

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ali Murat KÜLCÜ**

**COPRINUS CINEREUS' UN MAKSİMUM ÇİMLENME SICAKLIĞININ  
SAPTANMASI VE YÜKSEK SICAKLIKTAKİ MİSELLERLE NORMAL  
SICAKLIKTA GELİŞMİŞ MİSELLERİN VE MEYVELERİN PROTEİN  
KOMBİNASYONLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2007**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**COPRINUS CINEREUS' UN MAKSİMUM ÇİMLENME  
SICAKLIĞININ SAPTANMASI VE YÜKSEK SICAKLIKTAKİ  
MİSELLERLE NORMAL SICAKLIKTA GELİŞMİŞ MİSELLERİN VE  
MEYVELERİN PROTEİN KOMBİNASYONLARININ  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Ali Murat KÜLCÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 16/07/2007 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından  
Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza.....  
Prof. Dr. Ömer ÇOLAK  
DANIŞMAN

İmza.....  
Prof. Dr. Haluk SORAN  
ÜYE

İmza.....  
Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ  
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:FEF.2006.YL.43

- **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

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

**COPRINUS CINEREUSUN MAKSİMUM ÇİMLENME  
SICAKLIĞININ SAPTANMASI VE NORMAL SICAKLIKTA  
GELİŞMİŞ VE YÜKSEK SICAKLIKTA GELİŞMİŞ MİSEL VE  
MEYVELERİN PROTEİN KOMBİNASYONLARININ  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Ali Murat KÜLCÜ**

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman** : Prof. Dr. Ömer ÇOLAK  
**Yıl** : 2007, **Sayfa**: 60  
**Juri** : Prof. Dr. Ömer ÇOLAK  
Prof. Dr. Haluk SORAN  
Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

Bu çalışmanın amacı, *Coprinus cinereus* sporlarının maksimum çimlenme sıcaklığının belirlenmesi; normal ve yüksek sıcaklıkta gelişmiş misel ve meyvelerinin protein kombinasyonlarının karşılaştırılması ile sıcaklığa dayanıklılığı ifade eden protein yapılarının tespitidir.

CYM besiyerine ekilmiş olan sporlar, 24 saat içinde 37 °C'da 3 defa ayrı ayrı çimlendirilmiş ve ortalama çimlenme yüzdeleri hesaplanmıştır. Bu işlemler, 40, 41, 42, 43, 44 ve 47 °C sıcaklıklar için tekrarlanmıştır. Birbirinden farklı ve saf kültür halindeki 43 monokaryon misel 43 °C ve 46 °C sıcaklarda CYM besiyerinde geliştirilmiştir. Bu süreç sonunda gelişim hızlarının ölçülmesi ile, yüksek sıcaklığa dayanıklı olanlar ve olmayanlar belirlenmiştir. Yüksek sıcaklığa dayanıklı olan 2 farklı monokaryonun kendi aralarında ve yine yüksek sıcaklığa dayanıklı olan ve olmayan iki ayrı monokaryonun birbirleriyle eşleştirilmesi ile elde edilmiş olan dikaryon misel ve meyvelerinin ayrıca, yüksek sıcaklığa dayanıklı olan ve olmayan monokaryon misellerinin protein ekstraktları çıkarılmıştır. Proteinler, SDS-PAGE yöntemi ile analiz edilerek moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmıştır.

Sporlar yaklaşık olarak 41,2 °C'da maksimum çimlenme oranına (% 19,53) ulaşmıştır. 38 numaralı hariç, diğer monokaryon misel protein profilleri birbirine benzerlik göstermiştir. Meyve ile misel protein profillerinin farklı olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Basidiomycetes, Çimlenme, SDS-PAGE, Meyve, Misel

## ABSTRACT

### MSc THESIS

<p style="text-align: center;"><b>DETERMINING THE MAXIMUM GERMINATION TEMPERATURE OF COPRINUS CINEREUS AND COMPARING THE PROTEIN COMBINATIONS OF MYCEL AND FRUIT-BODIES WHICH GROWS UP AT NORMAL AND HIGHER TEMPERATURES</b></p>
--

**Ali Murat KÜLCÜ**

DEPARTMENT OF BIOLOGY  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

**Supervisor** : Prof. Dr. Ömer ÇOLAK  
**Year** : 2007, **Pages:** 60  
**Jury** : Prof. Dr. Ömer ÇOLAK  
Prof. Dr. Haluk SORAN  
Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

The aim of this study is determining maximum germination temperature of spores of *Coprinus cinereus* and the temperature resistant protein structures by comparing protein combinations of mycel and fruit-bodies which grows up at normal and higher temperature.

Spores were germinated three times separately on CYM media in 24 hours at 37 °C and average germination percentage was calculated. All applications were repeated at 40, 41, 42, 43, 44 and 47 °C temperatures. According to the result of the growth value of 43 different and pure monokaryon mycel at 43 and 46 °C, one higher temperature resistant monokaryon was chosen and paired with each other and, paired the another monokaryon which is not resistant on higher temperatures. Thus these fruit-bodies and mycels were obtained. In addition, monokaryon mycels which resisted or not resisted at higher temperatures, were chosen and then obtained. All proteins of fruit-bodies and mycels were extracted. Proteins were analysed by using SDS-PAGE electrophoresis method for separating their molecular weights.

Nearly at 41,0 °C, spore germination rate (19,53%) have been reached it's maximum value. The profiles of monokaryon mycel proteins were showed nearly similar except number 38. It has been established that profiles of fruit-body and mycel proteins were different.

**Key Words:** Basidiomycetes, Germination, SDS-PAGE, Fruit-body, Mycel

## **TEŞEKKÜR**

Çalıőmalarım sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, çalıőmalarıma yön verip, beni her zaman destekleyen, değerli bilim adamı, danışman Hocam Prof. Dr. Ömer ÇOLAK'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca deneysel çalıőmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen başta Biyolog Emel KARADENİZ, Araő. Gör. Gülcihan GÜZELDAĖ ve Araő. Gör. Ashabil AYGAN olmak üzere bölümün tüm öğretim elemanı ve öğretim üyelerine; bölümün laboratuvar ve diğer imkanlarını kullanmama izin veren Biyoloji Bölüm Başkanlığı ve Fen-Edebiyat Fakóltesi Dekanlığı'na, çalıőmaya maddi destek sağlayan Rektörlük Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne değerli katkılarından dolayı teşekkür ediyorum.

Hayatımın her aşamasında bana her zaman destek olan çok sevdiğim aileme teőekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Coprinus cinereus</i> .....	1
1.1.1. <i>Coprinus cinereus</i> 'un Gelişimine Çevresel Faktörlerin Etkisi.....	3
1.1.1.1. Gelişmeye Işığın Etkisi .....	3
1.1.1.2. Gelişmeye Sıcaklığın Etkisi.....	3
1.1.1.2.(1). Meyve Oluşumunda Sıcaklık Faktörü.....	3
1.1.1.2.(2). Diğer Gelişimlerde Sıcaklık Faktörü.....	4
1.1.2. <i>Coprinus cinereus</i> 'un Hayat Döngüsü.....	4
1.1.3. Monokaryon Dikaryon Farkı.....	8
1.1.4. <i>Coprinus cinereus</i> 'un Diğer Genetik Özellikleri.....	10
1.2. Elektroforez.....	10
1.2.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	11
<b>2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>17</b>
3.1 Materyal.....	17
3.1.1. Mantar.....	17
3.1.2. Besi yerleri.....	17
3.1.2.1. CYM – Complete Yeast Medium.....	17
3.1.2.2. At Gübresi Besi yeri.....	18
3.1.3. Deneylerde kullanılan Solüsyonlar.....	18
3.1.4. Kimyasal Maddeler.....	20

3.2. Metod.....	20
3.2.1. Meyvelerin Toplanması ve Sporlarının Stoklanması.....	20
3.2.2. Monokaryonların Tespit Edilmesi.....	21
3.2.3. Monokaryon Misellerin Stoklanması.....	22
3.2.4. Thoma Lamında Spor Sayımı ve Maksimum Çimlenme	
Sıcaklık Testleri.....	22
3.2.4.1. Thoma Lamında Spor Sayımı.....	22
3.2.4.2. Maksimum Çimlenme Sıcaklık Testleri.....	23
3.2.5. Eşleşme Testi .....	24
3.2.6. Meyve Oluşum Kontrolü ve Monokaryon Testleri .....	25
3.2.7 Monokaryon Misellerin Yüksek Sıcaklığa Dayanıklılık Testleri.....	26
3.2.8 Protein Ekstraksiyonu için Örneklerin Hazırlanması .....	27
3.2.9. Protein Ekstraksiyonu.....	28
3.2.10. Ayırıcı Jelin Hazırlanışı.....	28
3.2.11. Dengeleyici Jelin Hazırlanışı.....	29
3.2.12. SDS-PAGE Denatüre Protein Jel Elektrofrez.....	29
3.2.12.1. Protein Örneklerinin Uygulanması ve Elektrofrez.....	31
3.2.12.2. Jelin Coomassie Brillant Blue R-250 ile Boyanması.....	31
3.2.12.3. Boyanın Geri Alınması ve Görüntüleme.....	31
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>32</b>
4.1. Monokaryon Misellerinin Sıcaklığa Dayanıklılık Testi Bulguları.....	32
4.1.1. Monokaryon Misellerin 43 °C'daki Gelişimlerine Ait Bulgular.....	32
4.1.2. Monokaryon Misellerin 46 °C'daki Gelişimlerine Ait Bulgular.....	32
4.2. <i>Coprinus cinereus</i> 'un Maksimum Çimlenme Sıcaklığına Ait Bulgular....	36
4.2.1. 37 °C İçin Bulgular.....	37
4.2.2. 40 °C İçin Bulgular.....	38
4.2.3. 41 °C İçin Bulgular.....	38
4.2.4. 42 °C İçin Bulgular.....	39
4.2.5. 43 °C İçin Bulgular.....	39
4.2.6. 44 °C İçin Bulgular.....	40
4.2.7. 47 °C İçin Bulgular.....	40

4.3. <i>Coprinus cinereus</i> 'un Eşleşme Testlerine Ait Bulgular.....	41
4.4. Meyve Oluşum Kontrolü ve Monokaryon Testlerine	
Ait Bulgular.....	43
4.4.1. <i>Coprinus cinereus</i> 'un Meyve Oluşum Kontrolüne Ait Bulgular.....	43
4.4.2. <i>Coprinus cinereus</i> Monokaryon Testlerine Ait Bulgular.....	46
4.5. <i>Coprinus cinereus</i> SDS-PAGE Denatüre Protein Jel Elektroforezine	
Ait Bulgular.....	47
4.5.1. Monokaryon Misellerin Kıyaslanmasına Ait Bulgular.....	48
4.5.2. Dikaryon Misel ve Meyveler ile Monokaryonların Kıyaslanmasına	
Ait Bulgular.....	49
4.5.2.1. Misel ve Meyve Bulguları-1.....	49
4.5.2.2. Misel ve Meyve Bulguları-2.....	49
4.5.2.3. Misel ve Meyve Bulguları-3.....	50
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>52</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>54</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>60</b>



## ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Parçalama solüsyonu.....	18
Çizelge 3.2. SDS-PAGE stok solüsyonları ve hazırlanışı.....	18
Çizelge 3.3. SDS-PAGE çalışma solüsyonları ve hazırlanışı.....	19
Çizelge 3.4. Ayırıcı jelin bileşimi.....	19
Çizelge 3.5. Dengeleyici jelin bileşimi.....	19
Çizelge 3.6. Coomassie Brilliant Blue boyası stok solüsyonu.....	20
Çizelge 3.7. Boyayı geri alma solüsyonu.....	20
Çizelge 4.1. <i>Coprinus cinereus</i> monokaryon misellerinin 43 °C'daki gelişim hızları.....	34
Çizelge 4.2. <i>Coprinus cinereus</i> monokaryon misellerinin farklı günlerde 46 °C'daki gelişim hızları.....	35
Çizelge 4.3. <i>Coprinus cinereus</i> 'un 37 °C' daki çimlenme yüzdesi.....	38
Çizelge 4.4. <i>Coprinus cinereus</i> 'un 40 °C' daki çimlenme yüzdesi .....	38
Çizelge 4.5. <i>Coprinus cinereus</i> 'un 41 °C' daki çimlenme yüzdesi .....	39
Çizelge 4.6. <i>Coprinus cinereus</i> 'un 42 °C' daki çimlenme yüzdesi .....	39
Çizelge 4.7. <i>Coprinus cinereus</i> 'un 43 °C' daki çimlenme yüzdesi .....	40
Çizelge 4.8. <i>Coprinus cinereus</i> 'un 44 °C' daki çimlenme yüzdesi .....	40
Çizelge 4.9. <i>Coprinus cinereus</i> 'un 47 °C' daki çimlenme yüzdesi.....	41
Çizelge 4.10. Bazı eşleşme ve uyumluluk sonuçları.....	42

Şekil 1.1. <i>Coprinus cinereus</i> mantarının doğada gelişim biçimleri .....	2
Şekil 1.2. Olgun meyve yapısının görüntüsü .....	4
Şekil 1.3. Lameller üzerinde sporlu veya sporsuz basidiumlar .....	5
Şekil 1.4. Tipik Basidiomycetes ( <i>Coprinus cinereus</i> ) hayat döngüsü.....	6
Şekil 1.5. Kanca yapısının oluşumu .....	8
Şekil 1.6. <i>Coprinus cinereus</i> dikaryonlarının oluşum ve bakımının düzenlenmesinde A ve B tipi çiftleşme genlerinin rolü.....	8
Şekil 1.7. Dikaryon miselin mikroskopik görüntüsü .....	9
Şekil 1.8. Monokaryon miselin mikroskopik görüntüsü .....	9
Şekil 3.1. Meyvelerin yetiştirildiği ortamın iç görüntüsü .....	25
Şekil 3.2. Meyvelerin yetiştirildiği ahşap düzeneğin uzaktan görüntüsü .....	26
Şekil 3.3. Çalışır durumda bir elektroforez düzeneğinin görüntüsü .....	30
Şekil 4.1. 46 °C'da monokaryon misellerin 5. gün sonundaki gelişim durumları.....	33
Şekil 4.2. <i>Coprinus cinereus</i> sporlarının çimlenme yüzdesi.....	37
Şekil 4.3. Eşit koşullar altında misel gelişim hızlarının karşılaştırılması .....	41
Şekil 4.4. Uyumlu bir eşleşmeden görüntü .....	42
Şekil 4.5. Uyumsuz eşleşmelerden görüntü .....	43
Şekil 4.6. 30-37 Dikaryon örneğinin olgun meyve görüntüsü .....	44
Şekil 4.7. Spor yığıntısı ve meyvelerin üstten görüntüsü .....	44
Şekil 4.8. Meyvede şapka gelişim görüntüleri .....	45
Şekil 4.9. Bazı mutant monokaryon örneklerin görüntüsü .....	46
Şekil 4.10. 23 numaralı mutant monokaryon örneğin üstten görüntüsü. ....	47
Şekil 4.11. 3 numaralı mutant monokaryon örneğin görüntüsü .....	47
Şekil 4.12. <i>Coprinus cinereus</i> monokaryon misellerinin protein elektroforez sonucu.....	48
Şekil 4.13. <i>Coprinus cinereus</i> misel ve meyve protein elektroforez sonuçları(I).....	49
Şekil 4.14. <i>Coprinus cinereus</i> misel ve meyve protein elektroforez	

sonuçları(II).....	50
<b>Şekil 4.15.</b> <i>Coprinus cinereus</i> misel ve meyve protein elektroforez	
sonuçları(III).....	51

## **SİMGELER VE KISALTMALAR**

**SDS-PAGE** : Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

**TEMED** : N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin

**CYM** : Complete Yeast Medium

**AMPS** : Amonyum persülfat

***C. cinereus*** : *Coprinus cinereus*

## 1. GİRİŞ

Bazı araştırmacılara göre, mantarlar bitkiler dünyasının bir parçası iken, diğer önemli bir kısmına göre ise, onlar başlı başına ayrı bir dünyadır. Mantarlar, morfolojik yapılarının farklılığı, üreme yapıları, hücre çeperinin varlığı veya yokluğu gibi kriterler dikkate alınarak iki ayrı gruba ayrılır: Myxomycota ve Eumycota.

Myxomycota grubu üyeleri, hücre çeperi olmayan amipsi bir yapıya sahiptirler. Eumycota grubu ise, genellikle filamentli bir yapıya sahiptir.

Eumycota grubu 5 ayrı alt gruba ayrılır: Bunlar Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina ve Deuteromycotina (Fungi Imperfecti) gruplarıdır. Bazı sistematikçiler ise mantarları Eumycetes (gerçek mantarlar), diğerlerini ise Phycomycetes (ilkel mantarlar) olarak sınıflandırılmaktadır (Tuncer, 2001).

### 1.1. *Coprinus cinereus*

*C. cinereus* (Schaeff. Ex Fr.) S. F. Gray, doğal substrat olarak beygir gübresi üzerinde gelişen, *Agaricaceae* familyasının heterotallik koprofil basidiomycetidir. Diğer yenilebilir mantarlardan (*Amanita cesarea*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Coprinus comatus*) farklı olarak, *C. cinereus* insani tüketim açısından belirli bir değere sahip değildir (Bottoli, 2001). Diğer taraftan Şekil 1.1’de, *Coprinus cinereus* mantarının doğadaki farklı gelişim biçimleri gösterilmiştir.





**Şekil 1.1. Coprinus cinereus mantarının doğada gelişim biçimleri; A. Çimlerde (www-1), B. Samanda (www-2), C. Samanda (www-3), D. Dışkı ile zenginleştirilmiş samanda (www-4)**

Kültürü kolay yapılabilen *C. cinereus*, her zaman ve her koşulda mezofilik olarak misel gelişimini gerçekleştirebilir (Schaeffer, J 1774; Gray, 1821). Ortaçağ döneminde, *Coprini*'nin farklı türlerinin meyve yapılarındaki şapka kısmından alınan siyah spor süspansiyonları, yazma işlemi için mürekkep olarak kullanılmıştır. Aslında, *C. cinereus* yaygın bir şekilde *mürekkep şapka* olarak da bilinir (Bottoli, 2001).

Günümüzde, organik bileşikleri (lakkaz ve peroksidaz) parçalayan ve oksitleyen, bazı *C. cinereus* enzimleri, sanayi uygulamalarında kullanılmaktadır. Böyle enzimler çoğunlukla kağıt sanayi, şarap renginin korunması, tekstil boyaları içeren çevresel kirliliklerin detoksifikasyonu, ligninden kimyasalların üretiminde kullanılmıştır. Bir yüzyıldan fazla, bu mantar model mantar olarak laboratuvarlarda önem arz etmiştir. Bu mantar, homobasidiomycetes mantarların gelişim proseslerini çalışmak için kullanılmıştır. Bu mantar, aslında sentetik substratlarda meyve verebiliyor olması ve kültürünün kolayca yapılabilmesi, iki haftalık gibi kısa bir hayat döngüsüne sahip olması, geniş çapta genetik ve moleküler biyolojik tekniklere ve atımlara uygun olması nedenleri ile kullanılmıştır (Bottoli, 2001).

Mürekkep şapka basidiomycetes *C. cinereus* kültür ortamından arıtılmış lakkaz salgılar ve bu enzim tanımlanmış olup üç boyutlu kristal yapısı da belirlenmiştir (Yaver ark., 1999).

**1.1.1. *C. cinereus*'un Gelişimine Çevresel Faktörlerin Etkisi****1.1.1.1. Gelişmeye Işığın Etkisi**

Işık, genelde mantarların hayatını devam ettirebilmesi için mutlaka gerekli olmamakla birlikte eşeyli ve eşeysiz gelişimlerde sıkça pivotal bir rol oynamaktadır. Genellikle mavi ve mor ötesi ışınları daha etkilidir (Bottoli, 2001).

*C.cinereus* için mavi ve mor ötesi ışınlar, karpoforların başlangıç ve süregelen gelişim seviyelerinin ikisi için de gerekli olmaktadır, fakat kısa süreli ışığa maruz kalınması da yeterli olabilmektedir. 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünün, 12 saatlik ışıklı periyodunun ilk 30 saniyesinin olgunlaşmanın başlaması için yeterli olduğu gösterilmiştir. *Coprinus'un* tam olgunlaşması sırasında ışık ve karanlık döngülerinin dört farklı aşamada kritik öneme sahip olduğu belirlenmiştir. Bunlardan, birincisi, ışık etkisinin ardından birincil hif düğümlerin ikincil hif düğümlerine (initials) dönüşmesi sırasında önemli olmaktadır. Aksi halde, yalnızca karanlıkta tutulurlarsa, sklerotia oluşmaktadır (Bottoli, 2001).

**1.1.1.2. Gelişmeye Sıcaklığın Etkisi****1.1.1.2.(1). Meyve Oluşumunda Sıcaklık Faktörü**

*Coprinusun* vegetatif gelişimi için en uygun sıcaklık 37 °C'dir. Optimal meyve (Şekil 1.2) gelişiminde ise yaklaşık 25 °C daha uygun bulunmuştur. Meyve yapıları, genellikle, 10 °C'nin altında ve 30 °C'nin üzerinde gelişmemektedir (Bottoli, 2001).



**Şekil 1.2. Olgun meyve yapısının görüntüsü**

#### **1.1.1.2.(2). Diğer Gelişimlerde Sıcaklık Faktörü**

*C. cinereus* da oidia oluşumu, tüm gelişimlerde gerekli olan 25 ↔ 42 °C aralığında, fakat daha yüksek sıcaklıklarda meydana gelmektedir. Sklerotia üretimi için de, *A. niger*de de olduğu gibi, benzer şekilde daha yüksek bir sıcaklık gerekmektedir. Bir diğer gelişim olayı olan sporların çimlenmesinde ise, kontrol çevre sıcaklığı ile sağlanmaktadır. Farklı türlerde çimlenmenin başlaması için soğuk ve sıcak şoklarının her ikisi de gerekli olabilmektedir (Bottoli, 2001).

#### **1.1.2. *Coprinus Cinereus*'un Hayat Döngüsü**

Basidiomycetes *C. cinereus* hem eşeyli bir şekilde hem de eşeysiz bir şekilde ürer (Bottoli, 2001).

Monokaryonlarda bulunan, oidiofor adı verilen özelleşmiş çok hücreli yapıların uç kısımlarında büyük miktarlarda oidiospor denilen tek çekirdekli eşeysiz sporlar oluşur (Bottoli, 2001).

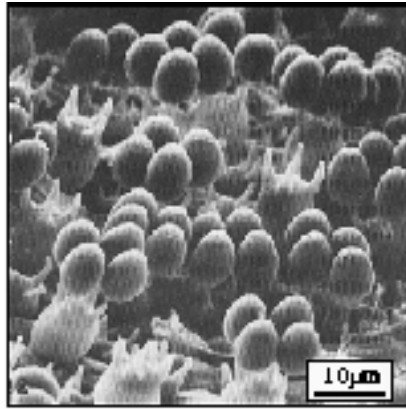
Dikaryonlar gibi bazı monokaryonlarda da klamidiospor denilen başka bir tipte eşeysiz spor üretebilmektedir. Buna ek olarak, her iki tip misel formunda (monokaryon ve dikaryon), yoğun hifsel dallanmaların sınırlandırıldığı alanlar olan hif



düğümlelerinde, üretilen sklerotia denilen çok hücreli dayanıklı yapılar (resting body) bulunur (Bottoli, 2001).

Sporların çimlenmesini takiben, mayoz veya mitozun meydana gelmesi ile monokaryonlar doğar. Bu ilk misel mitotik olarak gelişir, ve böylece substratın yüzeyini zamanla genişleyen bir koloni kaplar. Farklı çiftleşme genlerini (A ve B) taşıyan iki farklı ve birbirlerine uyumlu monokaryonun, anastomosis ile birleşmesi ile, doğurgan bir dikaryon meydana gelir. Bu dikaryonun (ikincil miselyum) her bir hif hücrelerinde genetik olarak birbirinden farklı iki haploid çekirdek ve her bir septumunda kanca yapısında bir hücre bulunmaktadır. Bu kanca yapıları hücrelerin oluşumu, bu dikaryonun her bir hücrelerinde bulunan farklı iki haploid çekirdeğin eşit dağılımlarını sağlar (Bottoli, 2001).

Özel çevresel koşullar, fertil dikaryon meyve yapılarını geliştirme gücünü sağlar. Meyve yapıları içerisinde, şapkanın (pileus) alt kısmındaki dilimler (gills) arasına yerleşmiş basidia denilen özelleşmiş hücrelerde karyogami meydana gelir. Mayozu direkt olarak takiben çekirdek birleşmesi gerçekleşir ve ardından mayotik sporlar (basidiospores) oluşur (Bottoli, 2001). Meyve basidiumlarında mayoz sonucu 4 haploid spor oluşması ile (Şekil 1.3), bir yaşam döngüsü tamamlanmış, bir yenisi başlamış olur (Larraya ve ark., 1999a).



**Şekil 1.3. Lameller üzerinde sporlu veya sporsuz basidiumlar** (McLaughlin ve ark., 1985)

*C. cinereus*'un hayat döngüsünde (Şekil 1.4.), meyve yapısının oluşumu büyüleyici aynı zamanda en karmaşık gelişim sürecidir. Sıcaklık, nem oranı, ışık ve

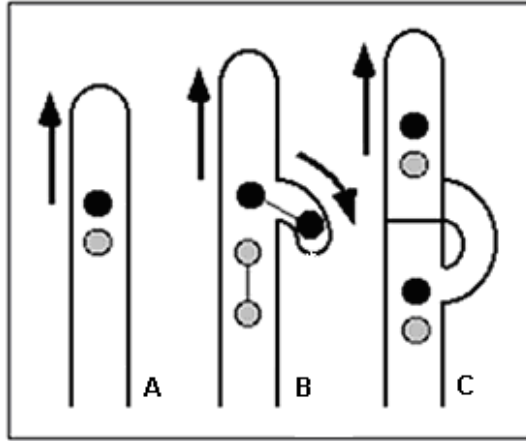


olmaksızın, hif düğümleri küresel (globose) yapılar halinde gelişir ki bu yapılar sklerotia olarak adlandırılır. Uzun süre hayatta kalan bu yapılar, inner medulla ve melanize olmuş kabuktan oluşan bir hif topluluğudur. Hif düğümleri ışığa maruz kaldıklarında, sıkı hif kümeleri halinde gelişir ki bu yapı initial olarak adlandırılır. Sonunda initial hif, aslında meyve embriyonu olan primordium oluşturmak üzere farklılaşır. Bu aşamada, olgun olmayan meyvenin sap ve şapkasını (pilus) meydana getiren yapılar açıkçası güçlükle görülebilir (Boulianne ve ark., 2000). Genellikle, monokaryonlar meyve yapısının gelişimini sürdürmezler.

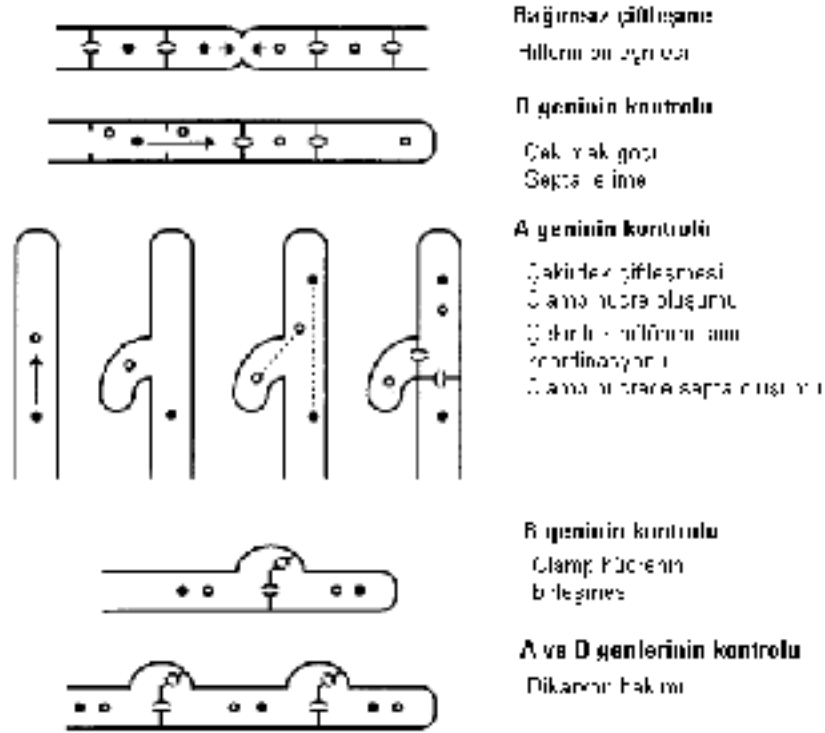
Hif düğümleri karpogenezeye uğramak yerine sklerotia haline olgunlaşır. Oluşum, ışık ve besin koşullarının baskısı ve A çiftleşme genlerinin kontrolü altındadır (Bottoli, 2001).

Kararlı bir dikaryon, yalnızca birbirinden farklı özellikteki çiftleşme bölgelerine sahip iki monokaryonun çiftleşmesi yolu ile oluşur. Bu çiftleşme bölgelerinde görülebilecek nadir mutasyonlar, dikaryonu taklit eden kendine-uyumlu  $A_{mut} B_{mut}$  monokaryonların oluşumunu yönetir. Bu türlü homokaryonlar, kısmen meyve oluşturabilmekte ve meyve gelişimini çiftleşme bölgeleri kontrol eder (Boulianne ve ark., 2000).

Farklı A ve B genlerine sahip uyumlu monokaryonlar bir araya geldiğinde ( $A_x B_x, A_y B_y$ ), B genleri çekirdeksel değiş tokuştan, septanın erimesinden ve karşıt özelliklere sahip miselile doğru çekirdeksel göçten sorumludur. A genleri ise, göç etmiş farklı genetik yapıdaki iki çekirdeğin bölünmesi, kanca (clamp) hücre oluşumu ve mitoz olayı sırasında çekirdek bölünmesinin eş zamanlı halde gerçekleşmesini kontrol eder. Septum (bölme) oluşumunun sonucunda, çekirdekciklerden birisi, kısa bir süre için clamp (kanca) hücresinde tutulur. Yavru çekirdekler arasında enine duvarlar (septumlar) gelişir ve bölünme tamamlanır. Oluşan kanca yapısı aşağıya doğru kıvrılarak hifin alt bölümü ile birleşir; aradaki çeper erir ve kancadaki çekirdek hifin içine girer. B genleri clamp hücresi ile subapikal hücrenin birleşmesine sebep olur (Şekil 1.5 ve Şekil 1.6) (Swiezynski ve Day, 1960).



Şekil 1.5. Kanca yapısının oluşumu (Esser, 1976)



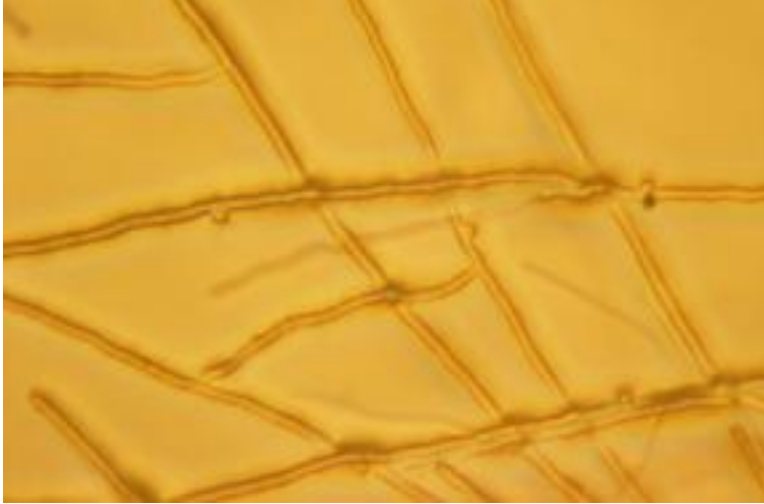
Şekil 1.6. *Coprinus cinereus* dikaryonlarının oluşum ve bakımının düzenlenmesinde A ve B tipi çiftleşme genlerinin rolü (Casselton ve Olesnicky, 1998)

### 1.1.3. Monokaryon Dikaryon Farkı

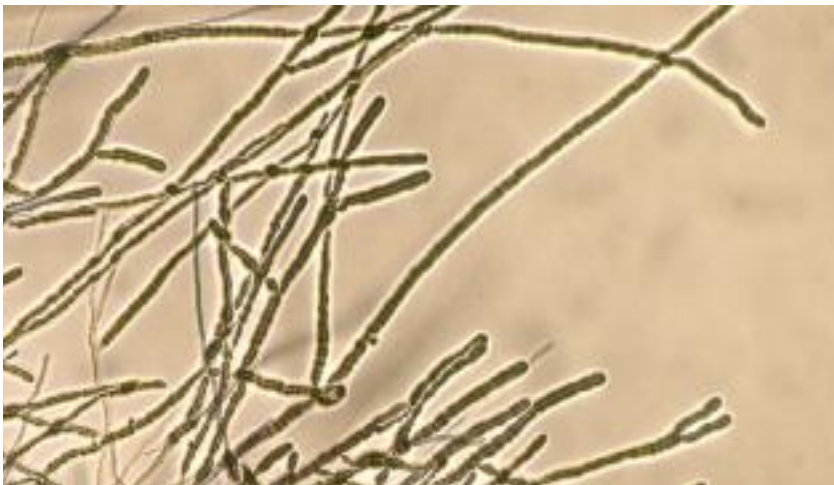
Özel olarak dikaryonlar (Şekil 1.7), monokaryonlardan (Şekil 1.8) farklı olarak haploid çekirdek kopyasını korumak üzere, mitozla üremiş kardeş hücrelere

eşit çekirdek dağılımı görevini üstlenen çengel şeklindeki bir yapıya sahiptir (Casselton ve Olesnicky, 1998; Larraya ve ark., 2001). Bu çengel yapılar, dikaryon miseldeki çekirdeklerden birinin diğerine göre daha fazla görünmesini engeller (Esser, 1976).

Bir hücrede kanca yapısının bulunması, dikaryonun varlığına işaret eder, ancak bu yapıya monokaryonlarda rastlanmaz (Larraya ve ark., 2001). Dikaryotik hücrelerde bulunan iki çekirdek vejetatif gelişme boyunca birleşmez (Larraya ve ark., 1999b) ve bu kanca yapılar sayesinde böylece birleşmeksizin çoğalır (Esser, 1976).



**Şekil 1.7. Dikaryon miselin mikroskopik bir görüntüsü**



**Şekil 1.8. Monokaryon miselin mikroskopik görüntüsü**

#### 1.1.4. *Coprinus Cinereus*'un Diğer Genetik Özellikleri

*C. cinereus*'un da mensubu olduğu homobasidiomycetes grubu mantarların %90'ı heterotallik (kendi ile eşleşemeyen), %10'u homotalliktir (kendi ile eşleşebilen) (Dix ve Webster,1995; Kamada, 2002). Bu yüzden *C. cinereus*'un homokaryon bir suşu uzun sürede meyve verebilmektedir ve de bu mantar füzyon yapmamış pseudoclamp niteliğinde kanca yapısına sahiptir.

Basidiomycetes *C. cinereus*, 38.000 kilobase çift (kb) büyüklüğünde küçük bir çekirdek genomuna sahiptir (Zolan ve Pukkila, 1986). Diğer basidiomycetlerden farklı olarak, *C.cinereus* sadece bir peroksidaz geni taşır (Yaver ve ark., 1999).

A ve B çiftleşme gen çifti, dikkate değer şekilde multialleliktir. *C. cinereus* türünde 12.000'den fazla özel çiftleşme verebilen 160 farklı A lokusu ve 79 farklı B lokusunun varlığı tahmin edilmektedir (O'Shea ve ark., 1998).

Feromon sinyali basidiomycetes mantarlarda çiftleşmede esas rol oynar, fakat *S. cerevisiae*'den farklı olarak *C. cinereus* gibi bazı mantarlarda çiftleşme cazibesindeki rolü hakkında bir kanıt bulunmamaktadır (Riquelme ve ark., 2005). *C.cinereus*'un B faktörü, feromonu kodlayan 6 geni ve feromon reseptörlerini kodlayan 3 geni kapsar (L Casselton, personal communication) (Kronstad ve Staben, 1997).

Ayrıca, *C. cinereus*'u da kapsayan birçok heterotallik basidiomycetes birbirinden bağımsız iki eşleşme tipi kısmına sahiptir (Kües ve ark.,2001; Liu, 2001; Kamada, 2002) ve seksüel gelişme A ve B olarak isimlendirilen bu iki bölümün kontrolü ile gerçekleşir (Kothe, 2001; Kamada, 2002).

## 1.2. ELEKTROFOREZ

Belli bir elektrik yüküne sahip biyomoleküllerin elektriksel bir alanda "sahip oldukları elektrik yüküne bağlı olarak" anod veya katoda göç etmeleri prensibine elektroforez denir (Vesterberg, 1993). Moleküllerin elektriksel alanda göç etmeleri moleküler ağırlık, ortamın pH'sı, kullanılan ayırma ortamının por çapı, sıcaklık,

elektroforez zamanı ve uygulanan akım gibi birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterir (Maniatis ve ark., 1982; Perbal, 1984; Walker ve ark., 1988).

### **1.2.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)**

Poliakrilamid jeller ortamda inisyatör (amonyum persülfat) ve katalizör (TEMED) bulunduğu zaman N-N'-bis akrilamid ile akrilamidin çapraz bağlar oluşturarak polimerizasyonu oluştururlar. Böylece belirli bir por büyüklüğüne sahip çapraz bağlanmış bir matriks meydana gelir. Akrilamid-bisakrilamid oranı çok önemli olup, jelin fiziksel ve mekanik özelliğini büyük ölçüde etkiler. Yüksek jel yüzdeleri küçük porlar oluşturacağından bu tip jeller moleküler ağırlığı küçük proteinlerin separasyonunda kullanılırlar. Örneklerin separasyonu sırasında protein bantlarının daha düzgün olması için polimerizasyondan sonra separating jelin üzerine stacking jel dökülerek tarak yerleştirilir ve örnekler oluşan gözlere uygulanır (Gaal ve ark., 1980).

SDS-PAGE yöntemi en fazla proteinlerin analizi ve özelliklerinin saptanmasında kullanılmaktadır. SDS anyonik bir deterjan olup, proteinlere sıkıca bağlanarak denatüre eder. SDS molekülü bir polipeptit zincirini meydana getiren aminoasitlerin yaklaşık yarısına bağlanır. SDS'in proteine bağlanma özelliği farklı protein konsantrasyonlarında denenmiş ve 1 gr protein için ortalama 1,4 gr SDS kullanılmasının gerektiği saptanmıştır. Protein molekülleri negatif yüklü olduklarından SDS-protein kompleksleri elektroforez ortamında anoda doğru geç ederler. Protein-SDS kompleksleri poliakrilamid jellerde yürütüldükleri zaman jelin elek etkisi nedeniyle farklı büyüklükteki proteinlerin farklı şekilde hareket ettikleri görülür. Bu nedenle SDS ile muamele edilmiş proteinlerin separasyonu protein büyüklüğündeki farklılığı yansıtır. Bu özellikler dikkate alındığında SDS jel elektroforez yönteminin moleküler ağırlıkları bilinmeyen proteinlerin analizleri için uygun bir yöntem olduğu belirtilmiştir (Weber ve Osborn, 1969).

Proteinlerin moleküler ağırlıklarının araştırılması moleküler ağırlıkları bilinen standart proteinler kullanarak elektroforez ortamındaki hareketlerinin karşılaştırılması ile hesaplanır (Weber, 1972; Podulso, 1980; Walker ve ark., 1988).

SDS-PAGE elektroforezinden sonra protein bantlarının ortaya çıkarılması amacı ile kullanım alanı bulmuş birçok yöntem mevcuttur. Bunlar içerisinde en fazla kullanılan, bantların boyandıktan sonra değerlendirilmesidir ve bu amaç için en uygun ve hassas olanları Coomassie Brilliant Blue (CBB) R250 ve Gümüş Boyama yöntemleridir. CBB R250 ile boyanmış bantlarda yaklaşık 0,2-0,5 µgr düzeyinde protein miktarı kolaylıkla saptanabilmektedir (Anderson ve ark., 1991; Granzier ve Wang, 1993; Küntzer ve ark., 1994).

Basidiomycetes mantarı olan *C. cinereus* hakkında bugüne kadar çok sayıda araştırma çalışması yürütülmüştür, ancak bunların çimlenme yüzdesi, çimlenme üzerine sıcaklığın etkisi, misel ve meyvelerinin protein yapılarının analizi ile ilgili çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, bir Basidiomycetes mantarı olan *C. cinereus* sporlarının maksimum çimlenme sıcaklığı, normal ve yüksek sıcaklıkta gelişmiş misel ve meyvelerin protein kombinasyonları karşılaştırılarak bunlarda sıcaklığa dayanıklılığı ifade eden protein yapıları araştırılacaktır. Elde edilen bulguların laboratuvar ve endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliği tartışılacaktır.



**2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Chang ve Chu (1969), Güney-Doğu Asya'da yaygın olarak bulunan ve yenilebilir bir straw mantarı olan *Volvoriella volvaceae* ile basidiosporun çimlenmesi üzerine, çevresel faktörlerin etkisini araştırmışlardır. Sporların çimlenebilmesi için en uygun sıcaklığın 40 °C olmasına karşın, erken hifsel gelişimlerin 35 °C'da daha iyi olduğu belirlenmiştir. Sporlarının çimlenmesinin, sıcaklık, pH, ilk ıslatma uygulamaları ve spor yoğunluğu faktörlerinden etkilendiği tespit edilmiştir. pH değerinin yüksekliği çimlenmeyi olumlu etkilese de, erken miselyal gelişimi için pek de uygun olmadığı anlaşılmıştır. Fosfat tamponu veya destile su ile yapılmış olan ilk ıslatma uygulamalarının da çimlenmeyi dikkat çekecek kadar iyi tetiklediği anlaşılmıştır.

Leighton ve Stock (1970), *Microsporum gypseum* mantarını kullanarak, mantar sporülasyonunu ve sporların çimlenme sırasında uğradıkları biyokimyasal değişimleri araştırmış; bunun için sporları çimlendirmek üzere *M. gypseum* mantarını, iki farklı sıcaklıkta (25 °C ve 37 °C), içerisinde 5 ml'lik besi ortamı bulunan 50 ml'lik erlenlere inoküle etmiş; çimlenmeleri için de bu erlenleri, 125 devir/dakika hızla çalışan çalkalayıcı su banyosuna aktarmışlardır. Gelişmiş hif yapıları, cam boncuklarla parçalanmış, ardından santrifüjlenmiş; spor ceketini ile hif duvarı örnekler, yüksek voltajla çalışan bir elektroforez işlemi ile saflaştırılmış ve sonrasında da hidrolizlenmiştir. Bu işlemlerin ardından protein yapıları ve proteaz aktiviteleri kontrol edilmiştir. Üst fazlarda alkalik proteaz varlığı saptanmış ve saflaştırılmış, ardından fenil metil sülfonil florür (PMSF) ile muamele edilmiştir. Daha önceden de rapor edildiği gibi, çimlenmenin endojenik aşamalarında, inkübasyon sıcaklığının 37 °C'a yükseltilmesi ile proteaz aktivitesi artmaksızın 25 °C'da %30 olan çimlenme yüzdesinin %90'a kadar yükseldiğini tespit etmişlerdir.

Sheridan ve Yen (1970), *Dothistroma pini*'den izole ettikleri konidiaların çimlenmesinde sıcaklık ve bağıl nemin etkisini araştırmışlardır. Konidiaların 5-30°C aralığında çimlendiği ve optimum çimlenme sıcaklığının ise 17 °C olduğu belirlenmiştir. Bağıl nemin %100 ile %96'nın olduğu aralıkta çimlenmenin başlaması için sıvı suyun mutlaka gerekli olmadığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra,

17 °C’de %98-100 arasındaki nem değerlerinde iyi bir çimlenmenin meydana geldiğini ve %76 gibi düşük bir nem oranında dahi birkaç konidianın çimlendiğinin gözlemlendiğinden bahsedilmektedir.

Braun (1971), *Fuligo septica* ile ilgili yaptığı çalışmada üniversite kampus alanında birbirlerine 50 ayak mesafede bulunan 6 farklı aethalia’yı üretilen ürününü toplamıştır. 6 farklı aethalia’nın farklı 4 bölgeden alınmış en fazla 1 günlük sporların çimlenme süreleri ve mm<sup>3</sup> ‘teki spor sayıları saptanmış ve sonuçlar, pH ve sıcaklık gibi faktörlere bağlı olarak irdelenmiştir. Sporlar her denemede, 4 ml %0,5 TSP solüsyonunda birkaç dakika süreyle ıslatılmış, 4000 rpm’de bir dakikalığına santrifüjlenmiş ve üst fazı atıldıktan sonra sporların üzerine 2 ml destile su eklenmiş ve böylece kullanıma hazır hale getirilmiştir. 2 saat içinde çimlenmeyen 2 aethalia örneği dışında kalan diğer örneklerin hepsine ait sporların 35 ile 92 dakika arasında çimlendiklerini belirlemişlerdir. Ayrıca tek bir aethaliumdan alınan tüm sporların, çimlenme zamanları farklı olsa da, ortalama sürenin 10 dakika olduğu saptanmıştır. Sporların varlıklarını sürdürebilmesinin, fruktifikasyon oluşumu sürecindeki bazı şartlar ve ayarlamalar kadar, aethaliumun yaşına da bağlı olduğunu belirlenmiştir.

Calpouzos ve Chang (1971), mor ya da kırmızı ötesi ışınların mantar sporları (üredospor) çimlenmesini nasıl etkilediğini, buğday-kökü pas mantarı olan *Puccinia graminis tiritici* ile çalışmışlardır. Buğday tohumlarından toplanmış olan üredo sporlarını, mm<sup>2</sup>’de 25-50 olacak şekilde %1-3 sulu agarlı besi ortamına inoküle etmişlerdir. Sporları barındıran Petri kutularında biri normal iken diğerinin dış yüzeyi siyah renkle kaplanmış olarak, oda sıcaklığında (22±1 °C) radyasyon işlemine tabi tutulmuş ve 2 saat boyunca bekletilmiştir. Siyah renkle kaplanmış olan Petrielerde bulunan sporların %50 oranında daha fazla çimlendiğini; ayrıca 450-603 nm dalga boyu aralığındaki ışınların mantar sporlarının çimlenmesini hemen hemen etkilemediğini saptamışlardır. 5-10 dakika arası 720 nm’lik kırmızı ötesi ışınlar maruz bırakılmış ve ardından 2 saat boyunca karanlıkta bırakılan sporlarda çimlenmenin engellenmediği tespit edilmiştir.

Towill (1978), *Onoclea sensibilis* sporlarının çimlenmesini, sıcaklık ve ışık şiddetine bağlı olarak incelemiştir. Ekiimleri sonrası karanlıkta (ve 30 °C’lık sıcaklıkta) sporların, maksimum çimlenme yüzdesinin %60-95 değerlerine

ulaşmasına yalnızca doyurulmuş kırmızı ışığın (0,38 joules/square meter) güçlü bir etkisinin olduğunu saptamıştır. Maksimum karanlık çimlenmenin, 30 °C'da ve en az 16-24 saatlik bir sürede meydana gelmesi, her defasındaki bu sıcaklık uygulamasının çimlenme prosesinden daha çok çimlenmeye neden olunması ihtiyacını göstermiştir. Sıcaklık ve ışık etkileşiminin neden olduğu çimlenmenin, katkısız olduğunu göstermiştir. Sporların karanlık ve 25 °C'da inkübasyonunun ardından ilk 12 saat veya daha uzun bir süre boyunca kırmızı ışığı emmesi, 30 °C'da sıcaklığa olan hassaslıklarını azaltmıştır.

Thevelein ve ark. (1979), *Phycomyces blakesleeanus* mantarı sporangiosporlarının ısı aktivitesini belirleyen termodinamik parametreleri çalışmışlardır. Aktifleştirme, pH değeri 6,5 olan 0,1 molarlık fosfat tamponu içerisinde yürütülmüştür. En fazla 14 günlük sporların kullanıldığı bu çalışmada, 50 °C'da 3 dakikalık ısı aktivasyonunun ardından genellikle %90'ın üzerinde bir çimlenme olduğu saptanmıştır. *P. blakesleeanus* sporlarının hem aktivasyon sıcaklığı hem de sıcaklığa dayanıklılığının *n*-alkoller (metanolden oktanole kadar), phenetil alkol ve furfural tarafından düşürüldüğü saptanmıştır.

Singh ve Agrawal (1982), *Chrysosporium crassitunicatum*, *Nannizzia fulva* (+), *Nannizzia fulva* (-) ve *Trichophyton equinum* sporlarının çimlenmesini, çeşitli karbon ve azot kaynaklarına bağlı ve bunun yanında da spor çimlenmesi üzerine sıcaklığın etkisini de birlikte araştırmışlardır. Tüm test mantarlarında karbon kaynağı olarak glükoz kullanılmış ve maksimum spor çimlenmesinin 24 saat içinde sağlandığını belirlemişlerdir. Spor çimlenmesi sırasında, sodyum nitrat haricindeki tüm diğer inorganik azot kaynakların derişimi, %0,05 daha fazla arttırarak alınmıştır. Ayrıca birçok organik azot kaynağının test mantarlarının spor çimlenmesi üzerindeki etkisi de belirlenmeye çalışılmıştır. Tüm test mantarlarında, 24 saat içinde, karbon destekli maksimum spor çimlenmesi için optimum sıcaklığın 28 °C olduğu belirlenmiştir. *Chrysosporium crassitunicatum*, *Nannizzia fulva* (+), *Nannizzia fulva* (-) mantarlar sporlarının 35 °C'ye kadar çimlendiğini, ancak daha yüksek sıcaklıklarda çimlenemediğini belirlemişlerdir.. *T. equinum*'un ise, 40 °C'ın üzerindeki sıcaklıklarda da çimlenebildiğini, ancak çimlenme yüzdesinin oldukça düşük olduğu saptamışlardır.

Kalmış ve Kalyoncu (2006), *Lentinus edodes* mantarına ait basidio sporlarının çimlenme süreleri ve misel gelişimi üzerine farklı kültür ortamlarının etkisini araştırmışlar;  $25 \pm 1$  °C sıcaklıkta 21 gün süren herbiri çalışma aşamasında, ilk olarak üç farklı şapkadan alınan basidiosporları, dört farklı agar besiyerine (CYM, MEA, PDA ve WA besiyerleri) aktarılmış (I. Aşama) ve bu kültür ortamında çimlenmiş olan basidio sporları misel gelişim hızlarını karşılaştırmak amacıyla patates dekstroz agar (PDA) ortamına aktarılmış ve ardından yeniden inkübasyona bırakılmıştır (II. Aşama). Tüm basidiosporlarının kültür ortamlarında 5-10 günlük süre içerisinde çimlenmiş olduğu, fakat bunlardan su-agar ortamına aktarılanların diğer kültür ortamlarında gelişenlere göre 1-2 gün daha geç çimlendiğini saptamışlardır. Çimlenmiş basidio sporlarının 15. ve 21. günlerde misel gelişim hızlarını ölçmüş ve daha önceden PDA ortamında çimlenmiş olanlarının daha hızlı bir gelişim gösterdiğini saptamışlardır.

**3. MATERYAL VE METOD****3.1. Materyal****3.1.1. Mantar**

Bu araştırmada kullanılan *C. cinereus* örnekleri, Çukurova Üniversitesi Balcalı Yerleşkesinin Ziraat Fakültesi Uygulama Çiftliği Ahırlarının bulunduğu bölgeden toplanmış ve elde edilmiş olan sporları da kuru halde buzdolabında muhafaza edilmiştir.

**3.1.2. Besi yerleri****3.1.2.1. CYM – Complete Yeast Medium** (Elliott ve ark., 1986)

<b>Bileşimi</b>	<b>Miktarı [g/l]</b>
Glikoz	20
Pepton	2
Maya ekstraktı	2
Dipotasyum hidrojenfosfat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1
Potasyum dihidrojenfosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,46
Magnezyum sülfat (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,50

Not: pH = 7,4-7,5 olacak şekilde ayarlandıktan sonra besi yeri otoklavda 121 °C de 15 dakika steril edilmiştir.

Katı Besi yeri hazırlanırken bu besi yerine 20 g/l düzeyinde agar ilave edilmiştir.

### 3.1.2.2. At Gübresi Besi yeri (Esser, 1976)

1 lt'lik cam şişelere, dağılmamış halde bulunan at gübresi yaklaşık 4-5 cm kalınlıkta olacak şekilde konmuş ve üzerine hafifçe bastırılıp sıkıştırıldıktan sonra bir miktar çeşme suyu eklenmiştir. Otoklavda 121 °C de 1 saat steril edilmiş ve oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır.

### 3.1.3. Deneylede Kullanılan Solüsyonlar

**Çizelge 3.1. Parçalama solüsyonu** (Rybicki ve Purves, 1996)

Kimyasal	Derişimi
Tris-HCl (pH = 6,8)	25 µM
Merkaptoetanol	% 10
SDS	% 10
Gliserol	% 10
Brom-fenol mavisi	50 µl

**Çizelge 3.2. SDS-PAGE stok solüsyonları ve hazırlanışı** (Bollag ve Edelstein, 1991)

Stok Solüsyonları	Hazırlanışı
Tris-HCl, 2 M	24,2 gram Tris tartılır, 50 ml destile suda çözülür, derişik HCl ile pH = 8,8'e ayarlanıp destile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
Tris- HCl, 1 M	12,1 gram Tris tartılır, 50 ml destile suda çözülür, konsantre HCl ile pH = 6,8'e ayarlanıp destile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
SDS (% 10)	10 gram SDS tartılıp destile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
Gliserol (%50)	50 ml %100'lük gliserol alınıp destile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
Bromfenol mavisi (%1)	100 mg Bromfenol mavisi tartılıp, 10 ml destile su içinde çözülür.

**Çizelge 3.3. SDS-PAGE çalışma solüsyonları ve hazırlanışı** (Bollag ve Edelstein, 1991)

Çalışma Solüsyonları	Hazırlanışı
Solüsyon A %30 akrilamid %0,8 bisakrilamid (100ml)	29,2 gram akrilamid ve 0,8 gram bisakrilamid tartılıp destile su ile 100 ml'ye tamamlanarak çözülür. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon B (4x) (100ml)	2 M Tris-HCl (pH = 8,8) 75 ml, %10'luk SDS 4 ml, destile su 21 ml. Buzdolabında saklanır.
Solüsyon C (4x) (100ml)	1 M Tris-HCl (pH = 6,8) 50 ml, %10'luk SDS 4 ml, destile su 46 ml. Buzdolabında saklanır.
Amonyum persülfat % 10'luk (5 ml)	0,5 gram amonyum persülfat tartılıp destile su ile 5 ml'ye tamamlanır.
Elektroforez Tamponu (1L)	Tris (25 µM) 3 gram, glisin (192 mM) 14,4 gram, SDS (% 0,1) 1 gram tartılıp destile su ile 1 L'ye tamamlanır. pH = 8,3
ÖrnekTamponu (5x) 10ml	1 M Tris-HCL (pH = 6,8) 0,6 ml, %50 Gliserol 5 ml, %10 SDS 2 ml; 0,5 ml 2-merkaptolanol, %1 Bromfenol mavisi 1 ml; 0,9 ml destile su. Buzdolabında saklanır.

**Çizelge 3.4. Ayırıcı jelin bileşimi (%10'luk)** (Bollag ve Edelstein, 1991)

Solüsyon A (Stok)	6,5 mL
Solüsyon B (Stok)	5 mL
Destile su	8,4 mL
Amonyum persülfat	66 µL
TEMED	13 µL

**Çizelge 3.5. Dengeleyici jelin bileşimi (% 4,5'lik)** (Bollag ve Edelstein, 1991)

Solüsyon A (Stok)	1,5 mL
Solüsyon C (Stok)	2,25 mL
Destile su	5,25 mL
Amonyum persülfat	30 µL
TEMED	7,5 µL

**Çizelge 3.6. Coomassie Brilliant Blue boyası stok solüsyonu (1L)** (Bollag ve Edelstein, 1991)

Coomassie Brilliant Blue R-250	1 gram
Metanol	450 ml
Glasial asetik asit	100 ml
Destile su	450 ml

**Çizelge 3.7. Boyayı geri alma solüsyonu (1L)** (Bollag ve Edelstein, 1991)

Metanol	100 ml
Glasial asetik asit	100 ml
Destile su	800 ml

### 3.1.4. Kimyasal Maddeler

Çalışmalarda etken maddesi amoksisilin olan alfoxil (1 gr 1 flakon) antibiyotiği (2 mg/ml derişimindeki stok çözeltiden) kullanılmıştır.

TEMED çözeltisi (= N,N,N',N-tetrametilen-etilendiamin),  $\beta$ -merkaptotanol, SDS, AMPS, Glacial Asetik Asit, Tris-HCL, Brom Fenol Mavisi ve metanol kullanılmıştır. Proteinmarker olarak ise 66 kDa'luk sığır albümini (1.12018 Merck) kullanılmıştır.

## 3.2. Metod

### 3.2.1. Meyvelerin Toplanması ve Sporlarının Stoklanması

Adana yöresindeki bir çiftlikten toplanmış *C. cinereus* meyveleri laboratuvar ortamına getirilmiştir. Temiz eldiven giyilerek tutulan meyveler, hafif hafif sarsılarak sporlarının steril Petri kutusuna dökülmesi sağlanmıştır. Petri kutusunda biriken spor yığıntısı, steril bir bistüri yardımı ile temiz Eppendorf tüplerine aktarılmıştır.



Kapakları kapatılan bu tüpler, daha sonraki araştırma çalışmalarında kullanılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.

### 3.2.2. Monokaryonların Tespit Edilmesi

*C. cinereus* monokaryonlarının elde edilmesinde sırası ile aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

1. Öze ile bir miktar spor toplanmış ve öze, içinde steril su bulunan bir diğer tüpe daldırılmış, sporların bu tüpe aktarılması sağlanmıştır.
2. Spor bulunan tüp Vorteks cihazı ile karıştırılarak karışım homojen hale getirilmiştir.
3. İçlerinde antibiyotikli CYM besi yeri bulunan iki Petri kutusuna steril bir pipet yardımı ile homojen spor süspansiyonundan birer damla (0,05ml) eklenmiş ve steril bir bagele tüm yüzeye homojen şekilde yayılması sağlanmıştır.
4. Petri kutularının ağzı bir streç film ile kapatıldıktan sonra çimlenmek üzere sporlar 37 °C de 24 saat inkübe edilmiştir.
5. Mikroskop altında incelenen Petri kutularında, tek bir spordan üreyen tek koloninin bulunduğu bölgeler, bölgede başka sporun olmadığından kesin olarak emin olunduktan sonra işaretlenmiştir.
6. Daha sonra steril kabin içerisinde, işaretli bölgelerde gelişmiş tek spor kaynaklı monokaryon miseller bistüri yardımı ile kesilerek alınmış ve yeni hazırlanmış antibiyotikli CYM besi yerlerine, tek spordan gelişen misel parçacıkları ayrı ayrı ekilmiştir.
7. Ekilmiş olan bu Petri kutuları, 37 °C da gelişmeye bırakılmış ve miseller, bir-iki gün içinde ve daha sonraları da tüm Petri kutusunu kaplamadan mikroskop altında kontrollü bir biçimde incelenmiştir.
8. İçlerinde monokaryon olanların, kesin olarak belirlenmesinden sonra, ayrı Petri kutularında gelişen bu miseller buzdolabında saklanmıştır.

**3.2.3. Monokaryon Misellerin Stoklanması**

Tek bir sporun çimlenmesiyle elde edilen misel, CYM (Complete Yeast Medium) agarda +4 °C de (buzdolabında) stok kültür şeklinde saklanmıştır.

**3.2.4. Thoma Lamında Spor Sayımı ve Maksimum Çimlenme Sıcaklık Testleri****3.2.4.1. Thoma Lamında Spor Sayımı**

Belli bir hacimdeki spor sayısının saptanması için kullanılan Thoma lamında sayım yöntemi kullanılmıştır. Thoma lamının esası 0,1mm<sup>3</sup> hacimde sayım yapılmasıdır.

Lamin çukur kısmına örnek damlatılır ve lamel kapatıldığında bu çukurda 0,1 mm yüksekliğinde bir sıvı kalmış olur. Sayım yapılacak alan cam yüzeyindeki çizgilerle belirlenmiştir. Lamel konduktan sonra üzerine bastırılarak lamin çukuru dışında kalan düz kısımla lamel arasında bir sıvı katmanının kalması önlenmiştir. Böylece çukur alan içinde tam olarak 0,1 mm yüksekliğinde sıvı bulunması sağlanmış olur.

Thoma lamında 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır ve sayım bu karelerde yapılmıştır.

Küçük kare olarak belirtilen gerçekte bir kare prizmadır ve derinlik boyutu 0,1 mm'dir. Hacimide  $0,05\text{mm} * 0,05\text{mm} * 0,1\text{mm} = 1/4000 \text{ mm}^3$  olarak hesaplanmıştır. Bu sayım alanında  $16*25 = 400$  küçük kare olduğuna göre sayım hacmi  $1/4000\text{mm}^3*400 = 0,1\text{mm}^3$ 'dür.

Thoma lamında sayım  $A*SF*10000$  formülü ile hesaplanır. Burada  $A = 16$  büyük karede sayılan spor adedi, SF ise seyreltme faktörüdür. 10000 ise 0,1 mm<sup>3</sup>'lük alanda bulunan spor adedinin 1ml de ne olduğunu saptamak içindir (Gürgün ve Halkman, 1990).

**3.2.4.2. Maksimum Çimlenme Sıcaklık Testleri**

Maksimum çimlenme için uygun olan sıcaklığın saptanması amaçlanmıştır. Bu testlerde  $10^3$ 'e yakın sayıda sporla çalışmak hedeflenmiştir. Bu testlerde sırası ile aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

1. Deney tüplerine 9 ml saf su eklenmiş, sonra otoklavda 1,2 atm'de 15 dakika steril edilmiştir.
2. Kullanılmak üzere önceden hazırlanan ve Eppendorf tüplerinde korunan kuru mantar sporu stoklarından minimal sayı içerecek kadar mantar sporu dikkatli bir şekilde alınarak içerisinde saf su bulunan steril deney tüplerine taşınmıştır.
3. Bu şekilde hazırlanan karışım sonra Vorteks cihazı yardımı ile homojen bir süspansiyon haline getirilmiş; böylece az miktarda spor içeren homojen bir süspansiyon elde edilmiştir.
4. Homojen spor süspansiyonundan pipetle bir damla örnek Thoma lamı üzerine damlatılmış, sonra üzeri bir lamelle kapatılarak mikroskopta sayım işlemleri gerçekleştirilmiştir. 400 küçük kareden oluşan tüm sayım alanında ( $0,1\text{mm}^3$ ) 1-2 sporun bulunması hedeflenmiş ve  $A \cdot SF \cdot 10000$  formülüne göre de, bir damlada (0,05 ml) 500-1000 sporun bulunduğu anlaşılmıştır. Beklenenden fazla sayıda spor bulunması halinde ise, seri sulandırma işlemi ile sporlar  $10^{-1}$  oranda seyreltilmiş ve ortalama 1000'e yakın spor hesaplanmış ve bir sonraki aşamaya geçilmiştir.
5. Bir damlasında yaklaşık 500-1000 spor içeren bu çözüldüden, steril pipet yardımı ile 1 damla (0,05 ml) örnek alınarak içerisinde CYM besi yeri (antibiyotikli) bulunan Petri kutularına (3 adet) eklenmiş; steril bir baget ile besi yerinin yüzeyine yayılmıştır.
6. Bu şekilde hazırlanan Petri kutularının ağızları sıkıca kapatılarak çimlenmesi için ilk önce  $37^\circ\text{C}$  da gelişmeye bırakılmıştır.
7. Petri kutuları 24 saat sonra, bir cetvel yardımı ile düzgün bölgelere ayrılmıştır.

8. Bu şekilde mikroskopla tarama ve sayım işlemleri için hazır hale getirilen Petri kutularının, çimlenen ve çimlenmeyen spor sayıları belirlenmiş; böylece. 37 °C'da 24 saat içinde gelişen sporların çimlenme yüzdesi bulunmuştur.

9. Bu yüzde çimlenme hesabı, her bir Petri kutusu için 3 kez tekrarlanarak 37 °C için ortalama çimlenme yüzdesi, 3 adet Petri kutusunda çimlenen sporların toplam sayısının toplam spor sayısına (çimlenen spor sayısı + çimlenmeyen spor sayısı) oranlanmasıyla hesaplanmıştır.

10. Bu işlemler 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C ve 47 °C için de tekrarlanmıştır.

### **3.2.5. Eşleşme Testi**

Eşleşme testinde amaç; meyve verebilme yeteneğinde olan, birbiriyle uyumlu monokaryon çiftlerin tespit edilmesidir. Uyumlu olan monokaryon çiftler ve uyumsuz olan monokaryonlar protein elektroforezi için kullanılacaktır. Eşleşme testi aşağıdaki gibi yapılmıştır;

1. Çapı 9 cm olan Petri kutularında CYM besiyerleri (antibiyotikli) hazırlanmış ve stoklardan aktarılan misel 37 °C'de gelişime bırakılmıştır.

2. Steril kabinde, steril edilmiş 0,7 cm çaplı silindirik bir metal boru ile Petri kutularındaki miselden örnek alınmıştır.

3. Metal boru ile kesilerek alınan parça yeni bir besi yerine aktarılmıştır.

4. Aynı işlemlerle alınan diğer monokaryon misel kesitleri, merkeze ve birbirlerine aynı uzaklıkta olacak şekilde düzenli bir biçimde ekilmiştir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, merkeze ve bunu çevreleyen alanlara ekim yapılırken simetrisinin korunması ve kenarlara çok yakın olunmamasıdır.

5. Ekim işleminden sonra Petri kutuları, 37 °C de gelişime bırakılmıştır.

6. Besi yerinde gelişen misellerin birbiriyle temas ettiği bölgeler mikroskop altında incelenerek connection clamp denilen kanca yapılarının oluşup oluşmadığı gözlemlenmiştir (Aralarında kanca yapıları oluşturan monokaryonlar uyumludur).

**3.2.6. Meyve Oluşum Kontrolü ve Monokaryon Testleri**

Meyve oluşum kontrolünde amaç, uyumlu bir şekilde eşleşmiş monokaryon çiftlerin gerçekten meyve verip vermediklerinin saptanmasıdır. Meyve verme ile sonlanan eşleşmeler, bu monokaryon çiftlerin gerçekten uyumlu olduklarının kesin bir göstergesi olamamaktadır, çünkü mutant monokaryonlar da meyve verebilmektedir. Bu yüzden, monokaryonların da meyve verip veremedikleri araştırılmıştır.

Meyve oluşum kontrolü testinde, uyumlu meyve verebilme yeteneğinde olan monokaryon çiftlerin, daha önceden CYM besi yerinde (antibiyotikli) geliştirilen misellerinden, dörder cm<sup>2</sup>'lik karesel kesitler, steril bir şekilde alınmıştır. Steril bir şekilde hazırlanan at gübresi besi yerlerine, aralarında 5 cm mesafe olacak şekilde karşılıklı olarak ekilmişlerdir.

At gübresi besi yeri bulunan cam kaplar (kavanozlar), 4-5 günlük süre ile (kavanozun her yanını kaplayıncaya kadar) 37 °C da karanlık bir etüv içinde bekletilmiştir. Misellerin tüm besi yerini kaplamasından sonra, mantarın meyve verebilmesi için kavanozlar, aydınlık olan ve 27 °C'a ayarlı bir ahşap düzenek (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2) içerisinde bekletilerek gelişimleri incelenmiştir (Hamada ve ark., 2002).



**Şekil 3.1. Meyvelerin yetiştirildiği ortamın iç görüntüsü**



**Şekil 3.2. Meyvelerin yetiştirildiği ahşap düzeneğin uzaktan görüntüsü**

Monokaryon testindeki asıl amaç; meyve yapabilme yeteneğinde olan mutant monokaryonların olup olmadığının araştırılmasıdır. Bu testte tek bir monokaryon ile çalışılmıştır.

Meyve oluşum kontrolünde yapılan uygulamaların tümü aynı şekilde burada da tekrarlanmıştır. Burada beygir dışkı besiyerine ekilen monokaryon misel 37 °C'da 5 gün, meyve gelişimi içinse 27 °C'da 7 gün bekletilmiştir. Meyve oluşumunun olup olmadığı aydınlık evrenin başından itibaren takip edilmiş ve meyve oluşturanlar kaydedilmiştir (Hamada ve ark., 2002).

### **3.2.7. Monokaryon Misellerin Yüksek Sıcaklığa Dayanıklılık Testleri**

43 farklı monokaryon misel örneğinin kullanıldığı bu işlem sırasıyla aşağıdaki gibi uygulanır;

1. Her bir örnek, Petri kutularında hazırlanmış olan CYM besiyerinin tam merkezine 0,7 cm çaplı dairesel kesitler halinde ekilmiştir.
2. Ekim işleminden sonra Petri kutuları, 43 °C de gelişime bırakılmıştır.

3. İnkübasyon sürecinin başlama anından itibaren 2., 4., 6., 7. günlerde gelişim hızları tespit edilmiş ve bu süreç bir hafta devam etmiştir. Gelişim hızları bir cetvel ile misel çapının ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir.

4. 43 °C için yapılan işlemler, bu defa 46 °C için tekrarlanmış; yalnız bu aşamada gelişim hızı yavaşladığı için ölçümler 12. güne kadar sürmüştür.

### **3.2.8. Protein Ekstraksiyonu için Örneklerin Hazırlanması**

Protein ekstraksiyonu için gerekli olan monokaryon ve dikaryon misel örnekler, sıvı ve katı CYM besiyerlerinde geliştirilmek suretiyle elde edilmiştir (Not: Elektroforez deneylerinin hiçbir aşamasında antibiyotikli besi yeri kullanılmamıştır). 11 adet monokaryon misel ve 3 adet de dikaryon misel olmak üzere toplam 14 çeşit misel örnek, Petri kutularının merkezine ayrı ayrı ve 1 cm ebatlarında kare kesitler halinde ekilmiştir. 37 °C de bir hafta kadar gelişmeye bırakılan örnekler, bu süre sonunda tüm Petri kutusunu saracak kadar gelişmiştir. Aynı örnekler, sıvı CYM besi yeri içeren deney tüplerine, 2-3 adet mini kare kesitler ( $\leq 0,5$  cm) halinde ekilmişler ve bir hafta süre ile etüvde yatık vaziyette inkübasyona bırakılmıştır. Besi yerini tamamen sarmış durumdaki misel örnekler, ekstraksiyon işlemlerinde kullanılmak için hazır hale getirilmişlerdir.

Eşleşme testleri sonucunda, uyumluluğu tespit edilen 3 farklı dikaryon örneğin, misel örneklerinin yanı sıra meyve örnekleri de protein ekstraksiyonu için kullanılmıştır.

Protein ekstraksiyonu için gerekli meyve örneklerinin sağlanması için, içinde 3-4 cm kalınlığında beygir dışkısı bulunan cam kaplar (kavanoz), otoklavda 1 saat boyunca 1,2 atm basınç altında steril edilmiştir.

Kavanozların merkezine, Petri kutusunda önceden geliştirilen miselden bir parça ekilmiştir. 37 °C de 4-5 gün süre ile karanlık bir evrede hızla gelişim geçiren örnekler, daha sonra meyve oluşumu için, 27 °C sabit sıcaklığa ayarlanmış ahşap bir düzenek içinde, 4-5 gün süreyle ardışık olarak 12 saat aydınlık-12 saat karanlık evrelere tabi tutulmuştur (Hamada ve ark., 2002).

**3.2.9. Protein Ekstraksiyonu**

Bu amaçla, Petri kutularında gelişimini tamamlamış olan misel kitleleri, besi yerinden, steril bir tahta çubuk yardımı ile titizce sıyrılarak alınmıştır. Sıvı besi yerindeki misel kitlesi, ortamdaki sıvının uzaklaştırılmasından sonra bir çubuk yardımıyla tüpten toplanmıştır. Meyve örnekleri yine steril bir penset yardımıyla hasat edilmiştir.

Ekstraksiyon işlemleri için her bir örnek, yağ ağırlığı 1 gram olacak şekilde bir hassas terazide tartılmış ve havana aktarılmıştır. Bu misel ya da meyve örnekleri üzerine, 1 kepçe sıvı azot eklenmiş ve örnekler ezilmiştir. Bu işlem yaklaşık 2-3 defa tekrarlanmıştır. Homojenize edilmiş örnek üzerine 1,5 ml (Brom-Fenol Mavisini içeren) parçalama (Çizelge 3.1) solüsyonu eklenmiştir. Havadaki örnek, parçalama çözeltisi ile yeterince yıkanmış ve karıştırılmıştır. Karışım, daha önceden hazırlanmış olan temiz eppendorf tüplerine aktarılmış ve etiketlenmiştir.

Örnekler steril Eppendorf tüplerinde, derin dondurucuda -30 °C'da 5 dakika ve bunu takiben, +95 °C sıcaklığa ayarlanmış bir su banyosunda 10 dakika süreyle bekletilmişlerdir (Rybicki ve Purves, 1996).

Mikro-santrifüjde 10000 rpm devirde 15 dakika süreyle çalıştırılarak çöktürme işlemi yapılmıştır. Santrifüjlemeyi takiben tüpler sarsılmayacak bir şekilde alınmış ve üst faz, yeni bir Eppendorf tüpüne aktarılmış ve -33 °C'da saklanmıştır.

**3.2.10. Ayırıcı Jelin Hazırlanışı (%10'luk) (Bollag ve Edelstein, 1991)**

1. Çizelge 3.4.'de verilen solüsyonlar, belirtilen miktarlarda, 50 ml'lik cam bir şişe içinde karıştırılmış ve moleküler oksijenin uzaklaştırılması için vakum pompası yardımı ile 3-5 dakika degaz işlemi yapılmıştır.

2. Karışıma %10'luk AMPS (Amonyum persülfat) çözeltisinden 66 µl, TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin) çözeltisinden 13 µl eklenmiş ve tüp birkaç kez alt üst edilmiştir.

3. Hazırlanan solüsyon bir enjektör yardımı ile aralarında 1 mm boşluk bulunan cam plakalar arasına doldurulmuştur.



4. Jel yüzeyinin düzgün olması ve atmosferik oksijenin jele difüzyonunu engellemek için üst yüzey ince bir su tabakası ile kapatılmıştır. Oda sıcaklığında yaklaşık 30-60 dakika bekletilerek jelin polimerleşmesi sağlanmıştır (Bollag ve Edelstein, 1991).

### **3.2.11. Dengeleyici Jelin Hazırlanışı (% 4,5'lik) (Bollag ve Edelstein, 1991)**

1. Çizelge 3.5' de verilen solüsyonlar, belirtilen miktarlarda, 50 ml'lik bir cam şişe içinde karıştırılmış, 5 dakika vakum altında degaz yapılmıştır.

2. Jel solüsyonuna 30 µl AMPS ve 7,5 µl TEMED eklenerek tüp birkaç kez alt üst edilmiştir.

3. Bir enjektör yardımı ile kabarcık oluşmamasına dikkat edilerek polimerize olmuş ayırıcı jelin üzerine dökülmüş ve tarak dikkatlice yerleştirilmiştir.

4. Oda sıcaklığında 30-60 dakika polimerleşmeye bırakılmıştır.

Polimerleşme tamamlandığında tarak dikkatlice kaldırılmış ve örnek çukurlarının oluşması sağlanmıştır.

### **3.2.12. SDS-PAGE Denatüre Protein Jel Elektrofrez**

SDS-PAGE jel elektrofrez ile, izole edilen proteinler arasındaki farkların saptanması amaçlanmıştır.

SDS-PAGE elektrofrez için uygun nitelikteki örneklerin seçimi yapılırken, önceki kısımlarda yapılmış olan eşleştirme testleri, meyve oluşum kontrolü gibi testlerin sonuçları göz önünde tutulmuştur.

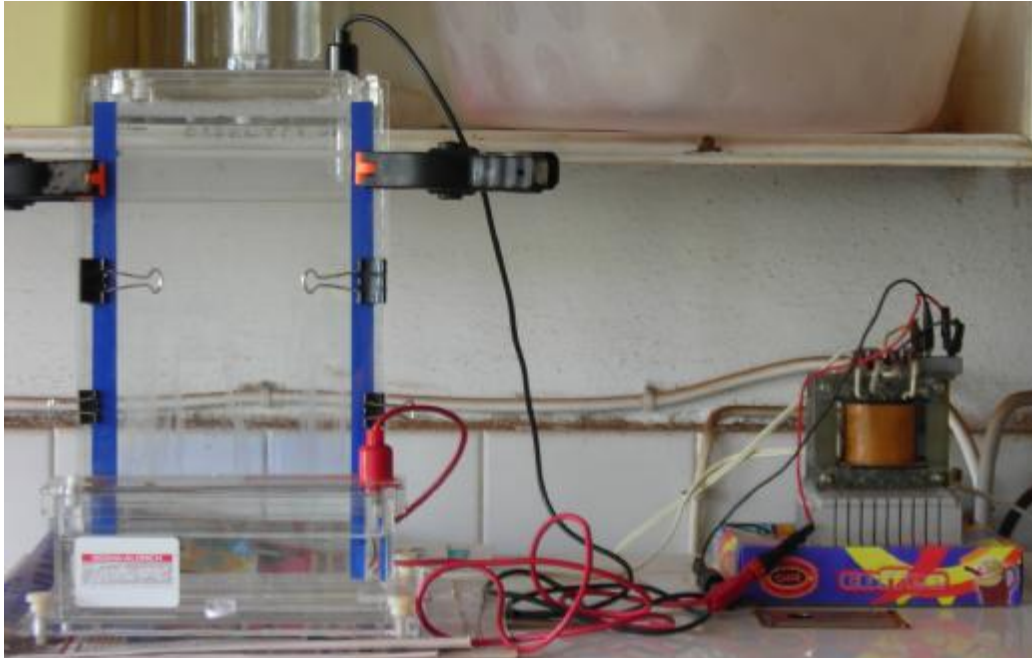
Yüksek sıcaklığa dayanıklılık testlerinin sonuçlarının değerlendirilmesiyle, bu deneyde, *C. cinereus* mantarına ait en iyi sonuçları verebilecek 17 farklı örnek (11 adet monokaryon misel, 3 adet dikaryon ve 3 adet dikaryon meyve) kullanılmıştır. Deneyler için 18x28 cm ebatlarında vertikal tipte bir elektrofrez düzeneği kullanılmıştır (Şekil 3.3).

Örneklerin seçiminde sıcaklığa dayanıklılık açısından yürütülen temel mantığa göre; yüksek sıcaklığa dayanıklı olan 2 farklı monokaryonun kendi

aralarında ve yine yüksek sıcaklığa dayanıklı olan ve olmayan iki ayrı monokaryonun birbirleriyle eşleştirilmesi ile elde edilmiş olan dikaryon misel ve meyvelerinin ayrıca, yüksek sıcaklığa dayanıklı olan ve olmayan monokaryon misellerin protein yapıları karşılaştırılmıştır.

Deneylede yüksek sıcaklığa dayanıklı olan 1, 5, 34, 37, 40 monokaryon örnekleri; yüksek sıcaklığa dayanıklı olmayan 4, 7, 30, 33 numaralı monokaryon örnekleri; ile karşılaştırma amaçlı olarak kullanılan 8 ve 38 numaralı monokaryon misel örnekleri ile 34-37, 34-37, 30-37 numaralı dikaryon misel ve meyve örnekleri kullanılmıştır.

Eşleşme testlerinin sonuçları dikkate alınarak uyum gösteren dikaryonlar seçilmiştir; bunlar 37-30 (yüksek sıcaklığa dayanıklı 2 monokaryon) ve 34-37'tür (yüksek sıcaklığa dayanıklı 1 monokaryon). Ayrıca uyumlu bir şekilde eşleşmiş olan 34-38 dikaryon da deneylede karşılaştırma materyali olarak kullanılmıştır.



**Şekil 3.3. Çalışır durumda bir elektroforez düzeneğinin görüntüsü**

**3.2.12.1. Protein Örneklerinin Uygulanması ve Elektroforez**

Elektroforezde, monokaryon ve dikaryon misel ile meyveden izole edilen protein örnekleri her biri için farklı miktarlarda da denenerek, aralarındaki farklar saptanmış ve deney 4 defa tekrar edilmiştir.

Tamponla yıkanmış olan jelin ceplerine, örnek ve tampon miktarının oranı 5/2 olacak şekilde hazırlanan monokaryon misel protein karışımından toplam 80 µl' lik bir miktar yüklenmiştir. Bu 5/2'lik oran, bütün elektroforetik çalışmalarda korunmuştur. Uyumluluk gösteren dikaryon örneklerde genelde 60, 80, 100 µl' lik miktarlar denenmiştir. Marker olarak, 66 kDa'luk sığır albümini kullanılmış ve jelle 10 µl miktarda yüklenmiştir.

Elektroforez 15mA'de 8 saat süreyle devam etmiştir. Elektroforez sonrasında jeller boyama işlemine alınmıştır.

**3.2.12.2. Jelin Coomassie Brilliant Blue R-250 İle Boyanması**

Bu metot, 0,1 µg kadar küçük miktarlardaki protein bantlarının boyanarak görünmesini sağlar. Elektroforez sonunda jeldeki bantların belirginleşmesi için jel, Coomassie Brilliant Blue R-250 (Çizelge 3.6) ile 3 saat boyanmıştır (Bollag ve Edelstein, 1991).

**3.2.12.3. Boyanın Geri Alınması ve Görüntüleme**

Boyanma aşaması tamamlanmış ve destile su ile bir kez yıkanmış olan jel, bantların belirginleşmesi için, boyayı alma solüsyonunda (Çizelge 3.7) bir gece bekletilmiştir (Bollag ve Edelstein, 1991). Şırınga yardımı ile solüsyon çekilerek görüntüleme işlemlerine geçilmiştir. Bu işlemlerden sonra jel Mini-Bis görüntüleme sisteminde incelenerek fotoğrafı çekilmiştir.

**4. BULGULAR ve TARTIŞMA****4.1. Monokaryon Misellerinin Sıcaklığa Dayanıklılık Testi Bulguları**

*C. cinereus* mantarına ait olan ve birbirlerinden farklı karakteristik özellikler taşıyan 43 monokaryon misel kültürünün, 43 °C'lik sıcaklıktaki gelişimleri 2., 4., 6., ve 7. günlerde kayıt edilmiş; sonuçları Çizelge 4.1.'de ve 46 °C'deki gelişimleri ise 2., 4., 5., 6., 7., ve 12. günlerde kayıt edilmiş; sonuçları Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

**4.1.1. Monokaryon Misellerin 43 °C'daki Gelişimlerine Ait Bulgular**

Çizelge 4.1.'e göre, 43 °C'da 7. günün sonunda, en hızlı gelişim gösterenler sırası ile 38, 3, 18, 41 ve 32 numaralı örnekler iken; en yavaş gelişim gösterenler ise sırası ile 17, 2, 23, 25, 10 ve 9 numaralı örnekler olmuştur.

4. günün sonu baz alındığında, en hızlı gelişim gösterenler 38, 3, 18, 41,19, 32 numaralı örnekler iken en yavaş olanlar ise 23, 10, 17, 28, 2 numaralı örneklerdir. En hızlısından en yavaş olanına kadar, gelişim gösteren tüm monokaryon misel örnekleri 7. günün sonunda Petri kutularını ( 7cm çaplı ) tamamen sarmıştır.

43 °C'da yavaş gelişim gösteren 9 ve 10 numaralı örneklerin çapı, 2. günde sırası ile 3,15 cm ve 2,00 cm; 6. günde ise sırası ile 6,90 cm ve 6,85 cm olarak belirlenmiştir. Buna göre, 2. gün sonunda yapılan tespitler, iki örnek arasındaki gelişim farkının 6.gün sonunda minimuma indiği saptanmıştır. Buna benzer sonuçlar, birçok örnekte de gözlemlenmiştir.

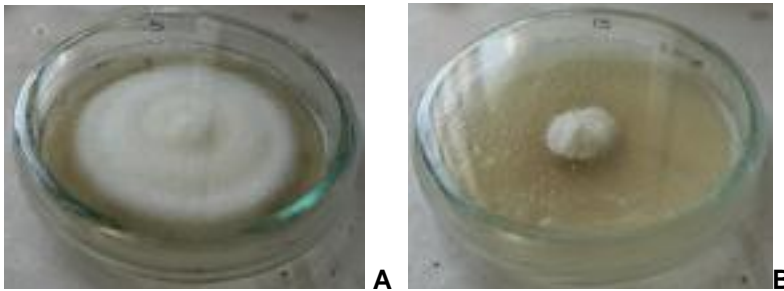
**4.1.2. Monokaryon Misellerin 46 °C'daki Gelişimlerine Ait Bulgular**

Çizelge 4.2'ye göre, 7. gün sonunda, 46 °C'de en hızlı gelişim gösterenler sırası ile 40, 39, 34, 29, 18, 43, 37, 38 ve 1 numaralı örnekler iken; en yavaş gelişim gösterenler ise sırası ile 15, 3, 13, 14, 33, 17, 16, 4, 9, ve 42 numaralı örnekler olmuştur.

7. gün sonunda yavaş gelişen örneklerden 15, 3, 13, 14, ve 16 numaralı örnekler gelişimlerini tamamlayamamıştır. Bir anlamda, bu örnekler tüm Petri kutusunu kaplayacak kadar gelişememiş ve 7. günün sonunda gelişimleri durmuştur. Yavaş gelişim gösteren 4, 9 ve 42 numaralı örneklerde ise 7. günün sonunda gelişimin hala sürdüğü, fakat sonraki günlerde durduğu saptanmıştır. Diğer yavaş gelişim gösteren 17 ve 33 numaralı örnekler ise, gelişimini sonuna kadar sürdürerek Petri kutusunu tamamen kaplamıştır. 4. gün sonunda ise, 5, 40, 39, 29 ve 7 numaralı örneklerin hızlı; 15, 3, 13, 17, 20 ve 33 numaralı örneklerin ise yavaş bir gelişim gösterdikleri saptanmıştır.

46 °C'de geliştirilmiş 3 ve 35 numaralı örnekler birbiriyle karşılaştırıldığında, her ikisinin de 4. gün sonuna kadar benzer hızda geliştikleri belirlenmiştir. Fakat, 4. günden sonra aralarında anormal bir gelişim farklılığı ortaya çıkmıştır. 3 numaralı örnek, 4-7. günler arasında nerede ise hiç gelişme göstermemişken; 35 numaralı örnek normal gelişimini sürdürmüş, hatta Petri kutusunu tümü ile kaplamıştır. 46 °C'da en hızlı gelişimi gösteren 40 numaralı örneğin, aynı gelişim performansını 43 °C'da da göstermemiş olmasıdır. 43 °C'da vasat bir gelişim süreci gösteren 9 ve 10 numaralı örnekler, 46 °C'da diğer örneklerle kıyasla normal bir gelişim performansı göstermiştir. Bu ise beklenmeyen bir bulgudur.

Eşit koşullar altında ve 46 °C'da gelişen 5 ile 15 numaralı örneklerin, 5. günün sonunda tespit edilen misel gelişim hızları arasında, önemli bir farklılığının olduğu Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Bununla birlikte, 5. günün sonu itibariyle misel çapı, 5 numaralı örnekte 5,60 cm ve 15 numaralı örnekte 1,90 cm olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.2).



**Şekil 4.1. 46 °C'da Monokaryon Misellerin 5. Gün Sonundaki Gelişim Durumları; A. 5 numaralı monokaryon; B. 15 numaralı monokaryon**

Çizelge 4.1. *Coprinus cinereus* monokaryon misellerinin 43 °C'daki gelişim hızları [cm cinsinden]

<i>C.cinereus</i> örnekleri	Başlangıç çapı	2. gün çapı	4. gün çapı	6. gün çapı	7. gün çapı
C-1	0,7	2,95	5,55	+	+
C-2	0,7	2,70	4,80	6,40	+
C-3	0,7	3,80	6,75	+	+
C-4	0,7	3,10	5,45	+	+
C-5	0,7	3,00	5,90	+	+
C-6	0,7	2,50	5,10	+	+
C-7	0,7	3,40	6,10	+	+
C-8	0,7	3,55	6,00	+	+
C-9	0,7	3,15	5,30	6,90	+
C-10	0,7	2,00	4,65	6,85	+
C-11	0,7	2,80	5,40	+	+
C-12	0,7	2,85	5,25	+	+
C-13	0,7	3,10	5,40	+	+
C-14	0,7	2,90	5,85	+	+
C-15	0,7	3,15	5,35	+	+
C-16	0,7	3,30	5,20	+	+
C-17	0,7	2,85	4,70	6,10	+
C-18	0,7	3,40	6,50	+	+
C-19	0,7	3,45	6,25	+	+
C-20	0,7	3,25	5,40	+	+
C-21	0,7	3,10	5,40	+	+
C-22	0,7	3,10	5,65	+	+
C-23	0,7	2,45	4,50	6,70	+
C-24	0,7	3,20	5,85	+	+
C-25	0,7	3,00	5,00	6,80	+
C-26	0,7	3,05	5,45	+	+
C-27	0,7	3,10	5,40	+	+
C-28	0,7	2,75	4,75	+	+
C-29	0,7	3,00	5,55	+	+
C-30	0,7	3,15	5,30	+	+
C-31	0,7	3,15	5,40	+	+
C-32	0,7	3,55	6,20	+	+
C-33	0,7	3,10	5,90	+	+
C-34	0,7	2,85	5,30	+	+
C-35	0,7	2,80	5,50	+	+
C-36	0,7	3,30	5,70	+	+
C-37	0,7	2,75	5,55	+	+
C-38	0,7	3,30	6,85	+	+

C-39	0,7	2,85	5,65	+	+
C-40	0,7	2,75	6,00	+	+
C-41	0,7	3,45	6,30	+	+
C-42	0,7	2,80	5,25	+	+
C-43	0,7	2,35	5,40	+	+

+ gelişimini tamamladı

**Çizelge 4.2. *Coprinus cinereus* monokaryon misellerinin farklı günlerde (G) 46 °C'daki gelişim hızları [cm cinsinden]**

CCÖ*	BÇ**	2. G	4. G	5. G	6. G	7. G	12. G
C-1	0,7	1,45	3,70	4,60	5,00	6,10	+
C-2	0,7	1,60	3,10	4,00	4,80	5,50	+
C-3	0,7	1,70	2,80	3,00	3,10	3,30	-
C-4	0,7	1,50	3,15	3,55	4,00	4,40	5,95
C-5	0,7	2,15	5,20	5,60	6,45	6,90	+
C-6	0,7	1,85	3,40	3,90	4,60	5,35	6,25
C-7	0,7	2,80	4,40	4,65	5,15	5,20	6,40
C-8	0,7	2,20	3,90	4,50	5,20	6,00	+
C-9	0,7	2,40	3,75	4,20	4,40	4,70	5,00
C-10	0,7	2,25	3,80	3,85	4,30	5,05	5,90
C-11	0,7	2,20	3,85	4,30	4,90	5,40	6,65
C-12	0,7	1,90	3,80	4,35	5,00	5,85	+
C-13	0,7	1,95	2,85	3,10	3,25	3,35	-
C-14	0,7	1,90	3,30	3,60	3,85	4,00	-
C-15	0,7	1,50	1,80	1,90	2,15	2,25	-
C-16	0,7	2,10	3,05	3,35	3,85	4,20	-
C-17	0,7	1,65	2,85	3,60	4,00	4,15	+
C-18	0,7	2,25	4,20	4,65	5,50	6,40	+
C-19	0,7	1,60	3,10	3,90	4,85	5,50	+
C-20	0,7	2,25	2,90	3,35	4,35	4,85	5,90
C-21	0,7	1,90	3,45	4,45	5,20	5,45	6,50
C-22	0,7	2,30	3,15	4,50	5,00	5,75	6,40
C-23	0,7	1,75	3,65	4,40	5,15	5,65	+
C-24	0,7	2,10	4,00	4,60	5,20	5,70	+
C-25	0,7	2,15	3,00	3,75	4,70	5,50	+
C-26	0,7	2,45	3,90	4,30	4,50	4,95	5,25
C-27	0,7	2,35	3,10	3,70	4,45	5,50	+
C-28	0,7	2,70	3,60	4,20	4,85	5,95	+
C-29	0,7	2,35	4,60	5,20	5,65	6,45	+
C-30	0,7	2,45	3,45	3,90	4,60	5,15	+

C-31	0,7	1,80	3,15	3,70	4,45	5,50	+
C-32	0,7	1,70	3,25	4,60	5,10	5,90	+
C-33	0,7	1,80	2,90	2,95	3,45	4,05	+
C-34	0,7	2,90	4,25	5,00	5,20	6,85	+
C-35	0,7	1,70	2,75	3,65	4,25	5,25	+
C-36	0,7	1,45	3,60	4,10	4,85	5,65	+
C-37	0,7	2,05	4,20	5,00	5,50	6,25	+
C-38	0,7	2,30	4,40	4,80	5,40	6,15	+
C-39	0,7	2,50	4,60	5,35	5,90	6,95	+
C-40	0,7	2,90	4,80	5,10	6,30	+	+
C-41	0,7	1,40	3,55	3,95	4,60	5,40	+
C-42	0,7	1,70	3,20	3,60	4,25	4,75	5,65
C-43	0,7	2,20	3,35	4,40	5,30	6,30	+

+ gelişimini tamamladı; - gelişimi durdu; \* CCÖ: *C. cinereus* örnekleri; \*\* BÇ: başlangıç çapı; G gün.

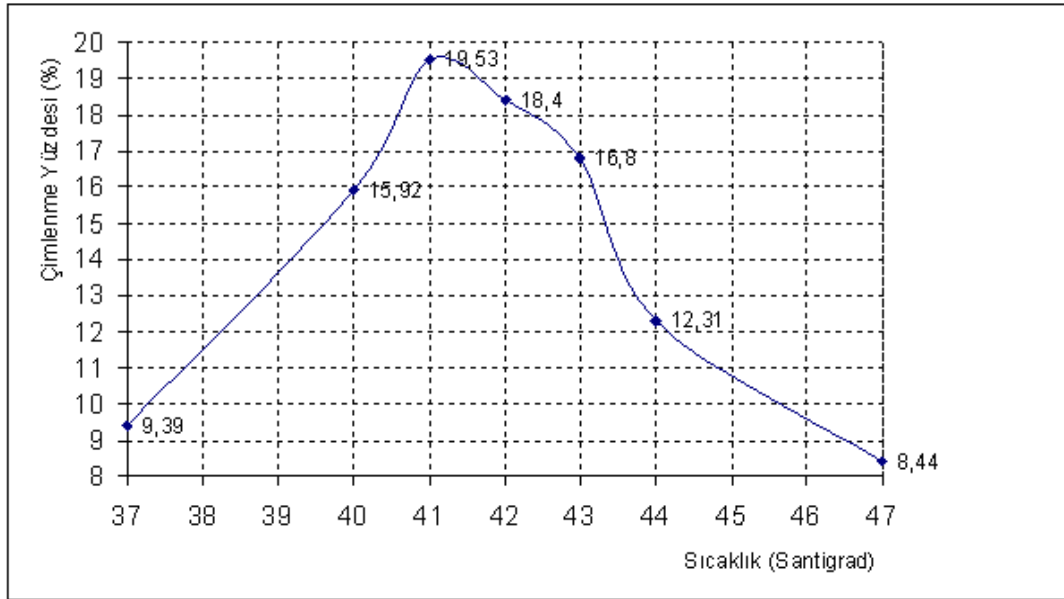
#### 4.2. *Coprinus cinereus*'un Maksimum Çimlenme Sıcaklığına Ait Bulgular

*C. cinereus* mantar sporlarının maksimum çimlenme sıcaklığını saptamak için, 3 farklı çimlendirme serisi uygulanmış ve bunların ortalaması alınmıştır.

Sıcaklık hariç tüm diğer koşullar aynı tutularak *C. cinereus* mantar sporlarının, çimlenme yüzdeleri sıcaklığa bağlı olarak ölçülerek bulunan sonuçlar Şekil 4.2'de bir grafik halinde verilmiştir. Grafiğe göre, sporların maksimum çimlenme potansiyelinin 41,2 °C da en üst düzeyde olduğu, diğer bir ifade ile 41,2 °C'ın sporların çimlenmesi için en ideal sıcaklık olduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.2.'e göre, çimlenme yüzdesi, 37 °C'da %9,39, 40 °C'da %15,92 ve 41 °C'da %19,53 artan değerleri alırken, 42 °C'dan (%18,40) itibaren bir düşme sürecine girmiştir. Buna göre çimlenme de maksimum değer yaklaşık 41 °C en yüksek değeri göstermiştir. Şekil 4.2. incelendiğinde büyüme hızının 41-42 °C arasında bir miktar daha artmaya devam etmiş, ancak daha sonra düşüşe geçmiş ve maksimum çimlenme de yaklaşık 41,2 °C da gerçekleşmiştir. 47 °C'da gibi yüksek sıcaklıkta bile sporların çimlenmesi gerçekleşmiş ve oranı da %8,44 olarak ölçülmüştür. Bu da yüksek sıcaklıkların sporları çimlenmeye teşvik edici olduğunu fakat yüksek sıcaklıklarda çimlenme yüzdesinin de düştüğünü göstermiştir.





**Şekil 4.2. *Coprinus cinereus* sporlarının çimlenme yüzdesi**

*Chrysosporium crassitunicatum*, *Nannizzia fulva* (+), *Nannizzia fulva* (-) ve *Trichophyton equinum* mantar sporlarını çimlendirmek üzere karbon kaynağı olarak glükozu kullanmış ve maksimum spor çimlenmesinin 24 saat içinde sağlandığını belirtmişler ve buna ilaveten, *Chrysosporium crassitunicatum*, *Nannizzia fulva* (+), *Nannizzia fulva* (-) mantar sporlarının 35 °C'a kadar çimlendiğini, ancak daha yüksek sıcaklıklarda çimlenemediğini belirlemişlerdir. Fakat *T. equinum*'un ise, 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda da çimlenebildiğini, ancak çimlenme yüzdesinin oldukça düşük olduğu saptamışlardır (Singh ve Agrawal., 1982).

Bu çalışmada ise, maksimum çimlenme sıcaklığı yine 24 saat içinde sağlanmış; buna ek olarak mezofilik bir mantar *C. cinereus* mantarı, 40 °C' in üzerinde 47 °C' a kadar çimlenmesini sürdürebilmiştir.

#### 4.2.1. 37 °C İçin Bulgular

37 °C'lik sıcaklık koşulları altında yürütülen bu çalışmada, kullanılan 2086 spordan 196 tanesinin çimlendiği tespit edilmiştir. Ortalama çimlenme yüzdesi % 9,39 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.3. *Coprinus cinereus*'un 37 °C'daki çimlenme yüzdesi**

Çimlendirme Serisi	1. Seri	2.Seri	3.Seri	Serilerin Ortalaması
Çimlenen Spor Sayısı	96	19	81	196
Toplam Spor Sayısı	1108	338	640	2086
Çimlenme Yüzdesi (%)	8,66	5,62	12,65	9,39

**4.2.2. 40 °C İçin Bulgular**

40 °C sıcaklıkta yürütülen bu çalışmada, kullanılan 1030 spordan 164 tanesinin çimlendiği tespit edilmiştir. Ortalama çimlenme yüzdesi %15,92 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.4.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.4. *Coprinus cinereus*'un 40 °C'daki çimlenme yüzdesi**

Çimlendirme Serisi	1. Seri	2.Seri	3.Seri	Serilerin Ortalaması
Çimlenen Spor Sayısı	56	39	69	164
Toplam Spor Sayısı	306	290	434	1030
Çimlenme Yüzdesi (%)	18,30	13,44	15,89	15,92

**4.2.3. 41 °C İçin Bulgular**

41°C sıcaklıkta yürütülen bu çalışmada, kullanılan 1367 spordan 267 tanesinin çimlendiği tespit edilmiştir. Ortalama çimlenme yüzdesi %19,53 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.5.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.5. *Coprinus cinereus*'un 41 °C'daki çimlenme yüzdesi**

Çimlendirme Serisi	1. Seri	2.Seri	3.Seri	Serilerin Ortalaması
Çimlenen Spor Sayısı	163	35	69	267
Toplam Spor Sayısı	864	165	338	1367
Çimlenme Yüzdesi (%)	18,86	21,21	20,41	19,53

**4.2.4. 42 °C İçin Bulgular**

42 °C sıcaklıkta yürütülen çalışmada, kullanılan 913 spordan 168 tanesinin çimlendiği belirlenmiş; ortalama çimlenme yüzdesi %18,40 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.6. *Coprinus cinereus*'un 42 °C'daki çimlenme yüzdesi**

Çimlendirme Serisi	1. Seri	2.Seri	3.Seri	Serilerin Ortalaması
Çimlenen Spor Sayısı	95	45	28	168
Toplam Spor Sayısı	461	290	162	913
Çimlenme Yüzdesi (%)	20,60	15,51	17,28	18,40

**4.2.5. 43 °C'deki Bulgular**

43 °C sıcaklıkta yürütülen bu çalışmada, kullanılan 1648 spordan 277 tanesinde çimlenme tespit edilmiş ve ortalama çimlenme yüzdesi %16,80 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.7.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.7. *Coprinus cinereus*'un 43 °C'daki çimlenme yüzdesi**

Çimlendirme Serisi	1. Seri	2.Seri	3.Seri	Serilerin Ortalaması
Çimlenen Spor Sayısı	209	15	53	277
Toplam Spor Sayısı	1107	122	419	1648
Çimlenme Yüzdesi (%)	18,87	12,29	12,64	16,80

**4.2.6. 44 °C İçin Bulgular**

44 °C sıcaklıkta yürütülen çalışmada, kullanılan 1251 spordan 154 tanesinin çimlenme belirlenmiş; ortalama çimlenme yüzdesi %12,31 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.8.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.8. *Coprinus cinereus*'un 44 °C'daki çimlenme yüzdesi**

Çimlendirme Serisi	1. Seri	2.Seri	3.Seri	Serilerin Ortalaması
Çimlenen Spor Sayısı	13	60	81	154
Toplam Spor Sayısı	84	510	657	1251
Çimlenme Yüzdesi (%)	15,47	11,76	12,32	12,31

**4.2.7. 47 °C İçin Bulgular**

47 °C'da yürütülen bu çalışmada, kullanılan 699 spordan 59 tanesinin çimlendiği belirlenmiş ve ortalama çimlenme yüzdesi %8,44 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.9.'da gösterilmiştir.

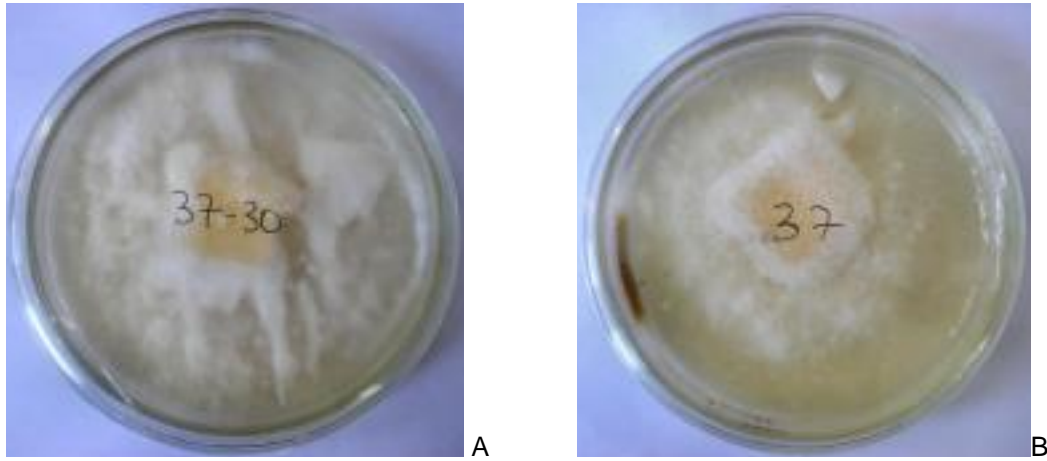
**Çizelge 4.9. *Coprinus cinereus*'un 47 °C'daki çimlenme yüzdesi**

Çimlendirme Serisi	1. Seri	2.Seri	3.Seri	Serilerin Ortalaması
Çimlenen Spor Sayısı	31	21	7	59
Toplam Spor Sayısı	356	220	123	699
Çimlenme Yüzdesi (%)	8,70	9,54	5,69	8,44

### 4.3. *Coprinus cinereus*'un Eşleşme Testlerine Ait Bulgular

*C. cinereus*'un eşleşme testlerinde, uyumlu olmayan monokaryon çiftlerin misellerinin karşılaştıkları veya karıştıkları bölgelerde kanca yapılarına rastlanmıştır. Çizelge 4.10'da kanca yapısı taşıyan ve taşımayan eşleşmeler verilmiştir.

Misellerin gelişim sürecinde, uyumluluğun saptandığı eşleşmelerde gelişim hızının, uyumlu olmayanlara kıyasla daha fazla olduğu Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.3. Eşit koşullar altında misel gelişim hızlarının karşılaştırılması;**

A. 37-30 Numaralı dikaryon örnek; B. 37 Numaralı monokaryon örnek

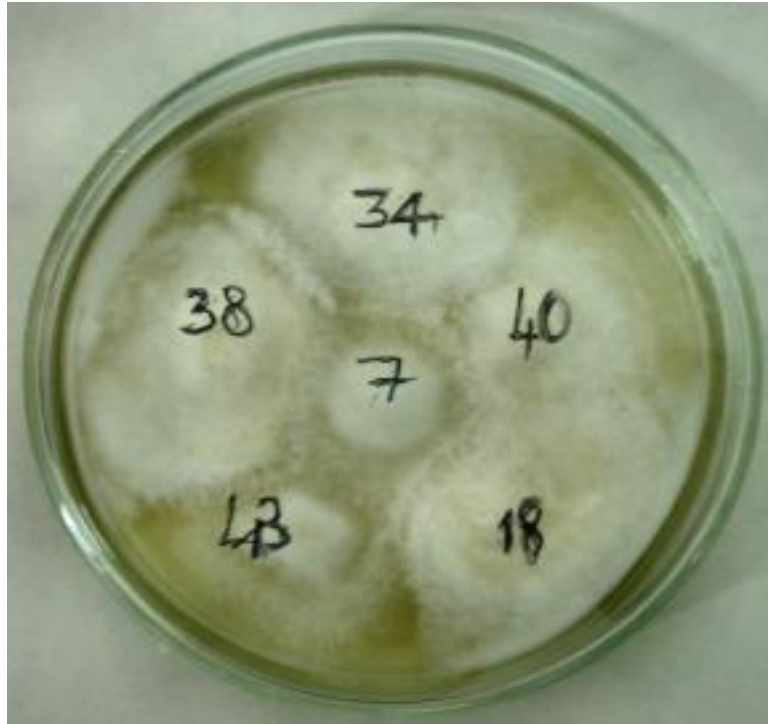
Eşleşme testlerine ait bulgular, misellerin sıcaklığa dayanıklılık testi sonuçları, seçilen örneklerin kendi aralarında uyumluluğunu saptamak için yol gösterici olmuştur. Eşleşme testlerinde birçok varyasyon denenmiş olmasına karşın, elektroforez deneylerinde kullanılması amaçlanan örnekler arasında, az sayıda

uyumlu çiftin varlığı tespit edilmiş ve bunlardan bazıları da Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. Çizelge 4.10'da da belirtilmiş olan, 30-37, 34-37 ve 34-38 uyumlu monokaryon çiftlerin, meyvelerindeki protein yapı farklılıklarının elektroforez tekniği ile belirlenmesine uygun nitelikte olduğu anlaşılmıştır.

**Çizelge 4.10. Bazı eşleşme ve uyumluluk sonuçları**

Uyumlu olan monokaryon çiftler	Uyumlu olmayan monokaryon çiftler
10-2	10-6
32-34	14-10
30-37	19-10
34-37	30-8
34-38	40-5

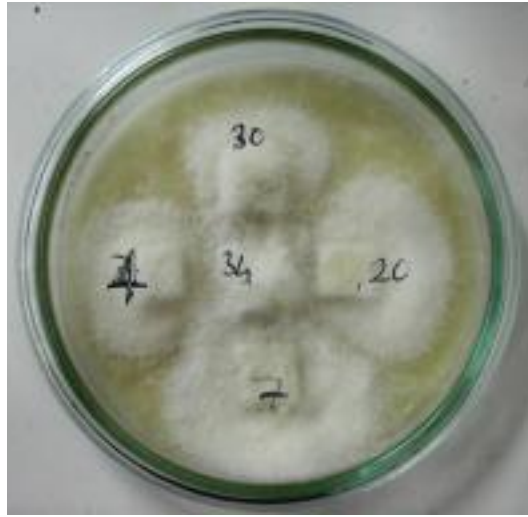
Ayrıca 38 ile 34 arasındaki uyumluluk yanında, 43 °C ve 46 °C sıcaklıkta iyi bir gelişim sergileyen 7, 18, 40 ve 43 numaralı monokaryonlar da Şekil 4.4'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.4. Uyumlu bir eşleşmeden görüntü. (34-38 çiftinin ara kesiti)**

Eşleşmelerin her zaman uyumlulukla sonlanamayacağı da Şekil 4.5’de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, merkezde gösterilmiş olan yüksek sıcaklığa dayanıklı 34 numaralı örnek, çevresinde simetrik olarak dizili haldeki yavaş gelişen 4, 7, 20, 30 numaralı örnekler ile uyumluluk göstermemiştir.

9 cm çaplı Petri kutularının kullanıldığı eşleştirme testlerinde, ekili halde bulunan örnekler, birbirleriyle ilk temaslarını 3-4 gün içinde sağlamıştır. Örnekler ilk temas anından itibaren, her gün ve gerektiğinde her saat örneklerin gelişimleri mikroskop altında kontrol edilmiştir.



**Şekil 4.5. Uyumsuz eşleşmelerden görüntü**

Tek bir monokaryonun merkeze ekilmesi halinde, 7 cm çaplı bir Petri kutusunu tamamen kaplaması, yaklaşık bir hafta sürmüştür. Çok sayıda monokaryonun simetrik olarak ekilmesi, gelişen misellerin birbirine teması için geçen sürenin 4-5 güne kadar inmesini sağlamıştır.

#### **4.4. Meyve Oluşum Kontrolü ve Monokaryon Testlerine Ait Bulgular**

##### **4.4.1. *Coprinus cinereus*'un Meyve Oluşum Kontrolüne Ait Bulgular**

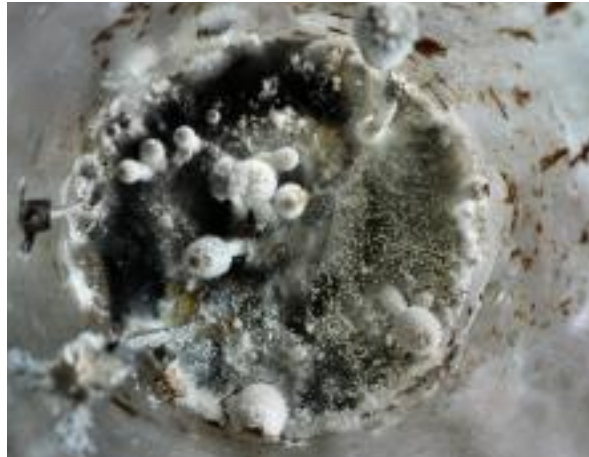
Meyve oluşum kontrol testlerinde en fazla çalışılan örnekler, elektroforez deneyleri için örnek materyal olarak kullanılacak olan 30-37, 34-37 ve 34-38

numaralı dikaryonlardır. Eşleştirme testlerinde mikroskobik çalışmalar ile kanca yapısı araştırılırken; meyve oluşum kontrol testlerinde dikaryon denilen uyumlu monokaryon örneklerin gerçekten meyve verip veremedikleri ve veriyorlarsa hangi koşullar altında verdiklerinin tespiti amaçlanmıştır.

Şekil 4.6'de sıkça meyve gelişim aşamaları göstermiş olan 37-30 dikaryon örneğine ait bir olgun meyve ile bu süreç sonunda bir ürün olarak ortaya çıkan bir miktar spor birikintisi gösterilmiştir. Diğer taraftan Şekil 4.7'de 37-30 dikaryon örneğinin olgunlaşmış meyvesi ve bir miktar spor yığıntısının üstten görüntüsü verilmiştir.



**Şekil 4.6. 30-37 Dikaryon örneğinin olgun meyve görüntüsü**

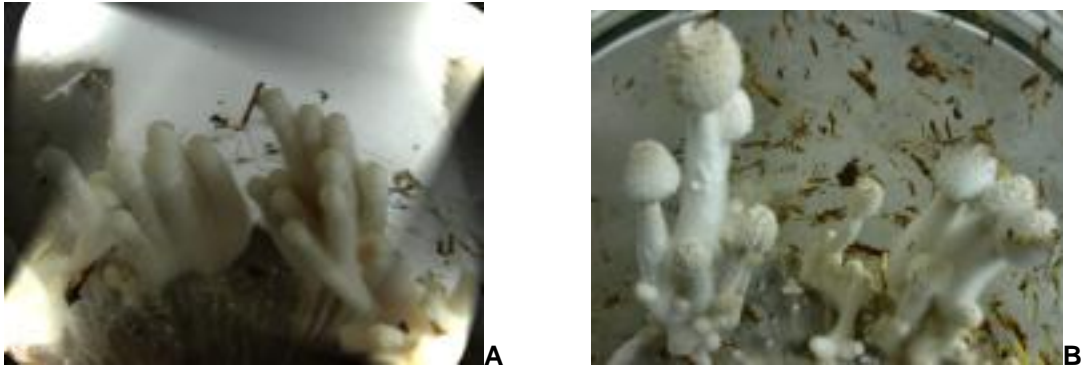


**Şekil 4.7. Spor yığıntısı ve meyvelerin üstten görüntüsü**



Daha önceden hızlı bir misel gelişimi sürdürdüğü bilinen 30-37 numaralı örnek, meyve oluşum testleri boyunca, bu özelliğini meyve oluşturma aşamalarında da sürdürmüştür. Her defasında standart meyve oluşturmuş ve bol miktarda spor vermiştir. Aynı davranışı uyumlu olan 34-38 ve 34-37 örnekleri de göstermiştir.

Çalışmalarda cam kavanozlar kullanılmış olup, 4 cm<sup>2</sup>'lik dikaryon misel kesitleri merkeze ekilmiş ve vejetatif gelişim aşaması 37 °C sıcaklıkta normalde 4-5 gün sürmüştür. Fakat çalışmalar sırasında; meyve yetiştirmek üzere misel miktarının artırıldığı vejetatif gelişim aşaması 37 °C'a ayarlı karanlık bir etüv içerisinde yürütülmüştür. Dikaryon miseller için normalde karanlıkta geçen sürenin 4-5 günü aşması halinde, normalde aydınlıkta meydana gelen meyve oluşumu karanlıkta da meydana gelmekte, ancak bu meyveler şapka kısmı gelişmemiş ve tümü ile sap görüntüsü veren olgunlaşmamış özelliklidirler (Şekil 4.8.A). Diğer taraftan yeterli ışığın alınması halinde, şapka kısmı oluşmakta ve de olgunlaşmaya başlamaktadır (Şekil 4.8. B)



**Şekil 4.8. Meyvede şapka gelişim görüntüleri; A. gelişmemiş; B gelişmekte olan**

Her denemede meyve alınamamıştır; bunun sebebi, meyve oluşumu için gerekli iz elementlerin ortamda olmaması ve/veya besi yerinin tazeliğini yitirmiş olması ihtimalidir.

Bu çalışmadan elde edilen diğer bir bulgu, meyve vermiş olan bir dikaryondan elde edilmiş olan sporların kısır olmasıdır.

#### 4.4.2. *Coprinus cinereus* Monokaryon Testlerine Ait Bulgular

Normalde bir dikaryonun veya heterokaryonun ve nadir olarak rastlanan mutant karakterli bir monokaryonun meyve yapısı oluşturmaları, en uygun şartlar altında gerçekleştirebilmiştir. Bu bilgiler ışığında, deneylerde, 43 mutant monokaryon örnekten 2, 3, 5, 6 ve 23 numaralı olanlarda meyve oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.9) ve de %5/43 (%11 civarı) oranda mutant karakterli monokaryon örneğinin bulunduğu anlaşılmıştır.

Buna ek olarak; normal bir dikaryona kıyasla, meyve vermiş olan mutant monokaryonların aydınlık evredeki gelişimlerinin daha yavaş ilerlediği belirlenmiştir. Mutant monokaryonlarda meyve yapısı oluşumu için gerekli olan süre, bir dikaryona göre, daha uzun sürmüştür ve bu süreç birkaç gün daha devam etmiştir (aydınlık evrenin 7-10 günleri arası sürmesi). Dikaryonlar ile yürütülen meyve oluşum sürecinde, ortalama olarak bu evrenin en geç 7. günde tamamlandığı tespit edilmiştir.

Tüm mutant monokaryon örneklerde, meyve yapıları oluşsa da saplar oldukça kısa kalmış (1-2 cm arası) ve aynı şekilde şapka kısımlarının da gelişmemiş bir görüntü verdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu mutant monokaryon örneklerin meyveleri çok sıkı bir şekilde bir araya toplanmış ve cüce bir görünüme sahiptir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



Şekil 4.9. Bazı mutant monokaryon örneklerinin görüntüsü



**Şekil 4.10. 23 Numaralı mutant monokaryon örneğın üstten görüntüsü**



**Şekil 4.11. 3 Numaralı mutant monokaryon örneğın görüntüsü**

#### **4.5. *Coprinus cinereus* SDS-PAGE Denatüre Protein Jel Elektroforezine Ait Bulgular**

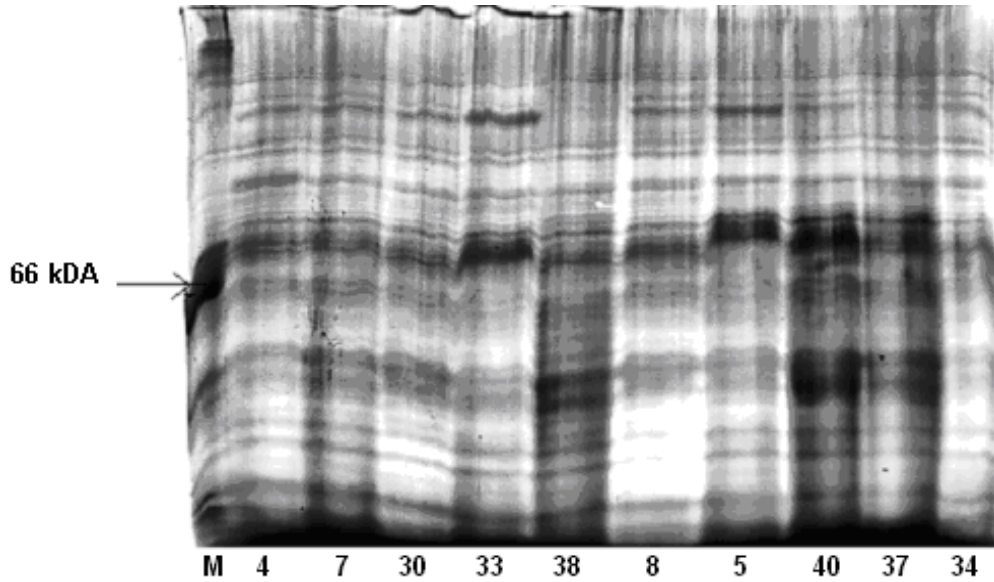
Genel olarak, 66 kDa'dan daha düşük ve yüksek moleküler ağırlıkta olan protein bandların sayısının birbirine yakın sayıda olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12).

#### 4.5.1. Monokaryon Misellerin Kıyaslanmasına Ait Bulgular

80 µl örneğin kullanıldığı elektroforez deneyinin sonucu Şekil 4.12' de gösterilmiştir.

*Agaricus*, *Boletus*, *Lactarius*, *Leccinium*, *Macrolepiota* ve *Suillus* türlerinden birkaç mantarın protein yapılarını SDS-PAGE analizi sonucu karşılaştırmışlardır. Sonuçta aynı aileye mensup türlerde bazı benzerliklerin olduğunu tespit etmişlerdir (Petrovska ve ark., 2004).

Elde edilen bulgulara göre, yukarıda sözü edilen saptamanın bu çalışmada elde edilenler için de geçerli olduğu, yani genelde protein bantları arasında temel benzerlikler olduğu Şekil 4.12' den de anlaşılmaktadır. Temel benzerlikler dışında 38 numaralı örnekte 66 kDa'dan daha düşük ağırlıkta bir proteinin eksik olduğu saptanmıştır. 5 numaralı mutant monokaryon örneğinin diğer monokaryon misel örnekleri ile benzer protein yapısında olduğu saptanmıştır.



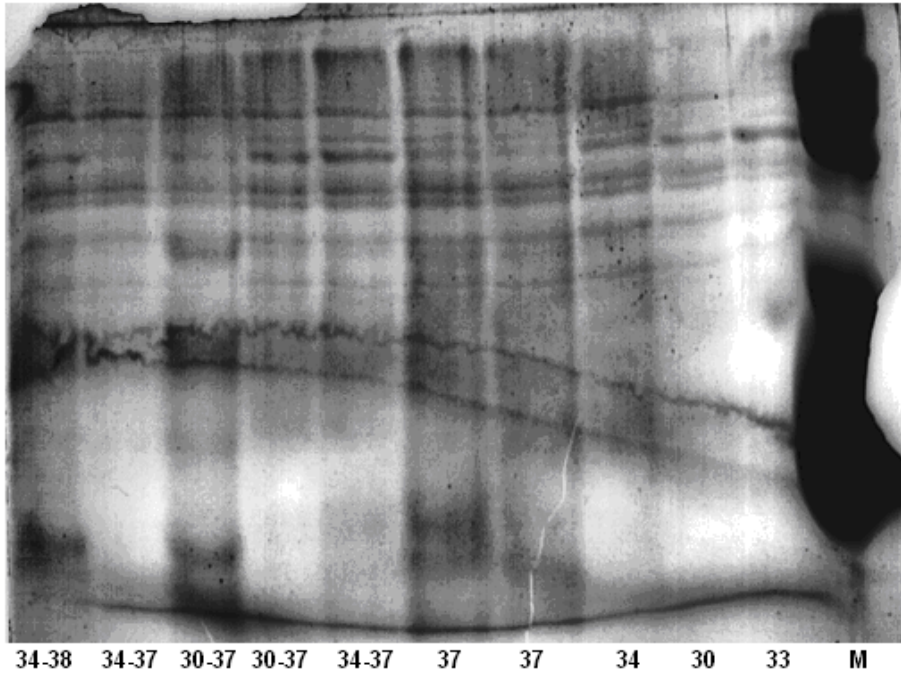
Şekil 4.12. *Coprinus cinereus* monokaryon misellerinin protein elektroforez sonucu (soldan sağa: Marker, 4, 7, 30, 33, 38, 8, 5 (mutant monokaryon), 40, 37 ve 34 monokaryon miseli)

#### 4.5.2. Dikaryon Misel ve Meyveler ile Monokaryonların Kıyaslanmasına Ait Bulgular

##### 4.5.2.1. Misel ve Meyve Bulguları-1

Sol baştan 6. ve 7. ceplere sırasıyla 80 ve 50 µl' lik yükleme yapılırken diğer tüm ceplere örneklerden 60 µl' lik bir miktar uygulanmıştır. Elektroforez deneyinin sonucu Şekil 4.13'de gösterilmiştir.

Yüksek sıcaklığa dayanıklı 34-37 ile yüksek sıcaklığa dayanıklı olmayan 30-37 numaralı meyve örneklerinin protein profillerinin birbirinden farklı olduğu gözlemlenmiştir.

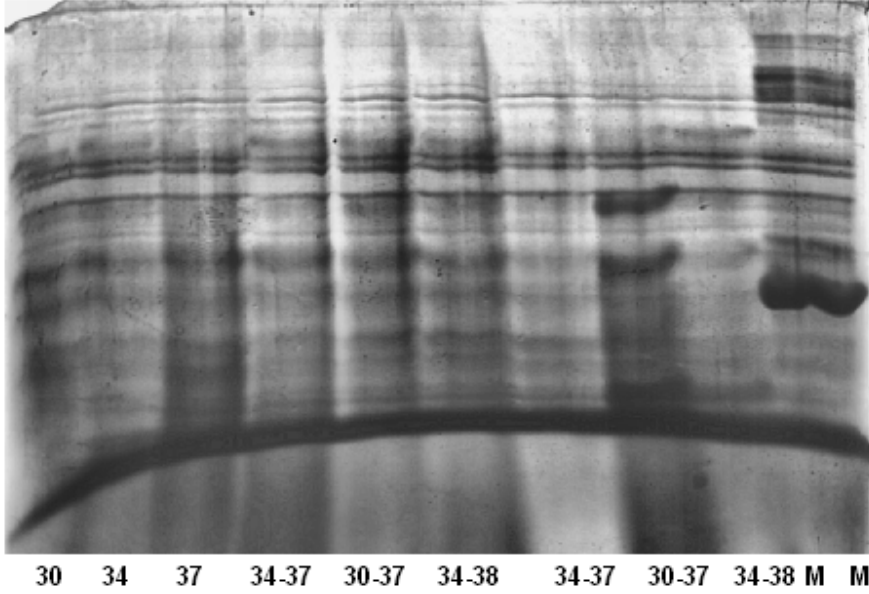


**Şekil 4.13. *Coprinus cinereus* misel ve meyve protein elektroforezi sonuçları (I)**  
(Soldan sağa: 34-38, 34-37, 30-37 meyve; 30-37, 34-37 dikaryon misel; 37 (80 µl), 37 (50 µl), 34, 30, 33 monokaryon misel; sığır albümin marker)

##### 4.5.2.2. Misel ve Meyve Bulguları-2

80 µl örneğin kullanıldığı elektroforez deneyinin sonucu Şekil 4.14' de gösterilmiştir.

Genel olarak, 66 kDa'dan daha düşük ve yüksek moleküler ağırlıkta olan protein bantların sayısının birbirine yakın sayıda olduğu gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.14. *Coprinus cinereus* misel ve meyve protein elektroforez sonuçları (II)**  
(Soldan sağa: 30, 34, 37 monokaryon misel; 34-37, 30-37, 34-38 dikaryon misel; 34-37, 30-37, 34-38 meyve; son iki cep ise marker)

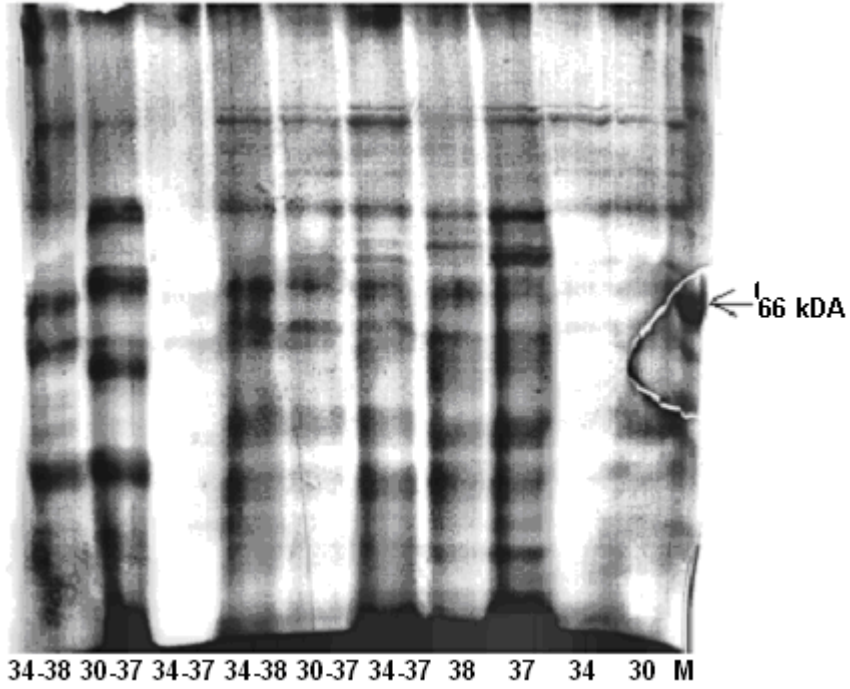
#### 4.5.2.3. Misel ve Meyve Bulguları-3

100 µl örneğin kullanıldığı elektroforez deneyinin sonucu Şekil 4.15' de gösterilmiştir.

Bipolar *Coprinus sp.* ile yapmış araştırma neticesinde, karışık monokaryon örnek bantlarının, gerçek dikaryon örneklerindeki benzemediğini, ama farklı tek monokaryonlardaki ile benzer olduklarını saptamışlardır. (Ross ve ark.,1973).

Bu çalışmada ise, Şekil 4.15'de gösterildiği gibi, gerçekten de monokaryonlar ile dikaryonların protein bantları arasında bir farklılık gözlenmiş ayrıca, meyve ile misel örnekleri de karşılaştırıldığında da bazı farklılıklar gözlemlenmiştir.

Genel olarak, 66 kDa'dan daha düşük ve yüksek moleküler ağırlıkta olan protein bantların sayısının birbirine yakın sayıda olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15. *Coprinus cinereus* misel ve meyve protein elektroforez sonuçları (III)**  
(Soldan sağa: 34-38, 30-37, 34-37 meyve; 34-38, 30-37, 34-37 dikaryon misel; 38, 37, 34, 30 monokaryon misel; 11. cepte marker bulunuyor).  
Not: soldan 3. cepteki 34-37 numaralı örnek jelden kaçmıştır.



**5. SONUÇ VE ÖNERİLER**

Bu çalışmada, bir Basidiomycetes mantarı olan *C. cinereus* sporlarının maksimum çimlenme sıcaklığı yanında normal ve yüksek sıcaklıkta gelişmiş misel ve meyvelerin protein kombinasyonları karşılaştırılarak bunlarda sıcaklığa dayanıklılığı ifade eden protein yapıları araştırılmıştır. Ayrıca elde edilen bulguların laboratuvar ve endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliği için öneriler getirilmiştir.

*C. cinereus* sporları CYM besiyerlerinde 37-47 °C arasında çimlendirilmiş, her bir sıcaklık için elde edilen çimlenme yüzdeleri karşılaştırılmış ve 41 °C civarında çimlenme oranının (%19,53) en yüksek olduğu ve çimlenmenin 47 °C'a kadar da dikkate değer bir oranda (% 8,44) sürdüğü belirlenmiştir.

Birbirinden farklı 43 ayrı monokaryon miselin 43 °C ve 46 °C'da gelişim hızları, farklı sürelerde incelenmiş ve gelişim hızlarına göre gruplandırılmıştır (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Böylece gelişim hızı, sıcaklığa dayanıklılığın bir ölçütü kabul edilerek çalışılan monokaryonlar sıcaklığa dayanıklılık bakımından gruplandırılmış ve tüm monokaryonlar meyve verme testine tabi tutulmuştur. Bu testlerin sonucunda 2, 3, 5, 6, 23 numaralı mutant monokaryon örneklerin meyve verebildikleri saptanmıştır.

Monokaryonların eşleştirme testlerinde, yüksek sıcaklığa dayanıklı monokaryonlar kendi aralarında ikiye ikiye; ayrıca biri yüksek sıcaklığa olan diğeri olmayan monokaryonlar da yine kendi aralarında ikiye ikiye eşleştirilerek birbiriyle uyumlulukları belirlenmeye çalışılmıştır. Tüm bu eşleştirme çalışmalarının sonucunda uyumlu 30-37, 34-37, 34-38 monokaryon çiftlerinin (dikaryon) protein analizine uygun oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Ardından bu çiftler meyve oluşturma testlerine tabi tutulmuş ve bunlardan en verimli 30-37 çifti olmak üzere hepsinin meyve verdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca karanlık fazın uzun tutulması halinde de meyvelerin şapka kısmı gelişmeksizin yalnızca sap kısmından ibaret meyve vererek gelişimlerini sürdürdükleri de gözlemlenmiştir.

Bu çalışmalardan sonra elektroforez çalışmalarında kullanılmak üzere yüksek sıcaklığa dayanıklı olan ve olmayan toplam 14 misel ve 3 meyve örneği, SDS-PAGE



elektroforez tekniği ile protein analizine tabi tutulmuştur. Monokaryon ve dikaryonların proteinlerine ayrıştırılması sonucunda aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Genel olarak, 66 kDa'dan daha düşük ve yüksek moleküler ağırlıkta olan protein bandların sayısının birbirine yakın sayıda olduğu belirlenmiştir.

2. Temel benzerlikler dışında 38 numaralı örnekte 66 kDa'dan daha düşük ağırlıkta olan bir proteinin eksik olduğu saptanmıştır. 5 numaralı monokaryon örneğinin de diğer monokaryon misel örnekleri ile benzer protein profiline sahip olduğu saptanmıştır.

3. Gerçekten de monokaryonlar ile dikaryonların örneklerin protein bantları arasında bir farklılık belirlenmiştir.

4. Ayrıca, meyve ile misel örnekleri de karşılaştırıldığında bazı farklılıklar göze çarpmıştır.

5. Yüksek sıcaklığa dayanıklı 34-37 ile yüksek sıcaklığa dayanıklı olmayan 30-37 numaralı meyve örneklerinin protein profillerinin birbirinden farklı olduğu gözlemlenmiştir.

Sporların maksimum çimlenme sıcaklığının tespitinde, çimlenme oranını belirleyen faktörlerden yalnızca sıcaklık değişkeni ve tek bir besi yeri (CYM) ile çalışılmıştır. Aynı çalışmaların bağıl nem, pH değeri, farklı besi yerleri ve radyasyon parametrelerinden nasıl etkileneceğinin de ayrıca araştırılmasında yarar vardır. Diğer taraftan, elde edilen sonuçların laboratuvar ve endüstriyel uygulamalar bakımından da incelenmesinde yarar vardır.

Yüksek sıcaklığa dayanıklı enzimlerin saptanması ve bunların geniş pH bandında çalışan, yüksek sıcaklık ve alkalilere karşı kararlı olanları, endüstriyel atık su uygulamalarda birçok avantaj sağlanması beklenmektedir.

## KAYNAKLAR

- ANDERSON, N. L., BLASKO, R. E., HOFFMAN, J. P., and ANDERSON, N. G., 1991.** A two-dimensional Gel Database of Rat Liver Proteins Useful in Gene Regulation and Drug Effects Studies. *Electrophoresis*, 12:907-930.
- BOLLAG, D. M. and EDELSTEIN, S. J., 1991.** Protein Methods. Wiley-Liss. New York, s. 180.
- BRAUN, K. L., 1971.** Spore Germination Time In *Fuligo septica*. The Ohio Journal of Science. 71 (5): 304.
- BOTTOLI, A. P. F., 2001.** Metabolic and environmental control of development in *Coprinus cinereus*. Swiss Federal Institute of Technology Zurich, PhD thesis, s.169.
- BOULIANNE, R. P., LIU, Y., AEBI, M., LU, B. C. and KÜES, U., 2000.** Fruiting body development in *Coprinus cinereus*: regulated expression of two galectins secreted by a non-classical pathway. *Microbiology*, 146, 1841-1853.
- CALPOUZOS, L., and CHANG, HO-SHII., 1971.** Fungus spore germination inhibited by blue and far red radiation. *Plant Physiol.*, 47, 729-730.
- CASSELTON, L. A., and OLESNICKY, N. S., 1998.** Molecular genetics of mating recognition in Basidiomycete Fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62:55-70.
- CHANG, SHU-TING., and CHU, SZE-SHUEN., 1969.** Factors Affecting Spore Germination of *Volvariella volvacea*. *Physiologia Plantarum Abstracts*. 22 (4), 734-741.
- DIX, N. J., and WEBSTER, J., 1995.** Fungal Ecology. Chapman and Hall, Cambridge.
- ELLIOTT, T. J. and CHALLEN, M. P., Sept./1986.** Mushroom Mutant States. United States Patent-4.608.775. Current U. S. Class:800/297.
- ESSER, K., 1976.** Kryptogamen. Springer-Verlag, Berlin.

- GAAL, Ö., MEDGYESI, G. A. and VERECZKEY, L., 1980.** Electrophoresis in the Separation of Biological Macromolecules. A Wiley-Interscience Publication. New York. Toronto.
- GRANZIER, H. L. M. and WANG, K., 1993.** Gel Electrophoresis of Gland Proteins: Solubilization and Silver-Staining of Titin and Nebulin from Single Muscle Fiber Segments. *Electrophoresis*, 14: 56-64.
- GRAY, S., 1821.** *A Natural Arrangement of British Plants*, I, 634.
- GÜRGÜN, V. ve HALKMAN, K., 1990.** Gıda Teknolojisi Derneği, 2. Baskı, Yayın No: 7. s.146.
- HAMADA, H., NAMEKAWA, S., KASAI, N., NARA, T., KIMURA, S., SUGAWARA, F. and SAKAGUCHI, K., 2002.** Proliferating cell nuclear antigen from a Basidiomycete, *Coprinus cinereus*. *Eur. J. Biochem.*, 269, 164-174.
- KALMIŞ, E. and KALYONCU, F., 2006.** Variations in the isolates obtained from Basidiospores of commercial mushroom *Lentinula edodes* (*Shiitake*). *International Journal of Science & Technology*, Vol 1, No:2, 99-103.
- KAMADA, T., 2002.** Molecular genetics of sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus*. *BioEssay*, 24:449-459.
- KOTHE, E., 2001.** Mating-type genes for basidiomycete strain improvement in mushroom farming. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56:602-612.
- KRONSTAD, J. W., and STABEN, C., 1997.** Mating Type in Filamentous Fungi. *Annu. Rev. Genet.*, 31:245-76.
- KÜNTZER, H. M., REICHERT, A., SCHNEIDER, K. H. and GIFFHORN, F., 1994.** Isolation and Characterization of a L-glucitol Dehydrogenase from the Newly Isolated Bacterium *Pseudomonas* sp. *Ac. J. Biotechnol.*, 36: 157-164.
- KÜES, U., 2000.** Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol.64, No:2, 316-353.
- KÜES, U., JAMES, T. Y., VILGALYS, R. and CHALLEN, M. P., 2001.** The chromosomal region containing *pab-1*, *mip*, and the A mating type locus of

the secondarily homothallic homobasidiomycete *Coprinus bilanatus*. *Curr. Genet.*, 39:16-24.

- LARRAYA, L. PEÑAS, M. M., PÉREZ, G., SANTOS, C., RITTER, E., PISABARRO, A.G., and RAMÍREZ, L., 1999a.** Identification of incompatibility alleles and characterisation of molecular markers genetically linked to the A incompatibility locus in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr. Genet.*, 34:486-493.
- LARRAYA, L. M., PÉREZ, G., PEÑAS, M. M., BAARS, J. J. P., MIKOSCH, T. S. P., PISABARRO, A. G. and RAMÍREZ, L., 1999b.** Molecular karyotype of the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:3413-3417.
- LARRAYA, L. M., PÉREZ, G., IRIBARREN, I., BLANCO, J. A., ALFONSO, M., PISABARRO, A. G., and RAMÍREZ, L., 2001.** Relationship between monokaryotic growth rate and mating type in the edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:3385-3390.
- LEIGHTON, T. J. and STOCK, J. J., 1970.** Biochemical Changes During Fungal Sporulation and Spore Germination. *Journal of Bacteriology*, Volume 101, No. 3, 931-940.
- LIU, Y., 2001.** Fruiting body initiation in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. A dissertation submitted to the Swiss Federal Institute of Technology Zuerich for the degree of Doctor of Natural Sciences. DISS ETH Nr. 14084 Zurich.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., and SAMBROOK, J., 1982.** *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- MCLAUGHLIN, D.M., BECKETT, A. and YOON, K.S. 1985.** Ultrastructure and evolution of ballistosporic basidiospores. *Bot. J. Linnean Soc.* 91:253-271.
- O'SHEA, S. F., CHAURE, P. T., HALSALL, J. R., OLESNICKY, N. S., LEIBBRANDT, A., CONNERTON, I. F. and CASSELTON, L. A., 1998.** A large pheromone and receptor gene complex determines multiple B mating type specificities in *Coprinus cinereus*. *Genetics*, 148:1081-1090.
- PERBAL, B., 1984.** *A practical guide to molecular cloning*. A Wiley-Interscience Publication. U.S.A.

- PETROVSKA, B. B., PANOV, S., ZAFIROVSKA, D. R. and KULEVANOVA, S., 2004.** Electrophoretic study of mushroom proteins. *Food, Agriculture & Environment*, Vol 2(1): 148-152.
- PODULSO, J. F., 1980.** Molecular Weight Estimating Using SDS-Pore Gradient Electrophoresis. *Anal. Biochem*, 101: 394-406.
- RIQUELME, M., CHALLEN, M. P., CASSELTON, L. A. and BROWN, A. J., 2005.** The origin of multiple B mating specificities in *Coprinus cinereus*. *Genetics*, 170: 1105-1119.
- ROSS, I. K., MARTINI, E. M. and THOMAN, M., 1973.** Changes in Isozyme Patterns Between Monokaryons and Dikaryons of a Bipolar *Coprinus*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 114, No. 3, 1083-1089.
- RYBICKI, E. and PURVES, M., 1996.** SDS Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Dept Microbiology University of Cape Town. <http://www.mcb.uct.ac.za/sdspage.html>.
- SCHAEFFER, J., 1774.** *Mexic. Pl.*, 100. United Kingdom.
- SHERIDAN, J. E. and YEN, C. C., 1970.** A Note On The Effect Of Temperature And relative humidity on the germination of conidia of a New Zealand isolate of *Dothistroma pini* hulbary. *N. Z. J Bot.* 8: 658-660.
- SINGH, K. V. and AGRAWAL, S. C., 1982.** Nutritional requirements of keratinophilic fungi and dermatophytes for conidial germination. *Mycopathologia Abstracts*, 80(1): 27-32.
- SWIEZYNSKI, K.M. and DAY, P.R., 1960.** Heterokaryon formation in *Coprinus lagopus*. *Geriet Res Camb*, 1, 114-128.
- THEVELEIN, J. M., VAN ASSCHE, J. A., CARLIER, A.R. and HEREMANS, K., 1979.** Heat Activation of *Phycomyces blakesleeanus* Spores: Thermodynamics and Effect of Alcohols, Furfural, and High Pressure. *Journal of Bacteriology*, Vol. 139, No. 2: 478-485.
- TOWILL, L. S., 1978.** Temperature and Photocontrol of *Onoclea* Spore Germination. *Plant Physiol.*, 62, 116-119.
- TUNCER, M., 2001.** Mikoloji. Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü. Mersin.

- VESTERBERG, O., 1993.** A short history of electrophoretic methods. *Electrophoresis*, 14: 1243-1249.
- WALKER, J., WINDER, J., STARKEY, M., 1988.** Introductory Workshops on Techniques in Molecular Biology. Hatfield Polytechnic. Hatfield, Herts.
- WEBER, K., 1972.** Measurements of Molecular Weight by Electrophoresis on SDS Acrylamide Gel. *Methods in Enzymology*, 26: 3-27.
- WEBER, K., and OSBORN, M., 1969.** The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244: 4406.
- YAVER, D. S., OVERJERO, M. D. C., XU, F., NELSON, N. A., BROWN, S. H. and KAUPPINEN, S., 1999.** Molecular characterization of laccase genes from the Basidiomycete *Coprinus cinereus* and Heterologous expression of the laccase Lcc1. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 11, 4943-4948.
- ZOLAN, E. M., and PUKKILA, P. J., 1986.** Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 6, No. 1, 195-200.

[www.sydneyfungalstudies.org.au/images/commonFungi/coprinuscinereus04.jpg](http://www.sydneyfungalstudies.org.au/images/commonFungi/coprinuscinereus04.jpg)

(www-1).

[www.micologia.net/g3/Coprinus-cinereus/Coprinus\\_cinereus](http://www.micologia.net/g3/Coprinus-cinereus/Coprinus_cinereus)(www-2).

[www.floredefrance.com/view.asp?pnum=31128](http://www.floredefrance.com/view.asp?pnum=31128) (www-3).

[www.kinoko-ya.jp/01eng3/coprinus\\_cinereus1.htm](http://www.kinoko-ya.jp/01eng3/coprinus_cinereus1.htm) (www-4).

## ÖZGEÇMİŞ

24.09.1980 tarihinde Frankfurt da (Almanya) doğdu; ilköğretim ve ortaokulu Kayseri’de TED Koleji’nde, liseyi Mersin’de İçel Anadolu Lisesinde tamamladı. 2002 yılında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden mezun oldu. 2003 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans çalışmasına başladı. İlk ders yarıyılıının sonunda yabancı dilini geliştirmek üzere İngiltere’ye ve sonrasında da Hollanda’ya gitti. 2005 yılı Nisan-Ekim ayları arasında askerlik görevini yaptı ve 2005 yılında yüksek lisans çalışmasına kaldığı yerden tekrar başladı.