

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN *Tricholoma* (Fr) STAUDE CİNSİNE AİT
BAZI TÜRLERİN FİLOGENETİK KARAKTERİZASYONLARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Şuheda Sümeyye ALDEMİR
DANIŞMAN: Doç. Dr. Ayten DİZKIRICI TEKPINAR
İKİNCİ DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi İsmail ACAR

VAN-2018

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN *Tricholoma* (Fr) Staude CİNSİNE AİT
BAZI TÜRLERİN FİLOGENETİK KARAKTERİZASYONLARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Şuheda S. ALDEMİR

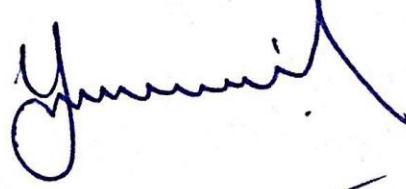
Bu çalışma VAN YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından FYL-2018-6864 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Ayten DİZKIRICI TEKPINAR danışmanlığında, Şuheda Sümeyye ALDEMİR tarafından sunulan "Türkiye'de Yayılış Gösteren *Tricholoma* (Fr) Staude Cinsine Ait Bazı Türlerin Filogenetik Karakterizasyonları" isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 17/12/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/ ~~oy çeklüğü~~ ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Yusuf UZUN



Üye : Doç. Dr. Ayten DİZKIRICI TEKPINAR



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Fidan




Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28./12./2018 tarih ve 2018/65-I sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Suat GENÇ
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.


Şuheda S. ALDEMİR

ÖZET

TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN *Tricholoma* (Fr) STAUDE CİNSİNE AİT BAZI TÜRLERİN FİLOGENETİK KARAKTERİZASYONLARI

ALDEMİR, S. Şuheda

Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayten DİZKIRICI TEKPINAR

Aralık 2018, 65 sayfa

Tricholoma (Fr) Staude cinsi Tricholomataceae familyasında sınıflandırılan ekonomik ve tıbbi değeri olan bir makrofungustur. Bu cinse ait morfoloik olarak tanımlanmış 16 tür ile 4 tanımlanamayan örneğin taksonomik ve evrimsel ilişkileri makroskobik (şapka, sap ve lamel), mikroskobik (spor, bazidyum, bazidyol ve marjinal hücreler) ve moleküler karakterler kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan *Tricholoma* türlerine ait örneklerin filogenetik ilişkileri, nükleer DNA'ya ait iki farklı gen bölgesinin [ITS (İnternal Transcribed Spacer) ve LSU (Large Subunit)] çoklu dizi analizleri yapılarak belirlenmiştir. Türler arası evrimsel akrabalık ilişkileri, oluşturulan filogenetik ağaçlar yardımıyla değerlendirilmiş, makroskobik ve mikroskobik karakterler kullanılarak yapılan teşhisleri destekleyip desteklemediği araştırılmıştır. Kullanılan iki bölgeden ITS bölgesi en fazla varyasyon gösteren ve tür ayrımında daha belirleyici olan bölge olmuştur. Yapılan değerlendirmeler sonucunda teşhis edilen ve analizi yapılan tüm örneklerin *Tricholoma* alt cinsine ait oldukları ve bu alt cins içerisinde dört seksiyona (*Genuina*, *Caligata*, *Tricholoma* ve *Terrea*) ayrıldıkları belirlenmiştir. *Genuina* seksiyonu içerisinde yer alan *Tricholoma* sp. T.184 ve *Tricholoma* sp. T.685 örnekleri ile *Terrea* seksiyonunda yer alan *Tricholoma* sp. T.17 ve *Tricholoma* sp. T.718 örneklerinin makroskobik, mikroskobik ve moleküler verilere dayanarak dünya mikotası için yeni türler olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Filogeni, ITS, LSU, Makrofungus, *Tricholoma*.



ABSTRACT

PHYLOGENETIC CHARACTERIZATIONS OF SOME SPECIES OF *Tricholoma* (Fr) STAUDE GENUS FOUND IN TURKEY

ALDEMİR, S. Şuheda

M. Sc. Thesis, Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayten DİZKIRICI TEKPINAR

December 2018, 65 pages

Tricholoma (Fr) Staude is a macrofungus that classified in the Tricholomataceae family which has economic and medicinal values. Taxonomic and evolutionary relationships of 16 species and 4 undetermined samples were tried to study by using macroscopic (pileus, stipe and lamellae), microscopic (spores, basidium, basidol and marginal cells) and molecular characters. The phylogenetic relationships of *Tricholoma* species collected from different regions of Turkey were determined by performing multiple sequence analysis of two different nuclear DNA regions [ITS (Internal Transcribed spacer), LSU (Large subunit)]. Evolutionary relationships among species were evaluated by using phylogenetic trees and investigated whether they support the species identifications which were done based on morphological characters. ITS was the region carrying more variations and having more discrimination value. At the end of study, it was observed that all identified and analyzed samples were found into four sections (*Genuina*, *Caligata*, *Tricholoma* and *Terrea*) of *Tricholoma* subgenus. *Tricholoma* sp. T.184 and *Tricholoma* sp. T.685 samples in the sect. *Genuina*, *Tricholoma* sp. T.17 and *Tricholoma* sp. T.718 samples in the sect. *Terrea* are inferred as new species for the world mycota based on macroscopic, microscopic and molecular data set.

Keywords: Phylogeny, ITS, LSU, Macrofungus, *Tricholoma*.



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının planlanması, araştırılması, yürütülmesi ve oluşumunda engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ayten DİZKIRICI TEKPINAR başta olmak üzere, arazi çalışmaları, mantarların teşhisi ve morfolojik analizlerin yapılması esnasında tecrübe ve deneyimlerini esirgemeyen, her türlü desteğiyle yanımda olan, çalışmalarına yön veren ve bana mantar konusunu sevdiren yardımcı danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi İsmail ACAR'a, tez çalışmamda mantar örneklerini aldığım Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fungarium ekibine ve çalışmamın bütün aşamalarında yanımda olan, yardımlarını eksik etmeyen, motivasyon kaynağım ve destekçim Arş. Gör. Ayşenur KALMER'e teşekkürü borç bilirim. Çalışmam boyunca manevi desteklerini eksik etmeyen değerli arkadaşlarıma ve bu çalışmayı FYL-2018-6864 No'lu proje olarak destekleyen Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne (BAPK) teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi desteklerini tüm hayatım boyunca esirgemeyen, sonsuz özveride bulunan sevgili aileme, özellikle de hayatımın her döneminde bana olan inancından dolayı canım annem Nurcan ALDEMİR'e şükranlarımı sunarım.

2018

Şuheda Sümeyye ALDEMİR



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
EKLER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Morfolojik Çalışmalar	15
3.2. Moleküler Çalışmalar	18
3.2.1. DNA izolasyonu	18
3.2.2. Analiz edilen gen bölgeleri	20
3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	22
3.2.4. Agaroz jel elektroforezi	24
3.2.5. DNA dizileme ve filogenetik aşamalar	25
4. BULGULAR	27
4.1. Morfolojik Değerlendirme	27
4.2. Moleküler Değerlendirme	34
4.2.1. Gen bölgelerinin çoğaltılması	34
4.2.2. Dizi verilerinin tanımlanması	36
4.2.3. Çoklu dizi hizalama	38

4.3. Filogenetik Analiz	39
4.3.1 <i>Genuina</i> seksiyonunun filogenetik analizi.....	41
4.3.2 <i>Megatricholoma</i> seksiyonunun filogenetik analizi.....	43
4.3.3. <i>Tricholoma</i> seksiyonunun filogenetik analizi.....	43
4.3.4. <i>Caligata</i> seksiyonunun filogenetik analizi	43
4.3.5. <i>Terrea</i> seksiyonunun filogenetik analizi	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	49
5.1. <i>Genuina</i> Seksiyonun Filogenetik Değerlendirilmesi.....	50
5.2. <i>Megatricholoma</i> Seksiyonunun Filogenetik Değerlendirilmesi	53
5.3. <i>Tricholoma</i> Seksiyonunun Filogenetik Değerlendirilmesi	54
5.4. <i>Caligata</i> Seksiyonunun Filogenetik Değerlendirilmesi.....	54
5.5. <i>Terrea</i> Seksiyonunun Filogenetik Değerlendirilmesi.....	55
KAYNAKLAR	57
EKLER	63
ÖZ GEÇMİŞ	65

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1. 1. <i>Tricholoma</i> cinsinin klasik sınıflandırılması.....	3
Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan <i>Tricholoma</i> türleri, fungaryum numaraları, lokasyonları, toplanma tarihleri ve buldukları seksiyonlar.....	16
Çizelge 3. 3. ITS bölgesini (ITS1+5.8S+ITS2) amplifiye etmek için kullanılan primer çifti ve nükleotit dizileri.....	20
Çizelge 3. 4. LSU bölgesini amplifiye etmek için kullanılan primer çifti ve nükleotit dizileri.....	21
Çizelge 3. 5. Çalışılan gen bölgeleri ve örnekler için reaksiyon hacimlerine göre belirlenmiş optimum PZR sıcaklık koşulları.....	23
Çizelge 4. 1. Tüm sekanslar (NCBI örnekleri dahil) kullanılarak elde edilen ITS ve LSU bölgelerinden hesaplanan moleküler çeşitlilik parametreleri.....	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3. 1. <i>Tricholoma</i> cinsine ait çalışılan türlerin Türkiye'deki yayılışını gösteren harita.....	18
Şekil 3. 2. ITS gen bölgesinin şematik gösterimi.	20
Şekil 3. 3. LSU gen ve D1-D2 bölgelerinin şematik gösterimi.	21
Şekil 4. 1. <i>Tricholoma</i> sp. T.17 örneğine ait makroskobik ve mikroskobik veriler.	28
Şekil 4. 2. <i>Tricholoma</i> sp. T.184 örneğine ait makroskobik ve mikroskobik veriler.	29
Şekil 4. 3. <i>Tricholoma</i> sp. T.685 örneğine ait makroskobik ve mikroskobik veriler.	30
Şekil 4. 4. <i>Tricholoma</i> sp. T.718 örneğine ait makroskobik ve mikroskobik veriler.	31
Şekil 4. 5. Çalışılan örneklerin ITS bölgelerine ait PZR ürünlerinin bant profilleri	35
Şekil 4. 6. Çalışılan örneklerin LSU bölgelerine ait PZR ürünlerinin bant profilleri.....	35
Şekil 4. 7. ITS gen bölgesine ait sekansın kromatogram görüntüsü.	36
Şekil 4. 8. LSU gen bölgesine ait sekansın kromatogram görüntüsü.	37
Şekil 4. 9. Çalışılan <i>Tricholoma</i> örneklerinin ITS gen bölgesine ait hizalanmış	38
Şekil 4. 10. Çalışılan <i>Tricholoma</i> örneklerinin LSU gen bölgesine ait hizalanmış.....	39
Şekil 4. 11. ITS gen bölgesine ait ML metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç.	46
Şekil 4. 12. LSU gen bölgesine ait ML metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç.	47



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

H₂O

Su

ml

Mililitre

mM

Milimolar

MgCl₂

Magnezyum Klorür

rpm

Dakikadaki devir sayısı

V

Hacim (Volume)

V

Volt

µl

Mikrolitre

µm

Mikrometre

gr

Gram

Kısaltmalar

Açıklama

ATP6

Adenozin Trifosfat 6 Subunit

bç

Baz Çifti

BLAST

Basic Local Alignment Search Tool

CTAB

Cetil Trimetil Ammonio Bromuro

dk

Dakika

DNA

Deoksiribonükleik Asit

dNTP

Deoksiribonükleotit Trifosfat

EDTA

Ethylenediaminetetraacetic Acid

GAPDH

Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

gpd

Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

Kısaltmalar

Açıklama

IGS	Intergenic Spacer
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
ITS	Internal Transcribed Spacer
LSU	Large Subunit
MegB1	Macroevolutionary Genomic Marker
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
ML	Maksimum Likelihood
MP	Maksimum Parsimony
NCBI	National Center of Biotechnology Information
nDNA	Nükleer Deoksiribonükleik Asit
nSSU	Nükleer Small Subunit
pH	Hidrojen Gücü
PVP	Polyvinylpyrrolidone
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonları
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonükleik Asit
rDNA	Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
RPB1	RNA Polymerase Largest Subunit
RPB2	RNA Polymerase Second Largest Subunit
TAE	Tris Asetat EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA
TEF1	Translation Elongation Factor 1 Alpha
tef	Translation Elongation Factor
VANF	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Fungaryumu

EKLER DİZİNİ

Ek 1. Örneklerin DNA konsantrasyonları ve saflıkları ile ölçüm tarihleri.....63





1. GİRİŞ

Filogenetik, organizmaların evrimsel tarihini, ilişkilerini ve soyağaçlarını temsil eden ağaç benzeri diyagramlar kullanarak inceleyen bir bilim dalıdır. Evrimsel ayrılığı temsil eden ağaç dallanma desenleri filogeni olarak adlandırılır. Filogenetik çeşitli şekillerde çalışılabilir, örneğin mevcut türlerin ataları ve ayrılma zaman çizelgesi hakkında morfolojik bilgiler içeren fosil kayıtlar kullanılabilir. Bununla birlikte, fosil kayıtları sneyseadece belirli türler için mevcut olduğundan çalışma alanlarında birçok sınırlamalar da görülebilir. Ayrıca, morfolojik özelliklerin tanımlamaları ve sınırları da çoklu genetik faktörlere bağlı olarak belirsizlik gösterebilir. Bu nedenle filogenetik ilişkileri saptamak için sadece fosil kayıtlarını kullanmak taraflı yani önyargılı olabilmektedir (Nei ve Kumar, 2000). Organizmaların evrimleşmesi süresince fenotipik değişimlere neden olan mutasyonları biriktirdiği için, DNA ve protein dizileri mevcut organizmaların evrimsel perspektiflerini verebilir (Simon ve Weiß, 2008). Genler birikmiş mutasyonları kaydetmiş olduğundan moleküler fosiller olarak hizmet edebilirler. Moleküler fosillerin ilgili organizmalardan karşılaştırmalı analizi yoluyla genlerin ve hatta organizmaların evrimsel tarihi açıkça ortaya çıkarılabilir. Moleküler veriler, fosil kayıtlarından daha fazla ve elde edilmesi kolaydır. Gerçek fosil kayıtlarındaki boşlukları doldurmaya yardımcı olan örnekleme önyargısı yoktur bu sayede moleküler verilerle daha net ve sağlam filogenetik ağaçlar inşa edilebilir. Araştırmacılar için moleküler veriler, evrimsel tarihi tekrar yapılandırmak için popüler ve bazı durumlarda eldeki tek verilerdir (Roy ve ark., 2014).

Moleküler filogenetik, moleküler biyoloji tekniklerinin gelişmesiyle birlikte 20. yüzyılın başlarında ortaya çıkmıştır (Dowell, 2008). Genomik çağın muazzam miktarlarda moleküler dizi verisi ortaya çıkarması, moleküler filogenetiğin bu denli hızlı gelişmesini sağlamıştır. Moleküler filogenetik, dizilerdeki çeşitli mutasyonları analiz ederek ve biyomoleküllerin evrimsel bağlılıkları hakkında hipotezler geliştirerek genlerin ve diğer biyolojik makromoleküllerin evrimsel ilişkilerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir (Roy ve ark., 2014). Moleküllerin dizi benzerliğine dayanarak organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiler çoğu zaman belirlenebilir. Bu organizmalardan biri de mantarlardır. Son yirmi yılda moleküler filogenetik ve

filogenomik alanındaki çalışmalar mantar sistematigi çalışmalarını büyük ölçüde değiştirmiş ve yeni bir bakış açısı kazandırmıştır (Wang ve ark., 2009). Dolayısıyla günümüz mantar sistematik çalışmalarında makroskobik ve mikroskobik verilerle birlikte moleküler veriler de kullanılmaktadır.

Myces=Mycos=Mantar ve Logy=Bilim kelimelerinin bir araya gelmesiyle oluşan Mikoloji terimi mantar bilimi olarak adlandırılmaktadır. Mikoloji terimi ilk defa 1836'da MJ Berkeley tarafından kullanılsa da bu alandaki çalışmalar çok daha eskiye dayanmaktadır. İngilizcede 'fungus' kelimesinin kullanımı ise 16. asrın başlarına dayanmaktadır (Ainsworth, 2009). Fungus veya mantar olarak adlandırılan organizmalar; ökaryotik, klorofilsiz, genel olarak iplikli yapıda olan, eşeyli ve eşeysiz üreyebilen, spor meydana getiren, heterotrof olarak beslenen, genellikle çeperleri kompleks karbonhidratlar ile kitin, selüloz veya her ikisini de yapılarında bulunduran canlılardır (Acar, 2017). Organik maddeleri parçalayarak karbon ve mineral döngülerinde çok önemli roller üstlenmektedirler. Milyonlarca ton organik artığı bir yıl içinde bileşenlerine ayırdıkları tahmin edilmektedir (Landecker, 1996). Canlılar dünyasının ayrı bir alemi olan mantarlar, morfolojik ve fizyolojik özellikleri bakımından çok çeşitlilik gösterirler. Doğada bol miktarda bulunan ve ökaryot olan mantarlar ekosistemin en önemli üyelerinden biridir. Coğrafi konumu ve ekolojik çeşitlilik yönünden zengin olan ülkemiz, mantar çeşitliliği ve bolluğu bakımından oldukça verimlidir. Ekolojik koşulların özellikle sıcaklık ve nemin uygun olduğu dönemlerde orman toprağında, çayırarda, bahçelerde, canlılığını yitirmiş bitki parçaları üzerinde, organik maddece zengin zeminlerde yetişmektedirler. Bilindiği gibi mantarlar klorofil içermediklerinden, bağımsız olarak şeker, yağ ve nişasta gibi organik maddeler oluşturamazlar. Bu nedenle diğer canlılara ihtiyaç duyarlar ve simbiyont olarak yaşamlarını sürdürürler. Yani başka canlılarla karşılıklı besin elementleri sağlayarak beslenirler. Bu simbiyotik ilişkinin en önemli örneklerinden biri mikorizal birlikteliklerdir. Simbiyotik yaşam alanı içerisinde enfeksiyonun gerçekleşmesi sonucunda, bitki mantara enerji kaynağı olarak fotosentezden elde ettiği karbonu, mantar ise bitkiye besin elementleri ve su sağlamaktadır (Marschner, 1995). Mantarlar genellikle miselleri aracılığı ile besin ve su alımını artırarak bitkilerin büyümesini, gelişmesini ve dolayısıyla kök canlılığının devamını sağlamaktadır. Mikoriza ayrıca

rizosferdeki patojenlere ve stres faktörleri olarak kabul edilen aşırı sıcaklık, kuraklık, ağır metal zehirlenmesi ve tuzluluğa karşı da bitkiyi korumaktadır (Nedelin, 2014). Mikorizalar kökte oluşturdukları morfolojik yapıları söz konusu olduğunda ektomikorizalar ve endomikorizalar olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Bu tez çalışmasını oluşturan *Tricholoma* (Fr.) Staude cinsi mantarlar da genellikle ektomikorizal mantarlar olup (Sanchez-Garcia ve Matheny, 2017), mantar aleminin iki büyük grubundan biri olan Basidiomycota Bölümü'ne ait, Agaricales Ordosu'nun, Tricholomataceae Familyası'nda yer almaktadır (Çizelge 1.1).

Agaricales ordosu'nun en büyük familyalarından biri olan Tricholomataceae familyası son derece polifiletik gruplara sahip olmasına karşın *Leucopaxillus*, *Tricholoma*, *Pseudotrachelium*, *Porpoloma*, *Dennisomyces*, *Corneriella*, *Albomagister* ve *Melanoleuca* cinslerinin monofiletik gruplar oldukları düşünülmektedir (Sanchez-Garcia ve ark., 2014; Kalmer, 2016). Familya üyelerinin spor baskıları genellikle beyaz, krem rengi, açık krem pembe, soluk mor, açık yeşil veya soluk gri renkli, amiloid ya da inamyloid gibi özelliklere sahiptirler. Lamellerin sapa bağlanma şekilleri; adnexed, adnat, sinuat ya da dekurvent şeklinde olabilmektedir. Lamel yapısı ise düzenli, yarı düzenli ya da düzensizdir (Sanchez-Garcia ve ark., 2014).

Çizelge 1.1. *Tricholoma* cinsinin klasik sınıflandırılması (Anonim, 2018)

Takson basamakları	
Alem	Fungi
Alt alem	Dikarya
Bölüm	Basidiomycota
Alt bölüm	Agaricomycotina
Sınıf	Agaricomycetes
Alt sınıf	Agaricomycetidae
Ordo	Agaricales
Familya	Tricholomataceae
Cins	<i>Tricholoma</i>

Famlyya üyelerinden sadece *Tricholoma* ve *Albomagister* cinsleri inamyloid sporlara sahiptir ve yalnız *Tricholoma* cinsi kelepçe bağlantıları olmayan bazı türler içerir (Riva, 2003; Besette ve ark., 2013; Christensen ve Heilmann-Clausen, 2013).

Mantarlar aleminin sınıflandırılması çalışmaları oldukça eskidir. 2004 yılında başlatılan ve günümüzde de devam eden AFTOL (Assembling the Fungal Tree of Life) adı verilen bir veritabanı ile mantarların moleküler seviyede sınıflandırılması hedeflenmiştir (Hibbett ve ark., 2007). Bu alanda gerçekleşen ilk gelişme 1990'ların başında PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile ribozomal RNA (rRNA) genlerinin amplifiye edilmesi ve analizidir (Hibbett ve ark., 2007). Ribozomal gen bölgeleri tüm canlı soylarında bulunan ve evrimsel anlamda uzun zamandır korunan genlerdir. Bu genler evrimsel olarak çok eskidirler ve yatay gen transferi (birbirleriyle ilişkisiz organizmalar arasında genlerin geçmesi) göstermeden veya çok az göstererek tüm canlı soylarında bulunurlar (Woese ve Olsen, 1993). Bu nedenle taksonomik ve tür teşhisi çalışmalarında rRNA gen bölgeleri yaygın biçimde kullanılmaktadır (Abd-Elsalam ve ark., 2003). Ribozomal bölgelerden özellikle transkribe edilen iç aralayıcı bölgeler (internal transcribed spacers, ITS1-ITS2) ve büyük alt birim bölgesi (large subunit LSU, D1/D2 altbölgeleri) birçok türün moleküler seviyede tanımlanmasında tercih edilmektedir (Hinrikson ve ark., 2005). Bu gen bölgeleri ekzonik ve intronik bölgeler içerdiği için filogenetik çalışmalarda kullanılabilir gen bölgelerindedir. Ökaryotik bir polipeptidi kodlayan DNA dizisi, kodlama yapan bölgeler arasına yerleşen kodlama yapmayan nükleik asit parçalarından oluşur. Aminoasitlere, rRNA'lara ve tRNA'lara tercüme edilen gen bölgeleri ekzon, tercüme edilmeyen bölgeler ise intron olarak adlandırılır (Campbell ve Reece, 2010). İntronların farklı ekzon kombinasyonlarına neden olarak evrimsel süreçte yeni genlerin ve proteinlerin oluşumunda rol aldıkları söylenmektedir (Anonim, 2018).

Tricholoma cinsinin ortaya çıkışı oldukça eskidir. Bu cinse ait çeşitlilik ilk olarak Eosen Dönemi'nin sonlarına doğru başlamıştır. Bu zaman diliminden sonra dünya iklimi sıcaktan ılımana doğru değişmiş ve *Tricholoma* cinsine ait mantarlar tropikal ormanlardan ziyade ılıman ormanlarda bazı ağaçlarla (*Quercus* L., *Betula* L., *Picea* A. Dietrich ve *Pinus* L.) ektomikorizal olarak baskın bir yayılış göstermeye başlamıştır (Sanchez-Garcia ve Matheny, 2017). *Tricholoma* ile ilgili ilk yazılı bilgilere

çok eski çağlardan beri bu mantara önem veren Japonya’da rastlanmaktadır. Japon yemek kültüründe mantarlar 1000 yıldan daha fazla bir süredir yer almaktadır. *Tricholoma* mantarları sadece Japon sofralarını süsleyen bir mantar cinsi olmaktan ziyade, kültürel ve dinsel anlamda da ayrı bir öneme sahiptirler (Hosford ve ark. 1997). Tarihsel olarak milattan sonra 759 yıllarında yazılmış bir şürde *Tricholoma*’nın (Japonya’daki ismi “Matsutake”) önemli ve insan sağlığı açısından faydalı bir gıda maddesi olduğundan övgüyle bahsedilmektedir. 13. ve 17. yüzyıllarda ise bu mantar asaletin ve zenginliğin bir göstergesi olmuştur. Toplumda önemli bir yere sahip kişiler birbirlerine özel günlerde veya yaptıkları özel ziyaretlerde bu mantarı hediye olarak götürmüşlerdir. “Matsutake”, verilen kişi için çok özel bir hediyedir ve onu alan kişinin bu hediyeye ait anyı uzun yıllar kalbinde yaşattığı belirtilmektedir. Aynı yüzyıllarda Japon sarayında sadece hükümdarın ve yakın çevresinin bu mantarı yemesine izin verilmiş, diğer saray çalışanlarına mantarı tüketmeleri yasaklanmıştır. 20. yüzyılın başlarına kadar *Tricholoma* verimliliğin, üretkenliğin ve mutluluğun bir simgesi olarak görülmüştür. Japon halkı günümüzde de bu mantar türüne çok önem vermektedir. Bu sebepten *Tricholoma* dünyanın birçok bölgesinden ve ülkemizden toplanarak Japonya’ya ihraç edilmektedir (Kalmış ve ark., 2009).

Doğada yaygın olarak yetişen *Tricholoma*, arazi koşullarında çeşitli makroskobik özellikleri ile diğer cinslerden ayırt edilebilmektedir. Özellikle, büyük ve etli bazidyokarp yapısı, emerginat (lamellerin içeri doğru bir çentik oluşturarak sap ile bağlandığı lameller) lamel bağlantısı ve merkezi silindirik sap yapısı bu cinsin karakteristik özellikleri arasındadır. Genellikle şapka yapısı beyaz, sarı, gri ve kırmızimsı, kırmızimsı-kahverengi, krem-kahverengi, siyahımsı-kahverengi tonlarda iken beyaz, sarı veya grimsi lamel renklerine sahiptir (Galli, 1999; Christensen ve Heilmann, 2013; Heilmann-Clausen ve ark., 2017). *Tricholoma* cinsi inamyloid spor yapısı ile karakterizedir (Singer, 1986). Sporları bazidyum denen yapılar üzerinde bulunur ve bu şekilde bulunan sporlar bazidyosporlar olarak adlandırılır. Bu makroskobik ve mikroskobik yapılar türlerin teşhisinde kullanılmaktadır. Bazidyokarp denen yapı makrofungusun tüm dış karakterlerini baz almaktadır. Bazidyumlar üzerinde sporlar bulunur ve Basidiomycetes sınıfına ait tüm mantarlarda bu yapı mevcuttur (Moretti, 2016). *Tricholoma* türlerinin büyük bölümü unsu kokuya sahipken, çiçeksi,

sabun benzeri, kokuşmuş ve baharatlı koku karakterlerine sahip taksonlar da vardır. Fakat, *Tricholoma caligatum* (Viv.) Ricken ve *T. magnivelare* (Peck.) Redhead gibi çiçeksi kokuya sahip olan türlerin tadı da çiçeksi ve parfüm benzeridir (Galli, 1999; Christensen ve Heilmann-Clausen, 2013). Bu cinse ait makrofunguslar, yenilebilen ve yenilemeyen türleriyle ülkemizde dağılım göstermektedir. *Tricholoma populinum* J.E. Lange, *T. vaccinum* P. Kumm, *T. imbricatum* (Fr.) P. Kumm., *T. terreum* (Schaeff.) P. Kumm., *T. portentosum* (Fr.) Quél. ve *T. caligatum* (Viv.) Ricken türlerinin yenilebildiği bildirilmiştir (Boa, 2004). Ayrıca, *Tricholoma fracticum* (Britzelm.) Kreisel gibi bazı türler zehirli olmamasına rağmen tadlarının acı olmasından dolayı besin maddesi olarak tercih edilmemektedir (Alı ve Şen, 2016).

Tricholoma türlerine ait morfolojik yapılar çevre faktörlerinden çok fazla etkilenmektedir (Bon, 1991). Bu sebeple özellikle tür tanımlaması farklı morfolojik karakterlerin sınırlı olması nedeniyle kolay değildir. Morfolojik karakterleri bakımından diğer cinslerden arazi koşullarında kolaylıkla ayırt edilebilmesine rağmen, morfolojik karakterlerinin benzer olması bakımından tür düzeyinde tayini oldukça zordur (Alı ve Şen, 2016). *Tricholoma*, pileipellis (şapka derisi) yapılarının oldukça benzer olması, küresel, yarı küresel, silindirik, hiyalin sporlar ihtiva etmesi gibi mikroskobik olarak sınırlı varyasyonlar gösterirler. Bu nedenle, tür tanımlama ve kısmen de infragenerik sınıflandırma makromorfolojiye dayanmaktadır (Heilmann-Clausen ve ark. 2017).

Singer (1986), *Tricholoma* cinsini şapka rengi, pileipellis yapısı, kelepçe bağlantılarının olup olmaması gibi özelliklerine göre dört alt cinse bu alt cinsleri de dokuz seksiyona ayırmıştır [alt cins *Contexocutis* (seksiyon *Rigida*), alt cins *Parinicutis*, alt cins *Sericeicutis* (seksiyon *Inamoena*, seksiyon *Lasciva*), alt cins *Tricholoma* (seksiyon *Terrea*, seksiyon *Tricholoma*, seksiyon *Imbricata*, seksiyon *Albobrunnea*, seksiyon *Caligata*, seksiyon *Megatracholoma*)]. Bu taksonomik ayırım Kibby (2010) tarafından da desteklenmiştir. Ancak Noordeloos ve Christensen (1999) *Tricholoma* cinsinin yedi seksiyona ayrıldığını savunduğu için Christensen ve Heilmann-Clausen (2013) tarafından yapılan moleküler çalışmalarla yedi seksiyona ayrıldığı doğrulanmıştır. Cins içindeki taksonomik karmaşa bu çalışma ile de tam anlamıyla netleştirilememiştir. Bu nedenle cins üzerinde yapılan çalışmalar devam etmiş ve son zamanlarda yapılan moleküler revizyon çalışmasıyla bu problem kapsamlı olarak ele alınarak seksiyon

sayısı değiştirilmiştir. Bu alanda en kapsamlı çalışmalardan biri Heilmann-Clausen ve ekip arkadaşlarıyla 2017 yılında Kuzey Avrupa'da kapsamlı bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada şapka rengi, pileipellis yapısı, kelepçe bağlantılarının mevcudiyeti, sporların büyüklüğü ve şeklinin seksiyonların geçerliliğini destekleyen oldukça sabit karakterler olduğunu belirtmiş ve annulus ile annular zon olup olmamasına göre on seksiyona (*Tricholoma*, *Caligata*, *Sericella*, *Lasciva*, *Pardinicutis*, *Genuina*, *Megatracheloma*, *Contextocutis*, *Atrosquamosa*, *Terrea*) ayırmıştır. Yapılan bu çalışmalara rağmen cins içerisinde birçok taksonomik problem hala devam etmektedir. Morfolojik karakterlerin çok benzer olması, türler ve seksiyonlar arasında taksonomik sınırların belirlenememesi, cinse ait bazı bireylerin henüz teşhis edilememiş olması, tür teşhisinde net bir tanımlama sağlanamaması ya da tanımlanan bireylerde hala şüphelerin var olması gibi önemli problemler bulunmaktadır.

Ülkemizde 54 türünün tespit edildiği *Tricholoma* cinsinin (Vizzini ve ark. 2012; Sesli ve Denchev, 2014; Solak ve ark., 2015; Demirel ve Koçak, 2016; şen ve ark. 2018) dünyada yaklaşık 959 türü mevcuttur (Anonim, 2018).

Bu tez çalışmasının amacı, Türkiye'de moleküler seviyede çok az çalışılan ve henüz kapsamlı olarak ele alınmamış olan *Tricholoma* cinsine ait tanımlanmış 16 türü temsil eden 27 örnek ile 4 tanımlanamayan örneğin makroskobik ve mikroskobik karakterler kullanılarak teşhis edilmesi ve sonrasında farklı gen bölgelerinin DNA dizileri ile filogenetik ağaçlar çizdirilerek taksonlar arası akrabalık ilişkilerinin belirlenmesidir.



2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Dünya çapında *Tricholoma* cinsine ait birçok moleküler çalışma mevcutken, ülkemizde yok denecek kadar az çalışma bulunmaktadır. Genellikle makroskobik ve mikroskobik özellikler kullanılarak türlerin teşhisi yapılmıştır. Moleküler çalışmaların çoğu yeni türlerin teşhisini kapsamaktadır (Sesli, 2014; Sesli ve ark., 2018). Konu ile ilgili çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Intini ve ark. (2003) tarafından *Tricholoma anatolicum* türüne ait örneklerin ITS sekans analizleri yapılmış ve morfolojik farklılıklara dayandırılarak Türkiye'den Dünya Mikobiyotası'na yeni tür olarak kazandırılmıştır. *Tricholoma anatolicum* ülkemiz için endemik olduğu düşünülen ve halk tarafından toplanıp yenilen hatta ticareti yapılan bir mantar olduğu için de önem taşımaktadır. İlban (2011) tarafından yapılan analizler ile *T. caligatum* ve *T. anatolicum* türlerinin birbirlerine %55 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ele alınan bu iki türün morfolojik ve genetik açıdan farklı türler olduğu bildirilmiştir. Çoğunlukla genetik açıdan belirgin farkları olan taksonlar ayrı türler olarak değerlendirilse de aradaki genetik farklılığın yetiştirme yerine bağlı doğal seleksiyonun bir sonucu olabileceği vurgulanarak bu iki taksonun aynı türe ait farklı varyeteler olabileceği de belirtilmiştir.

Sanchez-Garcia ve ark. (2014) tarafından nükleer small subunit (nSSU), nükleer large subunit (nLSU), RNA Polymerase II Largest Subunit (RPB2) ve ITS bölgeleri kullanılarak Tricholomataceae familyasının yeni üyelerinden olan *Albomagister*, *Corneriella*, *Pogonoloma* ve *Pseudotrachelomyces* cinsleri çalışılmıştır. Maksimum Likelihood ve Bayesian programları kullanılarak oluşturulan kladogramda bu familyanın popüler cinsleri olan *Tricholoma*, *Dennisiomyces* ve *Leucopaxillus* cinslerinin tricholomatoid kladında yer aldığı ve *Tricholoma* cinsinin *Leucopaxillus* cinsine yakın ve monofiletik olduğu açıkça gösterilmiştir.

Vizzini ve ark. (2015) tarafından Türkiye'den yeni tür olarak bulunan *Gymnopus trabzonensis* ve *Tricholoma virgatum* var. *fulvoubonatum* türlerinin morfolojik ve moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. ITS bölgesi kullanılarak Maksimum Likelihood ve Bayesian programlarıyla oluşturulan kladogramda *Tricholoma virgatum* var. *fulvoubonatum* türünün *Tricholoma* seksiyonunda olduğu açıkça gösterilmiştir.

Heilmann-Clausen ve ark. (2017) tarafından Kuzey Avrupa'da bulunan üç yeni *Tricholoma* türü (*Tricholoma boreosulphurescens*, *T. bryogenum* ve *T. ilkkae*) morfolojik ve moleküler verileri kullanarak tanımlanmıştır. ITS DNA sekans verileri kullanılarak Bayesian ve Maksimum Likelihood metodlarıyla oluşturdukları kladogramda tanımlanan yeni türlerden *T. boreosulphurescens* türü; *Sericeicutis* alt cinsi ve *Lasciva* seksiyonu içinde, *T. bryogenum* türü; *Sericeicutis* alt cinsi ve *Sericella* seksiyonu içerisinde, *T. ilkkae* türü ise *Tricholoma* alt cinsi ve *Caligata* seksiyonu içerisinde tanımlanmıştır. Ayrıca alt cins, seksiyon ve tür seviyelerinde oluşturdukları bu ağaçta *T. virgatum* türünün *Atrosquamosa* seksiyonu yerine *Tricholoma* seksiyonunda yer aldığı, *T. focale* türünün ise *Caligata* seksiyonu yerine *Genuina* seksiyonunda yer aldığı açıkça göstermişlerdir. *Tricholoma* cinsinin durumunu açıklığa kavuşturmak için ek moleküler verilere ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır.

Şen ve ark. (2018) tarafından Türkiye Mikobiyotası için yeni kayıt olarak verilen *Tricholoma bonii* türü üzerine moleküler ve morfolojik çalışmalar yapılmıştır. ITS gen bölgesi kullanılarak oluşturulan kladogramda *T. bonii* türünün taksonomik olarak aynı seksiyonda (*Terrea*) yer alan *T. triste* ve *T. terreum* türleriyle yakınlık gösterdiği belirlenmiştir.

Daha önceki kısımlarda da bahsedildiği gibi Türkiye'de *Tricholoma* cinsine ait türlerle yapılmış olan moleküler çalışmalar oldukça azdır. Filogenetik çalışmalarla elde edilen sonuçların bilim dünyasıyla paylaşılabilmesi için sekansların bazı diğer bilgilerle beraber (tür isimleri, çalışma yeri, çalışan bilim insanları isimleri v.b.) mutlaka NCBI veri tabanına girilmesi gereklidir. Literatür taramasında ve NCBI veri sisteminde bulunan bazı araştırmalar aşağıda özetlenmiş şekilde verilmiştir.

1. *Tricholoma albobrunneum* / *Tricholoma aurantium*: Osmundson ve ark. (2013) tarafından İtalya'daki Tarihi Tabiat Müzesi'nde *T. albobrunneum* ve *T. aurantium* türleri dahil olmak üzere yaklaşık 6000 makrofungal örneğin ITS gen bölgesi çalışılarak DNA barkodlaması yapılmıştır. Ayrıca Heilmann-Clausen ve arkadaşları tarafından da 2017 yılında bu türler çalışılmış olup, türlerin *Tricholoma* alt cinsinin *Genuina* seksiyonunda, yer aldığı gösterilmiştir.

2. *Tricholoma batschii*: Heilmann-Clausen ve ark. (2017) tarafından ITS gen bölgesi çalışılmıştır. Bu türün Bayesian ve Maksimum Likelihood metodlarıyla

oluşturdukları kladogramda *Genuina* seksiyonunda yer aldığı açıkça gösterilmiştir.

3. *Tricholoma cedretorum*: Heilmann-Clausen ve ark. (2017) tarafından Kuzey Avrupa'da bulunan *Tricholoma* cinsine ait türlerin morfolojik ve moleküler karakterizasyonları yapılmış ve bu türün *Tricholoma* alt cinsinin *Genuina* seksiyonunda, yer aldığı gösterilmiştir.

4. *Tricholoma caligatum*: Ota ve ark. (2012) tarafından dünya çapında önemli bir yere sahip ve matsutake olarak bilinen özellikle Japonya'da ekonomik değeri yüksek olan mantar grubu içerisinde yer aldığı bildirilmiştir. Morfolojik karakterlere dayalı tanımlamaları doğrulamak için ITS, megB1, tef, gpd bölgeleri çalışılmıştır. Filogenetik analizler sonucu bu mantar türü; *matsutake*, *T. bakamatsutake*, *T. fulvocastaneum* ve *T. caligatum* olmak üzere dört ana gruba ayrılmıştır. Ayrıca bu türler, Intini ve ark. (2003) tarafından Türkiye'de yeni tür olarak tanımlanan *T. anatolicum* türü ile yakın ilişkili olduğu bildirilmiştir. Benezza ve ark. (2016) tarafından Kuzey Afrika'dan Japonya'ya ihraç edilen matsutake grubu mantarlar üzerine yapılan moleküler çalışmada *T. caligatum* ve *T. anatolicum* türlerinin özellikle Kuzey Afrika'da bulunduğu belirtilmiştir. rDNA ve ITS bölgesi analiz edilerek oluşturulan ağaçta Kuzey Afrika'dan toplanan türler farklı habitatlardan toplanan diğer matsutake grubu üyeleri ile karşılaştırılmıştır. Bu türler Kuzey Afrika mikrobiyotası için yeni kayıt olarak önerilmiştir.

5. *Tricholoma fracticum* / *Tricholoma focale* / *Tricholoma imbricatum*: Bidartondo ve ark. (2002) tarafından ektomikorizal funguslardan aktif karbon elde eden bir bitki cinsi (Monotropeoideae / Ericaceae) çalışılmıştır. Çalışmalarında sekiz bitki soyu ve üç mantar türü arasındaki özgünlük paternleri ITS bölgesi kullanılarak moleküler filogenetik bir yaklaşımla sunulmuştur. Bu üç mantar türüne ait elde ettikleri sekans verilerini NCBI veri tabanına yüklemiştir. Ayrıca Heilmann-Clausen ve ark. (2017) tarafından *T. focale* türünün ITS gen bölgesi çalışılmış ve bu türün *Caligata* seksiyonu yerine *Genuina* seksiyonunda yer aldığı açıkça gösterilmiştir.

6. *Tricholoma portentosum*: Heilmann-Clausen ve ark. (2017) tarafından da bu türün ITS gen bölgesi çalışılmış ve oluşturulan kladogramda *Tricholoma* seksiyonunda yer aldığı açıkça gösterilmiştir.

7. *Tricholoma scalpturatum* ve *Tricholoma argyraceum*: Jargeat ve ark. (2010) tarafından Batı Avrupa popülasyonlarında iki gruba ayrılan *T. scalpturatum* kompleksi üzerine filogenetik çalışmalar yapılmıştır. ITS, *gpd* ve *tef* olmak üzere 3 farklı gen bölgesi kullanılmış ve bu iki grup *T. scalpturatum* ve *T. argyraceum* olarak değerlendirilmiştir. Carriconde ve ark. (2008) tarafından farklı popülasyonlardaki coğrafik yapının, kozmopolit ve kriptik ektomikorizal bir tür olan *T. scalpturatum* türü üzerine etkileri araştırılmıştır. Genetik yapıyı geniş bir coğrafyada incelemek için; Batı Avrupa'da, İspanya'da, İskandinavya'da bulunan 30 popülasyondan örnekler toplanmıştır. ISSR, RFLP ve ITS dizi analizleri kullanılarak oluşturulan sonuçlar birbiriyle kıyaslanmıştır. ISSR ve ITS verileri sonucu dizilerde oluşan polimorfizmlerin nispeten düşük değerinde (%96) olması farklı popülasyonlardan toplanan *T. scalpturatum* türleri arasında sınırlı gen akışına kanıt sağlamıştır. Çalışma sonucu elde edilen sekans verileri NCBI veri tabanına yüklenmiştir.

8. *Tricholoma subannulatum*: NCBI'da sekansı mevcut olmasına rağmen, literatürde bu türe ait herhangi bir yayına rastlanmamıştır.

9. *Tricholoma populinum*: Gryta ve ark. (2006) tarafından farklı çevresel koşullar altında siyah kavak (*Pinus nigra*) ile ilişkili ektomikorizal mantar türleri olan *Tricholoma populinum* türlerinin popülasyon dinamikleri çalışılmıştır. RAPD, ISSR, RFLP, rDNA, IGS dizi analizlerine dayanarak multilokus genotipleri (genetler) tanımlanarak iki türün popülasyon dinamiğindeki farklar ortaya konulmuştur. Başka bir çalışmada ise Grubisha ve ark. (2012) tarafından Kuzey Amerika ve İskandinav popülasyonları üzerine kıtalar arası filocoğrafik yapı ve nükleotid farklılığını gözlemleyebilmek için ITS, TEF1, ATP6, RPB1, GAPDH gen bölgeleri kullanılmıştır. Buna göre, *Tricholoma populinum*'un Kuzey Amerika ve İskandinav popülasyonları arasında devam eden gen akışının eksikliği için güçlü bir kanıt olduğunu gösterilmiştir. Heilmann-Clausen ve ark. (2017) tarafından da ele alınan bu tür Kuzey Avrupa'dan toplanmış ve hem morfolojik hem de moleküler açıdan değerlendirilmiştir. ITS DNA sekans verileri kullanılarak oluşturulan kladogramda *T. populinum* türünün *Tricholoma* alt cinsinin *Genuina* seksiyonunda yer aldığı açıkça gösterilmiştir.

10. *Tricholoma vaccinum*: Garnica ve ark. (2007) tarafından Agaricales ordosuna ait 88 mantar örneğinin RPB1 ve LSU gen bölgeleri kullanılarak moleküler

filogenetik analizleri yapılmıştır. Bu mantarlar içerisinde tez çalışmasında kullanılan *T. vaccinum* türü de mevcuttur. Morfolojik karakterler kullanılarak sistematik sınıflandırılması yapılan bu mantarların filogenetik ilişkileri ile morfolojik ve ekolojik özelliklerinin evriminin tam olarak anlaşamadığı belirtilmiştir. Yapılan filogenetik analizler dikkate alınarak, Basidiomycetes için geleneksel sınıflandırmada kullanılan karakterlerin homoplaziden etkilenebileceği iddia edilmiştir. LSU sekans verilerine dayalı çizilen filogenetik ağaçta birkaç monofiletik grup belirlenmiştir. Bu gruplar familya bazında kladlar oluşturmuş ve *Tricholoma* cinsine ait *T. vaccinum* türü Tricholomataceae kladı içerisinde gösterilmiştir. Benzer şekilde, Sanchez-Garcia ve Matheny (2017) tarafından Tricholomatineae alt ordosuna ait üyeler nLSU, nSSU, 5.8S, RPB1 ve RPB2 bölgeleri kullanılarak çalışılmıştır. Oluşturulan ağaçta *Tricholoma* cinsi Tricholomatacea kladında yer almış ve *T. vaccinum* türü bu monofiletik grup içerisinde konumlanmıştır.

11. *Tricholoma viridilutescens*: Heilmann-Clausen ve ark. (2017) tarafından morfolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılan *T. viridilutescens* türünün Kuzey Amerika ve Estonya'dan toplanan örneklerinin kriptik çeşitliliğe sahip olduğu savunulmuştur. ITS bölgesi çalışılarak Bayesian ve Maksimum Likelihood metodlarıyla oluşturulan kladogramda farklı yerlerden toplanan örneklerin taksonomik durumu bu çeşitliliği desteklemiş ve türün *Tricholoma* seksiyonunda yer aldığı açıkça gösterilmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Morfolojik Çalışmalar

Türkiye'nin farklı bölgelerinden ilkbahar ve sonbahar aylarında toplanan *Tricholoma* örneklerinin teşhisleri makroskobik (şapka, sap, lamel yapıları ve boyutları) ve mikroskobik (spor ve marjinal hücreler) karakterlerin değerlendirilmesi Dr. Öğr. Üyesi İsmail ACAR'ın gözetimi altında yapılmıştır. Teşhis edilen 16 tür (27 örnek) ile teşhis edilemeyen 4 örnek olmak üzere tez çalışması için toplamda 31 örnek kullanılmıştır. Makroskobik ve mikroskobik karakterlere ek olarak moleküler tekniklerle de bu örneklerin tanımlaması yapılmaya çalışılmıştır. Daha güvenilir sonuçlar elde etmek için çalışma en az iki tekrür halinde yapılmıştır. Bazı örneklerin tek numunesi olmasından dolayı tek örnek üzerinden çalışma yapılmıştır. Toplanan örneklerin isimleri, fungaryum numaraları, lokasyonları, toplanma tarihleri ve buldukları seksiyonlar Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Fungaryum materyali halinde bulunan kurutulmuş mantar örneklerinden kesit alınarak, Melzer ayracı ve KOH (%5) solüsyonu ile muamele edilmiş ve himenyum tabakasından kesit alınarak hazırlanan preparatlar mikroskop altında 10x100 büyütme ile incelenmiştir. Mantarların teşhisinde kullanılan kimyasal maddeler ile oluşan renk değişiklikleri tür tespitine yardımcı olmaktadır. Bazidyosporlara uygulanan bu ayracılar familyaların, cinslerin hatta türlerin ayırımında kullanılmaktadır. Örneklerin teşhisleri ilgili literatürler yardımıyla [Bon (1991), Breitenbach ve Kränzlin (1991), Galli (1999), Noordeloos ve Christensen (1999), Jordan (2004), Phillips (2006), Buczacki (2012)] yapılmıştır.

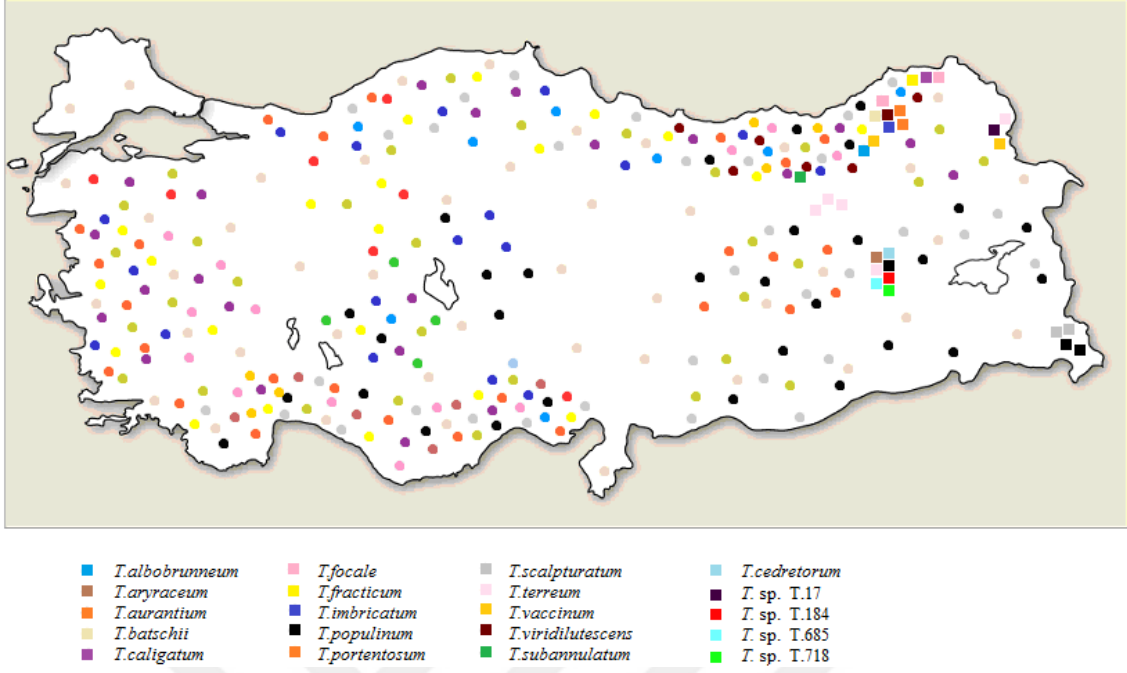
Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan *Tricholoma* türleri, fungaryum numaraları, lokasyonları, toplanma tarihleri ve buldukları seksiyonlar

Mantar ismi	Fungaryum No	Lokasyon Bilgisi	Habitat	Toplanma Tarihi	Seksiyon
1. <i>Tricholoma albobrunneum</i> (Pers.) P. Kumm.	T.7056	Refahiye- Erzincan	<i>Pinus</i> sp. ağaçları altı	2006	<i>Genuina</i>
2. <i>Tricholoma aurantium</i> (Schaeff.) Ricken	T.5016 T.5049 T.5657	Karagöl- Artvin, Sahara- Artvin, Sahara- Artvin	Konifer ormanı	2008 2008 2009	<i>Genuina</i>
3. <i>Tricholoma argyraceum</i> (Bull.) Gillet	T.667	Bingöl	Konifer ormanı	2008	<i>Terrea</i>
4. <i>T.batschii</i> Gulden	T.4722	Hatila- Artvin	Karışık orman	2006	<i>Genuina</i>
5. <i>Tricholoma caligatum</i> (Viv.) Ricken	T.4765	Hatila- Artvin	Konifer ormanı	2006	<i>Caligata</i>
6. <i>Tricholoma cedretorum</i> (Bon) A. Riva	T.1004	Bingöl	Çam Ağaçları Altı	2008	<i>Genuina</i>
7. <i>Tricholoma fracticum</i> (Britzelm.) Kreisel	T.4754	Hatila- Artvin	Konifer ormanı	2006	<i>Genuina</i>
8. <i>Tricholoma focale</i> (Fr.) Ricken	T.4794 T.4810	Şavşat- Artvin, Hatila- Artvin,	Konifer ormanı	2006 2006	<i>Genuina</i>
9. <i>Tricholoma imbricatum</i> (Fr.) P. Kumm	T.19	Sahara- Artvin	Konifer ormanı	2009	<i>Genuina</i>
10. <i>Tricholoma populinum</i> J.E. Lange	T.108 T.177 T.985	Hakkari, Hakkari, Bingöl	<i>Populus</i> sp. ağaçları altı	2006 2008 2014	<i>Genuina</i>
11. <i>Tricholoma portentosum</i> (Fr.) Quél.	T.5266	Sahara- Artvin	Konifer ormanı	2008	<i>Tricholoma</i>

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan *Tricholoma* türleri, fungaryum numaraları, lokasyonları, toplanma tarihleri ve buldukları seksiyonlar (devam)

12. <i>Tricholoma scalpturatum</i> (Fr.) Quél	T.43 T.139	Güldere- Hakkari	Kavak Ağacı Altı	2012 2013	<i>Terrea</i>
13. <i>Tricholoma subannulatum</i> (Peck) Zeller	T.3523	Torul- Gümüşhane	Karışık orman	2002	<i>Genuina</i>
14. <i>Tricholoma terreum</i> (Schaeff.) P. Kumm.	T.666 T.703 T.6990 T.6997 T.7040	Bingöl, Allahuekber Dağları, Tercan- Erzincan, Tercan- Erzincan, Refahiye- Erzincan	Çam Ağaçları Altı	2018 2010 2006 2006 2006	<i>Terrea</i>
15. <i>Tricholoma vaccinum</i> (Schaeff.) P. Kumm	T.94 T.5993	Kars Karagöl-Artvin,	Konifer ormanı	2007 2009	<i>Genuina</i>
16. <i>Tricholoma viridilutescens</i> M.M. Moser	T.4770	Hatila-Artvin	Konifer ormanı	2006	<i>Tricholoma</i>
17. <i>Tricholoma</i> sp.	T.17	Soğanlı-Kars	Konifer ormanı	2012	<i>Terrea</i>
18. <i>Tricholoma</i> sp	T.184	Bingöl	Konifer ormanı	2006	<i>Genuina</i>
19. <i>Tricholoma</i> sp	T.685	Bingöl	Konifer ormanı	2008	<i>Genuina</i>
20. <i>Tricholoma</i> sp	T.718	Bingöl	Çam Ağaçları Altı	2008	<i>Terrea</i>

Bu çalışmada kullanılan *Tricholoma* örneklerinin Türkiye’de yayılış gösterdikleri (renkli daire) ve toplandıkları (kare ile işaretli) bölgeler Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Türlerin yayılışma dair harita bilgileri Sesli ve Denchev (2014) çalışması ve örneklerin toplandığı lokasyonlar dikkate alınarak oluşturulmuştur. Bu haritadan da görüleceği üzere cinse ait türler ülke genelinde geniş bir yayılışa sahiptir. Ancak fruktifikasyon mevsimleri (ilkbahar ve sonbahar) dışında türlere rastlamak pek mümkün değildir.



Şekil 3. 1. *Tricholoma* cinsine ait çalışılan türlerin Türkiye'deki yayılışını gösteren harita.

Kare işaretleri bu çalışma kapsamında toplanan türlerin lokasyonlarını göstermektedir.

3.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.1. DNA izolasyonu

Modifiye edilmiş CTAB metodu (Doyle ve Doyle, 1987) kullanılarak *Tricholoma* cinsine ait kurutulmuş örneklerin bazidiyokarp kısmından genomik DNA izole edilmiştir. Her örneği temsilen en az iki bireyden aşağıdaki prosedüre göre DNA izolasyonu yapılmıştır.

1. Her örneğin şapka kısmından alınan yaklaşık 0.1 gr parça steril havanlarda 1000 µl özütleme tamponu (CTAB) ile ezilmiştir. (0,05 V PVP eklenmiş tampon, işlemden yaklaşık yarım saat önce 55 °C'lik su banyosunda bekletilmiş ve izole edilecek DNA verimi artırılmaya çalışılmıştır).
2. Oluşan karışım homojen bir görünüm alana kadar havanda ezildikten sonra etiketlemeleri dikkatle yapılan 1.5 ml'lik steril ependorf tüplerine aktarılmış ve 50 µl β-

merkpto-etanol ilave edilmiştir (β -merkpto-etanol ilavesinin mutlaka çeker ocak içerisinde yapılması gerekir).

3. Ependorf tüpler 13000 rpm'de +4 °C 10 dk santrifüj edilip, üst faz (süpernatant) alınarak yeni tüplere transfer edilmiş ve üzerine 20 μ l Proteinaz K ilave edilerek 55 °C'ye kadar ısıtılmış su banyosunda 30 dk bekletilmiştir. (Proteinaz K; DNase inaktivasyonu için kullanılmıştır. Tüpler belirli aralıklarla ters-düz edilerek veya kısa süreli vorteksten geçirilerek izolasyon verimliliği artırılmaya çalışılmıştır).

4. RNA'ları parçalamak ve DNA'ya kontaminasyonunu engellemek için 4 μ l RNase eklenmiştir ve vortekslenerek 55°C su banyosunda 30 dk bekletilmiştir.

6. Her bir endorf tüpüne 0,6 V Kloroform: İzamil alkol (24:1) eklenerek 13000 rpm'de +4 °C'de 8 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı steril tüplere aktarılmıştır.

7. Bu tüplere, 30 μ l Amonyum Asetat (daha verimli sonuçlar için üst fazın hacminin 0,08'i alınarak miktar belirlenebilir) ile 300 μ l soğuk izopropanol eklenmiş ve tüpler parafilmle sarılıp etiketlemeleri kontrol edildikten sonra -20 °C'de bir gece DNA'yı presipite etmek (çöktürme) için bekletilmiştir.

8. Bekletilen örnekler 13000 rpm'de 3 dk santrifüj edildikten sonra üst faz dibe çöken pelletin kaymamasına dikkat edilerek dökülmüştür.

9. Pellet, ilk olarak 800 μ l %70'lik etanol ile yıkanarak 2 dk 13.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant dikkatlice dökülmüştür. Daha sonra 700 μ l %90'lik etanol ile tekrar yıkanarak 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş süpernatant uzaklaştırılarak pellet oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

10. DNA'nın kurduğundan emin olunduktan sonra her bir örnek 50-75 μ l TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0) tamponunda çözündürülmüştür. Elde edilen stok DNA örnekleri -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

11. Her bir örneğin DNA miktarı ve saflığı NanoDrop2000c UV-Vis Spektrofotometre ile belirlenerek (Ek 1), PZR çalışmalarında kullanmak için 10 ng/ μ l'ye seyreltilmiştir.

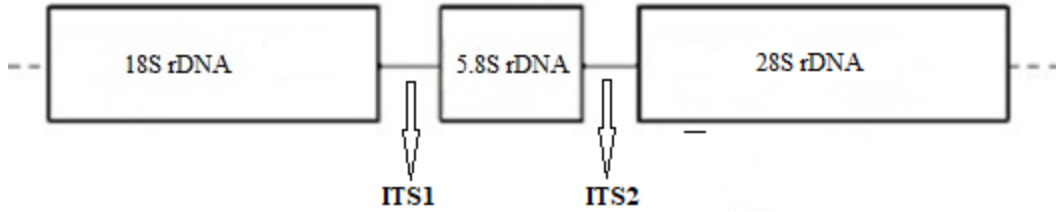
12. İzolasyon aşamasında herhangi bir problem olup olmadığını anlamak için her bir örnek %1'lik agaroz jelde yaklaşık 30 dakika 80 V'da yürütülerek UV görüntüleme cihazında profillerine bakılmıştır.

İzolasyon aşamasından sonra filogenetik ilişkileri belirleyebilmek için seçilen nükleer DNA gen bölgeleri PZR yöntemi ile amplifiye edilerek her bölgenin sekansları elde edilmiş ve analizleri yapılmıştır. Nükleer DNA bölgesinden seçilen bölgelere ait bilgiler aşağıda verilmiştir.

3.2.2. Analiz edilen gen bölgeleri

Nükleer rDNA ITS bölgesi

Ökaryotlarda ribozomal RNA'ları kodlayan genler tekrarlayan transkripsiyonel bölgeler içerirler. Bu bölgeler 18S, 5.8S ve 28S rRNA bölgeleri ile 5.8S geninin her iki yanında bulunan kodlanmayan 'Internal Transcribed Spacer (ITS1 ve ITS2) bölgeleridir (Şekil 3.2). Transkripsiyonu yapılamayan bölgelere, tür tanımlanması ve alt cinslerin filogenetik çalışmaları için mikolojik araştırmalarda çok sık rastlanmaktadır (Horton ve Bruns, 2001). ITS bölgeleri fungus taksonomisinde kabul gören resmi bir moleküler barkod haline gelmiştir (Schoch ve ark., 2012). Bu bölgede görülen varyasyon sayısının, gen bölgelerindeki varyasyon sayısından daha fazla olması filogenetik çalışmalarda tercih edilmesinin nedenlerinden biridir. Çizelge 3.2'de ITS bölgesini amplifiye etmek için kullanılan primer çifti ve bunların DNA dizileri gösterilmiştir.



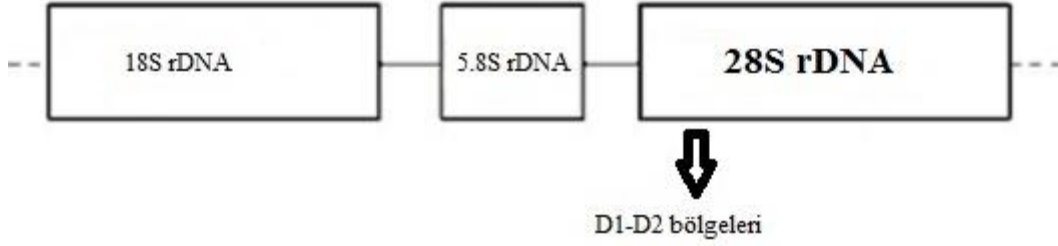
Şekil 3. 2. ITS gen bölgesinin şematik gösterimi.

Çizelge 3. 2. ITS bölgesini (ITS1+5.8S+ITS2) amplifiye etmek için kullanılan primer çifti ve nükleotit dizileri (Wen ve ark., 1996)

Primer ismi	Nükleotit dizisi
N-nc18S10 (F)	5'-AGGAGAAGTCGTAACAAG-3'
C26A (R)	5'-GTTTCTTTTCCTCCGCT-3'

Nükleer rDNA LSU bölgesi

Ribozom iki ana alt birimden oluşan ve protein sentezinde görev alan bir organeldir. Bu alt birimler; büyük alt birim [Large subunit (LSU)] ve küçük alt birim [Small subunit (SSU)] olarak isimlendirilir. Bu alt birimlerden her biri rRNA ve proteinlerden oluşur. LSU rRNA (aynı zamanda 28S rRNA olarak da bilinir) bir ribozim olarak peptit bağı oluşumunu katalizler. rDNA genleri son derece kararlı ve korunmuş mozaik yapı sergileyen genomdaki çeşitli bölgelerdir (Hibbett, 1992). Büyük alt birimi kodlayan gen bölgesi iki yüksek değişken bölge (D1-D2) içerir. Taksonomik ve filogenetik parmak izine dayalı LSU ve ITS genlerinin sekans analizi fungus sistematğinde bütüncü parçalardır (Liu ve ark., 2012), bu nedenle ITS bölgesine ek olarak LSU bölgesi de çalışmaya dahil edilmiştir. Şekil 3.3'te LSU bölgesi şematik olarak verilmiş ve Çizelge 3.3'te de bölgeyi amplifiye etmek için kullanılan primer çifti isimleri ve DNA dizileri gösterilmiştir.



Şekil 3. 3. LSU gen ve D1-D2 bölgelerinin şematik gösterimi.

Çizelge 3. 3. LSU bölgesini amplifiye etmek için kullanılan primer çifti ve nükleotit dizileri (Vilgalys ve Hester 1990)

Primer ismi	Nükleotit dizisi
LROR (F)	5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3'
LR5 (R)	5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3'

3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu metodu ile DNA üzerinde hedeflenen gen bölgeleri uygun koşullar altında çoğaltılarak binlerce kopyası elde edilir. In vitro bir ortamda bu işlemi gerçekleştirmek amacıyla Kalıp DNA, Taq DNA polimeraz, primer çifti, dNTP, tampon ve MgCl₂ kullanılmaktadır.

PZR reaksiyonları 25 veya 50 mikrolitrelik toplam hacimlerde yapılmıştır. Hedeflenen bölgeleri amplifiye edebilmek için her bir kimyasalın belirli oranda kullanılması gerekir. İlk olarak her bölge için ayrı ayrı optimizasyon çalışmaları yapılmış ve hedef bölgeyi en iyi şekilde çoğaltan oran ve miktarlar belirlenmiştir. Her iki hacim için de genomik DNA (10 ng/μl), 10X PZR tamponu, MgCl₂ (25 mM), dNTP (10 mM), primer çiftleri (10 μM), Taq polimeraz enzimi (5u/μl) bir karışım olarak hazırlanmış ve her bölge için farklı PZR sıcaklık koşullarında amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bölgelerin amplifiye olduğu optimum sıcaklık koşulları yapılan optimizasyon çalışmaları ile belirlenmiştir. Her bölge için optimum koşullar tür düzeyinde değişiklik gösterdiği için birden fazla koşul kullanılmıştır (Çizelge 3.4). PZR çalışmaları yapılırken, çevresel koşulların sebep olduğu bir kontaminasyonun olup olmadığını saptamak için çalışılan örneklere ilave olarak, içeriğine DNA ilave edilmeyen karışımlar kontrol olarak kullanılmıştır. ITS bölgesi için; 16 tür (tekrarlarla birlikte 37 birey) ve 4 tanımlanamayan örnek (tekrarlarla birlikte 8 birey) ile toplamda 45 birey analiz edilmiştir. LSU için; 16 tür (tekrarlarla birlikte 22 birey) ve 4 tanımlanamayan örnek ile birlikte toplamda 26 birey analiz edilmiştir. PZR işleminden sonra hedef bölgelerin çoğaltılıp çoğaltılmadığını anlamak için örnekler uygun konsantrasyondaki agaroz jelde yürütülmüştür.

Çizelge 3. 4. Çalışılan gen bölgeleri ve örnekler için reaksiyon hacimlerine göre belirlenmiş optimum PZR sıcaklık koşulları

Çalışılan Bölge	Örnek No	Örnek İsimleri	Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı	Reaksiyon hacmi
ITS	T.17-1	<i>Tricholoma</i> sp.					
	T.19-1	<i>T. imbricatum</i>					
	T.43	<i>T. scalpturatum</i>					
	T.94	<i>T. vaccinum</i>					
	T.108	<i>T. populinum</i>					
	T.139	<i>T. scalpturatum</i>	1	95°C	2 dk	1	
	T.177	<i>T. populinum</i>					
	T.184-1	<i>T.sp.</i>					
	T.666	<i>T. terreum</i>					
	T.667-1	<i>T. argyraceum</i>	2	94°C	1 dk		
	T.685-1	<i>T. sp.</i>					
	T.718-1	<i>T. sp.</i>		54°C	1 dk	35	
	T.703	<i>T. terreum</i>					
	T.985	<i>T. populinum</i>		72°C	2 dk		
	T.1004-1	<i>T. cedretorum</i>					
	T.3523-1	<i>T. subannulatum</i>					
	T.4722-1	<i>T. batschii</i>					25 µl
	T.4754-1	<i>T. fracticum</i>	3	72°C	5 dk	1	
	T.4765-1	<i>T. caligatum</i>					
	T.4770-1	<i>T. viridilutescens</i>					
	T.4794	<i>T. focale</i>					
	T.4810	<i>T. focale</i>					
	T.5016	<i>T. aurantium</i>					
	T.5049	<i>T. aurantium</i>					
	T.5266-1	<i>T. portentosum</i>					
	T.5657	<i>T. aurantium</i>					
	T.5993	<i>T. vaccinum</i>					
	T.6990	<i>T. terreum</i>					
T.6997	<i>T. terreum</i>						
T.7040	<i>T. terreum</i>						
T.7056-1	<i>T. albobrunneum</i>						
ITS	T.184-2	<i>T. sp</i>	1	95 °C	3 dk	1	
	T.667-2	<i>T. argyraceum</i>					
	T.685-2	<i>T. sp</i>	2	94 °C	30 sn		
	T.718-2	<i>T. sp</i>		50 °C	45 sn	35	50 µl
	T.4754-2	<i>T. fracticum</i>		72 °C	2 dk		
T.5266-2	<i>T. portentosum</i>						
ITS	T.17-2	<i>T. sp</i>	1	95 °C	2 dk	1	
	T.19-2	<i>T. imbricatum</i>					
	T.1004-2	<i>T. cedretorum</i>					
	T.3523-2	<i>T. subannulatum</i>	2	94 °C	1 dk		
	T.4722-2	<i>T. batschii</i>		51 °C	50sn	30	25 µl
	T.4765-2	<i>T. caligatum</i>		72 °C	2 dk		
	T.4770-2	<i>T. viridilutescens</i>					
T.7056-2	<i>T. albobrunneum</i>	3	72 °C	5 dk	1		

Çizelge 3. 4. Çalışılan gen bölgeleri ve örnekler için reaksiyon hacimlerine göre belirlenmiş optimum PZR sıcaklık koşulları (devam)

LSU	T.17	<i>T. sp.</i>	1	95°C	5 dk	1	
	T.19	<i>T. imbricatum</i>					
	T.94	<i>T. vaccinum</i>					
	T.667	<i>T. agraceum</i>					
	T.685	<i>T. sp</i>					50 µl
	T.718	<i>T. sp</i>	2	94°C	45 sn		
	T.1004	<i>T. cedretorum</i>		54°C	30 sn	35	
	T.4722	<i>T. batschii</i>		72°C	45 sn		
	T.4770	<i>T. viridilutescens</i>					
	T.5049	<i>T. aurantium</i>	3	72°C	10 dk	1	
T.6990	<i>T. terreum</i>						
LSU	T.7040	<i>T. terreum</i>					
	T.7056	<i>T. albobrunneum</i>	1	95 °C		1	
	T.43	<i>T. scalpturatum</i>					
	T.108	<i>T. populinum</i>					
	T.184	<i>T. sp</i>					
	T.177	<i>T. populinum</i>					
	T.703	<i>T. terreum</i>	2	94°C	2 dk	30	25 µl
	T.985	<i>T. populinum</i>		54°C	1 dk		
	T.3523	<i>T. subannulatum</i>		72°C	1 dk		
	T.4754	<i>T. fracticum</i>			2 dk		
	T.4765	<i>T. caligatum</i>					
	T.4794	<i>T. focale</i>					
	T.5266	<i>T. portentosum</i>					
	T.5657	<i>T. aurantium</i>	3	72°C	5 dk	1	
	T.6997	<i>T. terreum</i>					

3.2.4. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, moleküler biyoloji alanında kullanılan ve molekülleri büyüklüklerine ve yüklerine göre ayıran bir yöntemdir. Polimerize olabilen bir jel üzerine yüklenen moleküller, elektrik enerjisi kullanılarak yürütülür. Kullanılan bölgelerden LSU bölgesi ITS bölgesine göre daha büyüktür. Bu nedenle bu bölge için %0.8'lik, ITS bölgesi için %1'lik jel kullanılmıştır. Agaroz 1XTBE (Tris Borat EDTA) veya 1XTAE (Tris Asetat EDTA) tampon solüsyonlarında çözündürülüp, polimerleşmesi için kaynatılır. Deneysel çalışmalar sırasında agaroz jel hazırlarken 1XTAE tamponu kullanılmıştır. Kaynatılan solüsyon biraz soğutulduktan sonra jelde DNA bantlarını görünür hale getirebilmek için 1-2 damla GelRed boyası solüsyonun içine damlatılmış ve tarakları yerleştirilmiş elektroforez tankına dökülerek polimerleşmesi için beklenmiştir. PZR ürünlerinden 2 µl alınıp 2 µl 6XDNA yükleme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme boyası, DNA molekülünü bir arada

tutup kuyunun içinde dağılmadan kalmasını sağlamak ve bantların jel içinde tahmini yürüme mesafesini anlamamıza yardımcı olmaktadır. Jelde bulunan kuyucuklara PZR ürünleri yüklenerek 80 V'da yaklaşık yarım saat kadar yürütülmüştür. Elektroforez işleminin ardından jel, UV transilluminatör cihazı altında görünür hale getirilerek hedef bantların istenen kalitede olup olmadığı anlaşılmıştır.

3.2.5. DNA dizileme ve filogenetik aşamalar

ITS ve LSU gen bölgeleri için her bireye ait ikili (Forward-Reverse) dizileme işlemi özel bir firmaya (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) yaptırılmıştır. Dizi verileri oluşturulduktan sonra her örneğin kromatogram görüntüleri Finch TV (Patterson ve ark., 2004; 2006) programı kullanılarak görünür hale getirilmiştir. Her bireye ait ITS (80 örnek) ve LSU (36 örnek) için forward ve ncbireverse sekanslarının karşılaştırılmasıyla oluşturulan konsensus DNA sekans verileri MEGA 6.0 (Tamura ve ark., 2013) programı formatına göre düzenlenerek CLUSTALW programı ile hizalanmıştır. CLUSTAL programı genetik varyasyonları dikkate alarak diziler arası benzerliği en iyi şekilde hesaplayan ve filogenetik çalışmalarda en sık tercih edilen programlardan biridir. Filogenetik ağaçlar oluşturulurken Tamura-3 metodu (T92+G) kullanılarak genetik uzaklıklar hesaplanmıştır. Maximum Parsimony ve Maximum Likelihood metodları kullanılarak filogenetik ağaçlar MEGA 6.0 yardımıyla çizdirilmiştir. Elde edilen ağaçların güvenilirliğini artırmak için 1000 bootstrap tekrarı yapılmış (Felsenstein, 1985) ve %50'nin üzerindeki bootstrap değerleri ağaçlarda gösterilmiştir. Çalışılan taksonların monofiletik olup olmadığını anlayabilmek ve ağacı kklendirmek için dış grup analizi yapılmış ve dış grup olarak *Pluteus cervinus* [Genbank erişim no: ITS; JF908614 (Osmundson ve ark., (2013), LSU; HM562221 (Justo ve ark., 2011)] kullanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Morfolojik Değerlendirme

Türkiye’de bulunan *Tricholoma* türlerini ve cins içerisindeki taksonomik durumlarını belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada detaylı morfolojik analizler yapılmıştır. Morfolojik analizlerde makroskopik ve mikroskopik karakterler değerlendirilerek türler teşhis edilmeye çalışılmıştır. Sporların şekli, boyutları, yüzeyinin düz veya pürüzlü oluşu, hiyalin olup olmaması ve Melzer ayracıyla verdiği reaksiyon, bazidyum yapıları ve üzerinde kaç tane spor bulunduğu (bazidyospor yapıları), marginal cell ve bazidyol morfolojisi ayırt edici veriler olarak kullanılmıştır. Çalışılan örnekler içerisinde bulunan dört örneğin (*Tricholoma* sp. T.17, *Tricholoma* sp. T.184, *Tricholoma* sp. T.685, *Tricholoma* sp. T.718) makroskopik ve mikroskopik analizleri yapılmasına rağmen teşhisleri yapılamamıştır. Örneklerin yeni tür olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle bu örnekler üzerindeki çalışmalar devam edecektir. Tanımlanamayan örneklere ait detaylı deskripsiyonlar ile makroskopik (bazidyokarp) ve mikroskopik (spor, bazidyum, bazidyol, marjinal hücreler) görüntüler (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4) aşağıda sırasıyla verilmiştir.

Tricholoma sp. T.17

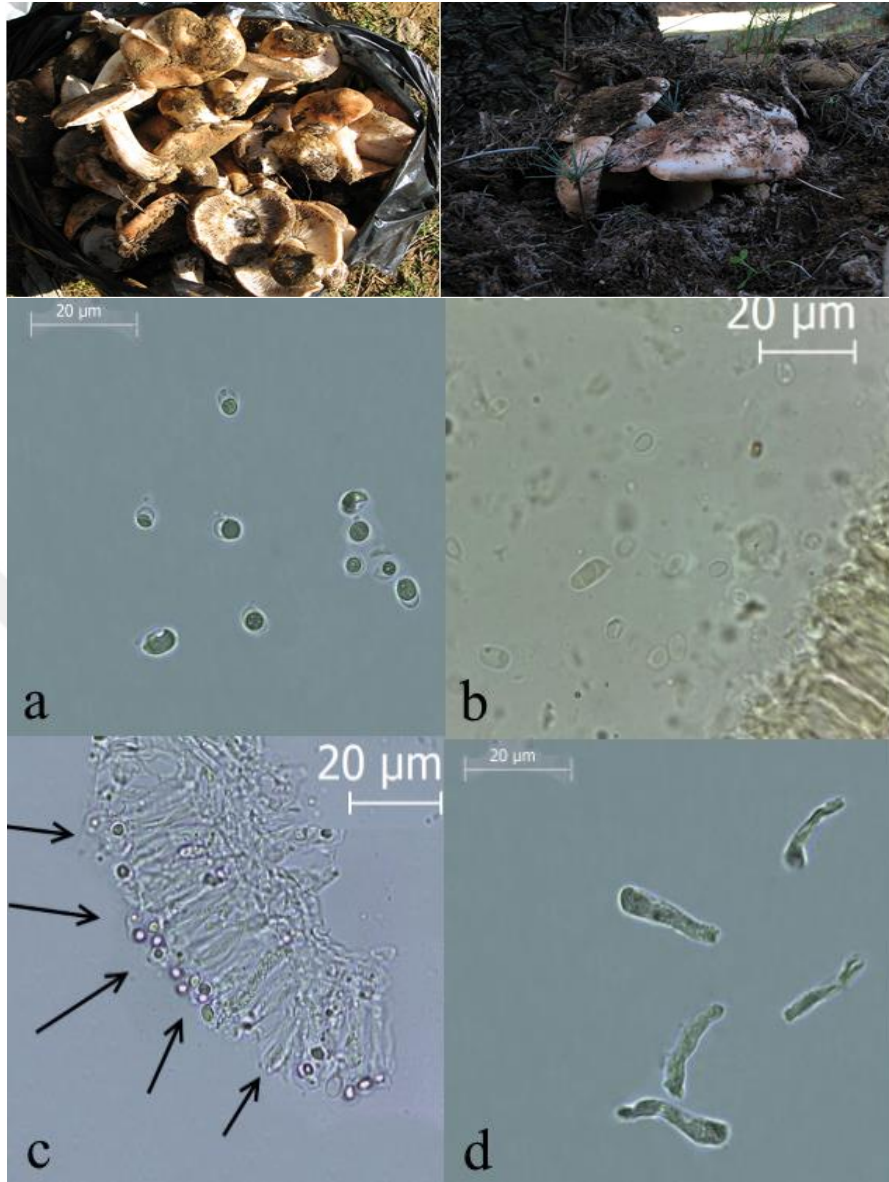
Şapka; 1-3.5 cm boyutlarında, gençken konik, daha sonra düzleşir, şapka kenarları içe doğru kıvrık, hafif pudramsı, olgunlaştığında hafif pullu, gri, kahverengimsi gri, olgunlaştığında rengi koyulaşır. Lameller; adnat veya subdekurrent, seyrek, geniş, çentikli, soluk beyaz - grimsi beyazdır. Sap; 1.5-4 × 0.4-0.8 cm boyutlarında, silindirik, eşit, bazen tabanda klavat, genç örneklerde genellikle sap üzerinde velar kalıntılar mevcut, olgunlaştığında uzunlamasına çizgili, beyaz-soluk gri renkte, içi boş ve kırılımandır. Sporlar; 6.7-10.4 × 4.1-5.4 µm boyutlarında, eliptik-ovoid, fasulye şeklinde, hiyalin, ve inamiloiddir. Bazidyum; 22-40 × 5.1-8 µm boyutlarındadır. Bazidyol; 23-28 × 5-7 µm boyutlarındadır. Sistid yoktur. Habitat; alpin bölgelerde yaz aylarında konifer orman açıklığında yetişir.



Şekil 4. 1. *Tricholoma* sp. T.17 örneğine ait makroskopik ve mikroskopik veriler.
a. Spor b. Spor (Melzer Ayracı) c. Bazidyum d. Bazidyol.

Tricholoma sp. T.184

Şapka; 3-12 cm çapında, gençken küresel, daha sonra yarı küresel, konveks veya planokonveks, en sonunda düzleşir, umbo yoktur, kenarları uzun bir süre içe doğru kıvrıktır, yüzeyi düz, nemliyken kaygan, mat, fındık kahverengi-açık kahverengi renkte, bazen merkezde koyulaşır. **Lameller;** adnat, sık, içe doğru kıvrık, beyaz, kirli beyaz ve krem renkte, kenarları düz, bazen hafif tırtıklıdır. **Sap;** 4-10 x 0.8-2 cm boyutlarında, silindirik, tabana doğru genişler, tabanda bulbulu, şapkayla aynı renkte, şapkaya yakın yerde annular zon taşır, bazen uzunlamasına fibriller mevcuttur. **Sporlar;** (4.2) 5-6 (7.5) x 3.3- 4.7 µm boyutlarında, ovoid, elipsoit, düz, damlalı ve inamiloiddir. **Bazidyum;** 19-23 x 3.9-5.3 x 2.4-3 µm boyutlarında, dört sporelidir, bazal klamp yoktur. Sistid yoktur. **Marginal hücreler;** eğri büğrü ve monomorfiktir. **Habitat;** subalpin bölgelerde sonbahar aylarında yaygın bir şekilde konifer ağaçları altında yetişir. Yöre halkı tarafından yenen bir türdür.

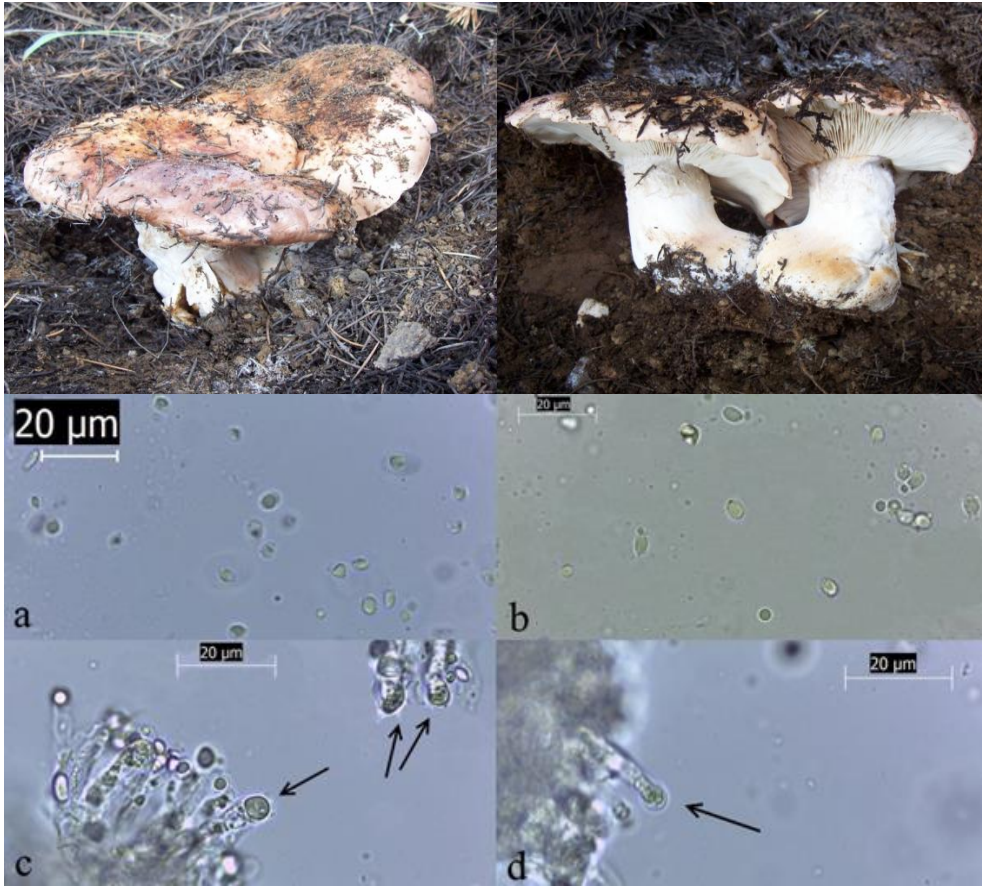


Şekil 4. 2. *Tricholoma* sp. T.184 örneğine ait makroskobik ve mikroskobik veriler.
a. Spor b. Spor (Melzer Ayracı) c. Bazidyum d. Bazidyol

Tricholoma sp. T.685

Şapka; 11 cm' ye kadar genişler, konveks, neredeyse düz, şapka kenarları içe doğru kıvrık, gençken yapışkanmsı, olgun örneklerde bu özellik gözlenmemekte, şapka kenarlarında yer yer beyazlıklar görülür, belirgin bir şekilde kırmızmsı kahverengi noktalar mevcut, şapka kahverengi-kırmızmsı kahverengi renktedir. Lameller; adnat,

içe doğru kavisli, sık, geniş, gençken beyaz, olgunlaştığında krem-beyaz renkte, bazen lamel yüzeyinde kahverengimsi lekeler bulunur. Sap; 7-9 × 2-3 cm boyutlarında, olgun örneklerde içi boş dolgun şekilde, tabanda klavat, annular zon yok, yüzeyi şapkaya yakın yerlerde pullu, tabana doğru düz, hafif çizgili, beyaz zemin üzerinde krem-kahverengimsi renktedir. Sporlar; 4.3-7.8 × 2.7-5 µm boyutlarında, hyalin ve inamyolittir. Bazidyum; 17-26 × 3.5-5.5 µm boyutlarındadır. Bazidyol; 19-22 × 3-5.1 µm boyutlarındadır. Sistit yoktur. Habitat; İlkbahar aylarında humusça zengin konifer ağaçları altında yetişir.

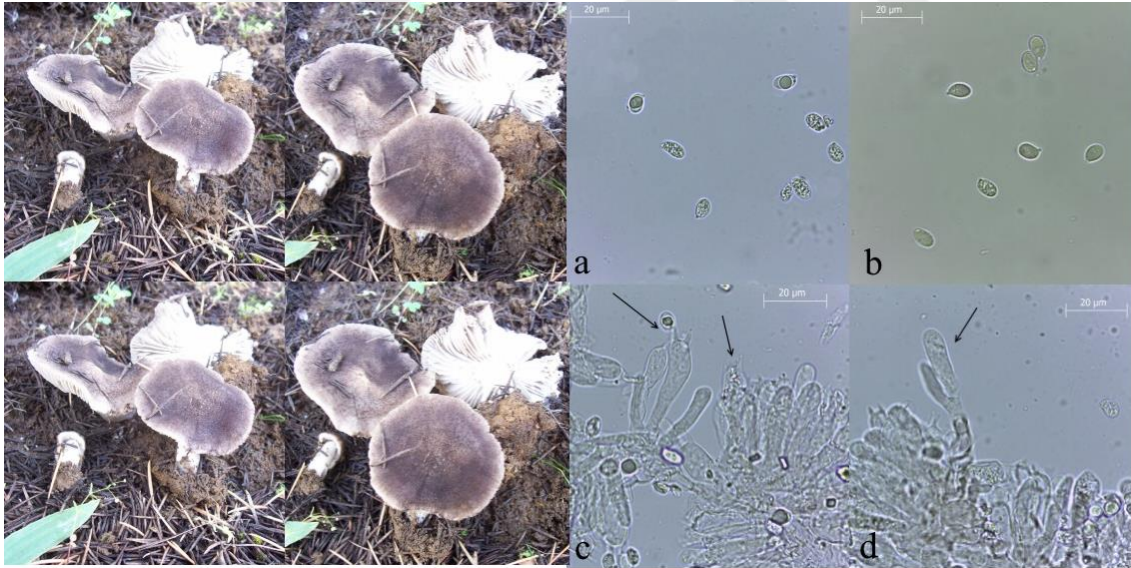


Şekil 4. 3. *Tricholoma* sp. T.685 örneğine ait makroskobik ve mikroskobik veriler.

a. Spor b. Spor (Melzer Ayırıcı) c. Bazidyum d. Bazidyol

Tricholoma sp. T.718

Şapka; 1.5-5.5 cm çapında, gençken konik, daha sonra düzleşir, olgunlarda dışa doğru kıvrılır, çok hafif bir umbo taşır, yüzeyi kenarlara doğru radyal fibrilli, şapka kenarları açık renkte, merkeze doğru koyulaşır, yüzeyi pullu, grimsi ve kırmızimsı kahverengi, siyahımsı gri renkte, kenarları beyaz renkte, olgunlaşınca kenarları genellikle tırtıklıdır. **Lameller;** çentikli ve dekkurent, geniş, kenarları dalgalı, beyaz, hafif grimsi-beyaz renktedir. **Sap;** 2.5-4 x 0.7-1 cm boyutlarında, belirgin bir şekilde klavat, hafif köklü yapıya sahiptir, beyaz-grimsi beyaz renkte düz, gençken içi boş ve kırılmandır. **Sporlar;** (6.1) 7-9.1 x 4-5.5 µm boyutlarında, eliptik-yuvarlağimsı, düz, hiyalin, damlalı ve inamiloiddir. **Bazidyum;** 26.5- 36.5 x 6-9 µm boyutlarında, silindirik-klavat, 2 veya 4 sporlu, bazal klamp yoktur. Sistid yoktur. **Marjinal hücreler;** eğri büğrü ve polimorfiktir. **Habitat;** subalpin bölgelerde, ilkbahar aylarında, konifer ağaçları altında yetişir.



Şekil 4. 4. *Tricholoma* sp. T.718 örneğine ait makroskobik ve mikroskobik veriler.

a. Spor b. Spor (Melzer Ayırıcı) c. Bazidyum ve bazidyol d. Marjinal hücreler

Bu çalışmada *Tricholoma* cinsinin *Tricholoma* alt cinsinde bulunan dört seksiyona (*Genuina*, *Terrea*, *Tricholoma* ve *Caligata*) ait bazı türler çalışılmıştır. Yapılan analizler ile çalışılan seksiyonların ve bu seksiyonlara ait türlerin taksonomik

olarak ayırt edici özellikleri kullanılarak bir anahtar oluşturulmuştur. Anahtar aşağıda verilmiştir.

Tricholoma alt cinsine ait *Genuina*, *Caligata*, *Tricholoma* ve *Terrea* seksiyonlarının bu çalışma kapsamında çalışılan türlerine ait anahtar:

Grup 1

1. Şapka kahverengi, sarımsı kahverengi, kırmızımsı kahverengi veya krem kahverengi renkli.....2

1*. Şapka genellikle grimsi renkli.....3

2. Şapka krem kahverengi ya da siyahımsı kahverengi renkli.....Seksiyon *Caligata* (Grup 1)

.....(*Tricholoma caligatum*)

2*. Şapka genellikle sarımsı kahverengi veya kırmızımsı kahverengi renklerde dir.....Seksiyon *Genuina* (Grup 2)

3. Şapka, sap veya lamellerde sarımsı renkler mevcut.....Seksiyon *Tricholoma* (Grup 3)

3*. Şapka, sap veya lamellerde sarımsı renkler mevcut değildir..... Seksiyon *Terrea* (Grup 4)

Grup 2

1. Sap annulus taşır.....*T. focale*

1*. Sapta annulus yoktur ancak annular zon vardır.....2

2. Şapka pullu ve kenarları velum kalıntısı taşır.....*T. vaccinum*

2*. Şapka pullu değil ve kenarları velum kalıntısı taşımaz.....3

3. Şapka genellikle altın sarısı veya turuncu renklindedir.....*T. aurantium*
 3*. Şapka farklı renklindedir.....4
4. Mantar *Populus* sp. ağaçları altında yetişir.....*T. populinum*
 4*. Mantar farklı ağaçlar altında yetişir.....5
5. Sap genellikle annular zon taşır.....6
 5*. Sap genellikle annular zon taşımaz.....8
6. Şapka genişliği maksimum 10 cm'e kadar ulaşır.....*T. subannulatum*
 6*. Şapka çapı 5 cm'ye kadar çıkar.....7
7. Spor 4.5-7.5 × 3.5-6 µm boyutlarında.....*T. fracticum*
 7*. Spor 7-9 × 5-7 µm boyutlarında.....*T. batschii*
8. Pileipelliste bulunan hifler paraleldir.....9
 8*. Pileipelliste bulunan hifler düzensizdir.....*T. albobrunneum*
9. Bazidyum 22-26 × 5-6 µm, sporlar, 5-6 × 3.5-4.5 µm boyutlarında.....*T. cedretorum*
 9*. Bazidyum 25-30 × 6-8 µm, sporlar, 5.3-7.4 × 3.7-5.5 µm boyutlarında.....*T. imbricatum*

Grup 3

1. Şapka 12 cm'e kadar genişler. Sporlar 5-7 × 4-5.3 µm boyutlarında.....*T. portentosum*
 1*. Şapka 6 cm'e kadar genişler. Sporlar 6-8 × 5-6 µm boyutlarında.....*T. viridilutescens*

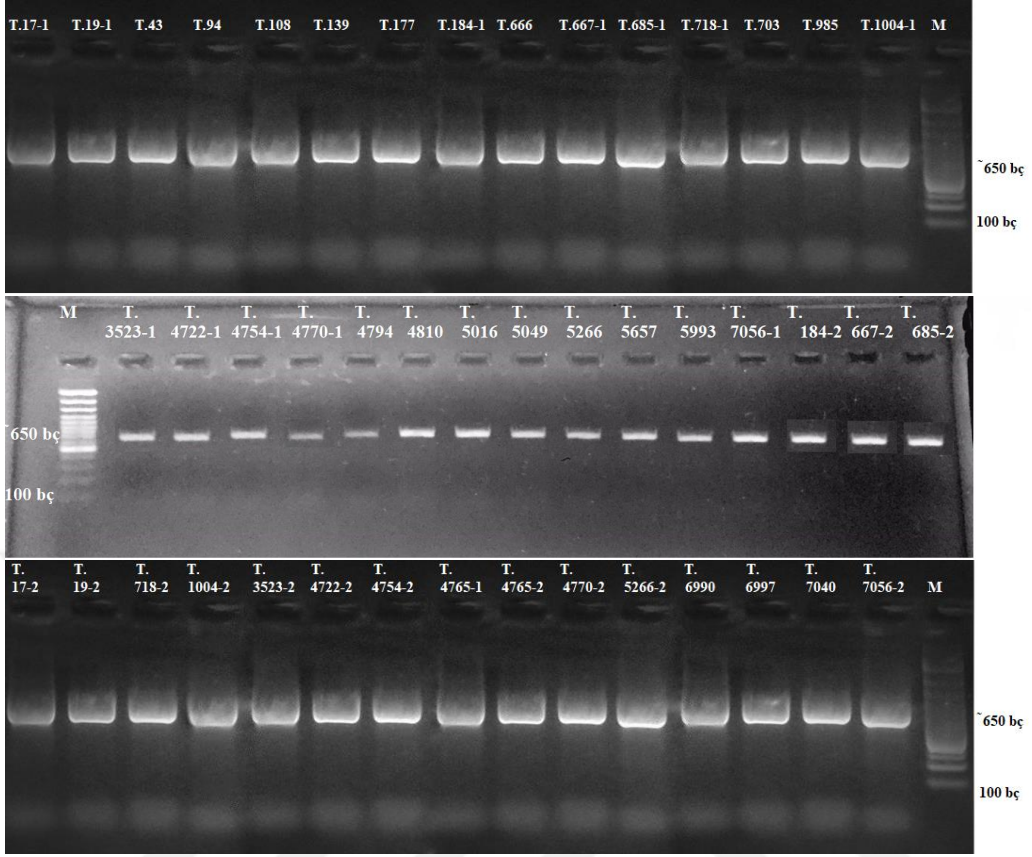
Grup 4

1. Şapka kenarları genellikle tırtıklıdır.....2
- 1*. Şapka kenarları tırtıklı değildir.*T. scalpturatum*
2. Sporlar $6-8 \times 4-6 \mu\text{m}$ boyutlarında.....*T. terreum*
- 2*. Sporlar $4-5 \times 1.5-2 \mu\text{m}$ boyutlarında.....*T. argyraceum*

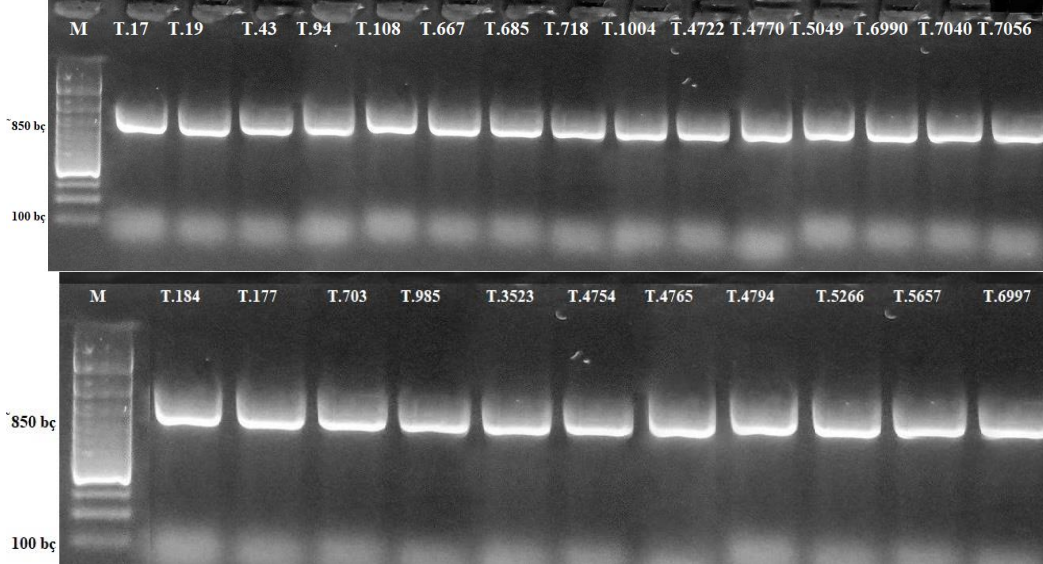
4.2. Moleküler Değerlendirme

4.2.1. Gen bölgelerinin çoğaltılması

Optimize edilen PZR koşullarında (Bkz. Çizelge 3.4) hedeflenen bölgeler çoğaltılmış ve elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi kullanılarak molekül büyüklüklerine göre yürütülmüştür. Oluşan bant profillerinin büyüklüklerini belirleyebilmek için Thermo Scientific GeneRuler 100 bp marker kullanılmıştır. ITS bölgesi için kullanılan primer çifti (Bkz. Çizelge 3.2) ITS1, 5.8S ve ITS2 bölgelerini çoğaltmıştır. Çoklu dizi hizalaması yapıldıktan sonra bölgelerin sınırları belirlenmiştir. LSU için kullanılan primer çifti (Bkz. Çizelge 3.3) 28S olarak ifade edilen ve D1-D2 değişken bölgelerini içeren ekzonik kısmı çoğaltmıştır. Her bölge için elde edilen bazı bant profilleri sırasıyla Şekil 4.5 ve 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 5. Çalışılan örneklerin ITS bölgelerine ait PZR ürünlerinin bant profilleri. (%1'lik agaroz jel). M: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp marker.

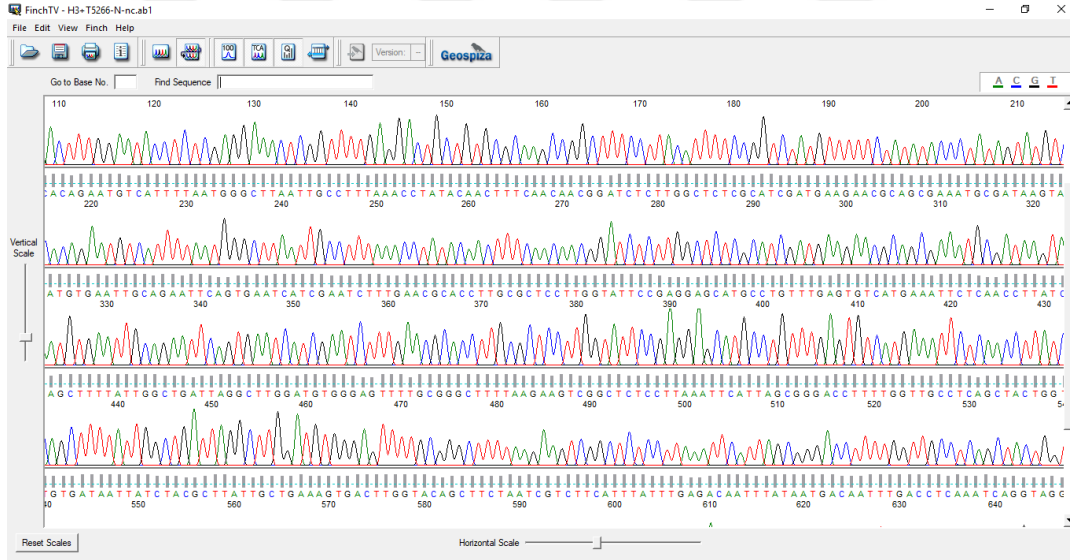


Şekil 4. 6. Çalışılan örneklerin LSU bölgelerine ait PZR ürünlerinin bant profilleri. (%0.8'lik agaroz jel). M: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp marker.

Bantların büyüklükleri belirlenmiş ve her bölgenin amplifiye edildiğinden emin olunduktan sonra DNA dizi verileri elde edilmiş ve analiz basamaklarına geçilmiştir.

4.2.2. Dizi verilerinin tanımlanması

Her örneğe ait ITS ve LSU sekanslarının kromatogram görüntüleri Finch TV (Patterson ve ark., 2004; 2006) programı kullanılarak görünür hale getirilmiştir (Şekil 4.7 ve 4.8). Bazları temsil eden piklerin yeterince temiz olduğuna karar verildikten sonra her birey için forward ve reverse sekanslar karşılaştırılarak konsensus dizi oluşturulmuştur. Oluşturulan konsensus dizi benzerlik oranını ve eşleştiği cinsi belirlemek için NCBI veri tabanı üzerinden BLAST algoritması kullanılarak taranmıştır.



Şekil 4. 7. ITS gen bölgesine ait sekansın kromatogram görüntüsü.



Şekil 4. 8. LSU gen bölgesine ait sekansın kromatogram görüntüsü.

Her bir bölge için elde edilen DNA sekanslarından birer örnek, NCBI veri tabanında taranabilmesi ve bilimsel olarak doğrulanabilmesi amacıyla aşağıda verilmiştir.

ITS bölgesi;

Tricholoma caligatum (T.4765)

tgcggaaggatcattactgagtaaagcttggtttaggctgttgcctggcttcttgagggcatgtgcacgtctgacgac
tctttcaccacctgtgcacctttgtagacttgggatattcaggaagctcggtttccggctatgtatctttatataataatccagt
atttcttaggatgtattctaattgggcttaattgcctttaaactfataactttcaac aacggatctcttggctctcgc atc gatgaaga
acgcagc gaaatgcgataagtaattggaattgcagaattcagtgatc atc gaatctttgaacgcaccttgcgtccttggattc
caaggagcatgcctgtttgagtgtcatgaaattc caacctttcggctttgtgacaggcttggattttgggagatattgtaggct
tcttagaagtttgcctctttaaattgcattagcagagcccttagttgttctagcatttgggtgataattatctacgccattgtgaacaa
tgcaataagaaaagaggctcagcatataaaaatggtttcgtgagggatcatttctgatattttgacctcaaatcaggtgaactac
ccgct

LSU bölgesi;

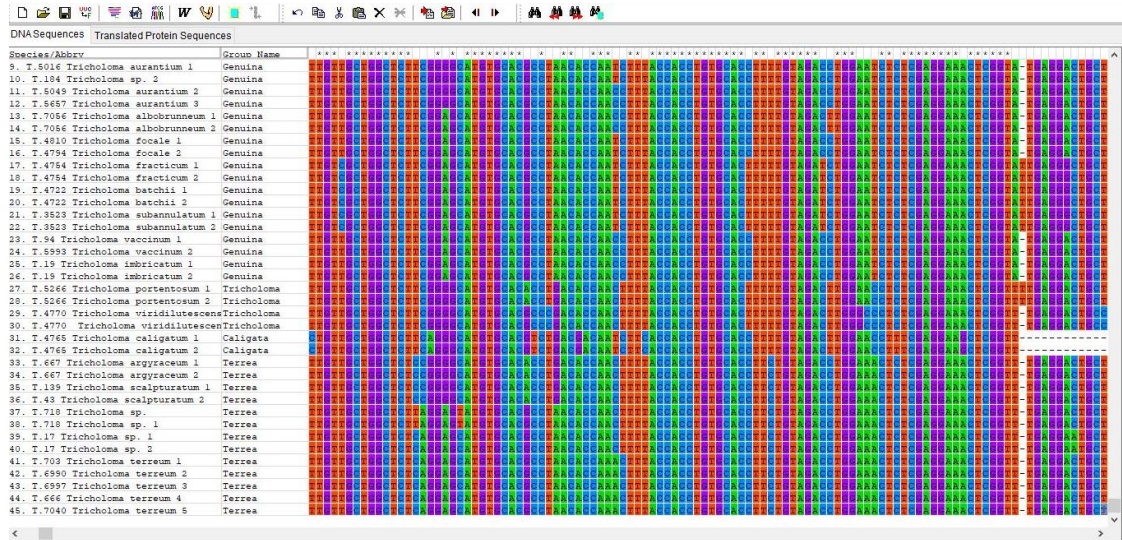
Tricholoma caligatum (T.4765)

attcccttagtaactgcgagtggaaggggaaaagctcaaatfataaatctgagggctttatgatcttccgagttgta at
ctagagaagtgtatccgcgctggaccgtgtatgagctcttggaatggagcatcatagagggtgagaatccgcttccgacac

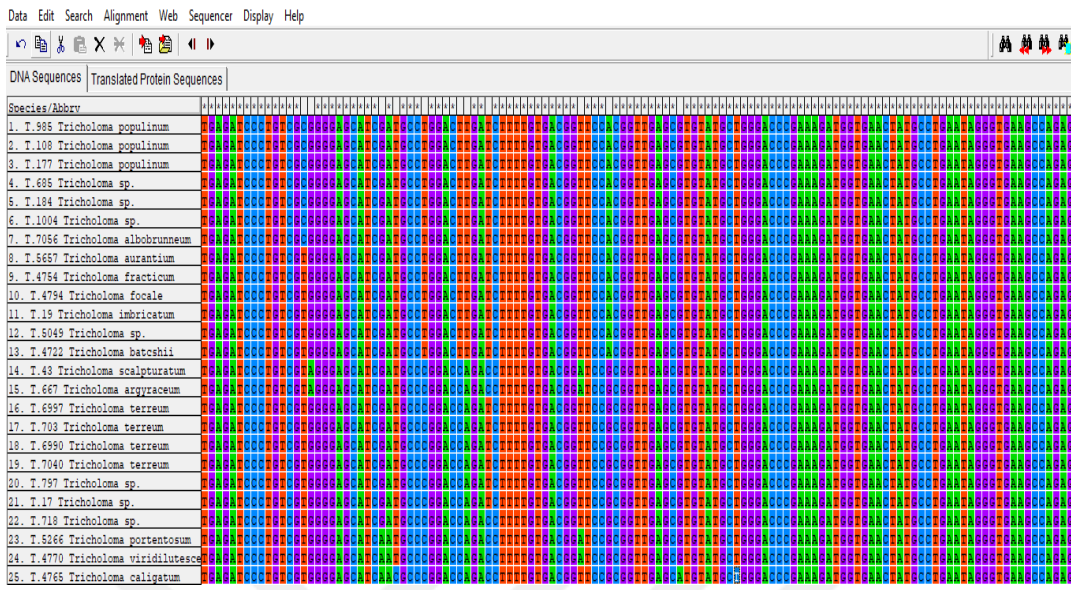
ggactaccaggccttatgtgatgcgctcctcaaaagagtcgagttgtttgggaatgcagctctaaatgggtggtaaattccatctaa
agctaaatattggcgagagaccgatagcgaacaagtaccgtgagggaaagatgaaaagaactttggaaagagagttaaaca
gtacgtgaaattgtgaaagggaaacgcttgaagtcagtcgcttggcagggatcagcccttgcctttcttcttggcactttc
tggtgacgggtcagcatcaatttaacaggtggataaaggtaacgggaaaggatcttcggatgtgtttatagcccttgggtg
tatacatcggttgggattgaggaactcagcagccgcaaggccgagtggtttacacactacgtttacgtgcttaggatgtggca
taatggctttaatcagccgtcttgaacacggaccaaggagttaacatgcgcgcgagtggttgggtggaaaaccgagcgc
gtaatgaaagtgaaaattgagatccctgtcgtggggagcatcaacgcccggaccagacctttgtgacggttccgcgggtgag
catgtatgttgggaccgaaagatggtgaactatgcctgaatgggtgaagccagaggaaactctggtggaggctcgtagcgc
attctgaagtcaaatc gatc gtc aaatttgggtataggggc ga aa gacta

4.2.3. Çoklu dizi hizalama

Materyal ve yöntem kısmında belirtildiği gibi bu çalışmada elde edilen dizilere veri tabanından alınan diziler de dahil edilmiş ve çoklu dizi hizalama metodu ile tüm diziler bir araya getirilip hizalanmıştır. Çoklu dizi hizalamanın amacı bireylerin dizileri arasındaki homolojiyi ve farklılıkları belirlemektir. Şekil 4.9 ve 4.10'da *Tricholoma* türlerinin ITS ve LSU gen bölgelerine ait hizalanmış dizilerin görüntüsünden küçük bir kesit verilmiştir.



Şekil 4. 9. Çalışılan *Tricholoma* örneklerinin ITS gen bölgesine ait hizalanmış sekansların görüntüsü.



Şekil 4. 10. Çalışılan *Tricholoma* örneklerinin LSU gen bölgesine ait hizalanmış sekansların görüntüsü.

4.3. Filogenetik Analiz

Filogenetik analiz yapılırken ITS bölgesi için; 16 tür (tekrarlarla birlikte 37 birey) ve 4 tanımlanamayan örnek (tekrarlarla birlikte 8 birey) ile birlikte toplamda 45 sekans analiz edilmiştir. Bu analizlere NCBI veri tabanından alınan 23 türe ait 35 ITS sekansı da dahil edilmiş ve toplamda 80 sekans kullanılmıştır (* simgesi, NCBI veri tabanından alınan örnekleri temsil etmektedir). Bölge uzunluğu 573 bç (T.667-1 *Tricholoma argyraceum*) ile 700 bç (T.4722-1 *T. batschii*) arasında değişmiştir. Tüm bireyler hizalandığında bölge uzunluğu 699 bç olmuştur. Bu durum bireylerin hizalanması ve aynı sekansların üst üste getirilmesi için çok fazla indel bölgelerinin kullanıldığını göstermektedir. MEGA programı kullanılarak her bir bölge için hesaplanan moleküler çeşitlilik parametreleri Çizelge 4.1’te gösterilmiştir.

ITS bölgesi için hizalanmış dizi setinde 96 baz bölgesinde indel ve 256 tanesi parsimoni informatif olan 322 nükleotit varyasyonu saptanmıştır (Çizelge 4.1). Çalışılan türler arasında en fazla genetik uzaklık *Tricholoma imbricatum* (T.19-1, T.19-2) ile *T. subannulatum* (T.3523-1, T.3523-2) arasında belirlenmiştir. Bu bölgedeki varyasyon içeren kısımlar ITS1 ve ITS2 değişken bölgeleridir. Dizi setinde 14-267. bazlar arası

ITS1 bölgesi, 424-679. bazlar arası ITS2 bölgesi olarak belirlenmiştir. ITS1 bölgesinde 172 adet varyasyon saptanırken ITS2 bölgesinde 150 adet varyasyon saptanmıştır. Bu bölgelerin belirlenmesinde *Tricholoma virgatum* var. *fulvoubonatum* sekansı (NR_153262, Vizzini ve ark., 2015) referans sekans olarak kullanılmıştır.

LSU bölgesi için; 16 tür (tekrarlarla birlikte 22 birey) ve 4 tanımlanamayan örnek ile birlikte toplamda 26 birey analiz edilmiştir. Bu analizlere NCBI'dan alınan 8 türe ait 10 sekans da dahil edilmiş ve toplamda 36 sekans kullanılmıştır. Bölge uzunluğu 862 bç (T.4722 *T. batschii*) ile 900 bç (T.985 *T. populinum*) arasında değişmiştir. Tüm bireyler hizalandığında bölge uzunluğu 870 bç olmuştur. LSU bölgesi için 13 baz indeli, 119 adet varyasyon ve 71 adet parsimoni informatif bölge saptanmıştır (Çizelge 4.1). Çalışılan türler arasında en fazla genetik uzaklık *T. caligatum* (T.4765-1) ile *T. subannulatum* (T.3523-1) arasında belirlenmiştir. Bu bölgedeki varyasyon içeren kısımlar D1 ve D2 değişken bölgeleridir. Dizi setinde 49-186. bazlar arası D1 bölgesi, 369-760. bazlar arası D2 bölgesi olarak belirlenmiştir. D2 bölgesi olarak belirlenen bölgede 92 adet varyasyon saptanırken D1 bölgesinde 27 adet varyasyon saptanmıştır. Bu bölgelerin sınırlarının belirlenmesinde Guadet ve ark. (1989) çalışmalarından yararlanılmıştır. Referans sekans olarak *Saccharomyces cerevisiae* (NG_042623, Kurtzman ve Robnett, 2013) kullanılmıştır.

Çizelge 4. 1. Tüm sekanslar (NCBI örnekleri dahil) kullanılarak elde edilen ITS ve LSU bölgelerinden hesaplanan moleküler çeşitlilik parametreleri

Parametreler	ITS	LSU
Takson sayısı	27	21
Sekans sayısı	81	37
Total uzunluk (bç)	699	870
Varyasyon	322	119
Parsimoni informatif sayısı	256	71
İndel sayısı (bç)	96	13
Ortalama uzaklık	0.087	0.026

Çoklu dizi hizalaması yapılırken sekanslar seksiyon bazında gruplandırılmış ve seksiyonlar kendi içerisinde analiz edilmiştir. Son literatürlere göre *Tricholoma* alt cinsi beş seksiyona (*Genuina*, *Megatracheloma*, *Tricholoma*, *Caligata*, *Terrea*) sahiptir (Heilmann-Clausen ve ark., 2017). Çalışılan örneklerin filogenetik analizleri seksiyon ayrımları yapılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler aşağıda anlatılmıştır.

4.3.1 *Genuina* seksiyonunun filogenetik analizi

Bu seksiyonu oluşturan bireyler; *Tricholoma populinum*, *T. cedretorum*, *T. albobrunneum*, *T. aurantium*, *T. focale*, *T. batschii*, *T. fracticum*, *T. subannulatum*, *T. imbricatum* ve *T. vaccinum* türleri ve *T. sp* (T.184), *T. sp* (T.685) örnekleridir.

ITS dizi setinde ITS1 ve ITS2 intronik bölgelerde en dikkat çeken varyasyon tek nükleotid varyasyonlarıdır. Seksiyon seviyesinde tür ayrımları ve yakın türlerin taksonomik durumları değerlendirilirken özellikle bu varyasyonlardan yararlanılmıştır. Veri seti incelendiğinde ilk göze çarpan kısım 526. baz ile başlayan 'TCTATTA' dizisinin *T. cedretorum** (LT000074) *T. sp.* (T.685-1, T.685-2) ve *T. sp* (184-1, 184-2) için ortak bir dizi olduğudur. *Tricholoma populinum* (T.108, T.177, T.985), *T. populinum** (LT000143), *T. cedretorum* (T.1004- 1, T.1004-2) türlerinde ve *T. sp* (T.184-1, T.184-2), *T. sp* (T.685-1, T.685-2) örneklerinde 459. bazda oluşan transisyon mutasyonu ile T – C dönüşümü görülmektedir. *T. cedretorum** (LT000074) türünde ise 459. bazda oluşan transversiyon mutasyonu ile T – A dönüşümü dikkat çekmektedir. Dikkat çekici diğer bir kısım *T. sp.* (T.685-1, T.685-2) örneği için 443. bazda oluşan G – A transisyon dönüşümüdür.

Farklı habitatlardan toplanmış olan *T. populinum* (T.108, T.177, T.985) türlerinde ITS1 bölgesinde 35. bazda, G – A dönüşümü görülmüştür. Benzer şekilde *T. populinum* (T.108, T.177, T.985) ve *T. populinum** (LT000143) türlerinde ITS2 bölgesinde 641. bazda C – T dönüşümü tür seviyesinde diğer türlerden ayıran bir varyasyon olarak göze çarpmıştır.

*Tricholoma albobrunneum** (AF241520, JF908734) ve *T. albobrunneum* (7056-1,7056-2) sekanslarına özgü; ITS1 bölgesinde 19. bazda C – A dönüşümüyle oluşan transversiyon mutasyonu, 80. bazda C – T dönüşümüyle oluşan transisyon mutasyonu

ve 205. bazda T – C dönüşümüyle oluşan transisyon mutasyonu tür seviyesindeki önemli ayrımlardandır. 451. bazda C – T dönüşümü ile *T. aurantium* (T.5016, T.5049, T.5657) ve *T. aurantium** (DQ367919) türleri veri seti içinde diğer türlerden ayırma teşkil etmiştir. *Tricholoma focale* (T.4810, T.4794) türlerinde 512. bazda G – A dönüşümü ile *T. focale* (T.4810, T.4794) ve *T. focale** (KJ705238, FJ845447) türlerinde 226. bazda T – A dönüşümü görülmektedir.

Oluşturulan ağaçta aynı grupta yer alan *T. batschii* (4722-1, 4722-2), *T. batschii** (JQ685729), *T. fracticum* (4754-1, 4754-2), *T. fracticum** (AF377238), *T. subannulatum* (3523-1, 3523-2) ve *T. subannulatum** (AY573541) türlerinde 8. (T – C) 68. (C – T) ve 79. (C – T) bazlarda oluşan transisyon mutasyonları ile 498. (T – G) bazlarda oluşan transversiyon mutasyonu dikkat çekici nükleotit substitüsyonlarıdır. 448., 521., 526., ve 534. bazlarda görülen transisyon mutasyonları ile 430. ve 672. bazlarda görülen transversiyon mutasyonları *T. imbricatum* (T.19-1, T.19-2), *T. imbricatum** (LT000024) türlerini *T. vaccinum* türünden ve seksiyon içindeki diğer türlerden ayıran dikkat çekici varyasyonlardır. Benzer şekilde *T. vaccinum* (T.94, T.5993) ve *T. vaccinum** (KU058521, KJ705241) türlerini *T. imbricatum* türlerinden ve seksiyon içindeki diğer türlerden ayıran varyasyonlar ise; 147. (G – A), 153. (C – T) ve 562. (T – C) bazlarda görülen transisyon mutasyonları ile 438. (T – A) ve 641. (C – A) bazlarda görülen transversiyon mutasyonları ve 617. bazda oluşan insersiyon mutasyonudur.

LSU bölgesi incelendiğinde *T. focale* (T.4794) ve *T. focale** (U76460) örneklerinde 55. bazda C – T dönüşümü göze çarpmaktadır. *Tricholoma imbricatum* (T.19), *T. imbricatum** (U76458) *T. vaccinum* (T.94) ve *T. vaccinum** (KU058559, GQ289219) türlerinde 58. bazda görülen A – G dönüşümü seksiyon içindeki dikkat çekici varyasyonlardan biridir. Tüm dizi setinde diğer türlerle karşılaştırıldığında özellikle *T. subannulatum* (T.3523), *T. fracticum* (T.4754) ve *T. batschii* (T.4722) türlerinde 395. (T – C), 403. (C – T), 414. (G – T) bazlarda oluşan varyasyonlar göze çarpmaktadır. Son olarak bu bölgede *T. populinum* (T.108, T.177, T.985) ve *T. populinum** (JN019648) türlerinde 489. bazda C – A baz dönüşümü görülmüştür.

4.3.2 *Megatricholoma* seksiyonunun filogenetik analizi

Çalışılan örnekler içerisinde *Megatricholoma* seksiyonuna ait herhangi bir tür tanımlanmamıştır. Bu nedenle çok fazla varyasyon barındıran bu seksiyon sadece NCBI veri tabanından alınan türlerle değerlendirilebilmiştir. NCBI veri tabanında LSU bölgesine ait herhangi bir sekans verisi olmadığı için analizler ITS bölgesi için yapılabilmektedir. Bu doğrultuda alınan türlerden *T. roseoacervum** (LT000073), *T. acervum** (MH628231, LT000005), *T. japonicum** (AB036900, AF204810) ve *T. colossium** (LT000164) türlerinin ITS1 ve ITS2 bölgelerinde oldukça fazla varyasyon saptanmıştır. En dikkat çekici varyasyonlar *T. colossium* türünde görülmekte olup, ihtiva ettiği bu varyasyonlardan ötürü çizilen ağaçta seksiyon içindeki diğer türlerden evrimsel olarak en uzakta yer almıştır.

4.3.3. *Tricholoma* seksiyonunun filogenetik analizi

Bu seksiyonu oluşturan bireyler; *Tricholoma portentosum* ve *T. viridilutescens* türleridir. ITS1 bölgesinde *T. viridilutescens* (T.4770-1, T.4770-2) ve *T. viridilutescens** (LT000095) türlerinde A – G değişimi ile 168. bazda G – A değişimi ve ITS2 bölgesinde 497. bazda C – T ve 452. bazda T – G dönüşümü görülmüştür. ITS1 bölgesinde *T. portentosum* türlerinde 193. bazdan başlayan ‘TA’ dizisi, *T. viridilutescens* türüne ait örneklerde ‘CC’ dizisine dönüşmüştür.

LSU bölgesinde, *T. portentosum* (T.5266), *T. portentosum** (U76464) ve *T. viridilutescens* (T.4770) türlerinde 375. bazda G – T dönüşümü ile oluşan transversiyon mutasyonu bu türler için ayırt edici olmuştur.

4.3.4. *Caligata* seksiyonunun filogenetik analizi

Tricholoma caligatum türü çalışılan bireyler arasında bu seksiyona ait tek türdür. *Tricholoma caligatum* (T.4765-1, T.4765-2) ve *T. caligatum** (KC565866, LT000079) türlerinde benzer değişimler gözlenirken, *T. anatolicum** (MF612194), *T. matsutake** (AY391712), *T. magnivelare** (AY391712) türleri birlikte benzer varyasyonlar göstermiştir. Seksiyon içerisinde ve hatta tüm dizi setinde en dikkat çeken kısım *T.*

caligatum (T.4765-1, T.4765-2) ve *T. caligatum** (KC565866, LT000079) türlerinde 119. ve 165. bazlar arasında uzun indellerin görülmesidir. Aynı durum Benazza-Bouregba ve ark. (2016) tarafından da gözlenmiştir.

LSU bölgesinde, *T. caligatum* (T.4765) ve *T. caligatum** (KU058548, U76467) türlerinde 66. (C – T), 155. (T – C) ve 742. (C – T) bazlarda oluşan transisyon mutasyonları ile 536. (C – A), 548. (T – G) ve 656. (A – T) bazlarda oluşan transversiyon mutasyonları tür seviyesindeki önemli ayrımlar olmuştur.

4.3.5. *Terrea* seksiyonunun filogenetik analizi

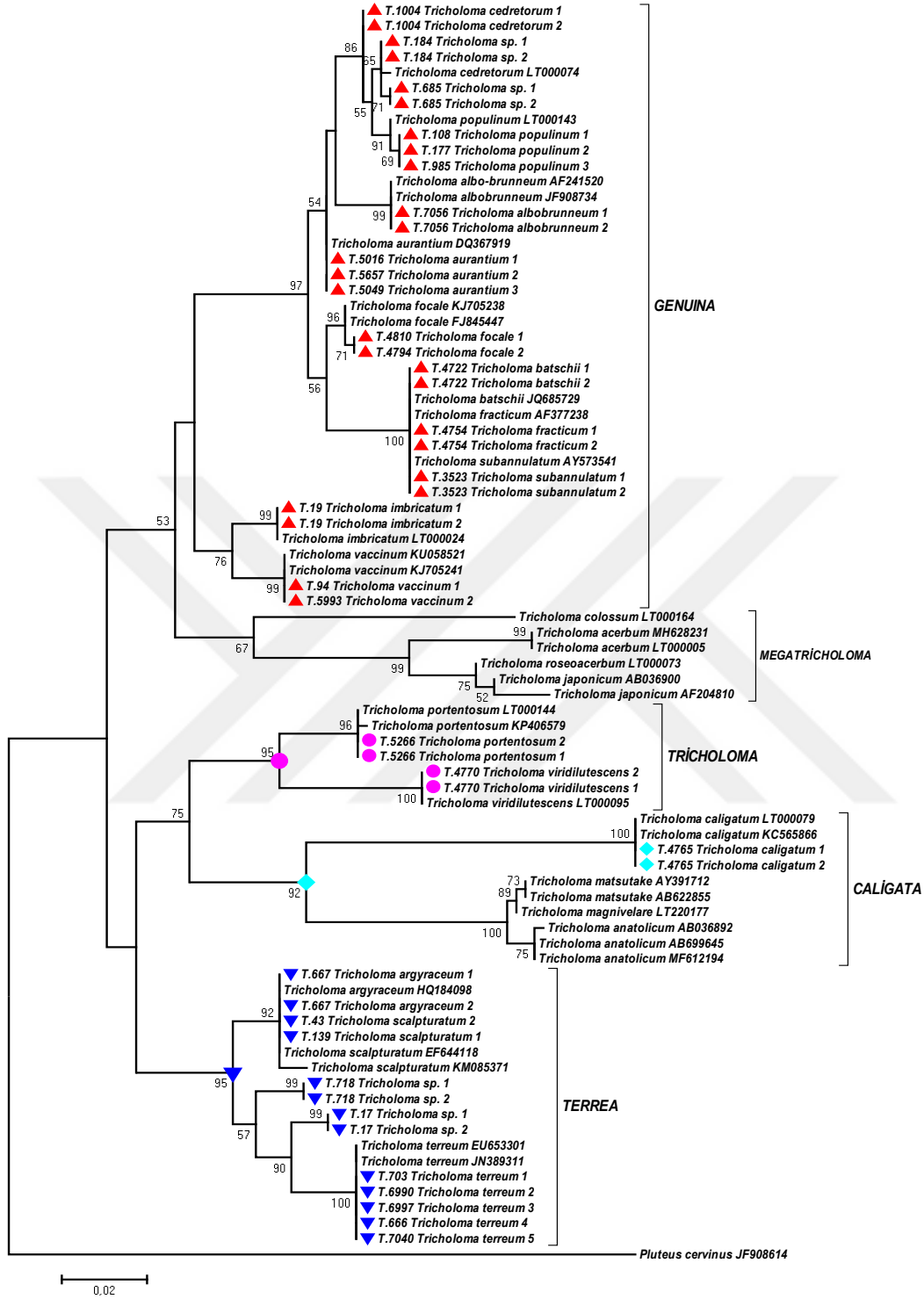
Bu seksiyonu oluşturan bireyler; *Tricholoma scalpturatum*, *T. argyraceum* ve *T. terreum* türleri ile *T. sp.* (T.17), *T. sp.* (T.718) örnekleridir.

ITS1 bölgesinde *T. scalpturatum* (T.43, T.139), *T. scalpturatum** (KM085371, EF644118) ve *T. argyraceum* (T.667-1, T.667-2) ile *T. argyraceum** (HQ184098) türlerinde 19. bazda A – C dönüşümü, 24., 35. ve 39. bazlarda A – G dönüşümü ve 179. bazda T – C dönüşümü görülürken, ITS2 bölgesinde 597. bazda G – A dönüşümü bu türleri seksiyon içindeki diğer türlerden ayıran dikkat çekici substitüsyonlardır. *Tricholoma sp.* (T.718-1, T.718-2) örneğinde ITS1 bölgesinde, 18. ve 26. bazlarda C – T dönüşümüyle oluşan transisyon mutasyonları ile 163. bazda C – A dönüşümüyle oluşan transversiyon mutasyonları bu örneği seksiyon içindeki diğer üyelerden ayırmıştır. *Tricholoma sp.* (T.17-1, T.17-2) örneğinde ise ITS1 bölgesinde 167. bazda C – T dönüşümü ve 191. bazda T – C dönüşümü dikkat çekicidir. Farklı habitatlardan toplanmış *T. terreum* (T.666, T.703, T.6990, T.6997, T.7040) ve NCBI'dan alınan *T. terreum** (JN389311, EU653301) türlerinde; ITS1 bölgesinde 257. bazda C – A dönüşümü ve 260. bazda A – T dönüşümü görülmüştür.

LSU bölgesinde, *T. scalpturatum* (T.43), *T. scalpturatum** (JN389350) ve *T. argyraceum* (T.667) türlerinde 167. bazda A – C dönüşümü ve 739. bazda T – A dönüşümüyle oluşan transversiyon mutasyonu ile 186. bazda C – T dönüşümü oldukça dikkat çekicidir. Dikkat çekici bir diğer değişim, *T. terreum* (T.703, T.6990, T.6997, T.7040), *T. terreum** (EU439362) türlerinde olup, 58. ve 178. bazlarda (A – G) oluşan transisyon mutasyonu ile 404. bazda (G – T) oluşan transversiyon mutasyonudur.

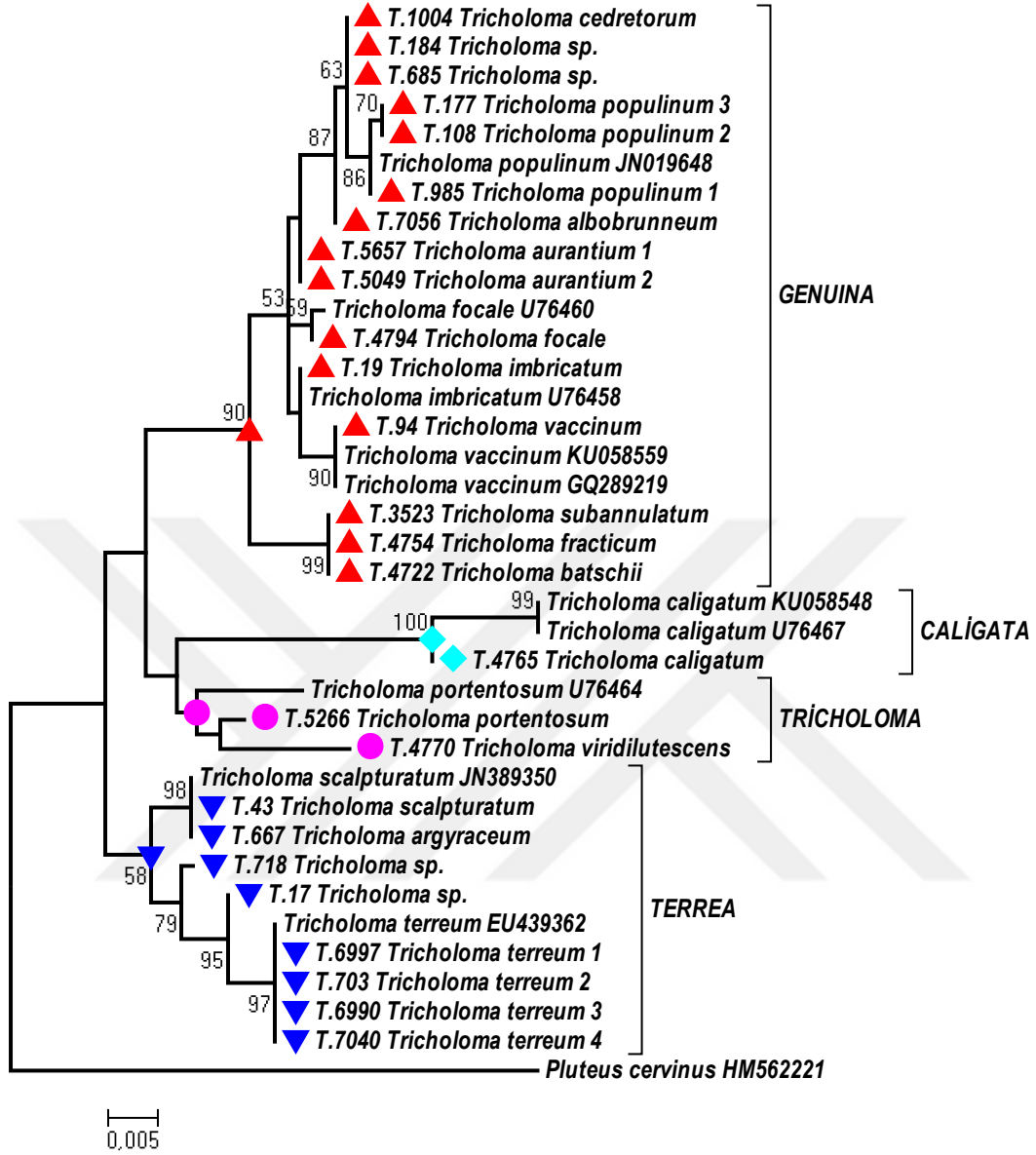
Her gen bölgesi için oluşturulan dizi setleri analiz edilip moleküler çeşitlilik parametreleri hesaplandıktan sonra elde edilen bu verilerin grafiksel gösterimi için filogenetik ağaçlar çizdirilmiştir. Filogenetik ağaçlar oluşturulurken evrimsel uzaklıklar Tamura-3 metodu (T92+G) kullanılarak hesaplanmış ve elde edilen ağacın güvenilirliğini artırmak için 1000 bootstrap tekrarı yapılmıştır (Felsenstein, 1985). Maksimum Likelihood ve Maksimum Parsimony bootstrap analizleri yapılmış benzer sonuçlar vermiştir. Yapılan analizler ile oluşturulan filogenetik ağaç verileri seksiyon bazında değerlendirilmiştir. Seksiyon değerlendirmesi Heilmann-Clausen ve ark. (2017) çalışmasına göre yapılmıştır. Maksimum Likelihood analizi kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlar Şekil 4.11 (ITS) ve 4.12 (LSU)'da gösterilmiştir. Her tür için en az iki örnekten sekanslar elde edilmiş, her türün ve tanımlanamayan örneklerin tekrarları yapılmıştır. Bu çalışmada ITS bölgesi için; 16 tür (tekrarlarla birlikte 37 birey) ve 4 tanımlanamayan örnek (tekrarlarla birlikte 8 birey) ile toplamda 45 birey analiz edilmiştir. LSU için; 16 tür (tekrarlarla birlikte 22 birey) ve 4 tanımlanamayan örnek ile birlikte toplamda 26 birey analiz edilmiştir. Oluşturulan ağaçta *Tricholoma* alt cinsinde yer alan 5 seksiyondan 4 seksiyona (*Genuina*, *Terrea*, *Caligata* ve *Tricholoma*) ait türler çalışılmış olup, *Megatracholoma* seksiyonu sadece NCBI veri tabanından alınan türler ile değerlendirilebilmiştir.

Her iki bölge için çizdirilen ağaçlarda tutarlı evrimsel ayrımlar meydana gelmiştir. Ancak LSU için oluşturulan ağaçta NCBI veri tabanında bulunan sekansların az sayıda olmasından dolayı takson sayısı ITS ağacına göre daha az olmuştur ve bu durum hizalanmış veri setinde parsimoni informatif bölge sayısının daha az olmasına neden olmuştur. LSU bölgesi ekzonik bir bölgedir ve kodlama yaptığı için evrimsel süreçte korunmuştur. Ancak bu bölge için dizi setinde beklenenden fazla varyasyon görülmüştür. Bundan dolayı çizdirilen ağaç evrimsel düzeyde ITS kadar bilgi verici olmasa da seksiyon seviyesinde ayırım sağlamıştır.



Şekil 4. 11. ITS gen bölgesine ait ML metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç.

İşaretili türler çalışmada kullanılan türlerdir. Diğer türler NCBI veri tabanından alınmıştır (*Pluteus cervinus* dış grup). Kırmızı üçgen; *Genuina* seksiyonu, pembe daire; *Tricholoma* seksiyonu, açık mavi dörtgen; *Caligata* seksiyonu ve lacivert ters üçgen; *Terrea* seksiyonunu göstermektedir.



Şekil 4. 12. LSU gen bölgesine ait ML metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç.

İşaretili türler çalışmada kullanılan türlerdir. Diğer türler NCBI veri tabanından alınmıştır (*Pluteus cervinus* dış grup). Kırmızı üçgen; *Genuina* seksiyonu, pembe daire; *Tricholoma* seksiyonu, açık mavi dörtgen; *Caligata* seksiyonu ve lacivert ters üçgen; *Terrea* seksiyonu göstermektedir.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mantarlar ekosistemin doğal bir parçası olup yaşam zincirinde önemli bir yere sahiptirler. Ülkemiz bu anlamda zengin bir çeşitliliğe sahip olup bu çeşitliliğin belirlenmesi ve korunması gerekmektedir. Bu doğrultuda sistematik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bilim alanı, canlıların oluşumlarını esas alarak onları belli gruplara ayırmaktadır. Son yıllarda bu morfolojik ve anatomik verilerle birlikte moleküler biyoloji alanındaki gelişmelere dayanarak genetik materyalden elde edilen verilerden de yararlanılarak sistematik çalışmaları oldukça artmıştır. Tez çalışmamızda, ülkemizde moleküler seviyede kapsamlı olarak çalışılmamış olan *Tricholoma* cinsine ait mantarlar klasik yöntemlerle birlikte moleküler yöntemler de kullanılarak çalışılmıştır.

Çalışma kapsamında doğadan toplanan ve *Tricholoma* cinsine ait olduğu düşünülen mantarların ilk olarak makroskobik ve mikroskobik karakterleri kullanılarak VANF ekibi tarafından teşhisleri yapılmıştır. Örnekler fungaryum materyali haline getirilmiş ve tez çalışması başlayınca yeniden değerlendirilmiştir. Yapılan teşhisler gözden geçirilmiş ve sonrasında moleküler çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla iki farklı gen bölgesi analiz edilmiş ve elde edilen veriler bir ağaç üzerinde grafiksel olarak gösterilmiştir. Dizilerden elde edilen verilerle, çalışılan bireylerin evrimsel ilişkileri seksiyon seviyesinde değerlendirilmiştir. Morfolojik ve moleküler değerlendirmelere rağmen çalışılan 4 örnek (T.17, T.184, T.685, T.718) herhangi bir türle eşleşmemiştir. Yapılan bütün değerlendirmeler (makroskobik, mikroskobik ve moleküler veriler) neticesinde bu örneklerin dünya mikobiyotası için yeni türler olduğu tespit edilmiştir.

Çalışma kapsamında ribosomal DNA üzerinde bulunan ve evrimsel anlamda bilgi verici olarak kabul edilen (Schoch ve ark., 2012; Raja ve ark., 2017) ITS ve LSU bölgeleri kullanılmıştır. Bu bölgelerden ITS bölgesi, LSU bölgesine kıyasla daha fazla varyasyon ve indel bölgeleri içermiştir. Genetik bilginin duplikasyonundaki hatalar, bir veya birkaç nükleotidin insersiyon veya delesyonuyla sonuçlanabilmektedir ve bu hatalar toplamda indel olarak ifade edilirler (Lemey ve ark., 2009). İndellerin ITS1 ve ITS2 bölgelerinde yoğunlaşması ve 5.8S bölgesinde olmaması da beklenen bir durumdur. DNA replikasyonu esnasında olan mutasyonlar ekzon olan bölgelerde dikkate alınıp DNA tamir mekanizması ile düzeltilmekte ama intron bölgelerinde her

zaman düzeltilememektedir. Bu nedenle indel ve varyasyonlar ITS1 ve ITS2 bölgelerinde daha fazla beklenmektedir. Bazı araştırmacılara göre ITS1 bölgesi ITS2 bölgesine oranla daha fazla varyasyon içermektedir (Nilsson ve ark., 2008; Wang ve ark., 2015). Bu durum yapılan analizlerde de gözlenmiştir. Benzer durum LSU bölgesinde de gözlenmiştir. Bu bölge içerisinde bulunan D1/D2 değişken bölgelerinde gözlenen varyasyon oranı D2 bölgesinde daha fazla olmuştur. Liu ve ark. (2012) fungal taksonlar arasında D2 bölgesinin D1 bölgesine göre daha değişken olduğunu ifade etmişlerdir.

ITS verisiyle oluşturulan filogenetik ağaçta, LSU ağacına göre daha yüksek bootstrap değerleri alınmıştır. Filogenetik analizlerde, bootstrap değerinin %70 ve üzerinde olması evrimsel ilişkilerin belirlenmesinde güvenilir olarak kabul edilir. Elde edilen her iki ağaçta da seksiyon seviyesinde filogenetik ayrım görülmüştür. ITS ağacında iki ana klad görülmüştür. Bu kladların ilkinde *Genuina* (%97) ve *Megatracholoma* (%67) seksiyonları bulunurken, diğerinde *Caligata* (%91), *Tricholoma* (%96) ve *Terrea* (%95) seksiyonları bulunmaktadır. LSU ağacında da iki ana klad oluşmuştur. *Genuina*, *Caligata* ve *Tricholoma* seksiyonları ilk kladda ayrı ayrı kümelenirken, *Terrea* seksiyonu çalışılan tüm seksiyonlardan ayrılarak diğer kladda yer almıştır. Seksiyonları oluşturan türler morfolojik açıdan ortak özellikler sergilemektedir. Bu doğrultuda paylaşılan özellikler ve farklılıklar seksiyonlar halinde aşağıda anlatılmıştır.

5.1. *Genuina* Seksiyonun Filogenetik Değerlendirilmesi

Genuina seksiyonu barındırdığı takson sayısı bakımından ITS ve LSU ağaçlarında daha fazla birey sayısına sahiptir. Seksiyon üyeleri kırmızmsı-kahverengi renkte, genellikle yapışkan şapka derisi (pileipellis) ile karakterizedir. Taksonomik olarak bu seksiyon içerisinde kümelenen *Tricholoma* örnekleri ayrıntılı olarak aşağıda ele alınmıştır.

Tricholoma cedretorum türü, ITS ağacında NCBI'dan alınan *T. cedretorum** türüyle yakın kümelenmiş ancak *T. populinum* ile *T. sp.* (T.184-1, T.184-2) ve *T. sp.* (T.685-1, T.685-2) örnekleri de bu kümelenmenin içinde yer almıştır. Genetik olarak

çalışılan *T. cedretorum* türü ile veri tabanından alınan tür arasında tek nükleotit varyasyonu belirlenmiştir. NCBI veritabanından alınan *T. cedretorum* türü Heilmann-Clausen ve ark. (2017) tarafından çalışılmış olup Kuzey Avrupa'dan toplanmıştır. Bu genetik uzaklığın nedeni farklı filocoğrafik etmenlere maruz kalmalarından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. LSU ağacında da ITS ağacında olduğu gibi *T. cedretorum* türü, *T. sp.* (T.184), *T. sp.* (T.685) örnekleri ve *T. populinum* türleriyle kümelennmiştir. *Tricholoma cedretorum* türünün NCBI veri tabanında LSU bölgesine ait sekans verisi olmadığı için bu anlamda bir kıyaslama yapılamamıştır.

Seksiyon içerisinde farklı habitatlardan toplanmış olan *T. populinum* türleri ile NCBI'dan alınan *T. populinum** türü %91 bootstrap değeriyle bir araya gelmişlerdir. Morfolojik olarak *T. cedretorum* ve *T. populinum* örnekleri benzerlik göstermektedir. Ancak mikroskopik karakterleri detaylı incelendiğinde türlerin ayrımları yapılabilmektedir. *Tricholoma cedretorum* türünün bazidyumu; 22-26 × 5-6 µm, sporları; 5-6 × 3.5-4.5 µm boyutlarında iken, *T. populinum* türünün bazidyumu; 25-38 × 5-6 µm, sporları; 4.5-6 × 3.5-4 µm boyutlarındadır. Bu ayrım Noordeloos ve Christensen (1999) tarafından da bildirilmiştir. Ayrıca çalışılan *T. populinum* türü *Populus* ağaçları altında yetişirken (Grubisha ve ark., 2012) *T. cedretorum* iğne yapraklı ağaçların altında yetişmektedir (Doğan ve Kurt, 2016). *Tricholoma sp.* (T.685) ve *T. sp.* (T.184) örneklerinin ayrıntılı deskripsiyonları Moleküler Değerlendirme (Bkz. Bölüm 4.1.) kısmında verilmiş olup dünya mikrobiyotası için yeni türler olduğu belirlenmiştir.

Tricholoma albobrunneum türleri ITS ağacında NCBI veri tabanından alınan *T. albobrunneum** türleri %99 bootstrap ile kümelennmiştir. LSU ağacında ise NCBI veri tabanında bu türe ait herhangi bir sekans verisi olmadığı için değerlendirme yapılamamıştır. Bu tür seksiyona ait çalışılan diğer tüm türlerden pileipelliste bulunan düzensiz hifleri ile morfolojik olarak ayırt edilebilmektedir.

ITS ağacında farklı habitatlardan toplanmış *T. aurantium* türleri ile NCBI veri tabanından alınan *T. aurantium** birlikte kümelennmiştir. LSU ağacında ise NCBI veri tabanında bu türe ait herhangi bir sekans verisine rastlanmadığı için değerlendirme yapılamamıştır. Bu tür morfolojik olarak seksiyona ait çalışılan türlerden farklılık gösterir. Morfolojik olarak ise altın sarısı veya turuncu renkteki belirgin şapka rengi ile diğer türlerden ayırt edilebilmektedir. Ekolojik olarak diğer türlerden farklı bir habitata

sahip olması da dikkat çekicidir. Kibby (2010), bu türün özellikle kireçli topraklarda yetiştiği belirtmiştir.

Farklı habitatlardan toplanmış *T. focale* türleri ile NCBI veri tabanından alınan *T. focale** türleri %96 bootstrap değeri ile gruplanmışlardır. Ancak çalışılan türler ile veri tabanından alınan türler arasındaki genetik uzaklık değeri %0.2 olduğu için çalışılan *T. focale* türleri kendi aralarında %71 bootstrap ile ayrı bir gruplanma oluşturmuştur. LSU ağacında ise *T. focale* türü kendi temsilcisiyle (%59) ayrı bir grup oluşturmuştur. *Tricholoma focale* türü annulus yapısına sahip olduğu için Noordeloos ve Christensen (1999) tarafından *Caligata* seksiyonuna dahil edilmiş ancak 2017 yılında yapılan moleküler çalışma ile (Heilmann-Clausen ve ark. 2017) *Genuina* seksiyonunda yer aldığı bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da bu türün *Genuina* seksiyonunda yer aldığı makroskobik, mikroskobik ve moleküler veriler ile desteklenmiştir.

Tricholoma batschii, *T. fracticum* ve *T. subannulatum* türleri ITS ağacında %100 bootstrap ile bir grup oluşturmuşlardır. ITS sekans verisi içerisinde birçok yerde görülen transisyon ve transversiyon mutasyonlarından dolayı bu türler seksiyon içindeki diğer türlerden moleküler olarak farklılık göstermektedir. LSU ağacında ise bu türler %99 bootstrap değeriyle diğer türlerden ayrı bir grup oluşturmuştur. Her iki ağaçta da bu türler birbirlerinden moleküler seviyede farklılık göstermemişlerdir. Michael Kuo (2006) tarafından *T. batschii* ve *T. subannulatum* türlerinin sinonim oldukları iddia edilmiş ancak Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>) veri tabanında sinonim olmadıkları belirtilmiştir. Morfolojik olarak değerlendirildiğinde hem makroskobik hem mikroskobik özellikleri ile belirgin farklılıklar gösterirler. *Tricholoma subannulatum* türünün şapka genişliği maksimum 10 cm'ye kadar ulaşırken, *T. batschii* türünün 12 cm'ye, *T. fracticum* türünün ise 15 cm'ye kadar genişler. Ayrıca *T. subannulatum* türünün sporları; 6-6 × 5-6 µm boyutlarındayken, *T. fracticum* türünün sporları; 4.5-7.5 × 3.5-6 µm boyutlarında ve *T. batschii* türünün sporları 7-9 × 5-7 µm boyutlarındadır. Klasik yöntemler ile farklı tür olarak kabul edilse de DNA seviyesinde aynı diziye sahip olmaları bu türlerin yakın süreçte türleşme yaptıklarını gösterebilir. Heilmann-Clausen ve ark. (2017) tarafından *T. batschii*, annulus yapısının farklı olmasından dolayı subannulate tür olarak belirtilmiştir. *Tricholoma subannulatum* ve *T. fracticum* türleri de saplarının iki renk tonuna sahip olmaları (sapın alt kısmı turuncumsu kahverengi,

şapkaya yakın kısmı beyaz) ile oluşan renk geçişi noktasındaki halka benzeri yapıdan ötürü subannulate tür olarak değerlendirilebilir.

Farklı habitatlardan toplanmış *T. vaccinum* türleri kendi temsilcileriyle %99 bootstrap ile *T. imbricatum* türleri de kendi temsilcileriyle ITS ağacında %99 bootstrap ile gruplanmışlardır. Bu iki takson grubu da birlikte %76 bootstrap ile gruplanmışlardır. LSU ağacında benzer kümelenme görülmüştür. Bu sonuç Heilmann-Clausen ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Moleküler olarak barındırdıkları varyasyonlardan dolayı farklılık teşkil eden bu türler makroskopik olarak da farklı özelliklere sahiptirler. *Tricholoma vaccinum* türünün şapka yapısı pullu ve kenarları velum kalıntısı taşırken, *T. imbricatum* türünde şapka *T. vaccinum* türüne göre daha az pullu ve velum kalıntısı taşmaz. Bu iki türün makroskopik olarak farklı oldukları Moreau (2011) tarafından da belirlenmiştir.

5.2. *Megatracholoma* Seksiyonunun Filogenetik Değerlendirilmesi

Megatracholoma seksiyonuna ait herhangi bir tür çalışma kapsamında tanımlanmamıştır. Bu seksiyon *Tricholoma* alt cinsine ait beş seksiyondan biri (Heilmann-Clausen ve ark., 2017) olduğu için seksiyon bazındaki ayrımları görebilmek adına analizlere dahil edilmiştir. *Megatracholoma* seksiyonu ilk olarak cins seviyesinde bir tanımlama ile öne sürülen bir takson olmakla birlikte *T. colossus* türünü içerdiği için monotipik bir cins olduğu iddia edilmiştir (Kost 1984). Bu görüş Noordeloos ve Christensen (1999) tarafından sorgulanmış ve *Megatracholoma* taksonu seksiyon olarak kabul edilmiştir. Heilmann-Clausen ve ark. (2017) tarafından *T. acerbum* ve *T. roseoacerbum* türlerinin de bu seksiyonun üyeleri olduğu belirtilmiştir. Her üç tür de çok sağlam ve kısa sap yapısına, sık lamellere ve içe kıvrık şapka yapısına sahiptir. Ancak *T. colossus* türü annulosa sahip sap yapısı ve büyük sporlarla bu iki türden ayrılmaktadır.

5.3. *Tricholoma* Seksiyonunun Filogenetik Değerlendirilmesi

Tricholoma seksiyonuna ait türler doğada fibrilli ve pullu pleipellis yapısı ile beyazımsı, grimsi, yeşilimsi veya sarı şapka renkleriyle karakterizedirler (Noordeoos ve Christensen, 1999). *Tricholoma viridilutescens* ve *T. portentosum* türleri ITS ağacında kendi temsilcileriyle birlikte sırasıyla %100 ve %96 bootstrap ile grup oluşturmuşlardır. Bu seksiyonda çalışma kapsamında sadece bu iki tür tanımlanmıştır. LSU ağacında da bu iki tür filogenetik seviyede yakın konumlanmış ve diğer seksiyonlara ait türlerden ayrılmışlardır. İki tür arasındaki moleküler seviyedeki ayırım morfolojik karakterler incelendiğinde de görülmektedir. *Tricholoma portentosum* türünde şapka 12 cm'ye kadar genişlerken, *T. viridilutescens* türünde 6 cm'ye kadar genişler. *T. portentosum* türünün sporları; $5-7 \times 4-5.3 \mu\text{m}$ boyutlarındayken, *T. viridilutescens* türünün sporları $6-8 \times 5-6 \mu\text{m}$ boyutlarındadır. Heilmann-Clausen ve ark. (2017) tarafından da bu türler yakından ilişkili olarak bu seksiyon içerisinde yer almış ve *T. viridilutescens* türünün kriptik bir çeşitliliğe sahip olduğu savunulmuştur.

5.4. *Caligata* Seksiyonunun Filogenetik Değerlendirilmesi

Caligata seksiyonu üyeleri, beyazımsı, soluk kahverengi-koyu kırmızımsı kahverengi, krem kahverengi, pullu şapka yapısı, annulusa sahip sap yapısı, oldukça büyük sporlar ve güçlü parfüm kokusu ile karakterizedirler (Heilmann-Clausen ve ark. 2017). Bu çalışma kapsamında seksiyona ait sadece *T. caligatum* türü tanımlanmıştır. Bu tür ITS ve LSU ağaçlarında kendi temsilcileriyle %100 bootstrap ile kümelennmiştir. Seksiyona ait diğer türler veri tabanından alınmıştır. *Tricholoma caligatum* veri tabanından alınan bu türlerle de (*T. anaticum*, *T. magnivelare* ve *T. matsutake*) %91 bootstrap ile gruplanmıştır. LSU ağacında seksiyona ait sadece çalışılan *T. caligatum* ile temsilcileri %99 bootstrap ile gruplanmıştır. Morfolojik olarak *T. caligatum* siyahımsı kahverengi, 12 cm'ye kadar genişleyen şapka yapısı ve 5-7 cm boyutlarında, ince uzun, üst yarısı beyaz, alt yarısı ise şapka ile aynı renkte, siyahımsı kahverengi annular zona sahip sap yapısıyla karakterizedir. Ayrıca $5.5-6.5 \times 4.4-5.3 \mu\text{m}$ boyutlarında, yuvarlağa yakın sporları ve $23.8-34.5 \times 5.8-8.1 \mu\text{m}$ boyutlarında, klavat bazidyum yapısı ile bu tür

morfolojik olarak diğer türlerden farklılık göstermektedir. Yani belirgin ayırt edici morfolojik özelliklerinden ötürü bu türün tanımlanması diğer türlere kıyasla daha kolaydır ve her iki ağaçta da *T. caligatum* türü filogenetik anlamda belirgin şekilde ayırım göstermiştir. Ancak ekolojik çeşitliliğinden dolayı tartışmalı bir türdür. Chapela ve Garbelotto (2004) tarafından bu taksonun polifiletik olduğu ve ITS bölgesinin evrimsel ayırmda yetersiz olduğu ek bölgelerin kullanılması gerektiği belirtilmiştir. Bu nedenle tez çalışmasında LSU bölgesi de ek bölge olarak çalışılmıştır. *Tricholoma caligatum*, Iwase (1994) tarafından ekolojik tür kapsamında üçe ayrılmıştır (Kuzey Afrika ve Güney Avrupa popülasyonu, Kuzeybatı Amerika popülasyonu ve Kuzeydoğu Amerika popülasyonu). Tez çalışmasında tanımladığımız *T. caligatum* türü filogenetik olarak Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika örnekleriyle ITS ağacında kümelendi.

5.5. *Terrea* Seksiyonunun Filogenetik Değerlendirilmesi

Terrea seksiyonu üyeleri, genellikle gri şapka rengi, fibrilli ve pullu pleipellis yapısı ile karakterizedir (Heilmann-Clausen ve ark. 2017). Seksiyona ait çalışılan tür ve örnekler ayrıntılı olarak aşağıda ele alınmıştır.

ITS ağacında farklı habitatlardan toplanmış *T. scalpturatum* türleri ile *T. argyraceum* türleri temsilcileriyle birlikte (%92) kümelendi. LSU ağacında da benzer filogenetik pozisyonlar (%98) görülmüştür. Bu iki türün daha önceki çalışmalarda sinonim oldukları düşünülmüştür (Bon, 1984b). Ancak Noordeloos ve ark. (1999) tarafından yapılan daha detaylı morfolojik ve Jargeat ve ark. (2010) tarafından yapılan moleküler çalışmalarla bu türlerin farklılıkları ortaya konmuştur. *Tricholoma argyraceum*, beyaz veya soluk gri renkli, küçük şapka yapısına sahipken, *T. scalpturatum* türü daha koyu gri, gri kahverengi, büyük şapka yapısına sahiptir. Ayrıca *T. argyraceum* türünde sap kısa, sporlar küçük (4-5 × 1.5-2 µm boyutlarında), *T. scalpturatum* türünde ise sap uzun, sporlar daha büyüktür (5-6 × 3-4 µm boyutlarında). Ekolojik açıdan bakıldığında *T. scalpturatum* türü kavak ağaçları altında yetişirken, *T. argyraceum* türü konifer ormanlarında yetişmektedir.

ITS ağacında, *T. sp.* (T.718-1, T.718-2) örnekleri %99 bootstrap ile kümelendi gösterirken *T. sp.* (T.17-1, T.17-2) örnekleri *T. terreum* kladına daha yakın bir

pozisyonda (%99) kümelenme göstermişlerdir. LSU ağacında da benzer evrimsel ilişki gözlenmiştir. Morfolojik olarak bu örnekler için detaylı deskripsiyon Morfolojik Değerlendirme bölümünde (Bkz. Bölüm 4.1.) verilmiştir. Bu örneklerin dünya mikrobiyotası için yeni türler olduğu belirlenmiştir.

Farklı habitatlardan toplanmış *T. terreum* türleri ITS ağacında kendi temsilcileriyle %100 bootstrap ile kümelenmişlerdir. LSU ağacında da yine temsilcisiyle %97 bootstrap ile ayrı bir grup oluşturmuştur. Moleküler seviyede olan bu ayırım, makroskopik ve mikroskopik karakterler ile de desteklenmiştir. *Tricholoma terreum* konveks şapka yapısı, koyu griden kül rengine kadar değişen şapka rengi, merkezde geniş çaplı ve belirgin küt ve konik çıkıntısı, tırtıklı şapka kenarları, ince tüylü krem beyaz pleipellis yapısı, silindirik, tabana doğru kalınlaşan, gri-beyaz renkte ve ipeksi görünümde sap yapısı, beyaz-gri beyaz renkteki sapa girinti yaparak bağlanan lamel yapısı ve $5.5-7 \times 4-5$ µm boyutunda sporları ile bu tür morfolojik olarak diğer türlerden farklılaşmaktadır. *Tricholoma terreum* kolay tanımlanabilen ve cins içerisinde taksonomik olarak tartışmasız olan bir türdür (Mankel ve ark., 1998).

Bu çalışma kapsamında *Tricholoma* cinsine ait 16 tür tanımlanırken 4 örnek tanımlanamamıştır. Bu cinse ait tanımlanan türlerin *Tricholoma* alt cinsinde yer aldığı ve seksiyonlar halinde gruplandıkları belirlenmiştir. Çalışılması zor bir takson olan *Tricholoma* cinsi üzerinde daha detaylı ve daha fazla gen bölgesi kullanılarak ileri boyutta çalışmalar yapılmalıdır. Özellikle seksiyon seviyesinde birçok problemi barındırmakta ve son yapılan çalışmalarda da bu problemlerin hala çözümlenemediği görülmektedir. Bu nedenle farklı alt cinslere ve seksiyonlara ait türler ile yeni DNA bölgeleri kullanılarak cins içinde var olan taksonomik problemler aydınlatılarak yeni bir bakış açısı sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abd-Elsalam, K.A., Aly, İ.N., Abdel-Satar, M.A., Khalil, S.M., Verreet, J.A., 2003. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal DNA sequence data. *African Journal of Biotechnology*, **2** (4): 82-85.
- Acar, İ. 2017. *Yüksekova ve Şemdinli Yörelerinde Yetişen Makrofunguslar Üzerinde Taksonomik Bir Araştırma*. (doktora tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Ainsworth, A.M. 2009. *Dichomitus efibulatus*: a recently described polypore from S.W. Britain. *Field Mycology*, **10** (2):59-62.
- Allı, H., Şen İ., 2016. *Tricholoma* türlerinin yenilebilirliği üzerine notlar. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, **4** (3): 178-181.
- Anonim, 2018. What is known about the function of introns, the nonencoding sequences in genes?. <https://www.scientificamerican.com/article/what-is-known-about-the-f/>. Scientific American. Erişim Tarihi: 13.11.2018.
- Anonim, 2018. Mycobank database, <http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Rec=57547&Fiel ds=All>, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, München, Germany. Erişim Tarihi: 13.11.2018.
- Bidartondo, M.I., Bruns, T.D., 2002. Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups. *Mol. Ecol.*, **11** (3): 557-69.
- Bessette, A.E., Bessette, A.R., Roody, W.C., Trudell, S.A. 2013. *Tricholomas of North America: A mushroom field guide*. Austin: University of Texas Press.
- Benazza-Bouregba, M., Savoie, J.M., Fortas, Z., Billette, C., 2016. A new record of *Tricholoma caligatum* (Tricholomataceae) from North Africa with a discussion of related species. *Phytotaxa* **282** (2): 119–128.
- Bon, M. 1984a. Les Tricholomes de France et d'Europe occidentale. *Encyclopedie Mycologique*, 36. Paris.
- Bon, M. 1984b. Tricholomes France, (*Tricholoma scalpturatum* var. *Tricholoma aryraceum*). Europe occ.: 153-154.
- Bon, M., 1991. *Flore Mycologique d'Europe*. 2 – Les Tricholomes et ressemblants. Doc. Mycol, Mém. hors-Sér. 2, 163.
- Boa E., 2004. Wild edible fungi, a global overview of their use and importance to people. Rome, Non Wood Forest Products 17. FAO.
- Breitenbach, J., Kränzlin, F., 1991. *Fungi of Switzerland*. Verlag Mykologia. 3rd ed. Lucerne, Switzerland. 360.
- Buczacki, S., 2012. *Collins Fungi Guide: The Most Complete Field Guide to the Mushrooms and Toadstools of Britain & Ireland*. Harper Collins Publishers, London, UK. 360.
- Campbell, N.A., Reece, J., 2010. *Biology*. Altıncı baskı. Palme yayınları, No: 381, Ankara. 313.

- Chapela, I.H., Garbelotto, M., 2004. Phylogeography and evolution in matsutake and close allies inferred by analyses of ITS sequences and AFLPs. *Mycologia* **96** (4): 730–741.
- Carriconde, F., Gardes, M., Jargeat, P., Heilmann-Clausen, J., Mouhamadou, B., Gryta, H. 2008. *Micro. Ecol.* **56** (3): 513-24.
- Chang, S. T., 1999. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. in China. *International J. Med. Mush.* **1**: 291–300.
- Christensen, M., Heilmann-Clausen, J., 2013. The genus *Tricholoma*. *Fungi of Northern Europe, vol. 4*. Svampetryk, Denmark. 228.
- Demirel, K., Koçak. M.Z., 2016. Zilan Vadisi'nin (Erciş-VAN) makrofungal çeşitliliği. *Mantar Dergisi*, **7** (2): 122-134
- Dizkırıncı, A., 2012. *Evolutionary Relationships Among Astragalus Species Native to Turkey* (doktora tezi). ODTÜ, Biyoloji Bölümü, Ankara.
- Doğan, H.H., Kurt, F., 2016. New macrofungi records from Turkey and macrofungal diversity of Pozantı-Adana. *Turkish Journal of Botany*, **40**: 209-217.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11-15.
- Dowell, K., 2008. *Molecular Phylogenetics*. Technical report, University of Maine.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783-791.
- Galli R. 1999. *Tricholomi*. Dalla Natura. Milano. İtalya.
- Garnica, S., Weiss, M., Walther, G., Oberwinkler, F., 2007. Reconstructing the evolution of agarics from nuclear gene sequences and basidiospore ultrastructure. *Mycological Research*, **111**: 1019–1029.
- Grubisha, L.C., Levens, N., Olson M.S., Taylor L.D. 2012. Intercontinental divergence in the *Populus*-associated ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma populinum*. *New Phytologist*, **194**: 548–560.
- Gryta, H., Carriconde, F., Charcosset, J.Y., Jargeat, P., Gardes, M. 2006. Population dynamics of the ectomycorrhizal fungal species *Tricholoma populinum* and *Tricholoma scalpturatum* associated with black poplar under differing environmental conditions. *Environ Microbiol.* **8** (5):773-86.
- Guadet, J., Julien, J., Lafay, J.F., Brygoo, Y., 1989. Phylogeny of Some Fusarium Species, as Determined by Large-Subunit rRNA Sequence Comparison. *Molecular Biology Evolution*, **6** (3): 227-242.
- Heilmann-Clausen, J., Christensen, M., Froslev, T.G., Kjoller, R., 2017. Taxonomy of *Tricholoma* in northern Europe based on ITS sequence data and morphological characters. *Persoonia* **38**: 38–57
- Hibbett, D.S., 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. *Mycological Society*, **33**: 533-556.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Lumbsch, H.T., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.C., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, C.M., Aptroot, A., Bauer, R.,

- Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Koljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y., Zhang, N., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi, *Mycological Research*, **111**: 509–547.
- Hinrikson, H.P., Hurst, S.F., Lott, T.J., Warnock, D.W., Morrison, C.J., 2005. Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species, *Journal of Clinical Microbiology*, **43**: 5, 2092-2103.
- Horton, T.R., Bruns, T.D., 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*, **10**: 1855–71.
- Hosford, D., Pilz D., Molina, R., Amaranthus, M., 1997. Ecology and management of the commercially harvested american matsutake mushroom, general technical report, Portland, United States Department of Agriculture, *PNW- GTR 412*: 5-7.
- İlban, Ş. 2011. *Tricholoma anatolicum ve Tricholoma caligatum'un Morfolojik ve Moleküler Yönden Karşılaştırılması*. (yüksek lisans tezi). Selçuk Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Konya.
- Intini, M., Dogan, H.H, Riva. A., 2003. *Tricholoma anatolicum* spec. nov.: a new member of the matsutake group. *Micologia e Vegetatione Mediterranea* **18**: 135–142.
- Iwase, K., 1994. Distribution of the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake* and the related species and some characteristics of their isolates. soil microorganisms tsukuba office of MAFF research council. In: proceeding of the international workshop on genetic resources. *Tsukuba Office of MAFF Research Council* **12**: 5–7 (78–188).
- Jargeat, P., Martos, F., Carriconde, F., Gryta, H., Moreau, P.A., Gardes, M., 2010. Phylogenetic species delimitation in ectomycorrhizal fungi and implications for barcoding: the case of the *Tricholoma scalpturatum* complex (Basidiomycota). *Mol Ecol*, **19**: 5216-30.
- Jordan, M., 2004. *The Encyclopedia of Fungi of Britain and Europe*. Frances Lincoln Publishers P. 51. UK.
- Justo, A., Vizzini, A., Minnis, A.M., Nelson Menolli Jr., Capelari, M., Rodríguez, O., Malysheva, E., Contu, M., Ghignone, S., Hibbett, D. S., 2011. phylogeny of the *Pluteaceae* (Agaricales, Basidiomycota): taxonomy and character evolution. *Fungal Biology*, **115** (1): 1-20.

- Kalmer, A. 2016. *Türkiye’de Yayılış Gösteren Melanoleuca Pat. Cinsine Ait Bazı Türlerin Filogenetik Analizi* (yüksek lisans tezi). Van YYÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Kılıçoğlu, M., Özkoç, İ., 2008. Fungal sistematikteki moleküler gelişmeler. *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, **23** (1): 65-72.
- Kibby, G., 2010. The Genus *Tricholoma* in Britain, *Field Mycology*, **11** (4): 113-140.
- Kost, G. 1984. *Megatracholoma* nov. gen. Eine neue agaricoide Gattung mit verwandtschaftlichen Beziehungen zu Arten anderer Organisationsstufen der Homobasidiomyceten. *Sydowia* **37**: 53–74.
- Kuo, M., Methven, S.A., 2014. *Mushrooms of the Midwest*, University of Illinois Press. Urbana, Chicago and Springfield.
- Kuo, M., 2006. *Tricholoma fracticum*. MushroomExpert.Com web site: http://www.mushroomexpert.com/tricholoma_fracticum.html .Erişim Tarihi: 13.11.18
- Kurtzman, C.P., Robnett, C. J., 2013. Relationships among genera of the Saccharomycotina (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species. *FEMS Yeast Research*, **13**: 23–33.
- Landecker, E. M., 1996. *Fundamentals of The Fungi*, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.M., 2009. *The Phylogenetic Handbook A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Cambridge University Press, New York. 723.
- Liu, K., Liu, L., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Eichorst, S.A., Xie, G., 2012. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, **78** (5): 1523–1533.
- Marschner, H., 1995. *Mineral Nutrition of Plants*, 2nd ed., Academic Press, London, UK.
- Moreau, P.A. 2011. Deux tricholomes peu connus retrouvés en Savoie: *Tricholoma inodermeum* et *T. subfusipes*. *Bulletin Mycologique et Botanique Dauphiné-Savoie* **200**: 21–34.
- Moretti, A., 2016. Taxonomy and identification of basidiomycetes. ISPA-CNR, Bari, Italy.
- Nei, M., Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Inc., New York.
- Nedelin, T. 2014. Ectomycorrhiza – nature and significance for functioning of forest ecosystems. *Forestry Ideas*, **20** (47): 3–29.
- Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N. Larsson K.H., 2008. Intraspecific ITS variability in the Kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol Bioinform Online* **4**: 193–201.
- Noordeloos, M.E., Christensen, M., 1999. *Tricholoma*. In: Bas, C., Kuyper T.W., Noordeloos, M.E., et al. (eds). *Flora Agaricina Neerlandica*, **4**: 107–148. Balkema, The Netherlands.
- Osmundson, T.W., Robert, V.A., Schoch, C.L., Baker, L.J., Smith, A., Robich, G., Mizzan, L., Garbelotto, M.M., 2013. Filling gaps in biodiversity knowledge

- for macrofungi: Contributions and Assessment of an herbarium collection DNA barcode sequencing project, *Plos One*, **8** (4): 62419.
- Ota Y, Yamanaka T, Murata H, Neda H, Ohta A, Kawai M, Yamada A, Konno M, Tanaka C, 2012. Phylogenetic relationship and species delimitation of “matsutake” and allied species based on multilocus phylogeny and haplotype analyses. *Mycologia* **104**: 1369-1380.
- Patterson, J., Chamberlain, B., Thayer, D., 2004. *Finch TV Version 1.4.0*. Geospiza Inc.
- Patterson, J., Chamberlain, B., Thayer, D., 2006. *Finch TV Version 1.4.0*. Geospiza Inc.
- Phillips, R., 2006. *Mushrooms: A Comprehensive Guide to Mushroom Identification*, 105-113. 388 p.
- Raja, H.A., Miller, A.N., Pearce, C.J., Oberlies N.H., 2017. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *Journal of Naturel Products*, **80** (3): 756–770.
- Riva A. 1988. *Tricholoma* (Fr.) Staude. *Fungi Europaei*, vol. 3, Libreria Giovanni Biella, Italy.
- Riva, A. 2003. *Fungi Europaei*, vol. 3, *Tricholoma* (Fr.) Staude. Alassio, Italy: Edizioni Candusso.
- Roy, S., Dasgupta, R., Bagchi, A. 2014. A review on phylogenetic analysis: A journey through modern era. *Computational Molecular Bioscience*, **4**:39-45.
- Sanchez-Garcia, M., Matheny, B.P., Palfnez G., Lodg D.J., 2014. Deconstructing the Tricholomataceae (Agaricales) and introduction of the new genera *Albomagister*, *Corneriella*, *Pogonoloma* and *Pseudotricholoma*, *Takson*, **63** (5): 993-1007.
- Sanchez-Garcia, M., Matheny., 2017. Is the switch to an ectomycorrhizal state an evolutionary key innovation in mushroom-forming fungi? A case study in the Tricholomatineae (Agaricales), *Evolution*, **71-1**: 51–65.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., 2012. Fungal barcoding consortium nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *PNAS*, **109**: 6241–6246.
- Shanks, K.M., 1997. The Agaricales (Gilled Fungi) of California. 11. Tricholomataceae II. *Tricholoma*. Mad River Press: Eureka, CA. 54 p.
- Sesli, E., Denchev, C.M., 2014. Checklists of the Myxomycetes, Larger Ascomycetes, and Larger Basidiomycetes in Turkey. *Mycotaxon*, **6**: 1–136.
- Sesli, E., 2014. Studies on new fungal records for Turkish Mycota from Trabzon. *Turkish Journal of Botany*, **5** (1) 38: 608-616.
- Sesli, E., Örtücü, S., Aytaç, E., 2018. Türkiye mikotası için yeni kayıtlar (Basidiomycota-Agaricales). *Bağbahçe Bilim Dergisi*, **3** (1): 15 – 20.
- Simon, K.U., Weiß, M., 2008. Intragenomic variation of fungal ribosomal genes is higher than previously thought. *Molecular Biology Evolution*, **25** (11): 2251–2254.
- Singer R., 1986. *The Agaricales in Modern Taxonomy*. 4th ed. Koenigstein Königstein im Taunus, Germany: Koeltz Scientific Books.

- Smith, M.E., Douhan, G.W., Rizzo, D.M. 2007. Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytol.* **174** (4):847-63.
- Solak, M.H., Işıloğlu, M., Erbil, K., Allı, H., 2015. *Macrofungi of Turkey, Checklist Volume II*, Üniversiteler Ofset, İzmir.
- Şen, İ., Allı, H., Çöl, B., 2018. *Tricholoma bonii*, a new record for Turkish Mycota and notes on its taxonomic status based on morphological and molecular Evidence. *Turkish Journal of Life Sciences*, **3** (1): 200-204
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., M., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution*, **30** (12): 2725–2729.
- Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* **172**: 4239-4246.
- Vizzini, A., Ercole, E., Contu, M. 2012. A contribution to the ITS-LSU phylogeny of the genus *Leucopaxillus* (tricholomatoid clade, *Agaricales*), with three new genera and notes on *Porpoloma*. *Mycosphere*, **3** (1): 79–90.
- Vizzini, A., Antonin, V., Sesli, E. Contu, M., 2015. *Gymnopus trabzonensis* sp. nov. (Omphalotaceae) and *Tricholoma virgatum* var. *fulvombonatum* var. nov. (Tricholomataceae), two new white-spored agarics from Turkey. *Phytotaxa* **226** (2): 119-130.
- Wang, H., Xu, Z., Gao, L., Hao, B., 2009. A fungal phylogeny based on 82 complete genomes using the composition vector method. *BMC Evolutionary Biology*, **9** (195): 1471-2148.
- Wang, X.C., Liu, C., Huang, L., Bengtsson-Palme, J., Chen, H., Zhang, J.H., Cai, D., Li J.Q., 2015. ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Mol Ecol Resour.*, **15**(3):573–86.
- Woese, R.C., Olsen, J.G., 1993. Ribosomal RNA: A key to phylogeny. *The FASEB Journal*, **7**: 113-122.
- Wen, J., Zimmer, E.A., 1996. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the Ginseng Genus, *Araliaceae*): Inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **6** (2): 167–177.

EKLER

Ek 1. Örneklerin DNA konsantrasyonları ve saflıkları ile ölçüm tarihleri

Örnek No	Örnek Adı	DNA Konsantrasyonu	Saflık (260/280 λ)	Tarih
T.184-1	<i>T. sp.</i>	427,4 ng/ μ l	1.8	19.10.2017
T.184-2	<i>T. sp.</i>	402,5 ng/ μ l	1.9	16.05.2018
T.685-1	<i>T. sp.</i>	1294 ng/ μ l	1.9	28.07.2017
T.685-2	<i>T. sp.</i>	728 ng/ μ l	1.9	21.05.2018
T.177	<i>T. populinum</i>	314,5 ng/ μ l	1.8	25.07.2017
T.108	<i>T. populinum</i>	653,7 ng/ μ l	1.9	28.07.2017
T.985	<i>T. populinum</i>	779,1 ng/ μ l	1.8	24.10.2017
T.1004-1	<i>T. cedretorum</i>	897,8 ng/ μ l	1.9	12.10.2017
T.1004-2	<i>T. cedretorum</i>	791 ng/ μ l	2.0	05.07.2018
T.7056	<i>T. albobrunneum</i>	701,3 ng/ μ l	1.9	16.10.2017
T.5016	<i>T. aurantium</i>	204,5 ng/ μ l	1.8	24.10.2017
T.5049	<i>T. aurantium</i>	839,7 ng/ μ l	1.8	16.10.2017
T.5657	<i>T. aurantium</i>	542,9 ng/ μ l	1.9	19.10.2017
T.4794	<i>T. focale</i>	772,9 ng/ μ l	1.9	19.10.2017
T.4810	<i>T. focale</i>	110 ng/ μ l	1.8	20.02.2018
T.4722-1	<i>T. batschii</i>	84 ng/ μ l	2.0	15.12.2017
T.4722-2	<i>T. batschii</i>	779 ng/ μ l	1.9	05.06.2018
T.4754-1	<i>T. fracticum</i>	223 ng/ μ l	2.0	15.12.2017
T.4754-2	<i>T. fracticum</i>	207 ng/ μ l	1.9	21.05.2018
T.3523-1	<i>T. subannulatum</i>	557,9 ng/ μ l	1.9	12.10.2017
T.3523-2	<i>T. subannulatum</i>	696,2 ng/ μ l	1.9	05.06.2018
T.19-1	<i>T. imbricatum</i>	922 ng/ μ l	2.0	14.02.2018
T.19-2	<i>T. imbricatum</i>	791 ng/ μ l	2.0	05.06.2018
T.94	<i>T. vaccinum</i>	160 ng/ μ l	1.9	14.02.2018
T.5993	<i>T. vaccinum</i>	497 ng/ μ l	1.9	22.09.2017
T.667-1	<i>T. argyraceum</i>	72,88 ng/ μ l	1.8	12.10.2017
T.667-2	<i>T. argyraceum</i>	1039 ng/ μ l	2.0	05.07.2018
T.43	<i>T. scalpturatum</i>	440,5 ng/ μ l	2.0	19.10.2017
T.139	<i>T. scalpturatum</i>	1214,5 ng/ μ l	2.0	19.06.2018
T.718-1	<i>T. sp.</i>	218 ng/ μ l	1.9	22.09.2017
T.718-2	<i>T. sp.</i>	791 ng/ μ l	2.0	05.07.2018
T.17-1	<i>T. sp.</i>	93 ng/ μ l	2.0	29.03.2018
T.17-2	<i>T. sp.</i>	305 ng/ μ l	2.0	05.07.2018
T.666	<i>T. terreum</i>	201,1 ng/ μ l	1.9	16.04.2018
T.703	<i>T. terreum</i>	354 ng/ μ l	1.8	25.07.2017
T.6997	<i>T. terreum</i>	452,7 ng/ μ l	1.8	24.10.2017
T.6990	<i>T. terreum</i>	137 ng/ μ l	1.9	22.09.2017
T.7040	<i>T. terreum</i>	22,12 ng/ μ l	1.8	06.12.2017
T.4765-1	<i>T. caligatum</i>	538 ng/ μ l	1.8	22.09.2017
T.4765-2	<i>T. caligatum</i>	651 ng/ μ l	1.8	19.06.2018
T.4770-1	<i>T. viridilutescens</i>	1028 ng/ μ l	1,9	24.10.2017
T.4770-2	<i>T. viridilutescens</i>	1169 ng/ μ l	2.0	05.07.2018
T. 5266-1	<i>T. portentosum</i>	1613	1.8	25.07.2017
T.5266-2	<i>T. portentosum</i>	1745 ng/ μ l	1.8	19.06.2018



ÖZ GEÇMİŞ

1993 yılında Van'm Edremit ilçesinde doğdu. İlk öğrenimine Atatürk İlkokulu'nda başladı, İrfan Baştuğ İlkokulu'nda tamamladı. 2011 yılında Van Milli Piyango Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2012 yılında Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2016 yılında bu bölümden Onursal derece ile mezun oldu. Aynı yıl Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilimdalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.



T.C
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 28/12/2018

Tez Başlığı / Konusu: Türkiye'de Yayılış Gösteren *Tricholoma* (Fr) Staude Cinsine Ait Bazı Türlerin Filogenetik Karakterizasyonları

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 32 sayfalık kısmına ilişkin, 28/12/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 0 (sıfır) dır.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.


28/12/2018

Adı Soyadı: Şuheda Sümeyye ALDEMİR

Öğrenci No: 169102020

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı:

Statüsü: Y. Lisans X

Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

Doç. Dr. Ayten DİZKIRICI TEKPINAR

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

Prof. Dr. Suat ŞENSOY
Enstitü Müdürü