

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Gölcihan GÜZELDAĞ

**“POLYPORACEAE” TÖRLERİNDE (*Ganoderma* spp.,ve *Trametes* spp.)
ÜRETİM VE BİYOTEKNOLOJİK OPTİMİZASYON OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2007

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**“POLYPORACEAE” TÜRLERİNDE (*Ganoderma* spp.,ve *Trametes*
spp.) ÜRETİM VE BİYOTEKNOLOJİK OPTİMİZASYON
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Gülcihan GÜZELDAĞ

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez/...../2007 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.**

İmza.....
Prof. Dr. Ömer ÇOLAK
Danışman

İmza.....
Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Üye

İmza.....
Prof. M. Macit İLKİT
Üye

İmza.....
Prof. Dr. Haluk SORAN
Üye

İmza.....
Prof. Dr. Ali Kerim ÇOLAK
Üye

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür**

Bu Çalışma Ç.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FEF2005D1

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

“POLYPORACEAE“ TÜRLERİNDE (*Ganoderma* spp.,ve *Trametes* spp.) ÜRETİM VE BİYOTEKNOLOJİK OPTİMİZASYON OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Gülcihan GÜZELDAĞ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Ömer ÇOLAK
Yıl: 2007, Sayfa:133
Jüri : Prof. Dr. Ömer ÇOLAK
Prof. Dr. Haluk SORAN
Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Prof. Dr. M. Macit İLKİT
Prof. Dr. Ali Kerim ÇOLAK

Polyporaceae familyası üyelerinden *Ganoderma lucidum* ve *Trametes versicolor* medikal anlamda önemli mantarlardır. Bu çalışmada ilk basamak olarak *Ganoderma lucidum* (Türk basidiomiset izolat) Japonya ve Çinde uygulanan geleneksel kültür metodlarına adapte edilen gelişmiş kültür koşulları kullanılarak araştırılmıştır. Bu çalışma ayrıca izolatın daha iyi gelişim gösterdiği kontrollü çevre koşullarını da irdelemiştir.

İkinci basamak olarak 4 basidiomiset grubu mantarın moleküler filogenetik analizleri ITS, 5.8S rDNA nükleotid sekans analizleri yapılarak çalışılan izolatların temel taksonomik sınıflandırılması yapılmıştır. Analiz sonuçları 4 grup mantar belirlemiştir. Bunlardan ikisi *Ganoderma* cinsine benzerlik göstermekte ve tür bazında *Ganoderma lucidum* ve *Ganoderma applanatum* benzemekte iken diğer iki izolatın *Trametes* cinsine benzerlik gösterdiği ve tür bazında birinin *Trametes versicolor*'a diğerinin ise subspecies düzeyinde farklılık göstermesi sebebiyle sadece cins düzeyinde *Trametes* spp. şeklinde ele alındığı bildirilmiştir.

Üçüncü basamak olarak *G. lucidum* ile *G. applanatum* arasında ve *Trametes versicolor* ve *Trametes spp.* arasında interspesifik hibridizasyon, protoplast tekniği kullanılarak yapılmıştır. Protoplast izolasyonu ve misel rejenerasyonu açısından değerlendirilen besiyerlerinden en fazla verimlilik MCMM besiyerinde gözlenirken litikaz en iyi litik etkili enzim ve mannitolde en iyi ozmatik stabilizör şeklinde ve bunlara bağlı füzyon frekansı 0.030 % şeklinde tespit edilmiştir.

Protoplast rejenerasyonu ile elde edilen hibritlerin heterokaryon olup olmadıkları incelenmiş ve rejeneratif kolonilerin bütün parental özellikleri aynı anda göstermediği tespit edilmiştir. Heterokaryonların hibrit olduklarından emin olmak için parental izolatlar ile fusantların esteraz izozim kalıpları tanımlanmıştır. İzolatlara (*Ganoderma sp.* ve *Trametes sp.*) ait elektroforetik kalıplarda yapılan incelemede fuzantlarda 1 yada iki parental bant teşhis edilmiştir.

Anahtar Kelimeler:Polyporaceae, *Ganoderma lucidum*, protoplast, ITS, 5.8 S

ABSTRACT

PhD THESIS

PRODUCTION OF THE “POLYPORACEAE” MEMBERS (*Ganoderma* spp., *Trametes* spp.) AND THE BIOTECHNOLOGICAL PROCESS CAPABILITIES

Gülcihan GÜZELDAĞ

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE
UNIVERSITY OF CUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. Ömer ÇOLAK
Year: 2007 Pages:133
Jury : Prof. Dr. Ömer ÇOLAK
Prof. Dr. Haluk SORAN
Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Prof. Dr. M. Macit İLKİT
Prof. Dr. Ali Kerim ÇOLAK

Polyporaceae family members especially *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolors* are important for their medical properties. In this study for the first step *Ganoderma lucidum* (Turkish basidiomycetes isolate) is being searched using extensive cultivation systems adapted the traditional growing methods developed in Japan and China. This research also focuses on indoor techniques which permit better environmental control for the isolate. The second step, molecular data analyses of four basidiomycete isolate are studied using molecular phylogenetic techniques by the nucleotide sequences of ITS-5.8S regions of rDNA to establish the basic taxonomy of the isolates. The analysis resulted in the emergence of four major clades. Two of the clades belonged to the *Ganoderma* and similar to *Ganoderma lucidum*, and *Ganoderma applanatum* the third clade was belonged to *Trametes* and similar *Trametes versicolor* and finally the fourth clade was belonging to the *Trametes* sp.. but similarity for the subgenus could not recognized. For the third step interspecific hybridization between *G. lucidum* and *G. applanatum*, and *Trametes versicolor* and *Trametes* sp.. were studied using protoplast technique. To establish conditions for the protoplast isolation and regeneration of the mycelia of the isolates, various enzymes and osmotic stabilizers were examined. Among different media MCMM medium was found to be the best for colony growth. Lyticase was the best lytic enzyme and mannitol was the best osmotic stabilizer with the fusion frequency in the range of 0.030 %. Protoplasts from various hybrids were released and regenerated to determine whether they were heterokaryons. In all regenerated colonies, both parental types could not be recovered at the same time. For being sure for the fourth step isozyme analysis up to esterase isozyme was determined with the parental isolates and fusants. The electroforetic bands of the (*Ganoderma* sp.. and *Trametes* sp..) fusants showed whether one or two parental esterase bands.

KeyWords Polyporaceae, *Ganoderma lucidum*, protoplast, ITS, 5.8 S

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Günümüz koşullarında doğal ortamlardan izole edilmiş ürünlerin sağlık amacıyla giderek artan yoğunlukta kullanıldığı göz ardı edilemez. Bu konuda gerek bitkisel kaynaklı bileşikler gerekse mantarlardan elde edilen ürünlerin sayısı oldukça fazladır. Bunların gelişi güzel kullanımları ve bunlardan doğabilecek zararlı sonuçların bertaraf edilebilmesi için kapsamlı olarak çalışılması ve varsa toksik etkilerinin ortaya çıkarılması bilimsel ahlakta üstümüze düşen roldür.

Bu anlamda çalışmamın adını koyarak bana bu yönde araştırma fırsatı veren danışmanım Prof. Dr. Ömer Çolak’a, yapıcı eleştirilerinden dolayı Prof. Dr. Burhan Arıkan’a ve Prof Dr. Sadık Dinçer’e, çalışmamın her aşamasında ilgilerini eksik etmeyen sayın Doç. Dr. Hatice Korkmaz Güvenmez’e teşekkür ederim.

Bir insanın sahip olabileceği en değerli varlıklara aileme:

Babacım, annecim, Sena, Ahmet ve Seda sizin gibi bir aileye sahip olduğum için kendimi çok şanslı sayıyorum.

Desteğinize ve varlığınıza şükürler olsun...

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	; santigrat celcius
AMPS	; amonyumpersülfat
bp	; baz çifti
CaCl ₂	; kalsiyumklorür
CuSO ₄	; bakırsülfat
CYM	; completely yeast medium
EDTA	; etilendiaminotetrasetikasit
F&R	; Fahraeus ve Reinhammar
FeSO ₄	; demirsülfat
GCM	; <i>Ganoderma</i> complete medium
GPD	; gliseraldehit-3-fosfatdehidrogenaz
HPLC	; high performance liquid chromatography
ITS	; internal transcribed spacer
K ₂ HPO ₄	; dipotasyumhidrojenfosfat
kb	; kilobaz
kDa	; kilodalton
KH ₂ PO ₄	; potasyumdihidrojenfosfat
MCM	; mushroom complete medium
MCMM	; mushroom complete mineral medium
Mg ₂ SO ₄	; magnezyum sülfat
MgSO ₄	; magnezyum sülfat
MMM	; mushroom minimal medium
MnCl ₂	; manganklorür
MnSO ₄	; mangansülfat
mt SSU rDNA	; mitokondrial small subunit ribosomal DNA
mt	; mitokondrial, mitokondri
Na ₂ HPO ₄	; disodyumhidrojenfosfat
NaCl	; sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	; sodyumdihidrojenfosfat

nt	; nükleotid
NTS	; non transcribed spacer
PB	; saflaştırma tamponu
PCR Master M	; PCR örnek karışımı
PCR	; polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	; potato dextrose agar
PEG	; polietilen glikol
pM	; pikomol
PVP-40	; polivinilprolidin
RAPD	; random amplified polimorfik DNA
rDNA	; ribozomal DNA
RNAaz	; ribonükleikaz
rpm	; rapid per minute
SDS	; sodyum dodesil sülfat
SSU	; small subunit
TE	; tris-EDTA
TEMED	; tetraetilmetilendiamin
Tris HCl	; Tris hidroklorid
YCM	; yeast complete medium
ZnSO₄	; çinkoklorür

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	III
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI

1.GİRİŞ.....	1
1.1. Doğal ürün endüstrisi.....	1
1.2. Mantarlar ve diğer organizmalarla ilişkileri.....	2
1.3. Polipor gruplarının karakteristiği.....	4
1.3.1 Poliporlara ilişkin genel görüşler.....	4
1.3.2. Poliporların sınıflandırılması.....	6
1.3.3. Polyporaceae Familyasının sınıflandırılması.....	6
1.4. Basidiomycetes Mantarları.....	7
1.4.1. Medikal anlamda Basidiomycetes'ler	7
1.4.2. Basidiomycetes'lerin diğer mantarlarla ilişkisi.....	8
1.4.2.1. Basidiomycetes'lerin sınıflandırılması.....	9
1.4.2.2. Homobasidiomycetes'lerin sınıflandırılması.....	9
1.4.3. Ganodermataceae familyası.....	10
1.4.3.1. Genel düşünceler.....	10
1.4.3.2. Sınıflandırmanın tarihçesi.....	12
1.4.3.3. <i>Ganoderma</i> 'nın sınıflandırılması.....	13
1.4.3.3.1. <i>Ganoderma</i> 'nın sınıflandırma özellikleri....	13
1.4.3.3.2. <i>Ganoderma</i> 'nın sistematik karakteri.....	16
1.4.3.3.3. <i>Ganoderma</i> 'nın moleküler sistematigi.....	17
1.4.4. <i>Ganoderma lucidum</i> 'un kimyasal özellikleri ve esaslar.....	18
1.5. <i>Trametes</i> grubu.....	23

1.6. Mantar kültürlerinin uygun şekilde muhafazası ve saklanması	
önemi.....	24
1.6.1. <i>Ganoderma</i> ve <i>Trametes</i> türlerinin kültür edilmesi.....	25
1.6.1.1. Basidiokarp oluşumu için kültüre alınma.....	25
1.6.1.2. Sıvı besi ortamlarında kültüre alma.....	26
1.6.1.3. Katı besiyerlerinde kültüre alma.....	26
1.6.2. Kültür gelişim parametrelerinin incelenmesi.....	27
1.6.3. Kültür besiyerinin misel biyomas gelişimi üzerine etkisi.....	27
1.6.4. Çevrenin misel biyomas oluşumuna etkisi.....	27
1.7. Modern gelişmeler.....	29
1.7.1. <i>Ganoderma</i> ve <i>Trametes</i> sp. hakkında moleküler yaklaşımlar.....	29
1.8. Moleküler işleyiş açısından ribozomal DNA'nın önemi.....	30
1.8.1 İyi bir moleküler işleyiş için gereksinimler.....	30
1.8.2. Ribozomal DNA genlerinin yapısı.....	31
1.8.3. Filogenetik çalışmada ribozomal DNA'nın önemi.....	32
1.8.4. Internal Transcribed Spacer (ITS) Bölümleri.....	33
1.9. İzozimler.....	34
1.9.1. İzozimlere genel bakış.....	34
1.10. Transformasyon.....	36
1.10.1. Protoplast transformasyonuna genel bakış	36
1.10.1.1. Protoplast transformasyonu.....	36
1.10.1.1.(1). Hücre tipi, gelişim fazı ve gelişim koşulları.....	36
1.10.1.1.(2). Hücre duvarının litik enzimlerce muamelesi.....	37
1.10.1.1.(3). DNA'nın alınması.....	37
1.10.1.1.(4). Rejenerasyon besiyeri.....	37
1.10.1.1.(5). Lityum asetat muamelesi.....	38
1.10.2. Elektroporasyon.....	38
1.10.3. Biolistik transformasyon.....	38

1.11. Medikal mantarların biyoteknolojide yeri.....	39
1.12. Çalışmanın amacı.....	40
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	41
3. MATERYAL ve METOD.....	54
3.1. Mantar izolatları ve referans değerleri.....	54
3.2. Kültür Ortamları.....	56
3.2.1. Spawn İnokülasyonları.....	56
3.2.2. Misel İnokülasyonları.....	56
3.3. Sıcaklık.....	58
3.4. Nem.....	58
3.5. Işık.....	58
3.6. Havalandırma.....	59
3.7. Ph.....	59
3.8. Monokaryotik misel eldesi.....	59
3.9. Spor çimlenme frekansının artırılması.....	59
3.10. Enzimler.....	60
3.11. Stabilizatörler.....	61
3.12. Biyomass Eldesi.....	62
3.13. DNA İzolasyonu.....	62
3.14. Agaroz Jel Elektroforezi.....	63
3.15. DNA konsantrasyonu.....	63
3.16. PCR Amplifikasyonu için örneklerin hazırlanması.....	64
3.17. PCR Amplifikasyonu.....	65
3.18. PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi.....	65

3.19. PCR ürünlerinin saflaştırılması.....	65
3.20. DNA sekans analizi.....	67
3.21. Genetik manipulasyon çalışmaları.....	68
3.21.1. Protoplast izolasyonu.....	68
3.21.2. Protoplast füzyonu	69
3.21.3. Regenerasyon ortamı.....	70
3.22. Fusant seçimi.....	70
3.23. Misel gelişimi ve hifsel büyüklük.....	71
3.24. İzozim(Esteraz) kalıbının determinasyonu.....	71
3.25. Biyomas eldesi.....	71
3.26. NATIVE PAGE Elektroforezi.....	72
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	76
4.1. Misel gelişimi.....	76
4.2. Spawn gelişimi.....	78
4.3. Basidiokarp gelişim ortamı.....	82
4.4. pH.....	85
4.5. Monokaryotik misel eldesine yönelik bulgular.....	85
4.6. Spor çimlenme frekansının artırılmasına ilişkin bulgular.....	86
4.7. DNA ekstraksiyonu ve PCR amplifikasyonu.....	87
4.8. Dizi “Cluster” analizi ve 5.8S sekans analizi.....	92
4.9. Genetik manipulasyon çalışmalarına ait bulgular.....	97
4.9.1. Protoplast verimi açısından elde edilen bulgular.....	97
4.9.2. Fusant seçimi.....	101
4.9.3. İzozim (Esteraz) determinasyonuna ilişkin bulgular...	107
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	109
KAYNAKLAR.....	114
ÖZGEÇMİŞ.....	134

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.Çalışma sırasında kullanılan basidiomiset grubu mantarlar.....	55
Çizelge 2. Besiyeri içerikleri ve misel gelişim hızları.....	57
Çizelge 3 Çimlenme amacıyla değerlendirilen ortam, sıcaklık ve zaman.....	60
Çizelge 4 Enzimler ve temin edildikleri kaynaklar.....	61
Çizelge 5 Ozmatik stabilizatörler ve temin edildikleri firmalar.....	61
Çizelge 6 Kullanılan DNA, primer, PCR Master M.....	64
Çizelge 7 Farklı dalga boylarında ölçülen DNA miktarları.....	66
Çizelge 8 Örneklere ait DNA ve primer miktarları.....	67
Çizelge 9 NATIVE PAGE stok solüsyonları ve hazırlanışları	72
Çizelge 10 NATIVE PAGE çalışma solüsyonları.....	73
Çizelge 11 Ayırıcı jelin bileşenleri (10%).....	73
Çizelge 12 Dengeleyici jelin bileşenleri (% 5).....	74
Çizelge 13. Misel gelişim hız grafiği.....	76
Çizelge 14. Spawn ortamları, basidiokarp ve net ağırlık (g).....	81
Çizelge 15 Meyve verimlilikleri (g).....	81
Çizelge 16. Farklı pH aralıklarında misel gelişim hızı (cm/gün).....	85
Çizelge 17. Spektrofotometrik bulgular.....	89
Çizelge 18. Protoplast oluşumu için kullanılan enzimler, protoplast değerleri ve protoplast oluşum yüzdeleri.....	98
Çizelge 19. Ozmatik stabilizatörler ve rejenerasyon sıklığı.....	98
Çizelge 20. YCM besiyerinde gelişen ana ve hibrit misel gelişim hızları.....	104
Çizelge 21. Basidiomiset gelişim hızı	105

Şekil 1. <i>Ganoderma lucidum</i> spor yapısı (elektron mikroskobu).....	11
Şekil 2. <i>Ganoderma lucidum</i> hif yapısı (elektron mikroskobu).....	13
Şekil 3. <i>Ganoderma lucidum</i> basidiokarp yapısı (Spawn ortamında).....	14
Şekil 4. <i>Ganoderma lucidum</i> basidiokarp yapısı.....	14
Şekil 5. <i>Ganoderma lucidum</i> basidiokarpı (dilimlenmiş parçalar halinde)....	15
Şekil 6. <i>Ganoderma lucidum</i> (tablet halinde).....	15
Şekil 7. A) ITS lokasyonunu gösteren rDNA gen organizasyonu, B) A da daire içine alınan kısmın büyütülmüş şekli.....	33
Şekil 8. Spawn oluşumu (Buğday ortamı).....	78
Şekil 9. Deformasyon gösteren <i>G. lucidum</i> basidiokarpları.....	83
Şekil 10. Düzgün gelişim morfolojisi gösteren <i>G. lucidum</i> basidiokarpları...	85
Şekil 11. Monokaryotik misel (ışık mikroskobu (×40)).....	86
Şekil 12 Agaroz jel, Ethidium bromid ile boyanmış ve 302 nm ultraviyole ışığı altında görüntülenerek fotoğraflanmış.	88
Şekil 13. PCR sonrası 0.8 % Agaroz jel elektroforezinde örneklerin yürütülmesi sonucu oluşan bantlaşma.....	90
Şekil 14. Taksonomik açıdan önem arz eden mantar ribozom DNA'larına ait önemli sekanslar.....	92
Şekil 15. <i>G. lucidum</i> elektroferogram grafiği.....	95
Şekil 16. <i>G. applanatum</i> elektroferogram grafiği.....	96
Şekil 17. <i>T. versicolor</i> elektroferogram grafiği.....	97
Şekil 18. <i>Trametes sp.</i> elektroferogram grafiği.....	97
Şekil 19. <i>G. lucidum</i> × <i>G. applanatum</i>	99
Şekil 20. <i>Trametes versicolor</i> × <i>Trametes sp.</i>	99
Şekil 21. <i>G. lucidum</i> × <i>G. applanatum</i>	100
Şekil 22. <i>Trametes versicolor</i> × <i>Trametes sp.</i>	100
Şekil 23. Uyumlu monokaryotik izolatlar (<i>Ganoderma sp.</i>).....	102
Şekil 24. Uyum göstermeyen monokaryotik izolatlar (<i>Ganoderma sp.</i>).....	102
Şekil 25. <i>Trametes sp.</i> mutantlarının uyumlulukları.....	103

Şekil 26. <i>Ganoderma sp.</i> hibriti (×3).....	106
Şekil 27. <i>Trametes sp.</i> hibriti (×3).....	106
Şekil 28. Nativ PAGE elektroforezi 1- <i>G. lucidum</i> , 2- <i>G. applanatum</i> , 3- <i>T. versicolor</i> , 4- <i>Ganoderma sp.</i> hibriti, 5- <i>Trametes sp.</i> , 6- <i>Trametes sp.</i> hibriti.....	107

1.GİRİŞ**1.1. Doğal ürün endüstrisi**

Özellikle son 30 yılda gerek doğal ürünler gerekse bitkisel kaynaklı ilaç endüstrisi ürünlerine olan rağbet artış göstermiştir (Hamburger ve Hostettmann, 1991; Su ve ark., 1997).

Geleneksel anlamda özellikle Asya da uzunca bir süredir kullanılan bitkisel kaynaklı ilaçların tedavi süreçlerine olumlu etkilerinin görülmesi bu anlamda değerlerinin artmasına neden olmuştur (Elvin-Lewis, 2001).

Günümüzde patojenik organizmalara karşı immün sistemi stimule edici özelliklere sahip bir çok ürünün ticari olarak satışı yapılmaktadır (Swartz, 2000;van der Waaij ve Nord, 2000; McGowan, 2001; Lipsitch ve Samore, 2002)

Klinikte kullanımları açısından faydalı birçok ilaç, doğal ürünlerden elde edilebilmektedir (Shu, 1998). Her yıl en azından 2 yada 3 antibiyotiğin mikroorganizmalardan temin edildiği bildirilmiştir (Clark, 1996), ayrıca antitümör ve antienfektif ajanların neredeyse 60 %'ının doğal ürün kökenli olduğu bildirilmiştir (Cragg ve ark., 1997).

Günümüzde doğal kaynaklı ürünlerin araştırılması amacıyla farmakolojik çalışmalar yapan birçok laboratuvar mevcuttur. Elde edilen sonuçlar harcanan zaman ve emeğin boşa çıkmadığı yönündedir (Farnsworth, 1994).

Filamentöz mantar gruplarının birçoğu ikincil metabolit üretmeleri açısından ve bu metabolitlerin terapötik ajan şeklinde işlevselliği olması yönünden önemlidir. Filamentöz mantarlardan elde edilen en önemli bileşiklerin başında β -laktam antibiyotikleri ve statin (antihiperkolesterol) kökenli ilaçlar gelir. Penisilin, Sir Alexander Fleming tarafından 1920'li yıllarda *Penicillium* türlerinden elde edilmiş ilk antimikrobik ilaç olma özelliğini gösterir (Fleming, 1929). Bu başarı aynı zamanda başka antibiyotiklerin ve terapötik bileşiklerin eldesi yönünde kaynak niteliği teşkil etmiştir. Penisilin günümüzde hala kullanılan en kuvvetli ve en az toksik etkili antibiyotik olarak ifade edilmektedir (Demain ve Elander, 1999).

Statinler, ilaç olarak değerlendirilen, önemli doğal ürün kaynaklı bileşiklerdir. Bunlarda hiperkolesterol, koroner kalp yetersizliği gibi risk gruplarının indirgenmesinde önemli roller üstlenirler (Shu, 1998; Quinn, 1999). Bilinen ilk statin, mevastatin (kompaktin), *Penicillium* mantarından elde edilmiştir (Endo ve ark., 1976a, 1976b). Takip eden çalışmalarda *Aspergillus terreus*'dan izole edilen lovastatin, aktif analog gruplar şeklinde türevlenen pravastatin ve simvastatin izole edilmiştir (Haruyama ve ark., 1986; Hoffman ve ark., 1986).

Artan dünya nüfusu ile birlikte problemlerde giderek artmaktadır. Gerek yiyecek ihtiyacının karşılanması gerek tıbbi anlamda yeni atılımların ortaya çıkması açısından doğal endüstrinin ve bu sayede yeni kaynakların gerekliliği göz ardı edilemeyecek şartlardandır.

1.2. Mantarlar ve diğer organizmalarla ilişkileri

Geçmişte bitkiler alemine dahil edilen ve bu anlamda incelenen mantarlara ilişkin düşünceler 1969'da Whittaker'in mantar sistematigi değerlendirmeleriyle yeni bir boyut kazanarak geleneksel anlayıştan uzaklaşmıştır. Buna göre hücre duvar yapılarından kaynaklanan farklılıklar, absorpsiyon ihtiyaçları, vücut morfolojilerindeki farklılık, üreme davranışları gibi temel özelliklerin belirlendiği bu değerlendirme daha gerçekçi bir yaklaşım olmuştur. Whittaker organizmaları beş aleme ayırmış ve bu alemleri Monera, Protista, Hayvanlar, Bitkiler ve Mantarlar şeklinde isimlendirmiştir. Monera alemi nükleer membrandan yoksun prokaryotik hücre gruplarını içermektedir. Protista, prokaryotik hücrelerden oluşmuş tek veya koloni şeklinde uniselüler organizmalardan oluşan ökaryotik hücre gruplarını ifade eder. Diğer 3 temel ökaryotik multiselüler yapıdaki gruplar hayvanlar, mantarlar ve bitkiler şeklinde sıralanmıştır. Sınıflandırma da temelde fotosentez, absorpsiyon ve biyokimyasal metabolik yollar gibi temel kriterler baz alınarak protistlerden ökaryotik gruplara kadar gelişim düzey ve basamakları benzerlik yada farklılıklar göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir (Whittaker, 1969).

1987'lere gelindiğinde Cavalier ve Smith isimli iki araştırmacı mantarların bazı hayvan gruplarıyla benzeştiğini özellikle choanoflagellat gruplarıyla aynı

atadan geldiklerini ileri sürmüşler ve teori her iki grubunda yassı, diskoidal olmayan benzer mitokondria yapıları gibi organik benzerliklerine dayandırarak pekiştirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar hayvanlarla mantarların sadece bu yönleriyle değil ayrıca benzer kitinolitik ekzoiskelet yapıları, nişasta yerine glikojen depo etmeleri, kloroplastlardan yoksun olmaları ve bitkilerin tersine aynı hayvanlarda olduğu gibi UGA kodonunu triptofan aminoasidi için zincir terminasyonunda kullanıyor olmaları gibi yönlerden de benzeştiklerini göstermiştir (Baldauf ve Palmer, 1993; Wainright ve ark., 1993).

Yakın zamanda yapılan ve ökaryotik grupların nükleer SSU rDNA'larına ait 214 sekans analizi, hayvanlar, mantarlar, bitkiler ve protozoa'ya ait çok geniş gruplar ile gerçek mantarların doğal sınıflandırma basamaklarında ascomycetes, basidiomycetes, chytridiomycetes, zygomycetes'ler içinde yer alması gerektiğini ortaya çıkarmıştır. Bu durum istatistiksel analiz sonuçlarıyla da desteklendirilmiştir (Kumar ve Rzhetsky, 1996).

Whittakerin sistematik değerlendirmeleri gerek Oomycetes ve küf mantarlarını içermesi gerekse mantar taksonomisinin polifiletik değerlendirilmesi gerektiğini organizmaların ultrastrüktürel ve moleküler sekans analizlerinin gerekliliğini vurgulaması açısından önemlidir. Ayrıca yapılan çalışmalar Oomycota ve küf mantarlarının Protista grubu içinde yer alması gerektiğini ortaya çıkarmıştır (Cavalier-Smith 1987; Föster ve ark., 1990).

Choanoflagellat türlerinin bazılarında gerçek mantarlar ve hayvan grupları arasında değerlendirilmesi gerektiği bildirilmiştir (Wainright ve ark., 1993; Kumar ve Rzhetsky, 1996). Ama pratikte choanoflagellatların hayvanlarla çok yakın ilişkiler içersinde olduklarına dair somut kanıtlar mevcut değildir. Fakat hayvanlar ve mantar gruplarının benzer karakter ve biyokimyasal özellikler taşımaları aynı veya benzer atadan gelmiş olabilecekleri iddialarını destekler niteliktedir (Cavalier-Smith, 1987; Kumar ve Rzhetsky, 1996).

1.3. Polipor gruplarının karakteristiği**1.3.1 Poliporlara ilişkin genel görüşler**

Polipor grubu mantarlar gerek kozmopolit yapıları gerekse koleksiyon değerleri açısından oldukça önemli mantar gruplarıdır.

19. yüzyıldan beri poliporları içeren mantar tanımlamalarına yönelik çalışmaların temeli mantarların sahip oldukları himenofor (himenyum) yapısının morfolojisine dayanmaktadır (Ryvarden, 1991). Himenoforu açık konumlu olan mantar grupları Hymenomycetes sınıfı içinde ele alınmış ve 2 takım halinde incelenmiştir. Bunlar lamelli yapı gösteren Agaricales ve Polypor yapısına sahip Aphyllophorales'tir. Kapalı himenofor yapısı sergileyen diğer mantar grupları Gasteromycetes sınıfı içinde incelenmektedir. 19. yüzyılın sonunda sadece himenofor konumuna göre yapılacak bir değerlendirmenin sistematik yapılandırma açısından yeterli olamayacağı fikri ağırlık kazanmaya başlamıştır (Donk, 1964).

Aphyllophorales takımında poliporlar genel olarak poroid himenofor içerirler. Teknolojinin gelişimine paralel olarak daha iyi mikroskoplarla çalışılmaya başlanması polipor ve diğer grupların tanımlanmalarını sağlamıştır. Bu tarz çalışmalar mikromorfolojik karakterlerinde irdelenerek mikologlara hif sistemleriyle ilgili önemli bilgiler vermiştir (Corner, 1983). Polipor grubu mantar sistematigi açısından basamak ödevi gören bu tarz çalışmalar yeni teoriler oluşturulması ve uygulama perspektiflerinin gelişime açık olması açısından da ayrı bir öneme sahiptir.

Günümüzde yapılan sınıflandırma analizleri bu anlamda taksonomik değerlendirmelerin daha komplike olduğu düşüncesini getirmektedir. Çalışmalar özellikle karakterlerdeki yeni özelliklerin ortaya çıkmasını sağlamış ve kimyasal reaksiyonlar, meydana getirilen çürük tipi, kültür karakteri gibi özelliklerin de sınıflandırmada değerlendirilmesi gerektiğini ortaya çıkarmıştır (Gill ve Steglich., 1987).

Poliporların ayırt edilmesinde kimyasal reaksiyonlar ve renk farklarının çoğu zaman önemli yer tuttuğuna yönelik ortaya atılan fikirler çoğu zaman genel geçer bir yaklaşım içersinde ele alınmıştır. Bununla birlikte bazı karakterler polipor

sınıflandırması için irdelenerek gözden geçirilmiş ve örneğin bipolar/tetrapolar heterotallik yapı gibi, uyum özellikleri gruplandırma açısından önem teşkil etmiştir (Ryvarden, 1991).

Morfolojik açıdan benzeyen türler ve biyolojik türlerin kısmi olarak irdelenmesi açısından interfertilite testleri gruplandırma için başarılı sonuçlar verebilmektedir. Türlerden bazılarının homokaryonlarının birbiri arasında yapılan uyumluluk analizleriyle interfertil olmamaları ayırt edici kriterlerdendir (Macrae, 1967; Magasi, 1976).

Saprofit yada parazitik yaşam formu göstermeleri de poliporların gruplandırılmaları açısından önemli bir karakterdir. Yapılan çalışmalar beyaz ve kahverengi çürük mantarları şeklinde 2 grup altında toplanmaları gerektiği üzerinedir. Bunun temel nedeni ağaçta meydana getirdikleri deformasyon şekliyle doğrudan alakalıdır. Beyaz çürük mantarları selüloz ve ağaç üzerindeki bütün hücre duvar komponentlerini parçalayan (lignin parçalayıcı) enzim sistemlerine sahiptirler. Ekstraselüler fenoloksidaz içerirler ve tannik asit ile gallik asitten oluşmuş besi ortamlarında pozitif oksidaz reaksiyonu verirler. Diğer taraftan kahverengi çürük mantarları ağaçlardan selüloz ve hemiselülozu ayrıştırırlar, ekstraselüler fenoloksidaz üretmez ve tannik asit ile gallik asitten oluşmuş besi ortamlarında negatif oksidaz reaksiyonu vermeleriyle ayırt edilirler. Görülme sıklığı açısından da kahverengi çürük mantarlarına, beyaz çürük mantarlarından daha az (6 %) rastlanır (Ryvarden, 1991).

Günümüzde mikoloji alanında uygulanan moleküler tercihler poliporları da içeren mantar gruplarının potansiyel karakterlerinin ortaya çıkarılmasını sağlayarak sağlıklı bir sınıflandırma anlayışını getirmiştir. Polipor grubu mantarlar Aphyllophorales grubu içinde en fazla kültüre alınan gruplardandır. Bu yüzden tür bazında birçok çalışma yapılmış ve kültür karakterleri irdelenmeye çalışılmıştır (Yao ve ark.,1977; Hibbet ve Donoghue, 1995; Hibbet ve ark., 1997; Boidin ve ark., 1998; Ko ve Jung, 1999a, 1999b).

Yaşam formlarının kategorize edilerek büyük oranda bağımsız verilerin elde edilmesi açısından mevcut karakterlerin irdelenmesi şarttır. Bu anlamda DNA sekanslarına dayalı filogenetik analizler sadece polipor grupları için değil aynı

zamanda tüm yaşam formları açısından evrim basamakları ve gelişimleri konusunda informasyonların eldesi açısından önemlidir. Polyporaceae familyası Aphyllophorales takımı içinde çeşitlilik içeren bir gruptur. Bu yüzden Polyporaceae alt gruplara ayrılmalı ve Aphyllophorales takımının diğer üyeleriyle ilişkileri daha netlikle araştırılmalıdır (Hibbet ve ark., 1997).

1.3.2. Poliporların sınıflandırılması

1.3.3. Polyporaceae Familyasının sınıflandırılması

Her ne kadar polipor terimi poroid himenofor yapısına sahip mantarları ifade etsede bu gruba giren mantarların yeri ve sınırları uzun süre belirsizliğini korumuştur. Patouillard'ın (1900) Hymenomycetes hakkında geçerli sayılan ilk sınıflandırma verileri bu doğrultuda kaynak ödevi görmüş ve sonraki çalışmalara ışık tutmuştur. Daha sonraları Donk'un (1964) Polyporaceae familyasına ilişkin yaptığı çalışma Polipor grublarının tespiti ve sistematigi açısından temel kaynak niteliği oluşturmuştur. Yapılan sınıflandırma da sadece benzerlik yada farklılıklara göre değil aynı zamanda evvelce belirtilmiş özellikleri taşıyıp taşımama durumuna göre kritiklere yer verilmiş ve por yapısı gösteren jenerasyonlar Bondarzewiaceae, Coniophoraceae, Corticiaceae, Echinodontiaceae, Fistulinaceae, Ganodermataceae, Hericiaceae, Hymenochaetaceae, Polyporaceae ve Thelephoraceae, familyaları şeklinde gruplandırılmıştır.

20. yüzyılın sonlarına gelindiğinde poroid yapıdaki benzerlik ve farklılıklar tekrar ele alınarak 10 yerine 9 takım halinde değerlendirilmelerinin daha doğru olacağı sonucuna varılmış ve bu takımlar Cantharellales, Bondarzewiales, Thelephorales, Polyporales, Coriales, Fomitopsidales, Perenniphorales, Ganodermatales ve Hericiales şeklinde isimlendirilmiştir (Jülich, 1981).

Ryvarden (1991) bu familyayı küçük gruplar halinde incelemenin daha gerçekçi yaklaşımlar doğuracağını bildirmiş ve bunun paralelinde yaptığı çalışmada familya üyelerini gerçek poliporlar şeklinde ifade etmiş ve küçük gruplar halinde detaylandırarak kanca yapılarının olup olmaması, neden oldukları çürük tipi, spor

morfolojisi, meyve karakteri, hif yapısı, mikromorfoloji gibi birçok özelliği irdeleyerek 11 alt gruba ayırmıştır. Bu gruplar *Polyporus*, *Trametes*, *Daedalea*, *Laetiporus*, *Rigidoporus*, *Tyromyces*, *Junghunia*, *Perenniporia*, *Fomes*, *Nigroporus* ve *Grammothela*'dır. Bunlar içinde sadece *Daedalea* ve *Laetiporus* grupları kahverengi çürük yapan mantarlardır. Ryvarden'in sınıflandırma anlayışı grupların moleküler filogenetik analizlerine, mitokondriyal SSU rDNA sekansı verilerine dayandığı için ayrı bir öneme sahiptir (Hibbet ve Donoghue, 1995). Örneğin *Laetiporus* ve *Phaeolus*, Ryvarden'in yaptığı sınıflandırmada *Laetiporus* içinde ele alınan monofiletik yapı gösteren ve *Trametes* üyeleriyle yakın ilişkili şekilde tespit edilirken *Rigidoporus* ve *Daedalea* gruplarının polifiletik olduğu belirtilmiştir. İlginç olan nokta her ne kadar yaptıkları çürük tipi, uyumlulukları ve basidiospor morfolojileri benzerlik gösterebilmekte ise de makromorfolojik yapıları, anatomi ve fizyolojik karakterlerinin farklılığıdır (Hibbet ve Donoghue, 1995).

1.4. Basidiomycetes Mantarları

1.4.1. Medikal anlamda Basidiomycetes'ler

Basidiomycetes mantarları çıplak gözle görülebilen belirgin bir şekli olan ve elle kavrayıp toplanabilen mantarlardır (Chang ve Miles, 1992).

Dünya üzerinde tahmini olarak 1.5 milyon mantar türü olduğu bunlardan yaklaşık 70.000'nin tanımlandığı düşünülmektedir (Hawksworth, 1991). Bunlardan yaklaşık 10.000 tanesi makro-mantarlar grubuna girmektedir (Kendrick, 1985). 5.000 tür yenilebilir kabul edilmekte ve yaklaşık olarak 1.800 türün de medikal öneme sahip olduğu düşünülmektedir (Chang, 1995).

Makro-mantarlar 4 grup altında incelenir. Bunlar: (1) yenilebilir, örneğin: *Agaricus*; (2) medikal, örneğin *Ganoderma*; (3) zehirli, örneğin *Amanita*; ve (4) muhtelif, özellikleri tam anlamıyla bilinmeyen mantar gruplarını içerirler (Chang, 1995). Yenilebilir mantarlardan *Agaricus* ve yenilebilir özelliği olmadığı halde medikal öneminden dolayı *Ganoderma* bu konuda en önde gelen temsilcilerdendir (Chang, 1995). Bugünlerde birçok yeni mantar türü yada bilinen mantar türlerine ait

farklı izolatlar üzerinde gerek yemeklik değerleri gerekse medikal anlamda öneme sahip olup olmamaları hakkında geniş çalışmalar yapılmaktadır (Chang, 1995). Değerli ürünler olarak nitelendirilebilecek birçok bileşik eldesi açısından Polyporaceae familyası ürünleri günümüz çalışmalarında kullanılmaktadır (Mizuno ve ark., 1995a). Mantarlardan ekstrakte edilen birçok bileşik hastalıkların tedavisinde yada önlenmesinde etkin olarak kullanılmaktadır (Chang ve Buswell, 1996).

Medikal mantarlardan izole edilen birçok ürün bulunmaktadır. Bunlar arasında özellikle karsino statik etkili 3 polisakkarit kökenli ilaç Japonyada bulunmuştur. Bunlar *Trametes versicolor*'dan elde edilen "Krestin" (PSK), *Lentinus edodes*'den temin edilen "Lentinan" ve *Schizophyllum commune*'den temin edilen "Schizophyllan"dır. Lentinan ve schizophyllan saf β -glukandır. PSK ise protein bağlayan polisakkarittir (Ooi, 2000).

Mantar kaynaklı bileşikler ve etkinlikleri üzerine günümüzde çok çalışma yapılmaktadır. Özellikle aktif bileşikler ve ekstratlarının tümör hücreleri üzerine etkinliği immün sistemi düzenleyici ve antibakteriyel özellikleri *Ganoderma* üzerine yapılan çalışmaları çoğaltmıştır (Smania ve ark., 1999; Mothana ve ark., 2000).

1.4.2. Basidiomycetes'lerin diğer mantarlarla ilişkisi

Basidiomycetes geniş ve farklı mantar gruplarından oluşur (Alexopoulos ve ark., 1996). Bu grupların bütün üyeleri basidiumdan basidiospor üretirler. Her ne kadar meyve yapısı bakımından oldukça farklı morfolojik yapı gösterebilirler 18S rDNA sekans analizleri, incelenen mantar tiplerinin monofiletik soya sahip olduklarını göstermiştir (Wilmotte ve ark., 1993). Çalışmalar Ascomycetes ve Basidiomycetes'lerin Chytridiomycetes ve Zygomycetes'lerden türevlenmiş monofiletik gruplar olduğunu ortaya koymuştur (Bruns ve ark., 1992; Wilmotte ve ark., 1993).

1.4.2.1. Basidiomycetes'lerin sınıflandırılması

Basidiomycetes üyeleri basidium morfolojisi, spor germinasyonu, ve gelişimin ilerleyen evrelerinde ortaya çıkan karakter değişimlerine göre Heterobasidiomycetes ve Homobasidiomycetes olmak üzere 2 grup altında toplanmıştır (Patouillard, 1900).

Heterobasidiomycetes üyeleri septalı yada septasız basidiaya sahip olabilmekte ve basidiosporları germinasyonu indükleyebilmektedir (Alexopoulos ve ark., 1996). Talbot, (1968) Basidiomycetesleri, Holobasidiomycetes, Phragmobasidiomycetes ve Teliomycetes olmak üzere basidial septa yapısı teşkil edip etmeme durumuna göre ayırt etmiştir.

Genel bir değerlendirme yapılacak olursa Holobasidiomycetes üyelerinin septasız basidia oluşturduğu yada mayoz sonucunda septalı hale geldiği görülmektedir. Phragmobasidiomycetes üyeleri basidiayı uzunlama yada enlemesine 4 hücreye bölünürken meydana getirmeleriyle ayırt edilebilmektedir. Teliomycetes grupları ise kalın duvarlı teliosporları ile geniş bir aralıkta değerlendirilmektedir (Alexopoulos ve ark., 1996).

18S rDNA sekans analizleri Basidiomycota'nın filogenetik olarak 2 gruba ayrıldığını göstermiştir. Bunlar Holobasidia üreten mantarlar ve Phragmobasidio üreten mantarlardır (Bruns ve ark., 1992). Yakın zamanda septalı basidia yapısına sahip bütün türlerin monofiletik olması gerektiğine ilişkin fikir de geçerliliğini yitirmiştir (Wilmotte ve ark., 1993).

1.4.2.2. Homobasidiomycetes'lerin sınıflandırılması

Homobasidiomycetes'ler aseptat basidium yapısına sahip, sporları germinasyonla direkt ilişkili olan bir gruptur. Bu grup üyeleri 2 sınıf altında incelenir. Hymenomycetes ve Gasteromycetes. Bu sınıflandırma temelde hymenophore yapısı dikkate alınarak yapılmıştır. Hymenomycetes dışı açık bir kanal yapısı arz eden himenofora sahiptir. İki takıma ayrılırlar. Lamelli bir yapı gösteren Agaricales ve polipor yapısına sahip olan Aphyllophorales. Gasteromycetes sınıfı

kapalı himenoforlardan oluşur. Bununla birlikte nükleer mitokondriyal rDNA sekanslarına yönelik filogenetik analizler Homobasidiomyceteslerin evrimlerine ilişkin bilgilerin meyve yapısı ile morfolojik olarak büyük paralellikler gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Hibbet ve ark., 1997).

Donk tarafından 1964’de yapılan bir çalışmada Aphylophorales takımı 21 familyaya ayrılmış ve şu şekilde isimlendirilmiştir. Auriscalpiaceae, Bankeraceae, Bondazewiaceae, Cantharellaceae, Clavariaceae, Clavulinaceae, Coniophoraceae, Corticiaceae, Echinodontiaceae, Fistulinaceae, Ganodermataceae, Gomphaceae, Hericiaceae, Hydnaceae, Hymenochaetaceae, Polyporaceae, Punctulariaceae, Schizophyllaceae, Sparassidaceae, Stereaceae, ve Thelephoraceae.

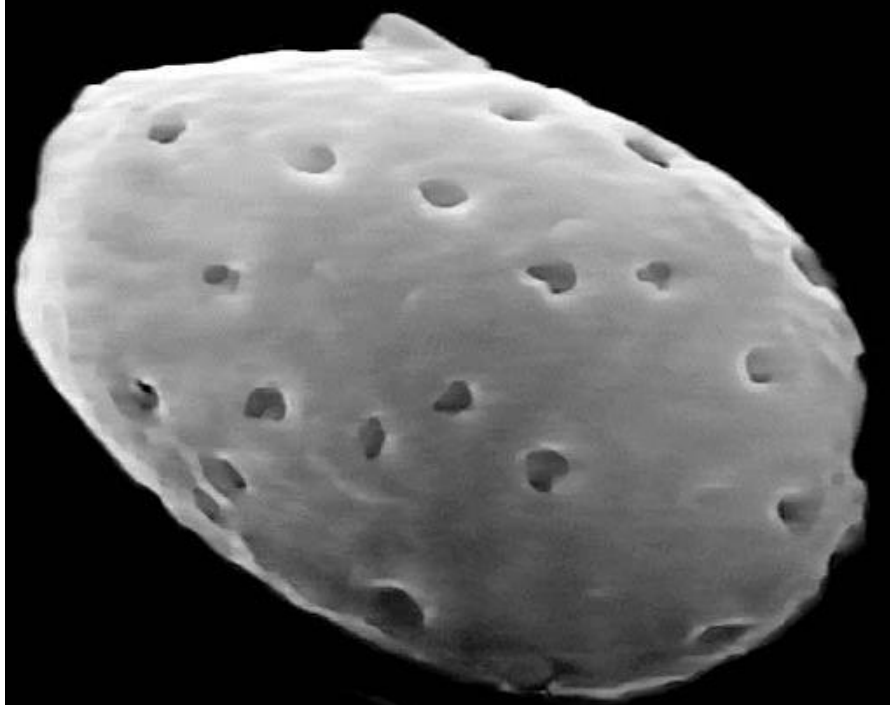
Familyaların bu şekilde bölünmeleri himenofor morfolojileri, basidia şekilleri, basidiumun genel karakteri, basidiospor morfolojileri, kanca oluşumları, ve diğer birçok kimyasal karakter yapılarındaki benzerlik yada farklılığa bakılarak tespit edilmiştir.

Hymenochaetaceae ve Ganodermataceae homojenik ve monofiletik gruplar şeklinde belirtilirken, Polyporaceae ve Corticiaceae gibi bazı familya üyelerinin heterojenik ve polifiletik gruplar şeklinde ifade edilmeleri gerektiği birçok araştırmacı tarafından daha doğru bir değerlendirme kabul edilmiştir (Donk, 1964; Jülich, 1981; Hawksworth ve ark., 1995; Alexopoulos ve ark., 1996).

1.4.3. Ganodermataceae familyası

1.4.3.1. Genel düşünceler

Ganodermataceae türleri benzersiz çift tabakalı basidiosporlara sahiptirler (Şekil 1). Basidiosporların şekli ve büyüklüğü, baş kısmının yüzey yapısı Ganodermataceae üyelerinin belirlenmesi açısından önemli özelliklerdir .



Şekil 1. *Ganoderma lucidum* spor yapısı (Adaskaveg ve Gilbertson, 1988a)

Kore, Çin ve Japonya gibi uzakdoğu ülkelerinde *Ganoderma*'nın bazı türleri tıbbi amaçlı doğal ürünler şeklinde kullanılmaktadır. Yakın zamanda *Ganoderma*'nın kullanımına ilişkin yoğun bir ilgi oluşmuştur. Çalışmalar *Ganoderma* bileşiklerinin medikal anlamda çok önemli tesirleri olduğunu göstermiştir. *Ganoderma lucidum*'dan saflaştırılan ganoderik asitlerin farnesyl protein transferaz üzerinde inhibitör etki oluşturması Ras onkoproteinini katalizlenmesini engellediğini göstermiştir. Yani ganoderik asitler Ras-onkogenine bağlı hücre transformasyonunu engellemektedir (Park ve ark., 1998).

Ganoderma tsugae'nin basidiokarp rezidülerinin deri yerine implante edilebileceğine ilişkin çalışmalar mevcuttur (Shu ve ark., 1998). *Ganoderma lucidum*'dan elde edilen polisakkaritlerin antifibrotik etkileri olduğu ve karaciğerdeki kollegen içeriğini indirgeyerek karaciğer morfolojisinin gelişimine olumlu tesir ettiği bildirilmiştir (Park ve ark., 1997). Benzer bir çalışmada doku transplantasyonunda kullanılan immün sistemi modüle edici ajanların *Ganoderma lucidum*'dan elde edilebileceği bildirilmiştir (van der Hem ve ark., 1995). İlave olarak *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma formosanum* ve *Ganoderma neo-japonicum*'un sıvı

ekstraktlarının serbest radikallerin aranmasında ve antihepatotoksik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Lin ve ark., 1995).

Ganoderma türleri sert ağaçlar ve koniferler (kozalaklı ağaç) üzerinde dünya genelinde yaygın olarak bulunabilmektedir. Beyaz çürükçül mantarlardır ve lignin kadar selülozu da ayrıştırabilmektedirler. *Ganoderma* ve benzeri çürükçüllerin bitki gövde ve köklerinde meydana getirilen zararlar bilinmektedir özellikle birçok ağaç ve ekinin yok olma tehlikesiyle karşı karşıya gelmesinde çürükçüllerin önemi büyüktür. Sevindirici nokta kağıt hamuru ve kirleticilerin parçalanması gibi endüstriyel uygulamaların birçoğunda *Ganoderma* türlerinin kullanılabilme olanaklarının fark edilmiş olmasıdır (Gottlieb ve ark., 1998).

1.4.3.2. Sınıflandırmanın tarihçesi

Ganoderma ilk defa Karsten tarafından 1881’de *Polyporus lucidus* tür ismi ile ifade edilmiştir. Bu tarihten sonra elde edilen verilerin ışığı altında Patouillard 1876’dan 1924’e kadar süren 37 senelik çalışma bütününde *Ganoderma* cinsini ele alarak bu cinse *Ganoderma lucidum*’da dahil olmak üzere birçok yeni tür ilave edilmesini sağlamıştır.

Ganoderma’nın monografisi incelendiğinde Patouillard’ın (1889) 48 tür ve 2 seksiyon dahilinde inceleme yaparak elde ettiği veriler göze çarpar. Araştırmacının *Ganoderma* ve *Amauroderma* adı altında incelediği bu iki seksiyon belirli özelliklerine göre kategorize edilmektedir. *Amauroderma* bölümüne ait üyeler hem sferik (küresel) hemde supsferik (altküresel) kalın duvarlı spor yapıları ile karakterize edilmişlerdir.

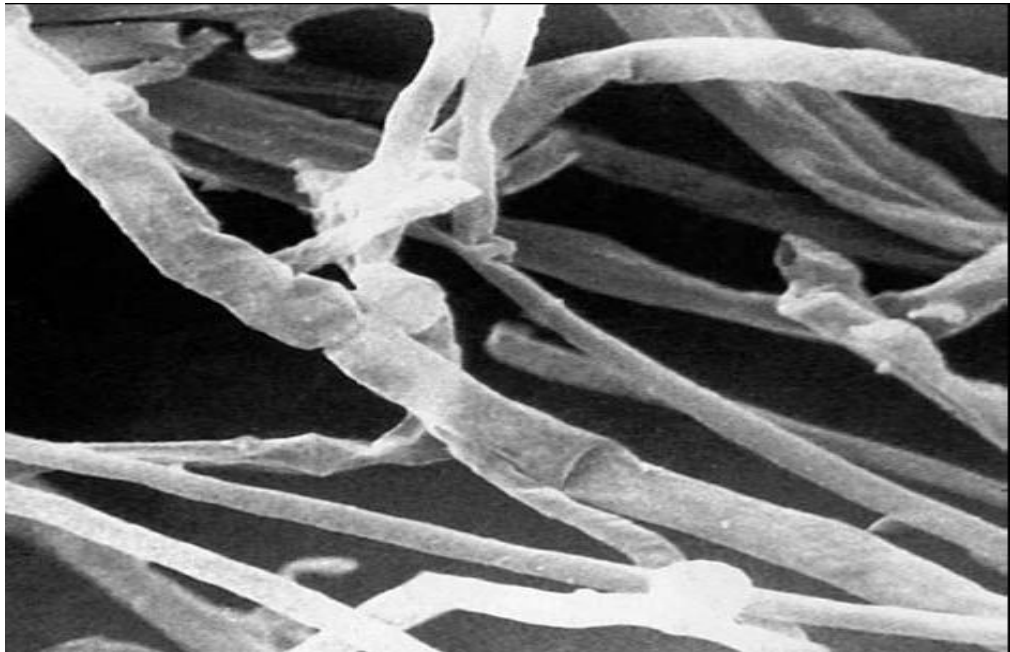
Ganodermataceae hakkında ilk veriler kalın çift duvar yapısına sahip basidiospor yapıları ile karakterize olduklarını belirtmektedir (Moncalvo ve Ryvarden, 1997). *Ganoderma* hakkında daha ayrıntılı bilgiler 1983’de Corner ve 1989’da Zhao tarafından belirtilmiş ve özellikle Asya’nın tropikal bölgeleri ve Amerika’da temin edilen izolatlardan temellendirilmiştir. Dökümsel anlamda *Ganodermataceae* familyası ile ilgili geniş değerlendirmeler bu familyaya ait 386 tür olduğunu ve bunlardan 336 tanesinin geçerli kabul edilmesi gerektiğini buna karşın

geriye kalan 50 tanesinin doğru kabul edilemeyeceği yönünde olmuştur. Kabul edilen 336 ismin 116 tanesinin de sinonim olduğu belirtilmiştir (Moncalvo ve Ryvarden, 1997).

1.4.3.3. *Ganoderma*'nın sınıflandırılması

1.4.3.3 1. *Ganoderma*'nın sınıflandırma özellikleri

Ganoderma türleri mantarlar alemine dahil, Basidiomycota bölümünden Homobasidiomycetes sınıfına mensup, Aphyllophorales takımından Polyporaceae familyasına (Ganodermataceae) giren *Ganoderma* cinsidir (Chang, 1995; Wasser ve Weis, 1999a). Polyporaceae familyasına ait mantar grupları basidiokarplarının alt yüzlerinde sporlar içeren küçük delikli yapılar arz etmeleriyle karakterize olmaktadır. Ağaçsı, kalın deriyi andıran vücut yapıları ve porlarıyla polipor mantarların diğer gruplarından kesin şekilde ayrılmışlardır. Poliporlar diğer mantar grupları gibi canlı yada ölü ağaçlar üzerinde gelişirler. Miselyum (Şekil 2) adı verilen mikroskopik tüpler aracılığıyla gelişerek ağacı yavaş yavaş parçalar ve yüzeyde basidiokarp adı verilen meyvaları oluştururlar (Moncalvo ve Ryvarden, 1998).



Şekil 2. *Ganoderma lucidum* hif yapısı ((Adaskaveg ve Gilbertson, 1988a))

Ganoderma türleri yenilebilir mantarlar gruplarında değerlendirilmezler. Bunun nedeni kalın, sert bir meyve yapısına sahip olmaları (Şekil 3 ve 4) ve *Agaricus bisporus*'a benzer şekilde yemeklik değerinin olmamasıdır.



Şekil 3. *Ganoderma lucidum* basidiokarp yapısı (Spawn ortamında)



Şekil 4. *Ganoderma lucidum* basidiokarp yapısı

Ganodermanın bazı türlerine ait elde edilen  r nler Şu anda marketlerde kapsül veya tablet halinde ekstraktları Şeklinde yada toz halinde hem basidiokarp hem de miselyum tabanlı olarak satıŐa sunulmaktadır (Şekil 5 ve 6). Hatta bazı bölgelerde *Ganoderma* 'dan elde edilmiş bira ve sağ tonikleri gibi ekstrem ürünlerle de karŐılaŐılmaktadır (Chen ve Li., 1993).



Şekil 5. *Ganoderma lucidum* basidiokarpı (dilimlenmiş parĖalar halinde)



Şekil 6. *Ganoderma lucidum* (tablet halinde)

Dünya genelinde *Ganoderma* cinsine giren yaklaşık 250 taksonomik isim bildirilmiştir. Bunlardan sıklıkla karşılaşılanlar *G. adspersum*, *G. applanatum*, *G. australe*, *G. boninense*, *G. cupreum*, *G. incrassatum*, *G. lipsiense*, *G. lobatum*, *G. lucidum*, *G. oerstedii*, *G. oregonense*, *G. pfeifferi*, *G. platense*, *G. resinaceum*, *G. sessile*, *G. sinense*, *G. tornatum*, *G. tsugae* ve *G. weberianum*'dur. Bununla birlikte en fazla araştırılan tür *Ganoderma lucidum*'dur (Adaskaveg ve Gilbertson, 1988a)

1.4.3.3.2. *Ganoderma*'nın sistematik karakteri

Ganoderma ifadesi ilk defa Karsten tarafından 1881 de kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar bu cinsi lakkat (dış katmanında küt, mumsu bir yüzeye sahip) (*G. lucidum*), ve lakkat olmayan (*G. applanatum* kompleksleri) şeklinde *Ganoderma* ve *Elfvigia* cinsleri altında toplamıştır. Her ne kadar uzun yıllar *Ganoderma* cinsi hakkında yapılan çalışmalar ve elde edilen bulgular uzunca bir süre taksonomik kaos şeklinde ifade edilmiş olsa da (Ryvarden, 1991) kimyasal yapısı, metabolik etkinliği, morfolojik karakteri gibi özellikleri irdelenerek sınıflandırmada değerlendirilmesi yapılmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar gelişim koşullarındaki farklılığın özellikle poliporlar gibi çok geniş grupların yapılandırılmasında sorun yarattığını ve gerek morfoloji gerekse kültür karakterinin etkilendiğini göstermiştir, bu durum özellikle morfolojik karakterlerden yola çıkılarak yapılan sınıflandırmaların etkinliğini ortadan kaldırmıştır. Çünkü iklim ve gelişim koşullarındaki farklılığa bakılarak aynı tür genel morfolojik karakterinden bağımsız bir gelişim gösterebilmiş ve araştırmacının farklı ve yeni bir tür gibi değerlendirme yapmasını sağlamıştır (Moncalvo, 2000). Gerek basidiokarp şekilleri gerekse spor yapılarının konumu ve şekli bulunan ortam koşullarından direkt etkilenmektedir (Steyaert, 1972, 1975; Chen, 1993). Bugünlerde meyvenin yaşı, bulunduğu çevre gibi faktörlerin mantarın renk, büyüklük, parlaklık ve boyun uzunluğu konusunda doğrudan etkili olduğu belirtilmiştir (Moncalvo, 2000).

Bu ve benzeri nedenler özellikle *Ganoderma* gibi önemli bir polipor grubunun sadece morfolojik karakterlere bağlı kalınarak doğru anlamda sistematize edilemeyeceğini göstermiştir (Hseu ve ark., 1996; Hong ve ark. 2002).

Geleneksel tanımlama yöntemleri hızla hayatımızdan çıkmakta ve yerini daha kalıcı ve doğru saptamalara bırakmaktadır. *Ganoderma* cinsinin identifikasyonu amacıyla RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analizi günümüzde başarıyla uygulanmaktadır (Miller ve ark., 1999). Sekans analizleri (Moncalvo ve ark., 1995a, 1995b; Smith ve Sivasithamparam, 2000a; Hong ve ark., 2002;) ve izozim elektroforezleri de tanımlama açısından kullanılan en önemli yöntemlerdir (Gottlieb ve ark., 1998; Gottlieb ve Wright 1999b). Yüksek oranda çözünürlüğe sahip bilinen bir amino asit yada DNA sekansının filogenetik analizine yönelik bu teknikler günümüzde en fazla geçerliliğe sahip yöntemlerdir (Bruns ve ark., 1991). Bu tip modern tekniklerin kullanılması hem *Ganoderma* hem de sınıflandırmada büyük güçlüklerle karşılaşılan ve isimlendirilememiş türlerin belirlenmesi açısından önem kazanmıştır (Moncalvo ve ark., 1995a, 1995b; Gottlieb ve ark., 1998).

1.4.3.3.3. *Ganoderma*'nın moleküler sistematigi

Yeni taksonomik gelişimlerin mantar moleküler sistematiginde kullanılması açısından nükleer kodlu ribozomal RNA genleri (rDNA) oldukça büyük öneme sahiptir. Bu genler (rDNA) birbiri ardı sıra tekrarlayan üniteler halindedir. Her ünite küçük bir alt ünite ile büyük bir alt ünite (5.8S, 18S) içerir. Her ünite bir yada birkaç intergenerik spacer (IGS) ile bölünmüş durumdadır. Bu bölümler 5.8S RNA için transkripte olmuş kodlu bölgelerdir (Moncalvo ve ark., 1995a).

18 S, 5.8 S, ve 28 S'lik nükleer ribozomal DNA genleri mantar saptamaları için oldukça konservatif ve yakın ilişkili gruplar için çok az düzeyde farklılık gösterirler. Bu yüzden filogenetik çalışmalar açısından oldukça tercih edilen bölgelerdir (Berbee ve Taylor., 1992; Swann ve Taylor., 1993, 1995; Binder ve Hibbet., 2001). Tekrarlayan her ünite konservatif bölümler iki internal transcribed spacer ile ayrılır. Bunlar ITS 1 ve ITS 2 'dir (Moncalvo ve ark., 1995a; Perlin ve Park., 2001). Oldukça sıklıkla kullanılan bu spacer'lar özellikle filogenetik

sınıflandırma anlayışı içinde *Ganoderma*'nın teşhisi açısından fazlaca öneme sahiptir.(Hseu ve ark., 1996)

Moleküler taksonomik anlamda elde edilen bulguların ışığında özellikle yanlış değerlendirilerek taksonomide farklı kategorize edilen yada hiç ifade edilememiş *Ganoderma* türlerinin bu sekanslar sayesinde daha net irdelenerek aydınlatılabileceği bildirilmiştir (Moncalvo ve ark., 1995a, 1995b).

1.4.4. *Ganoderma lucidum*'un kimyasal özellikleri ve esaslar

Ganoderma lucidum polyporacea familyasına ait bir basidiomisetidir. Çinde "Ling Zhi", Japonyada "Reishi" olarak da bilinmektedir. 2000 yıldan uzun bir süredir uzakdoğu tıbbında kullanılan bu mantar doğada yaşlı ağaç gövde ve köklerinde yetişen doğal bir mantardır (Naoi, 1997).

Günümüzde özellikle bazı kanser türleri, HIV, karaciğer yetmezliği, herpetik enfeksiyonlar gibi pek çok rahatsızlığa iyi geldiğinden, yoğun araştırmalara tabii tutulmakta ve ilaç gelişiminde katkı sağlamaktadır (Xin Liua ve ark., 2002)

Ganoderma lucidum ürünlerinin içerdiği bileşenler karmaşık yapıları karbohidratlar, proteinler, nükleik asitler, triterpenoidler, steroidler, steroller, yağ asitleri, betain, vitaminler, furanlar ve diğer eser elementlerdir (Gilbertson ve Ryvarden, 1986). Çeşitli fitokimyasalların arasından triterpenoidler ve polisakkaritler, uluslararası bilim çevrelerinin ilgisini çekmiştir. Bunun nedeni triterpenoidlerin kan basıncını ve kandaki lipid oranını düşürmesi (Morigiwa ve ark., 1986), polisakkaritlerle yapılan anti tümör taramalarında ise çeşitli hetero β -8-D glukunların β -8-(1-3)-D zincirine aktif olarak sahip olan β -8-(1-3)-D glukun, glukurono- β -D glukun, arabinokzilo β -D glukun, ksilo- β -D glukun, manno- β -D glukun ve ksilomanno- β -D glukun ve bunların protein komplekslerinin konakçıda kuvvetli anti tumor aktivitesi oluşturdıklarının saptanmasıdır (Lieu ve ark.,1992;Wang ve ark., 1997).

Ganoderma polisakkaritlerinin yarattığı anti tumor aktivitesinin esas olarak aktive olan makrofajlar ve T lenfositlerden çıkan sitokinler aracılığıyla gerçekleştiği ileri sürülmektedir (Lieu ve ark.,1992). *Ganoderma lucidum* meyvesi üzerinde

yapılan çalışmaları oldukça eskiye dayanmakta iken sporları üzerine yapılan çalışmalar daha yeni ve azdır (Xingfeng ve ark., 2001).

Ganoderma lucidum sporlarından izole edilen polisakkaritlerin yapısal analiz konformasyonları ve immunoaktiviteleri üzerinde yapılan bir çalışmada yüksek derecede dallanmış bir glukan ve metabolitler tanımlanmıştır (Bao ve ark., 2002).

G. lucidum sporlarının da esas meyvede olduğu gibi çeşitli biyoaktif maddeler içerdiği, fakat etkinliğin görülebilmesi için sporların mutlaka çizilmiş olması gerektiği (Zhu ve ark., 2000) belirtilmiştir.

Ganoderma lucidum sporlarının sıcak su ile elde edilen ekstralarının kuvvetli anti tümör aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (Zhu ve ark.,2000; Bao ve ark.,2002).

G. lucidum biyolojik aktiviteye sahip birçok metabolit üretir.

Spesifik Polisakkaritler: Aminoasitlere bağlı beta-D-glukanlar şeklinde görülür. Bağışıklığı güçlendirici ve anti-kanserojen etki gösterirler.

Ganoderik Asitler: Tansiyon düşürücü, kan pıhtılaşmasını azaltıcı, damar tıkanıklığını önleyici ve LDL-kolesterol düşürücülerdir (Chen ve ark., 2003).

Steroller, coumarin ve mannitol: Hayvanlar üzerinde yapılan klinik araştırmalar sonucunda *Ganoderma lucidum* tümörlerde 50 % gerileme sağlamıştır ve Japonya da kanser tedavilerinde radyo ve kemoterapi ile birlikte kullanılıp, hem bu tedavilerin yan etkilerinin azaltılması sağlanmış, hem de daha etkili sonuçlar alınmıştır (Wagner ve ark.,2003).

Fakat *Ganoderma lucidum*'un bilim adamları tarafından en çok dikkat çeken özelliği bağışıklık sistemini en üst düzeyde güçlendirip, HIV virüsü ile de savaşabilmesidir. İçerğinde bulunan polisakkaritlerin ise kanserli hücreleri 40-45 % arasında yok edebildiği görülmüştür (Bao, 2002).

Polisakkarit fraksiyonları (1→3) β-D glukanlar özellikle C-6 pozisyonunda yer alırlar ki bu da yüksek antitümör aktivitesinin gösterilmesi açısından önemlidir. Terpenoidler hepatoma hücreleri üzerinde sitotoksik etkilidirler. HIV tip 1 reverse transkriptaz enzimini inhibe ederler. (1→3) β-D glukanlar ve terpenoid grubları ganoderik asitler olarak bilinirler ve hem kültür edilmiş *G. lucidum*'da hemde basidiokarp da bulunurlar (Xingfeng ve ark., 2001).

G. lucidum'un doğada çok sık rastlanan bir mantar olmaması ve bileşeninde yer alan kimyasalların sağlık açısından çok büyük öneme sahip olması özellikle günümüz çalışmalarına büyük yoğunluk kazandırmıştır (Wagner ve ark.,2003).

Günümüzde *G. lucidum*'dan elde edilen çaylar, öğütülmüş ürünler ve kapsüllerin migren, hipertansiyon, sinir yatıştırıcı, kan basıncını düzenleyici, böbrek hastalıkları tedavisinde, hiperkolesterol ve kanser tedavisinde kullanılmaya başlandığı ve olumlu neticeler alındığı bilinmektedir (Kim ve ark., 1999). *Ganoderma*'dan elde edilen biyomoleküllerin bir çoğu tanımlanmıştır. Karbohidratlar nükleik asitler, triterpenoidler, steroller, yağ asitleri, vitaminler, ve benzeri tarzda önemli kimyasal bileşiklerin mantarın kompleks yapısını oluşturan başlıca kimyasallar olduğu tespit edilmiştir (Naoi ve ark., 1997).

Biyoaktif bileşiklerin enerji transformasyonu ve metabolik yolların düzenlenmesinde oldukça önemli roller üstlendikleri bildirilmiştir (Cheung, 2001). Bu yüzden araştırmaların temeli olarak düşünölmeleri hiç de şaşırtıcı değildir. Uluslararası bilim komitelerince triterpenlerin ve polisakkaritlerin önemlerinin vurgulanmasının yanı sıra özellikle triterpenlerin kan basıncının düşürölmesi yönünde oldukça büyük öneme sahip olduğu belirlenmiştir (Chen ve ark., 2003).

G. lucidum'un antitümör etkileri β glukanların immün sistemi (immunomodulation) düzenleyici yönde veya immün sistemi baskılayıcı yönde (immunosuppressive), protein gruplarının DNA polimerazları inhibe etmesiyle veya onkoproteinlerin posttranslasyonel modifikasyonu ile gerçekleştiği bilinmektedir (Xin ve ark., 2002).

Yaşlanmayı önleyici (Antiaging) özellikleri hücre döngülerinin yavaşlatılması ve mutasyon tamir mekanizmasının çoğalmasıyla sağlanmaktadır (van der Hem ve ark., 1995).

Serbest radikallerin aranarak ve/veya transisyon metalleri, özellikle germanyum (Ge)'un varlığının tespiti *Ganoderma*'dan elde edilen antimutajenik ve /veya antikarsinojenik etkili bileşenlerin sayısını artırmıştır. Süperoksit anyonları (O_2^-), Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri ($OH^\cdot$) aerobik döngüde oksijen kökenli reaktif oksijen türleri (ROS) olarak işlerlik kazanmışlardır (Xingfeng ve ark., 2001)..

Mitokondri, Endoplazmik retikulum ve nükleer membranlardaki oksidatif fosforilasyon sonucu süperoksit iyonları açığa çıkar. Diğer önemli ROS kaynakları da metabolik yan ürünler ile metabolik arakhidonik asit ile siklooksijenaz, lipooksijenaz ve sitokrom p450 monooksijenazdır. Diğer iki oksijen temelli enzim sistemleri ksantin oksidaz ve NADH-NADPH oksidaz'dır. Oksijenin dismutasyonu spontan olarak veya enzimatik yoldan süperoksit dismutazın hidrojen peroksit çıkışını sağlamasıyla gerçekleşir. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksit katalaz veya peroksidaz ile ortaya çıkar. Süperoksit ve H₂O₂ kimyasal reaksiyonlara tek başlarına veya demir içeren moleküllerle katılabilir. Bu şekilde yüksek düzeyde reaktif hidroksil radikalleri oluştururlar (Hamburger ve ark., 1991).

Normalde ROS üretimi antioksidan savunma sistemi ile temellendirilmiştir. ROS üretimi ve antioksidan savunması aşağı yukarı dengelenmiştir. Bu aşamada oksidatif stres şeklinde yapılacak bir tanımlama sanıyoruz ki daha doğru olacaktır. Oksidatif stres; antioksidanların tükenmesi ile kötü beslenmesi ve ROS'un aşırı üretilmesi örneğin; oksijen konsantrasyonunda çıkan ani yükseliş, toksin veya doğal radikal üretilen sistemlerin aşırı aktivasyonu ile gelişim gösterir. Hücreler belirli seviyelerdeki oksidatif stresi tolere edebilmektedir. Dengenin sağlanabilmesi için antioksidan savunma sisteminin üst düzeylerde regüle edilmesi gerekir. Bununla birlikte, oksidatif stres gerek hücre harabiyeti gerekse sağlık açısından başka olumsuzluklarla karşımıza çıkabilmektedir. Örneğin; kan dolaşımında yağdaki oksidatif hasar arterosiklerose neden olabilmektedir. Arterlerin iç duvarından oksidatif tahribiyet nedeniyle biriken yağ kalıntıları ile oluşan ve koroner bir hastalık olan arterosiklerosis ileri boyutlarda kan akışını arterlerdeki geçiş yerlerini bu lipid kalıntılarının tıkamasıyla damarlarda geçiş yerlerini azaltmakta ve tıkanmalarla karşılaşmaktadır(Jeng ve ark.,2001).

Araştırmacılara göre oksidatif DNA kanserleşme ve yaşlanmayı engellemesi açısından önemlidir. Bu yüzden *Ganoderma* ekstratları içinde bulunan germanyum maddesinin oranı özellikle incelenmelidir. Çünkü yüksek düzeyde germanyum metali antimutajenik, immunomoduler, antitumor ve antioksidan etkilere sahiptir (Jeng ve ark.,2001).

Ganoderma ekstratlarının faydalarına bakıldığında ayrıca görüyoruz ki DNA sarmalının yapı bütünlüğünü koruyarak özellikle ROS etkili ve UV radyasyonu kökenli kırılmalara karşı DNA'yı koruyucu etkileri olduğu saptanmıştır (Kim ve Kim., 1999).

Ganoderma lucidum meşe ve diğer sert ağaçlar üzerinde büyürken yakın akrabaları olan *G. tsugae* ve *G. oregonense* başlıca kozalaklı ağaçlar üzerinde büyür. Kültürde yetiştirme sürecinde *Ganoderma lucidum* ve *G. tsugae* kütük sapları oluşturularak çevresel manipulasyonlara uyum sağlarlar. *Ganoderma lucidum*'un hem bazı kozalaklı ağaçlar hem de sert ağaç talaşları üzerinde kolaylıkla gelişmesi bu mantarların yetiştirebilmesinin sadece habitata bağlamamak gerektiğini göstermektedir. Genelde *G. oregonense* soğuk iklimleri severken, *Ganoderma lucidum*'a daha ziyade sıcak bölgelerde rastlanır. *G. curtisii*, *G. oregonense* ve *G. tsugae* büyük olasılıkla aynı soy kütüğünden gelmişlerdir. Onları ayrı birer tür olarak sınıflandırma iddiasının kökeninde ekolojik ve özel konukçu durumunun yer aldığı, ayrımının biyolojik esaslı olmadığı ileri sürülmektedir. Az sayıdaki kültürel farklılık gözlemlerine bir örnek *Ganoderma lucidum*'un kültürde chlamydospor üretmesi, ve *G. tsugae*'nin üretmemesidir (Adaskaveg ve Gilbertson, 1986).

Geleneksel taksonomi yöntemleri *Ganoderma* türlerinin ayırt edilebilmeleri için yeterli olmamıştır. Buna karşılık nükleotid dizinlerinin incelenmesi yoluyla sınıflandırma konusunda daha somut sonuçlara ulaşıldığı görülmektedir (Hseu ve ark.,1996).

Ganodermataceae'nin kırkbeş değişik cins, alt cins, bölümler ve türleri üzerinde çalışılmış ve nükleotid dizinleri incelenerek rDNA'nın ITS1 ve ITS2 ile LSU alt birim genleri arasında filogenetik karakter oluşumları gösterilmiştir. ITS verileri daha ziyade alt taksonomik düzeylerde faydalı olurken, LSU verilerinin üst düzeylerde daha yararlı olduğu görülmüştür. Nükleotid dizin verileri *Ganoderma* ve *Amauroderma*'nın kesinlikle ayrı cinslere ait olduklarını gösterirken alt cins *Elfvigia*'nın monofiletik olduğu, *Characoderma* ve *Phaeonema* bölümlerinin ise monofiletik olmadığı saptanmıştır (Moncalvo ve ark.,1995a). Moncalvo ve ark. (1995b)'nın çalışmalarında subtropik ve ılımlı iklim bölgelerinden toplanan yirmi dokuz *Ganoderma lucidum* suşunu ITS1, ITS2 ve LSU nükleotid dizin verileri

analizine tabii tutmuşlar ve sonuçları morfolojik, ekolojik, ve kültürel bazda değerlendirilmişlerdir. Filogenetik olarak ilişkilendirilen izolatlar benzer kültür özellikleri göstermektedir. Ancak bu veriler daha uzak taksonomiye sahip izolatlarda da bulunabilmektedir. Dolayısıyla son zamanların uzak taksonomi sınıflamaları arasında, kültür özellikleri morfolojik özelliklere göre daha düşük polimorfik niteliktedir. Ancak bu kültür özellikleri monofiletik grupların saptanmasında yararlı olmamaktadırlar. Bu sonuçlara göre monofili bazında yeni bir tür tanımlaması yapılmış ve bunu genetik izolasyon için potansiyel bir gelişme olarak ortaya koymuşlar, buna göre de *Ganoderma lucidum* kompleksinin taksonomisi revize edilmiştir.

1.5. *Trametes* grubu

Ryvarden (1991) Polyporaceae familyasını gruplara ayırmış ve hifsel organizasyon benzerliklerini dikkate alarak (di-trimitik hif sistemi) *Trametes* grubunu oluşturmuştur. Buna göre *Cerrena*, *Coriolopsis*, *Cryptoporus*, *Daedaleopsis*, *Datronia*, *Earliella*, *Elmerina*, *Fomitella*, *Hexagonia*, *Lenzites*, *Megasporoporia*, *Microporus*, *Mollicarpus*, *Pycnoporus*, *Trametes* ve *Trichaptum* şeklinde 16 cinsden oluşan bu gruba *Trametes* denmiştir. Grup üyeleri düzgün, hyalin, ince duvar yapıları, genellikle silindirik, amiloid yapı göstermeyen, benzer spor yapıları ve gerçek olmayan himenyal sistidleri ile karakterize edilmiştir (Ryvarden, 1991).

Polyporaceae grubu üyeleri içinde özellikle *Trametes* grubunun septal yapılarının benzer morfoloji sergilemesi tipiktir. Bu durum özellikle grup üyelerini diğer polyporlardan ayırmaktadır. Diğer taraftan *Trametes* grubu üyelerinin birbirinden ayırt edilmesi zordur. Bunun nedeni *Trametes* üyelerinin spor morfolojilerindeki benzerlik, dimitik yada trimitik hif sistemleri arz etmeleridir. Bu da sınıflandırmayı güçleştirir (Gilbertson ve Ryvarden, 1986).

Günümüzde gerek mantarlar gerekse diğer organizmaların yapılandırılması ve gelişimlerinin ortaya çıkartılması amacıyla kullanılan sekans analizleri *Trametes* üyelerinin filogenetik sınıflandırılmaları amacıyla da kullanılmaktadır (Keunsook ve ark., 2002).

Trametes, *Ganoderma lucidum* gibi yemeklik değeri olmayan fakat medikal öneme haiz bir mantardır. Özellikle lignin parçalayıcı enzim sistemleri yönünden de oldukça zengin olan bu grup üyelerinden *Trametes versicolor*'dan elde edilen bileşiklerin gerek enzim eldesi gerekse faydalı bileşiklerin elde edilerek (krestin) örneğin kanser tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Ooi, 2000).

1.6. Mantar kültürlerinin uygun şekilde muhafazası ve saklanması önemi

Mantarlar hakkında yapılacak hangi tip çalışma olursa olsun eldeki izolatin korunması ve uygun şekilde muhafazası çalışmanın devamı açısından elzemdir. Mantar hücreleri oksijen seviyelerindeki değişim, metabolik bileşik eksikliği, substrat pH'sındaki artış yada azalışlar istenmeyen metabolitlerin akümüle edilip uzaklaştırılamaması gibi bir çok kriterden etkilenirler (Oei, 1996). Eğer kültür çok uzun süreli olarak saklanırsa muhtemelen genetik karakterlerinde uzun süreli beklemlere bağlı olarak kayıplar gelişecektir (Oei, 1996). Genellikle aynı cinse ait mantar türlerinin saklanma koşulları benzerlik gösterir. Bu yüzden aynı tür elemanları ve farklı mantar türleri için bildirilen saklama koşulları ayrı ayrı ele alınmıştır (Mayzumi ve ark., 1997).

Mantarların değişen sürelerde muhafazası için farklı teknikler kullanılabilir. Agardan agara transfer, agar üzerine mineral yağ ilavesi, dondurarak şoklama, liyofilizasyon gibi teknikler kullanılabilir.

Agardan agara transfer kısa süreli muhafaza için uygulanan ve genellikle en kolay ve ucuza mal edilebilen metoddur. Uygulamadaki tek zorluk misel gelişimi için beklenen zamandır. Bunun dışında herhangi bir zorluğu yoktur. Birçok mantar türü 2 ila 6 ay kadar subkültürleri yapılarak bu teknikle bekletilebilir (Ando, 1997). Elbette bu durum bütün mantar türlerini kapsamamakta bazı türler daha kısa aralıklarla (2-4 hafta) pasajlanma gereksinimi gösterebilmektedir (Reshetnikov, 2001). Tekniğin dezavantajı agara transfer edilen misel kültürünün her ne kadar buzdolabında olsa dahi düşük sıcaklıklarda da yavaş gelişim gösterebilmesi ve dejeneratif misel yapılarıyla karşılaşılmasıdır (Oei, 1996). Ayrıca bu yöntem gerek

kontaminasyon gerekse mantar karakterlerinde örneğin spor gelişimi, patojenite ve metabolit birikimlerine de istemeden olanak sağlayabileceği için uzun süreli saklamalar için tercih edilmemelidir (Ando, 1997).

Agar kültürlerinin mineral yağ veya medikal parafin ile kapatılması 1-20 yıla kadar kültürün saklanabilmesini sağlayabilmektedir (Onions, 1983). Yöntemin avantajı 4°C ve oda sıcaklığında bile kültürün uzun süreli muhafaza edilebilmesidir. Uygulamanın dezavantajı yağın uygulandığı derinliktir. Çok az dökülmesi durumunda hif açığa çıkabilir ve kültür kuruyabilir. Tam tersi durumda yani çok fazla yağ ilavesinde ise oksijen ve karbondioksit difüzyonu engellenir (Onions, 1983).

Liyofilizasyon ve sıvı kurutma metodları mantar misellerinin korunması için kullanılan zor tekniklerdir (Ando, 1997). Bu teknikler özellikle mantar sporlarının 20 sene ve üstü saklanabilmeleri için kullanılır (Oei, 1996). Mantar misellerinin saklanması için tercih edilen yöntem dondurmak ve sıvı nitrojen sıcaklığında muhafaza etmektir veya miselyumu -80°C de derin dondurucuda bekletmektir.

1.6.1. *Ganoderma* ve *Trametes* türlerinin kültür edilmesi

1.6.1.1. Basidiokarp oluşumu için kültüre alınma

Mizuno ve çalışma grubu (1995) tarafından laboratuvar şartlarında *Ganoderma* ve *Trametes*'i de içine alan mantar gruplarına ait basidiokarplar elde edilmiştir. Talaş içeren torbalar ve ağaç kütükleri üzerinde basidiokarp oluşumu için yapay ortamlar hazırlanmış ve uygulanmıştır (Mayzumi ve ark., 1997; Naoi, 1997). Yöntemlerde hedef, öncelikli olarak basidiokarp oluşumu, daha hızlı ve kimyasal kompozisyonu en az değişikliğe uğramış meyve eldesi olmuştur. Bunun sonucu olarak substrat içeriği değişkenlik göstermiş ve elde edilen ürün kalitesine de bu durum yansımıştır (Chen ve Miles, 1996b).

Laboratuvar ortamında ele alınan kültür teknikleri 5 basamakta incelenir: (1) Spawn gelişimi, (2) Genç primordia formasyonu, (3) Primordia tamamlanması, (4) Basidiokarp gelişimi, (5) Ürün eldesi (Stamets, 1993; Chen, 1999). Steril katı gelişim

için uygun substratlar ilave edilerek hazırlanan ortamlarda mantarın inkübasyonu sağlanmakta ve çevre şartları da optimize edilerek gelişim tamamlanmaktadır. Bu tarz uygulamalarda daha kontrollü oldukları için ürün elde süresi de kısalmaktadır (Stamets, 1993).

1.6.1.2. Sıvı besi ortamlarında kültüre alma

Sıvı besi ortamlarının mantar gelişimi üzerine etkilerinin araştırılmasının başlangıcı 1950'lere dayanmaktadır. Bu teknik ilk defa basidiokarp oluşturmayan mantarların üretilmesi için uygulanmıştır. Bunun içinde fermentörler kullanılmış ve ekonomik değere sahip ürünlerin eldesi mümkün olmuştur (Yang ve Liau., 1998).

Genellikle birkaç ay süren ve ürün kalitesi konusunda emin olunamayan katı kültür ortamlarına alternatif olması, daha hızlı bileşik eldesi, daha az yer gereksinimi ve daha az kontaminasyon riski gibi yönlerden avantaj sağlaması açısından sıvı ortamlar günümüzde sıkça kullanılmaktadır (Bae ve ark., 2000). Ayrıca, sıvı ortamlarda miselyumun substratla daha hızlı etkileşimi, gelişim parametrelerinin daha kolaylıkla ayarlanabilir olması ve ürün elde süresinin kısılması gibi birçok etkende uygulamayı başarılı kılmaktadır.

1.6.1.3. Katı besiyerlerinde kültüre alma

Çoğu mantar hakkında fikir sahibi olabilmek için mantarın katı besi ortamında verdiği bilgiler dikkate alınır. Bu anlamda gelişim davranışının tespiti ve besiyeri kimyasının gelişim üzerindeki etkileri fikir verici olmaktadır (Bilay ve ark., 2000).

Mantar besi ortamında gelişirken meydana getirdiği koloni morfolojisi ve uzunluğu çalışmaya ışık tutmaktadır (Worley, 1939; Brancato ve Golding, 1953). Bu durum aynı zamanda diğer mantarlarla mukayese yapılabilmesini ve seçilecek besi ortamının uygun olup olmadığını gösteren bir belirteçtir (Lonergan ve ark., 1993).

1.6.2. Kültür gelişim parametrelerinin incelenmesi

Misel gelişimi üzerine birçok faktör etken olabilmektedir. Örneğin, kültür besiyerinin içeriği (nitrojen, karbon ve inorganik tuzlar gibi) ve çevre (sıcaklık, havalandırma, karıştırma, inokulum miktarı ve pH gibi) mantarın gelişim ve üretimi açısından birinci derecede önemli etkenlerdir (Knudsen ve Stack., 1991). Bu açıdan iyi değerlendirilmeli ve irdelenmelidir.

1.6.3. Kültür besiyerinin misel biyomas gelişimi üzerine etkisi

Kültür besiyeri biyoması, gelişim optimizasyonu için gereken bileşikleri içerdiğinden birinci derecede önemli bir faktördür. Örneğin değişik karbohidrat kaynaklarının miselyum gelişimi üzerine etkilerini irdeleyen çok sayıda kaynak mevcuttur (Lin ve ark., 1973). Bu çalışmaların bazılarında laktozun karbohidrat kaynağı olarak kullanıldığı besi ortamlarından elde edilen miselyum kuru ağırlığının daha fazla olduğu, benzer şekilde değişik nitrojen kaynaklarının da biyomas gelişimi üzerinde olumlu yada olumsuz etkileri gözlenebileceği belirtilmiştir (Lin ve ark., 1973).

İnorganik tuz ve amonyum fosfat ilavesinin kültür ortamında biyomas gelişimine olumlu tesirleri olduğu da yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Lee ve ark., 1999b).

Bugünlerde araştırmacılar alternatif materyal arayışı içerisinde örneğin yağ asitleri ve bitkisel yağlar kullanarak bazı mantarlarda misel gelişimi üzerinde stimulatif etkileri araştırmaktadırlar (Schisler ve Volkoff, 1977; Yang ve ark., 2000).

1.6.4. Çevrenin misel biyomas oluşumuna etkisi

Önemli bir çevresel faktör olan sıcaklık miselyum gelişimi için çok dikkatli bir şekilde tespit edilmelidir (Brancato ve Golding, 1953). *Ganoderma lucidum* gelişim için optimal $30 \pm 2^\circ\text{C}$ tercih eder (Lin ve ark., 1973; Mayzumi ve ark., 1997; Yang ve Liau, 1998).

Diğer önemli bir faktör pH'dır. Hücre membran fonksiyonları, hücre morfolojisi ve yapısı, bileşik alınımı ve ürün biyosentezi gibi birçok önemli role sahiptir (Fang ve Zhong, 2002a). Mantarlar genellikle asit metabolize ederler, bu da pH'yı düşürür (Lin ve ark., 1973). Besiyeri pH'sının düşmesi de miselyum gelişimini geciktirir (Lin ve ark., 1973). Kullanılan kültür besiyerinin moleküler yapısına göre pH ayarlanmalıdır. Bu şekilde miselyum biyoması bundan en az şekilde etkilenecektir.

Miselyum gelişim morfolojisini etkileyen bir başka faktör de agitasyon hızıdır. Bu durum doğrudan doğruya hücre gelişiminin indirgenmesi ve biyoaktif bileşik miktarındaki değişime bağlıdır. Agitasyon hızının yavaş olması besiyerine oksijen transferini sınırlandıracak ve misel biyomas üretimini indirgeyecektir. Bunun tam tersi çok hızlı agitasyon hızı ise miselyumdaki hif karakterini etkileyecek, istenildiği gibi bileşenlere ulaşılamayacak, oksijen gibi elzem kimyasallarla yeterince etkileşime girilemeyecek ve beklenenden farklı bir biyomass morfolojisi ile karşılaşılabilir (Yang ve Liao, 1998).

İnokülasyon yoğunluğu da hücre kültür proseslerinde önemli bir faktördür (Wang ve ark., 1997a; Johansen ve ark., 1998). Özellikle sıvı kültürlerde küçük inokulumlardan elde edilen pellet büyüklükleri ile büyük inokulumlar arasında farklar görülmesi araştırmacıları inokulum yoğunluklarını irdelemeye itmiştir (Fang ve Zhong, 2002a). Ayrıca logaritmik fazda gelişim süresince inokulumun misel gelişimi için tercih edilmesi gerektiği bununda yaklaşık 3-4 günlük kültürlerle yapılması gerektiği vurgulanmıştır (Wang ve ark., 1997a). Işık sıvı ve katı besiyerlerinde kültür gelişimi için gerekli bir faktör değildir. Sadece dikkat edilmesi gereken husus çok fazla ışığın misel gelişimini olumsuz etkileyebileceğidir (Lin ve ark., 1973).

1.7. Modern gelişmeler

1.7.1. *Ganoderma* ve *Trametes* sp. hakkında moleküler yaklaşımlar

Ganoderma ve *Trametes*'i de içine alan mantarlara yönelik morfolojik karakter varyasyonları birçok taksonomisti, türler arasındaki kimyasal ve moleküler yaklaşımları tekrar irdelemeye yöneltmiştir. Stalpers tarafından (1978) *Ganoderma* 'nın kültür karakteri gözden geçirilmiş ve araştırmacının yaptığı çalışmada *Ganoderma tsugae*'nin aslında *Ganoderma valesiacum*'un sinonimi olduğunu belirtmiştir. Kültür bazında yapılan çalışmalar ve uyumluluk analizleri Kuzey Amerika'dan izole edilen *Ganoderma lucidum* ile Avrupa izolatu olan *Ganoderma resinaceum*'un benzer kültür karakterine sahip olduklarını ve interfertil olduklarını göstermiştir (Adaskaveg ve Gilbertson, 1988a). İzozim elektroforezi analizleri *Ganoderma lucidum* ve *Ganoderma applanatum* komplekslerinin bazı enzimlerce (aspartat aminotransferaz, alkalın fosfataz ve menadion redüktaz) ayırt edildiğini ortaya koymuştur. Elektron mikroskopuyla yapılan çalışmalar *Ganoderma colossum* ve *Ganoderma zonatum*'un basidiospor morfolojisi yönünden farklılık gösterdiğini belirlemiştir.

Bu konuda *Trametes*'e ilişkin verilere bakıldığında Asya izolatu olan *Trametes versicolor* ile İngiltere'de izolasyonu yapılmış başka bir *Trametes versicolor*'ın lakkaz ve selüloz aktiviteleri yönünden oldukça farklılık arz ettiği ve bunun çevresel koşullara dayandırıldığı, benzer şekilde *Trametes villosa* ile *Trametes sanguinea*'nın da gerek morfoloji gerek de enzim içeriği yönünden farklılıklar gösterdiğine ilişkin bilgiler mevcuttur (Ko ve ark.,1999).

Bu ve benzeri birçok çalışma neticesinde elde edilen bulgular *Ganoderma* ve *Trametes* cinsine ait bireylerde her zaman benzerlik yada farklılık gibi temel kavramlardan bu cinslerin üyelerinin yoksun olduğu ve belli bir stabilite göstermediği anlaşılmıştır. Bunun sonucu olarak varyasyonlar ve yeni etkileşimler kaçınılmazdır.

Son zamanlarda mitokondriyal SSU rDNA sekanlarıyla ilgili filogenetik analizler *Ganoderma lucidum*'un *Trametes* ve *Polyporus*'u da içeren trimitik ve

dimitik türleri kapsadığını, ayrıca monofiletik grupların jeolojik temelleri, veriler ve konak ilişkileriyle ışık altına alınması gerektiğini vurgulamıştır (Hibbet ve Donoghue, 1995).

1.8. Moleküler işleyiş açısından ribozomal DNA'nın önemi

1.8.1 İyi bir moleküler işleyiş için gereksinimler

Mantarlara yönelik geleneksel saptama yöntemlerinin sınıflandırma açısından gereken somut yaklaşımları sağlayamaması bu konuda moleküler sekans temelli filogenetik analizlerin daha gerçekçi bir tespit olarak değerlendirilmesi gerektiğini zorunlu kılmıştır. Moleküler filogenetiği oluşturan hipotez molekül sekanslarının tüm nesillerde moleküllerin tarihçesi ve evrimi konusunda verdiği bilgi şeklinde değerlendirilir. Bu yüzden moleküler sekanslar bir anlamda moleküler saat olarak da işlerlik gösterirler. İyi bir moleküler saat için onu oluşturacak molekül yapısının bazı özelliklere sahip olması gerekir. İlk olarak molekül, tahlil edilen bütün nesillerde yaklaşık olarak aynı frekans ve değerde olmalıdır. Özellikle UPGMA gibi filogenetik yapılanmaya dayalı simulasyon prosesleri analiz edilecek molekül değeri ve frekansı değişken olan bir molekülde işlevselliğe sahip değildir. Bu durum analizi güçleştirir. Ayrıca molekülün bütün nesillerde sabit bir gelişim grafiği çizmesi gerekir. Bir diğer özellik molekülün gereken ilgiyi çekmesidir. Kastedilen, moleküle ait filogenetik gruplarının birbirinden ayırt edilebilmesi için gereken informasyona sahip olmasıdır. Bu nedenle seçilecek molekülün konservatif olması gerekir. Bu şekilde çok daha az değişiklik içerecektir (Bruns ve ark., 1991). Molekül seçiminde önemli olan bir diğer husus molekül büyüklüğüdür. Yeterli büyüklüğe sahip olan ve bilgi taşıyan molekül tercihi bu anlamda önemlidir. Son olarak molekülün genomda sadece bir sefer yer alması yada tek kopya halinde olması istenir (Woese, 1987; Mitchell ve ark., 1995).

Filogenetik analizler açısından en sıklıkla kullanılan moleküller ribozomal DNA'lardır. Hemen hemen bütün organizmalarda bulunmaları, düzenli işleyişleri iyi bir moleküler saat olarak değerlendirilmelerini sağlar. Sekanslarındaki pozisyon farkları oldukça değişik yapılar arz edebilmektedir. Bu pozisyonlar farklı taksonomik

değerlendirmeler için faydalı olabilmektedir (Bruns ve ark., 1991; Seifert ve ark., 1994; Woese, 1987).

Nükleer 18S'lik rDNA'lar yaklaşık olarak 1700-1900 bp büyüklüklerine sahip olabilmektedir. Taksonomik basamakların genişleyen daha büyük halkalarında bu büyüklüklerden faydalanılabilmektedir (Föster ve ark., 1990; Wilmotte ve ark., 1993). Mitokondriyal SSU rDNA nükleer 18S rDNA'larla benzerlik göstermekte ve değerlendirmelerin daha hızlı sonuç vermesi açısından filogenetik analizlerde tercih edilmektedir (Seifert ve ark., 1994; Hibbet ve Donoghue, 1995). Ayrıca rDNA'ların birçok konservatif bölüm içermesi, bunların birarada değerlendirilebilmesi, geniş spektrumlu uygulamalar için gereken primer seçimini kolaylaştırması gibi birçok sebepten dolayı tercih edilmektedir.

1.8.2. Ribozomal DNA genlerinin yapısı

rDNA yapısı ökaryotların nükleer genomunda ardışık olarak tekrarlayan üniteler halinde arz etmektedir. Bir rDNA ünitesi genellikle eksternal transcribed (ETS), 18S rDNA, internal transcribed spacer 1 (ITS 1), 5.8 S rDNA, internal transcribed spacer 2 (ITS 2), 28 S rDNA ve non transcribed spacer (NTS)'den oluşur. rDNA'nın uzunluğu 6.8 kb'lık *Stylonychia* yada 44 kb uzunluğa sahip rat rDNA'sı kadar değişen uzunluklarda olabilmektedir. Bu farklılıklardaki en temel neden NTS'nin değişen uzunluklarıdır (Gerbi, 1985). Ayrıca ardışık devam eden ünitelerin kopya sayısı da örneğin *Tetrahymena* mikronükleusu içindeki tek kopyadan (Yao ve Gall, 1977), buğdaydaki (Appels ve ark., 1980) 6400 kopyaya kadar değişiklik gösterebilmektedir. Bu konuda görüş birliğine varılan düşünce rDNA'nın düzeninin "concerted evolution" birlikte geçirilen ve homojenize edilen benzer tarzda bir evrim süreciyle ilişkilendirilmiştir (Hillis ve Dixon, 1991). Bu gelişim süreci tam anlamıyla açık olmamakla beraber tekrarlayan ünitelerin homojenizasyonuna ilişkin durumların izahatının yapılabilmesi açısından önem arz etmektedir (Li ve ark., 1985). Bazı örnekler organizmanın değişik sekanslarına ait toplu halde gen dizilimlerine ait formlar teşkil ettiğini göstermiştir (O'Donnel ve Cigelnik, 1997;

Fatehi ve Bridge, 1998). Bu yüzden rDNA sekanslarına ilişkin filogeni çok dikkatli yorumlanmalıdır.

Birçok ökaryotta 5S rRNA genleri nükleer genomda farklı lokasyonda bulunmaktadır, fakat bazı mantarlar ve protozoa grubu üyelerinde 5S rRNA genleri rDNA lokusu ile bulunur (Gerbi, 1985).

5S rRNA geni rDNA'nın bir parçası ise transkripsiyon mekanizması ya *Coprinus cinereus*'da olduğu gibi aynı yönde ya da *Saccharomyces cerevisiae*'da olduğu gibi opozit yönde gelişir. Türlerle bağlı olarak rDNA kodlayan bölgelerin büyüklüğü ve organizasyonu değişkenlik arz eder, fakat birçok durumda genom başına bir tek kopya halinde küçük alt ünite rRNA genleri bulunmaktadır (Gerbi, 1985).

1.8.3. Filogenetik çalışmada ribozomal DNA'nın önemi

Filogenetik analizlerden 5.8 S, 18S, ITS sekansları ve mitokondriyal rDNA'lar sekans verileri açısından sıklıkla tercih edilirler. Temel sebep ökaryotik hücrelerde her yerde bulunabilmeleri ve fonksiyonel olmalarıdır (Carbone ve Kohn, 1993; Swann ve Taylor, 1993; Moncalvo ve ark., 1995a ve 1995b).

18S ve 26S rDNA sekanslarının konservatif yapı göstermeleri aynı familyaya ait mantar gruplarıyla neredeyse 95 % benzerlik oranı göstermelerini sağlamaktadır. Filogenetik analizler açısından yapılacak bir değerlendirme, 18S ve 26S rDNA analizlerinin mantar sınıflandırması açısından oldukça geniş spektrumda incelendiğini fakat zaman zaman familya, cins veya tür bazında elde edilen sonuçların değerlendirme açısından yeterli olmadığı yönündedir (Moncalvo ve ark., 1995a). Diğer taraftan ITS sonuçları da değişkenlik gösterebilmekte ve aynı cinsin tür düzeyinde yapılacak ayrımlarında tek başına yeterli olmamaktadır (Moncalvo ve ark., 1995a ve 1995b; Yan ve ark., 1995).

Mitokondriyal SSU rDNA sekansları nükleusdaki sekanslarda neredeyse 10 katı daha hızlı gelişim gösterir (Bruns ve Szaro, 1992). Mitokondriyal SSU rDNA sekansları konserve halde bölümlerden, hızlı gelişebilen ve mutasyon meydana gelebilen temel öneme sahip bölgelerden oluşmuştur. Bu yüzden mt SSU rDNA

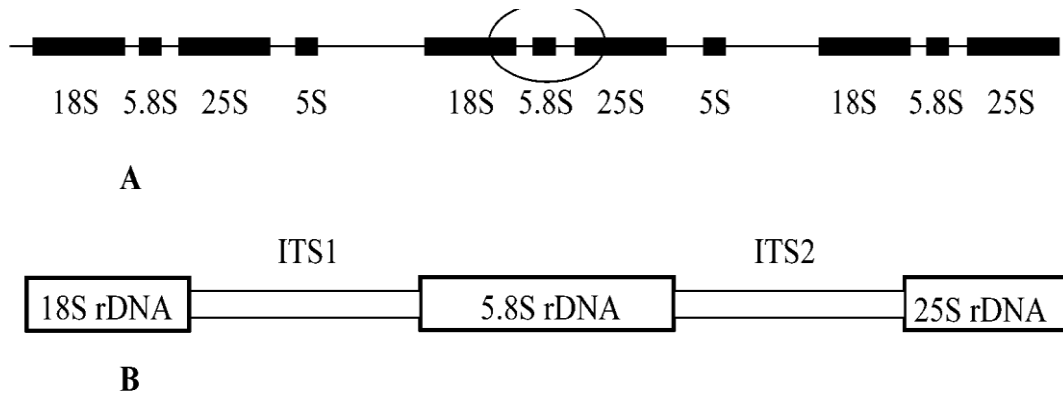
sekansları sınıflar arasındaki filogenetik analizler açısından en iyi değerlendirilebilecek biyomoleküllerdir.

1.8.4. Internal Transcribed Spacer (ITS) Bölümleri

ITS (internal transcribed spacers) bölümleri cins ve tür düzeyinde yapılacak filogenetik bir çalışma için en güvenilir metodlardandır. Bu nedenle ribozomal DNA internal transcribed spacers (rDNA ITS) mantar sistematigi ve tanımlamada sahip oldukları genomik bölümlerin (Şekil 7) işlevi ile paralel olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Kullanımdaki avantajı ribozomal DNA'nın yüksek düzeyde konservatif genlere sahip olması ve ITS bölümleri arasında konumlanmasıdır. Uygulanan primerlerle DNA amplifikasyonu sırasında kodlanamayan bölgelerden de elde edilen bilgiler ile tür düzeyinde tanımlamalar yapılabilmektedir. Bu yerlerde (kodlanmamış) fonksiyonel bir gen yok ise hiç düzeyde yada çok az düzeyde mutasyon gerçekleşir.

Uygun yöntemler kullanılarak sekanslar kaydedilir ve karşılaştırmaları yapılır. Özellikle *Ganoderma* cinslerinin analizleri açısından oldukça sıklıkla kullanılırlar. Çoğu zaman nükleer ve mitokondriyal rDNA kodlayan bölgeler filogenetik ilişkilerin belirlenebilmesi için yeterli bilgi verememektedir. Bu anlamda cins düzeyinde tanımlamalarla yetinmek gerekmektedir (Moncalvo, 2000).

Yapılan çalışmalar nükleotid konumlarının bütün ITS ler için aynı olduğunu fakat varyasyonların çoğunun ITS1'in terminal bölgesiyle, ITS2'nin uç kısmında olduğunu göstermiştir (Moncalvo ve ark., 1995a).



Şekil 7. A) ITS lokasyonunu gösteren rDNA gen organizasyonu. B) A da daire içine alınan kısmın büyütülmüş şekli. DNA amplifikasyonu için kullanılacak uygun primer yerleri 18S ve 25S’lik rDNA arasında uygulanmaktadır.

Kullanımdaki bir diğer avantaj ribozomal DNA genlerinin tekrarlayan dizilerden oluşmasıdır. Yaklaşık olarak genom başına 50 kopya kadar düşer. Bu da amplifikasyonda “single copy” tek kopya genin çalışılmasından daha avantajlı ve kolaydır.

1.9. İzozimler

İzozim (İzoenzim), farklı genler tarafından üretilen, ancak birbirine çok benzeyen enzimleri ifade etmekte ve aynı genin farklı allellerinden meydana gelen allozimlerle (alloenzim) çoğu zaman karıştırılabilmektedir. Bu kavram kargaşası literatürde çok yaygın olarak bulunmakta ve birbirleriyle yer değiştirilerek kullanılmaktadır (Aldrich ve ark., 1992).

1.9.1. İzozimlere genel bakış

İzozim analizi basit, başarılı ve ucuz bir teknik olması sebebiyle taksonomi, genetik, virülanslık, bitki patojenlerinin epidemiyolojisi, populasyon genetiği ve özellikle mantar araştırmalarında sıkça kullanılmaktadır (Munoz, 1997).

İzozimler tek bir enzimde birçok moleküler formda bulunabilirler. Bu formlar genellikle benzerlikler göstermekte fakat şayet identik değillerse bu durum gerek enzimatik işlevselliğe gerek de protein kodlayan DNA sekansının aminoasit kompozisyonunda oluşturduğu farklılıklarla belirlenir (Munoz, 1997).

Yapılan çalışmalar izozimlerin 3 değişik genetik ve biyokimyasal lokusdan kaynaklandığını göstermiştir. Bunlar (1) tek lokusdaki birçok allelden, (2) birçok lokusdaki tek veya çok allelden yada (3) transkripsiyon prosesleri sonucu ortaya çıkan ikincil izozimler şeklinde ifade edilir (Micales ve ark., 1992).

Tek lokusda birden fazla allellik durumuna bakıldığında yaklaşım gen lokusunun durumuna göre belirlenmiştir. Bir mantar populasyonunda belirlenen

herhangi bir gen lokusu monomorfik olabilir (örneğin populasyonda tek bir alleli eksprese eden) yada polimorfik (örneğin populasyonda birden fazla alleli eksprese eden) olabilir. Genetik lokus polimorfik olduğu zaman izozimler değişik allellerin eksprese olmasıyla allozim (Alloenzim) adını alırlar. Başka bir ifadeyle allozim, birbirinden ayırt edilebilen allelleri bulunan enzimleri ifade etmektedir. Allozimler aynı genin farklı allelleri tarafından meydana getirilmektedir. Her allel belli bir polipeptid zincir yapısını kodlamaktadır. Bu yüzden allozimin yapısı allel sayısı ve nukleotid sekansına göre değişkenlik gösterir. Allellerin sayısı organizmadan organizmaya nükleer durumlarına göre (monokaryotik, dikaryotik), ploid sayısına göre (haploid, diploid) ve genetiksel yapısına (homozigot, heterozigot) göre değişkenlik gösterir. Allozimlerden haploid veya homozigot olanlar basit elektroforetik bantlar verir iken, dikaryotik yada heterozigot yapıdaki alleller daha kompleks yapıli bant oluşumu gösterir. Bunun nedeni iki ayrı allelin ekspresyonudur. Enzimler bir yada daha fazla polipeptid zincirleri içerirler. Tek polipeptid zincir içerenler monomerik enzimlerdir ve bunlar elektroforetik yöntemlerde organizma heterozigot yapıda olsa dahi kolay teşhis edilirler diğer taraftan iki yada daha fazla polipeptid zincire sahip enzimler multimeriktirler, bunların elektroforetik tespiti ise daha zordur (Bonde ve ark., 1993).

Birden fazla lokusda tek veya çok allellik durumuna bakıldığında lokus sayısındaki fazlalık buradan elde edilecek izozimlerin büyüklük ve yükü gibi faktörlerde değişiklikler gözükmesine ve elektroforetik uygulamalarda farklı bantlaşmalar şeklinde kendini göstermektedir. Ayrıca uygulama için seçilecek boya çeşitleri ve kimyasal özellikleri iyi analiz edilmelidir. Şöyleki örneğin esteraz ve alkalın fosfataz tespiti yaparken seçilecek boya pek de seçici olmayan bu izozimlerin ikisini de boyamaktadır bu da analizi güçleştirmektedir (Vallejoz, 1983).

Translasyon sonrası oluşan ikincil izozimler deaminasyon, sülfidril gruplarının oksidasyonu, karbohidrat ilavesi veya çıkarılması, benzer şekilde fosfat değişimleri gibi etkinlikler neticesinde oluşan bu izozimler genel olarak sabit bir form göstermeleriyle her allelde göç eden bantlar şeklinde sabit bir yapı arz ederler (Royse, 1982).

1.10. Transformasyon

Rekombinat DNA tekniklerinin geliştirilmesinde en önemli faktör şüphesiz genetik transformasyon sistemlerinin keşfidir. Bu sayede organizmaların genomik yapısına saflaştırılmış DNA'lar manipule edilebilmektedir. Genetik transformasyon sistemleri günümüzde sürekli yeni teknikler uygulanarak geliştirilmektedir. Çalışılan organizmaya uygun, basit yöntemler içeren, ucuz ve kolay uygulanabilir metodlar geliştirilmelerindeki en büyük etkenlerdir (Fincham 1989; May 1992; Riach and Kinghorn 1996).

1.10.1. Protoplast transformasyonuna genel bakış

Mantar hücrelerinden protoplast preparasyonları hücre duvarını parçalayan enzimlerle (litikaz, novozim vb.) gerçekleştirilmektedir. Bu enzimler ticari olarak mevcuttur. Uygulamada en uygun enzim yada enzim kombinasyonları ile çalışmak başarılı bir transformasyon için elzem niteliği taşır. Bazı mantar gruplarının enzimlerce parçalanmaya alternatif olarak lityum iyonları ile de hücre duvarlarının parçalandığı bildirilmiştir. (Dhawale ve ark., 1984).

1.10.1.1. Protoplast transformasyonu**1.10.1.1.1. Hücre tipi, gelişim fazı ve gelişim koşulları**

Başlangıç olarak çalışılacak hücreler genç misel yada germinasyon yapabilen basidiospor yapıları olmalıdır. Dormant spor yada çimlenme kabiliyetine haiz olmayan sporlar protoplast eldesi için uygun değildir. Benzer şekilde misel seçimi önemlidir. Bunun nedeni enzim muamelesi ile, hiflerden açığa çıkan protoplastların hifsel debrislerde rahatlıkla ayrılabilmesinin genç misellerde oldukça rahatlıkla gerçekleşebilmesi fakat yaşlı misellerde bu durumun kolay gerçekleşmemesi ve düşük protoplast frekansı ile açıklanır (Buxton ve ark., 1983).

1.10.1.1.2. Hücre duvarının litik enzimlerce muamelesi

Uygun enzim seçimi bu tarz uygulamalarda anahtar rol niteliği taşır. Bu amaçla birçok ticari enzim (litikaz, novozim, lywallzym vb.) yada enzim kombinasyonları mevcuttur. Bunlar arasında *Trichoderma viridae*'den izole edilen Novozim 234 (Riach ve Kinghorn 1996) en fazla kullanılanıdır. Bu enzimlerin çoğu 1-3 glukanaaz ve kitinaaz gibi hidrolitik enzimlerdir (Binnering ve ark.,1987).

Protoplast stabilizasyonu da önemli bir faktördür. Bu amaçla magnezyum sülfat, mannitol, sorbitol yada sükroz kullanılabilir. Bunların saklanması ve uygun bir şekilde muhafaza edilmeleri protoplast frekansının belli bir değere ulaşmasında önemli sayılacak etkenlerdendir.

1.10.1.1.3. DNA'nın alınması

DNA'nın(lineer veya sirküler çift iplikli) protoplastlarca alınımı polietilen glikol (PEG) ve Ca iyonlarının etkinliğinde gerçekleşir. Genel olarak oda sıcaklığında 15-30 dakika'lık inkübasyon DNA'nın alınımı için yeterli bir süredir.

Protoplast transformasyonlarında kullanılacak kalsiyum iyonu miktarı genellikle 10 mmol L⁻¹ yada 50 mmol L⁻¹'dir. Protoplast frekansı genellikle 10⁸-10⁹ tercih edilir. DNA konsantrasyonu çok değişken olmakla birlikte genellikle 5µg ml⁻¹ düzeyleri tercih edilir (Binnering ve ark., 1987).

1.10.1.1.4. Rejenerasyon besiyeri

Transforme olan hücre gelişimi için çalışılan mantar yada organizmaya uygun ortamlar seçilmelidir. Bu amaçla sıvı yada katı ortamlar tercih edilebilir. Genellikle katı ortamlardan daha verimli sonuçlar alınmakla birlikte yumuşak tabakalı agarla sandwich yöntemi sıklıkla kullanılan metodlardandır (May., 1992).

1.10.1.1.5. Lityum asetat muamelesi

Lityum asetat ile muamele genellikle *Saccharomyces cerevisiae*, *Coprinus cinereus*, *Ustilago violacea* gibi mantarlarda uygulanan bir yöntemdir. (Binninger ve ark., 1987). Germinasyonu gerçekleşen sporların lityum asetat varlığında DNA ile etkileşimi esasına dayanır.

PEG ilavesi bütün protokollerde neredeyse ortak bileşiktir. 10-40 % PEG 4000 genellikle kullanılır. PEG kalsiyum klorür ile birlikte ilave edilir. Etkinlikleri, muamele edilmiş hücrelerin kümeleşmesi ve transforme edilen DNA'nın tutulmasını sağlamaktır.

1.10.2. Elektroporasyon

Teknik biyomembranlarda elektrik sinyallerine bağlı olarak geri dönüşümlü permeabilitelere olanak sağlamaktadır. Bu şekilde DNA alınmaktadır. Uygulama hayvan hücreleri, bitki protoplastları, bakteri ve mantarlar için yapılmaktadır. Uygulamada hücre duvarının zayıflatıcı ajanlarla muamelesi esastır (Chakraborty ve ark., 1991). Alternatif bir metot da protoplastların elektroporasyonudur. Bu yöntem filamentöz mantarların transformasyonu için de sıklıkla kullanılmaktadır (Kothe and Free 1996).

1.10.3. Biolistik transformasyon

Çalışılan bütün filamentöz mantarlardan verimli bir transformasyon eldesi çoğu zaman mümkün olmamaktadır. Ayrıca bazı mantarlar için protoplast eldesi de oldukça problemli olabilmektedir. Biolistik transformasyon ilk defa 1987'de (Klein ve ark., 1987) de uygulanmıştır. Teknik, plazmid DNA'nın intakt halde kalın duvarlı mantar hücresi içine doğrudan alınımı ile gerçekleşmektedir. Bu metot DNA ile sarılı tungsten partiküllerinin yüksek hızda mantar sporu yada hifi içine alınması şeklinde gelişir. *N. crassa*, *Magnaporthe grisea*, *Trichoderma harzianum* (Riach ve

ark., 1996), *A. nidulans* (Gomes-Barcellos ve ark., 1998) ve sıklıkla *T. reesei* (Hazell ve ark., 2000)' ye yönelik çalışmalarda bu yönetime başvurulmaktadır.

1.11. Medikal mantarların biyoteknolojide yeri

Kanser, kardiyovasküler bozukluklar gibi kronik hastalıkların çoğunda bugün “fonksiyonel gıdalar” adıyla da bilinen ürünlerin tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir (Sadler ve Saltmarsh 1998). US Academy of Science tedavi amacıyla kullanılan bu gıdaları içerdiği faydalı bileşikler sayesinde sağlığa olumlu yönde katkı sağlayan her türlü modifiye edilmiş gıda şeklinde tanımlamıştır (Thomas ve Earl 1994). Fonksiyonel gıdalar tek başlarına hastalıkları bertaraf edemezler ancak iyileşme sürecini başlatma veya hastalığı önleme anlamında etkinlikleri tartışılmazdır (Steinmetz ve Potter 1991).

Dünya genelinde özellikle doğuda birçok mantardan elde edilen bileşikler sağlık amacıyla kullanılmış ve geleneksel anlamda sağlığa olan katkılarına ilişkin bilgiler günümüze kadar gelmiştir. Yaklaşık 270 mantar türünün bu anlamda terapötik etkileri olduğu bildirilmiştir (Ying ve ark., 1987). Bugün medikal mantar deyimi dünya genelinde gelişen bir dal haline gelmiştir. Yenilebilir mantarlardan medikal anlamda yada fonksiyonel etkinliğe sahip olanlar *Lentinula*, *Hericium*, *Grifola*, *Flammulina*, *Pleurotus* ve *Tremella* veya medikal etkinliklerine göre *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor* en fazla bilinenleridir.

Geçmişe bakıldığında birçok mantar türü doğadan ağaçlardan yada ölmüş ağaç kütlelerinden temin edilmekteydi. Bugünlerde artan önemleriyle paralel olarak birçok laboratuvar ortamında yada bu anlamda özelleşmiş fabrikalarda mantarların doğal gelişim şartları yapay olarak sağlanarak gerek yemeklik gerek de tıbbi amaçlı üretimleri yapılmaktadır (Stamets 2000).

Hangi tip hastalık olursa olsun tedavisi amacıyla kullanılacak bileşiğin maksimum iyileştirme etkisi, hiç veya minimum toksik düzeye sahip olması beklenir. *Ganoderma* ve *Trametes* den elde edilen bileşikler neredeyse yok denecek düzeyde toksik etkilere sahiptirler. Bu da biyoteknolojik açıdan da neden giderek büyüyen bir araştırma sahası olduklarını açıklamaktadır.

Biyoteknoloji insanların hayatını kolaylaştıran geniş perspektiflere sahip yeni atılımlara açık bir bilim dalıdır. Bu anlamda kendi anlayışı ile birebir özdeşleşen bu konuyu da bünyesine katarak gelişimi için desteklemesi hiçde şaşırtıcı değildir.

1.12. Çalışmanın amacı

Morfolojik karakterlerdeki değişken yapı mantar sınıflandırmalarını oldukça güçleştirmektedir. Özellikle Poliporlar bu konuda oldukça fazla güçlüklerle karşılaşılacak gruplardır.

Polyporaceae familyasına ilişkin filogenetik analizler mt SSU rDNA analizlerinin konservatif yapı ve gerekli informasyonu taşımasından dolayı moleküler işleyiş açısından oldukça tercih edildiklerini göstermiştir. Yakın zamanda DNA sekans analizleri ile yapılan çalışmalarda PCR amplifikasyonu uygulamaları çalışmaya hız kazandırması açısından oldukça fazla tercih edilir olmuştur. Bu yüzden gereken uygun primer seçimi, ve hedef sekansların tespiti, filogenetik analizi daha kolay işler hale getirmiştir. Fungal 18S, 5.8S rDNA ve ITS sekanslarının neredeyse tamamının PCR ile amplifiye olabilmeleri buna karşın mt SSU rDNA'ların sadece kısmi olarak amplifikasyonlarının sağlanabilmesi uygulamaların işlevliliği açısından göreceleri de beraberinde getirmiştir. Bu tip sekansların moleküler sistematik ve polipor familyalarının mt SSU rDNA'sına dayanan filogenetik analizler açısından çok verimli olmadığı, bunun yerine ribozomal DNA analizlerinin ve ITS sekanslarının birlikte ele alınmalarının daha verimli sonuçlar doğurabileceği belirtilmiştir (Alexopoulos ve ark., 1996; Hibbet ve Donoghue, 1995).

Çalışmada hedefimiz dünya genelinde ticari olarak kullanılan *G. lucidum* suşlarına alternatif olarak Türkiye'ye özgü *G. lucidum* suşlarının tespit edilerek optimal gelişim koşullarının araştırılması, ayrıca kesin teşhis için 5.8S ribozomal DNA ile sekans analizi ve gerek *Ganoderma* gerek de *Trametes* cinslerinin etkileşiminin protoplast füzyonu ile tespit edilmesi ve melezlerin izozim kalıplarının determinasyonu şeklinde yürütülmüştür.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ross ve arkadaşları, *Coprinus sp.*'ye ait monokaryon, dikaryon, ve monokaryon solüsyonlarından elde ettikleri protein ve izozimleri poliakrilamid jel elektroforezinde analiz etmişlerdir. Protein ve izozim spektrumundaki veriler Wang ve Raper'in *Schizophyllum* cinsi basidiomiset mantarıyla yaptıkları çalışmada tespit ettikleri uyum/uyumsuzluk faktörleri ile karşılaştırılmıştır (Ross ve ark., 1973).

Gold ve arkadaşları 16 günlük *Phanerochaete chrysosporium* miselyumunu 2 ticari enzim kullanarak protoplast hale getirmişler ve regenerasyon sıklığının 10 % sorboz ve 3 % agar ilave edilmiş besiyerinde 5 % daha arttığını bildirmişlerdir (Gold ve ark., 1983).

Tanksley ve Orton bitkiler üzerinde yaptıkları izoenzim çalışmalarında enzim markırlarının birçok organizmada olduğu gibi bitki türlerinin tanımlanmasında da önemli kriterler olduklarını belirtmişlerdir (Tanksley ve ark., 1983).

Dhawale ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada mantar hücrelerinde lityum iyonları kullanılarak, hücre duvarlarını DNA geçişi için permeabl hale getirmişler ve bu konuda hücre duvarı parçalayıcı enzim kullanmadıkları için çalışmaları farklı bir uygulama olarak kabul edilmiştir (Dhawale ve ark.,1984).

Mukherjee ve arkadaşları *Volvariella volvaceae* mantarından Novozim 234 enzimi kullanarak protoplast elde etmişlerdir. Regenerasyon sıklığının sıvı besiyerinde az, bunun tam tersi olarak 0.5 % agar ilave edilmiş katı besiyerinde ise oldukça fazla olduğunu (50 %) tespit etmişlerdir. Elde edilen protoplastların UV'ye oldukça hassas oldukları, bununla birlikte herhangi bir farklı morfolojik karakter yada okzotrof mutant ile çalışma sırasında karşılaşılmadığı bildirilmiştir (Mukherjee ve ark., 1986).

Gardes ve arkadaşları değişik coğrafik bölgelerden temin ettikleri 40 *Frankia* türünde elektroforetik seperasyona bağlı izozim analizi yapmışlar ve test ettikleri bütün enzim sistemlerinde oldukça fazla varyasyon tespit etmişlerdir. Bunlar içinde diaforaz ve esteraz da çok fazla polimorfizm gözlenirken en az değişkenlik fosfoglukoz izomeraz ve malat dehidrogenazda tespit edilmiştir (Gardes ve ark., 1987)

Ojala ve arkadaşları, bitkilerde melezleme çalışmaları yapmışlar ve çalıştıkları *P. bracteatum*, *P. orientale* ve *P. pseudo-orientale* örnekleri arasında gerçekleşen ve oluşan melezlerdeki tohumların verimliliğinin açık tozlaşmayla elde edilen tohumların verimliliği ile hemen hemen eşit olduğunu savunarak Oxytona seksiyonunda kendine uyumsuzluk nedeni ile kendilendikleri zaman çok az sayıda tohum elde edildiğini belirlemişlerdir.

Ayrıca bu çalışmada tüm hibritlerde morfoloji, alkaloit analizi ve mayotik eşleşme konularını ele almışlardır. Sonuçlara dayanarak farklı bir genom evrimi modelini önermişlerdir. Önerdikleri genomik yapı daha çok *P. bracteatum* (AA), *P. orientale* (AA B1B1) ve *P. pseudo-orientale* (AA B1B1 B2B2) şeklindedir. B1 ve B2 genomlarının birbirleri ile eşleşebilirliğini belirlemişler. Ancak eşleşmede kendi cinslerini tercih ettiklerini de vurgulamışlardır. Bu açıklama hem melezlerde mayoz bölünme esnasında kromozomların eşleşme davranışını hem de seyrek olsa bile multivalentlerin nasıl oluştuğunu da daha anlaşılır bir temele oturtmaktadır (Ojala ve ark., 1990).

Sivan ve arkadaşları, *Trichoderma harzianum*'a ait genç hifleri kullanarak protoplast elde etmişler ve her protoplastın yaklaşık 4-6 nükleuslu, bir çoğunun da 3µm uzunluğa sahip olduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca *Trichoderma*'nın okzotrofik mutantından elde edilen bir mutant başka bir okzotrofik mutant ile etkileştirilmiş ve intrastrain nükleer transfer sonrası değişken, prototrofik, ve heterokaryotik yapılarla karşılaşmıştır. Benzer şekilde interstrain transfer yapılmış ve doğal tip prototrof, lizin yoksunu protoplastlara nakledilmiş ve regenerasyon besiyerindeki protoplastlarda 48 saat sonra düşük dozda lizin varlığı tespit edilmiştir (Sivan ve ark., 1990)

Bachmann'ın yaptığı izoenzim çalışmasında genom üzerinde kodlama yapan, kodlama yapmayan, tek kopya veya DNA dizi tekrarlarının da bulunduğu bölgelerin hepsinde DNA polimorfizmi meydana gelebildiği oysa enzimi kodlayan lokusların genom boyunca rastgele dağılım göstermediği belirtilmiş diğer bir ifadeyle, alloenzim markırlarının genel olarak genlerin kodlama yapan dizilerindeki farklılıklarla ve fonksiyonel enzim gruplarıyla sınırlı olduğu belirtilmiştir (Bachmann, 1993).

Dupuis ve arkadaşları, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Freudenreichii*'de lipaz ve esteraz aktivitesi çalışmışlar, ve lipaz aktivitesinin bütün hücrelerde ve kültür supernatantında gözlemlendiğini en yüksek aktivitenin 45°C ve pH 6.8'de olduğunu, esteraz aktivitesinde kültür besiyerinde ve elektroforetik tekniklerle 3 ila 6 arasında gözlenen bant yapılarıyla tespit edildiğini, bunlardan iki esteraz enziminin çalışılan bütün türlerde kaydedildiğini belirtmişlerdir (Dupuis ve ark., 1993).

Bourbonnais ve arkadaşları, *Trametes versicolor*'dan saflaştırılan iki lakkaz izoenzimi çalışmışlardır. İzoenzimlerin etkinliğinin birçok substrat ve lignin üzerinde olduğunu tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada bu enzimlere ait N terminal amino asit sekanslarını açığa çıkararak bildirilen diğer lakkaz sekansları ile mukayeselerini yapmışlar ve lakkaz enziminin lignin depolimerizasyonu yapan diğer lakkaz enzimlerle büyük oranda benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Test edilen iki izoenziminde sustratlar üzerindeki etkinlikleri benzer sonuçlar vermiş sadece polimerik substratların oksidasyon düzeylerinde değişikliklerle karşılaşmıştır (Bourbonnais ve ark., 1995).

Bretting ve Widrlechner adlı araştırmacılar bazı izoenzimlerin nötr olmadıklarını bu yüzden elektroforezde sadece amino asit dizisinde bulunan gerçek farklılığın sadece bir kısmının tespit edilebildiğini ve genetik çeşitlilik çalışmalarında aynı enzimatik aktiviteye ve elektroforetik yürüme oranına sahip izoenzimlerin homolog oldukları varsayımının amino asit analizi yapılmadan geçerli olamayacağını belirtmişlerdir (Bretting ve Widrlechner 1995).

Bryan ve arkadaşları bitki patojeni olan *G. graminis* türlerinin analizi için PCR teknolojisini kullanmışlar ve çalıştıkları türlerin neredeyse tamamına yakınında başarılı bir amplifikasyon sağlayarak, konservatif ribozomal DNA bölgelerinin spesifik ve tekrarlayan sekanslarının analizini yapmışlardır (Bryan ve ark., 1995).

Srinivasan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *Phanerochaete chrysosporium* mantarının lakkaz üretimi açısından değerlendirmesini yapmışlar ve bildirilen çalışmaların aksine bu mantarın ekstraselüler lakkaz enzimi ürettiğini çalışmalarında tespit ederek sonuçları SDS-PAGE'de gözlemlenen bantlaşmalarla ifade etmişlerdir (Srinivasan ve ark., 1996).

Weising ve arkadaşlarının, yapmış oldukları çalışmada RAPD-PCR yönteminde DNA'nın temiz olmasının önemi vurgulanıp, az miktarda parçalanmanın PCR ürün profilinin değişmesine sebep olabileceği, DNA'da meydana gelebilecek yüksek miktarda parçalanmanın ise amplifikasyonun yapılamamasına yani PCR ürününün oluşmamasına neden olabileceği belirtilmiştir (Weising ve ark., 1995).

Zhao ve arkadaşları *Volvariella volvacea* ve *V. bombycina* mantarlarında protoplast füzyonu çalışmışlar ve füzyon sıklığının 0.032 ile 0.333 % arasında gözlendiğini ayrıca rejenerasyon besiyerinden elde edilen heterokaryonlara ait nükleer DNA'ların parentallarla bir dereceye kadar benzeştiğini ama heterolog fragmentlerde arz ettiklerini belirtmişlerdir (Zhao ve ark., 2000)

D'souza ve arkadaşları, *Ganoderma lucidum*, *Phlebia brevispora*, *Trametes versicolor* mantarlarında PCR amplifikasyonu ile lakkaz spesifik sekans analizi çalışmışlardır. Yaptıkları çalışmada tüm örnekler istenilen PCR ürünlerini yaklaşık olarak 200 bp şeklinde vermiş, ayrıca nükleotid sekans benzerlik düzeyi 65-74 %, amino asit sekans benzerliği ise 83-91 % şeklinde tespit edilmiştir (D'souza ve ark., 1996).

Hseu ve arkadaşları *Ganoderma lucidum* türlerinde geleneksel taksonomik yöntemlerin dışına çıkarak ITS ve rDNA analizine dayanarak saptamalar yapmışlardır. İncelenen izolatlardan bazıları benzer ITS sekansları göstermiş bazıları ise farklılıklar göstermiştir, genetiksel anlamda parmak izi niteliği gören RAPD (random amplified polimorphic DNA) analizi ile taksonomik tanımlamaları yapılmış ve *G. lucidum* izolatları benzerlik yada farklılıklarına göre gruplandırılmıştır (Hseu ve ark., 1996).

Staub ve arkadaşlarının bildirdiğine göre enzim markırları genlerin ürettikleri proteinlerdir, izoenzimlerde farklı olarak yüklenmiş protein molekülleridir. Elektroforez tekniği kullanılarak kolayca ayrılabilirler. Enzimler özel biyokimyasal reaksiyonları katalizlerler. Belirli enzimlerin substrat ve kofaktörleri eklenerek jel üzerinde görülmesi sağlanır ve enzimatik reaksiyonların ürünleri renkli olarak üretilir. Renkli ürünler jel üzerinde görülür bantlar oluşturur. Bu bantlar genetik temellere sahiptir ve kodominant markır olarak genetik bilgi sağlar. Bununla birlikte morfolojik karakterlere göre çok daha yaygın kullanılmakla birlikte izoenzim

lokuslarının azlığı ve bazı enzim sistemlerinin çevre koşullarından etkileniyor olması kullanımlarını sınırlamaktadır (Staub ve ark., 1996).

Stockinger ve arkadaşları, markırlar yardımıyla seleksiyonda genelde fazla sayıda bireyle çalışıldığı için PCR'a dayalı markırların daha fazla tercih edildiğini belirtmektedirler. Yaptıkları çalışmada, *Emperor francis* meyvesinin mikrosporlarından elde edilmiş olan kallus kültürlerinden kısmi bağlantı haritaları oluşturulmuştur. Kallus kültürleri ile 2 alloenzim ve toplam 79 adet RAPD primeri kullanılarak 90 RAPD markır elde etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda 10 bağlantı (linkage) grubu üzerinde 89 markır haritalanmıştır (Stockinger ve ark., 1996).

Yaver ve arkadaşları *Trametes villosa* mantarından iki lakkaz enzimi saflaştırmışlar ve bu yapıların 63 kDa'lık alt ünitelere sahip olduklarını ve SDS-PAGE jelde tipik mavi lakkaz bantlaşmalar gösterdiklerini yaptıkları çalışmada belirtmişlerdir (Yaver ve ark., 1996).

Daniel Cullen isimli araştırmacı yaptığı çalışmada beyaz çürükçül mantarların moleküler genetik yapısına ışık tutarak yapıları, genomik organizasyonları, transkripsiyonel regülasyonları, enzim içerikleri gibi durumlara açıklık getirmiştir (Daniel, 1997).

Golembiewski ve arkadaşları *Agrostis stolonifera* çeşitlerini belirlemek için izozim elektroforez metodunu kullanmışlardır. İzozim elektroforezde sınırlı sayıda izozim içermesinden dolayı oldukça yakın genotipler arasında çok az polimorfizm belirlenmiştir.

Her izozim analizi için taze bitki örneklerinin kullanılması gerektiği, ayrıca izozim analizi için kullanılan proteinin RAPD için gereken DNA'dan daha stabil olması gerektiğini belirtmişlerdir (Golembiewski ve ark., 1997).

Munoz ve arkadaşları, *Pleurotus eryngii* mantarıyla yaptıkları çalışmada elektroforetik yöntemlerle iki lakkaz izoenzimi izole etmişlerdir. Lakkaz I ve II adını verdikleri bu izoenzimlerin monomerik yapılı ve 1-7 % düzeylerinde karbohidrat içeriğine sahip olduklarını, SDS-PAGE analizlerinde 65 ve 61 kDa olduğunu belirtmişlerdir (Munoz ve ark., 1997)

Yang ve arkadaşları çevre koşullarının *Ganoderma lucidum*'un polisakkarit formasyonuna olan etkilerini araştırmışlar ve gelişim için optimal sıcaklığı 30-35°C şeklinde optimal pH'yı da 4-4.5 şeklinde tespit etmişlerdir. Ayrıca glukoz ve amonyum klorürden oluşan besiyerinde polisakkarit formasyonunun artış gösterdiğini, havalandırmanın polisakkarit artışına olumlu tesir ettiğini bildirmişler ve şayet uygulama çalkalamalı kültürlerde yapılacaksa 150 rpm'nin polisakkarit formasyonunda etkin olduğunu çalışmalarında ifade etmişlerdir (Yang ve ark., 1998).

Campbell ve Racjan *Lentinula edodes* mantarını İngilterenin iklimatik koşullarında yetiştirmiş ve optimal parametreleri açığa çıkararak değerlendirmişlerdir. 4 farklı *Lentinus edodes* türü çalışma için kullanılmış, üretim koşulları değerlendirilmiş ve polietilen torbalardan elde edilen basidiokarplar ıslak ve kuru ağırlıklarına göre ölçülerek çalışma neticelendirilmiştir (Campbell ve Racjan, 1999).

Olaf Schmidt adlı araştırmacı ağaç çürükçülü olan *Serpula lacrymans* mantarının karakterizasyonunu ve identifikasyonunu yaparak mantardaki protein, nükleik asit, misel yapısı, elektroforetik protein karakteri, DNA sekans analizi vb.. yönlerden incelenmesini sağlayarak oldukça geniş bir perspektifte değerlendirmiştir (Schmidt, 1999).

Byong ve ark., *Lentinus lepideus* mantarı üzerinde protoplast analizleri yaparak mantarın farklı litik enzimler, stabilizatörler ve rejenerasyon ortamlarında verdiği tepkileri kaydetmişler ve buna göre koloni morfolojisi için PDA, litik enzim olarak novozim 234, stabilizatör olarak da süktroz ve MgSO₄'lü ortamların elverişli olduğu sonucunu belirtmişlerdir (Byong ve ark., 2000).

Crawford'a göre biyokimyasal markırların ilk grubunu enzimler oluşturmakta olup, enzimlerde izoenzimler ve alloenzimler olarak iki grupta toplanabilmektedir. İzoenzim farklı bir lokus tarafından kodlanan bir enzimin farklı moleküler formları olarak tanımlanabilir. Alloenzimler ise aynı lokustaki farklı alleller tarafından kodlanan bir enzimin farklı moleküler formlarıdır. İzoenzimler bitkilerde 1960'lerde kullanılmaya başlanmıştır. İzoenzim verileri poliploidiyi araştırmada çok değerli olup, poliploidlerin orijinini ve evrimini araştırmada teşvik edici bir rol oynamıştır. Enzimlerin çok iyi bilinen sınırlılıklarına rağmen onların kullanımları hem genetik

düzeyde hem de organizma düzeyinde olmakla birlikte, sistematik ve evrim ile ilgili sorular üzerinde yoğunlaşmıştır. Azalan ilgiye rağmen, enzim elektroforezi bitki ve hayvan sistematğine önemli bir etki yapmıştır ve bu alandaki önemini korumaktadır (Crawford, 2000)

Hundt ve arkadaşları Triklosan metabolizasyonu yapma yeteneği yönünden *Trametes versicolor* ve *Pycnoporous cinnabarinus* mantarlarını incelemişlerdir. Çalışma sırasında *Trametes* 'in 3 metabolit ürettiği kaydedilmiştir. Bunlar 2-O-(2,4,4-triklorodifenil eter)-b-D-ksilopiranosid, 2-O-(2,4,4-triklorodifenil eter)-b-D-glukopiranosid, ve 2,4-diklorofenol'dür. *Pycnoporous cinnabarinus* mantarında triklosanı 2,4,4*-trikloro-2*-metoksidifenil eter ve glikozide çevirdiği kaydedilmiştir (Hundt, 2000).

Kumlay ve arkadaşları, protein ve DNA polimorfizmine dayanan moleküler tekniklerin, seleksiyonda etkili olan markırların kullanılabilmesini sağladığını belirterek teknoloji sayesinde, yeni çeşitlere gidilmeden ökaryotiklerin genetik olarak modifikasyonunun mümkün olabildiğini belirtmektedirler (Kumlay ve ark., 2000).

Seong ve arkadaşları nötral protein bağlayan ve asidik protein bağlayan 2 polisakkariti *Ganoderma lucidum*'dan etil alkol presipitasyonu ile elde etmişler ve bu polisakkaritlerin antiviral etkilerini araştırmışlardır. Herpes simplex virus tip 1 (HSV-1) ve tip 2 (HSV-2) çalışmada kullanılmış ve sonuçta antiviral etkilerin doğrudan HSV spesifik proteinlere bağlanmayla gerçekleştiğini ve polisakkaritlerin önemli düzeyde virucidal etkinliğe sahip oldukları belirtilmiştir (Seong ve ark., 2000).

Smith ve Siwasithamparam Avustralya izolatları olan *Ganoderma*'ları ITS DNA sekans analizi yaparak filogenetik olarak sınıflandırmışlardır. Sekans istatistikleri oldukça değişik sonuçlar bildirmiş ve analiz edilen bazı türlerin isimlendirilerek sistematikte herhangi bir sınıfa sokulmadığı gözlenmiştir. Ayrıca *Elfvigia* ve *Ganoderma*'nın *Ganoderma*'nın alt cinsleri olduğu, benzer şekilde *G. chaliceum* kompleksinin de *Ganoderma* altında bir cins olarak, *G. microsporum*'un da *G. weberianum*'un sinonimi şeklinde değerlendirmelere yer verilmiştir (Smith ve Siwasithamparam., 2000).

Takeshi ve arkadaşları iki *Pleurotus* cinsi mantardan interspesifik melez elde ederek karyotip analizi yapmışlardır. *P. ostreatus* ve *P. cornucopiae* mantarlarının okzotrof mutantlarını kullanmışlar ve protoplastları elektriksel bir ortamlarda transforme etmişlerdir. Esteraz izozim analizi bazı mutantların her iki mantara ait izozim bantlarını içerdiğini bazılarının ise sadece bir tip mantara ait bant yapısına sahip olduğunu göstermiştir (Takeshi ve ark., 2000).

Cheung'un yaptığı çalışmada *G. lucidum*'a ait sıvı ekstratlarda nükleosid (adenozin, üridin) ve baz (urasil) markırlarının elektrokinetik kromatografik analizleri yapılmıştır. Markır separasyonu ve sistemin işleyişine ait veriler çalışmada bildirilmiş ve bu tarz uygulamalara işleyişindeki kolaylık sebebiyle, alternatif bir çalışma şeklinde değerlendirilmiştir (Cheung, 2001).

Li Sun ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *Ganoderma lucidum*'dan elde ettikleri protoplastları *Lentinus edodes*'den elde ettikleri gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GPD) enzimiyle muamele etmiş, elektroporasyon tekniği kullanarak transformasyon gerçekleştirmişler ve GPD promotorunun kullanılarak ekzojenik genlerin *G. lucidum*'da eksprese olabileceğini çalışmalarıyla göstermişlerdir (Li Sun ve ark., 2001)

Jeng ve arkadaşları *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma tsugae* ve *Trametes versicolor* mantar bileşiklerini incelemişler ve içeriklerindeki serbest aminoasit, nükleotid, ve çözülebilir şeker kompozisyonlarını belirlemişlerdir. İncelenen *Ganoderma* cinslerinde 7.18–7.92 % düzeyinde protein, *Trametes*'de ise 4.20 % düzeylerinde protein tespiti yapmışlardır. Karbohidrat içerikleri yönünden yapılan incelemede ise *Ganoderma* üyelerinde 21.83–27.78 %, *Trametes*'de ise 65.09 % düzeyinde karbohidrat tespit edilmiştir. Toplam serbest amino asit miktarı ise 4.25 - 14.04 mg g₋₁ şeklinde belirlenmiştir (Jeng ve ark., 2001).

Xingfeng ve arkadaşları *G. lucidum*'dan elde ettikleri 2 heteroglikan (PL-1 ve PL-4) ve bir glukanın (PL-3) kimyasal yapılarını inceleyerek glikozil rezidüleri ve kompozisyonlarını analiz etmişler ve sonuçlarını değerlendirerek bu polisakkarit yapılarının kimyasal haritalarını çıkarmışlardır (Xingfeng ve ark., 2001).

Woo ve arkadaşları *Ganoderma lucidum* mantarının miselyumundan izole ettikleri biri suda çözülebilir biride çözünmez iki bileşiğin kanserli bir hamster üzerinde etkilerini araştırmışlar ve her ikisinde de kanserli hücreler üzerinde inhibitör etkiler tespit etmişlerdir. Bunların düzeyleri ve uygulama yöntemlerini çalışmalarında belirterek hayvana enjeksiyonunu takiben hayvanın bünyesinde meydana gelen değişiklikleri ve bileşik miktarlarındaki artış yada azalışları analiz ederek immün sistem üzerindeki etkileri doğrudan analiz etmişlerdir (Woo ve ark., 2001).

Carolan ve arkadaşları *P. bracteatum*, *P. orientale* ve *P. pseudo-orientale* türlerinin morfolojik ve sitolojik özelliklerini irdelemişlerdir. Bunlar arasındaki farklılıkların her zaman net olmadığını ve türler arasındaki değişikliklerin birbirine geçiş yapabildiğini yani interspesifik hibridizasyon gerçekleşebildiğini belirtmişlerdir. Fenotipik benzerliklerden dolayı hücre kültürlerinde kullanılan türlerde yanlış teşhisin bu anlamda yaygın olduğunu belirtmişlerdir (Carolan ve ark., 2002).

Keunsook ve arkadaşları *Trametes versicolor* mantarında pAN 7-1 plasmidi kullanarak restrüksiyon analizi yapmışlar ve elde edilen bir çok mutantta preoksidaz aktivitesi tespit etmişlerdir. Çalışmada ayrıca elde edilen transformantların, herhangi seçici bir özelliği olmayan besiyerinde 10 pasajdan sonra stabilize ettiği ve olağan morfolojik durum sergilediği bildirilmiştir (Keunsook ve ark., 2002).

Xin ve arkadaşları *Ganoderma lucidum*'a ait dormant halde olan, germinasyon yapan sporlar ile sporoderm germinasyon yapan sporlar (duvar yapısı farklı şekillerde kırılarak germinasyonu indüklenmiş) ile bunlardan elde edilen lipidlerin hepatoma, sarkoma L-II hücrelerine sahip farede inhibitör etkilerini incelemişlerdir. Dormant haldeki sporlar germinasyonla indüklenebilir bu yüzden sporların biyoaktifliği değişken olabilmektedir. Bununla birlikte çalışma sırasında en fazla verim sporoderm sporlarda gözükmüş germinasyon yapabilen ve sporoderma sporlardan elde edilen lipidlerinde antitümör etkileri olduğu tespit edilmiştir (Xin Liua ve ark., 2002).

Aly ve arkadaşları *Fusarium* türleriyle multilokus-enzim ve hücre proteini çalışmaları yaparak 5 *Fusarium* türünü karakterize etmişlerdir. elde ettikleri veriler SDS-PAGE ve esteraz izoenzimlerinin izolatların özelliklerine göre gruplandırılmasında oldukça etken olduğunu göstermiştir. Ayrıca incelenen diğer izoenzimlerden malat dehidrogenaz ve peroksidazın güç çözüldüğü için sınırlı şekilde değerlendirme yapılabildiği ve bu yüzden fazla tercih edilmediği bildirilmiştir. Sonuçlar interspesifik varyasyonlara ilişkin tespitlerde protein markırlarının efektif olarak kullanılabileceğini, izozim analizlerinin de bu anlamda uygulanabileceğini ancak seçilecek izozimin kimyasal yapısına dikkat edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur (Aly ve ark., 2003).

Carvalho ve arkadaşları *Aspidosperma polyneuron* yapraklarında poliakrilamid jel tekniği kullanarak esteraz tespiti yapmışlar ve 14 esteraz izozimi kaydetmişlerdir. Farklı boyanma karakterlerine göre Est-2'nin α -naftil asetatı hidrolize ettiğini, Est-6, Est-7 ve Est-8'in α naftil asetatı, Est-1, Est-3, Est-4, Est-5, Est-9, Est-10, Est-11, Est-12, Est-13, ve Est-14'ün hem α hemde β -naftil asetatı hidrolize ettiklerini belirtmişlerdir (Carvalho ve ark., 2003).

Chen ve Chen özellikle Tayvanda büyük öneme sahip *Ganoderma tsugae* mantarından 9 triterpenoid izole etmiş ve HPLC metoduyla kimyasal analizini yaparak bişenlerini açığa çıkarmışlardır (Chen ve Chen, 2003).

Idris ve arkadaşları *Ganoderma boninense* mantarında sekans analizi yapmıştır. Araştırmacı PCR primeri PER44-123 ve LR1 primeri kullanarak yaklaşık olarak 580bp ürün elde etmiştir. Bu şekilde *Ganoderma* DNA'sının PCR amplifikasyonu ile çoğaltılabileceği ve değişik izolatlar ın tanımlamalarının yapılabileceğini bildirmişlerdir (Idris ve ark., 2003).

Mukaila ve arkadaşları *Lentinus subnudus* mantarının gelişim gösterdiği ağaç kütükleriyle değerlendirmeler yaparak bu kütüklere sitrik, tartarik, indol asetik ve giberellik asitlerin ne yönde etkidiğini araştırmışlar ve 4 değişik ağaç kütüğünde yetiştiği tespit edilen bu mantarın basidiokarp gelişiminin böylesi bir kimyasal müdahalede ne şekilde etkileneceğini araştırmışlardır. *Chlorophora excelsa*, *Terminalia ivorensis*, *Terminalia superba* ve *Spondias mombin* araştırmanın yapıldığı ağaç türleridir. çalışma neticesinde 50 ppm indol-3-asetik ve gibberellik asit

ilavesi yapılan *C. excelsa*'da fruktifikasyonun diğer ağaç tiplerinde gelişen mantarlardan daha hızlı olduğu ortaya çıkmıştır (Mukaila ve ark., 2003).

Roseli ve arkadaşları bitki patojeni olan *Rhizoctonia solani*'de ITS-5.8S rDNA nükleotid sekans analizi yapmışlar ve 5.8 S rDNA'nın (155 bp) test edilen bütün izolatlarda oldukça konservatif bir yapı gösterdiği ITS1 ve ITS bölümlerini ise uzunluk anlamında değişkenlik arz ettiği belirlenmiş ve *Rhizoctonia* izolatlarının bu bigiler ışığı altında değerlendirmeleri yapılmıştır (Roseli ve ark., 2003).

Wagner ve arkadaşları *G. lucidum* ile yaptıkları çalışmada gelişmiş fermentasyon teknikleri kullanmışlar ve bu tekniklerle ortam koşullarının değişimi gibi faktörlerin biyomas oluşumlarına tesirlerini araştırmışlardır. Elde ettiikleri biyoaktif bileşenlerin yoğunluğuna bakarak tekniklerinde farklılaşmaya gitmişler ve optimal parametreleri çalışmaları için belirtmişlerdir (Wagner ve ark., 2003)

Alves ve arkadaşlarının çalışması endüstriyel anlamda öneme sahip bir mantar olan *Pycnoporus cinnabarinus* mantarının transformasyon ve ekspresyonunu içermektedir. Çalışmada lakkaz yoksunu olan monokaryotik izolat, lac 1 lakkaz geni kullanılarak lignin parçalayabilir hale getirilmiştir. Çalışmada elde edilen rekombinantlardan elde edilen lakkaz aktivitesi ile bu organizmanın başka proteinlerce de alıcı olarak kullanılabileceği sonucu doğmuştur (Alves ve ark., 2004).

Beltrame-Botelhoa ve çalışma grubu dünyanın farklı coğrafik bölgelerinden izole ettikleri *Trypanosoma rangeli* türlerinde sekans analizi tespiti yaparak ITS etkinliğinde tek nükleotid polimorfizmini saptamışlar ayrıca ITS 2 bölümlerinin de filogenetik bilgi verme açısından fonksiyonel olduğu ve incelenen bütün izolatların interspesifik farklılıklar içerdiğini belirtmişlerdir (Beltrame-Botelhoa ve ark., 2004).

Mohammadi ve arkadaşları dünyanın farklı bölgelerinden temin ettikleri 13 *Fusarium oxysporum* üzerinde alkalın fosfataz, katalaz, esteraz, malat dehidrojenaz, ksantin dehidrojenaz enzimleri kullanarak karşılaştırmalı izozim analizi yapmışlardır. Çalışma sonunda *F. oxysporum* izolatlarına ait 22 elektroforetik fenotip tespit edilmiş, bunlar arasında da maksimum genetik çeşitlilik katalaz, esteraz, ve ksantin dehidrojenaz enzimleri için tespit edilmiştir (Mohammadi ve ark., 2004).

Pei-Sheng Yan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada yenilebilir mantar olan *Stropharia rugoso-annulata* da protoplast preparasyonu ve regenerasyonu çalışmışlar ve rejenerasyon özelliklerini irdelemişlerdir. Protoplast preparasyonu için optimal koşulların litik enzimlerle 30°C’de 3 saatlik süre zarfında karıştırma ile elde edildiğini tespit etmişler. (PGPM) patates, glukoz, pepton, ve mannitol içeren rejenerasyon besiyerinde gelişim hızının optimal olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca ozmatik stabilizatörlerden şekerlerinde (mannitol ve sükroz) inorganik tuzlara göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (Yan ve ark., 2004).

Burns ve arkadaşları, homobasidiomiset mantarlarda moleküler araç olarak nitelendirdikleri metodlarıyla promotor ve markır genlerin transformasyonda etkinliklerini araştırmışlardır. Bu amaçla *Agaricus bisporus* ve *Coprinus cinereus* mantarlarını yeşil floresans proteinini reporter gen olarak kullanmış ve analizlerini bu doğrultuda yapmışlardır. *C. cinereus* trp1 promotoru ile *A. bisporus* trp2 ve gpd2 promotorlarının *C. cinereus* ekspresyonunda başarılı sonuçlar verdiğini gpd3 promotorunun da *A. bisporus* üzerinde fonksiyonel olduğunu bildirmişlerdir (Burns ve ark., 2005).

Chienyan ve arkadaşları *G. lucidum*’dan elde edilen polisakkaritlerin miktarlarındaki artış yada azalışların karbon, magnezyum ve azot kaynakları ile çözünmüş oksijen düzeyleri gibi faktörlerin etkinliğinde olduğunu vurgulamışlar ve bu amaçla bu faktörlerdeki değişimleri çalışmalarında irdeleyerek çıkan sonuçların polisakkarit oluşumuna etkilerini değerlendirmişlerdir (Chienyan ve ark., 2005).

Dhitaphichit ve arkadaşları monokaryotik *Pleurotus ostreatus* ve *P. djamor* misellerinden protoplast izolasyonu yapmışlar, elde edilen protoplastları bir araya getirerek oda sıcaklığında 40 % PEG ile 20 dakika inkübe etmişler ve ardından rejenerasyon besiyerine almışlardır. Tespit ettikleri 412 koloninin mikroskop altında kanca oluşturup oluşturmadığına bakarak bu oluşumu gösteren kolonileri melez olarak nitelendirmişler ve gerek misel karakterindeki, gerek büyüme hızı gerek de esteraz bantlarındaki yapı benzerlik ve farklarının ana suşlarla mukayese etmişlerdir (Dhitaphichit ve ark., 2005).

Hexiang ve arkadaşları *G. lucidum*'dan izole ettikleri ve ganodermin adını verdikleri bir protein çalışmışlar ve 15 kDa'luk bu proteinin izolasyonunu DEAE-selüloz kromatografisi ile gerçekleştirmişler. Çalışmada antifungal özellik gösteren bu mantarın *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* ve *Physalospora piricola* gibi mantarların gelişimini önlediği kaydedilmiştir (Hexiang ve ark., 2005).

Chang ve arkadaşları çalkalama kültürde çalıştıkları *Ganoderma lucidum* mantarında farklı karbon kaynakları çalışmışlardır. Bunlar içerisinde en fazla esmer şeker ve malt şekerinin efektif olduğunu tespit etmişlerdir. Maya ve süttozunun da en iyi azot kaynakları olduğunu bildirmişler ve ayrıca tohum yağlarının da misel gelişimini olumlu yönde etkilediğini, ve bu şartlar altında optimal pH'nın 6.5 ve sıcaklığın 34°C olduğunu çalışmalarında ayrıntılı olarak bildirmişlerdir (Chang ve ark., 2005).

Xu Fei ve arkadaşları Zap ekspresyon klon vektörü kullanarak *G. lucidum*'a ait cDNA kütüphanesi oluşturmuşlardır. GPD geni, rekombinant faj klonlarının hibridizasyonu ve PCR amplifikasyonu ile elde edilmiş GPD spesifik gen problemlerinden izole edilir. cDNA ve genom DNA'sı karşılaştırıldığında nükleotid sekansının tamamında 338 aminoasitlik 6 intronla kesilmiş polipeptid zinciri tespit etmişler, gene ait aminoasit sekansında GPD proteinlerince maya ve filamentöz mantarlarla benzeştiğini kaydetmişlerdir (Xu Fei ve ark., 2006).

3. MATERİYAL ve METOD

Çalışma iki kademeli olarak sürdürülmüştür.

Birinci basamak Çukurova Üniversitesi mikrobiyoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla doğal ortamdan temin edilen polipor grubu mantarlardan *G. lucidum*'un izolasyonu, misel ve spor formlarının üretilmesi, basidiokarp oluşumunun sağlanabilmesi gibi mantar gelişim koşullarının incelenerek optimal değerlerin tespitine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

İkinci basamak Westminster Üniversitesi Biomedical Science laboratuvarında gerek mantar izolatımızın gerek de üniversite koleksiyonundan temin edilen *G. applanatum*, *Trametes versicolor* mantarlarıyla Tayland'dan temin edilen yeni bir *Trametes* cinsi üzerinde moleküler biyolojik düzeyde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla izolatlara filogenetik sınıflandırmalarının belirlenebilmesi için ITS, 5.8 S rDNA sekans analizleri yapılmış akabinde genetik manipulasyon amacıyla protoplast regenerasyonu yapılmış ve fusantlar morfolojik benzerlik ve esteraz izozimi yönünden incelenmiştir.

3.1. Mantar izolatları ve referans değerleri

Mantar izolatlarının spor, misel ve basidiokarp formları çalışma sırasında farklı amaçlar için kullanılmıştır.

İzolatların temin edildiği bölge, üniversite koleksiyon numaraları ve gen bankası kodları çizelge 1 de belirtilmiştir.

Çizelge 1.Çalışma sırasında kullanılan basidiomiset grubu mantarlar

Taxa	Orjin	Üniversite koleksiyon numarası	Gen Bankası giriş numarası
Basidiomiset izolat CB2	Prof. Christopher Bucke tarafından Kara Kavak da Mattingley, Hants, UK de temin edilmiştir.	997	AY605708
Basidiomiset izolat OC1	Prof. Ömer Çolak tarafından Meşe de Balcalı, Adana, Türkiye den temin edilmiştir.	gul	AY870653
Basidiomiset izolat LC3	Dr. Lerluck Chitradon, Kasetsart Üniversitesi, Bangkok Tayland dan temin edilmiştir.	995	AY605706
Basidiomiset izolat Thai	Prof. Christopher Bucke tarafından meşede Bangkok, Tayland dan temin edilmiştir.	Thai	_____

3.2. Kültür Ortamları

Spawn ve misel gelişimi ile meyve verimliliğinin saptanması amacıyla kültür ortamları iki aşamalı olarak incelenmiştir.

3.2.2. Misel İnokülasyonları

Çalışma sırasında kullanılan besiyerlerinden gerek spor çimlenmesi ile elde edilen gerekse doku kültürü yapılarak elde edilen miseller ile miselden misele pasajlama şeklinde ve uyumluluk analizleri için yapılan uygulamalara yönelik olarak kullanılan optimal gelişim besiyeri tespiti için incelenen besi ortamları çeşitlidir.

Bunlardan bir kısmı standart gelişim besiyerleridir. Diğer besiyerleri modifiye edilmiş besiyerleridir ve farklı oranlardaki kimyasal içeriklerin misel gelişim hızına etkinliğinin araştırılması amacıyla kullanılmışlardır.

Bu amaçla kullanılan besiyerleri ve içerikleri  izelge 2 de belirtilmiştir.

Çizelge 2. Besiyeri içerikleri ve misel gelişim hızları

Besiyerleri	İçerikleri (g/L)
Potato Dextrose Agar (PDA) (Raper ve ark.,1972)	Patates nişastası 4.0 g, Dextrose 20.0 g, Agar 15.0 g
*Mushroom Minimal Medium (MMM)	MgSO ₄ .7H ₂ O 0.5 g, KH ₂ PO ₄ 0.46 g, K ₂ HPO ₄ 1g, Glukoz 20g, Agar 20 g
*Mushroom Complete Medium (MCM)	MgSO ₄ .7H ₂ O 0.5 g, KH ₂ PO ₄ 0.46 g, K ₂ HPO ₄ 1g, Glukoz 20 g, Pepton 2g, Maya 2g, Agar 20 g
Yeast Complete Medium (YCM) (Elliot ve ark., 1986)	MgSO ₄ .7H ₂ O 0.5 g, KH ₂ PO ₄ 0.46 g, K ₂ HPO ₄ 1g, Glukoz 20g, Pepton 5g, Maya 5g, Agar 20 g
*Mushroom Complete Mineral Medium (MCMM)	MgSO ₄ .7H ₂ O 0.5 g, KH ₂ PO ₄ 0.46 g, K ₂ HPO ₄ 1g, Glukoz 20 g, Pepton 2g,, Maya 2 g, Agar 20 g Mineral solüsyon 10cc (4 mg ZnSO ₄ .7H ₂ O, 1mg CuSO ₄ .4H ₂ O, 7 mg MnCl ₂ .4H ₂ O, 10 mg FeSO ₄ .7H ₂ O)
*Ganoderma Complete Medium (GCM)	MgSO ₄ .7H ₂ O 0.5 g, KH ₂ PO ₄ 0.46 g, K ₂ HPO ₄ 1g, Glukoz 20 g, Pepton 4g,, Maya 10 g, Sükroz 20 g, Casamino acid 5 g, Agar 20 g
Fahraeus and Reinhammar medium (F&R)(Fahraeus ve Reinhammar. 1967)	Glukoz 20 g, L-Asparjin 2.5 g, L- Fenil alanin 0.15 g, Adenin 0.275g, Tiyamin HCl 50µg KH ₂ PO ₄ 1 g, Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O 0.10 g, CaCl ₂ 0.01 g, FeSO ₄ .7H ₂ O 0.01 g, MnSO ₄ .4H ₂ O 0.001 g, ZnSO ₄ .7H ₂ O 0.01g, CuSO ₄ .5H ₂ O 0.002 g, MgSO ₄ .7H ₂ O 0.5 g
** Alternatif gelişim besiyeri	Soya peptonu 10 g, Glukoz 5 g, Maya 4 g, KH ₂ PO ₄ 0.5 g, pH 7.5

* Modifize besiyerleri

** Bu besiyeri tarafımızdan modifize edilmiştir.

3.3. Sıcaklık

Sıcaklık aralıkları hakkında çalışma sırasında analiz yapılmamakla beraber uygulanan sıcaklık düzeyi çalışmada kullanılan mantar türleriyle yapılan diğer çalışmalarda gelişim için tespit edilen optimal seviyelerde alınmıştır.

Polipor grubu mantarlar 20-32 C ler arasında optimal seviyede gelişim göstermektedir. Bu değerlerinin dışındaki sıcaklıklarda ya basidiokarp meydana gelmemekte yada şekil bozukluğu olmaktadır. Misel ve meyve gelişiminin optimal seviyelerde tutulması açısından gelişim sıcaklığı çalışmamızda 25-35 C ler arasında tutulmuştur.

3.4. Nem

Uygun nem koşullarında gelişim amacıyla benzer çalışmalarda primordial basamakta nem düzeyi % 90, baş oluşumu sırasında % 70-80 ve son basamakta basidiokarp gelişimi için nem düzeyi % 30-40 seviyelerinde tutulmaktadır. Çalışmamızda nem düzeyi % 75-95 seviyelerinde tutulmuştur.

3.5. Işık

Mantar odasında 12 saat ışık olacak şekilde (50-450 Lux) düzenleme yapılmış bu şekilde primordial oluşum ve basidiokarp gelişimi için optimizasyon sağlanmıştır.

3.6. Havalandırma

Uygun aralıklarla mantar odasının havalandırılması başarılı ve düzgün morfolojili mantar gelişimi için şarttır. Bu amaçla mantar odasında kurulan tertibatla pervane yardımıyla resirkülasyon sağlanmış ve böylelikle nem düzeyi de belli bir seviyede sabitlenebilmiştir (Bilay ve ark., 2000).

3.7. pH

Mantar misellerinin gelişim hızlarının tespit edilmesi amacıyla YCM besiyeri standart alınarak pH 4.5-10 aralıklarında ölçümler yapılmıştır (Bilay ve ark., 2000).

3.8. Monokaryotik misel eldesi

Monokaryotik misel eldesine yönelik çalışma mantar sporlarının steril koşullarda elde edilerek  imlenmelerinin teşfik edilmesi esasına dayanmaktadır.

3.9. Spor  imlenme frekansının artırılması

G.lucidum sporlarının 3 % gibi düşük bir çimlenme frekansı vardır. Gerek sporun tek başına eldesi gerek de çimlenme yüzdesinin artırılması amacıyla steril koşullarda basidiokarp'tan bistüri yardımıyla çıkarılan doku parçaları farklı

solüsyonlar bulunan ortamlarda çimlenmeye teşvik edilmişlerdir. Kullanılan solüsyonlar sıcaklık ve bekletme süreleri çizelge 3’de belirtilmiştir.

Çizelge 3 Çimlenme amacıyla değerlendirilen ortamlar, sıcaklık ve zaman

Ortamlar	Sıcaklık ve Zaman
Steril distile su	30-40°C ‘de 2 saat
3 % Malt Extract	30-40°C ‘de 2 saat
3 % Biotin	30-40°C ‘de 2 saat
3 % KH ₂ PO ₄ ve Mg ₂ SO ₄	30-40°C ‘de 2 saat

Çimlenmesi teşvik edilen spor süspansiyonları uygun sulandırılmalar yapılarak YCM besiyerlerine inoküle edilmiş ve tek düşmüş sporların gerek çimlenme davranışı gerekse oluşturdıkları hif yapılarının kanca oluşturup oluşturmamasına göre kanca yapısı göstermeyenler monokaryotik, gösterenler ise dikaryotik miseller şeklinde seçilmiştir.

3.10. Enzimler

Protoplast oluşumu açısından enzim verimlilikleri araştırılmıştır. Bu amaçla farklı litik enzimler kullanılarak uygulama sırasında besiyerlerine 10 mg/mL olacak şekilde eklenmişlerdir (Çizelge 4). 2-4 saatlik inkübasyon sonunda oluşan protoplastların hemasitometrik sayımları yapılmıştır.

Çizelge 4 Enzimler ve temin edildikleri kaynaklar

Enzimler (Sigma Aldrich)	Kaynak
Novozim	<i>Trichoderma harzianum</i> lyophilized powder
Selüloz	<i>Aspergillus niger</i> Cellulase
β –Glukuronidaz	Bovine beta-Glucuronidase
Litikaz	<i>Arthrobacter luteus</i> lyophilized powder
Lywallzim	Chicken egg white lyophilized powder

3.11. Stabilizatörler

Çalışma sırasında farklı ozmatik stabilizatörler YCM besiyerine son konsantrasyon 0.6 M olacak şekilde uygulanmıştır. Kullanılan ozmatik stabilizatörler çizelge 5 de gösterilmektedir.

Çizelge 5 Ozmatik stabilizatörler ve temin edildikleri firmalar

Ozmatik stabilizatör	Temin edildiği firma
Sükroz	Sigma-Aldrich
Mannitol	Sigma-Aldrich
Sorbitol	Sigma-Aldrich
Glukoz	Sigma-Aldrich
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich
Mg ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich
KCl	Merck
NaCl	Merck

3.12. Biyomass Eldesi

Miseller, içersinde 20-30 adet 0.5 cm'lik cam boncuklar olan 500 ml'lik erlenler içerisine 100 ml F&R sıvı besiyerine inoküle edilerek 4 gün 27 C 150 rpm de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresini takiben vakumla steril filtreden geçirilerek besiyeri uzaklaştırılmış ve üstte kalan miseller steril bir plastik petriye alınarak -80 C de bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün petri içindeki miseller liyofilizatörde 3 gün süreyle kurutulmuştur. Bu işlemten sonra havanda dövülerek toz haline getirilmiş ve elde edilen biyomas sonraki uygulamalara kadar derin dondurucuda saklanmıştır.

3.13. DNA İzolasyonu

Basidiomiset izolatlarının total DNA izolasyonları Raeder ve Broda (1985) tarafından geliştirilen, Moncalvo ve arkadaşları tarafından (1995a) modifiye edilen DNA izolasyon protokolüne göre yapılmıştır. Protokol basamakları şu şekilde sıralanmaktadır. 50 mg biyomass 500 l ekstraksiyon tamponu (200 mM Tris HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS) ile süspanse edilir. Vortekslenir. Süspansiyon 350  l buz gibi soğuk fenol:kloroform:izoamilalkol(25:24:1) ile ekstrakte edilir. 1 dakika kadar vortekslenir. 15000g de 45 dakika santrifüj edilir. Üst faz 1.5 ml'lik steril eppendorf içine alınır, son konsantrasyon 1mg/mL olacak şekilde RNAaz ilave edilir. 37 C'de 10 dakika inkübe edilir. 350  l fenol kloroform izoamil alkol (25:24:1) ilave edilir. Vortekslenir. 15000 g de 10 dakika santrifüj edilir.

Supernatant zerine 250 µl buz gibi soğuk izopropanol eklenir. Bu Şekilde genomik DNA ktrlmŐtr. Nükleik asit pelleti üzerine 70 %'lik etil alkol ilave edilir, supernatant dökülür, kuruması sağlanır. 50 µl TE tamponuyla (10 mM Tris HCl, pH:8.0 ve 1 mM EDTA) süspanse edilir.

3.14. Agaroz Jel Elektroforezi

0.4 g agaroz, 50 mL TBE (45mM Tris-borate ve 1mM EDTA) içersinde homojen hale getirildikten sonra mikrodalgada 1 dakika kadar bekletilerek agarozun erimesi sağlanmıştır. Ardından 50 °C'ye soğutulan jel, jel aparatına dökülmüştür. Tarak yerleŐtirilir. Jelin polimerizasyonu için 10-15 dakika beklenir. Bu arada örnekler hazırlanır. Bunun için 1 µl blue orange loading dye, 6 µl DNA ile karıŐtırılır. Bu oran uygulanan bütün örnekler için sabit tutulmuştur. Marker DNA'nın (1 kb DNA, Promega) hazırlanması için 1 µl blue orange loading dye, 1 µl marker DNA ve 5 µl HPLC suyu kullanılmış ve örnekler çukurlara yüklenerek cm² ye 15 volt gelecek Şekilde akım uygulanarak elektroforez gerekleŐtirilmıŐtir (Moncalvo ve ark., 1995a).

3.15. DNA konsantrasyonu

DNA'nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen değerlerden belirlenmiştir. 1 optik dansite (OD) ift iplikli DNA için 50 µg/ml, tek iplikli DNA veya RNA için 40 µg/ml ve oligonükleotidler

için 20 µg/ml' ye karşılık gelmektedir. Bu çalışmada izole edilen DNA'lar çift iplikli olduğundan miktar tayininde aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = 260 \text{ nm'deki OD (Absorbans değeri)} \times \text{sulandırma oranı} \times 50$$

DNA miktarı ve temizliği Eppendorf marka spektrofotometre (Biophotometer) de ölçülmüştür.

3.16. PCR Amplifikasyonu için örneklerin hazırlanması

5.8S ve ITS sekanslarının amplifikasyonu amacıyla BMB-CR (5'-GTACACACCGCCCGTCG-3') ve LR1 (5'-GGTTGGTTTCTTTTCCT-3') primerleri kullanılmıştır (White ve ark., 1989). PCR yüklemesi yapılırken çalışılan her bir örnekte toplam 200 ng fungal DNA olacak şekilde hesaplama yapılmıştır. Çizelge 6'da kullanılan DNA, primer, PCR Master M (Promega, USA) miktarları belirtilmiştir. Son hacim nucleaz içermeyen su ile 25 µl'ye tamamlanmıştır.

Çizelge 6 Kullanılan DNA, primer, PCR Master M

	<i>G. lucidum</i> (×10µl)	<i>G. applanatum</i> (µl)	<i>T. versicolor</i> (µl)	<i>Trametes sp.</i> (µl)
PCR Master Mix	12.5	12.5	12.5	12.5
Primer BMB-CR	1	1	1	1
Primer LR 1	1	1	1	1
Genomik DNA	1.1	1.4	1.4	1.4
Nuc. free water	9.4	9.1	9.1	9.1

*Örnekler hazırlandıktan sonra üzerlerine 1.5 µl PCR oil ilave edilmiştir.

3.17. PCR Amplifikasyonu

Mastercycler gradient (Eppendorf, Almanya) tipi otomatik termocycler PCR amplifikasyonu amacıyla kullanılmıştır. Döngüler; 94°C’de 10 dakika denatürasyon, 30 döngü şeklinde 94°C’de 1 dakika, 50°C’de 45 saniye bağlanma basamağı, 72°C’de 1 dakika uzama ve bu döngüleri takiben 72°C’de 10 dakikalık bir inkübasyon süresinin tamamlanmasıyla gerçekleştirilmiştir (Hseu ve ark., 1996).

3.18. PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi

Amplifikasyon işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen PCR ürünleri buz üzerinde bekletilmiştir. Her bir örnekten 6 µl alınarak 2 µl blue orange loading dye ile karıştırılmıştır. Marker için 1 µl marker DNA, 2 µl blue orange loading dye ile karıştırılmış ve son hacim 5 µl HPLC suyu ile 8 µl’ye tamamlanmıştır. Örnekler 0.8 % agaroz jelde 0.5×TBE tamponu (45mM Tris-borat ve 1 mM EDTA) kullanılarak yürütülmüştür.

3.19. PCR ürünlerinin saflaştırılması

PCR ürünleri QIA quick PCR Purification Kit ile saflaştırılmıştır. Bunun için eppendorflar içindeki yaklaşık 20 µl lik PCR ürünlerinin herbirinin üstüne 100 µl PB (Qia-Quick™ PCR purification kit ile birlikte hazır olarak temin edilmiştir) ilave edilmiştir. 1 dakika kadar vortexlenmiştir. Quick Kit kolonu üzerine tam merkeze

gelecek şekilde mikropipetle örnekler boşaltılmış. 13000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon santrifüjden çıkartıldıktan sonra kolondaki filtre üzerinde DNA kalmıştır. Alttaki sıvı dökülmüştür.

Yıkama işlemi için 1800 µl etil alkol ve 450 µl PE (Qia-Quick™ PCR purification kit ile birlikte hazır olarak temin edilmiştir) birlikte karıştırılarak kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyondan her bir örnek için 0.75 µl alınmış ve örneklerin üzerine konmuştur. 13000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiş ve alt kısım dökülmüştür. Bu basamak tekrarlanmıştır.

Kolon filtresinin alt kısmına steril bir eppendorf yerleştirmiş ve üzerine 50 µl EB (Qia-Quick™ PCR purification kit ile birlikte hazır olarak temin edilmiştir) ilave edilmiştir. 13000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Saflaştırılan örneklerle ait DNA miktarları spektrofotometrik olarak ölçülmüş değerleri çizelge 7’de belirtilmiştir.

Çizelge 7 Farklı dalga boylarında ölçülen DNA miktarları

	<i>G. lucidum</i>	<i>G. applanatum</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>Trametes sp.</i>
DNA	51.1 µg/ml	36.4 µg/ml	40.0 µg/ml	41.2µg/ml
260/280	1.220	1.070	0.990	1.020
260/230	0.890	0.700	0.910	0.930
230	0.023	0.021	0.021	0.022
260	0.020	0.015	0.020	0.020
280	0.017	0.014	0.020	0.018
320	0.009	0.009	0.013	0.017

3.20. DNA sekans analizi

Saflaştırılmış DNA miktarları tespit edildikten sonra ABI-3100 DNA Sequencer marka sekans analizatöründe tayin için PCR ürünleri Imperial College School of Medicine'a (London, UK) gönderilmiştir. Her reaksiyon toplam 12 µl'lik hacimde içerisinde 120 ng DNA ve 12.8 pM düzeyinde sekans analiz primeri bulunan eppendorflarda gerçekleştirilmiştir.

ITS1, ITS2, ve 5.8S sekans analizleri için 5.8S (5'-CGCTGCGTTCTTCATCG-3'), 5.8 SR (5'-TCGATGAAGAACGCAGC-3') ve ITS 4 (5'-GAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') primerleri kullanılmıştır. Çizelge 8'de kullanılan DNA ve primer miktarları belirtilmiştir.

Çizelge 8 Örneklerle ait DNA ve primer miktarları (µl)

	<i>G.lucidum</i>	<i>G.applanatum</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>Trametes sp</i>
Örnek DNA'ları	2.35	3.29	2.45	2.47
Primer 5.8S (×10µl)	1.87	1.87	1.87	1.87
Primer 5.8SR ×10µl)	2.45	2.45	2.45	2.45
ITS 4(×10µl)	1.55	1.55	1.55	1.55

*Son hacim nukleaz içermeyen su ile 12 µl'ye tamamlanmıştır.

Gen scan analiz programı ile primer pik değerleri ve sekanslar tespit edilmiştir. Bu şekilde Electropherogram veri kalitesi görsel anlamda teyit edilerek sekansların manuel olarak tespiti sağlanmıştır.

Prensibte uygulama tarayıcının her nükleotidden aldığı sinyalleri bilgisayara kısa veya uzun fragmentler halinde yansıtmasıyla gerçekleşmiştir. Buna göre kısa fragmentler daha hızlı yol almış, koyu veya açık boyanmalarına göre de bazlar seçilebilmiştir. Sekanslar “Wingene” nükleotid sekans analiz programı ile uygun şekilde tamamlanmış, sekansların BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizleri (Kumar ve ark., 2004) NCBI, GenBank USA ’ya gönderilerek 5.8S ve ITS sonuçlarına göre mevcut Gen Bank koleksiyonunda değerlendirilerek yerleri belirlenmiştir

3.21. Genetik manipulasyon çalışmaları

3.21.1. Protoplast hazırlanması

Protoplast füzyonu ve regenerasyonu amacıyla *G.lucidum*×*G.applanatum* ve *T.versicolor* × *Trametes* sp. kullanılmıştır.

Protoplastlar monokaryotik misellerden Hashiba’nın (1992) metoduna göre elde edilmişlerdir. Bu amaçla *G.lucidum*, *G.applanatum*, *T.versicolor* ve *Trametes* sp. basidiomisetlerine ait monokaryotik miseller içersinde 20 adet 0.5 cm’lik cam boncuklar olan 50 ml YCM bulunan 250 mL’lik erlenler içine konmuş ve 4 gün süresince 27°C’de inkübe edilmiştir. Bu arada optimizasyonu tespit edilmiş litik enzim solüsyonundan (litikaz) 9 mg alınarak steril membran filtreden (0.45µm) geçirilmiş ve steril ozmatik stabilizatör (0.6 M Mannitol, 0.05 M Na-maleat) ile karıştırılmıştır. 0.3 gram misel 3 ml steril litik enzim solüsyonu bulunan tüp içine

alınarak 100 rpm’de oda sıcaklığında 2 saat kadar bekletilmiş, misel artıkları filtrasyon ile uzaklaştırılmıştır.

Protoplastlar 1000 g de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüş ve iki defa ozmatik stabilizatör ile yıkanmış ve 5 mL ozmatik stabilizatör ile süspanse edilmiştir. Protoplast sayımı Neubaur hemacytometre ile yapılmıştır.

3.21.2. Protoplast füzyonu

Protoplastlar görülmeye başladıktan yaklaşık 1.5-2 saat sonra ml’ye 10^5 - 10^6 protoplast gelecek şekilde ozmatik stabilizatör ile sulandırılmıştır. Taze hazırlanmış protoplastlardan *G.lucidum* ve *G. applanatuma* ait protoplastlardan 1’er mL alınarak aynı tüpe, benzer şekilde *T. versicolor* ve *Trametes sp.*’ye ait protoplastlardan da 1’er mL alınarak aynı tüp içine yerleştirilmiştir. Örnekler 1000g’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve akabinde supernatant atılmıştır. 1 ml steril PEG (40g PEG, 100mL 0.05 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) test tüpü içine protoplast karışımına ilave edilerek 5 dakika aralıklarla sallamak üzere 20 dakika oda sıcaklığında bırakılmıştır. 10 dakika 1000 g de santrifüj edilmiştir. Supernatant atılmış ve protoplastlar 2 defa ozmatik stabilizatör ile muamele edilmiştir. Daha sonra protoplast solüsyonu ml’ye 10^5 protoplast gelecek şekilde sulandırılmış (ozmatik stabilizatörle) ve bu süspansiyondan 0.1 mL alınarak protoplast regenerasyonu için kullanılmıştır.

3.21.3. Regenerasyon ortamı

Protoplast regenerasyonu amacıyla kullanılan regenerasyon besiyerine (30 g agar, 20 g malt, 20 g glukoz, 1 g pepton, 1000 ml distile su, 0.6 M süktroz) protoplastlar direkt pipetle ekilebileceği gibi başka bir uygulamayla yumuşak tabakalı regenerasyon besiyerine (5 g agar, 20 g malt, 20 g glukoz, 1 g pepton, 1000 ml distile su, 0.6 M süktroz) protoplastların alınıp karıştırılması ve yumuşak tabakalı regenerasyon besiyerinin normal agar konsantrasyonuna sahip regenerasyon besiyeri üzerine dökülmesi şeklinde de yapılabilir. Çalışmamızda 1. yöntem kullanılmıştır. İnkübasyon süresi kolonilerin görülmeye başlamasına kadar yaklaşık 2 gün sürmüştür. Tespit edilen her koloni pasajlanmıştır.

3.22. Fusant seçimi

Koloniler hipler üzerinde kanca yapılarının gözlenip gözlenmemesine dayanılarak ışık mikroskopunda incelenmiş ve kanca yapısı gözlenen miseller “fusant=hibrid” olarak tespit edilerek CYM’ye pasajlanmıştır. Kanca yapısı göstermeyen hiplerde regeneratif monokaryotik miseller şeklinde tespit edilmiş ve uyumluluk analizine tabii edilmişlerdir.

3.23. Misel gelişimi ve hifsel büyüklük

Hibritler YCM besi ortamına inoküle edilmiş ve inkübasyon süresini takiben gelişen misellerin hifsel büyüklükleri ve morfolojik farklılıkları tespit edilmiştir.

Kanca yapısı gösteren miseller için 3 durum söz konusudur.

1) (*G. lucidum* × *G. applanatum*) yada (*T. versicolor* × *Trametes sp.*)

2) (*G. lucidum* × *G. lucidum*) yada (*T. versicolor* × *T. versicolor*)

3) (*G. applanatum* × *G. applanatum*) yada (*Trametes sp.* × *Trametes sp.*)

Besi ortamında kanca yapısı gösterme durumlarına göre fuzant olarak tespit edilen dikaryotik misel yapıları parental izolatlarla besi ortamında gelişim morfolojisi benzerlik yada farklılıklarına göre değerlendirilmiş ve varsa misel farklılıkları kaydedilmiştir. Misellerin parental dikaryon mu yoksa melez dikaryonlar mı olduklarının tespiti izozim kalıplarına göre değerlendirilmiştir.

3.24. İzozim(Esteraz) kalıbının determinasyonu

Melezlerin izozim kalıpları Pasteur ve ark., 1988'e göre düzenlenen metodun modifiye edilmesiyle yapılmıştır.

3.25. Biyomas eldesi

Kültürden alınan misel YCM buyyonda 25-27 °C de 10 gün inkübe edilmiş, filtreden geçirilmiş ve 2 defa steril distile suyla yıkandıktan sonra sıvı nitrojen ile toz

hale getirilmiştir. Elde edilen biyomas 100 µL 1M fosfat tamponu pH 7.0 (0.94 % sodyum fosfat monobasik dihidrat, 1.61% sodyum fosfat dibasik heptahidrat, 0.015 % dithiothreitol, ve 19.81 % sodyum L-ascorbat, 5 % PVP-40, 1.0 mM EDTA, ve 0.5 % β-merkaptoethanol) ile ekstrakte edilmiştir. (Resende ve ark., 2000). İyice homojen hale getirilen biyomas steril santrifüj tüpüne alınmış ve 15000 g de 4 °C de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant -20 °C de saklanmıştır.

3.26. NATIVE PAGE Elektroforezi

Esteraz izozim kalıbının determinasyonu amacıyla NATIVE PAGE yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışları çizelge 9 ve 10'da belirtilmiştir.

Çizelge 9 NATIVE PAGE stok solüsyonları ve hazırlanışları (Bollag ve Edelstein, 1991)

Stok Solüsyonları	Hazırlanışları
Tris HCl 2M	24.2 g Tris tartılır. 50 mL distile suda çözülür, konsantre HCl ile pH 8.8'e ayarlanıp distile suyla 100 mL'ye tamamlanır.
Tris HCl 1M	12.1 g Tris tartılır. 50 mL distile suda çözülür, konsantre HCl ile pH 6.8'e ayarlanıp distile suyla 100 mL'ye tamamlanır.
Gliserol (50 %)	50 mL 100%'lük giserol alınıp distile suyla 100mL'ye tamamlanır.
Bromfenol mavisi (1 %)	100 mg Bromfenol mavisi tartılıp, 10 mL distile suyla çözülür.

Çizelge 10 NATIVE PAGE çalışma solüsyonları (Bollag ve Edelstein, 1991)

Solüsyonlar	Hazırlanışları
Solüsyon A 30 % Akrilamid, 0.8 % bisakrilamid (100 mL)	29,2 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid distile suda çözdürülmüş son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Whatman 1'den filtre edildikten sonra koyu renkli şişe içersine konup +4 °C'de saklanmıştır.
Solüsyon B (4×) (100 mL)	2M Tris-HCl (pH 8.8) 75 mL ,distile su 25 mL. +4 °C'de saklanmıştır
Solüsyon C (4×) (100 mL)	1M Tris-HCl (pH 6.8) 75 mL ,distile su 25 mL. +4 °C'de saklanmıştır
Amonyum persülfat (10%) (5 mL)	0.5 g Amonyum persülfat tartılıp distile suyla 5 mL'ye tamamlanır.
*Elektroforez Tamponu (5×) (2 L)	30 g Tris ve 144 g glisin distile suda çözülmüş (pH 8,4) ve hacim 2 litreye tamamlanmıştır.
Örnek tamponu (10 mL)	2.5 ml Tris-hidroklorid buffer stok çözeltisi (pH 6,8), 50 % gliserol 1 ml ve 0.2 ml bromfenol mavisi (1%)

*Kullanmadan önce ultra saf su ile 5 kat seyreltilmiştir.

Ayırıcı jel:SDS ve β-merkaptotanol kullanmadan 10 % ayırıcı jel
hazırlanmıştır (çizelge 11).

Çizelge 11 Ayırıcı jelin bileşenleri (10%) .(Bollag ve Edelstein, 1991)

Solüsyon A	4.9 mL
Solüsyon B	3.75 mL
Distile su	35 mL
AMPS	50 µL
TEMED	10 µL

2M Tris-HCl (pH 8.8) tamponu (Solüsyon B) çizelge 12’de belirtilen miktarlarda akrilamid bisakrilamid çözeltisi (solüsyon A) ile 10 mL lik cam bir şişe içinde karıştırılmıştır. Moleküler oksijenin uzaklaştırılması için vakum pompasıyla 5 dakika degaz işlemi yapılmıştır. (Jeyaseelan ve ark., 1987). Karışıma AMPS çözeltisinden 50 µL, TEMED den de 10 µL ilave edilmiştir.

Hazırlanan solüsyon Mini Protean III marka elektroforez aygıtının 0,75 mm aralığa sahip cam plakaları arasına dökülmüştür. Jelin polimerize olması için 1 ml distile su üst kısma ilave edilmiştir. Polimerizasyonun sağlanması için yaklaşık 1 saat. bekledikten sonra plaka üzerindeki su ortamdan uzaklaştırılmıştır.

Dengeleyici jel: 5 %’lik konsantrasyonda hazırlanmıştır.(Çizelge 12)

Çizelge 12 Dengeleyici jelin bileşenleri (% 5) .(Bollag ve Edelstein, 1991)

Solüsyon A	1.0 mL
Solüsyon C	1.5 mL
Distile su	3.5 mL
AMPS	20 µL
TEMED	5.0 µL

Dengeleyici jelin hazırlanması için çizelge 12’de belirtilen solüsyonlar 10 mL’lik cam şişe içinde karıştırılmış ve 5 dakika degaz işlemi yapılmıştır. Solüsyona 20 µL AMPS ve 5 µL TEMED ilavesi yapılmış ve bir enjektör yardımıyla polimerize olmuş ayırıcı jel üzerine dökülmüştür, örneklerin yüklenmesi için uygun boşluk oluşturulabilmesi amacıyla jel üzerine tarak yerleştirilmiş ve polimerizasyon için yine 1 saat beklenmiştir. Polimerizasyon

tamamlandığında tarak dikkatlice kaldırılmış ve örnek çukurlarının oluşması sağlanmıştır (Bollag ve Edelstein, 1991).

Örnekler 1:3 oranında örnek tamponu (Çizelge 10) ile karıştırılarak oluşturulan çukurlara 15-20 µL miktarlarda yüklenmiştir. Örnekler jele uygulandıktan sonra alt ve üst rezervuara elektroforez tamponu (Çizelge 10) doldurularak 20 mA akım uygulanmıştır. Bromfenol mavisi jel tabanına 1 cm yaklaşıncaya kadar elektroforez devam etmiştir. Jel aparattan alındıktan sonra yarım saat süreyle 50 mL 0.1 M sodyum fosfat tamponu (Na_2HPO_4 0.2 mol/L, Na_2HPO_4 0.16 mol/L) (pH 7.0) içersinde oda sıcaklığında bırakılmıştır (Micales ve ark., 1986; Bondre ve ark., 1993).

Substrat (5 mg α -naphthyl asetat, 20 mg β -naphthyl asetat, 1% v/v aseton içinde hazırlanmış) ile 1 saat süresince muamele edilmiş ve son olarak 50 ml boyama solüsyonu (0.1 M sodyum fosfat tamponu (Na_2HPO_4 0.2 mol/L, Na_2HPO_4 0.16 mol/L) (pH 7.0), 5 mL of N-propanol 10% fast blue RR tuzu) ile 1 saat süresince boyama işlemi yapılmıştır (Dupuis ve ark., 1993).

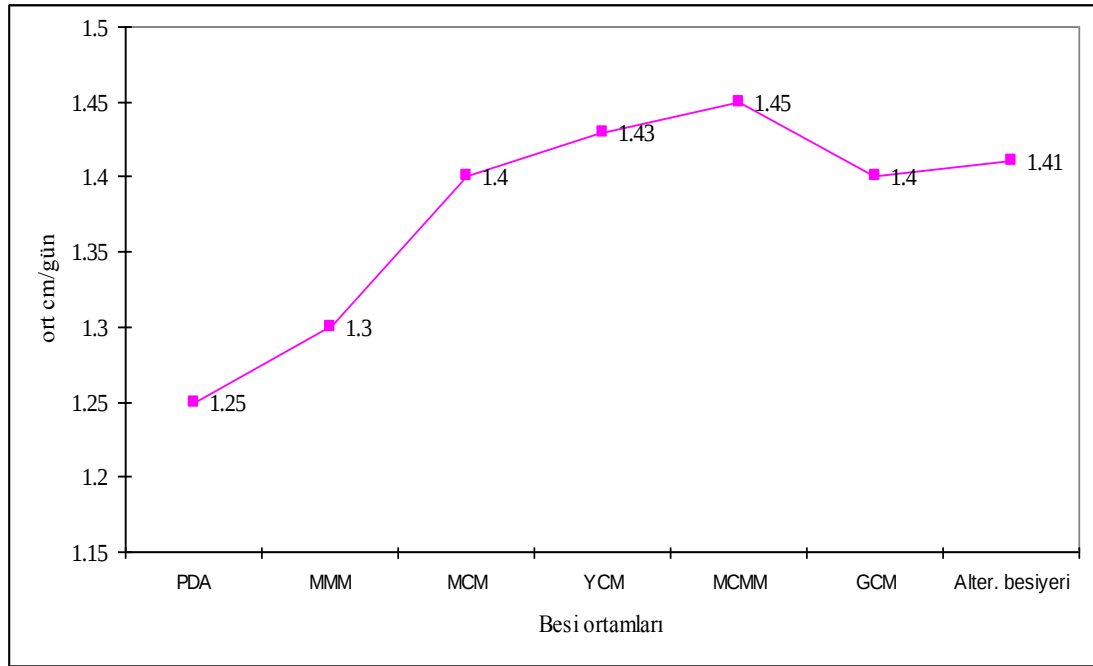
Bantlar kolaylıkla görülebilir hale geldikten sonra 10 % asetik asit ve 40 % metil alkol'den oluşan destaining çözeltisiyle boya giderimi yapılmıştır. Jel daha sonra naylon poşet dosyalar arasına aktarılmış ve bir tarayıcı vasıtasıyla bunların görüntüleri bilgisayar ortamına taşınmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Misel gelişimi

Doğal ortamdan izole edilen *G. lucidum* mantarından doku kültürü yapılmış ve misel gelişimi tamamlandıktan sonra pasajlanan misellerden eşit büyüklüklerde alınarak farklı besi ortamlarına inoküle edilmiştir. Gelişim hızı incelenerek çizelge 13’de elde edilen sonuçlar belirtilmiştir.

Çizelge 13. Misel gelişim hız grafiği



Konusu ne olursa olsun mikrobiyolojik bir çalışmada dikkat edilmesi gereken nokta saf kültürlerle çalışmadır. Bu nedenle çalışılacak mantarın saf misel kültürünün elde edilmesi önemlidir. Günümüzde bu amaçla kurulmuş farklı endüstriyel kuruluşlardan mantar enstitülerine kadar birçok kurumdan standart kültürler temin edilebilmektedir (Stamets, 1993).

Bu araştırmada kullanılan mantar doğal ortamdan izole edilmiş bir basidiokarp yapısıdır. Bu yüzden misel gelişimi ancak bir iki pasajlamadan sonra optimize edilmiş ve besiyeri bileşenlerinin gelişim hızına etkileri incelenmiştir.

Bunun yanı sıra bazı örnekler tek veya çok sporlu kültürlerden ya da bizim çalışmamızda da olduğu gibi doku kültürü şeklinde mantarlardan temin edilebilmektedir. Çizelge 13’de görülebileceği gibi misel gelişim hızı açısından tespit edilen ortalama değerler birbirine yakındır.

Kullanılan besiyerlerinin seçiminde (gerek standart gerekse modifiye besi ortamları) özellikle *Ganoderma* ve benzer mantar gruplarının gelişim sırasında en fazla ihtiyaç duyduğu bileşikleri içeren besi ortamları olmasına dikkat edilmiştir (Byong ve ark., 2000). Besi ortamlarında misel gelişimi açısından ortaya çıkan farklılıklar hem gelişim hızı hem de morfolojik yapılandırma hakkında fikir verebilmektedir. Elbette kullanılan besi ortamının ekonomik olması da kullanım açısından kolaylık sağlayabileceği için önemlidir.

En düşük misel gelişim PDA (1.25)’da gözlenirken en yüksek gelişim ise MCMM (1.45) besiyerinde tespit edilmiştir. PDA bu tarz mantar çalışmalarında sıklıkla kullanılan ve hazırlaması kolay bir besiyeridir (Byong ve ark., 2000). MCMM ise daha komplike bir yapı sergilemektedir.

Bu aşamada değerlendirilmesi gereken besiyeri içerikleri ve konsantrasyonları olmalıdır. Misel gelişiminin olumlu yönde etkilenmesi açısından karbohidrat kaynakları elzemdir. Elbette mevcut karbohidrat kaynaklarının ne oldukları ve kolay parçalanabilirlikleri sadece mantar miseli değil tüm organizmalar açısından önemli bir kriterdir.

Nitrojen kaynaklarından maya ve peptonunda misel gelişimini olumlu yönde etkilediği bilinmektedir. Lee ve arkadaşlarının (1999a; 1999b) *G. lucidum*’da besiyeri optimizasyonunu sağlamak için yaptıkları benzer bir çalışmada karbohidrat kaynaklarının ve şayet kullanılmışsa iz elementlerin mantar gelişimini arttırdığı fakat bunun tek başına yeterli olmayarak pepton ve maya gibi azot kaynaklarınca desteklenmesi gerektiği bildirilmiştir. Bu anlamda gerek mineral solüsyon gerekse azot ve karbohidrat yönünden zengin bir besi ortamı olan MCMM besiyerinde en fazla gelişim tespit edilmesi şaşırtıcı değildir.

4.2. Spawn gelişimi

Çalışmamızda *Ganoderma lucidum* mantarının büyük ölçekli üretim için geniş boyutlarda ele alınan spesifik inokülasyonları araştırılmıştır. Mantar gelişim teknolojilerinde inokulum “spawn” olarak ifade edilir. Spawn seçilen mantar tipine göre elde edilen misellerin inok lasyonlarının yapıldığı besiyerini ifade etmek için kullanılır (Stamets, 1993).

Temelde uyguladığımız spawn üretimi mantar miselinin büyüyerek katı organik bir matriks şeklinde çevresel koşullarda geliştiği bir fermentasyon prosesi şeklinde tanımlanabilir (Stamets, 1993). Hemen hemen bütün durumlarda spawnı oluşturan organik matriksin (saman, buğday, talaş vs..) sterilitesine dikkat edilmiştir. Hem besleyici hemde dolgu materyali gibi iç görerek misel tarafından tıpkı bir palto gibi sarılan organik matriks ise misel kapsülü gibi iç görmüştür (şekil 8).



şekil 8. Spawn oluşumu (Buğday ortamı)

Mikrobiyolojik bir çalışmanın konusu ne olursa olsun steril tekniklere riayet edilerek ve performansın olabildiğince hızlı bir şekilde yapılarak doğabilecek herhangi bir kontaminasyon riskinin minimuma indirilmesi gerekir.

Dünya genelinde bu tarz çalışmalara bakıldığında yüksek kalitede sağlıklı spawn üretimi konusunda teknolojiler geliştirilerek büyük pazarlar oluşturulmaktadır. Bu anlamda birçok kuruluş sadece bu yönde spesifite kazanarak yetiştiricilere mantar spawnı temin etmektedir. Bu konuda iki farklı metod kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi spawnın kütük parçalarına sarılmış halde temini ya da çalışmamızda da uygulanan şekliyle otoklavlanabilen polipropilen torbalar içersinde inokulumdur. Bu iki tekniğin karşılaştırılmasının yapılması çalışmamızda neden polipropilen torba tekniği uygulanarak üretim amacıyla tercih edildiğini açıklayacaktır.

Medikal anlamda önemli birçok mantar türünün saprofitik olarak ölü ağaç kütüklerinde gelişim gösterdiği bilinmektedir. Temin ettiğimiz ve şu anda laboratuvarımızda çalışılan gerek *Ganoderma* gerekse *Trametes* gibi birçok primer dekompozör niteliği gösteren mantarlar mevcuttur. Bu anlamda üretim için daha doğal bir teknik olan “log culture” kütüklere yapılan inokulasyon şeklinde özellikle Japonya ve Çinde yaklaşık 1000 yıldır uygulanmaktadır (Stamets, 1993). Yöntemin avantajı basit ve doğal bir metod olması fakat ürün eldesinin uzun vadede gerçekleşmesidir. Bu açıdan yapılacak bir değerlendirme polipropilen torbalara yapılan inokulasyon neticelerinin daha çabuk gerçekleştiğidir.

Ayrıca kütüklere yapılan ekimlerin temeli açılan deliklere spor ya da misellerin yerleştirilmesi esasına dayanır ve oldukça zahmetlidir. Misel gelişiminin mevsimsel değişimlere bağlı olduğu ve çevreden kaynaklanabilecek kontaminasyonlara oldukça açık ve uzun vadede getirebileceği ürün kalitesi de değişken olabilen bir metoddur ((Stamets, 1993). Bu nedenle gerek çalışılmasındaki zorluk gerek zaman ve ürün kalitesi açısından oldukça farklı ve değişken sonuçlarla karşılaşılabilceği düşünüldüğünden kütük ekimleri tarzında bir uygulama çalışmamızda değerlendirilmemiştir.

Bunun yerine mantarın türüne göre farklı talaş ya da saman tipleri ile azot kaynaklı örneğin pirinç unu veya farklı kepek türleri ile kombine hazırlanmış ortamların karıştırılarak otoklavlanmaları ve inokulasyona hazır hale getirilmelerinin

sağlandığı yapılanmalar tercih edilmiştir (Stamets, 1993; 2000). Bu tarz bir yöntem aseptik bir inoklasyonun da temelini oluşturmuştur. Beraberinde inokülasyonu tamamlanan torbalar evre koşulları düzenlenmiş optimal nem, ışık ve sıcaklık içeren ortamlarda gelişmeye bırakılmış, misel gelişip yeterli olgunluğa ulaştığında sıcaklığın daha düşük olduğu ortamlara alınmış ve baş oluşumu için torbanın şt açılmıştır. Bu şekilde uyguladığımız teknikle daha kısa sürede daha uzun verim alınımı sağlanmıştır.

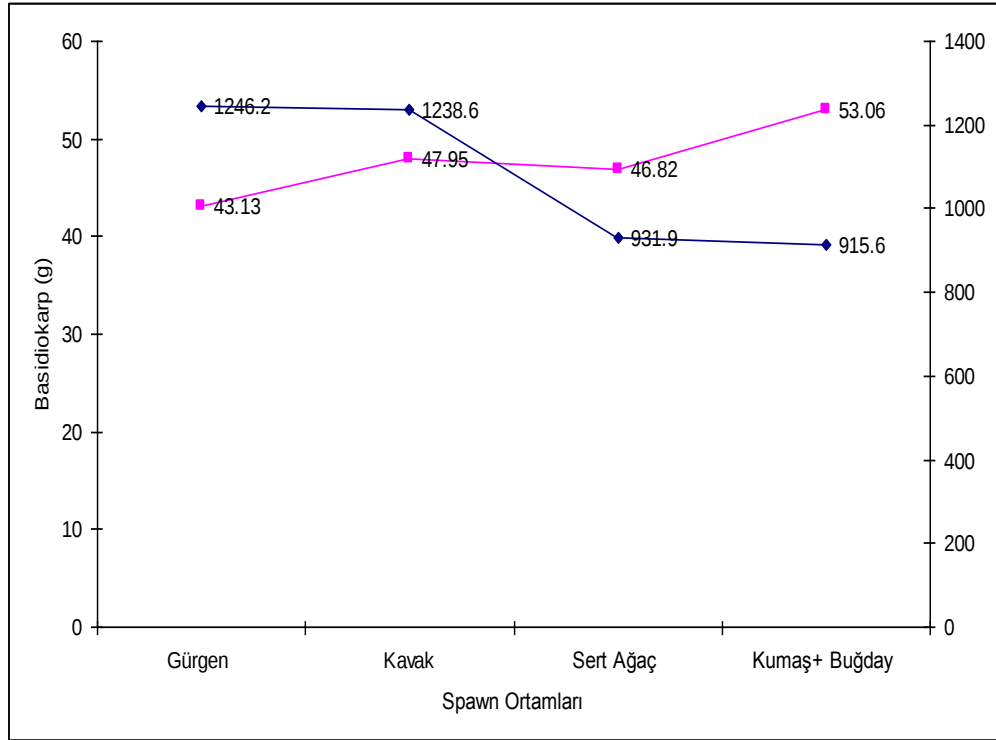
Doğal yollarla yapılabilecek kütük ekimleri için inokülasyondan meyve (basidiokarp) verimine kadar geçen süre 8 ayı, toplam ürün verim süresi max 3 yılı bulabilmektedir ((Stamets, 1993). 100 kg doğal kütük ekimleri 10-15 kg kadar taze mantar verebilmektedir. Diğer taraftan çalışmamızda uygulanan sentetik ekimlerde (laboratuvar koşulları, polipropilen torba) inokülasyonu takiben 80-90 gün sonra ürün eldesi gerçekleşebilmektedir. 100 kg talaşdan da yaklaşık 80 kg kadar basidiokarp elde etmek mümkündür. Bu neredeyse doğal kültür metodunun 8-10 katı ürün eldesine eşittir.

Farklı spawn ortamlarından elde edilen meyve byklĞu ve kalitesinde değişken olduğu bulgularımız arasındadır. Buna göre spawn ortamları ve elde edilen basidiokarp ağırlıkları izelge 14’de belirtilmiştir. Kullanılan spawn ortamlarının meyve verimliliği açısından elde edilen yüzdeleri izelge 15’de belirtilmiştir.

Çizelge 14. Spawn ortamları, basidiokarp ve net ağırlık (g)

Spawn Ortamları	Basidiokarp ortalama (g)	Net ağırlık (g)
Gürgen Talaşı	43.13	1246.2
Kavak Talaşı	47.95	1238.6
Sert Ağaç Talaşı	46.82	931.9
Kumaş Artıkları +	53.06	915.6
Buğday Kepeği		

Şekil 15 Meyve verimlilikleri (g)



Farklı spawn ortamlarından elde edilen basidiokarp (meyve) ortalama ağırlıklarında maksimum verim kumaş (kadife) artığı ve buğday kepeği ile hazırlanan besi ortamında gerçekleşmiştir. Bu durum iki şekilde değerlendirilebilir.

Her şeyden evvel yoğun düzeyde endüstriyel ve evsel atıkların eliminasyonunun ne kadar önemli olduğu düşünülecek olursa kullanımdaki kolaylık ve yan ürün olarak basidiokarp eldesi üzerinde düşünölmeye değerdir. Diğer yandan

bu şekilde kumaş artığı bazlı böylesi bir ortamdan izole edilen basidiokarpın tüketim amaçlı kullanımı sakıncalı sonuçlar doğurabilir. Bunun nedeni tekstil endüstrisinde kullanılan kumaş boyalarıdır. Bu tarz kimyasalların basidiokarpta birikimi mantarın kullanımı açısından çok sakıncalı sonuçlar doğurabilir. Dolayısıyla böyle bir çalışma yapmadan evvel dikkatli bir şekilde mantardan elde edilen bileşikler tespit edilmeli ve bunların sağlık açısından toksik etkili olmadığı ya da tolere edilebilir değerlerde olmaları istenmelidir.

Talaş ortamlarının incelemesine bakıldığında birbirine yakın sonuçlarla karşılaşıldığı gözlenir. Bu tarz talaş uygulamaları uzun yıllardır gerek bizim uyguladığımız ısıya dayanıklı plastik torbalarda sterilizasyon şeklinde gerek de kütüklere yapılan inokülasyonlarla daha uzun süreli ürün alma hedefine yönelik olarak başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Campbell, 1989).

Bizim uygulamamızdaki fark gerek temin açısından kolaylık gerekde ürün verimi açısından farklı talaş tiplerinin değerlendirilmesinden ileri gelmektedir. Bu anlamda kavak talaşından 47.95 g gibi yüksek ağırlıklı meyve eldesi çalışmanın üretim aşaması için verimli bir sonuç şeklinde değerlendirilebilir. Bir diğer nokta yüksek selülozik kirlilik şeklinde nitelendirilen ve atık olarak kabul edilen talaş bazlı bu tip yapıların hem çevreden uzaklaştırılması hemde sağlıklı mantar üretimi konusunda araç olarak kullanılabileceğidir.

4.3. Basidiokarp gelişim ortamı

Mantar gelişimdeki önemli faktörlerden biri sıcaklıktır (Przybylowicz and Donoghue, 1990). Çalışmamızda farklı sıcaklık aralıklarının misel ve basidiokarp gelişimi üzerine etkileri incelenmemiştir. Bununla birlikte çalışma sırasında sıcaklık ve nem artışında meydana gelen extrem değişiklikler takip edilerek yüksek sıcaklığın (>38 °C) basidiokarp gelişimini olumsuz etkilediği ve deformasyona uğramış, gelişimini tamamlayamamış basidiokarplarla karşılaşıldığı kaydedilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Deformasyon gösteren *G. lucidum* basidiokarpları

Wada'nın 2000'de *Ganoderma lucidum* mantarında yaptığı çalışma da gelişim için optimal koşullar araştırılırken benzer bir durumla karşılaşmış ve nem düzeyi basidiokarpın gelişiminin başladığı ilk basamakta (90 %) seviyelerinde tutularak deformasyon engellenmiştir.

Bizim çalışmamızda Şekil 9'dan da görülebileceği gibi bu şekilde oluşan basidiokarplarda daha küçük bir yüzey hacmi ve dejeneratif bir basidiokarp boyu meydana gelmiştir. Ayrıca mantar başı kenar kısımlarından yukarı doğru kalkmış ve bozuk bir yüzey morfolojisi kazanmıştır. Bu ve benzeri istenmeyen değişikliklerin giderilmesi amacıyla sıcaklık düzeyi optimal aralıklara çekilmiş gerek sıcaklık gerekse nem düzeyinin sabitlenmesi için mantar gelişim odasına pervaneli havalandırma tertibatı kurularak sürekli bir hava sirkülasyonu sağlanmış ve basidiokarpların gelişim morfolojileri bir düzen dahilinde incelenebilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. Düzgün gelişim morfolojisi gösteren *G. lucidum* basidiokarpları

Sıcaklık, nem, ışık ve havalandırma gibi parametreler optimal seviyelerde tutulduğunda başarılı bir basidiokarp gelişimi kaçınılmazdır. Benzer alışmalar da ve bizim çalışmamız sırasında gözlemlerimiz sonucu değerlendirmelerle izolatımız için uygun basidiokarp gelişim değerleri saptanmış ve başarıyla uygulanmıştır.

4.4. pH

Çalışmada farklı pH aralıklarında YCM besiyeri hazırlanmış ve inokülasyonlar yapılmıştır. Sonuçlar çizelge 16’da gösterilmiştir.

Çizelge 16. Farklı pH aralıklarında misel gelişim hızı (cm/gün)

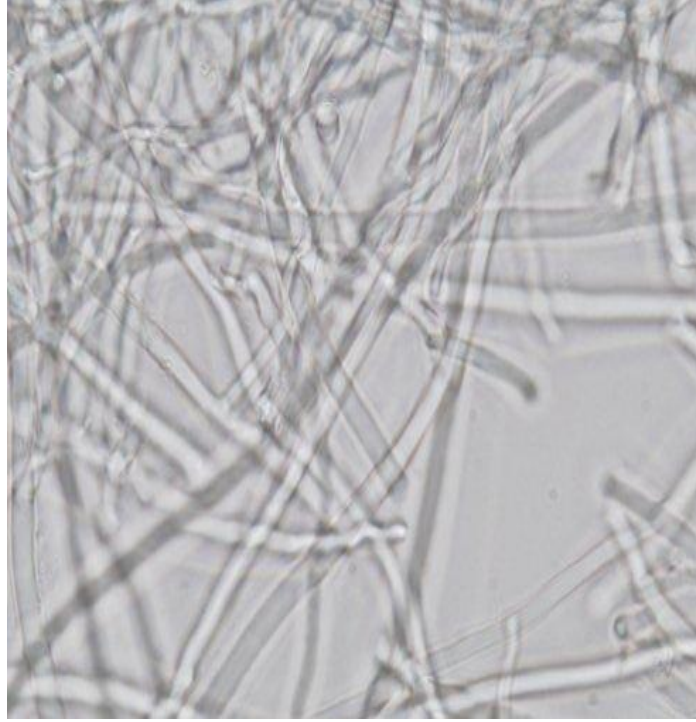
pH	Misel gelişimi ortalama (cm/gün)
4.5-5	1.1
5.5-6	1.3
6.5-7	1.4
7.5-8	1.6
8.5-9	1.5
9.5-10	1.4

İnkübasyon süresini takiben yapılan ölçümlerde optimal gelişim aralığının pH 7.5-8 olduğu tespit edilmiştir. Besiyerinin içeriği ve uygun pH mantar metabolitleri ve enzim oluşumunu etkileyen faktörlerin başında gelmektedir (Byong ve ark., 2000). Bu açıdan değerlendirildiğinde izolatımızın optimal gelişim aralığının kaynaklarda belirtilen yakın familya üyeleriyle de benzeştiği saptanmıştır. Daha yüksek ya da düşük aralıklarda ise ya misel gelişimi yavaşlamış ya da hiç olmamıştır (gelişim gözlenmeyen pH aralıkları belirtilmemiştir).

4.5. Monokaryotik misel eldesine yönelik bulgular

Mantar sporu “fingerprint” tekniği ile elde edilebilmektedir (Stamets ve ark., 1993). Uygulamanın zahmetli olması ve ortamın son derece sirkülasyondan uzak, durgun olması gerektiğinden çalışmada spordan monokaryotik misel eldesi için farklı bir uygulama yapılmıştır. Bunun nedeni diğer şekilde yani çevreden elde edilen mantar sporları ile çalışılırken karşılaşılan hem maya hem de *Trichoderma* sp. kontaminasyonlarının yoğunluğudur. Spor eldesi için yapılan uygulamada mantarın baş kısmının altındaki yoğun gözenekli kısımdan steril bistüri yardımıyla parça

çıkarılarak uygun solüsyonlarda bekletilmiş, bu şekilde spor henüz yapının içindeyken steril bir ortama alınmıştır. Sonraki aşamalarda karşılaşılabilecek maya, mantar ve bakteriyel kontaminasyonunun da önüne geçilmiştir. Monokaryotik hif Şekil 11’de gösterilmiştir.



Şekil 11. Monokaryotik misel (ışık mikroskobu (×40))

Böylesi bir uygulamayla spor daha dış ortama geçmeden tutulmuş ve steril şartlarda temin edilmiştir. Bu aynı zamanda fingerprint tekniği ile mukayese edildiğinde daha az zahmetli bir teknik olarak değerlendirilmiştir.

4.6. Spor çimlenme frekansının artırılmasına ilişkin bulgular

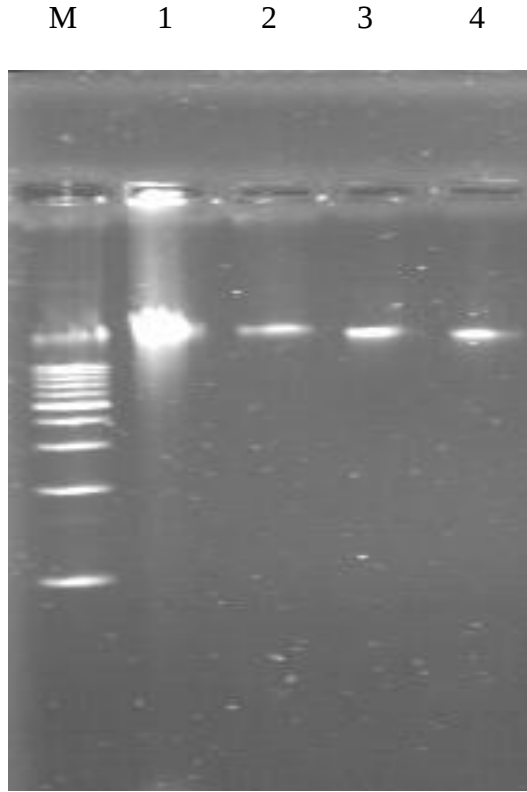
Ganoderma sp. gibi polipor grubu mantarlarda az olan çimlenme frekansının (3 %) artırılması yapılan çalışmalar açısından büyük öneme sahiptir. Sporum daha stabil bir yapı olması, genetik çalışmalar açısından kullanımını daha zorunlu hale getirmiştir (Xin Liua ve ark., 2002).

Çalışma sırasında spor eldesi yönünden farklı metodlar denenmiş ancak kontaminasyonlarla karşılaşmıştır. Bu durum sporun bir defa atmosfere yayıldığında kullanımının zorluğunu vurgulamıştır. Çünkü yapılan uygulamalarda yayılmış sporların eldesi için tıpkı kallus kültürü hazırlar gibi benzer metodlar denenmiş ama kullanılan solüsyonlar (hipoklorid, asit vb..) ve farklı bekletme sürelerinden verim alınamamış, ya maya kontaminasyonu ya da çatlamış fakat gelişmemiş sporlarla karşılaşmıştır. Bu yüzden detaylı olarak incelemeye girilmemiştir.

Diğer taraftan sporun henüz por içindeyken temin edilmesi ve sıcaklığın biraz artırılarak (30-40°C) çimlenme davranışını destekleyecek sıvı ortamlarda bekletilmeleri faydalı sonuç vermiştir. Bu şekilde 3 % olan normal çimlenme frekansı, 3 % malt, 3 % biyotin, veya 3 % KH_2PO_4 ve Mg_2SO_4 den oluşan ortamlarda gelişerek yaklaşık olarak 8-10 % düzeyinde belirlenmiştir. Bu amaçla istenilen solüsyon tercih edilebilir (Chang ve ark., 1999) Çalışmada denenilen solüsyonlar için elde edilen çimlenmiş spor katsayıları neredeyse aynı olduğundan belirtilmemiştir.

4.7. DNA ekstraksiyonu ve PCR amplifikasyonu

Ganoderma sp. ve *Trametes sp.* örneklerinin total DNA izolasyonu Moncalvo ve ark. (1995a) tarafından modifiye edilen total DNA izolasyon protokolüne göre uygun bir marker DNA (1 kb DNA, Promega) kullanılarak izole edilmiştir (Şekil 12).



Şekil 12 Agaroz jel, Ethidium bromid ile boyanmış ve 302 nm ultraviyole ışığı altında görüntülenerek fotoğraflanmıştır. Slot 1 moleküler ağırlık standartı olarak 1 kb'lık marker DNA'yı göstermektedir. Slot 2 OC1 genom DNA'sını, Slot 3 CB2 genom DNA'sını, Slot 4 LC3 genom DNA'sını, Slot 5 Thai genom DNA'sını göstermektedir.

Elektroforez işlemini takiben yapılan spektrofotometrik ölçümlerde DNA miktarları saptanmıştır. Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum emme özelliği taşır, bu dalga boyundaki emme derecesi nükleik asitlerin miktarının bir ölçüsüdür. Buna göre, DNA miktarları 146.1-1765.8 µg/ml arasında sonuçlanmış olup, saflığı için ise $A_{260/280}$, $A_{260/230}$ ve A_{320} ye bakılarak belirlenmiştir (Çizelge 17).

Çizelge 17. Spektrofotometrik bulgular

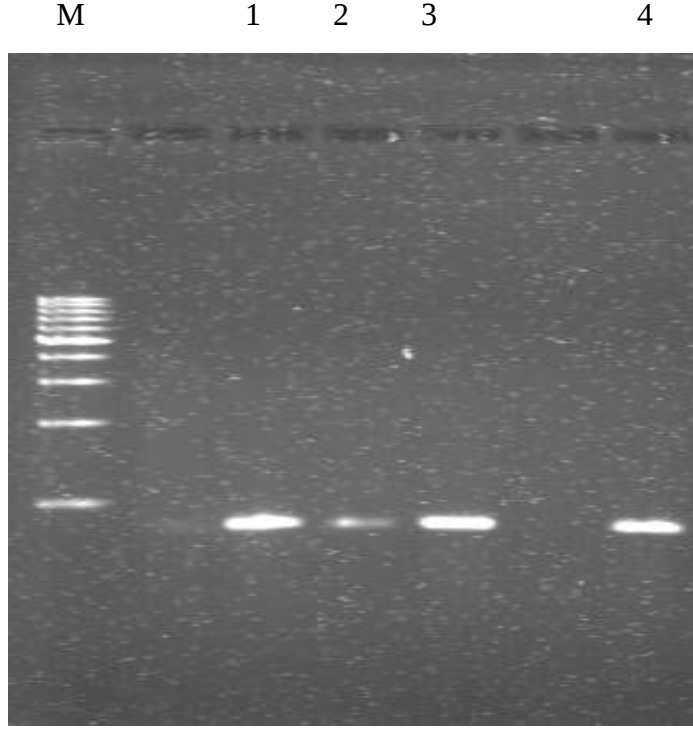
	<i>G.lucidum</i>	<i>G.applanatum</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>Trametes sp.</i>
	OC1	CB2	LC3	Thai
DNA	1765.8 µg/ml	147.6 µg/ml	146.1 µg/ml	146.2 µg/ml
260/280	1.86	1.54	1.39	1.37
260/230	2.07	1.57	1.23	1.11
230	0.341	0.038	0.047	0.053
260	0.706	0.059	0.058	0.058
280	0.380	0.038	0.042	0.043
320	0.004	0.007	0.012	0.017

Bir optik dansite (OD) çift iplikli DNA için 50 µg/ml, tek iplikli DNA veya RNA için 40 µg/ml ve oligonükleotidler için 20 µg/ml'ye karşılık gelmektedir. 260 ve 280 nm'deki değerler arasındaki oran (260/280 OD) nükleik asitlerin temizliği hakkında da fikir vermektedir. Bu oran iyi saflaştırılmış DNA'da yaklaşık 1.8 ile 2.00 arasında olmaktadır.

Ortamda fenol veya protein bulunuyorsa oran bu değerlerden düşük olarak gözlenir.(Olgun ve Topal 1999). Nitekim OC1 dışındaki diğer DNA 'larda fenol-protein kaynaklı kirlilik olduğu saptanmıştır. 260 ve 230 nm'deki değerler arasındaki oran (260/230 OD) ise 2.00 dan büyük olmalıdır. A_{320} ise DNA'nın saflığının bir göstergesi olarak sıfıra yakın olmalıdır (Hillis ve Moritz, 1990).

Yapılan analiz sonucunda OC1 DNA miktarı ml'ye 1765.8 µg gibi yüksek bir değer çıkarak diğer izolatlardan oldukça farklı bir sonuç göstermiştir. OC1 izolatu doğal ortamdan izole edilen basidiokarptan elde edilmiştir. Çalışılan diğer izolatlar (CB2, LC3, Thai) standart laboratuvar kültürleri olup bugüne kadar sadece misel ya da spor formlarıyla çalışılmıştır. Bu izolatlarla basidiokarp üretimine yönelik herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Benzer moleküler çalışmalar için kullanılan standart misel kültürleri olmaları zamanla doğal izolatlardan daha fazla yıkıma uğrayarak DNA miktarı yönünden farklılık meydana gelmesini sağlayabilmektedir. Bunun dışında

yapılacak bir değerlendirme genomik DNA'ların iyi bantlaşma göstermiş olmaları ve istenilen PCR ürünlerini vermiş olmalarıdır (Şekil 13).



Şekil 13. PCR sonrası 0.8 % Agaroz jel elektroforezinde örneklerin yürütülmesi sonucu oluşan bantlaşma. Jel Ethidium bromid ile boyanmış ve 302 nm ultraviyole ışığı altında görüntülenmiştir. Slot 1 moleküler ağırlık standartı olarak 1 kb'lık marker DNA'yı göstermektedir. Slot 2 OC1 genom DNA'sını, Slot 3 CB2 genom DNA'sını, Slot 4 LC3 genom DNA'sını, Slot 5 Thai genom DNA'sını göstermektedir.

Başlangıç denatürasyonu için genomik DNA gibi kompleks kalıpların denatüre olmasını sağlamak üzere yüksek sıcaklıklar (95-100 °C) kullanılır. Ancak PCR sırasında genellikle etkin denatürasyon sıcaklığının 92-95 °C olduğu tespit edilmiştir. Bu amaçla bizim uygulamamızda 94°C kullanılmıştır. Denatürasyondan sonra primerlerin bağlanması aşamasındaki Tm/bağlanma sıcaklığı oranının tespit edilmesi, PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından büyük bir önem taşımaktadır. Bu nedenle başarılı bir PCR için Tm/bağlanma sıcaklığının doğru hesaplanması gerekir.

Primerlerin uzaması aşamasında genellikle Taq DNA polimerazın polimerizasyon aktivitesi için en uygun sıcaklık derecesi olan 72 °C kullanılmıştır. PCR ürünü olan tüm moleküllerde reaksiyonun tamamlanmasını garanti altına almak için son döngünün uzama süresi uzun (10 dakika) tutulmuştur. Bu durum Shoyama ve ark., (1998) ve Sangwan, (2000) çalışmaları ile uyum içersindedir.

Genomik DNA'nın kısa oligonükleotid primerler kullanılarak amplifikasyonu, amplifikasyon protokolü ve reaksiyon koşullarına karşı duyarlıdır. Hedef DNA'nın konsantrasyonu, primer, Mg^{+2} , DNA polimeraz miktarları, DNA kalitesi ile "yapışma-annealing" sıcaklığı gibi termalcycler parametreleri DNA amplifikasyonunu etkiler. Buna göre; 94°C'de 10 dakika denatürasyon, ardından 30 döngü şeklinde 94°C'de 1 dakika, 50°C'de 45 saniye yapışma-annealing, 72°C'de 1 dakika elongasyon ve bu döngüleri takiben 72°C'de 10 dakikalık bir inkübasyon ile sentezi tamamlanamayan amplifikasyon ürünlerinin sentezi tamamlaması amaçlanmıştır. Programın son aşamasında bekleme sıcaklığı 4°C olarak tercih edilmiştir. Uygulanan bu parametreler sonucunda etkili bir amplifikasyon elde edilmiştir.

Gen çoğaltılması dahil PCR' ın birçok uygulamaları için kalıp DNA' ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere ihtiyaç vardır. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır. Primer tasarımı yapmak için bilgisayar programları da geliştirilmiş olmakla beraber, çoğu zaman araştırmacılar ilgilendikleri genleri ya da DNA parçalarını çoğaltmak için kendileri primer tasarımı yapmak durumundadırlar. Tasarım yapılırken mümkün olduğunca dört bazın eşit sayıda kullanımına dikkat edilmektedir. Sonucu olumsuz etkileyici istenmeyen oluşumları en aza indirmek için önem verilmesi gereken bazı noktalar vardır.

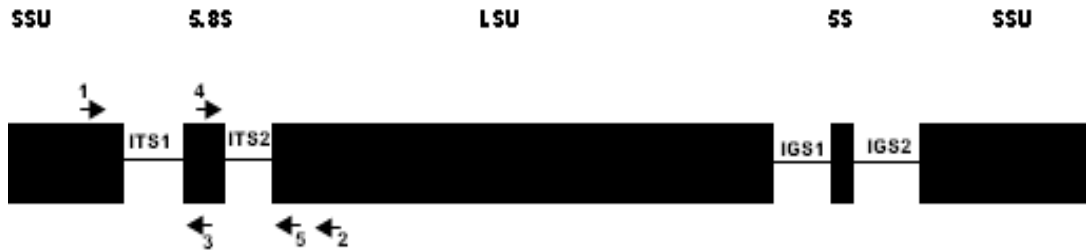
Bunlar; primerlerin polipürin, polipirimidin ya da tekrarlı bölgeler içermemesi, Primer çiftlerinin 3' uçlarının birbirine ya da primer içindeki bir bölgeye tamamlayıcı olmamasıdır. Çalışmada 5 adet primer kullanılmıştır. Ayrıca primerlerin Tm değerlerinin hesaplanması gerekmektedir. Çalışma sırasında tercih edilen primerlerin nükleotid uzunlukları 20'den küçüktür. Tm değerlerinin hesaplanması

için kullanılan çeşitli formüller vardır. Bu çalışmada nükleotid büyüklüğü de dikkate alınarak $[(A+T \text{ lerin sayısı}) \times 2^{\circ}\text{C} + (G+C \text{ lerin sayısı}) \times 4^{\circ}\text{C}]$ formülü kullanılmıştır.

Uygun primerler kullanılarak yapılan PCR uygulaması sonucunda tüm örneklerle ait bant yapıları gözlemlenmiştir. PCR ürün değerleri 780-800 bp ve ürün verim değerinin 41.2 ve 51.1 $\mu\text{g/mL}$ ’ ler seviyesinde değiştiği tespit edilmiştir.

4.8. Dizi “Cluster” analizi ve 5.8S sekans analizi

Çalışılan izolatların *Ganoderma sp.* ve *Trametes sp.* olduğu düşünüldüğünden sınıflandırma analizinde standart olarak Moncalvo ve arkadaşları (1995a) tarafından uygulanan ITS 1 ve ITS 2 sekanslarının temel alınarak yapıldığı bir inceleme olan çoklu nükleotid dizi analizi tespitinin yapılması da şart olmuştur. Beklendiği gibi 5.8 S rDNA geni ITS1 ve ITS2 bölümleri arasında yer almaktadır. Bu durum Şekil 14’de belirtilmektedir.



Şekil 14. Taksonomik açıdan önem arz eden mantar ribozom DNA’larına ait önemli sekanslar: SSU; nuclear small subunit, ITS1; internal transcribed spacer 1, ITS2; internal transcribed spacer 2, 5.8S; 5.8 sekansı, LSU; nuclear large subunit, IGS1; intergenic spacer 1, 5S; 5S region, IGS2; intergenic spacer 2. Çalışmada kullanılan primerler; 1:BMB CR, 2:LR1, 3:5.8S, 4:5.8SR, 5:ITS4

OC1, CB2, LC3 ve Thai izolatlarının DNA sekans verileri ITS1 ve ITS2 için belirlenmiştir. Çalışılan bütün izolatlarda benzerlik 73.2-88.9 % arasında bulunmuştur. OC1 ve CB2 izolatlarının DNA benzerlikleri 86.4 % şeklinde, LC3 ve Thai’nin benzerlikleri ise 88.9 % şeklinde tespit edilmiştir.

İzolatlar farklı mukayese edildiğinde ise benzerlik oranları OC1 ve LC3 için 75.6 %, OC1 ve Thai için 79.4 %, CB2 ve LC3 için 73.2 % ve CB2 ile Thai için 78.3 % şeklinde kaydedilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde OC1 ile CB2'nin benzer şekilde LC3 ile Thai'nin daha yakın akraba olduğu DNA'larının benzerliği ve sekans dizinlerinin analiziyle de ortaya konmuştur. Sekans dizinleri ITS1, ITS2 ve 5.8S için şu şekilde gözlenmiştir.

ITS1:

<u>Basidiomiset</u>	<u>izolat</u>	<u>OC1:</u>	TTGTAAACCC	ACAGTAGTGC
ACAGGTTGTA	GCGCGGATGA	CCAGGGACTG	CACTGCCTCG	
TATAACCCAG	CTACTACCCA	GTCAGAACTC	GGCG	
<u>Basidiomiset</u>	<u>izolat</u>	<u>CB2:</u>	TCGTAAACCC	ACAGTAGTGC
ACAGGTGTAG	GGCGGATGAG	CAGGGCGTGC	ACATGCCTCG	
TAAGGCCAGC	TACAACCCAG	TCAAAACTCG	ACG	
<u>Basidiomiset</u>	<u>izolat</u>	<u>LC3:</u>	CGGCGAGGTC	CCCTAGAACA
CACAGAGATA	TATAGCGCGC	GATATCGATA	CCACCGCGTC	
TCTCTCGGAT	TCGCGCTCGA	CCGCATTAAA	CAC	
<u>Basidiomiset</u>	<u>izolat</u>	<u>Thai:</u>	CGGCGTTTCG	AGGTCCCCTA
GAACACACAG	AGAATATAGC	GCGCGATATC	GATACCACGC	
GTCTCTTCGG	ATTCGCCTCG	ACCGCTTAAA	CC	

5.8S ve ITS2 :

<u>Basidiomiset</u>	<u>izolat</u>	<u>OC1:</u>	CGCCGAGTTC	TGACTGGGTA
GTAGCTGGGT	TATACGAGGC	AGTGCAGTCC	CTGGTCATCC	
GCGCTACAAC	CTGTGCACTA	CTGTGGGTTT	AGGACAGACC	
ACACACAGAG	ATTTTATAT	ATATAGAGCG	CGCGATATCG	
ATACCACCGC	GTCTCTCTCG	GATTCGCGCT	CGACCGCATT	
AAACGATGCT	TG			
<u>Basidiomiset</u>	<u>izolat</u>	<u>CB2:</u>	CGCCGCGTTA	GTTCTGACTG
GGGTATACG	AGGCAGTGCA	GCCTGGTCAT	CCGCGCTACA	
ACCTGTGCAC	TACTGTGGGT	TTAGGACAGA	CCACACACAG	

AGATATATAT AGAGCGCGCG ATATCGATAC CACCGCGTCT
CTCTCGGATT CGCGCTCGAC CGCATTAAAC GATGCTTG

Basidiomiset izolat LC3: CGCCAGGTCC CCGTTAGTTC TGACTGGGTA
GTCAGTAGCT GGGTTATACG AGGCAGTGCA GCCTGGTCAT
CCGCGCTACA ACCTGTGCAC TACTGTGGGT TTAGGACAGA
CCACACACAG AGATATATAT AGAGCGCGCG ATATCGATAC
CACCGCGTCT CTCTCGGATT CGCGCTCGAC CGCATTAAAC AC

Basidiomiset izolat Thai: CGGCGGGCCA GGTCCCCTAG TTCTGACTGG
GTAGTCAGTA GCTGGGTAT ACGAGGCAGT GCAGCCTGGT
CATCCGCGCT ACAACCTGTG CACTACTGTG GTAGGACAGA
CCACACACAG AGATATATAT AGAGCGCGCG ATATCGATAC
CACCGCGTCT CTCTCGGATT CGCGCTCGAC CGCATTAAAC AC

5.8S:

Basidiomiset izolat OC1: CGGCTTTAAA CC

Basidiomiset izolat CB2: ACGTGGCTAA AC

Basidiomiset izolat LC3: CGTTTGTGCT AA

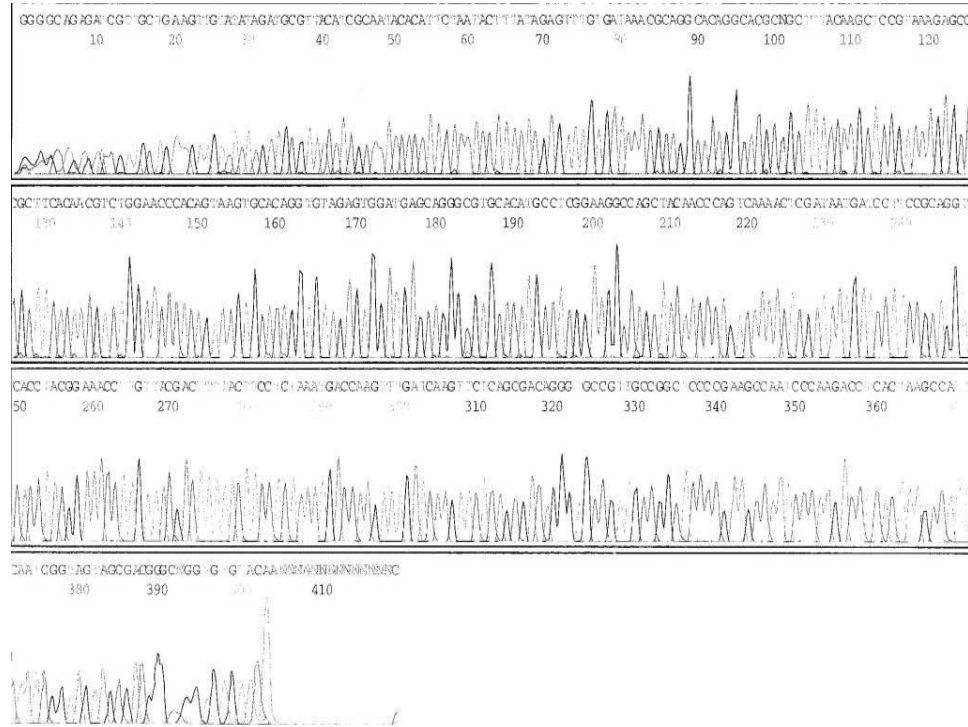
Basidiomiset izolat Thai: CGTTTGTGCT CGG

Belirtilmesi gereken önemli bir husus ITS sekanslarının filogenetik anlamda yapılacak bir sınıflandırmada asla tek başına yeterli olmayacağıdır. rDNA olarak son derece konservatif bir yapıya sahip olan 5.8S yapılacak bir sınıflandırmada bu anlamda ele alınmalıdır. Kombine bir uygulamayla ITS 1, ITS 2 ve 5.8S analizleri daha detaylı bir sınıflandırma yapmayı sağlamış ve çalışılan izolatların cins ve tür düzeyinde belirlenmesine yardımcı olmuştur.

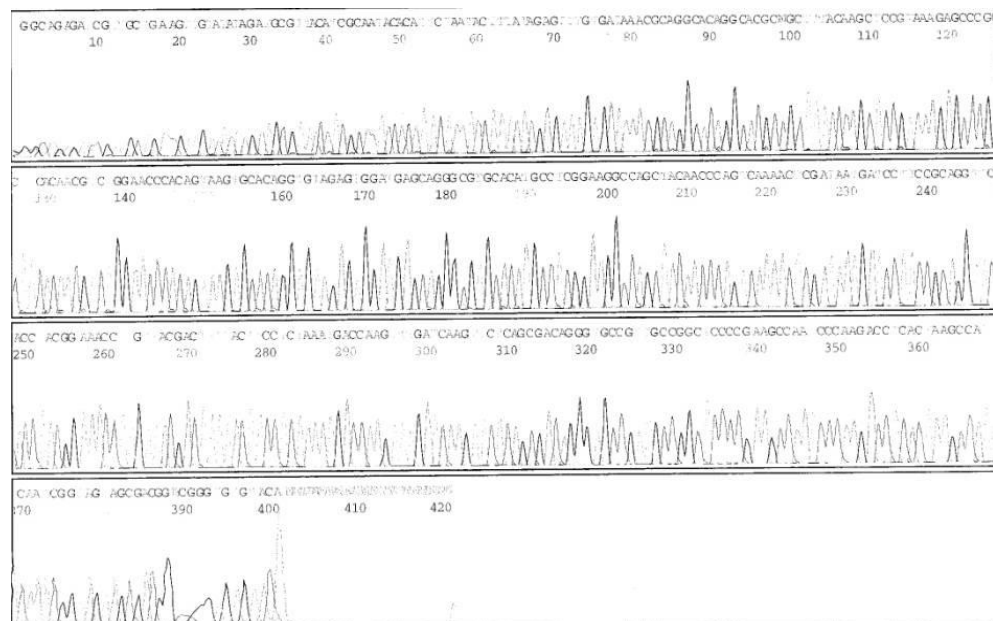
Çalışma sırasında 5.8S sekans bölümünün uzunluğunun tüm izolatlar için 158 bp olduğu tespit edilmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde çalışılan basidiomisetlerin aynı aileye (Polyporales) mensup olduğu söylenebilir.

Gen scan analiz programı ile primer peak değerleri ve sekansları belirlenen bazlara ait elektroferogram verileri *G. lucidum* için Şekil, 15’de, *G. applanatum*

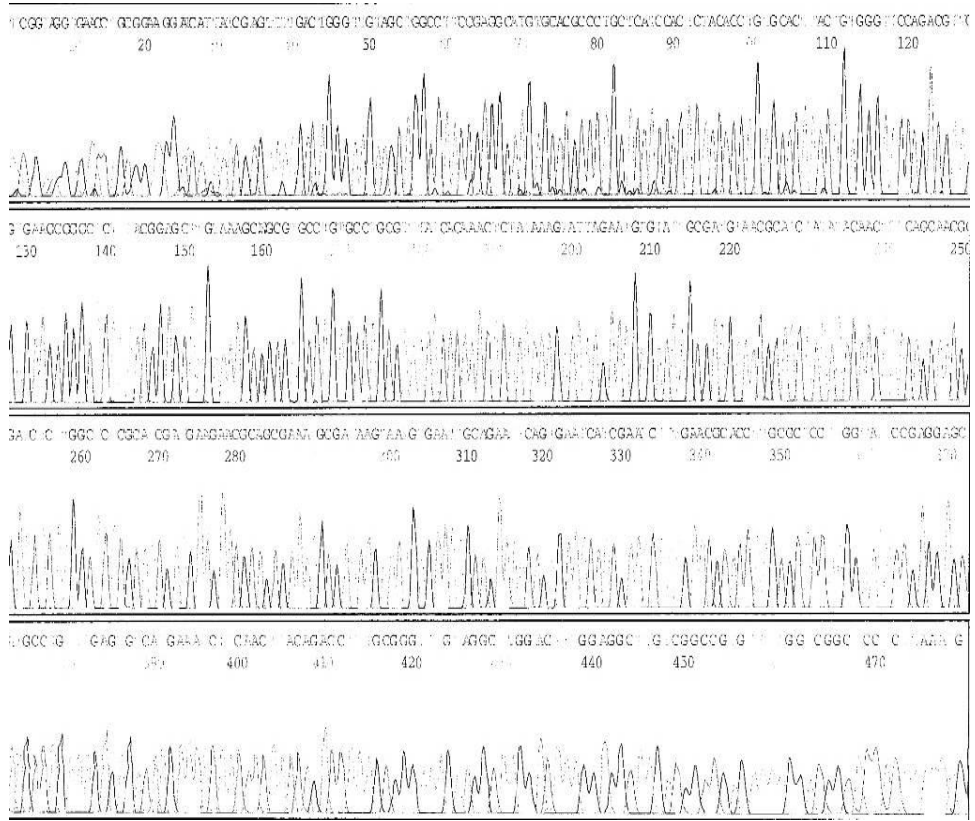
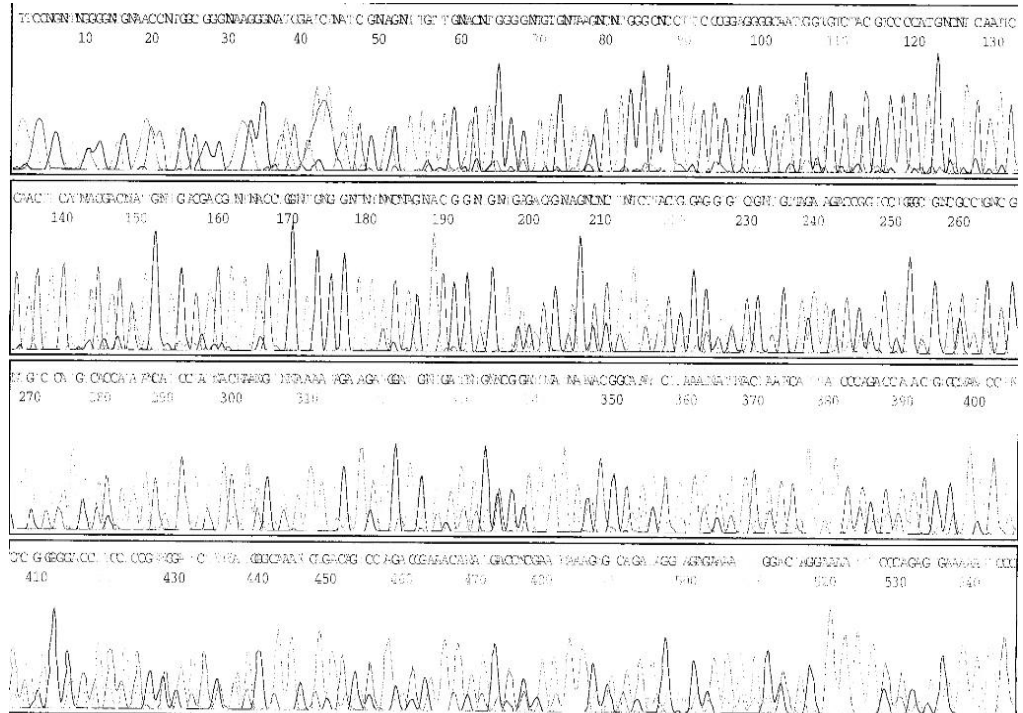
için Şekil 16’da, *T. versicolor* için Şekil 17’de ve *Trametes sp.* için Şekil 18’de gösterilmiştir.



Şekil 15. *G. lucidum* elektropherogram grafiği



Şekil 16. *G. applanatum* elektropherogram grafiği

Şekil 17. *T. versicolor* elektroferogram grafiğiŞekil 18. *Trametes sp.* elektroferogram grafiği

Elektropherogram veri kalitesi görsel anlamda teyit edilerek sekanslar manuel kaydedilmiştir. Prensipde tarayıcının her nükleotidden aldığı sinyali bilgisayara kısa veya uzun fragmentler halinde yansıtmasıyla işleyiş gerçekleştirilmiştir.

Kısa fragmentler daha hızlı yol almaktadır. Koyu veya açık boyanmalarına göre bazlar seçilebilmektedir. Sekanslar “Wingene” nükleotid sekans analiz programı ile uygun şekilde tamamlanmış, sekansların BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizleri (Kumar ve ark., 2004) NCBI, GenBank USA ’ya gönderilerek 5.8S ve ITS sonuçlarına göre mevcut Gen Bankası koleksiyonunda yerleri belirlenmiştir.

4.9. Genetik manipulasyon çalışmalarına ait bulgular

4.9.1. Protoplast verimi açısından elde edilen bulgular

Kullanılan materyale göre protoplast verimi artış ya da azalış gösterebilmektedir. Bu aşamada önemli olan uygun enzim veya enzim kombinasyonları ile uygun ozmatik stabilizatörlerin tespit edilerek yüksek kalitede, hasarsız ve sayıca yeterli protoplastların elde edilmesidir.

Çalışmanın bu bölümünde Westminster Üniversitesi Biomedical laboratuvarında mevcut enzimler ile yapılan çalışmada protoplast eldesi açısından en yüksek verimin litikaz enzimiyle gerçekleştiği saptanmıştır(Çizelge 18). Ozmatik stabilizatörlerden de en iyi sonuç mannitol ile sağlanmıştır (Çizelge 19).

Çizelge 18. Protoplast oluşumu için kullanılan enzimler, protoplast değerleri ve protoplast oluşum yüzdeleri

Enzimler (Sigma –Aldrich)	Protoplast değeri ($\times 10^6/\text{ml}$)	Protoplast oluşturma (%)
Novozim	18.25	21
Selülaz	14.75	17
β –Glukuronidaz	14.85	17
Litikaz	19.24	23
Lywallzim	19.02	22

Çizelge 19. Ozmatik stabilizatörler ve rejenerasyon sıklığı

Ozmatik stabilizatörler	Rejenerasyon sıklığı (%)
Sükroz	2.6
Mannitol	2.7
Sorbitol	1.5
Glukoz	0.9
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄	2.4
KCl	0
NaCl	0

Protoplastlar monokaryotik misellerden temin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve çalışılan bütün izolatlar için ortalamalar oluşturularak kaydedilmiştir. Bunun dayanağı çalışılan izolatların benzer mantar grubu üyeleri olmaları ve protoplast değeri açısından yakın sonuçlar vermiş olmalarından ileri gelmektedir. Çalışma bu şekliyle benzer protoplast çalışmalarında elde edilen protoplast düzeylerinden daha olumlu sonuç vermiştir (Jiong & Chang 1993).

Yüksek protoplast verimliliğini, doğrudan doğruya çalışılan izolatın yaşı ve geliştirildiği koşullar oluşturur. Ayrıca kullanılan litik enzimler ve ozmatik

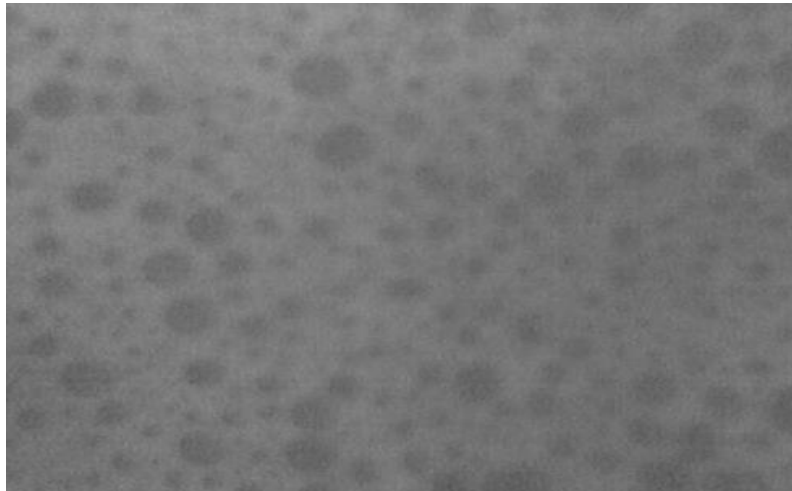
stabilizat rlerinde etkinliği önemlidir. Bu ve benzeri kriterler başarılı bir protoplast çalışması için değerlendirilmeli ve uygulanmalıdır.

Hibridizasyon çalışmalarında protoplast eldesi ve uygulanabilirliği açısından kullanılan örneklerin interspesifik ya da intraspesifik olmaları bu tarz çalışmalarda büyük öneme sahiptir.

Çalışmada *G. lucidum* ile *G. applanatum* ve *Trametes versicolor* ile *Trametes* sp. izolatlarının değerlendirmeleri öncelikli olarak protoplast oluşumu açısından ele alınmıştır. Bu anlamda protoplast oluşturma ve yoğunluğu açısından çalışma sırasında pek bir güçlükle karşılaşılmamıştır (şekil 19 ve 20).



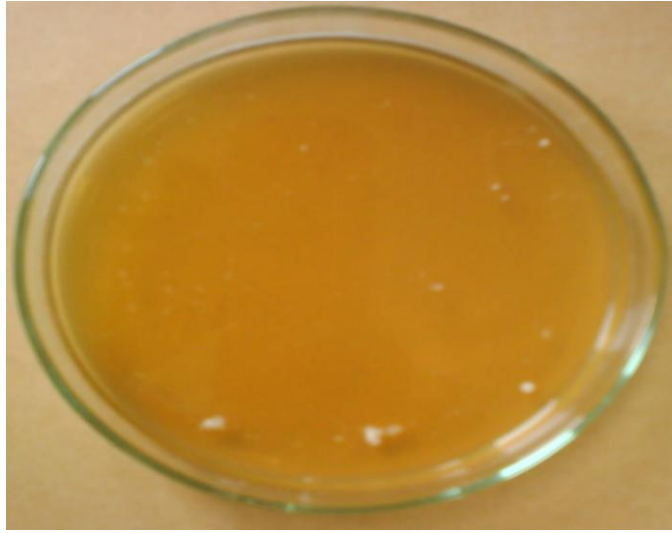
şekil 19. *G. lucidum*   *G. applanatum*



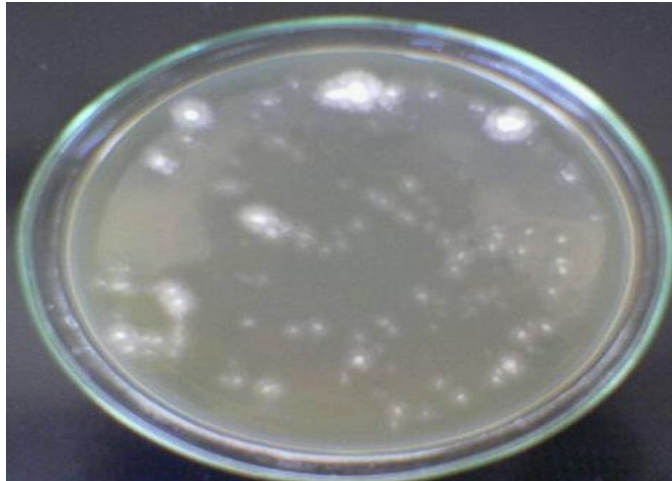
şekil 20. *Trametes versicolor*   *Trametes* sp.

Aynı cinsin farklı mensupları arasında ya da tür içi etkileşimlerde protoplast oluşturma başarısının oldukça göreceli olduğu bildirilmiştir (Peberdy 1991; Pan ve ark., 1994;).

Protoplast oluşturma başarısı yönünden yapılan değerlendirmelerde kullanılan ozmatik stabilizatörler, rejenerasyon besiyerleri, enzimatik reaksiyonlar, misel yaşı gibi bir çok faktörün protoplast rejenerasyonu üzerine etkin olduğu bilinmektedir (Vries & Wessels 1975; Peberdy 1991; Kim ve ark., 2000). Rejenerasyon besiyerine alınıp gelişmeye başlayan izolatlar tespit edilmiştir (Şekil 21 ve 22).



Şekil 21. *G. lucidum* × *G. applanatum*



Şekil 22. *Trametes versicolor* × *Trametes* sp.

Regeneratif protoplastlardan elde edilen izolatlar incelendiğinde gerek protoplast oluşturma gerek de rejenerasyonunun hızlı olması açısından yapılacak bir değerlendirme bu konuda monokaryotik izolatlarla yapılan çalışmaları destekler niteliktedir (Jiong ve Chang, 1993).

Benzer çalışmalarda elde edilen bulgularda daha düşük protoplast frekansı ortaya çıkmıştır (Pan ve ark., 1994). Bu durumun uygulamadaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Protoplast izolasyon teknikleri oldukça farklı yöntemler uygulanarak yapılabilmektedir (Bachman ve ark., 1959).

Çalışmada enzimsel bir etkileşim söz konusudur. Enzimlerle yapılan diğer protoplast protokollerinin bazılarında enzim ve akabinde stabilizatör uygulaması gerçekleştirilmiştir (Eichlerova ve ark., 2000).

Pratikte birlikte uygulanmaları daha kolaydır. Ayrıca kullanılan materyalin laboratuvar ortamında kolay gelişebilmesi ve etkileşimin hangi mantarlar arasında olduğu gibi kriterlerde protoplast frekansını doğrudan etkileyen faktörlerdir.

4.9.2. Fusant seçimi

Monokaryotik ve dikaryotik izolatlar kanca yapısı oluşturup oluşturumamasına göre hif yapılarının mikroskop altında yapılan incelemesi ile tespit edilmiştir. Regeneratif protoplastlardan elde edilen monokaryotik izolatlar diğer monokaryotik izolatlarla bir araya getirilerek uyumluluk analizi yapılmıştır.

Uyumluluk tespiti benzer çalışmalarda belirtilen şekilde petri üzerindeki hif gelişimi ve monokaryotik misellerin birbirine temas ettikleri yüzeydeki gelişime ve bu kısımlardan alınan misellerin kanca oluşturup oluşturumamasına göre analiz edilmiştir. Uyumlu izolatlar arasında meydana gelen hif gelişiminin oldukça yoğun olması dikkate değerdir. Bu durum Şekil 23 de gösterilmiştir.



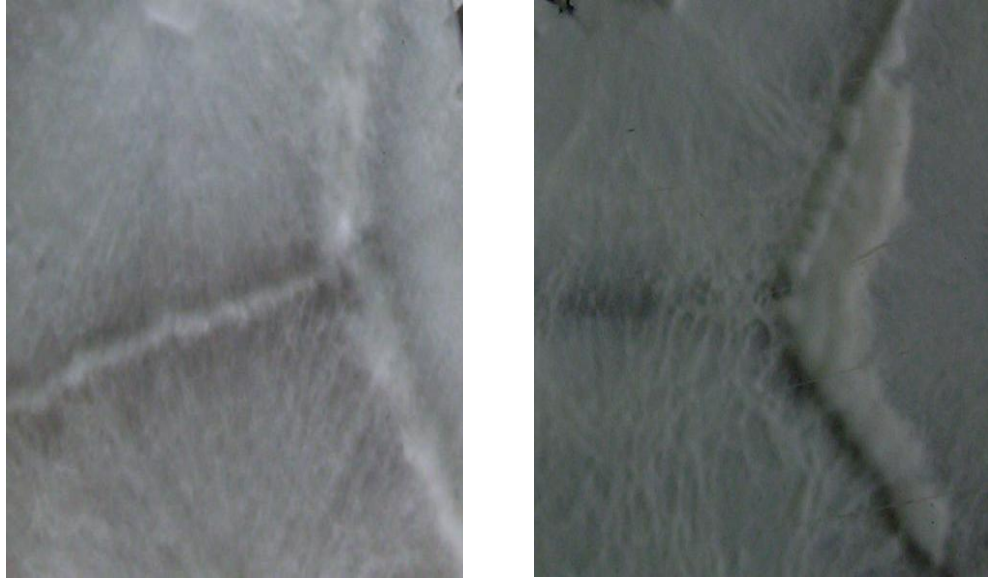
Şekil 23. Uyumlu monokaryotik izolatlar (*Ganoderma sp.*)

Tam tersi bir durum da uyumsuz izolatlardaki gelişimdir. Burada misellerin kesiştikleri bölgelerde hemen hemen hiç gelişim olmamaktadır (Şekil 24).



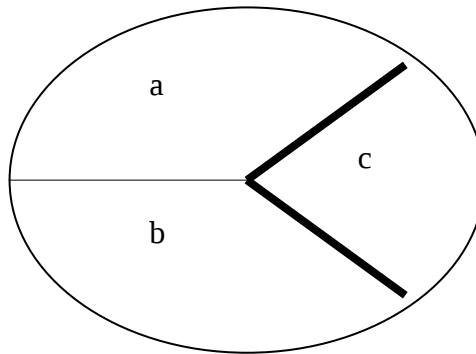
Şekil 24. Uyum göstermeyen monokaryotik izolatlar (*Ganoderma sp.*)

Trametes açısından da benzer bir değerlendirme yapılarak uyum durumları tespit edilmiştir. Monokaryotik misellerin uyumları petride temas noktalarında hifsel bir kalınlaşma şeklinde gözükmüş uyum göstermeyen çiftlerde ise bu durumun aksine zayıf hif yapısı ile temas noktalarında gelişmeme tespit edilmiştir (Şekil 25).



Şekil 25. *Trametes sp.* mutantlarının uyumlulukları

Şekil 25’de 3 farklı monokaryotik mutantın aynı petriye inokülasyonu sonucu 7 günlük ve 9 günlük inkübasyon süreleri neticesinde meydana gelen misel yapısı gözlenmektedir.



Şemadan da anlaşılacağı üzere a ile c’nin, ve b ile c’nin uyumu aşıkardır. a ve b arasındaki uyumsuzluk tam tezat oluşturacak şekilde belirgindir. İnkübasyon süresinin 3 gün daha artırılması bile bu durumu değiştirmemiş ve uyumlu olan bölgelerde hifsel yoğunluk, uyumsuz olan bölgede ise kısmi zayıflık belirgin birşekilde göze çarpmıştır.

Aynı cinsin farklı bireyleri arasında gerçekleştirilen böyle bir çalışmada rejenerasyon sonrası tespit edilen monokaryotik misellerin uyum durumuna göre elde edilen dikaryotik misellerde kullanılabilir. Bizim çalışmamızda ise rejenerasyon sonrası daha az frekansa elde edilen dikaryotik miseller (kanca oluşumu gözlenen miseller) ile çalışma yürütülmüş ve hem morfolojik hem de moleküler anlamda ele alınmıştır.

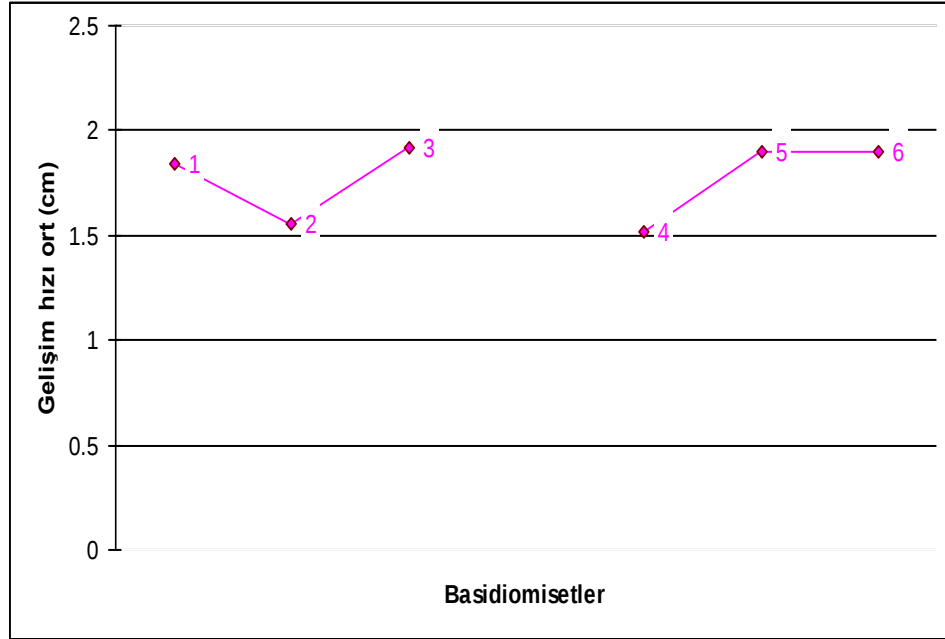
Hibritlerin tam anlamıyla melez olduklarının kanıtlanması amacıyla çalışmada kullanılan *Ganoderma sp.* ve *Trametes sp.* ana izolatlarıyla elde edilen misellerin hif yapısı misel gelişimi gibi morfolojik farklılıkların tespiti çizelge 20 ve 21’de belirtilmiştir.

Çizelge 20. YCM besiyerinde gelişen ana ve hibrit basidiomisetlerin gelişim hızları

Basidiomisetler (×3)	Misel gelişimi YCM ort (cm/gün)	Hifsel gelişim ort (cm/gün)	Morfoloji (misel)
<i>G. lucidum</i>	1.84	1.40	Beyaz pamuksu
<i>G. applanatum</i>	1.56	1.35	Açık kahve
<i>G. lucidum</i> × <i>G. applanatum</i>	1.92	1.42	Beyaz topaklaşmış
<i>T. versicolor</i>	1.52	1.35	Beyaz
<i>Trametes . sp.</i>	1.90	1.40	Beyaz -pembe
<i>T. versicolor</i> × <i>Trametes. sp.</i>	1.90	1.42	Beyaz –açık pembe

Çizelge 21’de kullanılan basidiomisetler ve bunlardan elde edilen hibritlerin petride günlük peryotlarla ölçülen gelişim hızları (cm) gözükmemektedir. Şemada 1-*G. lucidum*, 2- *G. applanatum*, 3- *G. lucidum*×*G. applanatum*, 4- *T. versicolor*, 5- *Trametes . sp.* ve 6- *T. versicolor*× *Trametes. sp.* izolatlarına ait miselleri ifade etmektedir.

Çizelge 21. Basidiomiset gelişim hızı



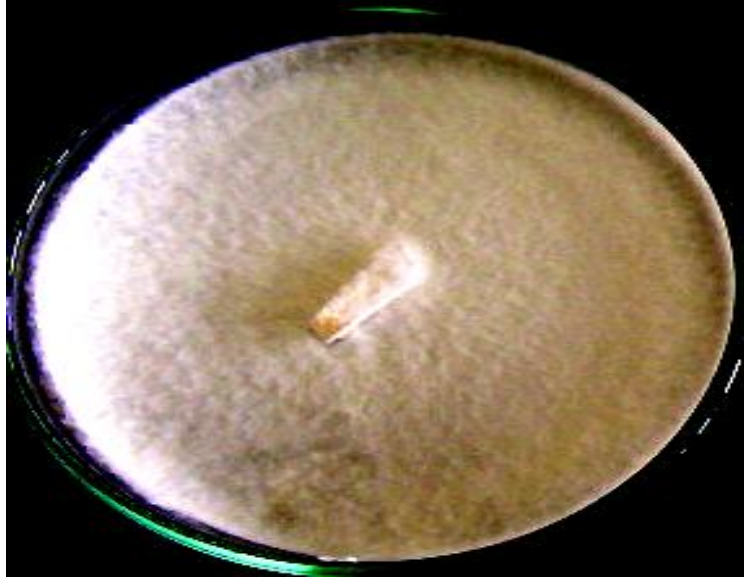
Hibrit misellerin daha hızlı geliştiği çizelgelerde 3 ve 6 numaralarla ifade edilmektedir. Miseller ilk defa pasajlandıklarında durum elbette bu şekilde gözlenmemiştir. Daha geç bir zamanlamada petri yüzeyine dağılım söz konusu idi. Bu durum mantarların kültüre alınması sırasında oldukça sık karşılaşılan bir olgudur (Dhitaphichit ve ark., 2005).

Misellerin bir anlamda kendini bulabilmesi için bir kaç pasajdan sonra değerlendirmeye alınmaları şarttır. Hibrit misellerin bu şekilde gerek hızlı gelişimi gerekde daha büyük hif yapılarına sahip olmaları bu konudaki teorileri destekler niteliktedir (Abe ve ark., 1982., Toyomatsu ve ark., 1987).

Misel karakteri yönünden yapılacak bir incelemede ise görülmektedir ki hibritlerin misel karakterizasyonu tam anlamıyla ebeveynlerinin ortak karakterini göstermemektedir. Örneğin bu konuda *Ganoderma* hibriti sadece *G. lucidum*'a benzerlik gösterirken *Trametes* mutanıtı sadece *Trametes* sp.'ye benzerlik göstermiştir (Şekil 26 ve 27). Bu durum hibritlerin tüm genomik yapılarının ebeveynlerden eşit düzeyde alınmadığını ortaya koyan çalışmaları destekler yöndedir (Dhitaphichit ve ark., 2005).



şekil 26. *Ganoderma sp. hibriti* (×3)

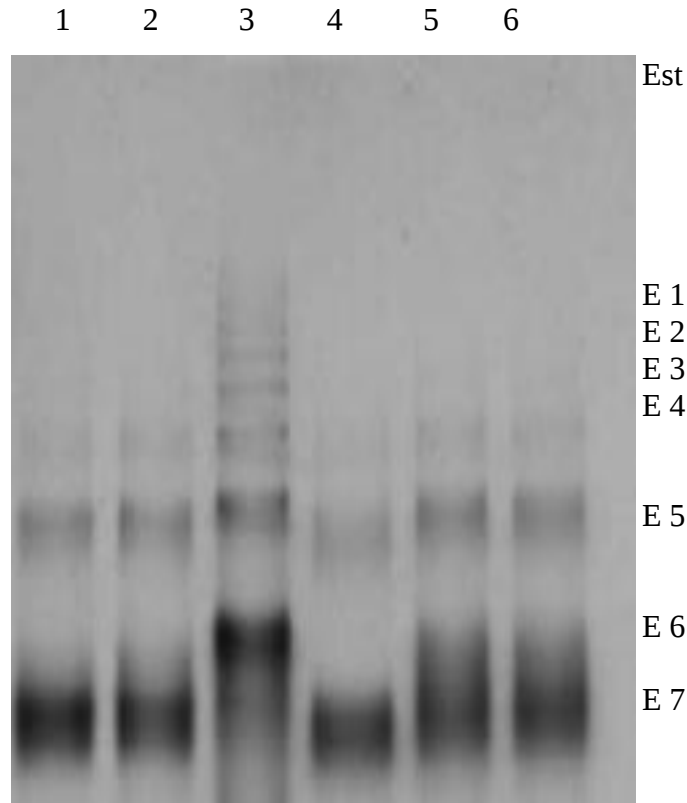


şekil 27. *Trametes sp. hibriti* (×3)

4.9.3. İzozim (Esteraz) determinasyonuna ilişkin bulgular

Nativ PAGE uygulaması spesifik olmayan esteraz izoziminin görüntülenmesi amacıyla kullanılmıştır.

SDS-PAGE için ticari moleküler ağırlık standartları olmasına karşın NATIVE PAGE için pek rastlanmamaktadır. Bu yüzden elektroforez sırasında herhangi bir standart kullanılmamıştır. Esteraz için α -naphthyl asetat substratı kullanılarak hazırlanan boya karışımı ile anoda göç eden toplam 7 tane bant belirlenmiş ve E1-E7 şeklinde numaralandırılmıştır (Şekil 28).



Şekil 28. Nativ PAGE elektroforezi 1-*G. lucidum*, 2-*G. applanatum*, 3-*T. versicolor*, 4-*Ganoderma sp.hibriti*, 5-*Trametes sp.*, 6-*Trametes sp. hibriti*

Şekil 28’de 1 nolu sütunda E5 ve E7 şeklinde iki bant göze çarpmaktadır. 2 nolu sütunda da E5 ve E7 değerlendirmeye alınırken E4 benzer elektroforetik sonuçlarda da ya çok zayıf bantlaşma göstermiş ya da burada olduğu gibi belli belirsiz gözüktüğü için değerlendirmeye alınmamıştır.

3 nolu sütunda *Trametes versicolor* için toplam 6 tane esteraz bantı belirlenmiştir (E1-E6). Tespit edilen en fazla bant 3 numaraya aittir. 4 nolu sütunda belirgin olmayan E7 şeklinde bir bant gözükrken 5 ve 6 numaralı sütunlarda E5 seçilebirken bunun dışında belirgin bir esteraz bantına rastlanılmamıştır.

E7 bantı yönünden 4 nolu sütun (hibrit) 1 ve 2 nolu sütunlarla kompozisyonel anlamda belirgin bir benzerlik gösterirken diğer hibrit olan 6 nolu bant E5 yönünden 3 nolu banta ve E6 yönünden de 5 nolu bantla benzerlik göstermektedir.

Esteraz incelemeleri yapılırken substrat spesifiteleri oldukça önemlidir. Özellikle esterazların çok lokuslu olmaları ve boyalarla çözünebilme davranışlarındaki farklılık bantlaşmaların tanımlanmasında bizim çalışmamızda da gözleendiği gibi çoğu zaman büyük güçlük getirmektedir. Fakat esteraz çalışmalarında kullanılan α ve β -naftil asetatlar yapılarında hidrofilik gruplar içerdiklerinden kolay çözünebilmektedir. Bu tarz çalışmalarda başka enzimler açısından (örneğin malat dehidrogenaz ya da peroksidazlar gibi) yapılan değerlendirmelerde çoğu zaman substratın çözünmemesi gibi zorluklarla karşılaşılabilir. Bu anlamda esteraz daha kolay çalışma olanağı sağlamaktadır. Ayrıca fusantlarda tespit edilen ebeveyn esteraz izozim bantları da değerlendirme açısından olumlu bir netice olarak kaydedilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mantar bilimi; mantarların optimal şartlarda kültüre alınması daha hızlı ve kaliteli ürün eldesi ve endüstrilere sunumu gibi birçok prensipler dahilinde incelenen bir disiplin şeklinde tanımlanabilir. Elbette bu anlayış içersinde beklenen, prensiplerin gelecek çalışmalara ışık tutacak teorileri de oluşturabilmesidir. Mantar izolatları ve bileşiklerinin bilimsel anlayış ve pratik çalışmalar açısından değerlendirilmesi bu anlamda günümüzde önem kazanmaktadır (Chang ve Miles, 1989).

Tanımlanmış 12000'den fazla mantar tipi olduğu ve bunlarında en azından 2000 çeşidinin belirli düzeylerde yenilebilir olduğu bilinmektedir (Chang, 1999). Ayrıca 200'ün üstünde mantar türünün doğal ortamdan izole edilerek uzakdoğuda yıllardır geleneksel anlamda edinilmiş bilgilerin ışığı altında kullanıldığı belirtilmiştir. Bugünlerde yaklaşık 35 mantar türü ticari uygulamalar için kültüre alınmış bunlardan da en azından 20 tanesi biyoteknolojik uygulamalar açısından değerlendirilmiş ve hem kuru hem de konsantre edilmiş bileşikleri içeren kapsül veya toz halinde ticari amaçla sunulmuştur. Bu türlerin önemi yenilebilir veya medikal anlamda değerlerinin tespit edilmesinden ileri gelmektedir. *Ganoderma sp.*,ve *Trametes sp.* gibi yenilebilir değeri olmayan ama medikal anlamda çok büyük etkinlikleri belirlenen polipor gruplarının bu anlamda incelenmesi günümüz şartlarında büyük bir zorunluluk haline gelmiştir.

Bir bilim insanı olarak bize düşen görev çalışmanın özünü ve günümüz şartlarında kazandığı önemi vurgulayarak çalışma sırasında izlediğimiz yolun açık bir şekilde ifadesi ile ileride yapılacak uygulamalara ışık tutmasına ön ayak olmaktır. Bu bilinçten hareketle önce izolasyonu yapılan mantarın optimal kültür koşullarının tespiti gerçekleştirilmiştir.

Polipor gruplarının optimal gelişim şartları elbette bu konuyla ilgili literatürlerde belirtilmiştir. Ancak mantarın bulunduğu ekolojik yapının değişiklikliklerine bağlı olarak hem mantar gelişimi hemde mantardan elde edilen bileşik çeşitliliği ve miktarı değişkenlik gösterebilmektedir. Elbette çalışmanın laboratuvar şartlarında ele alınması bir anlamda daha kontrollü bir gelişim sürecini de

beraberinde getirmiştir. Bu anlamda uygun metodların tespiti ve bütünüyle ele alınması önem arz etmektedir. Çünkü bu fazlardan herhangi biri yada birilerinde meydana gelecek başarısızlık bütün yöntemin yapısını bozacak ve çalışmanın bütününde kayıplara yol açacaktır. Çalışmamızda ele alınan kültür koşulları, mantar sporları ve türlerinin belirlenmesi, misel kültür ortamları, spawn /inokulum gelişimi, uygun besi ortamı hazırlanması, spawn inokulasyonu ve substratın kolonizasyonu, benzer polipor grupları ile genetik manipulasyonlar ve filogenetik anlamda sınıflandırma gibi parametreler nazarında bir bütün şeklinde ele alınmıştır.

Her ne kadar dünya genelinde *Ganoderma* cinsine ait çalışmalar mevcut isede ülkemizde henüz bu tip çalışmalar yok denecek kadar azdır. Ülkemiz bitki örtüsü açısından oldukça zengin bir floraya sahiptir. Elbetteki bu zengin doğal yapı beraberinde mantar popülasyonu açısından da bir zenginlik getirecektir.

Bilimde öncelik, yenilik getirmek farklı çalışma alanları kazandırmak ve elde edilen bulguların biyoteknolojik faaliyetlerde kullanılabilir olmasıdır. Bu amaçtan yola çıkılarak elde edilen mantara ait başlangıçta görünümü spor karakteri misel yapısı gibi tanımayı kolaylaştırıcı birçok karakter analiz edilmiştir. Ardından kültür koşullarının iyileştirilmesi ve ürün kalitesinin artırılması için sağlanan farklı kültür koşulları ile misel gelişim düzeyinin optimal sağlandığı en uygun koşullar tespit edilmiş ve bir sonraki aşama olan spawn gelişimi açısından değerlendirmeler yapılmıştır. Burada ortaya çıkan sonuçlardan farklı karbonik yapılanmanın spawn sürecine etkinlik hızının değişkenliğidir. Ayrıca talaş gibi organik atık şeklinde değerlendirilen yapıların bu anlamda kullanılabilmesi doğal eliminasyon şeklinde organik atıkların uzaklaştırılması yönünde, tekstil atıklarında benzer amaçla kullanılması da organik karbon açısından zengin atık eliminasyonlarının giderimi açısından faydalı olabileceği sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Mantar meyvesinin gelişimi açısından varılacak sonuç ise ortam koşullarının önemini vurgulamaktadır. Sıcaklıktaki birkaç derecelik bir artış, veya nem seviyesindeki yükseliş gibi yada ışık düzeyinin gerekli aralıklarda tutulmaması gibi olumsuz şartların mantar gelişimini doğrudan etkilemesi bugüne kadar çalışma düzgün gitmiş olsa dahi devamının tehlikede olduğu sinyallerini verebilmektedir. Bu da böylesi bir mantardan elde edilecek verimi düşürecektir. Başka bir ifadeyle bu tarz

bir çalışma son derece hassas bir teraziyi andırmaktadır. Dengelerin yerinde olması çalışma bütününe doğrudan etkilemektedir.

Her ne kadar mantarın gerek morfolojisi gerek misel karakteri gerekde spor yapısı gibi kriterler değerlendirilmiş olsa dahi bilimsel bir çalışmayı geçerli kılan bu tip tespitlerin genetik analizlerle perçinleştirilmesidir. Bu amaçla çalışmanın ikinci aşaması olan genetik manipulasyonlar öncelikli olarak filogenetik sınıflandırma açısından değerlendirilmiş ve hem izolatımız hem de Westminster Üniversitesi koleksiyonundan ve Tayland dan getirilen örneklerle çalışılmıştır. Moleküler filogenetik analizlerin moleküler araç olarak gelişimi ve kombinasyonlar yapılarak uygulanmalarının temelinde mantar gruplarının sınıflandırılmaları ve gelişim süreçleri doğrudan ilişkilidir. Bu bir anlamda klasik mantar sınıflandırma tekniklerinin morfolojik ve biyolojik karakterlerin açıklanmasında yeterli olmadığını da göstermektedir. Şekil yapılarındaki farklılık özellikle polipor grubu gibi benzer morfoloji gösteren mantarların teşhisini diğer mantar gruplarına göre zorlaştırmaktadır.

Bu tezde özellikle medikal anlamda önem arz eden polipor grubu mantarların filogenetik ilişkileri bu bağlamda incelenmiş ve bu konuda en sağlam metod olarak değerlendirilen rDNA ve nükleer ITS sekans analizi uygulamaları yapılarak sonuçlar bildirilmiştir. Bu bağlamda yapılan filogenetik analizler izolatımızın 99.8% benzerlik oranı ile *G. lucidum* olduğunu gen bankası datasında bulunan diğer referanslara dayanılarak göstermektedir. Benzer şekilde çalışılan *G.applanatum* için 97.6%, *Trametes versicolor* içinse bu oran 92.7 % şeklinde tespit edilirken Tayland dan temin edilen *Trametes sp.* için bu değer çelişkili kalarak izolatın 72.8% düzeyinde *Trametes villosa* olabileceğini göstermiştir. İzolat *Trametes sp.*'in birkaç türü ile de de benzerlik göstererek benzerlik katsayısı yaklaşık olarak 70 % dolaylarında seyir göstermiştir.

Genetik manipulasyon çalışmaları farklı türler arasındaki etkileşimlerin gözlenmesi yeni bireylerin ortaya çıkması ve çalışmamızında paralelinde bir sonuç şeklinde değerlendirilmesi gereken daha hızlı ve organik yönden zengin bileşiklerin elde edilerek sağlık alanında kullanılabilir olması yönünden etkinliğin araştırılması gibi bir bütünün vazgeçilmez parçalarıdır. Bu amaçla *G.lucidum*, *G.applanatum*'la

benzer şekilde *Trametes versicolor* da *Trametes sp.* ile protoplast füzyonuna sokulmuş rejenerasyon sonucu elde edilen bulgular değerlendirilmiş ayrıca çaprazlama sonucu elde edilen hibritlerin esteraz izozim kalıbı identifikasyonu Native PAGE uygulanarak ortaya çıkarılmış bu değerlendirmeler sonunda esteraz kalıbı yönünden melez izolatların ebeveyn olarak tarif edilebilecek örneklerle ait esteraz bantlarına benzer kalıplaşmalar gösterdiği ayrıca misel büyüklüğü ve gelişim hızı açısından da farklı oranlar göstererek bir anlamda gen havuzunun genişlemesine yardımcı olabileceği fikrini doğurmuştur.

Çalışma aynı cinsin farklı bireyleri arasında yapılmıştır. Farklı cinsler arasında yapılan bu tarz çalışmalarda daha geniş perspektifte değerlendirmeler gerekmektedir. Ayrıca başarı düzeyi oldukça değişken olabilmektedir, bu anlamda yapılabilecek bir değerlendirme cins düzeyinde yapılacak çalışmalardan elde edilen verimin daha yüksek olabileceğidir. Elbette bu demek değildir ki farklı cinsler arasında genetik manipulasyon çalışmaları olumsuz sonuç vermektedir. Sadece daha komplike analizler ve teçhizat gereksinimini de beraberinde getirmektedir. Bu amaçla ileride daha donanımlı çalışmalar yapabilmeyi umuyoruz.

Medikal anlamda doğal diye tabir edilen bileşiklerin sağlık amacıyla kullanılmasının değerinin yakın zamanda ortaya çıkması bu konuda yapılacak çalışmalara hız kazandırılması gerektiğini ortaya koymuştur. *Ganoderma* cinsine giren mantar izolatlarına yönelik şu anda dünya genelinde çok büyük bir ilgi vardır. Bunun başlıca nedeni mantarın sahip olduğu değerli bileşikler, kullanımındaki kolaylık ve bugüne kadar bildirilmiş herhangi toksik etkili bileşiğe rastlanılmamış olmasından ileri gelmektedir. Bu anlamda ülkemiz izolatlarının zenginliği düşünüldüğünde değerlendirilerek uluslararası boyutlarda ele alınması biyoteknolojik anlamda çok önemlidir.

Çalışmanın değerlendirilerek gen bankasında referans olarak yer alması dünya genelinde tanınmasını sağlamakta ve araştırmacılara kaynak niteliği teşkil etmektedir. Bu bir anlamda benzer çalışmalar yürüten araştırmacıları değişken morfoloji gösteren ve karakterlerindeki plastisite gibi farklılıklara sahip polipor gruplarının doğru tanımlamalarının yapılmasında anahtar rolü oynaması açısından önemlidir.

Mantar üretimi devamlı ve özenli yürütülmesi gereken bir prosestir. Atmosfer sıcaklığı nem ve ışık kontrolü, (mikrobiyolojik kontaminasyondan uzak duracak şekilde) aseptik çalışma tekniklerine uygun hareket etme gibi kriterlerin doğru kontrolü bu anlamda çok kritik değerlendirmelerdir.

Uygulama prosesleri ve oluşan ürünler açısından yapılacak bir değerlendirme biyoteknolojik anlamda mantarların çok geniş bir spektrumda dağılım gösterdiğini ortaya koymuştur. Antibiyotik ve alkol üretiminden enzim ve organik asitlere farmakolojik bileşiklerden atık su arıtmalarına ve gıda endüstrisine kadar biyoteknolojinin birçok alanında mantarlar ve mantar bileşiklerinin önemi gün geçtikçe artmaktadır.

Rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkması özellikle geniş ebatlı genomik analizlerin uygulanabilir olmasını sağlamış ve ticari uygulamalar açısından mantar kullanımını arttırmıştır. Günlük hayatta bilimsel yeniliklerle sağlanan değişimler insan yaşayış şekillerini biçimlendirmektedir. Bu amaçla özellikle rekombinant DNA teknolojileri, sekans analizleri vs. otomatizasyonun hız kazanması biyolojideki çeşitliliğin artmasına ve özellikle çok geniş bir alanda uygulamaların oluşumu için bir eşik (kapı) niteliği görmektedir.

Medikal anlamda doğal diye tabir edilen bileşiklerin sağlık amacıyla kullanılmasının değerinin yakın zamanda ortaya çıkması ve özellikle bu konuda kullanılan ilaçlarla mukayese edildiğinde yok denebilecek kadar minimal oranlarda toksik etkiye sahip *Ganoderma sp.* ve *Trametes sp.* cinslerine giren mantar grupları bu anlamda yapılan değerlendirmelerde biyoteknoloji basamaklarında ön sıralara gelmiştir.

Ülkemiz izolatlarının biyolojik zenginliği düşünüldüğünde değerlendirilerek uluslararası boyutlarda ele alınması bilimsel anlamda bizlere düşen bir şarttır. Çalışmanın değerlendirilerek gen bankasında referans olarak yer alması dünya genelinde tanınmasını sağlamakta ve araştırmacılara kaynak niteliği teşkil etmektedir.

Bu konuyla ilgili araştırmacıların çalışmalarının uluslar arası boyutta değerlendirilerek ele alınması mevcut şartlarda biyoteknoloji havuzunda farklı alternatiflerinde yer almasını sağlayacak ve özellikle insanlığın gelişimine büyük hizmetler sunacağı bilincindeyiz.

KAYNAKLAR

- ABE, M., Umetsu, H., Nakai, T. and Sasage, D. 1982. Regeneration and Fusion of Mycelial Protoplasts of *Tricholoma matsutake*. *Agric. Biol.Chem.*, 46: 1955-1957.
- ADASKAVEG, J.E. and R.L. Gilbertson, 1986. Cultural studies and genetics of sexuality of *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae* in relation to the taxonomy of the *G. lucidum* complex. *Mycologia*. 78 (5): 694- 705.
- ADASKAVEG, J .E. and R.L. GILBERTSON. 1988a. Basidiospores, pilocystidia, and other basidiocarp characters in several species of the *Ganoderma lucidum* complex. *Mycologia*. 80:493- 507.
- ALDRICH, P.R., Doebley, J., Schertz, K.F. and Stec, A. 1992. Patterns of allozyme variation in cultivated and wild *Sorghum bicolor*. *Theor. Appl. Genet.*, 85; 451-460.
- ALEXOPOULOS , C.J., C.W. Mims , and M. Blackwell. 1996. Introductory mycology. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- ALVES, A.M.C.R., Eric. R., Lomasco A.,2004. *App. Env. Microbiol.* p. 6379–6384 Vol. 70, No. 11
- ALY I.N., Sattara Elsalam K. A., Khalil m.s.,Verret J.A ,2003. Comparison of multi-locus enzyme and protein gel electrophoresis in the discrimination of five *Fusarium* species isolated from Egyptian cottons. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 2 (7), pp. 206–210
- ANDO, K. 1997. 12th Preservation of mushroom cultures. *Food Rev In.t* 13, 423-429.
- ANGELA Lopes de Almeida Amazonas and Marin Berovi. 2003. Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum*, *Food Technol. Biotechnol.* 41 (4) 371–382 ~
- APPELS, R., W.L. Gerlach, E.S ., Dennis , H., Swift, and W.J. Peacock, 1980. Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma*. 78: 293- 311.
- BACHMAN ,B. J. and D. M. Bonner. 1959. *J. Bacterial.* 78 550-553 .

- BACHMANN, K. 1993. Molecular markers in plant ecology, Tansley Review, No: 63; 403-414
- BAE, J. T., Sinha, J., Park, J. P., Song, C. H. & Yun, J. W. 2000 Optimization of submerged culture conditions for exo biopolymer production by *Paecilomyces Japonica*. *J Microbiol Biotechnol* 10, 482-487.
- BALDAUF, S .L. and J .D. Palmer , 1993. Animals and fungi a reach other's closest relatives: congruent evidence f rom mult iple proteins . *Proc. Natl. A cad. S ci. US A* 90 : 11558- 11562.
- BAO, X. F. Wang, X. S., Dong, Q., Fang, J. N. & Li, X. Y. 2002. Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 59, 175-181.
- BELTRAME-BOTELHOA, I. T., D. Gaspar-Silvaa, M. Steindel a, A.M.R. Dávilab, E.C. Grisarda. 2005. Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. *Infection, Genetics and Evolution*. 5 17–28
- BERBEE, M. L. & Taylor, J. W. 1992. Detecting morphological convergence in true fungi, using 18S rRNA gene sequence data. *BioSystems*. 28, 117-125.
- BILAY, V. T., Solomko, E. F. & Buchalo, A. S. 2000. Growth of edible and medicinal mushrooms on commercial agar media. In Proc 15th Congress Sci Cultivation of edible Fungi, vol. 1 & 2, pp. 757-761.
- BINDER, M.& Hibbet, D. S. 2001. Higher-level phylogenetic relationships of Homobasidiomycetes inferred from four rDNA regions. *Mycological Res*. 104: 76-90.
- BINNINGER, D.M., Skrzynia, C., Pukkila, P.J. and Casselton, L.A. 1987 DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *EMBO Journal* 6, 835±840.
- BOIDIN, J. and R. P. Korf, 1998. Comments on the names Trametaceae, Coriolaceae, and Trametales. *Mycotaxon*. 68: 497-498
- BOLLAG, D. M. and Edelstein, S. J. 1991. Protein Methods. *Villey-Liss Press*.
- BONDE, M. R., Micales, J. A. 1993. The use of isozyme analysis for the identification of plant pathogenic fungi. *Plant Dis*. 77:961

- BOURBONNAIS, R., M. G. Paice, I. D. Reid, P. Lanthier, and M. Yaguchi, 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,29-azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in kraft lignin depolymerization *Appl. and Environ. Microbiol.* p. 1876–1880 Vol. 61, No. 5
- BRANCATO, F. P. & Golding, N. S. 1953. The diameter of the mold colony as a reliable measure of growth. *Mycologia.* 45, 848-864.
- BRETTING, P. K. and Widrlechner, M. P. 1995. Genetic markers and horticultural germplasm management. *Hort. Sci.*, 30 (7); 1349-1356.
- BRYAN, G.T., Daniels, M.J. and Osbourn, A.E. 1995. Comparison of fungi within the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by analysis of ribosomal DNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:681-689.
- BRUNS, T .D., T .J. White and J .W. Taylor , 1991. Fungal molecular systematics. *Annu. Rev . Ecol. Syst .* 22 :525- 564.
- BRUNS, T .D. and T .M. Szaro, 1992. Rate and mode differences between nuclear and mitochondrial small-subunit rRNA genes in mushrooms. *Mol. Biol. Evol.* 9: 836- 855.
- BURNS, C., Gregory K. E., Kirby M. 2005. Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns *Fungal Genetics and Biology* 42 191–199
- BUXTON, F.P. and Radford, A. 1983 Cloning of the structural gene for orotidine 5-phosphate carboxylase of *Neurospora crassa* by expression in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* 190, 403±405.
- BYONG, Kak Kim, Ju Hye Kang, Mirim Jin, Ha Won Kim, Mi Ja Shim and Eung Chil Choi, 2000. Mycelial Protoplast Isolation and Regeneration of *Lentinus Lepideus*. *Life Sciences*, Vol. 66, No. 14, pp. 1359-1367
- CAMPBELL, A.C., Slee, R.W., 1989. The introduction of *Lentinus edodes*, the Japanese wood mushroom, to the UK. *Nature in Devon* 10, 25±33.
- CAMPBELL, A.C., Racjan M., 1999. The commercial exploitation of the white rot fungus *Lentinula edodes* (shiitake) *International Biodeterioration & Biodegradation* 43 (1999) 101±107

- CARBONE, I. and L.M. Kohn, 1993. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia* 85: 415- 427.
- CAROLAN, J. C., Hook, I. L. I., Walsh, J. J. and Hodkinson, T. R. 2002. Using AFLP markers for species differentiation and assessment of genetic variability of in vitro-cultured *Papaver bracteatum* (Section oxytona). *In vitro Cell. Dev. Biol.Plant.* 38; 300-307.
- CARVALHO Vanda Marilza de, Rosimar Maria Marques, Ana Silvia Lapenta and Maria de Fátima P.S. Machado. 2003. *Genetics and Molecular Biology.* 26, 2, 195-198
- CAVALIER - SMITH, T . 1987. The origin of fungi and pseudofungi, pp. 339- 353 In Rayner, A.D.M., C.M. Brasier and D. Moore (eds.) *Evolutionary biology of the fungi.* Cambridge University Press , Cambridge
- CHAKRABORTY, B.N., Patterson, N.A. and Kapoor, M. 1991. An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 37, 858±863.
- CHANG, H. M. & But, H. P. P. 1986. *Pharmacology and applications of Chinese Materia Medica.* 740p. World Scientific, Singapore
- CHANG, S.T. & MILES, P.G. 1992. Mushroom biology-A new discipline. *Mycologist* 6, 64-65
- CHANG, S. T. 1995. *Ganoderma*-The leader in production and technology of mushroom nutraceuticals. In *Proc 6th Int Symp Recent Adv Ganoderma lucidum Res* (ed. B. K. Kim, I. H. Kim and Y. S. Kim), pp.43-52. The Pharmaceutical Society of Korea, Seoul, Korea.
- CHANG, S. T. & Buswell, J. A. 1996. Mushroom nutraceuticals. *World J. Microbiol Biotechnol* 12, 473-476.
- CHANG, S. T., Bushwel, J.A. and Miles, P. G., 1999 *Genetics and breeding of edible mushrooms.* Gordon and Breach Science Publishers. Malaysia
- CHANG, Ming-Yao, Guo-Jane Tsai a, Jer-Yiing Houn. 2005. Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. *Enzyme and Microbial Technology*

- CHEN, K. Li C. 1993. Recent advances in studies on traditional Chinese anti-aging material medica. *J Tradit Chin Med* 13(3):223-226.
- CHEN, A. W. & Miles, P. G. 1996b. Cultivation of *Ganoderma bonsai*. In Proc 2nd Int Conf Mush Prod, University Park, Pennsylvania.
- CHEN, A. W. 1999. Cultivation of the Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* in North America. *Int J Med Mush* 1, 263-282.
- CHEN, D. H. and W. K. CHEN 2003. Determination of Ganoderic acids in Triterpenoid Constituents of *Ganoderma tsugae*. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 11, No. 3, 2003, Pp:195-201
- CHEUNG, H.Y., C.W. Ng, D.J. Hood, 2001. Identification and quantification of base and nucleoside markers in extracts of *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma japonicum* and *japonicum* and *Ganoderma* capsules by micellar electrokinetic chromatography *Journal of Chromatography A*, 911: 119–126
- CHIENYAN, Hsieh, Mei-Hua Tseng, Chia-Jang Liu. 2005 Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC 36041) under limitations of nutrients *Enzyme and Microbial Technology*
- CLARK, A. M. 1996. Natural products as a resource for new drugs. *Pharm Res* 13, 1131-1141
- CORNER, E.J.H., 1983. Ad. Polyporaceae. *Amauroderma* and *Ganoderma*. *Beheft NovaHedwigia* 75, 1- 182.
- CRAGG, G.M., Newman, D.J. & Snader, K.M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 60, 52-60.
- CRAWFORD, D.J. 2000. Plant macromolecular systematics in the past 50 years: one view. *Taxon*, 49; 479-501.
- DEMAIN, A.L. & Elander, R. P. 1999. The β -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek* 75, 5-19
- DHAWALE, S.S., Paietta, J.V., Marzluf, G.A. 1984. A new rapid and efficient transformation procedure for *Neurospora crassa*. *Current Genetics* 8, 77–79
- DHITAPHICHIT, P. and Pornsuriya, C, 2005. Protoplast fusion between *Pleurotus ostreatus* and *P. djamor* Songklanakarin *J. Sci. Technol.*, 27(5): 975-982

- DANIEL C. 1997. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. 1997 *Journal of Biotechnology* 53. 273-289
- DONK, M. A. 1964. A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia* 3 : 199- 324.
- D'SOUZA, T. M. K. Boominathan, and C. Adinarayana R. 1996. Isolation of Laccase Gene-Specific Sequences from White Rot and Brown Rot Fungi by PCR. *App. Environ. Microbiol.* p. 3739–3744 Vol. 62, No. 10
- DUPUIS, C., C. Corre, and P. Boyaval, 1993. Lipase and Esterase Activities of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Freudenreichii*. *Appl. and Environ. Microbiol.* p. 4004 4009 Vol. 59, No. 12
- EICHLEROVA, I., K., Ruel, L., Homlka, J.-P. Joseleau & Frantisek N. 2000 Ligninolytic characteristics of *Pleurotus ostreatus* strain F6 and its monokaryotic protoplast derivative P19. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 1153–1158
- ELLIOTT, T. J. and Challen, M. P. 1986. Mushroom Mutant Strains *United States Patent*- 4.608.775. Current U. S. Class:800/297
- ELVIN-LEWIS, M. 2001. Should we be concerned about herbal remedies. *J Ethnopharmacol* 75, 141-164.
- ENDO, A., Kuroda, M. & Tanzawa, K. 1976a. *FEBS Lett* 72, 323-326
- ENDO, A., Kuroda, M. & Tsujita, Y. 1976b. ML-236A, ML-236B, ve ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot* 29, 1346-1348
- FAHRAEUS, Gösta and Reinhammar, Bengt. 1967. Large scale production and purification of laccase from cultures of the fungus *Polyporus versicolor* and some properties of laccase A. *Acta Chemica Scandinavica*, vol. 21, p. 2367-2378.
- FANG, Q. H. & Zhong, J. J. 2002a. Two stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *G. lucidum*. *Biotechnol Prog* 18, 51-54.

- FARNSWORTH, N.R. 1994. Ethnopharmacology and drug development. In *Ethnobotany and the search for new drugs Ciba Foundation Symposium*, Vol. 185 (ed. G. T. Prance), pp. 42-59. Wiley, Chichester.
- FATEHI, J. and P. Bridge, 1998. Detection of multiple rRNA- ITS regions in isolates of *Ascochyta*. *Mol. Res.* 102: 762- 766.
- FINCHAM, J.R.S. 1989 Transformation in fungi. *Microbiology Reviews* 53, 148±170.
- FLEMING, A. 1929. On the antibacterial action of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit J Exp Pathol* 10, 226-236
- FÖSTER, H., M.D. Coffey, H. Elwood, and M.L. Sogin, 1990. Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNAs of three zoosporic fungi and implications for fungal evolution. *Mycologia* 82(3): 306- 312.
- GARDES, M., Jean Bousquet, and Maurice Lalonde 1987. Isozyme variation among 40 *Frankia* Strains. *Appl. and Environ. Microbiol.* p. 1596-1603
- GERBI, S .A. 1985. Evolution of ribosomal DNA, pp. 419- 517. In MacIntyre, R.J. (ed.) *Molecular evolutionary genetics*. Plenum Press, New York.
- GILBERTSON, R.L. and L. Ryvarden, 1986. North American polypores. *Fungiflora*, Oslo.
- GILL, M. and W. Steglich, 1987. Pigments of fungi. *Progress Chem. Org. Nat. Products*. 51: 1-317
- GOLD M. H., Therese M. Cheng, and Margaret A. 1983. Formation, Fusion, and Regeneration of Protoplasts from Wild-Type and Auxotrophic Strains of the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *App. Environ. Mic.* p. 260-263 Vol. 46,
- GOLEMBIEWSKI, R.C., Danneberger, T. K. and Sweeney, P.M. 1997. Potential of RAPD Markers for use in the identification of creeping bentgrass cultivars. *Crop Sci.*, 37; 212-214.
- GOMES-BARCELLOS, F., Pelegrinelli-Fungaro, M.H., Furlaneto, M.C., Lejeune, B., Pizzirani-Kleiner, A.A. and Azevedo, J.L. 1998 Genetic analysis of

- Aspergillus nidulans unstable transformants obtained by the biolistic process. *Canadian Journal of Microbiology*
- GOTTLIEB, A.M., B.O. Saidman, and J .E. Wright , 1998. Isoenzymes of *Ganoderma* species from southern South America. *Mycol. Res* . 102: 415-426.
- GOTTLIEB, A.M. & J .E. Wright. 1999b. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America:subgenus *Ganoderma*. *Mycological Res* 104, 1033-1045.
- HAMBURGER, M.&Hostettmann, K. 1991. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 30, 3864-3874
- HARUYAMA, H., Kuwano, H., Kinoshita, T., Terahara, A., Nishigaki, T. & Tamura, C. (1986). Structure elucidation of the bioactive metabolites of ML-236B (mevastatin) isolated from dog urine. *Chem Pharm Bull* 34, 1459-1467.
- HASHIBA, T. 1992. Isolation of fungal Protoplast. P. *In Handbook of applied Mycology*. Vol. 4, pp. 129-149.
- HAWKSWORTH, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Res* 95, 641-655.
- HAWKSWORTH, D.L., P .M. Kirk, B.C. Sutton, and D.N. Pegler, 1995. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. CAB International, Wallingford.
- HAZELL, B.W., Te'o, V.S., Bradner, J.R., Bergquist, P.L. and Nevalainen, K.M. 2000 Rapid transformation of high cellulaseproducing mutant strains of *Trichoderma reesei* by microprojectile bombardment. *Letters in Applied Microbiology* 30, 282±286.
- HEXIANG WANG , T.B. 2005. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides*.
- HIBBETT, D.S. and M.J. Donoghue, 1995. Progress toward a phylogenetic classification of the Polyporaceae through parsimony analysis of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Can . J. Bot* . 73 (S1) : S 853- S 861.
- HIBBETT , D.S., E.M. Pine, E. Lang er, G. Langer, and M.J. Donoghue, 1997. Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proc. Nat l. A cad. Sci. US A* 9 4: 12002- 12006.

- HILLIS, D.M. and Moritz, C.,1990, Molecular systematics, Sinauer Associates, Inc. Publishers, p 217-220, Sunderland.
- HILLIS, D.M. and M.T. Dixon, 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev .Biol.* 64: 411- 453.
- HOFMAN, W. F., Alberts, A. W., Anderson, P. S., Chen, J. S., Smith, R.L. & Willard, A. K. (1986). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. E. Side chain ester derivatives of mevlinolin. *J Med Chem* 29, 849-852
- HONG, S. G., Jeong, W. & Jung, H. S. 2002. Amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of polypores and its potential for phylogenetic analysis. *Mycologia* 94, 823-833.
- HSEU, R. S., Wang, H. H. F. & Moncalvo, J. M. 1996. Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by RAPD-PCR compared with grouping on the basis of ITS sequences. *Appl Environ Microbiol* 62, 1354-1363.
- HUNDT, Kai D. Martin, Elke H., Ulrike Jonas, M. K. Kindermann, and Frieder Schauer, 2000. Transformation of Triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. and Environ. Microbiol.* p. 4157–4160 Vol. 66, No. 9
- IDRIS, A S; Yamaoka, M; Hayakama, S; Basri, M W; Noorhasimah, I and Ariffin, D.2003. PCR technique for detection of *Ganoderma*. MPOB TT No. 188 mpob. information series.
- JENG, L. Maua, Hsiu-Ching Lin A, Chin-Chu Chen, 2001, Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International* 34: 521–526
- JIONG & CHANG 2004. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volume 20, Number 2, pp. 173-177(5)
- JOHANSEN, C. L., Coolen, L. & Hunik, J. H. 1998. Influence of morphology on product formation in *Aspergillus awamori* during submerged fermentations. *Biotechnol Prog* 14, 233-240.
- JÜLICH, W., 1981. Higher taxa of basidiomycetes. *Bibliotheca Mycolica* 8 5: 1-485.

- KARSTEN, P., 1881. Enumeratio Boletinearum et Polyporearum Fennicarum, Systemate novo dispositarum. *Rev. Mycol. (Toulouse)* 3: 16- 19.
- KENDRICK, B. 1985. The fifth Kingdom. *Mycologue Publication*, Waterloo.
- KEUNSOOK Kim A, Youngeun Leem , Kyujoong Kim , Kyunghoon Kim, Hyoung T. Choi 2002. Transformation of the medicinal basidiomycete *Trametes versicolor* to hygromycin B resistance by restriction enzyme mediated integration. *FEMS Microbiology Letters* 209 273-276
- KIM, K. C. & Kim, I. G. 1999. *Ganoderma lucidum* extract protects DNA from strand breakage caude by hydroxyl radical and UV irradiation *Int J Mol Med* 4, 273-277.
- KLEIN, T.M., Wolf, E.D., Wu, R. and Sanford, J.C. 1987 High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327, 70±73.
- KNUDSEN, G. R. &Stack, j. P. 1991. Modeling growth and and dispersal of fungi in natural environments. In *Handbook of applied Mycology*, vol. 1, pp. 625-645.
- KO, K.S. and H.S. Jung , 1999 . Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera. *Anton. van Leeuw*
- KOTHE, G.O. and Free, S.J. 1996 Protocol for the electroporation of *Neurospora spheroplasts*. *Fungal Genetics Newsletters* 43, 31±33.
- KUMAR, S. and A. Rzhetsky, 1996. Evolutionary relationships of eukaryotic kingdom. *J. Mol. Evol.* 4 2:183- 193.
- KUMAR, S., Tamura, T. and Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:2
- KUMLAY, A. M., Kaya, C., Olgun, M. and Dursun, A. 2000. Molekculer Genetik Techniques Assisting to Conventional Metods in Potato Improvement, 2. Balkan Sebze ve Patates Sempozyumu, 10-14 Ekim 2000, Selanik, Yunanistan.
- LEE K. M., S. Y. Lee, H. Y. Lee. 1999a. Bistage control of pH improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermenter. *J. Biosci. Bioeng.* 88: 646–650.

- LEE, K. M., Lee, S. Y. & Lee, H. Y. 1999b. Effect of ammonium phosphate on mycelial growth and exopolysaccharides production of *Ganoderma lucidum* in an air lift fermenter. *J Microbiol Biotechnol* 9, 726-731.
- LI SUN, Huaqing Cai, Weihong Xu, Yuanlei Hu, Yin Gao and Zhongping Lin, 2001. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 383-383, *Int. Society for Plant Molecular Biology*.
- LI, W.- H., C.-C. Luo, and C.- I Wu, 1985. Evolution of DNA sequences, pp. 1- 93. *In* MacIntyre(ed.)
- LIEU, C. W., Lee, S. S. & Wang, S. Y. 1992. The effect of *Ganoderma lucidum* on induction of differentiation in leukemic U937 cells. *Anticancer Res* 12, 1211-1215.
- LIN, C. P., Sun, A. T. & Liu, Y. A. 1973. Studies on the submerged cultivation of *Ganoderma* sp. *Acta Microbiol Sin* 13, 145-151.
- LIN, J .M., C.C. Lin, M.F. Chen, T. Ujiie, and A. Takada, 1995. Radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Ganoderma formosanum*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma neo-japonicum* . *J. Ethnopharmacol.* 47 (1): 33- 41.
- LIPSITCH, M. & Samore, M.H. 2002. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: A population perspective. *Emerg. Infect Dis* 8, 347-354
- LONERGAN, G., Jones, C. & Mainwaring, D. 1993. The effect of pH and temperature on radial growth rate and biomass production for selected Australian white rot fungi in comparison with two strains of *Phanerochaete chrysosporium*. *Materials and Organism* 28, 309-317.
- MACRAE, R., 1967. Pairing incompatibility and other distinctions among *Hisschioporus abietinus*, *H. Fusco-violaceus*, and *H. laricinus*. *Can. J. Bot.* 45: 1227-1398
- MAGASI, L. P., 1976. Incompatibility factors in *Polyporus abietinus*, their numbers and distributions. *Mem. N. Y. Bot. Gard.* 28:163-173.
- MAY, G.S. 1992 Fungal technology. In *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi* ed. Kinghorn, J.R. and Turner, G. pp. 1±27.
- MAYZUMI, F. H. Okamoto, T. Mizuno. 1997. *Food Rev. Int.* 13 365-382

- MCGOWAN, J. E. J (2001) Economic impact of antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis* 7, 286-292.
- MICALES, J. A., Bonde, M. R., and Peterson, G. L. 1986. , The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics, *Mycotaxon*, 27, 405,
- MICALES, J. A., Bonde, M. R, 1993. The use of isozyme analysis for the identification of plant pathogenic fungi. *Plant Dis.*, 77, 961
- MILLER, R. N. G., Holderness, M., Bridge, P. D., Chung, G. F. & Zakaria, M. H. 1999. Genetic diversity of *Ganoderma* in oil palm plantings. *Plant Pathology* 48, 595-603.
- MITCHELL, J .I., P.J. Robert s, and S .T. Moss, 1995. Sequence or structure A short review on the application of nucleic acid sequence in formation to fung a l taxonomy. *Mycologist* 9(2):67- 75.
- MIZUNO, T. G. Y. Wang, J. Zhang, H. Kawagishi, T. Nishitoba, J. X. Li. 1995 *Food Rev. Int.* 11:151–166.
- MIZUNO, T., Sakai T. & Chihara, G. 1995a. Health foods and medicinal usages of mushrooms. *Food Rev Int* 11, 69-81.
- MOHAMMADI, M., M. Aminipour¹ and Z. Banihashemi.2004. Isozyme Analysis and Soluble Mycelial Protein Pattern in Iranian Isolates of Several formae speciales of *Fusarium oxysporum* *J. Phytopathology* 152, 267–276
- MONCALVO, J. M., Wang, H. H. & Hseu, R. S. 1995a. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87: 223±238.
- MONCALVO, J.- M., H.- F. Wang, and R.- S. Hseu, 1995b. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complexes based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. *Mycol. Res* .99 (12): 1489- 1499.
- MONCALVO, J.- M. and L. Ryvarden, 1997. A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk. *Synopsis Fungorum* 11, Fungiflora, Oslo.
- MONCALVO, J. F. & Ryvarden, F. 1998. Nomenclature of Ganodermataceae. *App. and Environ. Microbiol.* p. 2166–2174

- MONCALVO, J. M. 2000. Systematics of *Ganoderma*. In *Ganoderma Diseases of Perennial Crops*, pp. 23-45. CABI Bioscience, Egham, UK.
- MORIGIWA, A. Kitabatake, K., Fujimoto, Y. & Ikekawa, N. 1986. Angiotension converting enzyme inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 34, 3025-3028.
- MOTHANA, R. A., Jansen, R., Julich, W. D. & Lindequist, U. 2000. Ganomycins A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycetes *Ganoderma pfeifferi*. *J Nat Prod* 63, 416-418.
- MUKAILA, K., Auwalu Halliru Arzai. 2004. Cultivation of *Lentinus subnudus* Berk (Polyporales: Polyporaceae) on woodlogs. *Bioresource Technology* 94 (2004) 65–67
- MUKHERJEE, M., and S. Sengupta, 1986. Mutagenesis of protoplasts and regeneration of mycelium in the mushroom *Volvariella volvacea*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 1412-1414 Vol. 52, No. 6
- MUNOZ, C., F. Guille'N, A. T. Marti'Nez, and M. J. Martinez, 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in cultivation of Molecular Oxygen and Mn21 Oxidation. *App. Environ. Microbiol.* p. 2166–2174
- NAOI, Y. 1997. Artificial cultivation of “Reishi”: To harvest the highest-quality *Ganoderma lucidum*. In *Proc 1st Int Symp Ganoderma lucidum in Japan*, pp. 160-162. Toyo- Igaku-sha Co., Ltd., Tokyo, Japan.
- O' DONNELL, K. and E. Cigelnik, 1997. Two divergent intra genomic rDNA ITS 2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogen. Evol.* 7 (1): 103- 116.
- OLGUN, A. ve TOPAL, A. 1999. DNA nın Analizi. In :Temizkan, G., Arda, N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. (ed.)İstanbul Üniv. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Uygulama Merkezi (BİYOGEN). Yayın No: 1 Sayfa 33-45.
- OEI, P. 1996. Conservation of strains and culture collections. In *Mush Cultivation*. Bachuys.

- OJALA, A., Rousi, A., Lewing, E., Pyysalo, H. and Widen, C. J. 1990. Interspecific hybridization in *Papaver* 3. F1 hybrids between species of sect. *Oxytona*. *Hereditas*, 112; 221-230.
- ONIONS, A. H. S. (1983). Preservation of fungi. In the *Filamentous fungi 4: Fungal echnology*, pp. 375-390.
- OOI, V. E. C. 2000. Medicinally important fungi. In *Proc 15th Int Congress Sci Cultivation of Edible Fungi*, vol. 1 & 2 (ed. L. J. L. D. Van Griensven), pp. 41-51. A. A. Balkema, Rotterdam, Maastricht. Ordinariat für Holzbiologie, Universität Hamburg, Hamburg, F.R. Germany
- PAN Y. 1994 Protoplasted monokaryotation of heterothallic edible fungi. *Journal of the Shanghai Agricultural College* 9, 1–5.
- PARK, E.J, G. Ko, J. Kim, and D.H. Sohn, 1997. Antifibrotic effects of a polysaccharide extract ed from *Ganoderma lucidum*, glycyrrhizin, and pentoxifilline in rats with cirrhosis induced by biliary obstruction. *Biol. Pharm. Bull.* 20(4): 417- 420.
- PARK, L.S., J.W. Oh, and C. Yang, 1998. Natural inhibitors for protein prenyltransferase. *Planta Med.* 64 (4): 303- 308.
- PASTEUR, N., Pasteur, G., Bonhomme, F. and Davidian J. B. 1988. *Practical Isozyme Genetics*. 1st ed. Chichester: Ellis Horwood Limited. 215 pp
- PATOUILLARD, N., 1876- 1924. *Collected mycological papers*. Asher, Amsterdam.
- PATOUILLARD, N., 1889. Le genre *Ganoderma*. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 5: 64- 80
- PATOUILLARD, N., 1900. *Essai taxonomique sur les familles et les Genres des Hymenomycetes*. Lonsle Saunier, France.
- PEBERDY J.F. 1991 Fungal protoplasts. In *More Gene Manipulations in Fungi*, eds. Bennett, J.W. & Lasure, L.L. pp. 307–318.
- PERLIN, D. S. & Park, S. 2001. Rapid identification of fungal pathogens: molecular approaches for the new millenium. *Rev Med Microbiol* 12, 13-20. *Pleurotus* Species. *Agric. Biol. Chem.*, 51(3): 935-937.
- PRZYBYLOWICZ, P., Donoghue, J., 1990. *Shiitake Growers Handbook. The Art and Science of Mushroom Cultivation*. Kendall/Hunt Publishing Company, Iowa.

- QUINN, R. J. 1999. High throughput screening in natural product drug discovery in Australia utilising Australia's biodiversity. *Drug Develop Res* 46, 250-254.
- RAEDER U. and BRODA P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 1:17-20.
- RAPER C A, Raper J R, Miller R E. 1972. Genetic analysis of the life-cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 64:1088-1117.
- RESHETNIKOV SV, Wasser SP, Duckman I, Tsikor K. 2001. Regulation of growth and biosynthetic activity of the medicinal jelly mushroom *Tremella mesenterica* (Retz.:Fr.) pure culture. *Int. J. Med. Mush.* 3: 45-51.
- RIACH, M.B.R. and Kinghorn, J.R. 1996 Genetic transformation and vector developments in filamentous fungi. In *Fungal Genetics: Principles and Practice* ed. Bos, C.J. pp. 209-233. New York: Marcel Dekker Inc.
- ROSELI C. Fenille, Maísa B. Ciampi, Eiko E. Kuramae & Nilton L. Souza, 2003. Identification of *Rhizoctonia solani* Associated with Soybean in Brazil by rDNA-ITS Sequences. Laboratório de Apoio Vegetal, DFA-GO, mapa.
- ROSS, Ian K. Elizabeth M. Martini, and Marilyn Thomas, 1973. Department of Biological Sciences, University of California, Santa Barbara, California 93106
- ROYSE, D. J. and May, B., 1982. Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnecens*, *Mycologia* 74,93,
- RYVARDEN L., 1991. Genera of polypores: nomenclature and taxonomy. *Synopsis Fungorum* 5, Fungi flora, Oslo.
- SADLER M, Saltmarsh M (eds) 1998. *Functional Foods: The Consumer, the Products and the Evidence*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- SANGWAN, R. S., Yadav, U. and Sangwan, N. S. 2000. Isolation of genomic DNA from defatted oil seed residue of *Opium poppy* (*Papaver somniferum*). *Plant molecular biology reporter*, 18:265-270.
- SCHMIDT, Olaf. 1999. Molecular Methods for *Serpula lacrymans*, Review article Molecular Methods for the Characterization and Identification of the Dry Rot Fungus *Serpula lacrymans* on the Growth Characteristics of Human Cell Lines. *Journal of Bioscience and Bioengineering.*, Vol. 92, No. 6, 550-555.

- SCHISLER, L. C. & Volkoff, O. 1977. The effect of safflower oil on mycelial growth of Boletaceae in submerged liquid cultures. *Mycologia* 69, 118-125.
- SEIFERT, K.A., B .D. Wingfield, and M.J. Wingfield, 1994. A critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous Ascomycetes and ascomycetous anamorphs. *Can . J. Bo .* 73 (S1): S 760- S 767.
- SEONG-K. Eo, Young-So Kim, Chong-Kil Lee, Seong-Sun Han, 2000. Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses. *Journal of Ethnopharmacology* 72 475–481
- SHOYAMA, Y., Kawachi, F., Tanaka, H., Nakai, R., Shibata, T. and Nishi, K. 1998. Genetic and alkaloid analysis of *Papaver* species and their F1 hybrid by RAPD, HPLC and ELISA. *Forensic science international*, 91; 207-217.
- SHU, Y. Z. 1998. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *J Nat Prod* 61, 1053-1071
- SIVAN A.,T G. E. Harman, and T. E. Stasz, 1990. Transfer of Isolated Nuclei into Protoplasts of *Trichoderma harzianum*. *Appl. and Environ. Microbiol.* p. 2404-2409
- SMANIA, A. J., Delle Monache, F., Smania, E. F. A. &Cueno, R. S.N. 1999. Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.)Pat. Fruitbody. *Int Med Mush* 1, 325-330.
- SMITH, B. J. and K. Sivasithamparam, 2000a. Internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence of species of *Ganoderma* from Australia. *Mycol. Res.* 104 (8) 943±951
- SMITH, B. J. & Sivasithamparam, K. 2000b. Isozymes of *Ganoderma* species in Australia. *Mycological Res.* 104, 952-961.
- SRINIVASAN, C.T. M. D'Souza, K. Boominathan, and C. A. Reddy.1996. *Appl. and Environ. Microbiol.* p. 4274–4277 Vol. 61, No. 12
- STALPERS, J.A. 1978. Identification of wood- inhabiting fungi in pure culture. *Studies in Mycology* 16:1- 248.
- STAMETS, P. 1993. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Ten Speed Press, PO Box 7123, Berkeley, CA 94707.

- STAMETS, P 2000 *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*, 3rd edn. Olympia, WA: Ten Speed Press.
- STAUB, J., Bacher, J. and Poetter, K. 1996. Sources of potential errors in the application of Random Amplified Polymorphic DNAs in cucumber. *Hortscience*, 31(2); 262-266.
- STEINMETZ, KA, Potter JD 1991. Vegetables, fruit and cancer. 1. Epidemiology. *Cancer Cause Cont.* 2: 325–357.
- STEYAERT, R.L., 1972. Species of *Ganoderma* and related genera mainly of the Bogor and Leidenherbaria. *Persoonia* 7: 55- 118.
- STEYAERT, R. L. 1975. The concept and circumscription of *Ganoderma tornatum*. *Trans Brit Mycol Soc* 65, 451-467.
- STOCKINGER, E.J., Mulinix, C.A., Long, C.M., Brettin, T.S. and Lezzoni, A.F. 1996. A linkage map of sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore-derived callus culture population. *Journal of Heredity*, 87; 214-218.
- SU, S .H., C.S. Sun , S .W. J uan, C.H. Hu, W.T . Ke, and M.T. Sheu, 1997. Fungal myc lia as the source of chitin and polysaccharides and their application as skin substitutes. *Biomaterials* 18 (17): 1169-1174.
- SWANN, E. C. & Taylor, J. W. 1993.Higher taxa of basidiomycetes: an 18S rRNA gene perspective. *Mycologia* 85, 923-936.
- SWANN, E. C. & Taylor, J. W. 1995. Phylogenetic perspectives on basidiomycetes systematics: evidence form the 18S rRNA gene. *Can J Bot* 73, 862-868.
- SWARTZ, M. N. 2000. Impact of antimicrobial agents and chemotherapy. *Antimicrob Agents Chemo.* 44, 2009-2016
- TAKESHI Y., Y. Tamai, T. Azuma Yoh Sakmna, K. Miura, Yasuo K. Masahide Sunagawa, M. Ohmasa.2000. Karyotype analysis of interspecific fusants of basidiomycetes by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Wood Sci.* 46:480-484
- TALBOT, P .H.B., 1968. Fossilized pre- Patouillardian taxonomy *Taxon* 17 : 620-628.
- TANKSLEY, S.D. and Orton, T.J. 1983. Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p; 147-163.

- THOMAS PR, Earl R 1994. Enhancing the food supply. In: Thomas PR, Earl R, eds. *Opportunities in Nutrition and Food Science*. Washington, DC: National Academy Press, pp. 98–142.
- TOYOMATSU, T. And Mori, K.I. 1987. Intra- and Interspecific Protoplast Fusion between Some Transcribed Spacer Sequences *App. and Environ Microbiol*, p. 1354–1363 Vol. 62, No. 4
- VALLEJOS, C. E., 1983, Enzyme activity staining, in isozymes in *Plant Genetics and Breeding*, Part a, Tanksley, S. D. and Orton. T. J.I Ams., 469.
- VAN DER HEM, L.G., J .A. vander Vliet , C.F. Bocken, K. Kino, A.J. Hoitsma, and W.J. Tax, 1995. Ling Zhi- 8: studies of a new immunomodulating agent. *Transplantation* 60 (5): 438-443.
- VAN DER WAAIJ, D. & Nord, C.E. (2000). Development and persistence of multi resistance to antibiotics in bacteria; an analysis and a new approach to this urgent problem. *Int J Agents* 16, 191-197.
- Vries, O.M.H. De & Wessels, J.G.H. 1975 Chemical analysis of cell wall regeneration and reversion of protoplasts from *Schizophyllum commune*. *Archives of Microbiology* 102, 209–218.
- WADA T. 2000. Method of cultivating *Ganoderma lucidum*, pp. 48-51.
- WAGNER, R. David Alexander Mitchell, Guilherme Lanzi Sassaki¹, Maria Angela Lopes de Almeida Amazonas and Marin Berovi. 2003. Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum*, *Food Technol. Biotechnol.* 41 (4) 371–382
- WAINRIGHT , P .O., G. Hinkle, M.L. Sogin , and S .K. Stickel, 1993. Monophyletic origins of the metazoa: an evolutionary link with fungi. *Science* 26 0: 340-342.
- WANG, H. Q., Zhong, J. J. & Yu, J. T. 1997a. Enhanced production of taxol in suspension cultures of *Taxus chinensis* by controlling inoculum size. *Biotech Lett* 19, 353-355.
- WANG, S. Y., Hsu, H. C., Tzeng, C. H., Lee, S. S., Shiao, M. S. & Ho, C. K. 1997. The main anti tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines

- released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int J Cancer* 70, 699-705.
- WASSER, S. P. & Weis, A. L. 1999a. General description of the most important medicinal higher basidiomycetes mushrooms. 1. *Int J Med Mush* 1, 351-370.
- WEISING, K. H., Nybom, W. K. and Meyer, W. 1995. DNA Fingerprints In *Plants And Fungi*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p 1-200
- WHITE, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor, 1989. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315- 322
- WHITTAKER, R. H. 1969. New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science* 163, 150-160
- WILMOTTE, A., Y.V. de Peer, A. Goris, S. Chapelle, R. de Baere, B. Nelissen, J.-M. Neefs, G.L. Hennebert, and R. de Wachter, 1993. Evolutionary relationships among higher fungi inferred from small ribosomal subunit RNA sequence analysis. *System Appl. Microbiol.* 16: 436- 444.
- WOESE, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51 (2): 221- 271.
- WOO Teak Chung, Seo Ho Lee, Jong Dai Kim, Young Ceik Park, Balk Hwang, Shin Young Lee, and Hyeon Yong Lee, 2001. Effect of Mycelial Culture Broth of *Ganoderma lucidum*
- WORLEY, C. L. 1939. Interpretation of comparative growths of fungal colonies on different solid substrates. *Plant Physiology* 14, 589-593.
- XIN LIUA, Jian-Ping Yuana, Chee-Keung Chunga, Xiao-Jun Chenb, 2002. Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum*. *Cancer Letters* 182: 155–161
- XINGFENG Bao, Jinyou Duan, Xuya Fang, Jinian Fang, 2001, Chemical modifications of the (1-3) - D-glucan from spores of *Ganoderma lucidum* and investigation of their physicochemical properties and immunological activity. *Carbohydrate Res.* 336 127–140
- XU Fei, Ming Wen Zhao, and Yu Xiang Li. 2006. Cloning and Sequence Analysis of a Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Gene from *Ganoderma lucidum*. *The Journal of Microbiology*, p. 515-522 Vol. 44, No. 5

- YAN Pei-Sheng, Jia-Hui Jiang and Wen-Shan Cui 2004. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 173–177, 2004
- YAN, Z.H., S .O. Roger s , and C.J .K. Wang , 1995. Assessment of *Phialophora* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacers and morphology. *Mycologia* 87: 72- 83.
- YAN, Pei-Sheng. J. Jiang and W. Cui. 2004. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 173–177
- YANG, Fan-Chiang and Chun-Bun Liau. 1998. The influence of environmental conditions polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures *Process Biochemist O*, Vol. 33, No. 5, pp. 547-553
- YANG F., Ke, Y. & Kuo, S. 2000. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *G. lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme Microb Technol* 27, 295-301.
- YAO, M.- C. and J .G. Gall, 1977. A single integrated gene for ribosomal RNA in a eucaryote, *Tetrahymena pyriformis* . *Cell* 1 2: 121- 132.
- YAYER, D.S,. F. XU, E.J. GOLIGHTLY, K. M. BROWN. 1996. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 834–841 Vol. 62, No. 3
- YING J.Z, Mao XL, Ma QH, Zong YC, Wen HA 1987 *Icons of Medicinal Fungi from China* (translation Xu YH), Beijing: Science Press.
- ZHAO, J .- D., 1989. The Ganodermataceae in China. *Bibliotheca Mycologica* 132: 1- 176
- ZHAO, J. Chang S. T. 2000. Interspecific hybridization between *Volvariella volvacea* and *V. bombycina* by PEG-induced protoplast fusion. *J Wood Sci.* 46:480-484
- ZHU, H. S., Yang, X. L., Wang, L. B., Zhao, D. X. & Chen, L. 2000. Effects of extracts from sporoderm broken spores of *Ganoderma lucidum* on HeLa cells. *Cell Biol Toxicol* 16, 201-206.

ÖZGEÇMİŞ

1976 Darende Malatya doğumluyum. İlk orta ve lise öğrenimimi Adana da tamamladım. 2000 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. 2002 yılında aynı bölümde yüksek lisansımı tamamladım. Aynı sene doktora eğitimime başladım. 2004 senesinde araştırma görevlisi olarak atandım. Halen görevime devam etmekteyim.