

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



BAZI MAKROMANTARLARDA
(*Suillus sp.*, *Lepista sp.*, *Morchella sp.*, *Rhizopogon sp.*)

**BİYOTEKNOLOJİK OPTİMİZASYON
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Eda DAŞTAN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Yrd. Doç. Dr. İbrahim TÜRKEKUL

2010

Her hakkı saklıdır

**T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI MAKROMANTARLARDA
(Suillus sp., Lepista sp., Morchella sp., Rhizopogon sp.)
**BİYOTEKNOLOJİK OPTİMİZASYON
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

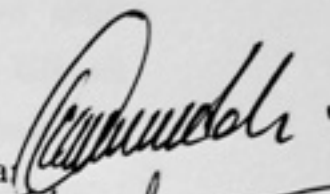
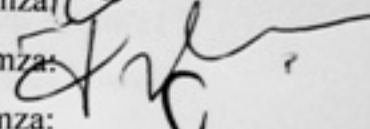
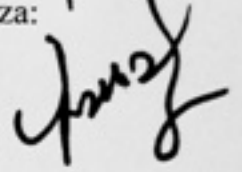
Eda DAŞTAN

**TOKAT
2010**

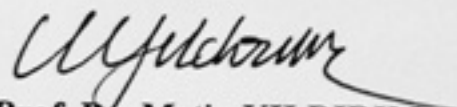
Her hakkı saklıdır.

Yrd. Doç. Dr. İbrahim TÜRKEKUL danışmanlığında, Eda DAŞTAN tarafından hazırlanan bu çalışma 20.08.2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Ömer İŞILDAK
Üye: Yrd. Doç. Dr. İbrahim TÜRKEKUL
Üye: Yrd. Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ

İmza: 
İmza: 
İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım


Prof. Dr. Metin YILDIRIM
Enstitü Müdürü
12/10/2010

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Eda DAŞTAN

ÖZET

BAZI MAKROMANTARLARDA
(*Suillus luteus*, *Lepista nuda*, *Morchella conica* ve *Rhizopogon luteolus*)
BİYOTEKNOLOJİK OPTİMİZASYON
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Eda DAŞTAN

Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. İbrahim TÜRKEKUL

Bu çalışmada Sivas, Tokat, Yozgat ve Amasya illerinden toplanan makro mantarlar (*Morchella conica*, *Lepista nuda*, *Suillus luteus* ve *Rhizopogon luteolus*) ile ITS1 ve ITS4 primerleri çalışılmıştır. Araştırmamızda; kullanılan materyalin DNA izolasyonu yapıp, ITS primerleri ile PCR uygulaması gerçekleştirilmiş ve PCR ürünlerinin agaroz jel ortamında yürütülmesi ile görüntüler elde edilmiştir. Bu iki primer de her örnek için 600-700 bp aralığında tek bant vermiştir.

2010, 32 sayfa

Anahtar kelime: Makromantarlar, PCR, ITS, DNA izolasyonu.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BIOTECHNOLOGIC OPTIMIZATON POSSIBILITIES IN SOME MACROFUNGI (*Suillus sp.*, *Lepista sp.*, *Morchella sp.*, *Rhizopogon sp.*)

Eda DAŞTAN

Gaziosmanpaşa University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Masters Thesis

Danışman: Yrd.Doç. Dr. İbrahim TÜRKEKUL

In this study, macrofungi collected from Sivas, Tokat, Yozgat and Amasya provinces (*Morchella conica*, *Lepista nuda*, *Suillus luteus* ve *Rhizopogon luteolus*) as well as ITS1 and ITS4 primers were studied. In our study, DNA of material used was isolated, PCR application with ITS primers was carried out and jel images were obtained by running PCR products in agarose jel medium. Both primers produced one band in 600-700 bp range for each sample.

2010, 32 pages

Key Words: Macro fungi, ITS, PCR, DNA izolation.

TEŐEKKÜR

Çalıőmalarım süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Zekeriya ALTUNER'e, çalıőmalarımda benimle beraber devamlı arazide yanımda olan desteğini ve bilgisini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. İbrahim TÜRKEKUL'a, moleküler çalışmalarda tecrübesi ve bilgisinden faydalandığım Sayın Yrd. Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ'a, labaratuarda yanımda olan çalışma arkadaşlarım Gülşen BOZTEPE, Elif KAYMAK ve İsmail BENLİ' ye maddi ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan aileme, özellikle tez yazımında bana yardım eden kardeşim Seda DAŞTAN'a ve desteğiyle yanımda olan Samet ALTU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Eda DAŞTAN
Tokat, 2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ	3
2.1. Makrofungusların Genel Özellikleri	3
2.2. Toplanılan Mantarların Özellikleri	5
2.2.1. <i>Lepista nuda</i> (Bull.: Fr.) Cke	5
2.2.2. <i>Rhizopogon luteolus</i> Fr.	6
2.2.3. <i>Suillus luteus</i> (L) S.F. Gray	6
2.2.4. <i>Morchella conica</i> Pers.	7
2.3. Coğrafi Özellikler	8
2.3.1. Tokat	8
2.3.2. Sivas.....	9
2.3.3. Yozgat.....	9
2.3.4. Amasya	10
2.4. Genetik Markörler.....	10
2.5. DNA Markörleri	11
2.5.1. Hibridizasyona Dayalı DNA (RFLP) Markörleri	12
2.5.2. PCR'a Dayalı DNA Markörleri	12
2.5.3. ITS(Internal Transcribed Spacer)	12
2.5.4. Mikrosatelitler.....	14
2.5.4.1. ISSR Markörler (Basit İç Dizi Tekrarları)	14

3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. Mantar Örneklerinin Laboratuvar Çalışmaları İçin Hazırlanması	21
3.2.2. DNA İzolasyonu	21
3.2.3. PCR Uygulaması.....	22
3.2.4. Çalışmada Kullanılan ITS Primerleri	23
3.2.5. Elektroforez İşlemi	23
3.2.6. DNA Bantlarının Görüntülenmesi	24
4. BULGULAR	25
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	26
KAYNAKLAR	28
ÖZGEÇMİŞ	33

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
bp	base pair (baz çifti =bç)
kb	kilo base
mM	milimolar
ng	nanogram
rpm	revolutions per minute
µg	mikrogram
µl	mikrolitre
µM	mikromolar
UV	ultraviole
mg	miligram

Kısaltmalar	Açıklama
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi
CAPS	The Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler)
dNTP	deoksinükleotidtrifosfat
DNA	deoksiribonükleik asid
EDTA	Ethilendiamintetraasetik asid
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats (Basit İç Dizi Tekrarları)
ITS	İnternal Transcribed Spacer
LSU	Büyük Alt Birim

Nu DNA	nükleer DNA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Kesilmiş Parçaların Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonukleik Asid
SCAR	Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Polimorfik Diziler
SSCP	Single-strand conformation polymorphism
SRAP	Sequence-related amplified polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat (Basit Dizi Tekrarı)
SSU	küçük alt birim
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/borat/EDTA (Buffer)
TE	Tris/EDTA (Buffer)
Tris	Tris(hidroksimetil) aminometan

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>Lepista nuda</i> ' nin basidiyokarpları	5
Şekil 2.2. <i>Rhizopogon luteolus</i> ' un basidiyokarpları	6
Şekil 2.3. <i>Suillus luteus</i> ' un basidiyokarpları	7
Şekil 2.4. <i>Morchella conica</i> ' nin askokarpı.....	7
Şekil 2.5. Araştırma Bölgelerinin Haritası.....	8
Şekil 2.6. ITS Gen Bölgeleri.....	12
Şekil 4.1. ITS primerlerinin %2 lik agaroz jel görüntüsü.....	25

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Mantar ve Diğer Bazı Gıdaların Taze Ağırlık Üzerinden Yüzde Olarak Besin Maddeleri İçeriği.....	5
Çizelge 3.1. Makro Mantarların Toplandığı Bölgeler	20
Çizelge 3.2. PCR Bileşenlerinin Konsantrasyonları ve Miktarları	22
Çizelge 3.3. ITS Primerleri İçin PCR Protokolü	23
Çizelge 3.4. Kullanılan Primerlerin İsimleri ve Baz Dizileri	23

1.GİRİŞ

Ülkemiz coğrafik konumu nedeniyle canlı çeşitliliği bakımından oldukça zengindir. Bu zenginlik iklim farklılıkları, topografik ve jeolojik çeşitlilikler, deniz, göl, akarsu gibi değişik su ortamı çeşitlilikleri, yükselti ve ekolojik farklılıklardandır (Atalay 1994; Çelik 2003).

Bilimsel yöntemler kullanılarak, canlıların bireysel benzerlik ve farklılıklarının geniş bir bakış açısı ile incelenmesi ve sınıflandırılması, asırlar önce başlamış ve günümüzde de devam eden bir süreçtir. Hayatın çeşitliliği ve yayılımıyla ilgili olayların modelini ortaya çıkaran ve ilgili ağacın yeniden yapılandırılmasını içine alan biyoloji sahası sistematik olarak adlandırılır (Quicke, 1993).

1987'lerde 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 mitokondri 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 (Küçük Alt Birim) 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 (Güzeldağ, 2007).

Günümüzde yapılan sınıflandırma analizleri bu anlamda taksonomik değerlendirmelerin daha karışık 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 ark., 1987).

Ryvarde'nin sınıflandırma anlayışı grupların moleküler filogenetik analizlerine, mitokondriyal SSU (Küçük Alt Birim) rDNA sekansı verilerine dayandığı için ayrı bir öneme sahiptir (Hibbet ve Donoghue, 1995). Örneğin *Laetiporus* ve *Phaeolus*, Ryvarde'nin 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 benzer olsa da makro morfolojik yapılarının, anatomilerinin ve fizyolojik karakterlerinin farklı olmasıdır (Hibbet ve ark., 1995).

Bu tez çalışmasının amacı ülkemizde doğal olarak yetişen bazı makro mantarların ITS primerleri kullanılarak genetik karakterizasyon araştırmasını yapmaktır. Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler; makro mantarlar ile ilgili yapılacak olan kapsamlı moleküler çalışmalara ve ülke ekonomisine katkı sağlayacağı ümidi taşımaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. Makrofungusların Genel Özellikleri

Mantarlar klorofil olmayan, fruktifikasyon organları ve esas bünyeleri hiflerden ibaret canlılardır. Üremeleri hem eşeyli hem de eşeysiz olarak sporlarla olur. Klorofil ihtiva etmedikleri için bağımsız olarak şeker, yağ ve nişasta gibi organik madde oluşturma kabiliyetinde değillerdir. Bu sebepten besinlerini diğer canlılardan ve ölü atıklardan alırlar (Türkecul, 200).

Funguslar besinlerini diğer canlıların hazırladığı organik bileşiklerden elde eder, yani heterotrofturlar. Fotosentez görülmez. Bazı funguslar gübre gibi diğer organizma artıkları ve ölü organizma kalıntıları üzerinde saprofit olarak beslenirler. Bir kısmı ise bitki, hayvan ve diğer fungusların canlı hücreleri üzerinde veya içinde parazit olarak yaşarlar. Funguslar besinlerini dışarıdan absorpsiyonla alırlar. Bu durum monosakkaritler, aminoasitler gibi basit bileşikler için geçerlerdir. Polimerler gibi kompleks bileşikler ise önce dış ortama salınan sindirim enzimleriyle basit bileşenlerine parçalandıktan sonra osmoz veya özelleşmiş taşınım mekanizmalarıyla hücre içine alınırlar (Tamer ve ark., 2006).

Sindirim hücre dışında gerçekleştiği için, enzimatik parçalanma ürünleri o ortamda mevcut bütün organizmalar tarafından kullanılabilir. Böylece bazı fungus türleri, diğer fungusların enzimatik aktivitelerinden doğan monomerlerin bulunduğu bölgelerde gelişmeye yatkındırlar (Tamer ve ark., 2006).

Fungusların bakterilerden farkı ökaryotik organizmalar olmasıdır. Yani çift katlı membranla kuşatılmış bir gerçek nükleus, yine membranla tarafından çevrelenmiş sitoplazmik organellere sahiptirler (Tamer ve ark., 2006).

Mantarların meyvesi veya fruktifikasyon organı olarak bilinen şapka, Basidiomycetes sınıfında basidiyokarp, Ascomycetes sınıfında askokarp olarak isimlendirilir. Makro funguslar buldukları ortama miselleriyle tutunarak bitkilerdeki kökler gibi ortamdaki

su ve besin maddesi absorbe ederek sap ve şapka gibi diğer vücut kısımlarına iletirler. Yüksek bitkilerde toprak üstü kısmını oluşturan plumula ve toprak altı kısmını oluşturan radikula tohumda hemen hemen aynı anda meydana gelir.

Fakat mantarlarda üretim birimi olan sporların çimlenmesi ile önce miseller daha sonra misellerden şapka meydana gelir. Mantarlarda şapka ve sap yeterince besin maddesi toplayarak belirli bir noktada yoğunlaşan sekonder misellerden meydana gelir. Bu misellere tersiyer miseller de denilmektedir. Basidiyokarpların yapıtaşı hif olarak adlandırılan tüp şeklindeki iplikçiklerdir. Hücre çeperlerinin yapısında lignin, selüloz, kitin ve diğer bazı organik bileşikler bulunur.

Hücre çeperinin bileşimi, çevre koşullarına, ortamın pH'sına, sıcaklığa, hücrenin yaşına göre değişir. Hücre içinde sitoplâzma ile birlikte vakuoller bulunur. Vakuoller hücrenin gaz alışverişini düzenler ve sitoplâzmanın atıklarını barındırır (Türkecul, 2001).

Mantarlar tatlı sularda, karalarda, nadiren denizlerde ve havada yaşarlar. Hayvan ve özellikle bitkilerde parazit olarak yaşayıp hastalıklar yaparlar. Bir kısmı alkolik fermentasyonu sağlar. Drog ve antibiyotik veren türleri vardır. Yüksek mantarlardan şapkalı mantarların bir kısmı yenir. Bazı memleketlerde insanların önemli besin maddesini temin ederler (Altuner, 2004).

Mantarlar içerdikleri vitaminler ve mineraller nedeniyle yüksek besin değerine sahiptirler. İnsan sağlığını koruyan B kompleksi vitaminleri olan (Thiamin), B2 (Rhiboflavin), B3 (Pantetonik asit), B5 (Nikotinik asit), B7 (Biothin), Vitamin C (Askorbik asit) ve vitamin D yönünden zengin bir besin maddesidir. Mantarlar sebzelere oranla 5-10 kez daha fazla Vitamin B3 içerir. Yağ ve karbonhidrat miktarı az, protein bakımından zengindir. Bitkisel kaynaklı bir yiyecek olan mantarlarda proteinin %70'i vücut tarafından kolaylıkla sindirilebilir. Vitaminlerce zenginliği, insanların sinir sistemleri üzerinde sakinleştirici ve yumuşatıcı bir etkiye yol açtığı bilinmektedir (Anşin ve ark., 2000) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Mantar ve Diğer Bazı Gıdaların Taze Ağırlık Üzerinden Yüzde Olarak Besin Maddeleri İçeriği (Sesli. 1994)

Gıda maddesi	Su	Protein	Yağ	Karbonhidrat	Mineraller	Kal / 100gr
Mantar	92	3.5	0.3	4.5	1.0	25
Ispanak	93	2.2	0.3	1.0	1.9	15
Kuşkonmaz	95	1.8	0.1	2.7	0.6	20
Patates	75	2.0	0.1	21.0	1.1	85
Süt	87	3.5	3.7	4.8	0.7	62
Et	68	18.5	13.3	0.5	0.5	189

2.2. Toplanan Mantarların Özellikleri

2.2.1. *Lepista nuda* (Bull.: Fr.) Cke

Syn. *Tricholoma nudum* (Bull.: Fr.) Kumm.

Syn : *Rhodopaxillus nudus* (Bull.:Fr.) Mre.

Şapka 4-13cm, genç iken konveks, sonra düz-konveks, hafif umbonat veya merkezden basıktır. Yüzeyi nemli havalarda biraz yapışkan, menekşe, menekşe mavi, leylak, kahverengi-leylak renklerindedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Lepista nuda*'nın basidiyokarpları

Sap 4-9/1-3cm, silindirik, beysbol sopası şeklinde, içi dolgun, gençlerde menekşe renginde, olgunlarda soluk ve beyazlaşır. Eti beyazımsı, hoş kokulu, meyvemsi, tadı hoş, biraz mantarsıdır. Lameller leylaktan gri-leylağa kadar değişen renklerde bazen mavimsi tonlarda, yaşlanınca güderi rengindedir. Spor izi soluk pembe, sporlar eliptik, renksiz ve saydam ortalama 6,8-7,6/4,3-5 mikrondur.

2.2.2. *Rhizopogon luteolus* Fr.

Üreme organı 1.5-5cm, çapında, oval, başlangıçta beyaz, kirli sarı veya kırmızımsı, daha sonra zeytini-kahverengi veya açık kahverengi, dayanıklı bir zarla çevrilidir. Eti olgunlukta zeytin rengindedir. Sporları eliptiktir. Zeytin renginde, ortalama 7-10/2-3.5 mikrondur (Şekil 2).



Şekil 2.2. *Rhizopogon luteolus*' un basidiyokarpları

2.2.3. *Suillus luteus* (L) S.F. Gray

Şapka 5-9cm, genç iken yarıküresel, olgunlarda konveks, konik biçimde. Yüzeyi nemli iken parlak, yapışkan, kuru iken donuk ve yapışkan, ipeksi, koyu gri hafif kahverengi, kırmızımsı veya zeytuni kahverengi renklerde, kenar kısımları tüplere doğru kıvrımlıdır. Sap 4-5/1-3cm, silindirik, tabana doğru hafifçe şişkinleşir, içi gençlerde boş, olgunlarda dolgundur. Annulusun üst kısımlarında kahverengimsi benekler, alt kısımlarında ise koyu kahverengi granüller bulunur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. *Suillus luteus* ' un basidiyokarpları

Eti beyaz, soluk sarı, kalın, kokusu mantarimsı, tadı fındıksıdır. Tüpler genç iken beyazımsı, limon sarısı, olgunlarda sarımsı tonlarda ve yuvarlaktır. Spor izi tarçın kahverengi, sporlar açık sarı, eliptik-fusifform, ortalama 6-10/2-3 mikrondur.

2.2.4. *Morchella conica* Pers.

Şapka 4-5cm, konik, tepe kısmı küt, oval veya az yuvarlak, bal peteği şeklinde girintili ve çıkıntılı, başlangıçta açık kahverengi, daha sonra koyu kahverengiye döner (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. *Morchella conica* ' nın askokarpı

Sap 2-4/2-3,5cm, boyunda, silindir şeklinde, tabanı şişkin, içi boş, yüzeyi pudra gibi tozlu görünüşte, sarımsı beyaz veya krem renginde olup dip kısmı karışıktır. Eti kalın, beyazımsı renkte. Sporlar elips şeklinde, ortalama 16-23/11-14 mikrondur.

2.3. Coğrafi Özellikler



Şekil 2.5. Araştırma Bölgelerinin Haritası

2.3.1. Tokat

Orta Karadeniz Bölgesi'nin iç kısmında 40- 41° kuzey enlem ve 36-37° doğu boylam dereceleri arasında yer alır. Doğudan Ordu ve Sivas, batıda Amasya, güneyde Sivas ve Yozgat, kuzeyden Samsun ve Ordu illeri ile çevrilmiştir. Tokat ilinin gerçek alan olarak yüzölçümü 10,470 km² olup Türkiye yüzölçümünün %1,28'ni oluşturur. Tokat ilinde topoğrafik yapı olarak toplam arazinin % 10'u düz, %15,3'ü hafif meyilli, %24'ü orta, %33'ü dik, %14'ü çok dik, %7,3'ü sarp arazilerdir (Karkacier, 1991).

İklim olarak Orta Karadeniz'in geçit bölgesinde yer alan Tokat ili yarı kurak bir iklime sahip olup, yazları sıcak olmakla birlikte kışları da oldukça sert geçer. Mevsimlere göre yağış dağılımı: ilkbahar aylarında 155,8mm, yaz aylarında 54,0 mm, sonbahar aylarında 83,8mm, kış aylarında ise 127,4mm dir. Yıllık ortalama yağış miktarı 421mm dir (Karkacier, 1991).

2.3.2. Sivas

Sivas, yüzölçümü itibariyle Türkiye'nin ikinci büyük ilidir. Toprakları üç bölgeye yayılmıştır. İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Karadeniz bölgesinde yer alır. Bozkır iklimi hâkimdir. Sivas çevresine göre bir mikro klima iklim bölgesindedir. Bu özelliği sağlayan temel faktörler şunlardır:

- a) Çevre illere göre daha yüksek oluşu.
- b) Kuzey rüzgârlarına açık oluşu.
- c) Engbeli bir yapıya sahip oluşu.
- d) Yıl içinde değişen basınç farkı.
- e) İl topraklarının farklı coğrafi bölgelerde yer alması.

Sivas'ta aralarında küçük farklar olmakla birlikte ana hatlarıyla karasal iklim görülür. Kış ayları dondurucu soğuk olup, kış ortalama sıcaklığı 0 °C civarındadır. Yaz aylarında sıcaklık genellikle 19 °C üzerindedir. Ancak sıcaklığın 38 °C'yi aştığı görülür. Buradan da anlaşılacağı gibi yıllık sıcaklık farkı 74 °C gibi büyük bir fark gösterir. Karasal iklim özelliğine sahip olan Sivas'ta; yağışlar kış, ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde görülür. Yağışların %22'si sonbahar, %36'sı ilkbahar, %32'si kış ve %10'luk bölümü yaz aylarında düşer.

2.3.3. Yozgat

Yozgat İl'inde, İç Anadolu Bölgesi'nin yarı kurak karasal iklimi hakimdir. Deniz etkisine kapalı olduğu için, yazlar sıcak ve kurak; kışlar soğuk ve yağışlı geçer. Yaz ile kış; gece ile gündüz arasındaki sıcaklık farkları yüksektir. Temmuz ve Ağustos en sıcak aylardır. Yılın en soğuk ayı Şubat olup, ortalama sıcaklık -2,1 °C dir. Yozgat'ta kaydedilen en düşük sıcaklık -24,4 °C dir ve 23 Şubat 1985'te ölçülmüştür. İl de, yağışın aylara ve mevsimlere göre dağılışı düzensizdir. Kış ve ilkbahar yağışlı mevsimler olup, kış aylarında genel olarak kar yağışı görülmektedir. Yıllık ortalama yağış miktarı 554,6 mm dir. Ortalama bağıl nem % 66 olup, en yüksek orana Aralık - Ocak aylarında % 77, en düşük orana Ağustos ayında % 54'e ulaşır.

2.3.4. Amasya

Amasya, Karadeniz Bölgesi'nin orta kesimine düşer. Doğu ve güneydoğusunda Tokat, batısında Çorum, kuzeyinde Samsun illeri bulunur. Amasya, bulunduğu konum itibariyle bir geçiş iklimine sahiptir. Bu ilimiz dağların engellemesi nedeniyle Orta Anadolu ikliminden farklılık gösterir. Kışın en düşük sıcaklığın $-20,5^{\circ}\text{C}$, yazın en yüksek sıcaklığın 43°C bulunduğu görülmüştür. Amasya çok yağmur alan illerimizden biridir. Yıllık yağış ilçelere göre değişiklik göstermekle birlikte, il ortalaması 395 mm'dir. Yıllık ortalama sıcaklık $13,3^{\circ}\text{C}$, yıllık ortalama yağış miktarı ise 451,1 mm dolaylarındadır.

2.4. Genetik Markörler

Kalıtım şekilleri, morfolojik, biyokimyasal ve DNA düzeyinde izlenebilen karakterlere genetik markörler denir. Bu karakterlerin markör (işaret) olarak isimlendirilmesinin nedeni, çalışılan organizmadaki ilgilenilen diğer özelliklerin genetiği hakkında, dolaylı da olsa, bilgi sağlamalarıdır. Moleküler markörler DNA'nın aktif bölgelerinden veya herhangi bir genetik kodlama fonksiyonuna sahip olmayan DNA dizilerinden geliştirilebilmektedirler. Genetik markörlerin en önemli kullanım alanı genetik haritaların hazırlanmasıdır. Genetik haritalar bir haritalama popülasyonunda çok sayıda markörün analiz edilerek bağlantı ilişkilerinin bulunması ile hazırlanır (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

DNA markör terimi bireyler arasındaki genetik çeşitliliğe ait bir terimdir. DNA markör testlerinden basit özelliklerle elde edilen genotip bilgisinin kullanımı oldukça kolaydır. Bu gibi özellikler sıklıkla bir tek gen ve bu özelliğin fenotipini tamamen gösterebilen bir gen tarafından kontrol edilmektedirler.

2.5. DNA Markörleri

DNA markörleri birçok farklı mutasyon sınıflarının bir sonucu olarak ortaya çıkarlar. Bunun en basit örneği iki genotipi birbirinden ayıran tek bir nükleotidin yer değişmesi kadar küçük bir farklılıktır (Paterson, 1996).

Tek bir bazın yer değiştirerek bir enzimin kesim noktasını değiştirmesi, DNA parçasının uzunluğunu değiştirerek ilgili gözlem metodunda direkt olarak bir bireyin genotipini temsil eden farklı bir markör ortaya çıkarır. PCR (Polimorfik Zincir Reaksiyonları) metodunu temel alan gözlemlerde PCR primerinin bağlanacağı bölgedeki bir bazdaki değişiklik de aynı şekilde bir etkiye sahiptir (Yıldırım, 2001).

İdeal DNA Markörlerinin Özellikleri:

- Yüksek oranda Polimorfik yapı
- Kodominant kalıtım (Diploit Organizmaların Homozigot ve Heterozigotluğunun Saptanması)
- Genomda sık bulunması
- Seçici nötral davranış (Herhangi Bir Organizmanın DNA Dizisinin Çevresel Koşullara ya da İşletim Uygulamalarına Karşı Nötr Olması)
- Kolay elde edilebilirlik
- Kolay ve hızlı çalışma
- Yüksek verim
- Verilerin laboratuvarlar arasında kolaylıkla alıp verilebilmesi

DNA polimorfizmini değerlendirmek üzere moleküler markörlerin çeşitli tipleri kullanılır. Bunlar genel olarak iki sınıfa ayrılır:

- a) Hibridizasyon temelli markörler
- b) PCR temelli markörler

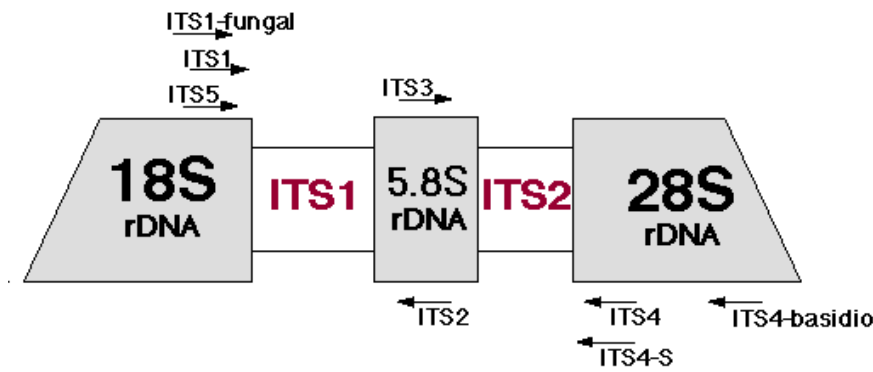
2.5.1. Hibridizasyona Dayalı DNA (RFLP) Markörleri

Bu çalışmada PCR temelli markörler kullanılmıştır. PCR temelli markörler, belirli bir DNA dizisinin ya da bölgesinin özgül olarak hazırlanmış ya da rastgele seçilmiş oligonükleotit dizileri (primer) ve ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi yardımı ile *in vitro* olarak çoğaltılmasını içerir. Çoğaltılmış olan fragmentler elektroforetik olarak ayrılır ve bant örnekleri, boyama ve otoradyografi gibi çeşitli yöntemlerle saptanır.

2.5.2. PCR'a Dayalı DNA Markörleri

- AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi)
- RAPD (Rastgele Artırılmış Polimorfik DNA)
- SCAR Markörleri (Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Polimorfik Diziler)
- CAPS Markörleri (Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler)
- SRAP Markörler (Sequence-related Amplified Polymorphism)

2.5.3. ITS (Internal Transcribed Spacer)



Şekil 2.6. ITS Gen Bölgeleri

Kodlanmayan iki değişken bölgeden meydana gelen ITS bölgesi, oldukça korunmuş küçük alt birim (SSU) ile 5.8S alt birimi arasında (ITS1 bölgesi) ve de büyük alt birim (LSU) rRNA genleri ile 5.8S alt birimi arasındaki bölgede (ITS2) yer almaktadır. ITS bölgesi 4 temel nedenle funguslarda moleküler karakterizasyon çalışmaları için özellikle kullanışlıdır (White ve ark., 1990, Bruns ve ark., 1991, Lee ve Taylor, 1992)

- ITS bölgesi nispeten küçük bölgelerdir (500-800 bp) ve evrensel tek bir primer çifti (rRNA alt birimleri içindeki korunmuş bölgelerin komplementeri) kullanılarak PCR ile kolaylıkla çoğaltılabilir.
- Morfolojik açıdan farklı türler arasında ITS bölgesi yeterince değişken olabilir ve bundan dolayı ITS-RFLP (Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi) restriksiyon verileri genetik uzaklığı tahmin etmek için kullanılabilir böylece filogenetik ve sistematik analizler için karakterler sağlayabilir.
- ITS türe özgü probları, bir kromozomal kütüphane oluşturmaya gerek kalmaksızın hızlı bir şekilde PCR ile üretilebilir. Birçok araştırmacı dizilerin tekrarlayan birimler şeklinde olması ve türler arasında değişken, tür içinde benzer olma eğiliminde olmasından dolayı, türe özgü probları geliştirmek için dizileri ITS bölgesinden seçmektedir.
- rDNA birimlerinin çok sayıda tekrarlarının olması nedeniyle, seyreltik yada oldukça bozulmuş DNA örneklerinden bile ITS bölgesi kolaylıkla çoğaltılabilir (Kılıçoğlu ve ark., 2008)

Fungal türler arasındaki polimorfik DNA dizilerinden biri olan ITS bölgesi, günümüzde bir türün doğru olarak tespiti açısından iyi bir aday olarak görülmekte ve bu uygulama ile diğer tüm türlerden büyük ölçüde ayrılabilirler. Bununla birlikte, ITS dizilerindeki varyasyon ve bu varyasyonu doğrudan değerlendirebilen PCR temelli teknikler sayesinde fungusun izolasyonuna gerek duyulmaksızın konukçu bitkiler içindeki ve çevresindeki bir çok fitopatojenik fungal türün belirlenmesi mümkün hale gelmiştir (Maukhamedov ve ark., 1994).

ITS dizileri türler içinde nispeten korunmuş olmasına karşın bir cinsin türleri arasında değişebilmesi nedeniyle, bu diziler Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) analizi ile fungal türlerin teşhisinde ve aynı zamanda hızlı prosedürlerin geliştirilmesinde ve tür spesifik primerlerin dizaynında yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Bridge ve ark., 1998).

2.5.4. Mikrosatelitler

Mikrosatelitler hem prokaryot (Gur-Arie, R. ve ark., 2000) hem ökaryotlarda bulunan tekrarlı DNA dizileridir. Genellikle tekrarlayan 2–6 bp (baz çifti) uzunluğunda tüm genoma rastgele dağılmış dizilerdir (türlerde ve kromozomlarda dağılımı çeşitlidir) ve çok korunmuş dizilerce çevrilmiştir (Chambers ve MacAvoy, 2000).

2.5.4.1. ISSR Markörler (Basit İç Dizi Tekrarları)

Mikrosatelitler genellikle az çok tüm genoma yayılmışlardır. Bununla birlikte, bu dizileri bol miktarda içeren bölgeler bulunmuştur ve “SSR hot spots” olarak isimlendirilmiştir (Zietkiewicz ve ark., 1994).

Böyle bölgeler ISSR markör kaynakları olarak işlev görebilirler (Bolibok ve Trojanowska, 2003).

ISSR teknolojisi ters düzenlenmiş yakın aralıklı mikrosatelitlerin arasındaki bölgelerin (100–300 bp) amplifikasyonuna dayanmaktadır (Zietkiewicz ve ark., 1994).

Bu bölgelerin amplifikasyonu için kullanılan 16-18 bp uzunluğunda tek primerleri içeren çok sayıda basit dizi tekrarları herhangi bir SSR motifi ve 5’ veya 3’ ucuna bağlanmış tesadüfi seçilmiş nükleotidlere dayanabilir. Ayrıca bağlanmamış primerler de kullanılmaktadır (Bornet ve ark., 2002).

PCR ürünleri belirsiz SSR bölgeleridir. ISSR lar genellikle bir reaksiyonda 25–50 ürün çoğaltabilirler. Bu metodun en büyük avantajı genomik kütüphanelerin yapım aşaması pahalı değildir ve çok fazla zaman gerektirmez.

ISSR markörleri daha çok dominant kalıtım gösterirler; eğer mikrosatelitlerde primerlerin bağlanma bölgeleri arasındaki mesafe değişmişse nadiren ko-dominant kalıtım gösterirler. ISSR markörleri özellikle filogenetik çalışmalar, genetik çeşitliliğinin değerlendirilmesi ve kültürlerin tanımlanması çalışmaları için uygundur. ISSR markörlerin kolaylığı onları gen işaretleme için de öncül kılar (Bolibok ve Trojanowska, 2003).

ISSR markörleri somaklonal varyasyonu görüntülemek için de oldukça kullanışlıdır (Rostiana ve ark., 1999).

ISSR markörlerinin diğer bir yararı genomlardaki SSR miktarını ve dağılımını çalışmayı mümkün kılmasıdır. Belirli bir mikrosatelit tekrarı ile ISSR primeri tarafından oluşturulan bantlar belirli bir genomdaki motifin oransal frekansını yansıtabilir.

Boletus edulis ektomikorizal bir tür kompleksidir. Bu funguslar oldukça farklı morfolojik özelliklere sahip olduğu için türlerin belirlenmesi oldukça zordur. Bu çalışmada rDNA ITS dizi analizi yapılarak İtalya'dan elde edilen çok sayıda *B. edulis* türü analiz edilmiştir. Moleküler analizler *B. edulis*, *B. aventivialis*, *B. pinophilus* ve *B. aereus* türleri arasındaki ve içindeki ayrıma olanak sağlarken, filogenetik ilişkileri de ortaya çıkarmıştır (Leonardi ve ark., 2005).

Wipf ve ark. (1996) *Morchella esculenta* (Yellow Morel) ve *Morchella conica* (Black Morel) üzerinde yaptıkları çalışmada ITS bölgelerinin kökeninin iki grup arasında farklı olduğunu göstermiştir. İki türde de 740 bp'den 750 bp'ye kadar belirtmişlerdir. Cins düzeyinde non-coding polimorfizm derecesi ITS bölgesi mantarlar arasında değiştiğini söylemişlerdir.

Nazar ve ark. (1991) de PCR ile amplifiye edilen (çoğaltılan) rDNA ITS dizileri *Verticillium albo-atrum* ve *V. dahliae*'nin karakterizasyon, teşhis ve belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu çalışmada hem ITS1 hem de ITS2 içindeki homolog olmayan farklı nükleotid kümelerinin belirlenmesi sayesinde, bu iki önemli bitki patojeninin güvenilir bir şekilde teşhis edilmesini sağlamıştır.

Maukhamedov ve arkadaşları da (1994) aynı prensibi kullanarak *V. tricorpus*'u ayırt etmek için 5.8-28S ITS bölgesinin amplifikasyon ürünlerinin dizilemesini yapmıştır. Bu çalışmada 5.8S dizisinin *Verticillium*'un türleri arasında korunduğu fakat *V. tricorpus*'un ITS bölgesinin tür spesifik primerlerin oluşturulmasına izin verecek kadar farklı olduğu belirlenmiştir

Nuytinck ve ark. (2007) Avrupada'ki *Lactarius* türlerinin filogenetik akrabalıklarıyla ilgili yaptıkları çalışmalarda geni kodlayan gliseraldehit-3fosfat-dehidrogenazın 800 bp'lik fragmentlerini ve nuDNA ITS dizilerini kullanarak, *Lactarius* şubesinin delicious örneklerinin *Piperites* üstgenusunun içinde monofiletik bir genus olduğunu onaylamışlardır. Ayrıca AFLP tekniğini kullanarak *L. deterrimus* ve *L. fennoscandicus* arasında belirli bir fark olduğunu göstermişlerdir.

Nuytinck ve ark. (2004) Laden ile ektomikorizal yaşayan *Lactarius tesquorum* ile yaptıkları çalışmada türün anatomik ve moleküler özelliklerini, morfolojik olarak yakınlıklarını tanımlamışlardır. ITS rDNA dizi filogenetik analizler Avrupadaki *Lactarius*ların takson ilişkilerine uygulamışlardır.

Nuytinck ve ark. (2007) *Lactarius delicious* ile ilgili çalışmaya filogenetik analizleri bilinen bütün türlerin toplayarak başlamışlardır. Geniş coğrafik alanlardaki her bir türün çeşitli örnekleri alınmış ve kullanılan iki DNA bölgesi uyumsuz bir filogenetik sinyal göstermiştir. Taksonomik sonuçları çizmek için mikro ve makro morfolojik karakterler elde edilmiştir. Bilim dünyasında 4 türü yeni olan 38 takson kabul edilmiştir. Şubenin monofilisi ve pozisyonu *Lactarius* alt genusu olan *Piperatis* olduğunu öne sürmüşlerdir.

Başka bir çalışmada yenilebilir ektomikorizal *Lactarius deliciousun* hayat döngüsünün farklı aşamaları seçilip izole edilmiştir. Karakterize ve teşhis için mikrosatellite primed PCR ve ITS-SSCP analizleri uygulanmıştır. Örnekler mikorizalar ve toprak için kurulmuş fidelik deneysel arsalardan, elde edilen saf kültürlerden yapılmıştır. Yeni tasarlanan revers primer (LDITS2R) universal forward ITS ile kombine edilmiş ve özel *Lactarius delicious* türlerine uygulanmasına olanak sağlamıştır. PCR da kullanılan (GTG₅) oligonükleotid primer gibi çeşitli *Lactarius delicious* izolasyonlarında açıkça polimorfizm görülmüştür. Mikorizal örneklerin modelleri plant DNA ile aynı ek bantlar göstermiştir. Özel rDNA ITS fragmentlerinin tek iplik konformasyon polimorfizm analizleri 18 tane *Lactarius delicious* izolasyonundan güçlendirilmiş; 9 farklı modeli mikoriza ve toprak örnekleri rastlantısal örneklerle beraber kendi mantar izolasyonlarını göstermiştir. Özel rDNA ITS çoğaltmaları daha önce dış mikorizal ve ekstraradikal miselyumlarla SSCP analizleri için kullanılmamıştır. Diğerlerine nazaran basit ve ucuz olan bu teknik *Lactarius deliciousun* gelişiminin farklı aşamalarındaki izolasyonlarının

izlenmesine izin vermiştir. Özel ITS-SSCP analizleri *L. delicious* aşılmasının devamlılık çalışmaları ve onların yerli ektomikorizal mantarlarla karşılaştırılmasında özellikle ekstraradikal miselyum aşamalarında umut vermektedir (Hortal, 2006).

Taşkın ve ark. (2010) Türkiye'nin güneyinin özellikle Ege ve Marmara bölgelerinden 247 mantarlık (*Marchella spp*) bir koleksiyon nükleer ribozomal geniş alt birim (LSU) rDNA gen dizini ve RNA polimeraz I (RPB1) bölümü kullanılarak tür farklılıkları için analiz etmişlerdir. İlk ekran sonuçlarına dayanarak 62 koleksiyon genetik çeşitlilik örnekleme tam aralığını temsilen (izofen) kalıtsal uyuma dayalı multigen filogenetik türe maruz bırakılmıştır. 62 tür kategorisi 3 protein kodlama geni, RNA polimeraz I(RPB1), RNA polimeraz II(RPB2), aktarma elangasyon (uzama) faktörü (EF1-X) ve kısmi LSU rDNA gen dizininden meydana gelmiştir. Bireysel ve kombin veri kategorisinin filogenetik analizlerinde maksimum sıklık ve maksimum olabilirlik kullanarak, neredeyse tamamı çözümlenmiş yüksek uyumlu topolojik filogeni sonuç vermiştir. 62 tür kategorisinin GCPSR (genealogical concordance) analizi 15 tane türlerin evrimsel gelişimiyle (filogenetik) ilgili net tür çözümlenmiştir. Sırasıyla 13 ve 2 tür tarafından Elata (siyah mantarlar) ve *Esculenta clades* (sarı mantarlar) açıklanmıştır.

Fusarium cinsi oldukça heterojen bir gruptur, morfolojik ve biyokimyasal kriterlere göre türlerin teşhisi zor ve karışıktır. 28S rDNA ve ITS bölgesinin RFLP analizleriyle tür seviyesinde birkaç *F. oxysporum* suşu ayırt edilmiştir (Edel ve ark., 1995).

Diagnostik protokoller geliştirmek ve filogenetik akrabalığı belirleyen karakterleri değerlendirmek amacıyla, *Rhizoctonia*'daki rRNA genlerinin farklı anostomoz grupları (AG) arasındaki ilişkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, PCR ile çoğaltılan rRNA genlerinin binükleat (BN) *Rhizoctonia* türleri ve *R. solani*'nin farklı AG'leri içindeki genetik akrabalığı incelemek için kullanışlı olacağı belirlenmiştir (Liu ve ark., 1995; Cubeta ve ark., 1996; Hyakumachi ve ark.,1998).

Liu ve Sinclair (1993) birkaç *R. solani* alt grubunun (AG1 ve AG2) ITS1-5.8S-ITS2 amplifikasyon ürünlerinin restriksiyon analizini yapmıştır. Bu çalışmalarda AG1 içinde altı alt grup ve AG2 içinde beş alt grup belirlenmiştir.

Üzümde elde edilen *Aspergillus* cinsine ait çok sayıda türün teşhisinde ITS-RFLP analizleri hızlı ve kolay bir yöntem olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada *HhaI*, *NlaIII* ve *RsaI* restriksiyon endonükleazları kullanılarak *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. Carbonarius* ve *A. Aculeatus*'a ait dört farklı RFLP şablonuna ilaveten *A.niger*'e ait yeni bir RFLP şablonu belirlenmiştir (Martinez-Culebras ve Ramon, 2006). Elde edilen bu sonuçlar çok sayıda *Aspergillus* cinsinin teşhisinde araştırmacılara hız ve kolaylık sağlamıştır.

Afrika'da yapılan bir çalışmada, beş farklı *Fusarium* türüne ait doğal bir popülasyon içindeki genetik ilişkilerin belirlenmesi amacıyla AFLP yöntemi kullanılmıştır. *Fusarium* DNA'sı *EcoRI* and *MseI* restriksiyon endonükleazlarla kesilerek AFLP kalıpları ile birlikte, dört primer kombinasyonundan toplam 80 polimorfik AFLP profili elde edilmiştir. Sonuçlar *Fusarium*'un moleküler karakterizasyonu için bu yöntemin kullanılabilir olduğunu göstermiştir (Abdel-Satar ve ark., 2003).

Yine son dönemlerde *F. avenaceum*, *F. culmorum* ve *F. graminearum* türlerini ayırt edebilmek için ITS bölgesinin dizi varyasyonlarından yararlanılmıştır. *F. culmorum* ve *F. graminearum*'da ITS bölgesi türe özgü primerler elde etmeye olanak sağlayacak derecede polimorfik iken *F. culmorum* ve *F. graminearum*'u *F. avenaceum*'dan ayırt etmek için ITS1 ve ITS2 bölgelerindeki dizi varyasyonunun yeterli olmadığı belirlenmiştir (Schilling ve ark., 1996).

Rhizoctonia cinsi de yaygın bir bitki patojeni olup bu form cins içinde tarımsal açıdan önemli bir çok tür grubu bulunmaktadır. Bu organizmaların da diğer funguslar gibi eşeyli ve eşeysiz safhaları bulunmakta (Sneh ve ark., 1996), fakat eşeyli safhanın tespiti her zaman mümkün olmadığı için bu grubun ayrımı anostomoz temeline dayalı olarak gerçekleştirilmektedir (Özkoç ve ark., 2002; Karaca ve ark., 2002).

DNA dizi analizi *Trichoderma* taksonomisine önemli katkılar sağlamıştır. Bu yöntem kullanılarak yaklaşık atmışdan fazla tür tanımlanırken, iki yada daha fazla gen karakterize edilmiştir. Sonuç olarak moleküler analizler sayesinde morfoloji temeline dayalı olarak belirlenenden daha fazla türün varlığı ortaya çıkarılmıştır (Samuels, 2004).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Makro mantar türlerini toplama işlemi ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde (Sivas, Tokat, Yozgat ve Amasya) illerinden *Morchella conica*, *Lepista nuda*, *Suillus luteus* ve *Rhizopogon luteolus* mantarlarının gelişmesi için yeterli yağış ve sıcaklık şartlarına sahip zaman dilimlerinde yapılmıştır. Mantarlar bitki florası bakımından zengin, eğimi az, düzlük, su tutma kapasitesi ve nem oranı yüksek, kır ve ormanlık bölgeler tercih edilerek toplanmıştır.

Materyallerin toplanmasında özellikle genç ve olgun üreme organlarından zedelenmemiş olanların seçilmesine özen gösterilmiştir. Örneklere ait ortam ve flora özellikleri not edilerek örneklere numaralar verilmiştir. Renkli negatiflerin alınması esnasında makro mantarların morfolojik özelliklerinin mümkün olduğu kadar fotoğrafta tespit edilebilmesi için çözünürlüğü yüksek bir makine ile örnekler fotoğraflanmıştır.

Araziden toplanan mantar örnekleri literatürlerden yararlanılarak (Phillips. R, 1981, Breitenbach, J. and Kranzlin, F., 1984, 1986, 1991) teşhisleri yapılmıştır (Çizelge 3.1)

Çizelge 3.1. Makro mantarların toplandığı bölgeler

Toplandığı Bölge	Mantar Kod Numarası	Mantar Adedi
Tokat	A1 ve A4 arası	4
Amasya	B1 ve B4 arası	4
Yozgat	C1 ve C4 arası	4
Sivas	D1 ve D4 arası	4

3.2. Yöntem

Araştırmamız kullanılan materyalin DNA izolasyonu, ITS primerleri ile PCR uygulaması ve PCR ürünlerinin agaroz jel ortamında yürütülerek “jel görüntüleme sisteminde” görüntülenmesi işlemlerini içermektedir.

3.2.1. Mantar Örneklerinin Laboratuvar Çalışmaları İçin Hazırlanması

Moleküler analizlerde kullanılacak DNA materyalini izole etmek amacıyla mantarlar ilkbahar döneminde toplanmıştır. Toplanan mantarlar kuru buz içerisinde laboratuvara getirilerek -80°C ye konulmuştur. Birkaç gün bekletildikten sonra sıvı azot ile beraber havanda dövülerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen mantar örnekleri DNA izolasyonu yapılana kadar -80°C de bekletilmiştir.

3.2.2. DNA İzolasyon

DNA izolasyonu için Fermentas marka Genomic DNA Purification DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. DNA izolasyon işlemi şu basamaklardan oluşmaktadır.

- 50–100 mg öğütülmüş bitki örneği üzerine 400 μl lizis (parçalayıcı) solüsyonu eklenmiştir.
- 5 dakika 65°C de inkübe edilmiştir.
- Üzerine 600 ml kloroform eklenmiş ve 3-5 kez alt üst edilmiştir.
- 2 dakika 10000 rpm de santrifüj edilmiştir.
- Üst tarafta kalan kısım yeni bir tüpe alınmıştır.
- 800 μl seyreltilmiş yoğunlaştırıcı solüsyonu (Precipitation Solution) eklenmiştir.
- 1–2 dakika karıştırılmıştır.
- 2 dakika 10000 rpm de santrifüj edilmiştir.
- Üst tarafta kalan kısım atılmıştır.
- Tüpün dibinde kalan DNA pelleti 100 μl NaCl solüsyonu ile çözülmüştür.

- Üzerine 0.7 µl RNAaz eklenmiştir.
- 300 µl soğuk etanol eklenmiştir.
- 10 dakika -20 °C de inkübe edilmiştir.
- 4 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan kısım atılmıştır.
- % 70'lik soğuk etanol ile DNA pelleti yıkanmıştır. DNA pelleti 100 µl TE (Tris –EDTA Buffer) içinde çözdürülmüştür.

3.2.3. PCR Uygulaması

PCR işlemi için Apollo Instrumentation ATC401 cihazı kullanılmıştır. PCR mix içerisine aşağıda belirtilen hacimlerde ve konsantrasyonlarda PCR bileşenleri katılmıştır (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3).

Çizelge 3. 2. PCR bileşenlerinin konsantrasyonları ve miktarları

PCR öğeleri	Final Konsantrasyon	Kullanılan Miktar (µl)
Su		8,7
10x Buffer Mg free (BIOBASIC)	1X	2,5
20 mM MgSO4 (BIOBASIC)	2.6 mM	3,50
10 mM dNTP (Vivantis)	0.3 mM	1
primer	8µM	2
Taq DNA polimeraz (BIOBASIC)	0.3U	0,3
DNA	50 ng	5
Toplam	25	

Çizelge 3.3. ITS primerleri için PCR protokolü (Hortal, 2006)

Sıcaklık (°C)		Süre (sn)	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95	300	1
Denatürasyon	95	20	35
Bağlanma	55	50	
Uzatma	72	45	
Son uzatma	72	500	1
Bekleme	4		

3.2.4. Çalışmada Kullanılan ITS Primerleri

Çalışmada baz dizileri aşağıda belirtilen ve 2 adet ITS primeri kullanılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3. 4. Kullanılan Primerlerin İsimleri ve Baz Dizileri

Primer	TM	Primerlere Ait Baz Dizileri (5'-3')
ITS1	55	TCC GTA GGT GAA CCT GCGG
ITS4	55	TCCTCCGCTTATTGATATGC

3.2.5. Elektroforez İşlemi

- 2 gr agaroz, 200 mL 0.5x TBE buffer(0.09M Tris-borate ve 0.002M EDTA) içerisinde homojen hale getirildikten sonra mikrodalgada 1 dakika kadar bekletilerek agarozun erimesi sağlanmıştır.
- Ardından soğutulan jel, jel aparatına dökülmüştür. Üzerine 1 µl etidyum eklenerek dağılması sağlanmıştır. Daha sonra tarak yerleştirilir. Jelin polimerizasyonu için 10-15 dakika beklenir.

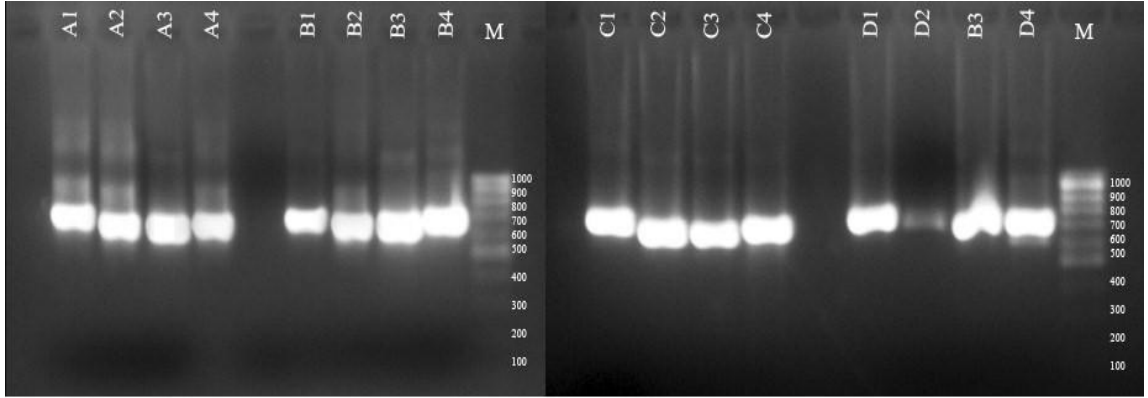
- 3 µl blue loading dye, 25 µl DNA ile karıştırılır. Bu oran uygulanan bütün örnekler için sabit tutulmuştur. Hazırlanan jel polimerleştikten sonra tarak çıkartılır ve boyanmış DNA'lar kuyucuklara yüklenir. 150V da ortalama 3 saat DNA'lar yürütülür.

3.2.6. DNA Bantlarının Görüntülenmesi

Elektroforez uygulaması bittikten sonra KODAK Gel Logic 200 jel görüntüleme cihazı kullanılarak U.V. ışık altında resimler alınarak değerlendirilme yapılmıştır.

4. BULGULAR

ITS alışmasında *Lepista*, *Morchella*, *Suillus* ve *Rhizopogon* ' a ait türlerde ITS1 ve ITS4 primerleri çalışılmıştır. İki primer de her örnekte 600-700 bp aralığında tek bant vermiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. ITS primerlerinin %2 lik agaroz jel görüntüsü

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Araziden toplanan mantarların laboratuvar ortamında incelenmesine başlama aşamasına kadar teşhis açısından bozulma olasılığı, sadece geleneksel çalışma yöntemlerinin (morfolojik, biyokimyasal vb.) bugün yeterli olmadığını göstermektedir. Morfolojik olarak mantar bozulmuş olabilir fakat DNA' sını aynı kalacağından gelişmiş teknolojileri sistematik alana uyarlamının, moleküler çalışmalarda daha hızlı, güvenilir ve uluslararası geçerliliği olan sonuçlara ulaşmada etkili olacağı söylenebilir.

Gelişmiş teknolojilerden PCR tekniği, çekirdek rDNA' sındaki genetik farklılığın araştırılmasında mükemmel bir yoldur. ITS bölgeleri, rDNA' daki büyük alt ünite (LSU) ve protein kodlayan genler, filogenetik çalışmalarda kullanılacak karakterlerin önemli kaynaklarıdır ve sistematik bilgilere eklenmelidir.

Moleküler alandaki bu gelişmeler göz önüne alındığında, sistematikçilerin geleneksel yöntemlere göre teşhisini yaptıkları organizmaları moleküler olarak da incelemesi zaman açısından avantajlı olacağı gibi yapılan çalışmaların daha güvenilir olmasını da destekleyecektir ve kişisel hatalarla beraber onun doğuracağı sonuçları da en aza indirecektir. Şu anda pahalı bir işlem gibi görülse de, sürekli gelişen teknoloji bu analizleri hem daha pratik hem de daha ucuz hale getirmektedir (Kılıçoğlu ve ark., 2008)

Ökaryotik canlılarda çeşitli uzunluklarda bant veren ITS primeleri fungal DNA larda 500-800bp arasında bant verdiği bilinmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada 4 farklı bölgeden toplanan 4 tür (*Morchella conica*, *Lepista nuda*, *Rhizopogon luteus* ve *Suillus luteolus*) mantar 600-700bp aralığında bant vermiştir. Bilimsel doğrularla uyumludur ve diğer çalışmalarla desteklenmiştir.

Bu çalışmalardan bazıları; Wipf ve arkadaşları (1996) *Morchella esculenta* (Yellow Morel) ve *Morchella conica* (Black Morel) üzerinde yaptıkları çalışmada ITS primerleri iki türde de 740 - 750 bp aralığında bant göstermiştir. Cins düzeyinde non-coding poliformizm derecesi ITS bölgesi mantarlar arasında değiştiğini söylemişlerdir.

Kaminski ve arkadaşları (2005) *Ophiosphaerella agrostis*'in ITS1 ve ITS2 bölgesi için spesifik primerler geliştirilmiştir. Bu çalışmada diğer patojenler amplifikasyon ürünü oluşturmazken seksen *Ophiosphaerella agrostis* türüne ait ITS bölgesi amplifikasyon ürünü oluşturmuş ve bu sayede teşhis süreci oldukça hızlı ve güvenilir olarak gerçekleştirilmiştir.

Diğer yandan; Edel ve arkadaşları (1995) *Fusarium* cinsi ile yaptıkları çalışmada 28S rDNA ve ITS bölgesinin RFLP analizleriyle tür seviyesinde birkaç *F. oxysporum* suşu ayırt edebilmişken, Schilling ve arkadaşlarının (1996) *Fusarium* türleri ile yapmış oldukları bir çalışmada ise; *F. avenaceum*, *F. culmorum* ve *F. graminearum* türlerini ayırt edebilmek için ITS bölgesinin dizi varyasyonlarından yararlanılmıştır. *F. culmorum* ve *F. graminearum*'da ITS bölgesi türe özgü primerler elde etmeye fırsat sağlayacak derecede polimorfik iken *F. culmorum* ve *F. graminearum*'u *F. avenaceum*'dan ayırt etmek için ITS1 ve ITS2 bölgelerindeki dizi varyasyonunun yeterli olmadığı belirtilmiştir.

Bu tez çalışması da ülkemiz doğal bitki örtüsünde var olan ekonomik olarak önemli *Morchella sp.* ve *Lepista sp.* gibi türlerin bireylerinde gen potansiyelinin genetik düzeyde tanımlanması, teşhisinin hızlı ve güvenilir olması açısından yapılan ilk uygulamalardan biri olması nedeniyle önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Satar, M.A., Khalil, M.S., Mohmed I.N., Abd- Elsalam K.A., Verreet, J.A., 2003. Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint African Journal of Biotechnology. Vol. 2 (3), pp. 51-55
- Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A. and Cregan, P. B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean, Genetics, 134; 1131-1139.
- Altuner, Z., 2004. Sistematik Botanik 2. Aktif Yayınevi, 1-3, Erzurum.
- Anşin, R., Eminağaoğlu, Ö., Göktürk, T., Artvin İli Sınırlarında Yenebilen Mantarlar, Türkiye VI. Yemeklik Mantar Kongresi, 20-22. Eylül.2000, Bergama-İzmir, Bildiri Kitabı, 122-129
- Atalay, İ., 1994. Türkiye Vejetasyon Coğrafyası. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir
- Bolibok, H. and Rakoczy-Trojanowska, 2003. M. Evaluating the efficiency of SAMPL marker system in assessing genetic diversity in winter rye (*Secale cereale* L.). 7th Internat. Congress of Plant Mol. Biol., Barcelona, June 23- 28.
- Bornet, B., Muller, C., Paulus, F. and Branchard, M., 2002. Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using triand tetra-nucleotide primers from DNA of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.). Genome, 45 890–896.
- Breitenbach, J. and Kranzlin, F., 1984, 1986, 1991..Fungi of Switzerland, Vol. 1-2-3, Verlag Mykologia, Lucerne
- Bridge, P. D., Arora, D. K., Reddy, C. A., Elander, R. P., 1998. Appliation of PCR in Mycology, Cab International, New York, 357p.
- Byrne, M., Marquez-Garcia M. I., Üren, T., Smith, D.S. and Moran, G.F. 1996. Conservation and genetic diversity of microsatellite loci the genus Eucalyptus. Aust. J. Bot., 44; 331-341.
- Chambers, G.K. and MacAvoy, E.S., 2000. Microsatellites: consensus and controversy. Comp. Biochem. Physiol., 126 455-476.
- Cantini, C., Iezzoni, A.F., Lamboy, W.F., Boritzki, M. and Struss, D. 2001. DNA Fingerprinting of Tetraploid Cherry Germplasm Using Simple Sequence Repeats. J. Amer. Soc. Hort. Sci.,1266 (2); 205-209.

- Çelik, S., 2003. *Centaurea L. Cinsi psephelloidea (Boiss) sosn. Seksiyonuna Ait Türlerin Ekolojik Özellikleri*. Doktora Tezi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Eskişehir.
- Gianfi-Anceschl, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M. and Gessler, C. 1998. Simple Sequence Repeats For The Genetic Analysis Of Apple. *Theor. Appl. Genet.*, 96; 1069-1076.
- Gill, M. and W. Steglich, 1987. Pigments of fungi. *Progress Chem. Org. Nat. Products*. 51: 1-317
- Gur-Arie, R., Cohen, C.J., Eitan, Y., Shelef, L., Hallerman, E.M. and Kashi, Y., 2000. Simple Sequence Repeats In *Escherichia coli*: Abundance, Distribution, Composition, and Polymorphism. *Genome Res.*, 10 62–71.
- Güzeldağ, G., “Polyporaceae“ Türlerinde (*Ganoderma Spp.*,ve *Trametes Spp.*) Üretim Ve Biyoteknolojik Optimizasyon Olanaklarının Araştırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, (Doktora Tezi), Adana 2007.
- Edel, V., Steinberg, C., Avelance, I., Laguerre, G., Alabouvette, C., 1995. Comparison Of Three Molecular Methods For The Characterization Of *Fusarium Oxysporum* Strains. *Phytopathology* 85, 579-585.
- Hallden, C., Nilsson, N.O., Rading, I.M. and Säll, T. 1994. Evaluation of RFLP and RAPD Markers in a Comparison of *Brassica napus* Breeding Lines. *Theor. Appl. Genet.*, 88; 123-128.
- 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.
- Hortal, S., 2006. Molecular identification of the edible ectomycorrhizal fungus *Lactarius deliciosus* In The Symbiotic and Extraradical Mycelium Stages, *Journal Of Biotechnology*, 126: 123-124.
- Hyakumachi, M., Mushika, T., Ogiso, Y., Toda, T., Kageyama, K., Tsuge, T., 1998. Characterization of a new cultural type (LP) of *Rhizoctonia solani* AG2-2 isolated from warm-season turgrasses, and its genetic differentiation from other cultural types. *Plant Pathology* 47

- Johansson, M., Ellegren, H. and Andersson, L. 1992. Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. *J. Hered.*, 83;196-198.
- Karkacier, O., Tokat (Turhal) Sığır Besiciliği İşletmelerinin Ekonomik Analizi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarım Ekonomisi Anabilim Dalı, (Doktora Tezi), İzmir 1991.
- Kaminski, J., Dernoeden, P., Oneill, N.R., Whetzel, H.C. 2005. A PCR-based method for the detection of *Ophiosphaerella agrostis* in creeping bentgrass. *Plant Disease*. 89:980-985.
- Leonardi, M., Paolocci, F., Rubini, A., Simonini, G., Pacioni, G., 2005. Assessment of inter and intraspecific variability in the main species of *Boletus edulis* complex by ITS analysis. *FEMS Microbiology Letters* 243, 411-416
- Liu, Z.L., Sinclair, J.B., 1993. Differentiation of intraspecific groups within anastomosis group I of *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia* 85, 797-800
- Macrae, R., 1967. Pairing incompatibility and other distinctions among *Hisschioporus abietinus*, *H. Fusco-violaceus*, and *H. laricinus*. *Can. J. Bot.* 45: 1227-1398
- Magası, L. P., 1976. Incompatibility factors in *Polyporus abietinus*, their numbers and distributions. *Mem. N. Y. Bot. Gard.* 28:163-173.
- Maukhamedov, R., Hu, X., Nazar, R.N., Robb, J., 1994. Use of polymerase chain reaction- amplified ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology* 84, 256-259.
- Martinez-Culebras, P.V., Ramon, D., 2006. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 113, pp. 147-153.
- Nazar, R.N., Hu, X, Schmidt, J., Culham, D., Robb, J., 1991. Potential use of PCR amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogen. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39, 1-11
- Newbury, H.J and Ford-Lloyd, B.V. 1993. The Use of RAPD for Assessing Variation in Plants. *Plant Growth Regulation*, 12; 43-51.
- Nuytinck, J., Verbeken, A. Rinaldi C A. Leonardi, M. Pacioni, G. Comandini, O. 2004. Characterization of *Lactarius tesquorum* ectomycorrhizae on *Cistus* sp. and Molecular Phylogeny of Related European *Lactarius* Taxa. *Mycologia*, 272-282.

- Nuytinck, J., Verbeken, A. 2007. Species Delimitation and Phylogenetic Relationships in *Lactarius* section *Deliciosi* in Europe. *Mycological Research*, 1285-1297.
- Özkoç, İ., Karaca, G.H., Erper, İ., 2002. Pathogenicity of *Rhizoctonia repens* Bernard on different plants and its effect on the suppression of root-rot on cucumber plants. *Acta Horticulture*, Vol 579, 463-467
- Quicke, D. L.J., 1993. *Principles and Techniques of Contemporary Taxonomy*. Blackie Academic & Professional, London, 311 pp.
- Powell W., Macharay G.C. and Provan. J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Genet.*, 1; 215-222.
- Parmaksız, İ. 2004. *Papaver* cinsi *Oxytona* seksiyonunun Türkiye’de yetişen türlerinde genetik çeşitliliğin RAPD markörleri ile analizi. Doktora tezi. Ankara üniv. Fen Bilimleri Enst. Ankara.
- Phillips, R., *Mushrooms and Other Fungi of Great Britain and Europe*, New Interlitho S.P.A. Milan (1981).
- Reiter, S.R., Young, M. and Scolnik, P.A. 1993. Genetic linkage of the arabidopsis genome: Methods for Mapping with Recombinant Inbreds and RAPDs. *Methods in Arabidopsis Research*, World Scientific Publishing, Singapore.
- Rostiana, O., Niwa, M. and Marubashi, W. 1999. Efficiency of inter-simple sequence repeat PCR for detecting somaclonal variation among leaf-culture regenerated plants of horseradish. *Breed. Sci.*, 49 245–250
- Samuels, G.J., 2004. Changes in taxonomy, occurrence of the sexual stage and ecology of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 94, 138
- Schilling, A.G., Moller, E.M., Geiger, H.H., 1996. Polymerase chain reaction-based assays for species specific detection *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* ve *F. avenaceum*. *Phytopathology* 86, 515-522.
- Sesli., E., Trabzon Yöresinde Yetişen Makromantarlar Üzerinde Taksonomik Araştırmalar, K.T.Ü. Fen Bilimleri Eğitimi Anabilim Dalı Fen Bilimleri Eğitimi Programı (Doktora Tezi) Mayıs 1994, Trabzon.
- Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A., 1991. Identification of *Rhizoctonia* species, APS PRESS The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, USA. Sf 133.

- Tamer, A.Ü., Gücin, F. ve Solak, M.H., 2006. Mikolojiye Giriş. Celal Bayar Üniversitesi, 9–10, Manisa.
- Taşkın, H., 2010, A Multigene Molecular Phylogenetic Assessment Of True Morels (*Morchella*), Fungal Genetics and Biology.
- Türkekul, İ., 2001. Tokat Yöresinde Yetişen Makromantarlar Üzerinde Taksonomik Bir Araştırma. (Doktora Tezi), Karadeniz Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor. J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, san Diego, pp. 315-322.
- Wıpf, D., Munch, J-C., Botton, B. ve Buscot, F., 1996. DNA Polymorphism in Morels: Complete Sequences of the Internal Transcribed Spacer of Genes Coding for rRNA in *Morchella esculenta* (Yellow Morel) and *Morchella conica* (Black Morel), Applied And Environmental Microbiology, 3541–354
- Xu, J., Kerrigan, R.W., Sonnenberg, A.S., Callac, P., Horgen, P.A., Anderson, J.B., 1998. Mitochondrial DNA variation in natural populations of the mushroom *Agaricus bisporus*. Molecular Ecology 7, 19-33.
- Yıldırım, A. ve Kandemir, N. 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Bölüm 23. In : Özcan, S. Gürel, E., Babaoğlu, M. Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. (ed.). Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları, Sayfa 112–159. ISBN 975-6652-05-5. Konya.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20:176–183.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Eda DAŞTAN

Doğum Tarihi ve Yer : 26/07/1985 - SAMSUN

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Telefon : 05064884459

e-mail : eda_dastan@mynet.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	G.O.P Üniversitesi	---
Lisans	G.O.P Üniversitesi	20/07/2004
Lise	Mevlana Lisesi	17/06/2003

Yapılan Bilimsel Çalışmalar

TÜBİTAK, Lisans Öğrencilerine Yönelik Proje Tabanlı Biyoloji Eğitimi Çalıştayı, Haziran 2008, AMASYA

TÜBİTAK, Eğitimde Bilim Danışmanlığı Projesi Tokat İlindeki Fen bilimleri ve Matematik Öğretmenlerini Bilim Danışmanlığı ve Eğitimi Yönünden Destekleme Çalıştayı, Kasım 2008, TOKAT