bir iç kısma sahip puffball benzeri meyve gövdeleri oluştururlar (Anonymous 2022 Britannica.com)

Sclerodermataceae'nin taksonomik durumu henüz netlik kazanmamış bir fungal familyadır. Farklı kaynaklarda cins seviyesindeki gruplamalar bile değişim gösterebilmektedir. Sesli ve Denchev (2008), Dünya genelinde Sclerodermataceae corda familyası 5 cins (*Chlorogaster* & *Jalink*, *Favillea* fr., *Horakiella castellano* & *trappe*, *Scleroderma pers.* ve *Pisolithus alb.* & *schwein.*) ile temsil edildiğini, Türkiye'den günümüze kadar 8 Sclerodermataceae (*Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert, *Scleroderma areolatum* Ehrenb., *S. bovista* Fr., *S. cepa* Pers., *S. citrinum* Pers., *S. meridionale* Demoulin & Malençon, *S. polyrhizum* (J.F. Gmel.) Pers. and *S. verrucosum* (Bull.) Pers.) üyesinin rapor edildiğini ifade etmektedir. Bu konuda, Akata (2017) ise, dünya genelinde 2 cins ve 72 ektomikorizal tür içerdiğini rapor etmiştir. Sundukları çalışmada, 7 Sclerodermataceae üyesi (*Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert, *Scleroderma areolatum* Ehrenb., *S. bovista* Fr., *S. citrinum* Pers., *S. meridionale* Demoulin & Malençon, *S. polyrhizum* (J.F. Gmel.) Pers. ve *S. verrucosum* (Bull.) Pers.) türlerini tanımlamışlardır.

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Fungorumuna ait geleneksel yöntemlerle teşhisleri yapılmış (bazılarının ise yapılmamış) 40 makromantar örneğinin moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Scleroderma geaster, Sclerodermataceae ailesine ait bir mantar türüdür. Türkçede "toplu mantar" veya "yıldız mantar" olarak da bilinir. Bu mantar, toprak altında yaşayan ve genellikle çürümekte olan bitki materyalleri üzerinde bulunur. *S. geaster*, karakteristik bir şekli olan yuvarlak veya küresel meyveleriyle tanınır. Bu meyveler, dış tabakadan oluşan bir kabukla kaplıdır ve iç tabakada mantarın sporlarını içerir. Kabuğunun içindeki sporlar, olgunlaştığında çevreye yayılarak üreme gerçekleştirir. Bu mantarın dikkat çekici bir özelliği, olgunlaştığında meyve gövdesinin içinde bulunan bölümlerin ayrılması ve yıldız şeklinde açılmasıdır. Bu nedenle "yıldız mantar" olarak da adlandırılır. Bu açılan bölümler, mantarın içindeki sporları dağıtarak üreme sağlar. *S. geaster*, mikorizal bir ilişki içinde yaşar. Bu, mantarın bitki kökleriyle simbiyotik bir ilişki kurduğu anlamına gelir. Mantarlar, bitki köklerine bağlanarak bitkilerin su ve mineral emilimini artırırken, bitkiler de mantarlar için organik besin üretir. Bu simbiyotik ilişki, hem mantarlar hem de bitkiler için faydalıdır. *S.geaster*, genellikle ormanlık alanlarda veya çayırlarda bulunur. Toprakta organik madde ayrışımına yardımcı olur ve böylece

ekosistemin döngüsüne katkıda bulunur. Ayrıca, bazı böcek türlerinin beslenme kaynağı olabilir. Bu mantarın tüketilmesi önerilmez, çünkü bazı türleri zehirli olabilir. *Sc. geaster* de bu türlere dahildir. Zehirlenme durumunda, mide bulantısı, kusma, karın ağrısı gibi semptomlar ortaya çıkabilir. Bu nedenle, toplama ve tüketim konusunda dikkatli olunmalıdır. (Smith, A. H. 1951).

Scleroderma citrinum, genellikle ormanlık alanlarda, ağaç kökleri veya organik madde ile zenginleştirilmiş topraklarda bulunur. Genellikle yaz ve sonbahar aylarında ortaya çıkar. *Sc. citrinum*, genellikle küçük veya orta boyutlarda olup, 2 ila 10 cm çapında olabilir. Gençken top şeklinde olan bu mantarlar, olgunlaştıkça daha da yayılarak düzleşir. Renkleri sarıdan kahverengiye, hatta siyaha kadar değişebilir. Mantarın üzerinde küçük dikenler veya çıkıntılar bulunur. Bu mantarın etli kısmı sert ve yoğundur. Genellikle kokusu yoktur veya hafifçe meyve kokusuna benzer bir kokusu vardır. *S. citrinum*, çoğunlukla toprak altında büyür ve nadiren toprak üstünde görülür. *S. citrinum*, endomikoriza olarak adlandırılan bir simbiyotik ilişki içinde yaşar. Bu, mantarın ağaç kökleriyle birlikte yaşadığı ve birbirlerine fayda sağladığı anlamına gelir. Mantar, ağaç köklerinden organik besinler alırken, ağaç köklerine mineral ve su sağlar. Bu simbiyotik ilişki, hem mantarın hem de ağaçların büyümesine ve sağlığına katkıda bulunur. *Sc. citrinum*, bazı bölgelerde yenilebilir olarak kabul edilir. Ancak, genellikle hoş olmayan bir tadı vardır ve sindirimi zor olabilir. Ayrıca bu mantarın bazı türleri, toksinler içerebilir ve insanlar için zehirli olabilir. (Guzman, G. 1970).

Scleroderma verrucosum, Basidiomycota mantarlarının Boletales takımına ait ilginç bir türdür ve benzersiz özellikleri ve ekolojik önemi ile bilinir. *S. verrucosum*, belirgin morfolojik özelliklere sahiptir. Sporokarp adı verilen üreme organı yeraltında gelişir ve başlangıçta beyaz veya soluk renklidir. Olgunlaştıkça dış yüzeyi siğillerle veya kabarcıklarla kaplanır, bu da tür adı "verrucosum"a yani "siğillerle kaplı"ya yol açar. İç eteğin açığa çıkmasıyla karakteristik morumsu-kahverengi bir renk ortaya çıkar. *S. verrucosum* 'un yaşam döngüsü Basidiomycota mantarlarının tipik bir örneğini takip eder. Döngü, olgunlaşmış sporokarplardan salınan sporların çimlenmesiyle başlar. Uygun bir ortama ulaşan sporlar çimlenir ve mantarların karakteristik dallanmış ipliklerine, yani hifalara dönüşürler. Bu hifalar, toprak altında geniş bir ağ oluşturur ve mantarın yaşam döngüsünün devamını sağlar. Mikoriza, mantarın bitkilerle karşılıklı yararlı bir ilişki kurduğu, bitki kökleriyle mantar hifalarının bir araya geldiği bir simbiyotik ilişkidir. *S. verrucosum*, bu simbiyotik ilişkiden yararlanarak bitkilere su ve besin elementleri sağlar, karşılığında da bitkilerden organik bileşikler alır. Bu nedenle, mantarın ekolojik önemi büyüktür

ve orman ekosistemlerinin işleyişinde önemli bir rol oynar. *S. verrucosum*'un diğer organizmalarla karmaşık etkileşimleri vardır. Mikoriza ile birlikte çalıştığı bitkiler dışında, bazı böcekler ve omurgasızlar da bu mantar türüyle etkileşime girebilir. Ayrıca, bazı çalışmalar bu mantarın potansiyel antibakteriyel veya antifungal bileşiklere sahip olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, tıp alanında ilgi çeken bir potansiyele sahip olabilir ve ilaç geliştirme çalışmalarında değerlendirilebilir. Ancak, doğal habitatların tahribatı, ormansızlaşma ve çevresel değişiklikler gibi modern dünyanın zorlukları, *S. verrucosum* gibi doğal yaşam alanlarına bağlı olan türleri tehdit etmektedir. Bu nedenle, bu türün korunması ve ekosistemlerdeki rolünün anlaşılması, biyolojik çeşitliliğin sürdürülebilirliği açısından önemlidir. (Guzman, G. 1970).

S. cepa mantarı, karakteristik morfolojik özelliklere sahiptir. Genç sporokarplar (mantarın üreme organları), yeraltında gelişir ve sıklıkla soğan veya kivi şeklinde görünür. Olgunlaştığında, sporokarpın dış yüzeyi koyu renkte ve pürüzlüdür, iç yüzey ise beyazımsıdır. Bu özellikler, *S. cepa* mantarını diğer mantar türlerinden ayırmamıza yardımcı olur. *S. cepa* mantarının yaşam döngüsü, tipik bir Basidiomycota mantarının yaşam döngüsüne benzer. (Petersen, J.H. 2019).

Scleroderma meridionale, Sporokarp adı verilen üreme organı, yeraltında gelişir ve gençken beyaz veya açık renklidir. Olgunlaştıkça renk değiştirerek kahverengiye veya siyaha döner. Dış yüzeyi pürüzlü ve kabuklu görünümündedir. İç kısım ise beyazımsı ve sert dokulu olarak karşımıza çıkar. *S. meridionale* mantarının yaşam döngüsü, diğer mantar türlerine benzerlik gösterir. *S. meridionale*, bu simbiyotik ilişkiden yararlanarak bitkilere su ve besin elementleri sağlar, karşılığında da bitkilerden organik bileşikler alır. Bu sayede, mantarın ekolojik önemi büyüktür ve orman ekosistemlerinin işleyişinde önemli bir rol oynar. (Petersen, J.H. 2019).

S. bovista mantarı, dış yüzeyi pürüzlü ve kabuklu görünümündedir. Gençken açık renkli olan sporokarp, olgunlaştıkça kahverengiye veya siyaha döner. Mantarın iç kısmı beyaz veya açık renklidir. *S. bovista* mantarı, doğal ekosistemlerde önemli bir ekolojik rol oynamaktadır. Mikorizal ilişkisi sayesinde bitki-dokuya önemli faydalar sağlayarak toprak verimliliğini artırır ve bitkilerin büyümesine katkıda bulunur. (Guzman, G. 1970).

Scleroderma areolatum, olgunlaşan sporokarpın dış yüzeyi kabuklu ve kahverengi renkte, iç kısmı ise beyazımsıdır. Bu özellikler, *S. areolatum* mantarını diğer türlerden ayırmamıza yardımcı olur. Ekosistemlerdeki rolü, toprak verimliliğini artırarak ve bitkilerin büyümesine katkıda bulunarak önemli bir ekolojik işleve sahiptir. (Guzman, G. 1970).

2.2. Kaynak Özetleri

Türkiye, biyolojik çeşitlilik açısından oldukça zengin bir ülkedir ve makrofunguslar (büyük mantarlar), bu çeşitliliğin önemli bir parçasını oluşturur. Türkiye'nin farklı iklim ve ekolojik bölgelerindeki çeşitli bitki örtüsü ve toprak tipleri, çeşitli makrofungus türlerinin varlığını destekler. Bu nedenle, Türkiye'de makrofunguslar üzerinde yapılan çalışmalar oldukça önemlidir ve ülkenin mantar florasının zenginliğini anlamamızı sağlar. Ancak, bu makalede, Türkiye'de yapılan tüm çalışmaları detaylı bir şekilde anlatmak mümkün değildir. Bu nedenle, bazı önemli ve temsilci çalışmaları vurgulamak daha uygun olacaktır:

1. **Türkiye'nin Makrofungus Florası Üzerine Genel Bir İnceleme:** Türkiye'nin farklı bölgelerindeki makrofungus çeşitliliği ve dağılımını anlamak için yapılan genel incelemeler, ülkenin mantar florasının zenginliği ve çeşitliliği hakkında bilgi sağlar.
2. **Mantar Taksonomisi ve Yeni Türlerin Keşfi:** Mantarlar, taksonomik olarak karmaşık organizmalar olduğu için, Türkiye'de de mantar türlerinin tanımlanması ve sınıflandırılması için taksonomik çalışmalar önemlidir. Bu çalışmalar, yeni türlerin keşfedilmesine ve bilinen türlerin sınıflandırmasının güncellenmesine katkı sağlar.
3. **Mantar Ekolojisi ve Yaşam Döngüsü:** Türkiye'deki farklı ekosistemlerde yaşayan makrofungusların ekolojisi ve yaşam döngüsü üzerine yapılan çalışmalar, mantarların yaşam alanları, iklim tercihleri ve mikorizal ilişkileri gibi önemli özelliklerini anlamamıza yardımcı olur.
4. **Toksik Mantarlar ve Sağlık Etkileri:** Bazı mantar türleri, insanlar için zehirli veya tehlikeli olabilir. Türkiye'de yapılan çalışmalar, toksik mantarların belirlenmesi, zehirlenme vakalarının incelenmesi ve halk sağlığına yönelik önlemlerin alınmasına yardımcı olur.
5. **Endemik ve Nadir Mantar Türleri:** Türkiye, endemik ve nadir mantar türlerine ev sahipliği yapar. Bu türlerin dağılımı, korunmaları ve biyocoğrafyaları üzerine yapılan çalışmalar, biyolojik çeşitlilik ve koruma açısından büyük öneme sahiptir.
6. **Mantarların Ekonomik ve Ekolojik Önemi:** Mantarlar, gıda, ilaç ve endüstriyel alanlarda çeşitli kullanımlara sahiptir. Türkiye'deki mantarların ekonomik ve ekolojik önemi üzerine yapılan çalışmalar, yerel ekonomi ve sürdürülebilirlik açısından önemlidir.

Tüm bu çalışmalar, Türkiye'deki makrofungus florasının anlaşılması ve biyolojik çeşitliliğin korunması için önemli bir bilgi kaynağıdır. Türkiye'deki mantarlar hakkında daha fazla bilgi edinmek için, akademik dergilerde ve doğa koruma kuruluşlarının yayınlarında yapılan çalışmalara başvurmak faydalı olacaktır (Gezer, K., ve Karacan, M. S. 2017). Özellikle Sclerodermataceae grubu makro mantarlarla ilgili taksonomik veriler yeterli değildir.

2.3. Türkiyede Sclerodermataceae üzerinde yapılan çalışmalar:

2000 ve 2001 yıllarında Türkoğlu ve ark. 2007, Ihlara vadisinde yapılan arazi çalışmalarında 14 familyaya ait 31 tür teşhis etmişler ve bu türlerden biri de Sclerodermataceae ait bir türdür (*Pisolithus arhizus*).

2002 ve 2005 yılları arasında Allı, vd., 2022, Aydın ilinden toplanan makromantarlardan 3 Sclerodermataceae üyesi bildirmiştir (*Pisolithus arhizus*, *S.citrinum* ve *S. verrucosum*).

2003 ve 2016 yıllar arasında Akata, 2022, Türkiye genelinde toplanan makromantarlardan 7 Sclerodermataceae üyesi bildirmiştir (*Pisolithus arhizus*, *Sclerderma areolatum*, *S.bovista*, *S.citrinum*, *S. meridionale*, *S. polyrhizum* ve *S. verrucosum*).

2012 ve 2015 yıllar arasında Doğan, vd., 2021, Samanlı dağlarından toplanan 84 familya ve 197 cinse ait 510 makromantar taksonu belirlenmiştir. Makromantarlardan 5 Sclerodermataceae üyesi bildirmiştir (*Pisolithus arhizus*, *Sclerderma areolatum*, *S.citrinum*, *S. cepa*, *S. polyrhizum* ve *S. verrucosum*).

2014 ve 2017 yıllar arasında Uzun, vd., 2020, Trabzon ilinden toplanan makromantarlardan 2 *Sclerodermataceae* üyesi bildirmiştir (*S.citrinum* ve *S. areolatum*).

Fungoryum terimi genel olarak birçok insan tarafından duyulmamış olabilir, çünkü bu terim standart mikoloji literatüründe yaygın olarak kullanılmaz. Ancak, bazı kontekstlerde, "fungoryum" bir mantar koleksiyonu veya mantarları saklamak ve korumak için kullanılan bir depo ya da laboratuvar olabilir (Hawksworth, D. L. 1991).

Fungoryum, belirli bir bölge veya konu üzerine odaklanan mantar örneklerinin kurutulmuş olarak saklandığı özel koleksiyondur. Genellikle bilimsel araştırma kurumları, üniversiteler veya botanik bahçeleri gibi yerlerde bulunur. Fungoryumlarda saklanan örnekler genellikle iyi

korunmuş, etiketlenmiş ve kataloglanmıştır, böylece gelecekteki araştırmacılar için erişilebilir ve kullanılşlıdırlar.

Fungoryum Materyallerinin Önemi:

1. **Bilimsel Referans:** Fungoryumlarda saklanan mantar örnekleri, bir bölgenin mikoflorasının (mantar florasının) belirlenmesi için kritik referans materyalleri sağlar. Bu, bilim insanlarına bir bölgedeki mantar çeşitliliğini anlama ve taksonomik çalışmalarda kullanma olanağı tanır.
2. **Biyolojik Çeşitlilik:** Fungoryum koleksiyonları, belirli bir bölgenin biyolojik çeşitliliğini belgelemek için değerli kaynaklardır. Bu, koruma çabalarında ve doğal alanların yönetiminde de kritik öneme sahiptir.
3. **Tarihsel Kayıt:** Fungoryum materyalleri, zamanla bir bölgedeki ekosistem değişikliklerini izlemek için bir kaynak olarak hizmet eder. Bu, iklim değişikliği, kirlilik ve diğer çevresel faktörlerin etkilerini anlamak için kullanılabilir.
4. **Taksonomik Araştırma:** Fungoryumlarda saklanan örnekler, yeni türlerin tanımlanması ve mevcut türlerin revizyonu için kritik öneme sahiptir.
5. **Farmasötik ve Biyoteknolojik Araştırma:** Bazı mantarlar, insan sağlığı için potansiyel faydalara sahip bileşikler üretir. Fungoryum koleksiyonları, bu bileşikleri araştırmak ve karakterize etmek için değerli kaynaklardır.
6. **Eğitim:** Fungoryumlar, mykoloji eğitimi ve öğrenci araştırmaları için önemli bir kaynak olabilir.

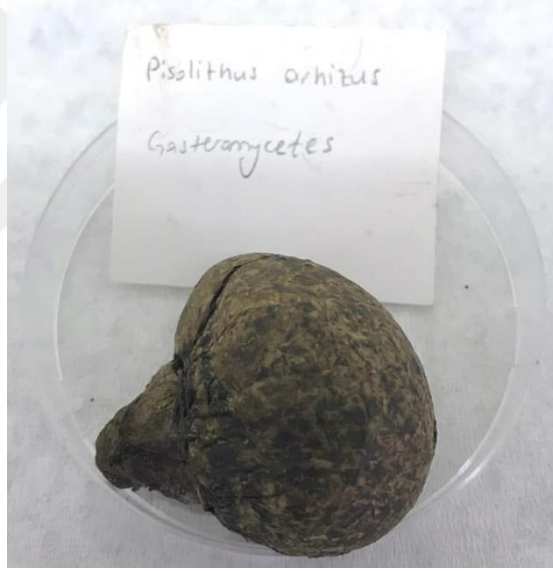
Fungoryumlar, mikolojik araştırmalar için vazgeçilmez bir kaynak sunar. Bu koleksiyonlar, mantar çeşitliliğini anlamamızı, korumamızı ve sürdürülebilir bir şekilde kullanmamızı sağlar. Bu nedenle, fungoryum materyallerinin korunması ve genişletilmesi kritik öneme sahiptir (Mueller, vd., 2004).

Bu çalışmada, örneklerimizi fungoryumdan seçerek çalışmamızda kullandık. Bu, örneklerin türlerinin daha kesin bir şekilde teşhis edilmesi için son derece önemlidir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan materyal Sclerodermataceae familyasına ait mantar örnekleri 2004-2018 yılları arasında Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış ve Ankara Üniversitesi Biyoloji bölümü Fungaryumunda muhafaza edilmiştir (Şekil 3.1). Örnekler arasında farklı türlere ait numuneler yer almakta olup bunların bazılarının geleneksel yöntemlerle teşhisi yapılmıştır. Ancak bazılarının teşhisi ya yapılmamış ya da şüpheli durumdadır. Çalışmamızın amacı moleküler teknikleri (moleküler filogeni) uygulayarak belirsizlikleri ortadan kaldırmaya çalışmaktadır.



Şekil 3.1. Toplanan Sclerodermataceae üyelerine ait bir numune

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Liyofilizasyonu

Akata'nın koleksiyonundan sağlanan örneklerle (40 örnek) öncelikle liyofilizasyon işlemi uygulayarak örnekler toz haline getirilmiştir. Liyofilizasyon işlemi, çözelti veya süspansiyon halindeki ürünün dondurulması ve sonrasında süblimasyon ile oluşan gaz fazının uzaklaştırılması sonucu maddenin kurutulmasını sağlayan bir süreçtir. Kısaca dondurarak kurutma, bir maddenin dondurulması ve ardından sistemin basıncı düşürülerek istenilen maddedeki donmuş suyun

doğrudan buhara dönüştürülmesi işlemidir. Malzemelerin oksitlenmemesi, yeni bileşiklerin oluşmaması, malzemelerin yapışkanlığının azalması, malzeme partiküllerinin üniform boyutu, depolama süresinin artması ve bu işlemin düşük maliyeti, diğer kurutma yöntemlerine kıyasla avantajlarını oluşturmaktadır. Bu işlem, gıda ve ilaçların ömrünü uzatmak ve ayrıca o maddenin toz haline getirmek için kullanılır.

Dondurarak kurutma, birinci dondurma ve birinci kurutma (vakumda süblimasyon) ve ikincil kurutma (vakumda buharlaştırma) olmak üzere üç aşamada gerçekleşir.

Bu amaçla laboratuvarımızdaki liyofilizatör (Scanvac Coolsafe) (Şekil 3.2.) kullanılarak örneklerimiz toz haline getirilmiş ve elde edilen örnekler -20'de depolanmıştır.



Şekil 3.2. Liyofilizatör cihazı

3.2.2. DNA Ekstraksiyonu

Örneklerden DNA ekstraksiyon işlemi 3 farklı protokol ile gerçekleştirilmiştir.

1. Protokol

Manual olarak aşağıdaki protokole (Doyle, 1987) göre yapıldı:

1. 10 mg kurutulmuş fungus materyalleri 2 ml reaksiyon tüplerine konuldu.
2. Bu tüplere 5 adet küçük homojenizasyon boncuklar eklendikten sonra 2 dakika vorteksenerek homojenize edildi.
3. Daha sonra mantar materyallerinin toz haline dönüşüp dönüşmediği göz ile kontrol edildi.

4. Bu aşamada reaksiyon tüplerine 1 ml CTAB buffer'ı eklendi ve iyice karıştırılıp 55 °C' de 30 dakika boyunca inkübe edildi.
5. Daha sonra 1 ml kloroform/isoamilal eklendi ve yaklaşık 1 dakika boyunca vorteks ile iyice karıştırıldı.
6. Tüpler 13.000 rpm de 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonucunda tüplerde iki tabaka görüldü. İki kısımdan biri olan alt kısımda çökelmiş halde organik kısım, üst tabakada ise su, DNA ve diğer polisakkaritleri içeren kısımdı. Çalışmada bu kısım (üst kısım) kullanıldı.
7. Daha sonra süpernatant kısmı yani DNA'nın bulunduğu kısım 1.5 ml'lik yeni tüplere transfer edildi.
8. Kloroform reaksiyonu yeniden tekrarlandı (1 ml kloroform/Isoamilalkol) ve 2 dakika boyunca 13.000 rpm de santrifüj edildi.
9. Üst kısım yani süpernatant 1.5 ml' lik tüplere transfer edildi.
10. Süpernantın 2/3 hacminde soğuk isopropanol tüpe eklenip, iyice vorteks ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika boyunca 20 °C' de çökelmeye bırakıldı.
11. 10 dakika boyunca 13.000 rpm de santrifüj edildi ve böylece DNA tüpün alt kısmına çökeldikten sonra üst kısım hızlı bir şekilde uzaklaştırıldı.
12. 1 ml yıkama bufferi eklendikten sonra 5 dakika santrifüj edilmiş ve üst kısım yine hızlı bir şekilde uzaklaştırıldı. Tüplerdeki tüm etanolü uzaklaştırmak için 20 dakika boyunca DNA'lar, oda koşullarında kurumaya bırakıldı.
13. Kurumuş DNA peletleri yaklaşık 90 mikrolitre resuspanسیون buffer içerisinde çözüldü.
14. Tüplerin üzerine 180 mikrolitre su, 135 mikrolitre NH₄AC (2.5 M) ve 1 ml soğuk %96 EtOH eklenip iyice karıştırılmış ve buzdolabında -20 derecede çökelmeye bırakıldı.
15. 10 dakika boyunca 13.00 rpm de santrifüj edildikten sonra üst kısım hızlı bir şekilde uzaklaştırıldı.
16. Bu aşamada 1 ml %70 etanol eklendi ve 5 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı hızlı bir şekilde uzaklaştırıldı ve tüplerdeki tüm etanollerin alındığından emin olduktan sonra havada kurumaya bırakıldı.
17. Son aşama olarak kuru DNA peletleri 100 mikrolitre TE tamponu içerisinde tekrar suspense hale getirildi.

2. protokol

Aşağıdaki şekilde uygulandı :

1. 25 mg toz haline getirilmiş fungus parçasını 2 ml reaksiyon tüplerine transfer edildi.
2. Her bir reaksiyon tüplerine 5 adet küçük homojenizasyon boncuğu (0,4 mm) eklenip ve üzerine 1 ml CTAB buffer ilave edilmiştir. Tüpler 2 dakika vortekslenerek homojenize edildi (Fisons SGP-010J).
3. Tüpleri iyice karıştırıldıktan sonra su banyosunda 65⁰C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi.. Tüpleri su banyosundan aldıktan sonra 10 dakika boyunca 5000 rpm'de, santrifüj edildi.
4. Uygulanan işlem sonucunda iki tabaka görülmüştür. Tabakalardan biri alt kısma çökelmiş organik kısım, diğeri ise üst tabakada DNA, su ve diğer parçaları içeren kısımdır. Süpernatant alınıp yeni bir 1,5 ml'lik tüplere dikkatli bir şekilde transfer edildi.
5. Tüpün üzerine 2 µl RNase ve 1 ml kloroform/isoamilalkol ilave edilip 2 dakika boyunca iyice vortekslenerek karıştırıldı. Daha sonra tüpler 13.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edilerek süpernatant 1,5 ml'lik tüplere transfer edildi.
6. Tekrar her tüpe 1 ml kloroform/isoamilalkol eklenip 2 dakika boyunca iyice vortekslendi ve karıştırıldı. Daha sonra 13.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. DNA'nın bulunduğu kısım (süpernatant) 1,5 ml'lik yeni tüplere transfer edildi.
7. Sonraki aşamada 2/3 hacminde soğuk isopropanol eklenip, iyice karıştırıldıktan sonra yarım saat boyunca 8⁰C'de buzdolabında çökelmeye bırakıldı.
8. Tüpler buzdolabından alınıp 10 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüj edilip DNA tüpün altına çökeldikten sonra üst kısım çok hızlı bir şekilde uzaklaştırıldı.
9. Tüplerdeki tüm etanol uzaklaştırılıp daha sonra DNA'lar 30 dakika boyunca desikatörde kurumaya bırakıldı. DNA'lar iyice kuruduktan sonra DNA'yı korumak için üzerine 50 µl TE eklendi ve buzdolabında +8 ⁰C de saklandı (Sromyatnikov vd, 2016; Pascual vd, 2000)

TE Tamponunun Hazırlanması

Uygun bir kaptaki 800 mL distile su hazırlanıp çözeltiye 15.759 g Tris-Cl (istenen pH) ve daha sonra 2,92 g EDTA (pH 8) eklendi. Distile su ile Hacim 1 litreye tamamlandı (Sambrook ve Russell, 2001).

CTAB/NaCl Çözeltisinin Hazırlanması

100 ml CTAB/NaCl çözeltisi hazırlamak için 4.1 g NaCl tartılıp 90 ml ddH₂O içerisinde çözülür. Daha sonra bu çözeltinin içerisine 10 g CTAB (Sigma, Steinheim, Almanya) ekleyip otoklavlandıktan sonra karıştırılarak CTAB'ın çözünmesi sağlandı. Daha sonra çözelti ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

%70'lik Etanol Hazırlanması

70 ml Absolute alkol ve 30 ml su, steril 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişe içine ilave edilerek solüsyon hazırlandı (Çebi Kılıçoğlu, 2009).

1 mg/ml Ribonükleaz A (RNase) Hazırlanması

10 ml TE tamponu içerisinde 10 mg Ribonükleaz A çözülür. daha sonra 0.2 µm'lik membran filtreden (Schleicher ve Schuell) geçirilerek steril edilen RNase, steril 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldıktan sonra -20°C'de muhafaza edildi (Çebi Kılıçoğlu, 2009).

3. protokol olarak aşağıdaki şekilde uygulandı :

Qiagen Türkiye firmasından satın alınan Qiagen AllPrep Bacterial/Fungal DNA/RNA/Protein Kit ile aşağıdaki protokol uygulandı:

1: 10 mg toz haline gelen fungus örneği 350 µl Solution HC içinde vorteksleyerek veya pipetlenerek süspanse edildi ve bir PowerBead Tüpüne aktarıldı.

- solüsyon HC, β-ME (veya DTT) ve proteaz inhibitörleri ile taze olarak hazırlandı. Solution HC, toplam fungal nükleik asitleri ve proteinleri parçalamaya ve çözmeye yardımcı olan kaotropik bir formülasyon içerir. β-ME (veya DTT), disülfür bağlarını parçalayan güçlü bir indirgeyici ajandır. Proteaz inhibitörleri, bol miktarda proteaz üreten birçok mantar kültürü için gereklidir. Bu bileşikler, nükleik asit ve protein stabilitesini ve çözünürlüğünü en üst düzeye çıkarmak için birlikte hareket eder.

2: PowerBead Tüpünü 10 dakika boyunca maksimum hızda vorteksledi.

- Mekanik homojenizasyon, mantar hücrelerinin parçalanmasını optimize etmek için 0,5 mm'lik cam boncuklara sahip bir PowerBead Tüpü ile gerçekleştirildi.

3: PowerBead tüpünün kapağı hızlı şekilde açıldı ve doğrudan PowerBead Tüpüne 175 µl Solution MR eklendi. Tekrar kapatılıp ve karıştırmak için en az 10 sn yüksek hızla vorteksledi.

- Solution MR'nin doğrudan PowerBead Tüpüne eklenmesi, aksi takdirde geride kalacak olan küçük bir protein fraksiyonunu çözer.
- 4: PowerBead tüpünü oda sıcaklığında 2 dakika boyunca 15.000 x g'de santrifüjlendi.
- Santrifüjleme, nükleik asitleri ve proteinleri çözelti içinde bırakırken bir sonraki adımdan önce lizati kalan parçacıklardan veya boncuklardan temizlemek için kullanılır.
- 5: 350 µl lizati PowerBead tüpünden doğrudan bir MB Kolonuna aktarıp 15.000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi.
- RNA ve protein sıvıda kalırken DNA, MB Kolonunda silika zarına seçici olarak bağlanır.
- 6: MB Kolonunu 2 ml'lik temiz bir Toplama Tüpüne aktarıldı.
- 7: 650 µl Solution EA eklenip ve 15.000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi ve toplanan sıvı kısım atıldı.
- Solution EA, DNA'nın MB Spin Column silika membranına bağlı kalmasına izin verirken artık tuzu uzaklaştırmak için tasarlanmış alkol bazlı bir yıkamadır.
- 8: 650 µl IW Solution eklendi ve 15.000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Toplanan sıvı kısım atıldı.
- IW Solution, Solution EA'nın MB Spin Column filtre membranından tamamen çıkarılmasını sağlayarak daha yüksek DNA verimi ve saflığı sağlar.
- 9: Tüpler 2 dakika boyunca 15.000 x g'de santrifüjlenip ve filtre kısmına sıvı sıçramasına dikkat ederek MB Kolonunu yeni bir 2 ml Toplama tüpüne yerleştirildi.
- 10: Beyaz filtre kağıdın merkezine 100 µl Solution EB eklendi.
- Çözüm EB'yi filtre zarının merkezine eklemek, tüm zarın ıslak olmasını ve DNA'nın verimli bir şekilde ayrıştırılmasını sağlayacaktır.
- 11: Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca inkübe edilip daha sonra 1 dakika boyunca 15.000 x g'de santrifüjlendi.
- 12: MB Sütununu atıldı. DNA artık aşağıda biriken sıvı kısımda toplandı ve uygulamalar için hazır hale gelmiş oldu.

3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, biyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. Bu teknik, özellikle DNA, RNA ve bazen proteinlerin boyutlarına göre ayrılmasını

sağlar. Agaroz jel elektroforezi örneklerden DNA izole edilip edilmediğini yani, DNA varlığını göstermek için kullanılmıştır.

3.2.4. DNA Saflık ve Konsantrasyon Ölçümü

Nükleik Asit (DNA, RNA) örnekleri 260 nm ve proteinler 280 nm dalga boylarında maksimum absorban gösterir. İki dalga boyunda elde edilen absorbanların oranı 'saflık' derecesini gösterir. Aynı şekilde 230 nm dalga boyunda elde edilen absorbanlar bizlere kontaminasyon derecesini verir. DNA için saflık değerini 260/230 oranı gösterir. Beklenen saflık değeri; DNA ölçümleri için yaklaşık 1,8 kabul edildi. Parlak bantların eldesi DNA kalitesi ve miktarı için fikir verdi. Bu bilgilere göre DNA saflığı test edildi.

3.2.5. ITS , 28S ve RPB2 Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR veya polimeraz zincir reaksiyonu, moleküler biyolojide en yaygın kullanılan tekniklerden biridir ve bir DNA bölgesinin binlerce ve milyonlarca kez amplifiye edilmesini sağlar. PCR'nin temeli, birkaç sıcaklık döngüsünde tamamlanan DNA polimeraz tarafından bir DNA zincirinin enzimatik sentezidir. Bu yöntemi yöneten kurallar, bir termocycler'da mikrotübüllerdeki canlı hücre yerine PCR yönteminin gerçekleştirilmesi dışında, canlı bir hücredeki replikasyon sürecindeki kurallarla aynıdır. Bu, reaksiyon döngüleri sırasında reaksiyonu gerçekleştirmek için gereken çeşitli sıcaklık değişikliklerine izin veren bir makinedir.

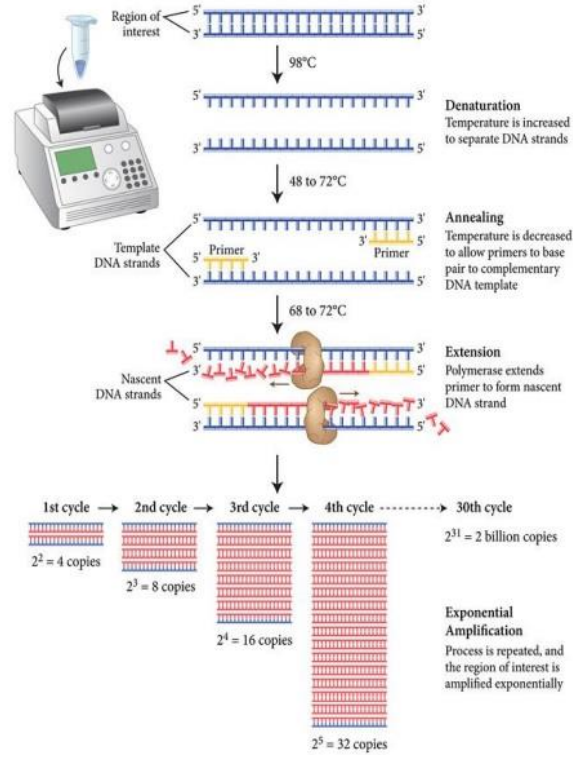
PCR adımları:

- 1: DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılması
- 2: Primerleri hedef DNA'daki tamamlayıcı zincire takın
- 3: DNA enzimi Taq polimeraz kullanılarak hedef DNA'da istenen parçanın amplifikasyonu.

DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılması ısı ile yapılır. Bu amaçla termocycler numuneyi 95 santigrat dereceye kadar ısıtır, böylece DNA'yı oluşturan iki zincir birbirinden ayrılır. DNA polimeraz enzimi hedef bölgeyi tespit edemediğinden primerler kullanılır.

Primer, dizisi hedef alandaki dizinin bir bölümünü tamamlayan kısa bir DNA parçasıdır. Primerleri iki ayrı ipliğin DNA'sına bağlamak için sıcaklığı 95 dereceden 60-50 dereceye düşürün. Bu sıcaklık, primerleri DNA'ya bağlar. Primerleri DNA zincirine bağladıktan sonra, Taq polimeraz enzimi kullanılarak DNA sentezi gerçekleştirilir. Sıcaklık tekrar DNA polimeraz

aktivitesi için doğru sıcaklık olan 72 °C'ye yükselir. Bu üç aşamalı döngü daha sonra 30 ila 35 kez tekrarlanır ve istenen parça katlanarak yayılır.



Şekil 3.3. PCR reaksiyon adımlarına genel bakış

DNA varlığı doğrulanmış funguslara ait DNA örneklerinin ITS1-5.8S-ITS2'i kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için iki primer (ITS-1 ve ITS-2) kullanılmıştır (White vd, 1990). ITS bölgesinin PCR'si, 700-bp'lik bir ürün oluşturmak için aşağıdaki primerler kullanılarak yapıldı: ITS5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG ve ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC (White vd, 1990).

Bazı örneklerden PCR işlemleri ITS5 ve ITS4 primerleri kullanarak yapılmış ve dizilemeye hazır hale getirilmiştir.

PCR Döngü Protokolü (rDNA-ITS gen bölgesi için)

94 ⁰ C	3 dk	⇒	Başlangıç denatürasyonu	} 30 döngü
94 ⁰ C	1 dk	⇒	DNA'nın denatürasyonu	
49 ⁰ C	2 dk	⇒	Primerlerin Bağlanması	
72 ⁰ C	3 dk	⇒	Uzama ve Amplifikasyon	
72 ⁰ C	7 dk	⇒	Son sentez	

Tablo 3.1. PCR reaksiyonunda çözeltilerin konsantrasyonu ve hacmi

Sıra	Solüsyon	25 mikrolitrede kullanılan hacim
1	2 X Taq DNA Polymerase Master Mix	8
2	F primer	0,5
3	R primer	0,5
4	DNA	2
5	H2O	14
Toplam hacim		25

2. gen olarak 28S ribozomal RNA kullanılmıştır. Mantarların ribozomal DNA'sı (rDNA), türler arasındaki akrabalık ilişkilerini belirlemek için yaygın olarak kullanılan genetik bölgeleri içerir. Bu bölgelerden biri, 28S ribozomal RNA genidir (28S rRNA ya da sıkça sadece 28S olarak adlandırılır).

2. Gen olarak 28S ribozomal bölgesinin PCR için (TTTTGGTAAGCAGAAGCTGGYG ve TTTAATTAACAGTGATTCCC) , (CCGTGTTTCAAGACGGG ve GTCTTGAAACACGGACC) ve (ACCCGCTGAACTTAAGC ve ATCCTGAGGGAACTTC) primerleri kullanılmıştır (Alvardo, P. 2021).

3. Gen olarak RPB2 geni kullanılmıştır. RPB2 geni, RNA polimeraz II'nin ikinci en büyük alt birimini kodlar. RNA polimeraz II, ökaryotlarda mRNA'nın (haberci RNA) ve bazı diğer RNA moleküllerinin sentezinden sorumlu olan bir enzimdir.

RNA polimeraz II'nin bu ikinci en büyük alt birimi, enzimin yapısında ve işlevinde kritik bir role sahip olduğu için RPB2 geni özellikle önemlidir. Genin evrimi, türler arasındaki akrabalık ilişkilerini belirlemek için kullanılan moleküler filogenetik çalışmalarda sıkça kullanılır.

Özellikle, RPB2 geninin sekansının çeşitliliği, bazı fungal (mantar) gruplarında türlerin ve hatta cinslerin filogenetik ilişkilerini belirlemekte kullanılır. Bu gen, özellikle ITS gibi diğer yaygın olarak kullanılan gen bölgelerinden daha az homoplaziye (aynı morfolojik ya da genetik özelliklerin farklı evrimsel yollarla ortaya çıkması) sahip olduğu için bazı fungal gruplar için

daha tercih edilir. Bu nedenle, RPB2, fungal filogenetik analizlerinde kritik bir gen olarak kabul edilir.

RPB2 genin PCR için TGGGGRGACCARAAGAARTC ve CTGATTRTGGTCNNGGGAAMGG primerleri kullanılmıştır (Matheny, P.B. 2007).

3.2.6. DNA Dizileme

Diagen Biyoteknolojik Sistemler A.Ş (TÜRKİYE) şirketi, ITS, 28S ve RPB2 genlerinin DNA dizilemesini ticari bir hizmet olarak gerçekleştirmiştir. Her genin DNA sıralaması çift yönlü olarak alınarak, bu sayede dizinin hassas ve doğru bir şekilde belirlenmesi sağlanmıştır.

3.2.7. Dizi Verilerinin Analizi ve Filogenetik Analiz

Filogeni ağacı, türler veya genler arasındaki evrimsel ilişkileri gösteren bir diyagramdır. Dizi verilerinin analizi, türler veya genler arasındaki benzerlik ve farklılıkları değerlendirmek için kullanılır. Bu analiz sonucunda, dizi benzerliğine dayalı olarak bir filogenetik ağaç oluşturulabilir. İşte dizi verilerinin analizi ve filogeni ağacının oluşturulması için genel bir prosedür:

Veri setini filogenetik analizler için hazırlamak üzere, Sclerodermataceae familyasından çeşitli türlerin veya izolatların ITS, 28S ve RPB2 gen dizinleri, NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) veri tabanından tespit edilip elde edilmiştir. Dizi verilerini hazırladıktan sonra, homolog bazların doğru hizalanmasını sağlamak için Thompson ve arkadaşlarının 1997'de geliştirdiği ClustalX yazılımı tercih edilmiştir. Hizalama adımlarında, ikili karşılaştırma için Gap Opening değeri 10.00 ve Gap Extension değeri 0.10 olarak belirlenirken, çoklu hizalamalar için Gap Opening 10.00 ve Gap Extension 0.20 şeklinde ayarlanmıştır (Hall, 2004).

Programla gerçekleştirilen hizalamalar, BioEdit yazılımı aracılığıyla gözden geçirilmiştir. İyileştirmeye ihtiyaç duyulan alanlar düzenlenmiş ve indel içeren sütunlar kaldırılmıştır (Hall, 1999). Örneklerin haplotiplerini belirlemek için hizalanmış dizilerde Dnasp programı kullanıldı ve haplotipler belirlendi. Veri seti için en iyi baz değişiklik modelini saptamak amacıyla,

filogenetik analizlerden önce JModelTest programına başvurulmuştur (Posada, 2008). Bu değerlendirmeler, veri setlerine dış grup katılıp katılmamasına bağlı olarak iki farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bir veri seti için ModelTest'in çeşitli baz değişim modelleri tavsiye ettiği durumlarda, her bir model için ayrı ayrı filogenetik ağaçlar hazırlandı. Bu çalışmada, en yüksek Bootstrap değerine ulaşan ağaç sergilenmiştir.

Neighbor-Joining, ve Maksimum Likelihood (ML) yöntemleri, izolatların evrimsel bağlantılarını saptamak üzere iki ayrı algoritma olarak kullanıldı (NJ: Saitou ve Nei, 1987). AIC ve BIC analizlerinden elde edilen tüm baz değişim modelleri temel alınarak, NJ değerlendirmeleri PAUP 4.0b10 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir (Swofford, 2003).

Filogenetik ağaçların güven seviyelerini saptamak için 10.000 tekrarlı Bootstrap testleri uygulanmıştır. Ağaçlarda, %50'nin üstünde destek bulan düğümlerin Bootstrap değerleri belirtilmiştir.

3.2.8. Örneklerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri (SEM)

Elektron Mikroskop Görüntüleri Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (TÜRKİYE) firması tarafından ticari olarak yapıldı ve 7 farklı örneğin SEM görüntüleri alındı. Örnekler stublar üzerine çift taraflı karbon bant ile sabitlenmiştir. Sputter Coater cihazında örnekler 12,5-15 nm altın-paladyum ile kaplanmıştır (SEM coating system, SC7620). İnceleme ve çekimler JEOL JMS-7001F Tarayıcı Elektron Mikroskopunda (SEM) uygun voltajla yapılmıştır.

3.2.9. Kullanılan Çözeltiler

EDTA (0.5 M) pH 8

EDTA çözeltisi hazırlığı için, Sigma firmasının Steinheim, Almanya menşeli EDTA'sından 14.6 gram alındı ve 80 ml saf su (ddH₂O) ile birleştirildi. Bu karışım, manyetik bir karıştırıcı üzerinde dönüyor iken, Carlo Erba'nın İtalya menşeli NaOH granülleri eklenerek pH değeri 8 seviyesine getirildi. Sonrasında saf su ile karışımın hacmi 100 ml'ye tamamlandı. pH seviyesi tekrar kontrol edildikten sonra, elde edilen çözelti 121 °C'de 20 dakika süreyle otoklav işlemine tabi tutularak sterilize edildi (Durmaz, vd., 2001).

10X Tris-EDTA (TE) tamponu, pH 8

10X TE tampon çözeltisi hazırlığı amacıyla, pH 8.0'da 10 ml Tris-Cl (100 mM) ile 2 ml pH 8.0 EDTA (10 mM) 88 ml saf su (ddH₂O) içinde bir araya getirilmiştir. Bu karışım, 121 °C'de 1 atmosfer basıncında 20 dakika süreyle otoklavlandıktan sonra steril hale getirilmiştir. Daha sonra, bu stok çözelti 1/10 oranında seyreltilerek 1X TE tampon çözeltisi elde edilmiştir (Sambrook ve Russell, 2001).

%10'luk SDS

%10'luk bir SDS solüsyonu hazırlamak amacıyla, Amresco firmasının Ohio, ABD menşeli SDS ürününden 10 gram ölçülüp, saf su (ddH₂O) ile 100 ml hacmine ulaşınca dek doldurulmuştur. Bu karışım, ısıtmalı bir manyetik karıştırıcıda sürekli karıştırılarak SDS'nin tam anlamıyla suda çözünmesi sağlanmıştır.

CTAB (Setil trimetil amonyum bromür)/NaCl

Carlo Erba'nın İtalya menşeli NaCl'sından 4.1 gram alınıp 90 ml saf su (ddH₂O) içinde çözüldü. Ardından, bu karışıma Sigma'nın Steinheim, Almanya menşeli 10 gram CTAB eklenerek 65 °C sıcaklığa kadar ısıtıldı ve karıştırılarak CTAB'ın tamamen çözünürlüğü sağlandı. Son olarak, bu karışımın hacmi saf su ile 100 ml'ye getirildi (Temizkan, vd., 2004).

ProteinazK (20 mg/ml)

Promega firmasının Madison, WI, ABD menşeli proteinazK'sından 20 mg (0.02 gram) alınıp TE tamponu (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) ile hacmi 1 ml'ye getirilmiştir. ProteinazK solüsyonu vorteks yardımıyla tamamen çözüldükten sonra 100 µl miktarlarında bölümlere ayrılmış ve -20 °C'de saklanmıştır. ProteinazK'nin duyarlı yapısı sebebiyle, mümkünse yeni olarak hazırlanıp hemen kullanılmasına dikkat edilmiştir.

Kloroform/izoamil alkol

Merch firmasının Darmstadt, Almanya menşeli 96 ml kloroform ile Amresco'nun Ohio, ABD kaynaklı 4 ml izoamil alkolünü birleştirerek 100 ml kloroform/izoamil alkol solüsyonu hazırlandı.

Etanol (%70)

J.T. Baker'ın Deventer, Hollanda menşeli saf etanolünden 70 ml alınıp, buna 30 ml saf su (ddH₂O) eklenerek %70 etanol solüsyonu elde edilmiştir.

30 mg/ml RNaz (RibonükleazA)

Sigma markalı 0.03 gram RibonükleazA bir mikrosantrüfuj tüpüne konmuştur. Ardından, 1X TE tamponu (referans: 3.5.17) ile tüp içeriği 1 ml'ye getirilmiştir.

TBE (Tris-Borat-EDTA)

Maniatis ve ekibinin 1982'de belirttiği yönergeler doğrultusunda 10X TBE tampon çözeltisi hazırlanmıştır:

- Trizma Base (Sigma, Steinheim, Almanya menşeli): 108 gram
- Borik Asit (Merch, Darmstadt, Almanya menşeli): 55 gram
- 0.5M EDTA (pH: 8) (referans: 3.5.16): 40 ml

Bu bileşenler 1000 ml saf su (ddH₂O) ile tamamlanarak karıştırılmıştır. Daha sonra, 121°C'de 20 dakika boyunca otoklavlandıktan sonra steril hale getirilmiştir. İstenildiğinde 1X TBE tampon elde etmek için bu stok çözelti 1/10 oranında seyreltilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

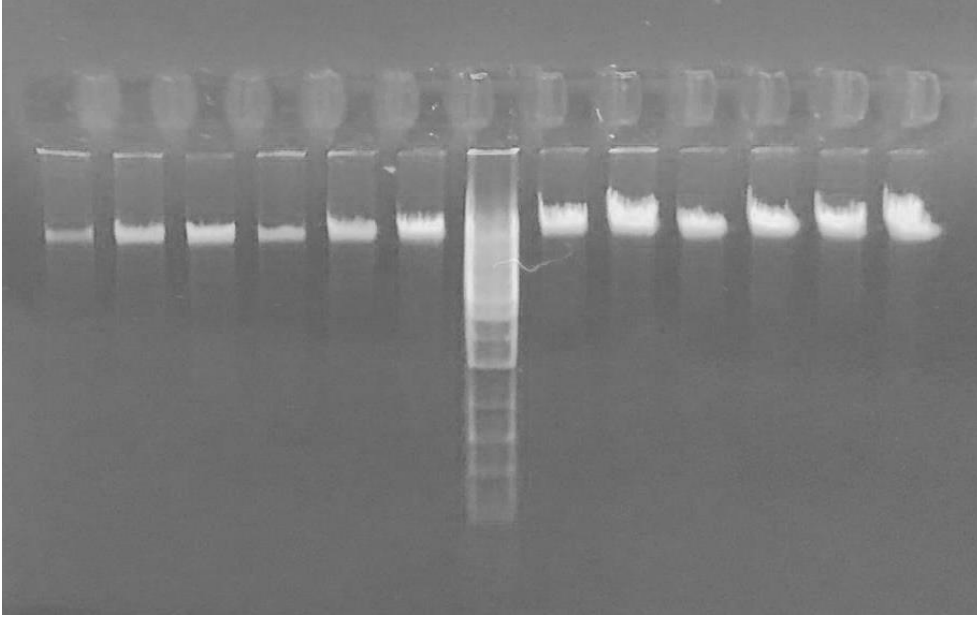
Moleküler çalışmaların fungus taksonomisinde uygulanabilir hale gelmesiyle, tüm fungus cinsleri ülkesel, ülkelerarası ve kıtalararası olarak değerlendirilmeye başlanmış ve fungus taksonomisinde yeni düzenlemelere gidilmiştir. Günümüze kadar morfolojik ve mikroskopik yöntemlerle yapılan tür belirleme çalışmaları, farklı gen bölgelerinin DNA dizi analizine dayalı moleküler yöntemlerle, tekrar gözden geçirilmekte ve moleküler yöntemlerle morfolojik-mikroskopik yöntemlerin birleştirilmesi sonucu daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Funguslarda moleküler filogenide yaygın olarak kullanılan belirteç ITS bölgesidir. Son yıllarda özellikle Makrofunguslarla ilgili çalışmalarda hem yaş örneklerde hem de herbaryum örneklerinde bu belirteç yaygın olarak kullanılmıştır (Hawksworth, D. L. 2011).

4.1. Sclerodermataceae Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu :

Bu çalışmada da, Ankara Üniversitesi Fungoryumunda Ilgaz Akata koleksiyonuna ait olan ve ülkemizin değişik yörelerinden toplanmış olan 40 Sclerodermataceae örneği üzerinde çalışılması kararlaştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle örnekler liyofilize edilerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen mantarlar öncelikle spor kısımlarından örneklenmiş ve DNA ekstraksiyonları yapılmaya çalışılmış, bir çok farklı deney yapılmasına karşın istenen miktarda DNA elde edilememiştir. Daha sonra dış kabuk kısımlarından liyofilize örnekler hazırlanmış ve bazı örneklerden DNA elde edilmiş , fakat PCR işlemlerinden sonuç alınamamıştır.

Farklı manuel yöntemlerle yapılan denemelerde sonuç veremeyince, örnekler DNA ekstraksiyon, PCR işlemi ve dizileme işlemleri için Hollanda'daki Makrogen firmasına gönderilmiş, buradan da olumsuz sonuç bildirilmiştir. İşlemlerden olumsuz sonuç alınmasının nedeni örneklerin yapısı ve herbaryum örnekleri olması olabilir. Bu sonucu çıkarmamızın nedeni, önceki araştırmalarda Sclerodermataceae türlerinin tanımlanması için tamamen taze mantar örnekleri kullanılmış olmasıdır. Yapılan literatür incelemelerinde, herbaryum örneklerinden DNA ekstraksiyonu ile ilgili herhangi bir açıklamaya rastlanmamıştır. Daha sonra, aynı işlemleri yaptırmak üzere Ankara'da faaliyet gösteren Teknogen Biyomühendislik ve Teknolojik Sistemler Anonim Şirketine gönderilmiştir. Burada da 20 örnekten DNA ekstrakte edilmiş ve 13 örnekte de PCR işlemi ve dizileme işlemi başarılı olmuştur. Kalan örneklerden Qiagen AllPrep Bacterial/Fungal DNA/RNA/Protein Kit ile izolasyon yapılmış ve tüm örneklerin izolasyon işlemleri tamamlanmıştır.

Herbariyom örnekleri genellikle kurutulmuş olarak saklanır ve bazen koruyucu kimyasallarla muamele edilir. Bu kimyasallar DNA'nın yapısına zarar verebilir ve DNA'nın izolasyonunu zorlaştırabilir. Bu nedenle, başlangıçta örneklerden DNA'nın manuel yöntemlerle ve hatta bazı DNA ekstraksiyon kitleriyle elde edilmesi başarılı olmadı ve istenen sonuçları vermedi. Ancak Qiagen şirketinin DNA ekstraksiyon kitini kullanarak tüm örneklerden istenen miktarda DNA başarıyla elde edildi. Qiagen kitinin bu konuda diğer kitlere göre üstün olması dikkat çekicidir. Doğru ekstraksiyon yönteminin seçimi, DNA bazlı çalışmalarda son derece kritiktir ve Manuel yöntemlerin yanı sıra birçok farklı kit mevcut olup, örnek türüne ve çalışmanın amacına göre en uygun olanını seçmek gerekmektedir.



Şekil 4.1. Agaroz gel üzerinde yürütülen bazı DNA örnekleri

DNA'nın saflığı ve konsantrasyonunun ölçülmesi, moleküler biyoloji çalışmalarında kritik bir öneme sahiptir. Bu amaçla Nanodrop cihazı kullanarak DNA saflık ve konsantrasyon oranları belirlenmiştir. Nanodropla ölçülen rakamlar çalışmamız için normal miktarları gösterdiği için elde edilen DNA lar ile çalışmaya devam edilmiştir. DNA miktarları Tablo 4.1. de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. DNA Saflık ve Konsantrasyon oranları

	Abs 260	Abs 280	260/280	260/230
Örnek 1	0,978	0,490	2,00	1,4
Örnek 2	6,263	1,671	3,75	2,09
Örnek 3	7,652	3,763	2,03	1,99
Örnek 4	1,243	0,580	2,14	2,60
Örnek 5	0,938	0,490	1,91	1,38
Örnek 6	1,233	0,681	1,81	1,05
Örnek 7	6,126	3,059	2,00	1,95
Örnek 8	12,696	6,762	1,88	1,32
Örnek 9	4,003	2,282	1,75	1,06
Örnek 10	5,2299	2,594	2,02	2,01
Örnek 11	11,095	6,111	1,8	1,14
Örnek 12	7,248	3,763	1,93	1,54
Örnek 13	4,471	2,196	2,04	2,08
Örnek 14	4,815	2,590	1,86	1,33
Örnek 15	7,680	3,877	1,98	1,66
Örnek 16	3,062	1,710	1,79	1,16
Örnek 17	2,449	1,351	1,81	1,18
Örnek 18	6,190	3,174	1,95	1,52
Örnek 19	3,977	2,032	1,96	1,81
Örnek 20	9,180	5,089	1,80	1,17

Örnek 21	5,252	2,951	1,87	1,41
Örnek 22	3,390	1,874	1,81	1,32
Örnek 23	5,621	2,772	2,03	1,62
Örnek 24	3,921	2,031	1,96	1,92
Örnek 25	7,250	3,891	1,87	1,42
Örnek 26	2,126	1,084	1,96	1,93
Örnek 27	6,112	3,340	1,83	1,75
Örnek 28	4,023	1,992	2,02	1,43
Örnek 29	5,321	2,745	1,94	1,85
Örnek 30	6,521	3,450	1,89	2,01
Örnek 31	1,985	1,040	1,91	1,51
Örnek 32	2,365	1,344	1,76	1,62
Örnek 33	4,621	2,497	1,85	1,76
Örnek 34	8,125	4,063	2,00	1,69
Örnek 35	3,854	1,899	2,03	2,03
Örnek 36	4,632	2,662	1,74	1,32
Örnek 37	10,023	5,221	1,92	1,89
Örnek 38	7,854	4,156	1,89	1,65
Örnek 39	6,325	3,116	2,03	1,98
Örnek 40	4,213	2,253	1,87	1,64

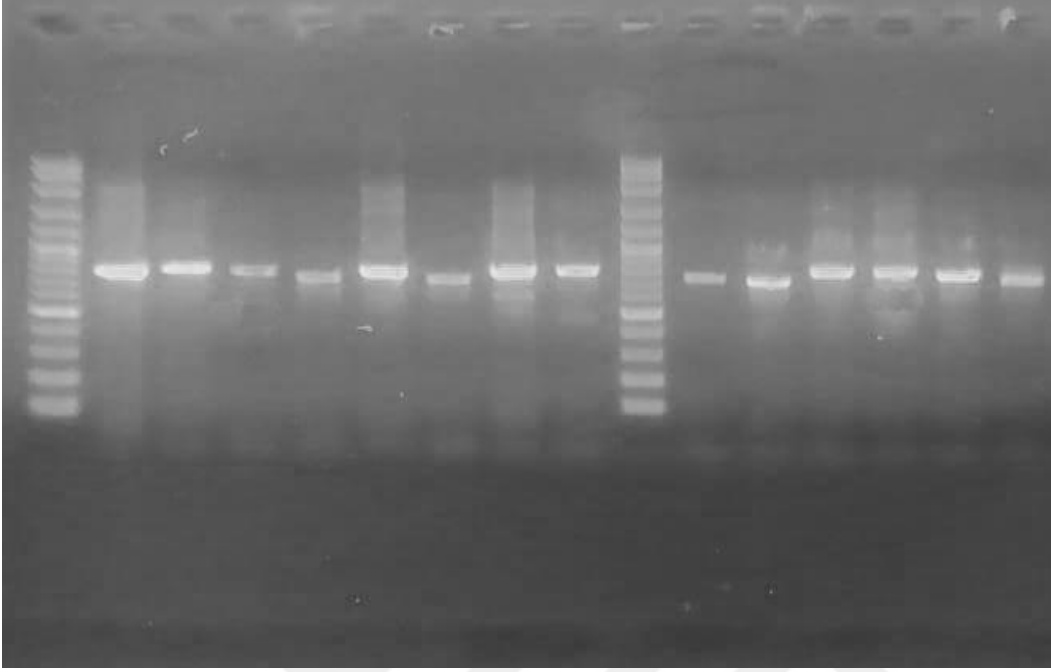
4.2. İzole edilen genomik DNA ların PCR ve dizileme işlemleri:

Filogenetik çalışmalarda, özellikle mantarlar söz konusu olduğunda, ITS (İç transkript spacer) bölgesi sıkça kullanılır.

Avantajlarına rağmen, ITS bölgesinin bazı sınırlamaları da vardır ve bazı durumlarda, özellikle daha derin filogenetik ilişkilerin analizinde, başka gen bölgelerinin veya çoklu gen bölgelerinin kullanılması gerekebilir. Ancak genel olarak, ITS, mantar filogenetik çalışmalarında bir "standart" olarak kabul edilir. Bu nedenle PCR işlemlerinde ITS , 28S ve RPB2 gen bölgeleri seçilerek ilgili primerler kullanılmıştır. PCR sırasında primerlerin bağlanma sıcaklığı 49 ve 55 derece aralığında optimize edilmiş ve hedef bölgeler çoğaltılmıştır. ITS ve 28S genler için tüm örneklerde PCR işlemleri başarılı bir şekilde sonuçlanırken RPB2 gen bölgesinde 17 örnekte işlem sonuç vermiştir (K07, K08, K13, K14, K15, K16, K17, K21, K23, K24, K26, K28, K30, K34, K37, K39, K40).

Literatüre baktığımızda yaklaşık çalışmaların hepsinde ITS gen bölgesi seçilip kullanılmış ve sadece bir kaç çalışmada 28S ve RPB2 değerlendirilmiştir. Wilson, A.W. ve arkadaşları 2012 de yapılan çalışmada 168 örnekten sadece 40 tanesinden RPB2 için PCR başarılı olmuştur (*Scleroderma meridionale*, *Scleroderma citrinum*, *Scleroderma bermudense*, *Scleroderma bovista*, *Scleroderma areolatum*).

PCR sonuçlarını görmek için ITS ile ilgili primerler kullanılarak elde edilen PCR örnekleri agaroz jel elektroforezi yöntemiyle incelenmiştir. Agaroz jel üzerinde yaklaşık 750 baz çifti uzunluğunda bir bant gözlenmiştir. Elektroforez jel görüntüsü Şekil 4.2' de gösterilmiştir.

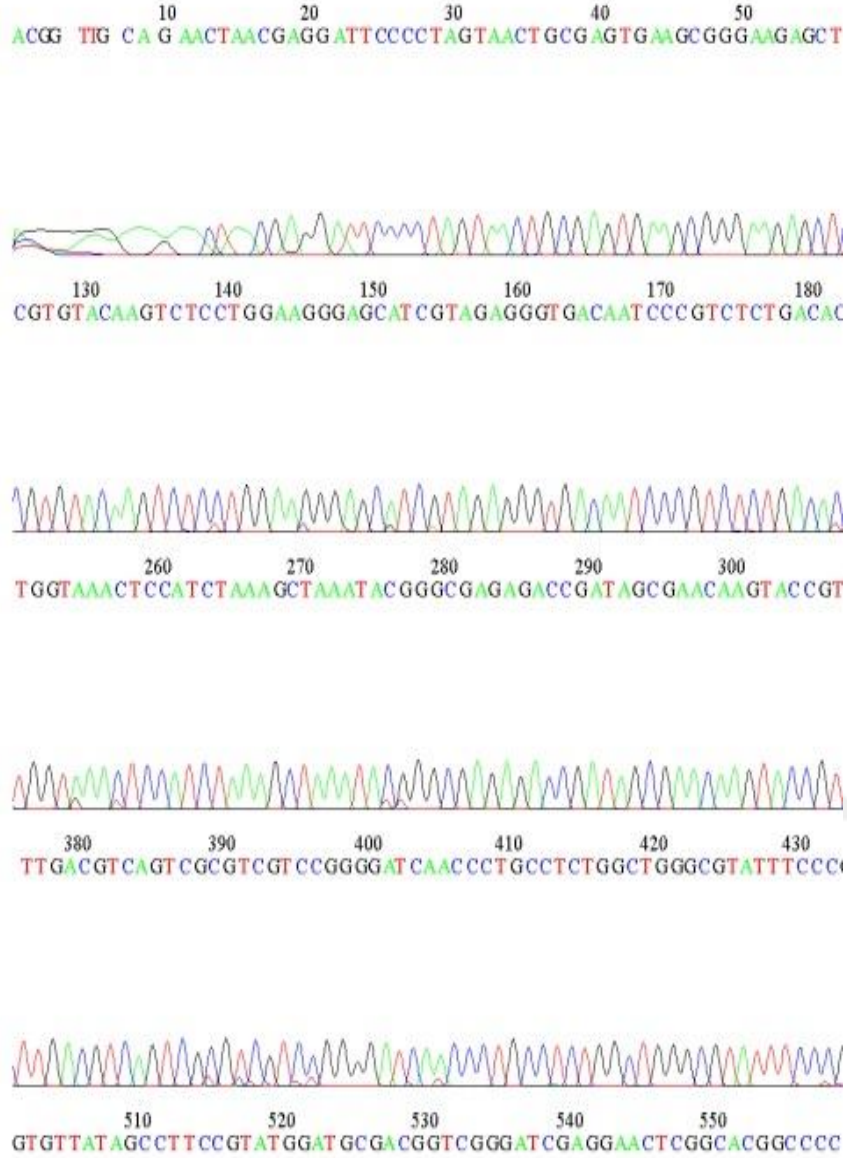


Şekil 4.2. Bazı ITS PCR örneklerinin agaroz gel görüntüsü

PCR ürünleri dizileme için Diagen firmasına gönderilmiştir. Diagen Firmasından gelen diziler incelenip ham veriler işlenip kirli (mess li) bölgeleri çıkarıldıktan sonra ileri ve geri okumalar birleştirilerek kontigler oluşturulmuş ve bu diziler filogenetik analizlerde kullanılmak üzere kaydedilmişlerdir.

Birleştirilmiş dizileri elde etmek için, DNA dizileme yöntemiyle elde edilen iki yönlü dizileri PRABI web sitesi aracılığıyla tek bir birleştirilmiş diziye dönüştürülmüştür.

Şekil 4.3.'te, DNA dizileme yöntemiyle elde edilen bir dizi örneği ve bu okumanın sonucunda elde edilen piklerin kalitesi gösterilmiştir. Bazı örneklerde DNA dizileme işlemi başarılı olmamıştır. Bu tür örnekler, yeniden dizileme için Diagen firmasına geri gönderilmiş ve ikinci denemede okuma başarılı olmuştur. Kaliteli DNA dizlerinin elde edilmesi, araştırmalar için son derece kritiktir ve bu tür durumlar, genellikle laboratuvar çalışmalarının rutin bir parçasıdır. Tekrarlanan okuma işlemleri, daha doğru ve güvenilir sonuçların elde edilmesine yardımcı olur.



Şekil 4.3. Diagen firmasından gönderilen örneğe ait ham dizi veri görüntüsü

Her bir dizi daha sonra BLAST işlemine tabi tutulmuş ve ilişkili olduğu diziler ve ilişkili organizmalarla yüzde benzerlikleri gibi özellikler belirlenmiştir. Çoğunlukla örnekler % 95'in üzerinde benzerlik göstermiştir. İlişkili diziler içinde güvenilir bulunan diziler veri seti oluştururken kullanılmıştır. Blast analizi sonucu her bir örnek için ilişkili cins belirlendikten sonra bu cinse ait referans diziler tesbit edilerek veri setine dahil edilmiştir. Veri tabanında 28S ve RPB2 bölgeler için yeterli veri olmadığı için veri seti sadece ITS bölgesi için hazırlanmıştır.

Şekil 4.4.'te, incelenen örneğin DNA okumasından elde edilen bir BLAST sonucunu görebilirsiniz.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Scleroderma cepa voucher RBG Kew K(M)54373 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal...	Scleroderma cepa	1290	1290	96%	0.0	99.03%	722	EU784412.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Scleroderma cepa 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), isolate C...	Scleroderma cepa	1288	1288	97%	0.0	98.89%	786	FM213354.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Scleroderma verrucosum genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA...	Scleroderma ver...	1286	1286	94%	0.0	99.72%	706	HF933237.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Scleroderma verrucosum voucher M97 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	Scleroderma ver...	1279	1279	95%	0.0	99.02%	753	MW355006.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Scleroderma verrucosum voucher RBG Kew K(M)30670 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; i...	Scleroderma ver...	1277	1277	96%	0.0	98.74%	728	EU784415.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Scleroderma verrucosum genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA...	Scleroderma ver...	1275	1275	94%	0.0	99.43%	706	HF933241.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Scleroderma verrucosum genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA...	Scleroderma ver...	1271	1271	94%	0.0	99.29%	707	HF933233.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Scleroderma verrucosum genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA...	Scleroderma ver...	1269	1269	94%	0.0	99.29%	707	HF933232.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Scleroderma verrucosum voucher A4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gen...	Scleroderma ver...	1262	1262	94%	0.0	99.00%	704	JX434678.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Scleroderma verrucosum voucher CM077 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Scleroderma ver...	1236	1236	93%	0.0	98.85%	694	KP826736.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Scleroderma sp. isolate ANK221 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene an...	Scleroderma sp.	1219	1219	96%	0.0	97.49%	784	MH998624.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Scleroderma verrucosum voucher CM086 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Scleroderma ver...	1218	1218	92%	0.0	98.54%	688	KP826752.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Scleroderma sp. SA1 Sclesp internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, compl...	Scleroderma sp...	1205	1205	88%	0.0	99.70%	658	KJ524531.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Scleroderma sp. clone 7M1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complet...	Scleroderma sp.	1201	1201	89%	0.0	99.25%	665	MG973284.1

Şekil 4.4. K18 izolatının BLAST sonucu

Veri seti oluşturulduktan sonra Clustal X (Thompson ve ark 1997) ile alignment (hizalama) işlemi yapıldıktan sonra, oluşturulan hizalama elle düzeltilmiştir. Hizalaması yapılan veri setlerinin dnaSp5.0 programında haplotip analizinde benzer olan diziler çıkarılmıştır. Daha sonra JModel Test programında ilgili filogenetik modeller belirlenerek bu modeller Mega 10 programında kullanılmıştır. Mega10 filogeni programında ilgili veri testleri seçilerek daha önce tesbit edilen evrimsel modeller kullanılarak filogenetik ağaçlar ve bootstrep ağaçları oluşturulmuştur. Bootstrep ağaçlarındaki bootstrep değerleri (% 50'nin üzerinde olanlar) Neighbor Joining ağacına aktarılarak ilgili kümelerinin değerlendirilmesinde kullanılmışlardır.

Yapılan BLAST analizleri sonucu birkaç farklı tür grubu belirlenmiş ve bunlar dnaSP programı ile analiz edildiğinde örneklerin haplotip grupları belirlenmiş ve benzer olanlarından biri filogenetik analiz için seçilmiştir. Bu diziler ilgili ITS veri setleri oluşturulmuş ve yukarıda bahsedilen analizler yapılarak filogenetik ağaçları oluşturulduktan sonra ilişkili oldukları gruplar belirlenmiştir. Tablo 4.2.'de, ITS ile ilgili veri setinin hazırlanmasında kullanılan dizilerin genel özellikleri görülmektedir.

Tablo 4.2. Bu çalışmada kullanılan veri setini oluşturan diziler

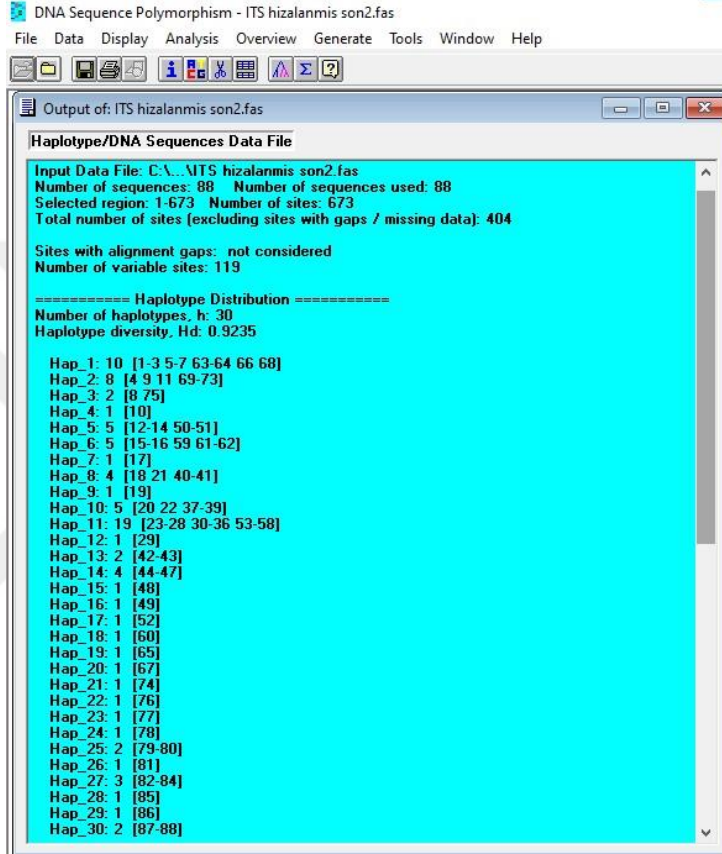
Bu çalışmada kullanılan fungus örnekleri / ait olduğu veri seti	Tür isimleri	Kaynak
HF933235	<i>S. bovista</i>	Rusevska,K., Karadelev,M., Phosri,C., Duenas,M., Watling,R. And Martin,M.P. 2014
KX017590	<i>S. bovisra</i>	Martin,M.P., Duenas,M. and Telleria,M.T.
HF933242	<i>S. bovisra</i>	Martin,M.P. 2014
HF933240	<i>S. bovisra</i>	Martin,M.P. 2014
HF933234	<i>S. bovisra</i>	Martin,M.P. 2014
AB211267	<i>S. bovisra</i>	Nara,K 2006
GQ267487	<i>S. bovisra</i>	Walbert,K. 2010
MG367369	<i>S. meridionale</i>	Leonardi,M., Neves,M.-A., Comandini,O. and Rinaldi,A.C. 2018
HF933239	<i>S. meridionale</i>	Martin,M.P. 2014
HF933238	<i>S. meridionale</i>	Martin,M.P. 2014
MG264160	<i>S. meridionale</i>	Leonardi,M., Neves,M.-A., Comandini,O. and Rinaldi,A.C. 2018
MT594538	<i>S. meridionale</i>	Leonardi,M., Nobrega Marinho Furtado,A., Comandini,O., Geml,J. and Rinaldi,A.C. 2020
GQ166907	<i>S. citrinum</i>	Avis,P.G., Leacock,P., Gaswick,W., Branco,S., Tang,Y., Neves,M.A. and Mueller,G.2008
EU784413	<i>S. citrinum</i>	Brock,P.M., Doring,H. and Bidartondo,M.I. 2009
FJ824090	<i>S. citrinum</i>	Bauman,J.M., Keiffer,C.H. and Hiremath,S.

FM213353	<i>S. areolatum</i>	Martin,M.P. 2009
FM213352	<i>S. areolatum</i>	Martin,M.P. 2009
EU819438	<i>S. areolatum</i>	Palmer,J.M., Lindner,D.L. and Volk,T.J. 2008
EU819518	<i>S. areolatum</i>	Palmer,J.M., Lindner,D.L. and Volk,T.J. 2008
GQ166910	<i>S. areolatum</i>	Avis,P.G., Leacock,P., Gaswick,W., Branco,S., Tang,Y., Neves,M.A. and Mueller,G. 2008
FM213351	<i>S. areolatum</i>	Martin,M.P. 2009
HF933231	<i>S. areolatum</i>	Martin,M.P. 2009
EU819439	<i>S. cepa</i>	Palmer,J.M., Lindner,D.L. and Volk,T.J. 2008
FM213355	<i>S. cepa</i>	Martin,M.P. 2009
DQ453694	<i>S. cepa</i>	Frank,J.L., Barry,S. and Southworth,D.
OP743515	<i>S. cepa</i>	Russell,S.D. 2022
OP743680	<i>S. cepa</i>	Russell,S.D. 2022
HF933237	<i>S. verrucosum</i>	Martin,M.P. 2009
HF933232	<i>S. verrucosum</i>	Martin,M.P. 2009
AJ629886	<i>S. verrucosum</i>	Phosri,C., Martin,M.P., Sihanonth,P., Whalley,A.J. and Watling,R. 2007
HF933241	<i>S. verrucosum</i>	Martin,M.P. 2009
HF933233	<i>S. verrucosum</i>	Martin,M.P. 2009
EU784415	<i>S. verrucosum</i>	Brock,P.M., Doring,H. and Bidartondo,M.I. 2009
MT270644	<i>S. geaster</i>	Ortiz Rivero,J. and Martin,M.P. 2020
MT270642	<i>S. geaster</i>	Ortiz-Rivero,J., Watling,R., Guzman-Davalos,L. and Martin,M.P. 2021
MT270641	<i>S. geaster</i>	Ortiz-Rivero,J., Watling,R., Guzman-

		Davalos,L. and Martin,M.P. 2021
MT270635	<i>S. geaster</i>	Ortiz Rivero,J. and Martin,M.P. 2020
MT270632	<i>S. geaster</i>	Ortiz-Rivero,J., Watling,R., Guzman-Davalos,L. and Martin,M.P. 2021
FM213337	<i>S. septentrionale</i>	Martin,M.P. 2009
FM213338	<i>S. septentrionale</i>	Martin,M.P. 2009
EU819441	<i>S. michiganense</i>	Palmer,J.M., Lindner,D.L. and Volk,T.J. 2008
FM213346	<i>S. michiganense</i>	Martin,M.P. 2009
FM213347	<i>S. michiganense</i>	Martin,M.P. 2009
KU759904	<i>S. nitidum</i>	Silva,B.D.B., Sulzbacher,M.A., Grebenc,T., Baseia,I.G. and Martin,M.P.
KU759908	<i>S. nitidum</i>	Silva,B.D.B., Sulzbacher,M.A., Grebenc,T., Baseia,I.G. and Martin,M.P.
KU759909	<i>S. nitidum</i>	Silva,B.D.B., Sulzbacher,M.A., Grebenc,T., Baseia,I.G. and Martin,M.P.
FM213364	<i>S. sinnamariense</i>	Martin,M.P. 2009
HQ687222	<i>S. sinnamariense</i>	Kumla,J., Danell,E., Bussaban,B. and Lumyong,S.
FM213356	<i>S. sinnamariense</i>	Martin,M.P. 2009
FJ840449	<i>S. dictyosporum</i>	Sanon,K.B., Ba,A.M., Delaruelle,C., Duponnois,R. and Martin,F. 2009
FJ840449	<i>S. dictyosporum</i>	Sanon,K.B., Ba,A.M., Delaruelle,C., Duponnois,R. and Martin,F. 2009
KU747114	<i>S. dunensis</i>	Silva,B.D.B., Sulzbacher,M., Grebenc,T., Baseia,I.G. and Martin,M.P. 2009

DnaSP programından elde edilen sonuçlara göre, ITS geninin okunmasıyla elde edilen 40 örneğin 12'si için haplotip belirlenmiş ve bu haplotipler aşağıda Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Haplotiplerin belirlenmesi, genetik çeşitliliğin ve popülasyon yapısının anlaşılmasında önemlidir. ITS geni, özellikle mantarlar arasında tür tanımlamada sıkça kullanılan bir bölgedir. Elde edilen bu haplotip bilgisi, çalışılan örneklerin genetik çeşitliliği hakkında önemli bilgiler sunmaktadır (Şekil 4.5).



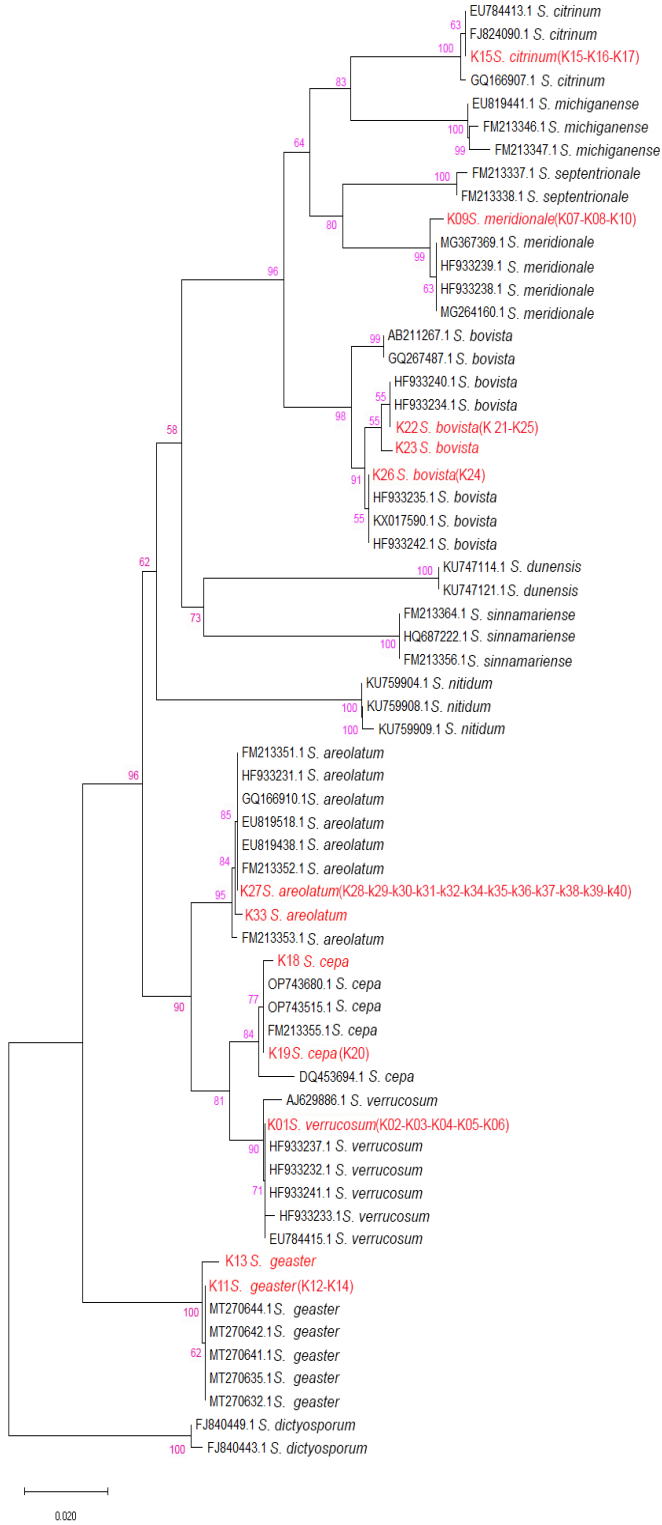
Şekil 4.5. DnaSP programı ile ITS veri setinin haplotipleri.

Tablo 4.3'te, ITS gen dizilerinin haplotip analizi sonuçlarını görebilirsiniz. Haplotip dizileri, benzerlikleri nedeniyle veri setinden çıkarılmıştır. Geriye kalan dizilerle filogenetik ağacın çizimi ve diğer çalışmalar yürütülmüştür. Haplotiplerin tanımlanması ve benzer olanlarının elenmesi, filogenetik analizlerin daha anlamlı ve doğru sonuçlar vermesi için önemlidir. Bu tür analizler, türler arası ilişkilerin ve evrimsel tarihlerin anlaşılmasında kritik bir role sahiptir.

Tablo 4.3. Haplotip analizi sonucu benzer olan diziler ve analiz için seçilenler

Haplotip Grubu	Örnekler	Çıkarılan örnekler	Filogenetik analizi yapılan örnekler
<i>S. verrucosum</i>	K01, K06, K04, K02, K03,	K06, K04, K02, K03	K01
<i>S. geaster</i>	K11, K12, K14	K12, K14	K11
<i>S. citrinum</i>	K15, K16, K17	K16, K17	K15
<i>S. cepa</i>	K19, K20	K20	K19
<i>S. bovista</i>	K22, K25	K25	K22
<i>S. bovista</i>	K24, K26	K24	K26
<i>S. areolatum</i>	K27, K28, K29, K30, K31, K32, K34, K35, K36, K37, K38, K39, K40	K28, K29, K30, K31, K32, K34, K35, K36, K37, K38, K39, K40	K27

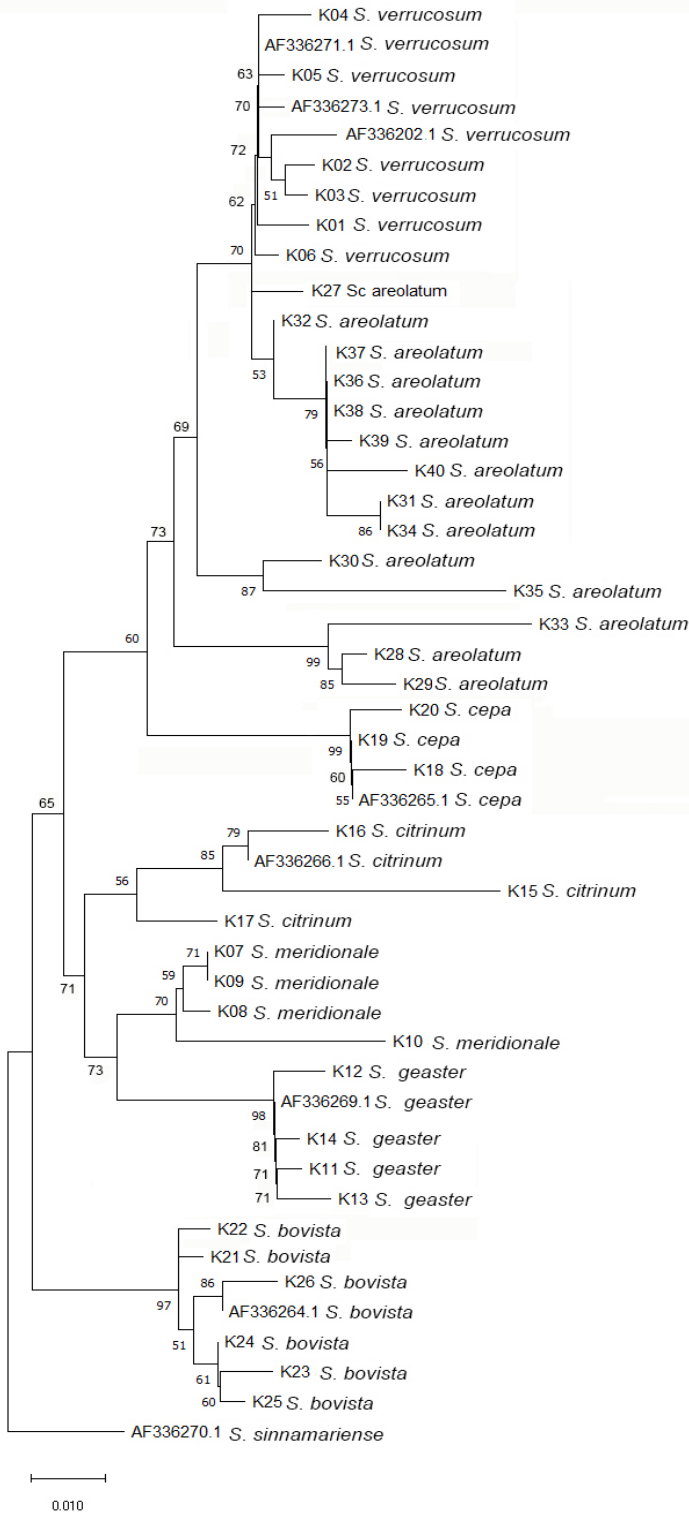
Veri setinden haplotidleri çıkardıktan sonra ITS bilgilerine göre veri seti model testine tabi tutulmuş ve seçilen modele göre Mega 10 programında NJ ağacı oluşturulmuştur (Şekil 4.6).



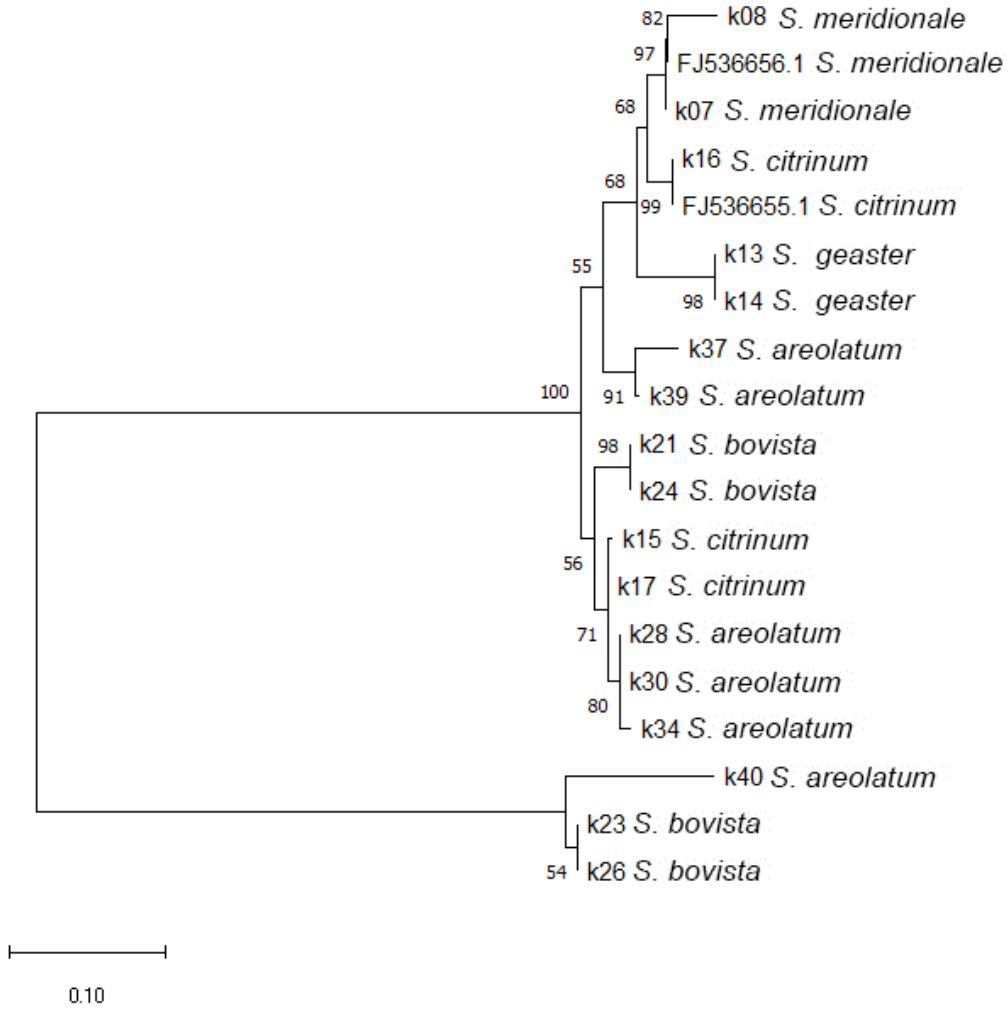
Şekil 4.6. Makrofungusların rDNA ITS numuneler arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren NJ ağacı.

Filogenetik ağaçlar, biyolojik çeşitliliği ve türler arasındaki ilişkileri aydınlatmada kritik bir araçtır. ITS geni kullanılarak çizilen filogenetik ağacın incelenmesiyle, NCBI bilgi sistemi üzerindeki dizi blast sonuçları doğrulanmış ve ilgili türler hakkında genel bir görüş elde edilmiştir. Filogenetik ağacın Andrew W. Wilson'ın (2012) nceki araştırmalarıyla karşılaştırılması ve incelenmesi sonucunda, filogenetik ağacın ve ilgili türlerin ilişkileri doğrulanmıştır. Bu alışma, türlerin evrimsel ilişkilerini daha iyi anlamamıza yardımcı olmaktadır. İncelenen türlerin doğruluğunu onaylamak için 28S dizileri ve RPB2 genini kullanarak diğer filogenetik ağaçlarını oluşturduk. Bu genler, tür tanımlamasında ve evrimsel ilişkilerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır.

ITS, biyolojik sınıflandırmada sıklıkla kullanılan bir DNA bölgesi olmasına rağmen Cherdchai Phosri ve arkadaşları, 2014 yılında Tayland'da yeni mantar türlerini keşfetmek için yaptıkları araştırmalarda, ITS'ten elde edilen filogenetik sonuçları onaylamak için RPB2 gibi diğer genetik markerları kullanmışlardır. ITS, 28s ve RPB2'den elde edilen üç filogenetik ağacı birbiriyle karşılaştırdığımızda, ITS ağacından elde edilen sonuçların doğru olduğu ve türlerin doğru bir şekilde belirlendiği sonucuna varıyoruz. Türleri daha detaylı ve hassas bir şekilde incelemek için elektron mikroskobu yöntemi de kullanılmıştır. Bu değerlendirmeler, sonraki bölümde incelenmiştir. şekil 4.7. ve 4.8.'de, NJ yöntemi ile çizilmiş olan 28s ve RPB2'den elde edilen filogenetik ağaçları görülmektedir.



Şekil 4.7. 28S bölgesinden elde edilen veri tabanından yapılan NJ filogenetik ağaç



Şekil 4.8. RPB2 bölgesinden elde edilen veri tabanından yapılan NJ filogenetik ağaç

Veriler, ITS dizini temel alınarak elde edilen NJ filogenik ağaç sonuçlarına göre, K1'den K6'ya kadar olan örneklerin *S. verrucosum*, K7'den K10'a kadar olan örneklerin *S. meridionale*, K11'den K14'e kadar olan örneklerin *S. geaster*, K15'ten K17'ye kadar olan örneklerin *S. citrinum*, K18'den K20'ye kadar olan örneklerin *S. cepa*, K21'den K26'ya kadar olan örneklerin *S. bovisra* ve K27'den K40'a kadar olan örneklerin ise *S. areolatum* ile ilgili olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar, farklı örneklerin hangi türlere ait olduğunu net bir şekilde göstermektedir.

ITS dizilerine dayalı olarak elde ettiğimiz NJ filogenik ağaç sonuçlarımızı, 28S ve RPB2 dizilerine dayanarak elde edilen NJ filogenik ağaç sonuçları ile karşılaştırdığımızda, bazı örneklerde farklılıklarla karşılaşırız. Bu farklılıklar, metodolojik ya da deneysel nedenlerden kaynaklanıyor olabilir. Farklı gen bölgelerinin farklı evrimsel süreçlerden geçmiş olabileceğini veya deneysel hataların var olabileceğini göz önünde bulundurmalısınız. Bu tür çelişkiler, genellikle çoklu veri kaynakları ve analitik yöntemler kullanılarak çözülebilir. Ayrıca, ek deneyler ve daha geniş bir örneklem grubu da faydalı olabilir.

ITS bölgeleri oldukça hızlı değişir, bu kısa vadeli filogenetik analizler için faydalı olabilir ama uzun vadeli veya daha yüksek taksonomik seviyeler için yanıltıcı olabilir. Ayrıca bazı organizmalar birden fazla ITS versiyonuna sahip olabilir, bu filogenetik analizi karmaşık hale getirebilir. ITS analizleri Yüksek dizilim çeşitliliği nedeniyle, farklı türler arasında uygun bir eşleşme yapmak zordur. Bazı durumlarda, ITS dizisinin kalitesi doğru bir şekilde doğrulanamayabilir, bu yanıltıcı sonuçlara yol açabilir. Bu nedenlerle ITS, 28S ve RPB2 sonuçları arasında farklılıklar göstermektedir.

Filogenetik ağaç çalışmasında, ITS dizisinin kullanıldığı K40 örneği *S. areolatum* türüne ait olarak belirlenmiştir. Ancak, aynı örneğin RPB2 geni için yapılan filogenetik ağaç analizi, türün *S. bovisra* ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu tür farklılıklar, kullanılan gen bölgelerinin evrimsel hızlarının farklı olması, seçim baskılarına farklı şekillerde maruz kalmaları veya teknik sınırlamalar gibi nedenlerle ortaya çıkabilir. Dolayısıyla, bu iki farklı gen bölgesinin sunduğu bilgilerin nasıl yorumlanması gerektiği konusunda dikkatli olunmalıdır.

Ayrıca, ITS dizisiyle elde edilen filogenik ağaç incelemesinde K37, K36 ve K38 örneklerinin *S. areolatum* türüne ait olduğu gösterilmiştir. Ancak, 28S geniyle ilgili filogenik ağaç incelemesinde bu türün *S. verrucosum* ile ilişkili olduğu görülmektedir.

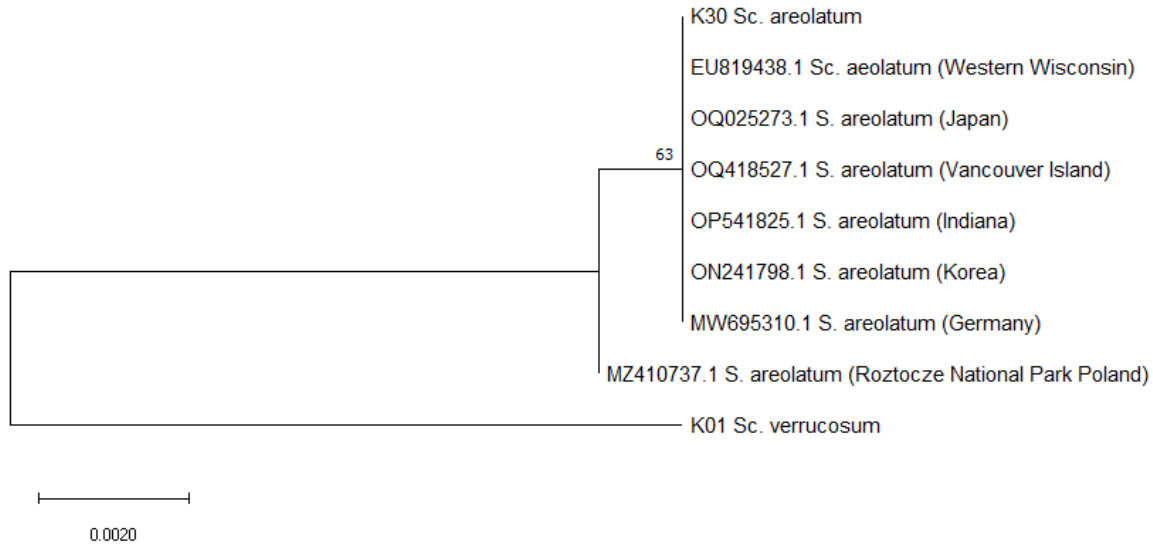
Yapılan ITS çalışmalar sonucunda aşağıdaki türler (Tablo 4.4) belirlenmiştir:

Tablo 4.4. Çalışmadaki örnekler ve İlişkili türleri

Örnek	İlişkili Organizma	Örnek	İlişkili Organizma
K01	<i>S. verrucosum</i>	K18	<i>S. cepa</i>
K02	<i>S. verrucosum</i>	K19	<i>S. cepa</i>
K03	<i>S. verrucosum</i>	K20	<i>S. cepa</i>
K04	<i>S. verrucosum</i>	K21	<i>S. bovisra</i>
K05	<i>S. verrucosum</i>	K22	<i>S. bovisra</i>
K06	<i>S. verrucosum</i>	K23	<i>S. bovisra</i>
K07	<i>S. meridionale</i>	K24	<i>S. bovisra</i>
K08	<i>S. meridionale</i>	K25	<i>S. bovisra</i>
K09	<i>S. meridionale</i>	K26	<i>S. bovisra</i>
K10	<i>S. meridionale</i>	K27	<i>S. areolatum</i>
K11	<i>S. geaster</i>	K28	<i>S. areolatum</i>
K12	<i>S. geaster</i>	K29	<i>S. areolatum</i>
K13	<i>S. geaster</i>	K30	<i>S. areolatum</i>
K14	<i>S. geaster</i>	K31	<i>S. areolatum</i>
K15	<i>S. citrinum</i>	K32	<i>S. areolatum</i>
K16	<i>S. citrinum</i>	K33	<i>S. areolatum</i>
K17	<i>S. citrinum</i>	K34	<i>S. areolatum</i>
K35	<i>S. areolatum</i>	K38	<i>S. areolatum</i>
K36	<i>S. areolatum</i>	K39	<i>S. areolatum</i>
K37	<i>S. areolatum</i>	K40	<i>S. areolatum</i>

4.3. Belirlenen türler ile dünyada yayılım gösteren benzer örneklerin yakınlığı karşılaştırılması

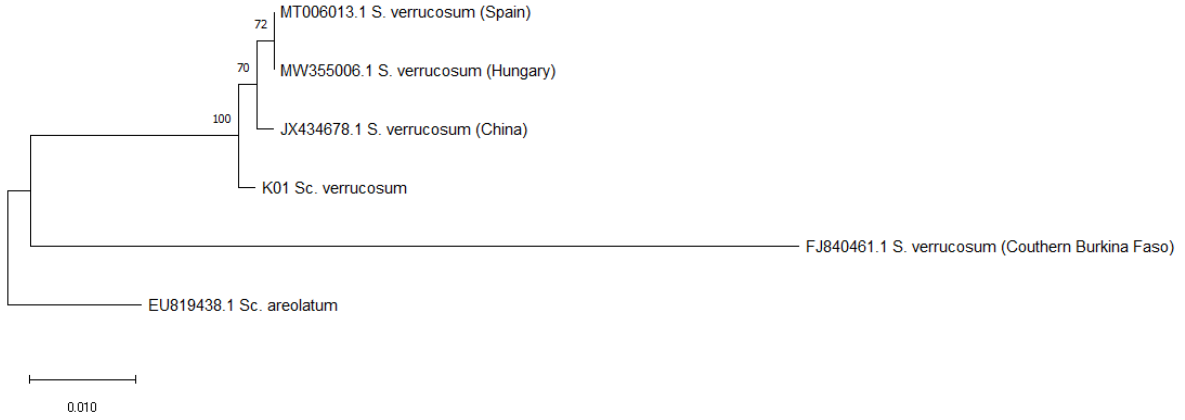
Önceki bölümde, 40 örneğimizin 7 farklı türle ilişkili olduğu tesbit edilmiştir (*Sc. bovisra*, *Sc. meridionale*, *Sc. citrinum*, *Sc. areolatum*, *Sc. cepa*, *Sc. verrucosum*, *Sc. geaster*). Belirlenen türlerin ve dünya genelindeki önceki araştırmalarda benzer örneklerin ilişkilerini incelemek için her tür için bir veriseti hazırlanmış ve her tür için özel bir filogenik ağaç NJ yöntemiyle çizilerek incelenmiştir. Bu tür çalışmalar, türlerin çeşitliliğini ve evrimsel yollarını anlamamıza temel sağlar. Özellikle biyolojik çeşitliliği koruma ve sürdürülebilirliği teşvik etme açısından büyük öneme sahiptir.



Şekil 4.9. Dünyanın değişik yörelerine ait *S. areolatum* örneklerinin ilişkilerini gösteren NJ filogenetik ağacı

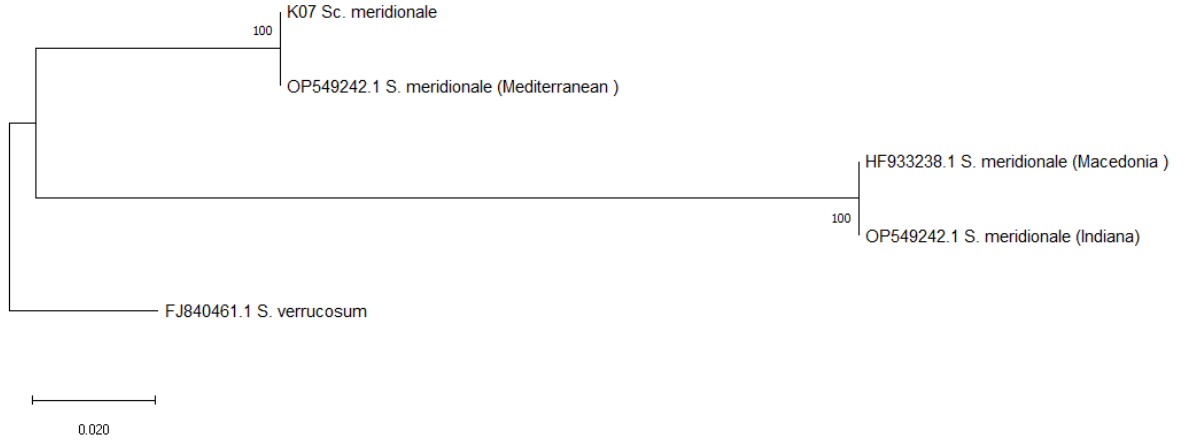
S. areolatum türünün veri tabanından elde edilen ve farklı coğrafyalardan elde edilen diğer örneklerle oluşturulan filogenetik ağaçdaki ilişkiler Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Bu verilere göre, bu araştırmada kullanılan ve Türkiye'nin dört bir yanından toplanan *S. areolatum* türü ile 2021 yılında Polonya'da Rosa, A. tarafından yapılan araştırmalarda toplanan en uzak genetik ilişkinin olduğu görülmektedir. Maalesef bu araştırma resmi olarak yayımlanmadığı için bu çalışma hakkında fazla bilgiye sahip değiliz. Ayrıca, çalışmamızda tesbit edilen *S. areolatum* örnekleri

2008 yılında Amerika ve Kanada'da Palmer, J.M. tarafından toplanan türlerle en yakın genetik akrabalığı göstermiştir.



Şekil 4.10. Dünyanın değişik yörelerine ait *S. verrucosum* örneklerinin ilişkilerini gösteren NJ filogenetik ağacı.

Tıpkı önceki örnekte olduğu gibi, NJ yöntemiyle yapılan ITS filogenik ağaç incelemesinde *S. verrucosum* örneklerine ait ilişkiler Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Bu tezde kullanılan ve çalışılan örnekler, 2012 yılında Çin'de Chai, D. tarafından toplanan örneklerle genetik olarak en yakın ilişkiyi göstermektedir. Ayrıca, en uzak genetik ilişkinin 2009 yılında southern Burkina Faso'da Sanon, K.B. tarafından toplanan örneklerle olduğu görülmektedir.

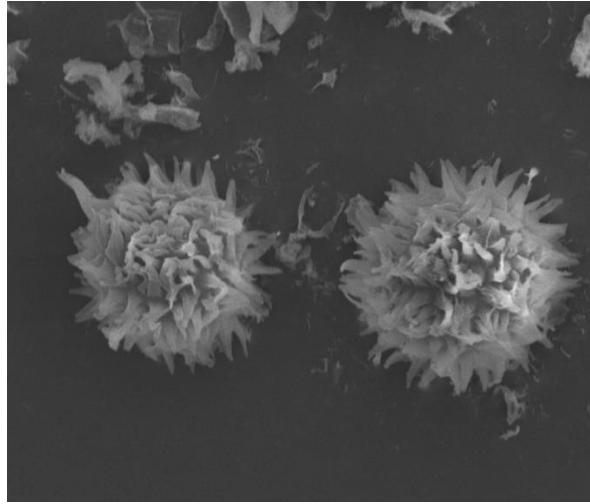


Şekil 4.11. Dünyanın değişik yörelerine ait *S. meridionale* örneklerinin ilişkilerini gösteren NJ filogenetik ağacı.

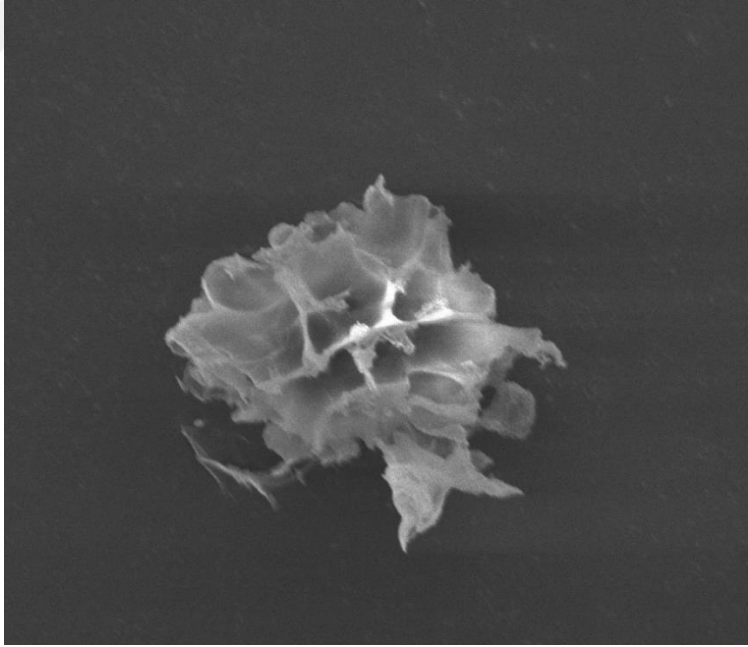
NJ yöntemiyle elde edilen filogenik ağaca göre, çalışmamızda kullanılan *S. meridionale* örneklerinden bu çalışmada incelenen K07 örneği, Russell, S.D. tarafından Amerika'nın Indiana eyaletinden toplanan örnek ile en uzak ilişkiye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca incelenen K09 numunesi de Leonardi, M. tarafından Akdeniz bölgesinden toplanan örneklerle aynı grupta yer almaktadır.

4.4. Taramalı Elektron Mikroskop alışmaları

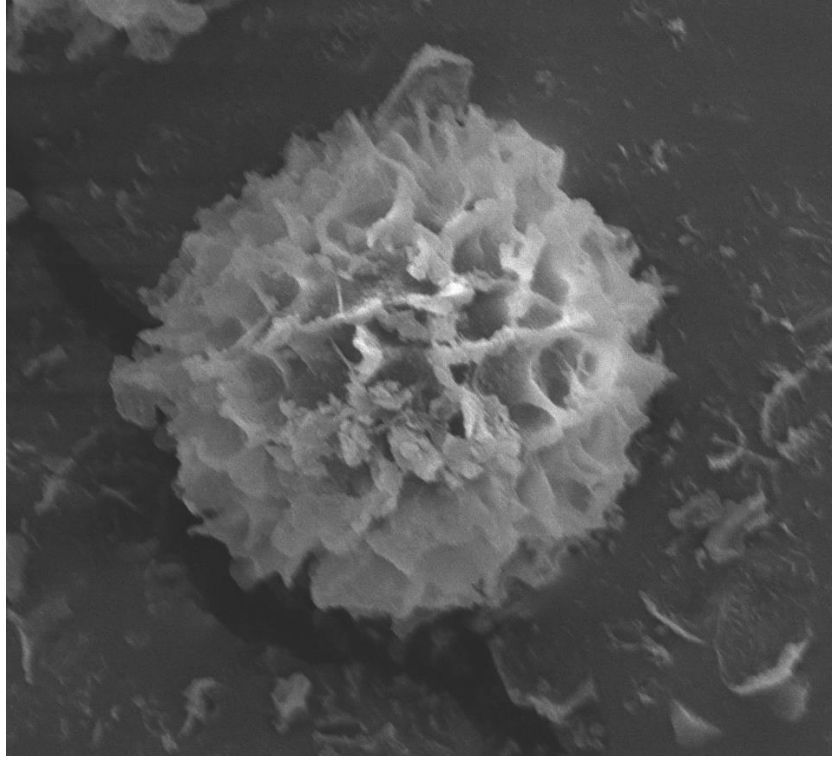
Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde řu alette çekilen gelen görüntüler ve laboratuvarıda çekilen görüntüler detaylı incelenmiş ve güvenilir kaynaklar ile karşılaştırılmıştır. Mikroskopik resimlerin daha önce Sclerodermataceae makro mantar hakkında araştırma yapan güvenilir kaynaklarla (zellikle Arjantin'de yeni Sclerodermataceae türleri hakkında yapılan araştırmalar) karşılaştırılması, filogenik ağaçtan elde edilen verilerin doğru bir şekilde ilişkilendirildiğin göstermektedir (Nouhra, 2011) .



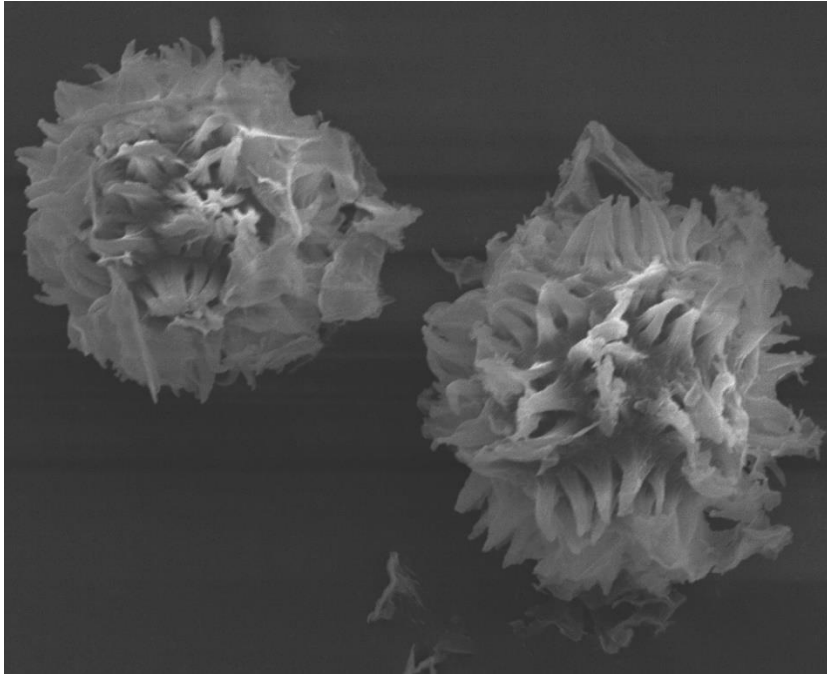
şekil 4.12. *Scleroderma areolatuma* ait mantar ve SEM görüntüler.



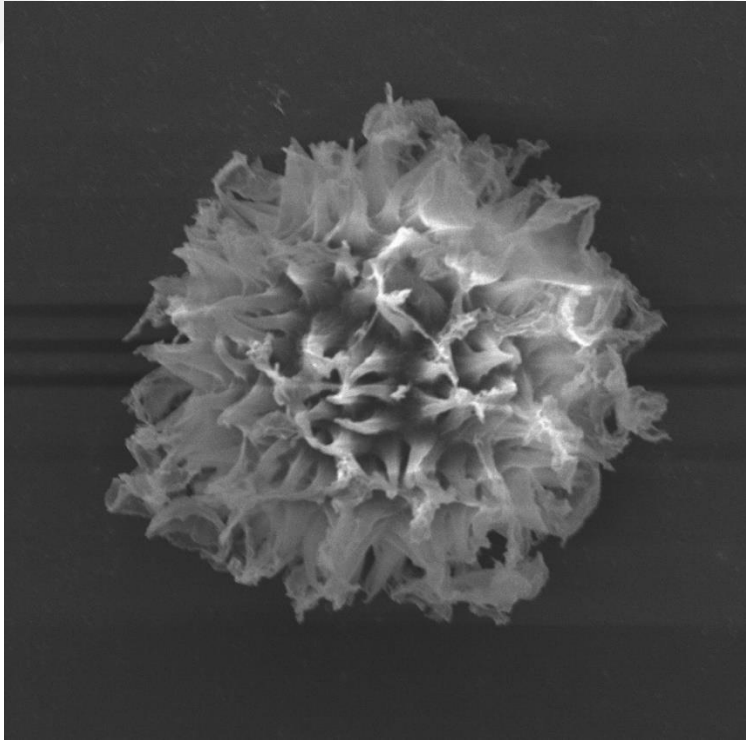
Şekil 4.13. *Scleroderma bovista* ait mantar ve SEM görüntüleri.



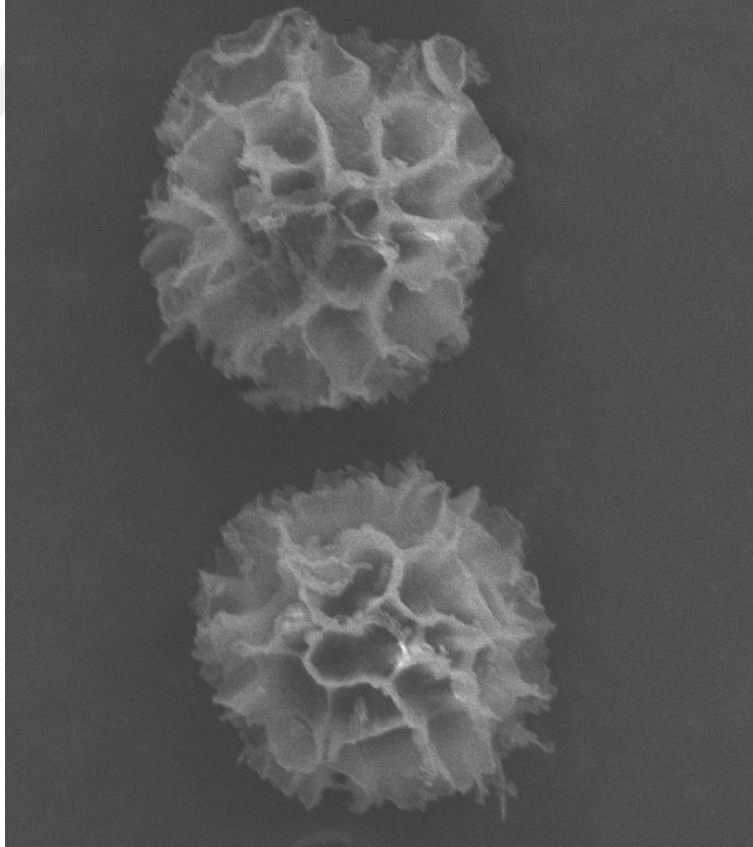
Şekil 4.14. *Scleroderma citrinum* ait mantar ve SEM görüntüler.



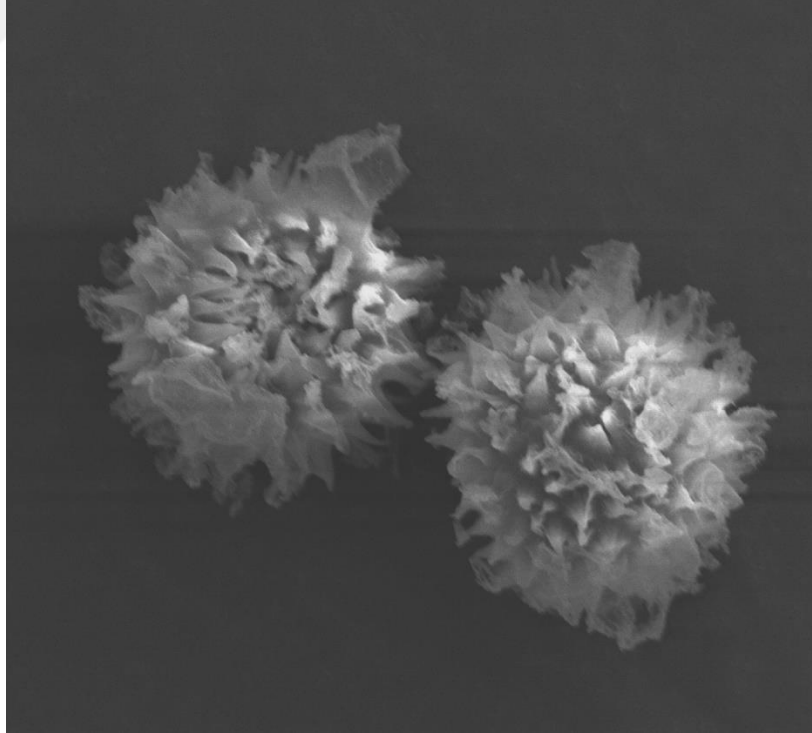
Şekil 4.15. *Scleroderma cepa* ait mantar ve SEM görüntüleri.



Şekil 4.16. *Scleroderma geaster* ait mantar ve SEM görüntüleri.



Şekil 4.17. *Scleroderma meridionale* ait mantar ve SEM görüntüleri.



Şekil 4.18. *Scleroderma verrucosum* ait mantar ve SEM görüntüleri.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Her ne kadar bir çok zorlukla (DNA ekstraksiyon ve PCR işlemleri) karşılaşılmış olsa da, bu çalışma ile Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Fungoriumuna ait bazı örneklerin filogenetik analizi ile ilişkili olduğu organizmalar tür seviyesinde moleküler olarak değerlendirilmiştir. Bu da fungoriumdaki örneklerin sağlıklı ve doğru bir şekilde kataloglanmasına ve sonraki bilimsel çalışmalara önemli bir katkı sağlayacaktır.

Veriler, ITS dizilimi temel alınarak elde edilen filogeni ağaç sonuçlarına göre, K1'den K6'ya kadar olan örneklerin *S. verrucosum*, K7'den K10'a kadar olan örneklerin *S. meridionale*, K11'den K14'e kadar olan örneklerin *S. geaster*, K15'ten K17'ye kadar olan örneklerin *S. citrinum*, K18'den K20'ye kadar olan örneklerin *S. cepa*, K21'den K26'ya kadar olan örneklerin *S. bovisra* ve K27'den K40'a kadar olan örneklerin ise *S. areolatum* ile ilgili olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar, farklı örneklerin hangi türlere ait olduğunu net bir şekilde göstermektedir.

Bu projeyi gerçekleştirirken karşılaştığımız en temel sorunlardan biri, bize zaman ve maddi kayıplara yolaçan makromantar örneklerinin durumu ve seçilen DNA ekstraksiyon yöntemleri olmuştur. Örneklerle ilgili durumdan kaynaklı olarak, DNA ekstraksiyon ve diğer aşamalarda birçok sorunla karşı karşıya kalınmıştır. Bu durumla ilgili literatürde bir veriye rastlanmamıştır. Çalışmamızda özellikle Qiagen'in DNA ekstraksiyon kitlerinin bu amaçla en başarılı uygulama olduğu ve bu tip çalışmalarda kullanımının uygun olacağı görülmüştür.

Filogenik incelemelerde, çoğu araştırmada ana gen olarak ITS dizileri kullanılmaktadır. Biz de bu projede, türleri incelemek için bu diziye başvurduk. Ancak, ITS geniyle ilgili sorunlar (hızlı genetik değişimler ve dizi kopyalarının yüksek sayısı gibi) nedeniyle, ITS temelli filogenik sonuçlar, diğer genlerle elde edilen sonuçlardan bazı türler için farklılık göstermektedir. Ancak genel bir değerlendirmede, sonuçlarımızı ITS geni üzerinden almayı uygun gördük.

Bu durum, ITS geninin kullanımının hem avantajlarını hem de sınırlamalarını gösteriyor. ITS dizisinin sıkça kullanılmasına rağmen, genin kendine has sorunları, sonuçların yorumlanmasında dikkatli olunması gerektiğini işaret ediyor.

KAYNAKLAR

1. Akın Mutlu V. Samsun İlinde Yetiştirilen Bazı Kültür Bitkilerinden Elde Edilen *Rhizoctonia* İzolatlarının Geleneksel ve Moleküler Yöntemler ile Karakterizasyonu, OMÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Turkey, 2014
2. Anonymous a. Lycoperdaceae, <https://www.britannica.com/science/Lycoperdaceae#ref15851>, 2022
3. Anonymous b. Sclerodermataceae, <https://www.britannica.com/science/Sclerodermataceae>, 2022
4. Baseia IG, Silva BD, Ishikawa NK, Soares JV, Franka IF, Ushijima S, Maekawa N and Martin MP. Discovery or extinction of new Scleroderma species in Amozonia? Plos One, 11(12): EO167879, 2016
5. Blackwell M., Vilgays R, James TY, Taylor JW. Fungi. Available From <http://tolweb.org/Fungi/2377/2007.07.13>, 2007 .
6. Bridge PD, Spooner BM, Roberts, PJ. The Impact of Molecular Data in Fungal Systematics. Advances in Botanical Research, 42, 33-67, 2005.
7. Bennett JW. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology, Journal of Biotechnology 66: 101 – 107, 1998
8. Brock PM, Doring H ve Bidartondo MI. How to know unknown fungi: the role of herbarium, New Phytol. 181(3): 719-724, 2009
9. Bruns TD, Fogel R, Taylor JW. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. Mycologia 82, 175-184, 1990.
10. Bruns TD, White TJ and Taylor JW. Fungal molecular systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, 22, 525–564, 1991.
11. Cho SE, Kwag YN, Sang-Kuk H, Dong-Hyeon L and Sun KC. Two new records of Scleroderma species (Sclerodermataceae, Boletales) in South Korea, Mycobacter Journal of Korea, 50(2): 115-123, 2022.
12. Çebi Kılıçoğlu M. Karadeniz Sahil Şeridinde Fasulye Bitkisi ve Rizosfer Bölgesinden İzole Edilen Multinükleat *Rhizoctonia spp*'nin Genetik Çeşitliliğinin Belirlenmesi, OMÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Samsun, Turkey, 2009.
13. Çebi Kılıçoğlu M and Ozkoc I. Molecular characterization of *Rhizoctonia solani* AG4 using PCR-RFLP of the rDNA-ITS region, Turkish Journal of Biology 34(3) 261-269 DOI: 10.3906/biy-0812-14, 2010.
14. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. — Phytochem. Bull.19: 11–15, 1987.

15. Dutta AK, Paloi S and Acharya K. New record of *Tulostoma squamosum* (Agaricales: Basidiomycota) from India based on morphological features and phylogenetic analysis, *J Treat Taxa*, 12(3): 15375-15381, 2020.
16. Elsayed EA, El Enshasy H, Wadaan MAM,1 and Aziz R. Mushrooms: A Potential Natural Source of Anti-Inflammatory Compounds for Medical Applications, Hindawi Publishing Corporation *Mediators of Inflammation* Volume 2014, Article ID 805841, 15 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/805841>, 2014.
17. Hall TA. BioEdit: a user- friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41, 95-98, 1999.
18. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL and DeWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Science*, 270: 313-321, 2003A.
19. Hebert PDN, Ratnasingham S and DeWaard JR 2003b. Barcoding animal life: Cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species, *Proceedings of Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 270: 96-99, 2003b.
20. Jeppson M, Finy P and Larsson E. *Bovista hollosii* n. sp. –a new species from sand steppe vegetation in Hungary, *Phytotaxa* 268(2): 145-154, 2016.
21. Jeppson M, Larsson E and Martin M. *Lycoperdon rupicola* and *L. Subimbrinum*: two new puffballs from Europe, *Mycological Progress*, 11(4): 887-897, 2012.
22. Kasuya T, Uzawa M and Hosaka K. *Scleroderma capeverdeanum*, a subhypogeous fungus new to Japan, collected from the Eucalyptus plantation in Ibaraki Prefecture, *Truffology*, 5(1): 23-32, 2022.
23. Katock A ve Kapoor P. Recent concepts in fungal taxonomy, a review, *Journal of Agriculture and Allied Sciences*, 3:23-35, 2014.
24. Kılıçoğlu MÇ ve Özkoç İ. Fungal sistematiğe moleküler gelişmeler, *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 23(1):65-72, 2008.
25. Krueger D, Binder M, Fischer M and Kreisel H. The Lycoperdales. A molecular approach to the systematics of some gasteroid mushrooms, *Mycologia*, 93, 947-957, 2001.
26. Kumla J, Suwannarach N, Bussaban B and Lumyong S. *Scleroderma suthepense*, a new ectomycorrhizal fungus from Thailand, *Mycotaxon*, 123: 1-7
27. Larsson E and Jeppson M 2008. Phylogenetic relationships among species and genera of Lycoperdaceae based on ITS and LSU sequence data from North European taxa. *Mycol.Res.*, 113(Pt1):4-22, 2013.
28. Lipscomb, D. Basics of cladistic Analysis. Available

from www.gwu.edu/~clade/faculty/lipscomb/Cladistics.pdf, 1998.

29. Maniatis T, Fritsch E. F, Sambrook J. Molecular cloning. — New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
30. Niego, A.G.; Rapior, S.; Thongklang, N.; Raspé, O.; Jaidee, W.; Lumyong, S.; Hyde, K.D. Macrofungi as a Nutraceutical Source: Promising Bioactive Compounds and *Market Value*. *J. Fungi* 2021, 7, 397. <https://doi.org/10.3390/jof7050397>
31. Ortiz-Rivero J, Watling R, Guzman-Davalos L and Martin MP. The mant rooted earthball-*Scleroderma geaster* and *S. polyrhizum* revisited, with the description of a new species, *Phytotaxa*, 510(1): 1-17, 2020.
32. Palmer JM, Lindner DL and Volk TJ. Ectomycorrhizal characterization of an American chestnut (*Castanea dentata*)-dominated community in Western Wisconsin, *Mycorrhiza*, 19(1): 27-36, 2008.
33. Park, C.H., Kim, H.W., Uhm, C.S. (2016) How to Get Well-Preserved Samples for Transmission Electron Microscopy. *Applied Microscopy* 46,188-192.
34. Phosri C, Martin MP, Watling R, Jeppson M and Sihanonth P. Molecular phylogeny and re-assessment of some *Scleroderma* spp. (gasteromycetes, An. Jard. Bot. Madr., 66(S1): 83-91, 2009.
35. Posada D. jModel test: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253-1256, 2008.
36. Raja HA, Baker TR, Little JG and Obelies NH. DNA barcoding for identification of consumer-relevant mushrooms: A partial solution for product certification? *Food Chemistry*, 214: 383-392, 2017.
37. Raut JK, Poudel RC, Shrestha R and Basukala O. *Scleroderma nastii* sp. nov., a gasteroid mushroom from Phulchoki hill, Nepal, *Studies in Fungi*, 5(1): 50-58, 2020.
38. Sambrook J and Russell D. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 3th Edition, 2001.
39. Sanon KB, Ba AM, Delaruella C, Duponnois R and Martin F. Morphological and molecular analysis in *Scleroderma* species associated with some Caesalpinoid legumes, Dipterocarpaceae and Phyllanthaceae trees in Southern Burkina Faso, *Mycorrhiza*, 19(8): 571-584, 2009.
40. SesliE , Denchev, CM. Checklists of the myxomycetes, larger ascomycetes, and larger basidiomycetes in Turkey. *Mycotaxon*, 106: 65-67.
41. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiski A , Kumar S. *Molecular Biology and Evolution*

30:2725-2729, 2008, 2013.

42. Thompson, R.F., Walker, M., Siebert, C.A., Muench, S.P., Ranson, NA. (2016) An introduction to sample preparation and imaging by cryo-electron microscopy for structural biology. *Methods* 100, 3-15.
43. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 15;25(24):4876-82, 1997.
44. Truong C, Mujic AB, Healy R, Kuhar F. How to know the fungi: combining field inventories and DNA-barcoding to document fungal diversity, *New Phytol.* 214 (3): 913-919, 2017
45. White TJ, Burns T, Lee S and Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, San Diego, CA, Academic Press, 1990.
46. Zhang CX, Xu X, Liu J, He MX, Wang Y and Ji KP. *Mycotax*, 125: 193-200
47. Zhang N, Luo J and Bhattacharya D. Advances in Fungal Phylogenomics and Their Impact on Fungal Systematics, *Advances in Genetics* 100: 309-328, 2013, 2017.
48. Zhou LW. Systematics is crucial for the traditional Chinese medicinal studies and industry of macrofungi, *Fungal Biology Reviews*, 34:10-12, 2020.
49. Zhao RL, Li GJ, Sanchez-Ramirez S, Stata Z, Wu G, Dai YC, He SH, Cui BK, Zhou JL, Wu F, He MQ, Moncalvo JM and Hyde KD 2017. A six phylogenetic overview of Basidiomycota and allied phyla with estimated times of higher taxa and a phyloproteomics perspective, *Fungal Diversity*, 84: 43-74. DOI 10.1007/s13225-017-0381-5, 2017.

ÖZ GEÇMİŞ

Amir SAGHAFIAN, Tabriz Ostad shahriyar Lisesi'ni bitirdikten sonra Shahid chamran Üniversitesi Fen Fakültesi, Genetik bölümünden 20.01.2010 tarihinde mezun olmuştur. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı programına girdiği yüksek lisans çalışmasını 19.07.2013 tarihte bitirmiştir, 03.09.2014 Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde doktora programına başlamıştır.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0003-4774-5862.

Yayımlar:

1. Taskin M., Ortucu S., Unver Y., Arslan N.P., Algur O.F., and Saghafian A. L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* MBG-10 using starch-rich waste loquat kernels as substrate. *Starch* 2013;65:322–329.
2. Taskin M., Saghafian A., Aydogan M.N. , Arslan N.P. Microbial lipid production by coldadapted oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* B9 in non-sterile whey medium.10.1002/bbb.156