ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emel KARADENİZ

YÜKSEK SICAKLIĞA DAYANIKLI *Ganoderma lucidum* MONOKARYON MİSEL ÜRETİMİ VE *Ganoderma* SP.' NİN TÜRKİYE İZOLATLARINDA RFLP KALIPLARININ ARAŞTIRILMASI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2007

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK SICAKLIĞA DAYANIKLI *Ganoderma lucidum* MONOKARYON MİSEL ÜRETİMİ VE *Ganoderma* SP.' NİN TÜRKİYE İZOLATLARINDA RFLP KALIPLARININ ARAŞTIRILMASI

Emel KARADENİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez …./…./2006 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri tarafından Oy Birliği/Oy çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

İmza : ……

Prof. Dr. Ömer ÇOLAK
DANIŞMAN

İmza : : ……

Prof.Dr. Ali Kerim ÇOLAK
ÜYE

İmza ……

Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof.Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: FEF2006YL17

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YÜKSEK SICAKLIĞA DAYANIKLI *GANODERMA LUCIDUM* MONOKARYON MİSEL ÜRETİMİ VE *GANODERMA* SP.' NİN TÜRKİYE İZOLATLARINDA RFLP KALIPLARININ ARAŞTIRILMASI

Emel KARADENİZ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof.Dr. Ömer ÇOLAK

Yıl: 2007, **Sayfa:**70

Jüri Prof.Dr. Ömer ÇOLAK
Prof.Dr. Ali Kerim ÇOLAK
Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

Bu çalışmada, *Ganoderma lucidum*'un sporlarını çimlendirerek elde edilen monokaryonların yüksek sıcaklıklara olan toleranslarını ve *G. lucidum* Türkiye izolatlarından ekstrakte edilen DNA'ların *EcoR*I ezimi kullanılarak RFLP (Restiction Fragment Lenght Polymorphizm) analizlerinin yapılmasıyla izolatlar arasındaki farkın saptanması amaçlanmıştır.

G. lucidum'un sporları, sulandırma yoluyla CYM (Complete Yeast Medium) katı besiyerine, yayma yöntemiyle ekilmiş ve 25ºC sıcaklıkta inkübe edilerek, tek düşen sporlardan çimleneneler ,CYM (Complete Yeast Medium) katı besiyerine inoküle edilmiştir. *G. lucidum'*un sporlarından elde edilen monokaryonların sıcaklığa olan tolereransları 27ºC, 32ºC, 35ºC, 37ºC, 40ºC sıcaklıklarda, CYM katı besiyerinde denenmiş, en fazla gelişim hızının 27ºC ve 32ºC sıcaklıklarda meydana geldiği, 35ºC ve 37ºC sıcaklıklarda gelişmenin olduğu ancak, 27ºC, 32ºC sıcaklıklara oranla gelişme hızının olduça yavaş olduğu, 40ºC sıcaklıkta ise hiçbir monokaryonun gelişmediği saptanmıştır.

Genom analizlerinin en güvenilirlerinden olan kromozomal separasyon ve total genom büyüklüğü hesaplama tekniğinin elimizdeki farklı *Ganoderma* suşlarına uygulanması amacıyla yaptığımız çalışmada ise, bu Basidiomycetes in birkaç mb büyüklükte kromozomlara sahip olduğu, sadece iki kromozomun 200 kb dolayında büyüklüğe sahip olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Ganoderma lucidum*, Monokaryon, PFGE, Kromozom Separasyonu.

ABSTRACT

MSc THESIS

MONOKARYON MYCEL PRODUCTION FROM *Ganoderma lucidum* RESISTANT TO HIGH TEMPARATURE AND INVESTIGATION OF RFLP PATTERN OF *Ganoderma* Sp. ISOLATES FROM TURKEY.

Emel KARADENİZ

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

Supervisor: Prof. Dr. Ömer ÇOLAK

Year: 2007,**Pages:** 70

Jury Prof. Dr. Ömer ÇOLAK
Prof.Dr. Ali Kerim ÇOLAK
Assoc.Prof.Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

In this study, thermo-tolerance of *Ganoderma lucidum* monokaryon, obtained by spor germination, has been determined against high temperature and the comparison of strains has been accomplished by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis of extracted DNA from Turkey isolates by using *Eco*RI enzyme. *Ganoderma lucidum* spores were spread-inoculated on solid CYM (Complete Yeast Medium) by diluting. Single germinated spores after incubation at 25ºC, subcultured to another CYM. These monokaryon has then been tested for determination of tolerance to temperatures ranging from 25ºC,32ºC, 35ºC, 37ºC to 40ºC. The highest growth rate was seen at 27ºC and 32ºC temperatures. Although there is no growth obtained at 40^{o}C, fairly decreased growth rate were seen at 35^{o}C and 37ºC compared to 27ºC and 32ºC.

By applying chromasomal separation ,one of the most reliable genom analysis, and total genomic size determination technique on different *Ganoderma* sp strains, it was found that this Basidiomycetes contain chromosomes in a few mb size, only two chromosome could be 200 kb size .

Key Words: *Ganoderma lucidum*, Monokaryon, PFGE, Chromosomal Separation

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ömer Çolak'a içtenlikle teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında desteklerini gördüğüm Sayın Prof. Dr. Burhan Arıkan'a, Sayın Prof. Dr. Sadık Dinçer'e ve Sayın Doç. Dr. Hatice Korkmaz Güvenmez'e, tez yazım sırasında yardımını gördüğüm sayın Prof. Dr. İskender Emre'ye, araştırma görevlileri Sayın Ashabil Aygan ve Gülcihan Güzeldağ'a ve Arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonuna, çalışmalarıma katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bana maddi ve manevi destekte bulunan Aileme ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ ……..……...…… I
ABSTRACT …… II
TEŞEKKÜR …… III
İÇİNDEKİLER …… IV
ÇİZELGELER DİZİNİ …… VII
ŞEKİLLER DİZİNİ …… VIII
1. GİRİŞ 1
1.1. *Ganoderma lucidium*……... 2
1.1.1. *Ganoderma lucidum*'un Sistematiği…….. 2
1.1.2. *Ganoderma lucidium*'un Genel Özellikleri ve Sağlık Üzerine etkileri……. 2
1.1.3.*Ganoderma lucidum*'un Biyolojik bileşenleri……... 5
1.1.3.1. Triterpeler-Triterpenoidler……. 5
1.1.3.1.1. Bitterness…….. 6
1.1.3.1.2. Sitotoksisite…….. 6
1.1.3.1.3. Trombosit Agregasyon İnhibisyonu…… 6
1.1.3.1.4. Antihipertansiyon…… 7
1.1.3.1.5. Hepatoprotectif Aktivite…… 7
1.1.3.1.6.Anti-HIV Aktivitesi……... 7
1.1.3.1.7.Hipoglisemik Etkiler…… 7
1.1.1.3.2. Polisakkaritler……. 8
1.1.1.3.3.Fungal Immunomodülatör Proteinler……. 9
1.1.1.3.4.Steroidler…….. 9
1.1.3.Üretim Paremetreleri……. 10
1.1.4. *Ganoderma lucidum*'un Kültürü……... 10
1.2. Sporların Germinasyonu (çimlenme)……. 11
1.2.1. Sporların Germinasyonunu Etkileyen Faktörler……... 12
1.2.2. Dormansinin kırılması……... 13

1.2.3. Besiyerinin Terkibi……... 14
1.2.4. Çimlenmekte Olan Sporun Morfoloji…… 14
1.3. Monokaryonların Tarihçesi…… 15
1.3.1. Monokaryonların Kullanım Alanları ve Önemi…… 17
1.4. Seksüel Davranış…… 17
1.5. Eşleşme Tipleri, Monokaryon, Dikaryon ve Nükleer Migrasyon…... 18
1.6. Protoplastlar Kullanılarak Gen Transferi…… 19
1.7. Basidiomycetes Mantarların Genetiği……. 21
1.7.1. RFLPs (Restriction Fragment Lenght Polymorphizm)……. 22
1.7.2. Restriksiyon Enzimleri ……. 23
1.7.3.Pulsed Field Gel Elektrophoresis (PFGE)……. 25

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR …… 28
3. MATERYAL VE METOT..... 34
3.1.Materyal……
3.1.1. Besiyerleri …… 34
3.1.1.1.CYM (Complete Yeast Medium)……. 34
3.1.1.2.CYM (Complete Yeast Medium) Agar…… 34
3.1.2. DNA Açığa Çıkarılması Gerekli Olan Maddeler…….. 35
3.1.2.1. Protoplastların ve Agaroz Blokların Hazırlanması İçin Gerekli Maddeler…….. 35
3.1.2.2. DNA' nın Açığa Çıkarılmasında Kullanılan Maddeler……... 36
3.1.2.3. Agaroz blokların *EcoR*I Restriksiyon Endonükleazı İle Yürütülmesi..... 37
3.1.2.4. PFGE İçin Gerekli Solüsyonlar…… 38
3.1.2.5.CHEF'de Kullanılan Puls Zamanları…… 39
3.2. Metod…….. 39
3.2.1. Sporların Çimlendirilmesi…… 39
3.2.1.1. Kültür Şartları…… 40
3.2.2. DNA'nın Arıtılması…… 41
3.2.2.1. Kültür Şartları…… 41

3.2.2.2. Protoplastların ve Agaroz Blokların Hazırlanması……... 41
3.2.2.3. DNA' nın Açığa Çıkarılmasında Kullanılan Metod……. 42
3.2.3. RFLP Analizi…… 42
3.2.3.1. Agaroz blokların *EcoR*I Restriksiyon Endonükleazı İle Muamelesi…… 42
3.2.4. CHEF (Contour Clamped Homogeneous Electrical Field) – PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) Sitemiyle *Ganoderma lucidum* Türkiye izolatlarının Kromozomal DNA'larının Yürütülmesi..... 43
3.2.4.1. Agaroz Jelin Aparata Dökülmesi…… 44
3.2.4.2. Agaroz Jelin Boyanması……..... 44
4. BULGULAR 45
4.1. Monokaryonların Farklı Sıcaklıklardaki Gelişim Hızına Ait Bulgular… 45
4.2. PFGE'ne Ait Bulgular……..... 53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ ……. 54
6. ÖNERİLER ……..…….. 57
KAYNAKLAR ……. 59
ÖZGEÇMİŞ ……..……... 70

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1. Protoplast Solüsyonu İçin Gerekli Bileşenler……. 35
Çizelge 2. Protoplast ve agaroz bloklar için gerekli solüsyonlar…. 35
Çizelge 3. Proteinaz-K çözeltisinin bileşenleri……. 36
Çizelge 4. Proteinaz-K çözeltisi ……... 36
Çizelge 5. Restriksiyon endonükleaz muamelesi için gerekli Solüsyonlar…….. 37
Çizelge 6. PFGE'de Kullanılan Solüsyonlar ……... 38
Çizelge 7. CHEF-PFGE Sisteminde Kullanılan Puls Periyotları…... 39
Çizelge 8. 27ºC sıcaklıkta Monokaryonların Misel Gelişimin Hızlarına (Çaplarının ölçülmesiyle) ait bulguların çizelgesi…….. 46
Çizelge 9. 32ºC sıcaklıkta Monokaryonların Misel Gelişimin…….. Hızlarına ait bulguların çizelgesi…….. 47
Çizelge 10. 35ºC sıcaklıkta Monokaryonların Misel Gelişimin Hızlarına ait bulguların çizelgesi…… 48
Çizelge 11. 37ºC sıcaklıkta Monokaryonların Misel Gelişimin Hızlarına ait bulguların çizelgesi……... 49
Çizelge 12. 2. Gün Misel Gelişim Hızlarına Ait bulguların Çizelgesi... 50
Çizelge 13. 4.Gün Misel Gelişim Hızlarına Ait Bulguların Çizelgesi… 50
Çizelge 14. 6. Gün Misel Gelişim Hızlarına Ait bulguların Çizelgesi.. 51

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.*Ganoderma lucidum*'un sert odunlu bir ağaçta gelişmesi…….. 3
Şekil 2. *Ganoderma lucidum*'un sporları…… 5
Şekil-3 Tek bir sporun Çimlenmesi ile oluşan hif…… 15
Şekil 4. Clamp connection formasyonu……... 16
Şekil 5. Protoplast formasyonu……... 21
Şekil 6. Restriksiyon endonükleazların kesimiyle meydana gelen palindrom ve restriksiyon sitesi…… 24
Şekil 7. *EcoR*I enzimi ile kesilen iki farklı DNA molekülünde, enzimin oluşturduğu yapışkan uçların birleşerek oluşturdukları rekombinant DNA yapısı…….. 24
Şekil 8. CHEF aparatında elektriksel alan dağılımı…….. 27
Şekil 9. Çimlenmiş sporların mikroskop altında çekilmiş fotoğrafı. …….. 40
Şekil 10. Clamp connectionlı yapıların mikroskop altında çekilmiş fotoğrafı…… 40
Şekil 11.CHEF Aparatus…….. 43
Şekil 12. Agaroz Jelin Dökülmesi ve Bloklara Yerleştirilmesi…… 44
Şekil 13. 27ºC Sıcaklıkta Monokaryon Miselin 6.Günde petride gösterdiği gelişim…… 51
Şekil 14. 32ºC Sıcaklıkta Monokaryon Miselin 6.Günde petride gösterdiği gelişim…….. 51
Şekil 15. 35ºC Sıcaklıkta Monokaryon Miselin 6.Günde petride gösterdiği gelişim…… 52
Şekil 16. 37ºC Sıcaklıkta Monokaryon Miselin 6.Güdeki petride gösterdiği gelişim……... 52
Şekil17.6. 40ºC Sıcaklıkta Monokaryon Miselin 6.Güdeki petride gösterdiği gelişim……. 52
Şekil 18. PFGE *Ganoderma lucidum* Türkiye izolatlarının separasyonu……. 53

1.GİRİŞ

20. yüzyıl bilgi birikiminin patlayıcı olduğu dönemdir. 21.yüzyılda insanların yaşama kolaylığı için, modern teknolojinin gelişmesiyle beraber, insanoğlu, artmakta olan dünya nüfusunun bir sonucu olarak yiyecek kıtlığı, çevre kirliliği ve insan sağlığının giderek azalan kalitesine karşın, artarak devam eden riziko düzeyiyle karşı karşıyadır. 20.yüzyılın başında 1.6 milyar olan dünya nüfusu yüzyılın sonunda 6 milyar olmuştur ve 2050 yılında yaklaşık 9 milyar olacaktır. En eski demografik çalışmalara göre, az gelişmiş ülkelerde daha çok nüfus artışı meydana gelmektedir. Sürekli artan dünya nüfusuna her yıl 80 milyon insan eklendiği bildirilmektedir. Dünya da yaklaşık 800 milyon insan yoksulluk içinde yaşamaktadır (Chang, 1999).

Macrofungus grubunu oluşturan mantarlar yalnızca insan yiyeceği olarak kullanılmayıp, aynı zamanda sağlığa yararlı kayda değer bazı biomedikal maddeler içerdiklerinden, tıbbi amaçlarla da kullanılmaktadır. Diğer yandan, kültürü yapılabilen bazı türlerin özellikle başka kullanım alanı bulunmayan zirai ve endüstriyel atıkların değerlendirilmesinde ve biyolojik döngünün kolaylaştırılmasında önemli katkı sağladıkları da bir gerçektir. 1999'da yenilebilir mantarların dünyadaki toplam üretiminin 7 milyon tondan daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. Bunun yanı sıra, her yıl tıbbi yararı olan ve yenilebilir mantarların dünya ticaret ortamında toplam pazar değerinin 30 milyon amerikan dolarından daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. Buna ek olarak, orman ekosistemlerinden toplanan ekonomik değeri bulunan mikorizal mantarların dünya ekonomisine katkısı her yıl birkaç milyon amerikan dolarına ulaşmaktadır (Chang, 1999).

1.1. *Ganoderma lucidium*

1.1.1. *Ganoderma lucidium*'un Sistematiği

Chang ve Miles'e (2004), göre günümüzde kabul gören sistematik kuralları içinde *Ganoderma lucidium*' un Sistematikteki yeri şöyledir:

Kingdom:*Fungi*

Phylum:*Basidiomycota*

Class:*Homobasidiomycete*s

Order:*Aphyllophorales*

Family: *Ganodermataceae*

Genus: *Ganoderma*

Species: *Ganoderma lucidum* (Chang ve Miles, 2004).

1.1.2. *Ganoderma lucidium*'un Genel Özellikleri ve Sağlık Üzerine etkileri:

Çin'de "*Lingzhi*" olarak bilinen *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) için Japonya'da *Reishi, Mannentake* veya *Sachitake*, Kore'de ise *Youngzi* isimleri kullanlır. Çin geleneklerine göre, *Lingzhi* "mucize" veya "uğurlu" mantar olarak bilinip genellikle mutluluğun, iyi şansın, iyi sağlığın ve uzun yaşamın sembolüdür (Wasson, 1968).

Son yıllarda Basidiocarp adı da verilen meyvelerinin sağlık üzerine yararlı etkileri anlaşılmış olup, yalnız Japonya ve Çin'de değil; Kuzey Amerika ve Dünya'nın diğer subtropik bölgeleriyle Güneydoğu Asya'da yaygın şekilde üretimi yapılmaya başlanmıştır. *Ganoderma*'nın meyve dokusunun bileşiminde alkaloidler, aminoasitler, peptidler, inorganik maddeler, steroidler, yağ ve organik asitler bulunmasına rağmen; bu mantardan ekstrakte edilen ve bu mantara özgü tıbbi etkinin temelini oluşturan en önemli maddeler polisakkaritler ve triterpenlerdir (Mekkawy ve ark., 1999). Son 30 yıl içerisinde 150'den fazla triterpen (Kim ve Kim, 2002) ve 50'den fazla karsinostatik polisakkarit (Jong ve

Birmingham, 1992) izole edilmiştir. Farklı polisakkaritler ve triterpenler veya bunların kombinasyonları farklı farmakolojik etkilerin temelidir (Leung ve ark., 2002).



Şekil 1.*Ganoderma lucidum*'un sert odunlu bir ağaçta gelişmesi

Ganoderma meyveleri yenilebilir olmadığından sadece medikal amaçlı kullanılmaktadır (Chang ve ark., 1999).

G. lucidum insan sağlığı üzerine etkilerinden dolayı eski tarihlerden beri "mucize mantar" olarak bilinir. *G. lucidium*' da dahil olmak üzere *Ganoderma* familyası meşe, akçaağaç, çınar ve dişbudak gibi odunlu ağaçlarda (Şekil 1) selüloz, lignin ve polisakkaritleri parçalayarak "white rot" denilen beyaz çürüklük oluşumuna neden olurlar (Hepting., 1971).

Asmalarda (Adaskaveg ve ark., 1987) ,zeytin ağacı (Miller ve ark., 1995; Steyaert, 1967;Turner, 1965), kauçuk, çay ve diğer ekonomik öneme sahip tropikal ürünlerde bazı hastalıklara (Mahmood, 1971; Miller ve ark., 1995; Zhao,1989) sebep olmasına rağmen meyveleri Çin, Japonya, Kore ve diğer Asya ülkelerinde uzun zamandır geleneksel tıpta ilaç olarak kullanılmaktadır. (Seo ve ark., 1987). İçerdiği doğal aktif maddeler Nöro-Endokrin sistemi ile bağışıklık sistemini aktive ederek, insanların hastalıklara dirençli hale gelmesini sağladığı

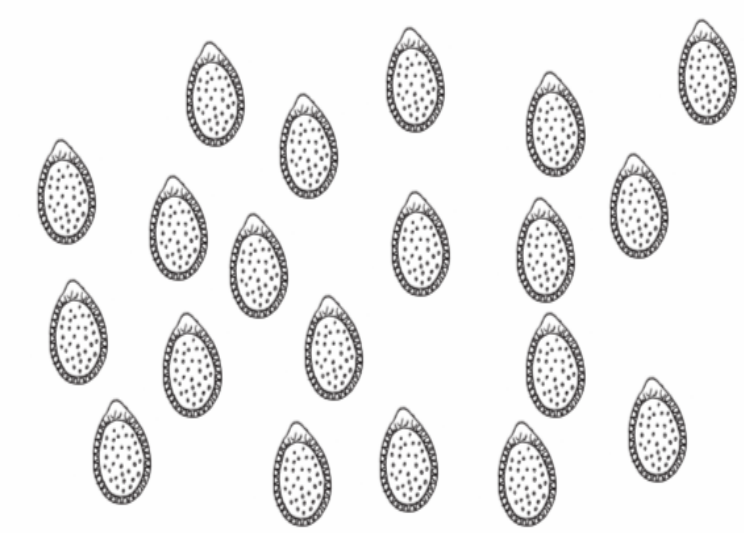
gibi, iyileşmeyi hızlandırma ve özellikle antitümör aktivitesinin bulunması (Kim ve ark., 2000), kardiyovasküler etkileri (Lee ve ark.,1990) ile antihepatotoksik aktiviteleri de (Lin ve ark., 1995) iyi bilinmekte ve kendisine duyulan bilimsel ilgiyi arttırmaktadır.

1,3 β-D-glucan, *G. lucidium*'un ekstrasellüler polisakkaritlerinden biri olup, immun tedavilerde kullanılabilecek yeni bir antikarsinojenik ajandır (Y. Sone ve ark., 1985;T.C. Tseng ve ark., 1984; T. Mizuno ve ark., 1995).

Bir triterpen olan Ganoderik asit anti-HIV-1 etkinliği ve antitümör özellikleriyle önem taşıyan bir bileşiktir ve *G. lucidum*' dan exrakte edilen farmakolojik ve terapik değer taşıyan en önemli maddedir (El-Mekkaway ve ark., 1998; Min ve ark., 2000; Wagner ve ark., 2003).

Bunlar dışında *Ganoderma lucidium*'un bilenşenlerinden biri olan germanyumun, antiiskemik, antioksidan, antiamiloid, analjezik (Goodman, 1988; Benjamin ve ark., 1991)ve hipoglisemik aktiviteleri olduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (Hikino ve ark., 1985; 1989).

G. lucidium'un sporlarının (Şekil 2) *Ganoderma*'nın içermiş olduğu biyoaktif maddeleri yapısında bulundurduğuna inanılmasına rağmen, *G. lucidum* ile ilgili bilimsel araştırmalar, miseller ve meyveler üzerine yoğunlaşmıştır. Sporlar nadiren çalışma konusu olmuştur. Çok küçük yapıda olan sporların büyüklükleri 5-8 mikron arasında değişmektedir. Episporların çiftkatlı olması, sporların çimlenmesini zorlaştırmaktadır. Sporlar olgunlaşmış *Ganoderma*'nın pileusundan ortama yayılırlar. Pileustan dışarı atılan sporların toplu hali "spore powders" olarak isimlendirilir. Doğal ortamlarda pileustan ortama salınan sporlar, rüzgar ve yağmur gibi çevresel faktörlerden dolayı "spore powders" yapılarını oluşturamamaktadır. Sporların çimlenmesi, episporların dirençli olmasından dolayı güçtür. Son yıllarda, sulandırma, havada kurutma, mikrodalgayla ısıtma, dondurma gibi işlemlerin yanı sıra lizozim, selülaz, hyolürinidaz ve hemiselülaz gibi enzimlerin kullanılması ve ses dalgaları sporların çimlenme düzeyini artırmada kullanılan yöntemler arasındadır (Liu ve ark., 2001).



Şekil 2. *Ganoderma lucidum*'un sporları

1.1.3.*Ganoderma lucidum*'un Biyolojik bileşenleri

1.1.3.1. Triterpenler-Triterpenoidler

Kubato ve arkadaşları ilk defa *Ganoderma lucidum*'dan Ganoderic acid-A ve B triterpenlerini izole etmişlerdir (Kubato ve ark.,1982). Daha sonra 150'den fazla lanostane tipi triterpen *G. lucidum*'da bulunmuştur ve bunlar medikal aktivitelerine, biyolojik özelliklerine ve yapısal benzerliklerine göre 10 grup içeresinde toplanmış ve tanımlanmıştır (Kim ve Kim, 2002). Bu bileşenler miselden olduğu gibi, spordan ve meyveden da izole edilebilmektedir. Triterpenler, sitotoksik, hepatoprotectif ve hipolipidemic (ACE) etki gösteren maddelerdir. Özellikle kan damarlarında angiotensin-coverting enzimini inhibe ederek kinin kallikrein sisteminin aktivasyonu ile histaminin salınmasını sağlar. (Kim ve Kim, 2002;Lin, 1996;Lindequist, 1995;Mizuno ve ark., 1995).

Farklı triterpenler farklı tıbbi özellikler göstermektedir. Bazı triterpenlerin aktiviteleri aşağıdaki gibi olmaktadır.

1.1.3.1.1. Bitterness

G. lucidum oldukça fazla miktarlarda, diğer mantarlarda bulunmayan bitternesse sahiptir. Bitternesslerin varlığı suşa ve *G. lucidum*'un kültürünün yapıldığı ortama göre değişiklik göstermektedir. Bitternesslerin miktarı stipelerde, pileustan daha fazladır. Bitterness, sıvı kültürde yetiştirelen misellerde bulunmamıştır. Biternessin tıbbi aktivitesi olmamasına rağmen, *Ganoderma'*nın meyve kalitesinin bir göstergesidir. Bu yüzden Koreli satıcılar *Ganoderma lucidum*'un bitterness miktarına bakmaktadırlar. Meyve oluşumu boyunca meydana gelen bitternessin üretimine ganoderic acid-A, C, I, J lucidenic acid- A, D ve lucidones A ve C katkıda bulunur. Bu triterpenler C_{30} ganoderic asit tipi ve C_{27} lucidenic tip olmak üzere iki grupta toplanır (Nishitoba ve ark., 1996).

1.1.3.1.2. Sitotoksisite

Sitotoksik triterpenler, antikanser ajanları olarak etkisini göstermektedir. Sitotoksik maddeler miselden ve meyveden izole edilebilmektedir. Miselden izole edilen ganoderik asit Z, Y, X, W, V ve T invitro olarak hepatoma hücrelerine karşı sitotoksik etkilidir ve meyveden izole edilen lanostanoidler ise invitro olarak tümör hücrelerini inhibe etmektedir (Kim ve Kim, 2002).

1.1.3.1.3. Trombositer Agregasyon İnhibisyonu

Kandaki plateletler, yapısı normal olan vasküler endotelyumda aktif değildirler. Bununla beraber zarar gören vasküler endotellerde agregasyon ve koagülasyonun hızlı bir şekilde oluşumundan sorumlu tutulurlar. Platelet agregasyonlarının inhibitörleri apoplexinin tedavisinde potansiyeldir. Ganoderik asit-S platelet agregasyonunun oluşumunu inhibe ederek etkisini göstermektedir (Su ve ark., 1999; Wang ve ark., 1997).

1.1.3.1.4. Antihipertansiyon Aktivitesi

Morigiwa ve arkadaşları (1996) ganoderic asit-F'in güçlü bir antihipertansiyon aktivitesi olduğunu, ganoderic asit-B, D, Y ve H'nın oldukça zayıf antihiper tansiyon etkisi olduğunu göstermişlerdir.

1.1.3.1.5. Hepatoprotective Aktivite

Çin'de halk tıbbında, *G. lucidum*'un meyveleri kronik Hepatitin tedavisinde kullanılmıştır. Hirano ve arkadaşları (1986), misel kültürlerinden elde edilen ganoderic asit-R ve S'nin güçlü antihepatotoksik aktivitesi olduğunu göstermişlerdir. Bunun yanı sıra sporlardan eter ekstraksiyonu ile elde edilen ganoderik asit-A'nın karaciğer hücrelerini koruyan özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Chen ve Yu, 1991; 1999).

1.1.3.1.6. Anti-HIV

HIV (Human immunodeficiency virüs), AIDS (acquired immunodeficiency disease syndrome) hastalarından izole edilen bir virüstür (Barre-Sinoussi ve ark., 1983; Gallo ve ark., 1983). *G. lucidum*'un suda çözünen maddelerinden elde edilen ekstraktlar anti- HIV aktivitesi göstermektedir (Hattori ve ark., 1997; Kim ve ark., 1997). el-Mekawy ve arkadaşları (1998), *G. lucidum*'dan anti-HIV etkili ganoderiol-F ve ganodermanontriol bileşenlerini izole etmişlerdir. Min ve arkadaşlarıda (1998), anti- HIV etkili ganoderic asit-β, ganodermanontriol, ganolucidik asit-A ve lucidumol-B'yi izole etmişlerdir

1.1.3.1.7.Hipoglisemik Etkiler

G. lucidum'un meyvesinden ekstrakte edilen ganoderans-A, B ve C gibi bazı triterpenlerin güçlü bir hipoglisemik etkisi olduğu gösterilmiştir (Hikino ve ark., 1985). Şeker hastaları için hazırlanan ilaçların varolan yan etkileri, *G. lucidum*

ile minimize edilmiştir. Ayrıca şeker hastalığı ve hypertansiyonu olan hastalar, koroner arter hastalığı, böbrek hastalığı, gözde körlük, serebrovasküler hastalıklar gibi ciddi hastalıklarla karşı karşıyadır. *G. lucidum*'un içerdiği maddeler bu hastalıkların iyileşmesinde de oldukça etkilidir. (Chang ve Miles.,2004).

1.1.1.3.2. Polisakkaritler

Lee ve arkadaşları (1995), *Ganoderma lucidum*'un suda çözünebilen ekstraktlarının, farelerdeki sarkoma ve fibrosarkomayı inhibe ettiğini göstermişlerdir. Daha sonradan yapılan çalışmalarda sıvı ekstraktların, etanol prespitasyonuyla sağlanan fraksiyonların da, tümör aşılanmış farelerde yaşam süresini uzattığı, fibrosarkomaya karşı yokedici etki gösterdiği ve tümörün akciğere metastazını engellediği görülmüştür (He ve Li, 1989; Furusawa ve ark.,1992; Lee ve ark., 1995).

G. lucidum'un misel ve meyvesinde 50'den fazla karsinostatik polisakkarit bulunmuştur (Jong ve Birmingham, 1992).

Bazı polisakkaritler, sıcak su, ammoniu oxalate solüsyonu, alkali solüsyon, dimetill sulfoxide (DMSO) ve bazı kromotografik metodlarla extrakte edilebilir. β-D glucanların, β-D glucan, glucurono-β-D glucan, arabinoxylo-β-D glucan, xylo-β-D glucan, manno-β-D glucan ve xylomanno-β-D glucan formlarının ve proteinlerle oluşturdukları komplexlerin çok güçlü antitümör aktiviteleri bulunmuştur (Mizuno ve ark., 1995). Bu bileşiklerin hipoglisemik özellikleride açıklanmıştır (Mizuno ve ark., 1995; Lindequist, 1995;Lin, 1996). Son zamanlarda, sıvı kültürde geliştirilen, *Ganoderman*'ın miselinden izole edilen bir glikoprotein (içerisinde %82.8 karbonhidrat ve %17.2 protein bulunan) farelerin yüzmeye dayanma kapasitelerinde artış sağlamıştır. Buna karşılık mantarın meyvesinden ve meyvesinden doku kültürü ile elde edilen misellerde böyle bir etki gözlenmemiştir (Yang ve ark., 2001). Meyvelerden ve sıvı besiyerinde geliştirilen misellerden elde edilen ekstraktların hepsi farklı özellikler gösterip, farklı fonksiyonları vardır. Polisakkaritlerin antitümör ve antikanser etkilerinin

temelini, sitosidal etkisinden çok immün sistemi güçlendirmesi oluşturur (Lieu ve ark., 1992; Zhu ve Mori, 1993; Chen ve ark., 1995 ; Wang ve ark.,1997).

İmmün sistemdeki değişik komponentlere etkisi makrofajların, naturel killer hücrelerinin, sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonu şeklinde olur (Ooi ve ark., 2002).

1.1.1.3.3.Fungal İmmünomodülatör Proteinler

Değişik mantar türlerinden yeni bir grup fungal İmmünomodülatör proteinler (FIPs) bildirilmiştir. Bunlar *G. lucidum*'dan LZ-8 (Ling Zhi-8) (Kino ve ark., 1989), *Flammulina velutipes*' ten FIP-fve (Ko ve ark., 1995), *Volvariella volvace*'den FIP-vvo ve *G. tsugae*'den FIP-gts (Lin ve ark.,1997) 'dir.

G. lucidum'un miselinden elde edilen LZ-8'in 3.13µg/mL konsantrasyonu farelerin dalak hücrelerinde, kan hücrelerinin şekillenmesinde maximum aktivite göstermiştir (Kino ve ark., 1989). Buna ek olarak FIP genç, dişi ve obez olmayan diyabetik farelerde otoimmün diyabetin oluşumunu engellemektedir (van der Heun ve ark.,1997).

1.1.1.3.3.Steroidler

G. lucidum yüksek oranlarda steroid içermektedir. Steroidler, ergasterol ve kolesterol olmak üzere iki grup altında incelenir. Yaklaşık olarak 20 farklı steroid *G. lucidum*'dan izole edilmiştir (Ha ve ark.,2000; Ma ve ark., 2002). Bu steroidler anti-aterosklerotik ve lipid düşürücü etkilere sahiptir (Kimura ve ark., 1988).

1.1.3.Üretim Paremetreleri

G. lucidum sıcak bölgelere nazaran subtropikal bölgelerde daha sık yetişir. Ganoderma lucidum'u üretme parametreleri aşağıdaki gibidir (Lin, 1996; Chen, 1999; Stamets, 2000).

1. Sıcaklık: Misel 15-35°C'lerde gelişir. Optimum sıcaklık 24-32°C'ler arasındadır. Primordia oluşumu için 18-25°C arası ve fruting body gelişimi için ise 20-25°C'ler arası ideal sıcaklıktır.

2. Besiyerindeki Su içeriği: %60-65 arasında olmalıdır.

3. Nem: Misel için %60-70, primordia için %85-90, meyve oluşumu için %70-85 oranında nem uygundur.

4. Hava: Fruktifikasyon (meyve oluşumu) boyunca iyi bir havalandırma şarttır.

5. pH değeri: Misel için optimum pH 5.0-5.5 arasıdır.

6. Işık: Primordia oluşuncaya kadar 500-1000 lux, fruiting body gelişimi için ise 750-1500 lux ışık ister.

1.1.4 *Ganoderma lucidum*'un Kültürü

G. lucidum'un tıbbi değeri Çin'de 2000 yıldan fazla süredir bilinmektedir. Doğada seyrek bulunan *G. lucidum,* elde edilme olanağının yokluğu sebebiyle paha biçilmezdi. Eski tarihlerde Çin'de bu mantarı bulan ve doğal çevresinden koparan insanlar resmi olarak iyi bir dereceye getirilir ve ödüllendirilirdi. 1950'lerin başlangıcına kadar bu gelenek bu şekilde devam etti ve Taiwan ve Çin Ülkelerinin her ikisindede ara sıra doğada bulunan mantar Çin liderlerine hediye edilirdi. *Ling-zhi* Doğada ılıman, subtropikal ve tropikal bölgelere yayılmıştır ve Çin'in güneydoğu bölgeleri asıl yetiştiği alanlardır. Doğada bu mantarın meyve gelişimini etkileyen çok farlı özellikler olmasından dolayı mantarın doğadaki gelişimi kısıtlanmaktadır. *Ling-zhi*'nin çevresi kontrol altına alınmış ortamlarda yetiştirilmesiyle beraber popülerliği giderek artmıştır (Chang ve Miles, 2004).

Bu değerli mantarın yapay kültürü 1970'lerin başında başarılı bir şekilde yapılmıştır (Mizuno ve ark., 1996) ve Çin'de özellikle 1980'den beri *G.a lucidum*'un üretimi hızlı bir şekilde artmıştır. Benzer şekilde *G. lucidum*'un meyvelerini geliştirmek için kullanılan iki aşamanın prosesleri diğer yenilebilir mantarlarda da uygunlanmış ve bunlardaki üretim hızıda artmıştır. Birinci aşamada meyve kültürün hazırlanması (stok kültür, ana spawn ve spawnların ekilmesi), ikinci aşamada ise mantar kültürü için üretim maddelerinin veya besiyerinin hazırlanmasını gerektiren aşamadır. Son zamanlarda ticari üretim için tahta kütük, kısa ağaç parçaları, kesilmiş ağacın toprakta kalan kısmı, talaş torbası ve şişe prosedürleri gibi üretim metodları kullanılmaktadır (Stamets, 2000; Chen, 1999; Mayzumi ve ark., 1997; Hung, 1996; Mizuno ve ark., 1996; Hseu, 1994).

Plastik torba veya şişelerdeki üretimde kültürdeki besiyeri bileşimleri aşağıdaki gibi olabilir.

1. %78 talaş, %20 buğday kepeği, %1 alçı ve %1 soya tozu
2. %88 pamuk tohumu, %21 buğday kepeği, %1 şeker kamışı ve %1 a
3. %70 talaş, %14 mısır tozu, %14 buğday kepeği, %1 alçı ve %1 saman
4. %78 mısır tozu, %20 buğday veya pirinç kepeği, %1 alçı ve %1 saman

Plastik şişelerin sterilizasyonundan sonra ve spawnın kültürlere inokülasyonundan sonra yer üzerinde horizontal bir şekilde dizilir. Kütük kültüvasyonunda ise, kütüklere 12-15 cm boyutlarında açılan deliklere spawn direk inoküle edilirek meyve gelişimi beklenir.

1.2. Sporların Germinasyonu (çimlenmesi)

Bir sporun inaktif halden aktif forma gelmesiyle birlikte hiflerin oluşması olayına spor germinasyonu denir. Spor germinasyonu, zaman zaman kolay başarılırken bazı durumlarda zor olabilir. Sporların çimlenme oranlarının yüksek olması, letal faktörlere bağlı olarak eliminasyondan dolayı, genetik çalışmalarda çok önemlidir. Sporların çimlenebilmesi sıcaklık, nem, oksijen ve pH gibi faktörlere bağlıdır. Bu koşullar uygun olduğu zaman sporlar uygun bir

besiyerinde çimlenir. Ancak, bazı belirli türlerde mantarın, sporlarının çimlenebilmesi için, ebeveynin yapısından bir miktar besiyerine konmalıdır (Chang ve Miles, 2004).

1.2.1. Sporların Germinasyonunu Etkileyen Faktörler

Çevre koşulları uygunsa bazı sporlar ana yapılarından serbest kaldıkları gibi hemen çimlenirken, bazı türler ise bir zaman boyunca dormant kalan sporlar üretirler. Dormansi iki tiptir: endojenoz ve exojenoz olmak üzere. Endojenoz dormansi, içsel faktörlere bağlıdır. Nispeten suya geçirimsiz olan bir duvar ve sporun düşük su içeriği dormant durumda sporu korumada etkilidir. Çimlenmeyi engelleyen maddelerin inhibitörleri, uçucu veya uçucu olmayan maddeler olabilir ve bu maddeler çimlenmenin meydana gelmesi için ortadan kaldırılmalıdır. Uçucu organik asitler, sporların çimlenmesini etkilemektedir. Örneğin misellerin metabolizması sonucu açığa çıkan ve uçucu olan isovalerik asit, germinasyonun self inhibitörü olan CO_2'i zaklaştırır. Bu olay, sporlarda CO_2' in birikmesinin çimlenmeyi baskıladığının göstergesidir. Çünkü, isovalerik asit, CO_2 akseptörü olan Beta metilkrontonil koenzim-a nın öncü maddesidir. Böylece isovalerik asit spordan CO_2 nin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Normalde oxaloasetat formuna getirilen CO_2 ortamdan uzaklaştırılır. Bu durum TCA ve Krebs döngüsünün süksinik dehidrogenaz enziminin aktivitesini engeller. İsovalerik asitin yokluğunda, CO_2 oxalaasetat üretiminde kullanılmaktadır. TCA döngüsünün yavaşlamasıyla birlikte azalan solunum aktiviteleri sporların dormant durumda kalmasına neden olur. CO_2'i uzaklaştıran isovalerik asit, CO_2' ten oxalaasetat formasyonunu engeller ve böylece germinasyon için istenen, TCA döngüsünün solunum aktivitesi hızlanır. Yani, CO_2 çimlenmenin self inhibitörü olarak etki gösterir ve CO_2 yi uzaklaştıran bir uçucu madde normal TCA respirasyonunun oluşmasına ve çimlenmenin başlamasına izin verir. Exogenes dormansi, çevresel faktörler tarafından kontrol edilir. Bazı türlerde besinler germinasyon için gerekliyken, bazı türlerde su ve uygun çevresel koşulların varlığında spor çimlenmesi meydana gelir. Spor

çimlenmesinde, çevresel faktörlerin önemi misel ve meyve üretimi için aynıdır: sıcaklık, pH, hava ve ışık.

Ancak, bu faktörlerin değeri, misel, spor ve meyve için farklıdır. Çimlenme için besinsel istekler farklı genellenir, çünkü bazı türlerin sporları su ve O_2 dışında bir şey istemez. Diğer bir taraftan da, inorganik tuzlar ve örneğin glukoz, spesifik vitaminler veya aminoasitler gibi organik maddeler isteyen türlerde vardır. Bazı mantarlarda CO_2 spor germinasyonu ve meyve üretimi için istenilmektedir ve önemle CO_2'in evrensel ihtiyaç olabileceği vurgulanmaktadır (Chiu ve Chang,1987).

1.2.2. Dormansinin kırılması

Bir sporun dormant durumdan aktif duruma geçmesinde, farklı türler için farklı yollar izlenir. Spor duvarları nispeten suya ve gazlara geçirimsizdir. Bu durum spor duvarının dış yüzeyi, uzaklaştırılmadıkça veya geçişe izin verilmesi için tahrib edilmediği sürece sporlar dormant durumunda kalır. Örneğin; *Neurospora tetrasperma*'nın sporları uygulanan ısı şokuna bağlı olarak aktive olmaktadır.

Sporların germinasyonunu stimüle eden kimyasal bileşikler mevcuttur. Furfuralların varlığı, sporların germinasyonuna öncülük eden solunum (oksijenin tutulup karbondioksitin oluştuğu) olayını artırır. Furfural *Neurospora* ve *Coprinus radiatus* için etkilidir. Lipoprotein membranları tahrib eden bileşiklerin çoğu permeabiliteyi artırdığından germinasyonu stimüle etmede etkilidir.. Germinasyon için, bazı özel besin isteyen sporlara sahip mantar türleride vardır. Örneğin exogenous dormant durumundaki türler glukoz ve minerallerin (iz elementlerininde bulunduğu) bileşiminde bulunduğu spesifik besin ortamında germinasyon artmaktadır. Agaricus cinsinde ise, önceleri zor olduğu düşünülen spor germinasyonun, daha sonra sporlarla birlikte mantar dokusundan alınan parçanın aynı besin ortamında olmasıyla kolay olduğu anlaşılmıştır. Bu olayda, dokunun açığa çıkardığı gazlar sayesinde sporlar çimlenmektedir (Chiu ve Chang,1987).

1.2.3. Besiyerinin İçeriği

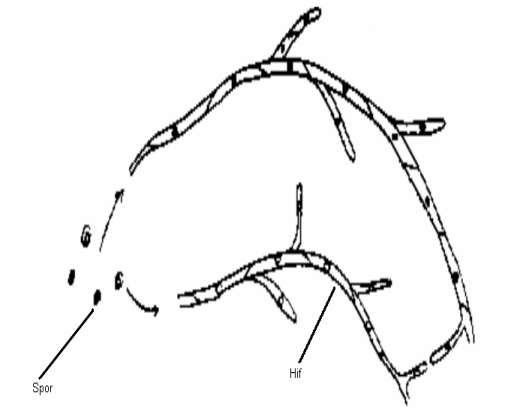
Çimlenen fidelerin, izolasyonundan önce çimlenme amacıyla sporların gömüldüğü (veya konulduğu) ortamın bileşeni çok önemlidir. Türlerin çoğunda mayosporlar çimlenme aşamasında yani çevre koşullarının uygun olduğu ana kadar ancak yetecek besin maddesi ile donatılmışlardır. Bu tip sporlar henüz besin maddeleri bol iken uygun koşullar yakalarlarsa suda bile çimlenirler. Buda yatırımcı için büyük bir avantajdır. Bu tip besin maddesiz ortamlarda fidelerin gelişmesi ise zordur ve komşu fidelerin gelişmesi yavaş olduğundan birbirine karışması geç olur veya hiç olmaz. Buda bize tek spor izolatı elde etmenin kolaylaşması demektir. zaman germinasyonun artırılması amacıyla ortama bazı katkılar yapmak gerekir. Örneğin bu bir amonyum iyonu olabilir. Ancak bazı durumlarda amonyumun fidelerin gelişmesini baskı altına aldığı görülebilir (Shaw ve Miles, 1970; Fries 1966). Spor çimlenmesi ve fidelerin ilk üremeleri için mutlaka optimal karışımlar araştırılmalıdır.

1.2.4. Çimlenmekte Olan Sporun Morfoloji

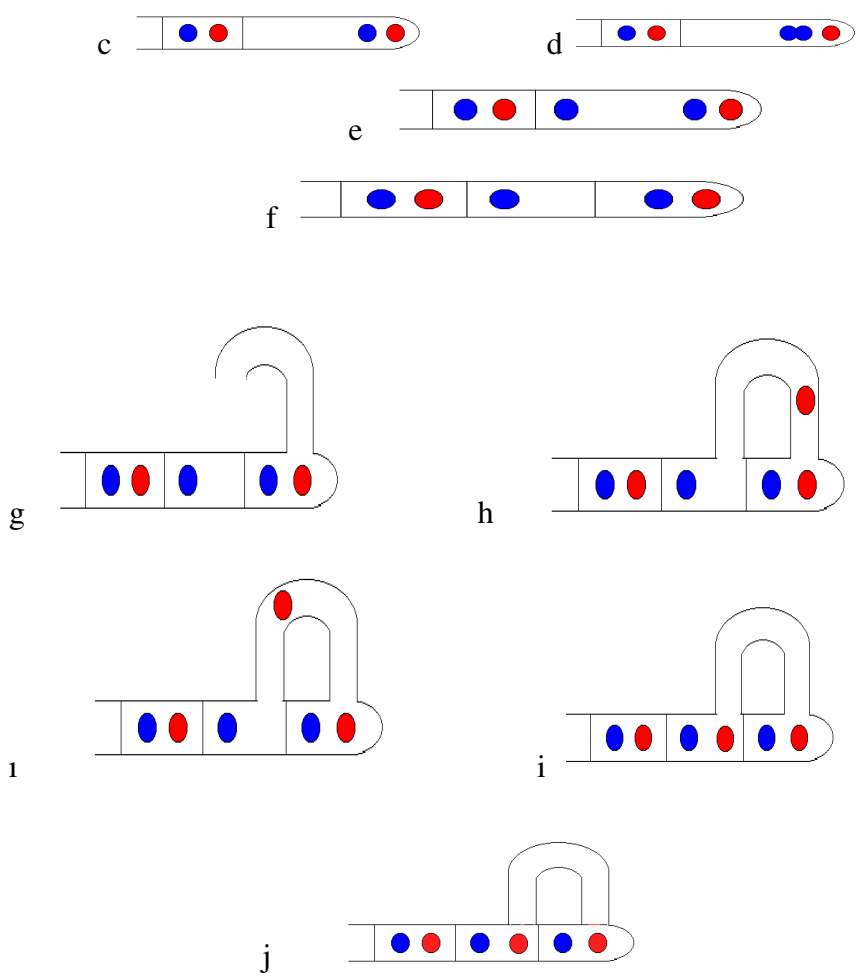
Morfolojik olarak sporun çimleneceği ilk işaret düzgün bir şişmenin gözlenmesidir. Bazı sporların çimlenme tüpünün çıkacağı bir por bölgesi vardır. Herhalükarda sporun içindeki bütün yapılar ve oluşmakta olan çimlenme tüpünün içine aktarılır. Çimlenme tüpünün çevresi duvar malzemesiyle örüldükçe apex adı verilen tüp tepesi ileriye doğru uzanmayı sürdürür. Bir süre sonra genç bir hif meydana gelir. Hif çevresi glukanlar ve kitin gibi polisakkaritlerden meydana gelmiş bir duvarla çevrili olan ve bunun iç yüzeyinde selektif permeabl bir sitoplazma örtüsü şeklinde plazma membranı bulunan bir yapıdır. Sitoplazmik elemanlar arasında endoplazmik retikulum, golgi cisimcikleri,mitokondriler,vakuoller çeşitli tipte kesecikler ve nükleuslar bulunur. Bazı yapıların membranla çevrili ve ilişkili olduğu açıkça gösterilmiştir (Miles, 1993).

1.3. Monokaryonların Tarihçesi

Monokaryon, tek bir sporun çimlenmesiyle oluşan, basit septalı hiflerin (Şekil 3) meydana getirdiği misel yapılarıdır. "Monokaryon" miseller tek tip nukleus içerir. Monokaryonlar, ilk defa 1. Dünya Şavaşı sırasında Mathilde Bensaude' nin Coprinus fimentarius'un tek sporlarından elde etmiş olduğu kültürleri eşleştirme üzerine yaptığı doktara tezinde araştırma konusudur. Bensaude tek sporların çimlenmesi sonucu elde ettiği miseller arasından, uyumlu olanları eşleştirerek elde ettiği miselleri ve mantarın meyvesinden yaptığı doku kültüründe oluşan miselleri mikroskop altında incelediğinde bunların basit septalı hiflerden oluşmadığını, "clamp connection" denilen yuvarlak şekilli, kanca yapılarının varlığını keşfetmiştir (Bensaude, M., 1918). İki uyumlu monokaryonun bir araya gelerek (Şekil 4) oluşturdukları "clamp connection" lı yapılar içeren miseller "dikaryon" şeklinde isimlendirilmiştir.



Şekil 3.Tek bir sporun Çimlenmesi ile oluşan hif



Şekil 4. Clamp connection formasyonu. (a) İki monokaryon arasında nükleer migrasyonun gerçekleştiği hif yapısı (b) Connection clamp yapısı oluşturmak üzere uzayan hif yapısı (c) Hif ucuna giden nükleuslar (d) nükleusların karyokinezi (e) Oluşan nükleuslardan birinin uzaklaşması (f) Nükleuslar arasının kapanması (g) Hiften çıkıntının oluşması (h,ı) Bu çıkıntının hife bağlanması (g) Diğer nükleusun oluşan bu bağlantıyla migrasyonu (j) Clamp connection veya kanca yapısı.

1.3.1. Monokaryonların Kullanım Alanları ve Önemi

Genetiksel olarak araştırılması yapılmış olan monokaryonların seçilerek kullanılması üretim başarısını ve meyve verimini son derece artırmaktadır. Monokaryonların yada tek bir sporun yüksek sıcaklığa dayanıklı olmasının temelinde enzimler yatmaktadır. Bir spor yüksek sıcaklığa dayanıklı değilse genlerden kaynaklı letal faktörler devreye girerek spor çimlenmez veya büyüme belli bir noktada durur. Ancak yüksek sıcaklığa dayanıklı olan monokaryonlarda letal faktörlerin önüne geçilmiş olur. 2 uyumlu monokaryotik kültürün yüksek sıcaklık toleransları varsa bunlardan elde edilecek dikaryon hibridlerin büyük çoğunluğu yüksek sıcaklığa dayanıklı olacaktır. Kültürlerin biri yüksek sıcaklığa hassas olduğunda meydana gelecek dikaryotik hibridler farklı davranışlar gösterebilir. Monokaryonlar ayrıca mantarlar arası transformasyonda, oldukça önemlidir (Chang ve Miles, 2004).

1.4. Seksüel Davranış

Mantarın hayat siklusunun önemli bir kısmı vejetatif çoğalma dediğimiz misel gelişmesi kapsar. Mantar üretiminde bunun yeri önemli isede ırk ıslahı için mutlaka sexüel üreme fazlarının iyi anlaşılması gerekir. Sexüel davranış ve eşeyli üreme fazı üç ana evreyi kapsar. Plasmogami, karyogami ve mayoz. Plasmogami aynı hücreye iki farklı nükleus sokmayı amaçlayan ve protoplast füzyonu olarak gerçekleşen bir olaydır. Karyogami ise aynı hücrede (basidiomycetesler basidium içinde) bulunan iki farklı nükleusun füzyonudur. Mayoz diploid hale gelmiş olan bu nükleusun geçirdiği redüksiyon bölünmesidir. Sonuçta 4 haploid nükleus meydana gelir.

Plasmagami yenilebilir mantarların büyük bir kısmı basidiomycetes olduğundan bunlardaki davranışı anlamamız gerekir. Her ne kadar hiflerin füzyonu şeklinde gerçekleşse de bazen bir hif ve bir spor arasında

gerçekleştiği görülmektedir. Hiflerin arasındaki füzyon davranışı uç uca, yan yana, veya yan uca şeklinde 3 tipte olur. Tabi bu çok önemli değildir.

S. commune ile yapılan çalışmalarda füzyonun en fazla uç yana şeklinde gerçekleştiği görülmüştür (Ahmad ve Miles, 1970). Her durumdada kesin olan olgu her iki üyeninde aktif büyüyen segmentler olmasıdır. Dolayısıyla en yaygın füzyon davranışının hif ucundaki bölgeler arasında gerçekleştiği daha 50 yıl öncesinden bildirilmiştir. Gelişimini tamamlamış olan dallar bu arada yan dallar oluşturduklarından bu kez bu yeni dalların uçları plasmogamiye elverişli hale gelmektedir. Bütün Basidiomycetes'lerin birkaç grubu hariç hepsinde eşleşme faktörlerinin (allel gruplarının) uygun olmaması durumunda plasmogami olmadığı bilinmektedir. Uygun olanlar çok yüksek düzeyde füzyon yaparlar. Uygun hiflerin karşı karşıya gelmeleri durumunda diffüzyonla hücre dışına çıkabilen bazı bileşiklerin aktive edildiği görülmüştür. 1986'da S. commune ile yapılan bir çalışmada aralarında permeabl membranlar bulunsa bile hiflerin Basidiosporlara kemotropik cezp edilmesi yönünde etki eden bazı bileşiklerin spor tarafından sentezlendiği gösterilmiştir. Sadece canlı sporlar bu tip aktraktantları sentezleyebilmektedir. Füzyon gerçekleştikten sonra bunun üretimide durur (Voorhees ve Peterson, 1986).

1.5. Eşleşme Tipleri, Monokaryon, Dikaryon ve Nükleer Migrasyon

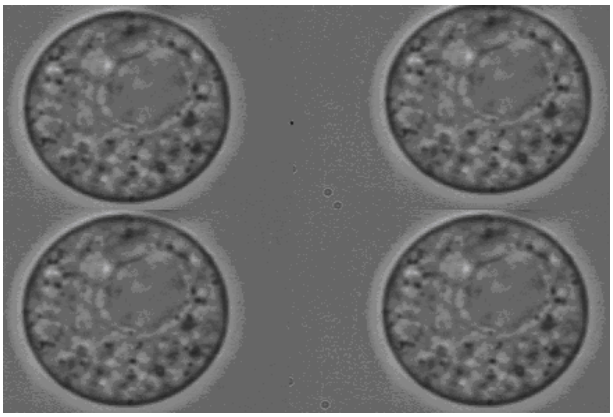
Flammulina velutipes türü "tetrapolar mating tip" adı verilen ve Aα-Aβ ile Bα-Bβ allellerine bağlı olan bir uyum davranışı gösterir. Bu allellerin rekombinasyon olayları örneğin $B\alpha\text{-}B_\beta$ arasında % 16,4 iken, $A\alpha\text{-}A_\beta$ arasında %0,5-%1,3 arasındadır.Yapılan çalışmalarda bu oranların değiştiğine dair bulgularda vardır. Dolayısıyla basidiosporlar bu alt lokuslar arasında oluşabilecek yeni rekombinant nukleusları taşıyabilirler. Gerçek anlamda eşleşmiş kültür elde edilebilmesi için A ve B faktörlerinin eşleşme tipleri bakımından uygunluk oluşturduğu iki monokaryotik misel gerektirir. Buna "compatible combination" denmektedir. Gerçekleşen plasmogami ortaya ortaya

bir dikaryon çıkartır. Donör nükleus recipient misel içerisinde hareket eder ve çok sayıda çekirdek bölünmesi gerçekleşir. Nükleer migrasyon bazen hızlı bazen yavaş gerçekleşir. Hızlı olduğu zaman dikaryonun misel büyüme hızından bile süratli olabilmektedir. Nükleusun miselde dağılma hızı (migrasyon hızı) monokaryonlardan gelen etkileşime bağlı olarak değişir. Örneğin Kanada kökenli bir monokaryonda migrasyon hızı 0,37cm/gün iken ona benzer bir diğer monokaryonda migrasyon hızı 1,4cm/gün olabilir. Monokaryonların uzun süre pasaj yapılması nükleer migrasyon yeteneğini büyük ölçüde azaltır. Öyleki ister donör isterse recipient olarak kullanılsın nükleer migrasyondaki azalma değişmez. Subkültür uygulamaları uzayınca monokaryonun eşleşme kapasitesi (mating kapasite) tamamen kaybolur(Kinugava., 1993).

1.6. Protoplastlar Kullanılarak Gen Transferi

Protoplast teknolojisi alışıla gelmiş ıslah uygulamalarının birçok sıkıntısını ortadan kaldırmıştır. Bu uygulamalarda gen transferi için füzyon ve transformasyon prosesleri kullanılmaktadır. Yenilebilir mantarlarda ticari değeri yüksek olan suşların üretilebilmesi için gen transfer sisteminin iyi anlaşılması gerekir. İlk yapılacak iş protoplast izolasyonudur. Bunun için ya mekanik güçlerden faydalanılır veya mantar duvarını yokeden sindirim enzimleri kullanılır. Hücre duvarını parçalayan enzimler belirli düzeyde toksik etki yaptıklarından bazı uygulamalar için sorun yaratabilirler. Günümüzde başarı ile kullanılabilecek çok sayıda litik enzim temin edilebilmektedir. Protoplast izolasyonunda tercih edilecek enzimlere *Agaricus bisporus* için Novozym-234, β-glukonaz ve hyolürinidaz (Yoo ve ark., 1985), *Ganoderma lucidum* için Novozym-234(Shin ve ark., 1988), β-glucuronidase (Choi ve ark., 1987) örnek verilebilir. Hücre duvarı yok edildiği andan itibaren protoplast (Şekil 5), çevrenin osmotik etkisine açık hale gelir. Dolayısıyla osmotik dengeyi sağlayan inorganik veya organik dengeleyiciler (osmotik stabilizatör) kullanılmaktadır. 0,6 molar sukroz üzerine permeabl cellophane membranı yayılmış CYM (Complete Yeast Medium) agarında 2-6 gün süreyle gelişmiş birçok miselden

protoplast elde etmek için en uygun stabilizatördür. KCl, MgSO4 ve NaCl protoplast izolasyonunda kullanılan enzimlerin aktiviteleriyle rekabet edebildiklerinden bazen sorun yaratırlar. 1987'de Novozyme-234 kullanılarak yapılan testlerde β-glukonazın KCl ve NaCl tarafından sukroza göre çok daha yüksek düzeyde inhibe edilidiği gözlenilmiştir. Bunun aksine Ascomyceteslerde KCl, MgSO4 ve NH_4Cl'ün en başarılı inorganik stabilizatörler olduğu ortaya çıkmıştır. Bunların etkisi sadece Basidiomycetes'lerde görülmüştür. Kullanılan tamponun ve ortam Ph sınında protoplast ürün miktarına etkisi vardır. Öyleki içerisinde 0,6 molar sukroz bulunan PO_4 tamponundan *Pleurotus cornucopiae* protoplast elde etmede Na-maleat tamponuna göre çok daha başarılı bulunmuştur. PH dengelemesi yapılmamış 0,6 molar sukroz çözeltisi en yüksek başarıyı vermiştir. *Pleurotus ostreatus*'tan protoplast üretilirken erlenmayerdeki sıvı kültürler cellophane membranlı agar kültürlerine göre daha başarısız bulunmuşlardır. Bu bulgu diğer filemantöz mantarlar tasdik edilmiştir. Üretilmiş fungal protoplastları sıvı veya yarı katı besiyerlerinde rejenere etmek tercih edilir. *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus cornucopiae* katı minimal besiyeri üzerinde 1-3 gün üretilmiş protoplastların görüntüsü mayaya benzer hücre zincirleri şeklinde olup her bir sferik protoplastlardan 1-4 çimlenme tüpü çıktığı görülmüştür. CYM 0,6 molar sukrozla stabilize edildiğinde yüksek Basidiomycetes'lerin protoplastlarının rejenerasyonu yönünden en verimli ortamı oluşturmaktadır. Burada metabolize edilebilir besin kaynaklarıyla o stabilizatör arasında olumlu bir uyum söz konusudur. Protoplast rejenerasyon hızı ile hif gelişiminin çeşitli aminoasit, vitamin ve nükleik asit komponentleri tarafından desteklendiği *Pleurotus cornucopiae*'de gösterilmiştir.Protoplastların reversiyon kolonileri 8 dikaryotik türden elde edilip CM (Complete medium) veya MM (Minimal Medium) besiyerlerine aktarıldıklarında hepsi (bir tür hariç) connecting clampsız monokaryotik miseller vermiştir(Chang ve Miles, 2004).



Şekil 5. Protoplast formasyonu.

1.7. Mantarların Genetiği

Mantarlarla ilgili çalışmaların çoğu kültüvasyon metodları üstüne olup, *Agaricus bisporus* ve *Lentinula edodes*'in bazı morfolojik mutanlarının isolasyon ve karakterizasyonu dışında mantarların genetiği üzerinde çok fazla çalışma yapılmadığından mantarlar konusunda genetiksel bilgiler azdır. (Hasebe ve ark., 1982, 1987, 1991; Murakami ve ark., 1987; Itavaara, 1990). Doğal ortamlarda yaşayan ve kültürü yapılmış olan mantarların karakterizasyonları veya tipleri geleneksel olarak morfolojikal karakterler ve sıcaklık gibi fizyolojik özelliklerin temelindedir. Son zamanlarda protein karakterleri,çeşitli enzim aktiviteleri, serolojik özellikler (Kawamura ve Goto, 1980; Ohmasa ve Furukawa, 1986; Itıvaara, 1988; Burdsall ve ark., 1990; Lin ve Hsies, 1991) ve özellikle isozyme karakterleri gibi biyokimyasal markerler gösterilmiştir. Bu özellikler mantarlar arasında büyük farklılıklar gösterdiği için tanıtılmalarında önemli metodlar olmuştur. Bununla beraber bu biyokimyasal markerlerin ifadesi fizyolojik ve genetik kontroller altındadadır. Markörlerin temeli DNA üzerinedir. Farklı suşların sabit olan genetik farkların ve dominant karakterlerin değerlendirilmesi direk yapılabilmektedir. Bu amaçla kullanılan ilk metodlardan

olan Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) fazlaca kullanılmıştır. Bu metodda, belirli sequensleri kesme özelliğine sahip olan restriksiyon endonükleazlar kullanılarak, bu belirli sequensleri, mantarın DNA' da bulunup bulundurmamasına bağlı olarak bireyler arasında allelik akrabalığın olup olmamasını gösterir. (Chiu ve ark., 1993). Bunun dışında Random Amplified polimorphic DNAs (RAPDs) RFLP gibi ektrakte edilmiş fungal DNA analizinde güvenle kullanılan metodlardan birisidir (Chang ve Miles, 2004).

1.7.1. RFLP

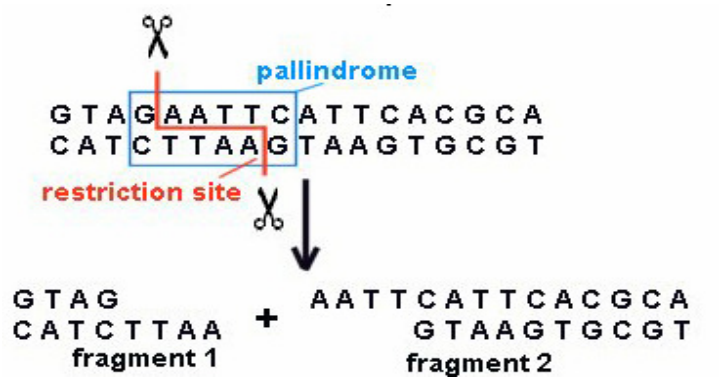
RFLP bakteriyel restriksiyon endonükleazlar tarafından kesilmiş örneklerin farklılığı temeline dayanan bir metodtur. Bu enzimler DNA üzerindeki spesifik kısa sekansları tanır ve keser. Restriksiyon enzimleri bakterinin savunma sistemlerinin bir parçasıdır. Eukaryotlardan farklı olarak nispeten ortama dağılmış vaziyettedir böylece yabancı DNA bir bakteri hücresine girdikten sonra endojen restriksiyon endonukleazlar tarafından hızlı bir şekilde parçalara ayrılır. Aynı zamanda bakteri etkili biçimde kesim için kendi DNA' sında uygun olmayan restriksiyon bölgeleri yapan modifikasyon sistemlerine sahiptir (Botstein ve ark.,1980; Hulbert ve ark., 1988; Chang ve ark., 1988). Endonükleazların DNA üzerinde kesmiş oldukları bazların topluluğuna Pallindrom, kesilen spesifik bölge Restriksiyon Sitesi olarak adlandırılır (Şekil 6)

Sıklıkla kullanılan RE arasında *Eco*RI, *Cla*I, *Hind*III, *Hinf*I sayılabilir (Persing ve ark., 1993). DNA'nın bu enzimlerden bir veya bir kaçı ile kesime uğratıldıktan sonra agaroz jelde yürütülüp ethidium bromide ile boyanıp jelde oluşan bantların yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe RFLP adı verilir.

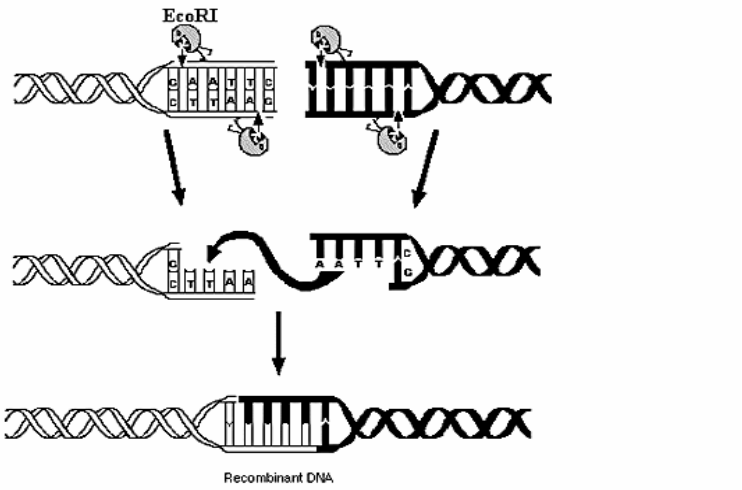
1.7.2. Restriksiyon Enzimleri

Restriksiyon endonükleazlar olarak adlandırılan bir grup enzim rekombinant DNA teknolojisinin köşe taşlarından biridir. Bu enzimler bakterilerden izole edilirler. Bakteriyi istila eden viral DNA'yı parçalayarak, virüs enfeksiyonunu önlediği yada kısıtladığı için bu ismi almışlardır. Restriksiyon enzimleri özgül DNA dizilerini tanırlar ve bu dizilerden her iki DNA zincirini keserler. 1978 yılı Nobel ödülü restriksiyon enzimleri ile ilgili çalışmalarından ötürü Werner Arber, Hamilton Smith ve Daniel Nathans'a verilmiştir. Bugüne kadar 200'den fazla restriksiyon enzimi tanımlanmıştır. Klonlama için çok önemli araçlar olmalarının nedeni, DNA'yı her zaman özgün bölgelerden kesmelerinden ileri gelmektedir. *EcoR*I, E. coli'den elde edilen restriksiyon enzimlerindendir. *EcoR*I ile oluşturulan DNA parçalarının ucunda uzanan tek iplikli kuyruklar (yapışkan uçlar diye adlandırılır) tekrar birleşebilir. Farklı iki kaynaktan elde edilen bu tür DNA parçaları uygun koşullarda bir araya getirilirse, hidrojen bağları ile komplementer yapışkan uçların birleşmesi sonucu rekombinant moleküller oluşur (şekil 7). DNA ligaz adı verilen enzim, bu DNA parçalarını kovalent bağ ile birleştirerek rekombinant DNA molekülleri oluşuşturur (Öner, 2003).

*Sma*I gibi diğer bir grup restriksiyon enzimleri, küt uçlu parçalar oluşturacak şekilde DNA'yı kırarlar. DNA'da yapılan bazı modifikasyonlarla, bu tür DNA moleküleride birleştirilerek rekombinant moleküller oluşturulabilir. Terminal deoksinükleotidil transferaz adı verilen enzim, yapıya nükleotit kuyrukları ilave ederek tek zincirli uçlar oluşturmak için kullanılır. Eğer bir kaynaktan elde edilen DNA parçasına poli-dA kuyruğu takılır, diğer kaynaktan elde edilen parçasınada poli-dT kuyruğu takılırsa, birbirlerine komplementer (tamamlayıcı) tek zincirli kuyruklar yaratılmış olur ve bu DNA parçaları hidrojen bağı oluşumu ile birleşebilirler. Rekombinant molekül, daha sonra kovalent bağ ile birleştirilerek (ligasyon) oluşturulur.



Şekil 6. Restriksiyon endonükleazların kesimiyle meydana gelen palindrom ve restriksiyon sitesi.



Şekil 7. *EcoR*I enzimi ile kesilen iki farklı DNA molekülünde, enzimin oluşturduğu yapışkan uçların birleşerek oluşturdukları rekombinant DNA yapısı.

1.7.3.Pulsed Field Gel Elektrophoresis (PFGE)

Horizontal jel elektroforezi büyüklükleri 0.1-30 Kb arasında olan DNA moleküllerini ayırmada en sık kullanılan tekniktir. Bu teknik homojen bir alan içerisinde agaroz jel ortamında DNA molekülerinin migrasyonu yardımıyla bu moleküllerin birbirinden ayrılmasına yarar.Bütün DNA moleküllerinin sulu çözeltilerde aynı yük:kitle oranına sahip olmalarından faydalanılır. En basit açıklamayla lineer DNA moleküllerinin küçük olanlara agaroz matriksin por ve kanalları içinde büyük moleküllere göre daha kolay migrasyon yapabilmektedirler. Ancak bu olay DNA molekülünün belirli bir büyüklüğü aşması ortamında değişmekte ve moleküller ayrılamayacak şekilde birlikte hareket etmektedirler. Büyük DNA moleküllerinin jeldeki hareketi yılan hareketine benzetilip "Reptation" olarak tanımlanır (Gurrieri ve ark., 1996).

1983-1984 te Schwartz ve Contour PFGE adını vererek bir teknik geliştirmişlerdir (Schwartz ve Cantor, 1984). Bu tekniğe göre nonuniform elektriksel alanlarda benzer DNA molekülleri arasındaki mobilite farklılığı separasyonun temelini oluşturmaktadır. Bu yönde yapılan çalışmalar göstermiştirki değişken elektriksel alanların arasındaki açı oluşan nonuniform elektriksel alan gücünden daha önemlidir. Bir elektriksel alanın 180° değişmesiyle ortaya çıkan teknik FIGE (Field Inversion Gel Elektrophoresis) olarak tanımlanmaktadır. PFGE metodlarından en yaygın olanları yaklaşık 120° reoryantasyon açısı ile çalışan Counter-Clamped Homojegeneous Electric Fields (CHEF) denilen (Şekil 8) uygulamalardır. FIGE ile 15 ten başlayarak 700 Kb'ın biraz üstüne kadar olan DNA fragmentleri ayrılabilmektedir (Carle ve ark., 1986; Chu ve ark., 1986; Chu, 1989). Bu uygulamalarda farklı büyüklükteki DNA moleküllerinin hareket davranışları çok değişken olabilmektedir.FIGE de orta büyüklükte kabul edilecek fragmentler hiç hareket etmeden kalabildikleri halde çok küçük ve çok büyükler öne veya ileriye doğru separe olmaktadır.FIGE deki bu davranış şekli Switch time denilen elektriksel alan yön değiştirme frekansına bağlıdır.1986'da Chu Vollrath ve Davis (Chu ve ark., 1986; Chu, 1989) CHEF tekniğini yayınlamışlardır.Farklı darbe (pulse) sürelerinde 120°'lik

sabit açı ile çeşitli elektrik akım güçleriyle çalışılmış ve 2 Mb kadar olan fragmetlerin düz bir çizgi şeklinde separe oldukları gözlenilmiştir. Günümüzde 10 Mb kadar DNA fragmentleri bu teknikte separe edilebilmektedir.CHEF teknolojisinde aşağıdaki parametreler separasyon için en önemli etkiyi yaparlar(Birren ve ark.,1988).

1. Switching Time (ST): Darbe süresi olarakta tanımlayabileceğimiz bu parametre artarsa yüksek moleküler ağırlıklı fragmentler maximal hızlarına ulaşırlar (o koşullar için).Bu demektirki büyük DNA molekülleri separe edilebilirler. Buna karşılık düşük moleküler ağırlıklı fragmentler kaybolur giderler çünkü çok hızlı bir şekilde ortamı terk ederler.Bu olmasa bile bunların birbirlerinden ayrılma özellikleri kaybolur.

2. Sıcaklık:50-1000 Kb'lık fragmentler 34°C'de 4°'dekinden 2 kat hızlı giderler.Düşük moleküler ağırlık sınırlarında sıcaklığa bağlı olarak migrasyon hızı artar.Ancak jelin içerisindeki ısı homojen dağılım göstermiş ise o zaman Smilling efekti ortaya çıkar.

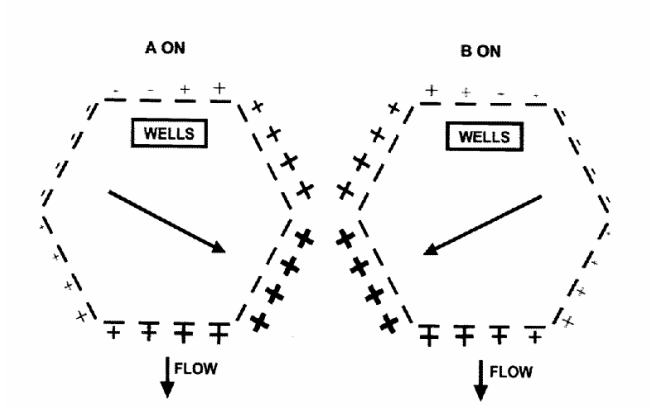
3.Voltage: Genellikle V/cm şeklinde jel boyutuna göre verilir. Kullanılan güç kaynakları alete bağlanan voltajın %80 ile aktivite göstermektedir. Bu yüzden aşağıdaki formüle göre hesaplama yapılır.Gerçek Voltaj=0.8xAletten Çıkan Voltaj/Jel Uzunluğu (cm)5-10 V/cm 2-3 Mb büyüklüğündeki birçok DNA'nın separasyonu için uygundur. Voltaj artışı separe edilen fragment boyutlarını değiştirir. Resolüsyonu artırmak ve bu arada büyük moleküllerin separe olmasını sağlamak için voltaj azaltılır. Switching Time uzatılır. Bu konudaki en güzel örnek *Saccharomyces pompe* kromozomlarıdır. Uzatılmış Switching Time uygulamalarında 2V/cm'de separasyon sağlandığı halde 2.5 V/cm'de sağlanmaz.

4.Buffer: V=IxR $P=I^2R$ olduğundan direnç düşmesi için iyonik gücü yüksek (çok iyonize olan) Buffer'lar tercih edilir. Ama bu durumda I yükselir. Buradan yola çıkıldığında düşük dirençli bufferler da ısı oluşumu çok yüksektir. Buna dayanarak 0.5XTBE düşük akım geçirdiği için tercih edilir. Buna karşılık DNA mobilitesi TAE'de yüksek moleküllü DNA'nın separasyonu daha kolaydır. Çünkü yüksek molekül ağırlıklı fragmentlerin mobilitesi yükselir.

5.Ethidium Bromide: Mobiliteyi yavaşlatır. 100 Kb'dan küçük olmayan moleküller için elektroforez esnasında kullanılmamalıdır.

6.Agarose: Düşük konsantrasyonlarda daha büyük moleküllü DNA'ları separe eder. Ama migrasyon düzeyi agaroz konsantrasyonuna bağlı olarak artsada çok düşük konsantrasyonlarda düşük moleküler ağırlıklı DNA'ların hızları çok yükseldiğinden resolüsyon özelliği ortadan kalkabilir. Birkaç Mb'lık DNA moleküllerine kadar %1 agaroz jel içeren jeller kullnılabilir. Bazı firmalar PFGE için özel agaroz imal etmektedirler. Bunların por çapları büyüktür ve özellikle 3-10 Mb'lık fragmentleri separe etmede çok önemlidir.

7.Reoryantasyon Açısı: 90° veya daha küçük açılar resolüsyona fazla etki etmezler. CHEF uygulamalarının geneli 120°'dir. Çünkü 105-165° elektrik alan açılar arasında neredeyse hiç fark yoktur. Açı daraldıkça migrasyon hızı artar. Tüm elektroforez süresi düşünüldüğünde 120°'den küçük fakat 90°'den büyük açılarda reoryantasyon zamanı kısalabilmektedir. Yeni CHEF modelleri reoryantasyon açısını değiştirebilecek şekilde yapılmışlardır. Ama 2 Mb'dan küçük fragmentlerin separasyonu için 120° sabit açı yeter.



Şekil 8.CHEF aparatında elektriksel alan dağılımı.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Yoshikumi ve ark., (1979), bir Polyporaceae üyesi olan, *Coriolus versicolor*'un dikaryotik misellerini sıvı besiyerinde üretip, mekanik işlemlerle parçalayıp ürettikleri monokaryonları, dikaryotik miselleriyle karşılaştırdıkları zaman, elde etmiş oldukları monokaryonların, morfolojik ve fizyolojik karakterlerinin dikaryotik misellerinden farklı olduğunu, orjin aldıkları dikaryonlara nazaran gelişme özelliği fazla olup, besiyeri içerisinde oluşturdukları miselin daha sağlıklı olduğu saptanmıştır.

Eger ve Lara (1981), *Pleurotus ostreatus, Kuehneromyces mutabilis*, *Flamunila velutipes* gibi Basidiomycetes'lerin dikaryotik suşlarını kimyasal maddelere maruz bırakıp her bir dikaryondan elde ettikleri iki tane monokaryonu uyumlu olan monkaryonlarla eşleştirerek yeni dikaryotik Basidiomycetes suşları elde etmişlerdir.

Dhitaphictic ve Pornsuriya, (2005), *Pleurotus* os*treatus* ve *P. djamor'un* tek sporlarından elde ettikleri monokaryonlardan protoplast hazırlayıp bunlar arasında PEG (Poli Etilen Glikol)'li bir protoplast füzyonu gerçekleştirmişlerdir ve elde ettikleri fusantların ebeveynlerinden daha hızlı misel oluşturduklarını, izoenzim çalışmaları için kullandıkları esterasın ebeveynlerle aynı bantlar oluşturduğunu, fusantların oluşturdukları meyvelerin orjin aldıkları ebeveynlerle recombine karakterler taşıdığını göstermişlerdir.

Larraya ve ark., (2001), endüstriyel olarak üretimi yapılan *Pleurotus ostreatus*'un mating prosesinin kontrol edilidiği tetrapolar genetik sistemler içeriside yeralan β-lokusunun identifikasyonunu sağlayan moleküler markörlerin vermiş oldukları sonuçlara dayanarak iki genetik alt birimin varlığını göstermişlerdir. Bu alt birimlerle birlikte monokaryotik büyüme hızlarında farklılıklar gösteren bazı spesifik allerin varlığını göstermişlerdir. Gerekli olan markörlerin temini ve monokaryonların büyüme hızlarının bağlı olduğu mating tipi etkisinin ortaya çıkarılmasında hızlı büyüyen monokaryonları seçerek, bunlardan uygun dikaryonlar üretip gerek substratı hızla kuşatma, besin ortakçılarına yaşam imkanı

vermeme ve son olarakta kısa sürede bol ürün elde edebilen yeni şuşlar geliştirmişlerdir.

Glen ve ark., (2000), ektomikorhizal birlikteliklerde rastlanılan Basidiomycetes mantarların PCR-RFLP tekniklerini kullanarak bunları identifiye etmişilerdir. Eukaliptus ormanlarının oluşturulduğu Avusturalya bölgelerinde Basidiomycetes fungusların nükleer ribozomal DNA'daki ITS (İnternal Transcribed Spacers) primer çiftlerinin spesifikasyonu ITS-I-F/ITS-4-B'lerinkilerle karşılaştırılmıştır. PCR ve RFLP yapılmış ve bu region, mantarları 28 familyaya ait 91 tür altında toplamalarını sağlamıştır. Bu çalışmada fungusların identifikasyonu için 3 tanesi mitekondriyal regionlara, 3 taneside nükleer targetlere uydurularak hazırlanmış 6 farklı primer çifti morfolojik olarak tanımlanmış türlerin PCR-RFLP kalıplarını oluşturmak için kullanılmıştır. Primerlerin 2 seti birisi yeni düzenlenmiş ve nükleer ribozomal DNA'da ki ITS, iyi hedef olan diğeri ise Mitekondriyal Large Subunit Ribozomal DNA'nın amplifikasyonu ile edilmiş olan bu primer setleri çok yüksek hassasiyet ve spesifikasyon göstermiştir.

Williams ve ark., (1981), bir Basidiomycetes olan *Coriolus versicolor* ile yaptıkları çalışmada, laboratuarda hazırlanmış %3 malt içeren agar besiyerinde petrilere ekilmiş monokaryon ve dikaryonlardan oluşan çeşitli kombinasyonları, ağaçlık araziye konuşlandırılmış kayın kütüklerine aşılamışlardır. Bireysel olarak dikaryonların kendilerine özel hale getirdikleri regionlar mutual antogonizmin doğal sonucu bazı zonların oluşmasına sebep olmuştur. Farklı dikaryonlar aynı zaman sürecinde aynı alanı kapsayacak şekilde benzer misel gelişim hızları göstermişlerdir. Hem agar üzerinde hemde odunlarda aynı durum ortaya çıkmıştır. Sexüel uyumlu monokaryonların agar üzerindeki gelişimleri göstermiştir ki monokaryonların gelişim hızlarıyla dikaryotizasyondan sonra gözlenen misel gelişimi ve nükleus migrasyonu dikaryonların bir populasyonda dominant veya daha alt düzeyde dağılım göstermelerini etkilemektedir. Monkaryonlar kütüklere aşılandıktan sonra arazide kısa sürede dikaryon hale gelmişlerdir. Sonuçta ortaya çıkan dikaryonlar arasındaki mating tipi faktörlerinin dağılımı çevrede heterojen spor yağmuru oluşturduğunu göstermişlerdir.

Babasaki ve ark., (2002), bir Basidiomycetes mantar olan *Pholiota nameko* spawnında meyve üretimini etkileyecek heterolog misel düzeyi araştırılmıştır. Protoplast klonlarının dikaryon ve monokaryon kültivasyonundan oluşan meyvelerin dikaryon-monokaryon eşlemesinden türeyecek olan meyvelerle aynı olan mozaik meyveler oluşturduğu ve dikaryon-dikaryon şeklinde üretilen ve farklı meyve zamanları olan heterolog suşlarda her dikaryonun kendine has meyve tipleriyle kimera gösterenler meyveların ortaya çıktığı ve kimera meyvelarından elde edilen misellerin her üç tip meyveyı yaptığı gözlenmiştir. Bu tip sonuçlara dayanarak *Pholiota nameko* ve diğer Basidiomycetes'lerde substratın içinde yayılan misel farklı bölümleriyle interaksiyon göstererek meyve oluşumunu başlatığı bulunmuştur.

Kwan ve Xu, (2002), *Lentinula edodes*'in L-54 suşundan monokaryotizasyon yoluyla elde edilen monokaryonlarda RAPD (Random-amplified polimorphic DNA) tekniği kullanılmış ve L. edodes'in genetik haritasında 14 Linkage grubunun toplandığını ve bunların uzunluklarının 622,4 cM (sentimorgen) olduğu saptanmıştır.

Tello ve ark., (2001), white-rot bir Basidiomycetes olan *Ceriporiopsis subvermispora'*nın homokaryatik (monokaryon) suşların izolasyonu ve karakterizasyonu konusunda çalışmışlardır. Bu çalışmada *Ceriporiopsis subvermispora* FP105752'nin homokaryotik suşları rejenarasyona sokulmuş protoplastlardan homokaryotik izolatları elde edilmiş. CSA ve CSB adı verilen bu suşların homokaryotik yapıları PCR ile ve 3 farklı birbirine allel olan MnP geninin (manganaz peroksidaz enziminin oluşumundan sorumlu gen) amplifikasyon ve sequens analizi yapılmıştır. Ebeveyn suşlarla karşılaştırıldıklarında homokaryon kültürlerin filtratlarında daha az sayıda MnP izoenzimleri bulunduğu isoelektrik-focusingle gösterilmiştir.

Pilotti ve ark., (2002), *Ganoderma boninense*'nin monokaryotik ve dikaryotik miselinin interaksiyonu ve sexualite konusunda araştırma yapmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda hetrotallik tetrapolar multiple allel olan *Ganoderma boninense*'de çimlenen fideler arsındaki misel interaksyonları izolatlar arsındaki vejatatif inkompabilite varlığını, monokaryotik ve dikaryotik miseller arasındaki

interaksiyonların kuvettli antogonistlikten, antogonizmin yokluğuna kadar değişen 4-farklı grubun oluşmasına sebep olduğu, dikaryotik miseller arasındaki eşleşmenin antagonist sonucunu doğurduğunu ve antogonizmin derecesini genellikle izolatların yakınlığıyla (uyumluğuyla) doğru orantılı olduğunu ve genetik farklı dikaryonlar discret bireylerin oluşturduğu gösterilmiştir.

Hseu ve ark., (1996), geleneksel taksonomik metodlarla ayrılamayan *Ganoderma lucidium*'un izolatları arasındaki farkları ITS (İnternal Transcribed Spacers) denilen rDNA genlerini inceleyip, ITS denilen sequenslere RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniği uygulamışlardır. Bu çalışmanın sonucunda bazı izolatların ITS sequensleri identik olmasına rağmen, RAPD tekniğiyle genetik Finger Prints lerin birbirinden farklı şekilde oluştuğu görülmüştür.

Horgen ve ark., (1996), ticari olarak üretilen *Agaricus bisporus* şuşlarının arzu edilmeyen fenotip gösteren suşlarınının 8 tanesini örnek almış bunların DNA'larını izole edip FRLP analizi yapıp sağlıklı suşla mukayesesi ve identifikasyonu yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda istenilmeyen suşlarda heterozigotluğun kaybı, deheterokaryotizasyon, somatik rekombinasyon, kromozom kayıpları, kromozom uzunluğundaki polymorfizm, kromozomal translokasyon ve rDNA tekrarlarının kopya sayısındaki değişiklikleride kapsayan bir dizi farklılık tespit edilmiştir.

Larraya ve ark., (2002), *Pleurotus ostreatus*'u monokaryon ve dikaryon miseller halinde Eger besiyerinde ve buğday samanında yetiştirerek analizler yapmışlardır. Analiz sonuçlarına göre bu mantarın genetik haritasında Quantitative Trait Loci (QTL) adı verilen bazı genomik regionların gösterilebileceğinin mümkün olduğunu ve bazı durumlarda monokaryotik ve dikaryotik QTL'ler haritada aynı bölgede yığıldığını göstermişlerdir. QTL'leri kapsayan böyle genetik haritalarının oluşturulabilmesinin mümkün olamasıyla birlikte genetik informasyona dayanarak yeni ıslah programlarının oluşturulacağını araştırmışlardır.

Castle ve ark., (1987), *Agaricus*'un iki türü olan *Agaricus brunnescens* ve *Agaricus bitorquis* RFLP (restriction fragment length polymorphisms) yoluyla araştırılmıştır. Bu çalışmada *EcoR*I enzimi ile parçalanmış problar Southern DNA-

DNA hibridizasyonuna sokulmuşlardır. Klonlanmış fragmentlerin her iki tür içinde büyük çoğunluğu polimorfik bulunmuştur ve *A. brunnescens'*te beklenilenden daha az sayıda fenotiplere rastlanılmıştır. Aynı zamanda homokaryotik suşlardan elde edilen DNA'larda, heterekaryotik suşların DNA'larına göre daha az sayıda bant görülmüştür.

Larraya ve ark., (1999), *Pleurotus ostreatus*'un 1.4-4.7 Mbp büyüklüğü arasında değişen 11 tane kromozomnunu PFGE (Pulsed Field Gel Elektrophoresis) yoluyla kolayca separe edilebildiğini göstermişlerdir.

Fujitaa ve ark., (2005), 19 tane yenilebilir ve medikal özellikli mantarların metanol ekstraktlarının 5α-redüktaz aktivitesini araştırmışlardır. *G.lucidum* Fr. Krast'ın bu araştırmayla çok güçlü bir 5α-redüktaz inhibitör aktivitesinin bulunduğu saptanmıştır. *G. lucidum*'un meyvelarından hazırlanan preparatların sıçanlarda ventral prostatın büyümesine neden olan testesteronu önemli miktarlarda inhibe etmiştir. Sonuçlar göstermiştirki *G. lucidum* benign prostatik hyperplasia (BPH) de kullanışlı bir madde olarak kullanılabilir.

Aryantha ve ark., (2002), *Ganoderma lucidum* ve *Ganoderma tropicum*'un iki önemli bileşeni olan triterpen ve polisakkaritlerini izole etmişler ve her iki ganoderma türünde medikal özelliğinin temelinde olan polisakkarit ve triterpen miktarının farklı olduğu saptanmıştır.

Lin ve Zhang, (2004), *G. lucidum*'un antitümör ve immunoregulatör etkisi üzerine çalışmışlardır. *G. lucidum*'un su exraktının ve polisakkaritinin tümör taşıyan hayvanlarda immün sistemi aktive ederek önemli derecede antitümör aktivitesi gösterdiği saptanmıştır (Lin ve Zhang, 2004).

Eo ve ark., (1999), *G. Lucidum*'un antiviral aktiviteleri üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmada *G. lucidum*'un iktane suda çözünen GLhw ve GLIw ve 8 tane metanolde çözünebilen GLMe-1-8 maddeleri meyvesindan hazırlanmıştır. Bu maddeler herpes simplex virüs tip-1(HSV-1) ve HSV-2, influenza A virüs (Flu A) ve vesicular stomatitis virüs (VSV) Indiana ve New Jersey gibi 5 tane patojen suşa karşı etkili olduğu gözlenmiştir.Özellikle GLhw, GLMe-1, -2, -4 ve -7 HSV ve VSV'nin cytopathic etkilerini (CPE) inhibe ettiği gösterilmiştir.

Hsieha ve ark., (2005), *G. lucidum*'un besiyerindeki karbon kaynağı, nitrojen kaynağı, fosfat kaynağı, mağnnezyum kaynağı ve çözünmüş oksijen ihtiyacında kısıtlamalar yaparak polisakkarit üretimindeki değişimleri gözlemlemişlerdir. Bu deneyin sonucunda litrede 60gr glukoz konsantrasyonunun yüksek polisakkarit üretimine, karbon kaynağı sınırlandığında ise oldukça düşük moleküler ağırlıklı polisakkaritlerin oluştuğu,litrede 0,492 gr nitrojen kaynağının bulunması polisakkarit üretiminin artığı, düşük miktarda fosfat kaynağı kullanılması düşük moleküler ağırlıklı polisakkaritlerin oluşumuna, oksijen faktörünün ise en iyi polisakkarit oluşumunu sağladığı gösterilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Besiyerleri

3.1.1.1.CYM (Complete Yeast Medium) (Raper ve ark., 1972).

Ganoderma lucidum' dan DNA elde etmek için, kullanılacak misellerin gelişmesi için hazırlanmıştır.

	Bileşimi (gr/L)
Glikoz	20
Yeast	2
Peptone	2
$MgS0_4.7H2O$	0,5
KH_2PO_4	0,5
K_2HPO_4	1

Bütün bileşenler distile su içerinde çözündükten sonra pH 7.3-7.4'e ayarlanır ve 121 °C de 1.2 atm basınçta 15 dakika otoklav edilir.

3.1.1.2.CYM (Complete Yeast Medium) Agar

Ganoderma lucidum sporlarının çimlenmesi ve elde edilen monokaryonların misel gelişimi için kullanılmıştır.

	Bileşimi (gr/L)
Glikoz	20
Yeast	2
Peptone	2
$MgS0_4.7H2O$	0,5
KH_2PO_4	0,5
K_2HPO_4	1

Agar 20

Bütün bileşenler distile su içerinde çözündükten sonra pH 7.3-7.4'e ayarlanır ve 121 °C de 1.2 atm basınçta 15 dakika otoklav edilir.

3.1.2. DNA Açığa Çıkarılması Gerekli Olan Maddeler

3.1.2.1. Protoplastların ve Agaroz Blokların Hazırlanması İçin Gerekli Maddeler

Çizelge 1. Protoplast Solüsyonu İçin Gerekli Bileşenler

Bileşenler	Hazırlanışı
100mM Tris (stok)* 100mL (pH 7,2)	1,21grTris tartılır,100mL distile su içerinde çözülerek ve pH 7.2'ye ayarlanır
200 mM NaCl (stok)* 100 mL	1,16 gr NaCl tartılarak, 100 mL su içerisinde çözülür.
500 mM EDTA (stok)* 100 mL	18,62 gr EDTA tartılarak, 100 mL su içerisinde çözülür

Çizelge 2. Protoplast ve agaroz bloklar için gerekli solüsyonlar

Solüsyonlar	Hazırlanışı
ProtoplastSolüsyonu (10 mM Tris pH7,2,20mM NaCl, 50mM EDTA) 100 mL	10 mL Tris (stok), 20mL NaCl (stok),50 mL EDTA(stok) çözeltileri alınır ve üzerine 20 mL distile su ilave edilir.
% 2'lik Low Melting Agaroz solüsyonu, 50mL	1 gr agaroz (A-94-14) tartılarak, 50 mL distile su içerinde çözündükten sonra mikro dalgada eritilir.

3.1.2.2. DNA' nın Açığa Çıkartılmaında Kullanılan Maddeler

Çizelge 3. Proteinaz-K çözeltisinin bileşenleri (Bio-Rad, 1992).

Bileşenler	Hazırlanışı
1M EDTA (stok)* 100 mL (pH 8)	37,4 gr EDTA tartılırak 100mL distile su içerisinde çözülürek pH 8'e ayarlanır.
% 2 Sodyum Dezoksikolat(stok)* 100 mL	2gr Sodyum Dezoksikolat tartılarak 100mL distile su içerisinde çözülür.
% 10 SDS (stok)* 100 mL	10 gr SDS tartılarak100mL distile su içerisinde çözülür.

Çizelge 4. Proteinaz-K çözeltisi (Bio-Rad, 1992).

Solüsyon	Hazırlanışı
Proteinaz-K Reaksiyon Çözeltisi (100 mM EDTA pH 8 , % 1 SDS, % 0,2 Sodyum Dezoksikolat) 1mg /mL Proteinaz-K	10 mL stok EDTA çözeltisinden,2 mL stok Sodyum Dezoksikolat çözeltisinden, 1 mL stok SDS çözeltisinden alınırak 77 mL distile su ile 100 mL'ye tamamlanır ve 0,1 gr Proteinaz-K tartılarak içerisinde çözülür.

3.1.2.3. Agaroz blokların *EcoR*I Restriksiyon Endonükleazı İle Muamelesinde Kullanılan Maddeler

Çizelge 5. Restriksiyon endonükleaz muamelesi için gerekli solüsyonlar (Bio-Rad, 1992).

Solüsyonlar	Hazırlanışı
1X Restriksiyon enzim solüsyonu 5 mL	2,5 mL Restriksiyon enzim çözeltisinden alınır ve 2.5 mL steril distile su ile karıştırılır
*EcoR*I mL/40000 U 5 mL 80 U	10 µl *EcoR*I (SIGMA) enziminden alınır ve 499 mL steril su ile karıştırılır.

3.1.2.4. PFGE İçin Gerekli Solüsyonlar

Çizelge 7. PFGE İçin Gerekli Solüsyonlar

Solüsyonlar	Hazırlanışı
Agaroz Solüsyonu (%1) 130 mL	1,3 gr agaroz (AG0896) tartılırak, 13 mL 5XTBE tamponu ve 117 mL distile suda çözündükten sora mikrodalgada eritilir.
Yükleme Tamponu*	%25 Brom Fenol Mavisi, %10 Gliserol,distile su 100 mL'ye tamamlanır.
5XTBE (Tris, Boric asit, EDTA)* 1000 mL	54g Tris base, 27,5g Boric asit,3,72g EDTA tartılırak distile su ile 1000 mL'ye tamalanır. pH 8,3'e ayarlanır
Ethidium Bromid Solüsyonu (stok)* 10 mg/mL	1gr Ethidium bromid 100 mL distile suda çözünerek koyu renkli şişede +4 ºC saklanır.
Yürütme Tamponu	27,5gr Boric asit, 54 gr Tris base tartılır, 20mL 0,5 M EDTA (pH 8.0) üzerine

3.1.2.5. CHEF'de Kullanılan Puls Zamanları

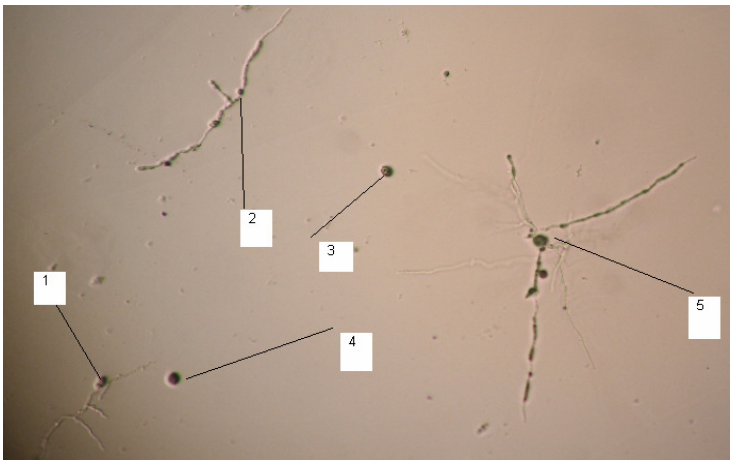
Çizelge 7. CHEF-PFGE Sisteminde Kullanılan Puls Periyotları

Seri No:	Puls Süresi (Saniye)	Devir Sayısı	Gerilim (Volt)
Seri. 1	300	60	36
Seri 2	600	60	36
Seri 3	1200	25	36
Seri 4	1800	25	36
Seri 5	2400	25	36

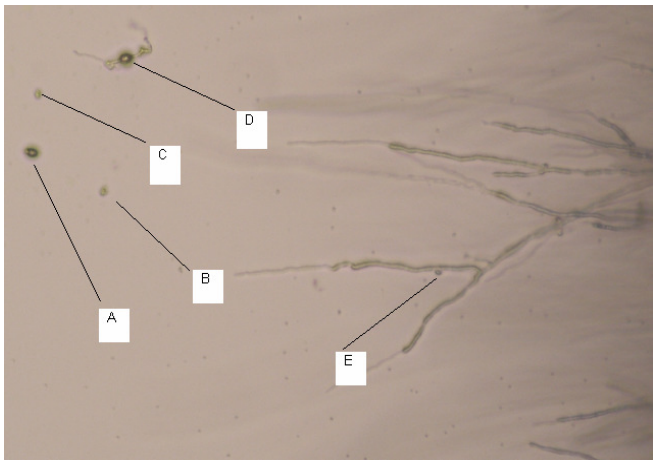
3.2. Metod

3.2.1. Sporların Çimlendirilmesi

1. *G. lucidium*'un sporları steril suda 3 gün bekletilir.
2. İçinde steril su bulunan 8 tüpe seri sulandırma yoluyla sporlar aktarılır.
3. İmipenem antibiyotiği (mL'de 1µg) ilave edilen petrilerdeki katı besiyerine, sulandırılan sporlar yayma yoluyla inoküle edilir ve 24°C sıcaklıkta etüvde bekletilir.
4. Besiyerlerindeki çimlenen sporlar, mikroskop atında seçilip işaretlenerek, steril bir bistüri ile yeni besiyerine aktarılır (Şekil 9).
5. Besiyerinde sporların oluşturduğu miseller tekrar mikroskop altında incelenerek clamp-connection yapıları olup olmadığı bakılır (Şeki 10).
6. Clamp-connection içermeyen kültürler 27 °C, 32 °C, 35 °C, 37 °C ve 40°C sıcaklıklarda inkübasyona bırakılır.
7. 2 gün arayla misellerin gelişme hızı (cm cinsinden, Çapın artışı) ölçülür.
8. Örneklerin 2.gün, 4.gün ve 6.gün ortalama misel gelişim hızı hesaplanır.



Şekil 9. Çimlenmiş sporların mikroskop altında çekilmiş fotoğrafı. 1-2-5, Tek düşüp çimlenen sporlar, 3-4, çimlenmemiş sporlar.



Şekil 10. Clamp connectionlı yapıların mikroskop altında çekilmiş fotoğrafı. A-B-C, çimlenmemiş sporlar, D, çimlenmiş spor, E- clamp connection yapısı.

3.2.1.1. Kültür Şartları

1. Otoklavda steril edilen CYM besiyeri 50°C soğukluğa geldiğinde, içine mL'de 1µg olacak şekilde imipenem antibiyotiği ilave edilirek petrilere dökülür ve katılaşması beklenir.

2. Sulandırılmış sporlar besiyerine inoküle edilir.

3. Besiyerleri 24°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılır.

4. Çimlenen sporlar yeni besiyerlerine aktarılarak 27 °C, 32 °C, 35 °C, 37 °C ve 40°C sıcaklıklar da etüvde inkübasyona bırakılır.

3.2.2. DNA'nın Arıtılması

3.2.2.1. Kültür Şartları

1. 200 mL CYM sıvı besiyerİ otoklavda steril edilir.

2. DNA izolasyonu için kullanılacak miseller petrideki katı besiyerlerinden bistüri yardımıyla sıvı besiyerlerine inoküle edilir.

3. Besiyerleri 27 °C de bir hafta süre ile inkübasyona bırakılır.

3.2.2.2. Protoplastların ve Agaroz Blokların Hazırlanması

1. Sıvı besiyerinde gelişen miseller steril su ile iyice yıkanır.

2. Miseller 4mL protoplast solüsyonu ile, Ultra-Toraks (Homojenizatör) yardımyla parçalanır.

3. Homojenat sentetik mutfak temizlik bezi (Banat ev bakım ürünü) ile iyice süzülür.

4. Mikrosantrifüjde 5000 rpm de santrifüj edilen homojenat 1mL protoplast süspansiyonu ile resüspanse edilir.

5. Bir damla örnek lam-lamel arası preparasyon ile 100'lük immersiyon objektifinde incelenerek protoplastların varlığı saptanır.

6. Protoplast süspansiyonu 1:1 oranında %2'lik low melting agaroz jel ile karıştırılarak 10x20x1 mm boyutlarındaki bloklara dökülür.

7. Donan her bir blok bir bistrü yardımıyla 3 eşit parçaya bölünerek uygulama ebadı 10x6x1 mm olan bloklar elde edilir.

3.2.2.3. DNA' nın Açığa Çıkarılmasında Kullanılan Metod

1. 50mL'lik santrifüj tüp içerisine konulan agaroz bloklar 25 mL Proteinaz-K Reaction Buffer ile karıştırılarak 50°C sıcaklıkta, iki gün sıcak su bayosunda bekletilir.
2. Agaroz bloklar yıkama solüsyonu ile oda sıcaklığında 30 dakika karıştırıcıda çalkalanır. Bu aşama 4 defa tekrar edilir.
3. 1mM PMSF ile yıkanan agaroz bloklar 2-gün TE çözeltisinde bekletilir.
4. Agaroz bloklar kullanılıncaya kadar 1X yıkama solüsyonunda +4°C sıcaklıkta saklanır (Bio-Rad, 1992'den degiştirilerek).

3.2.3. RFLP Analizi

3.2.3.1. Agaroz blokların *EcoR*I Restriksiyon Endonükleazı İle Muamelesi

1. Agaroz bloklar 1.5 mL'lik mikrosentrifüj tüplerine konulur.
2. Tüp içine 1X restriksiyon enzim çözeltisinden 1mL ilave edilerek, oda sıcaklığında 100 rpm'de çalkalayıcıda 1 saat bekletilir.
4. Bir saatin sonunda restriksyon enzim çözeltisi atılır.
5. Tüplere tekrar, yeni hazırlanmış 1X restriksiyon enzim çözeltisinden , 0,3 mL eklenir.
6. Her 100 µl Plug için tüplere 50 U *EcoR*I enziminden ilave edilir.
7. Tüpler bir gece 37ºC'de sıcak su banyosunda bekletilir.
8. Süre sonunda enzim çözeltisi atılarak kullanılıncaya kadar TBE buffer içinde +4ºC'de saklanır ((Bio-Rad, 1992).

3.2.4. CHEF (Contour Clamped Homogeneous Electrical Field) – PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) Sitemiyle Ganoderma Lucidum Türkiye izolatlarının Kromozomal DNA'larının Yürütülmesi.

G. lucidum'un Türkiye izolatları olan, *Ganoderma lucidum Standart, Ziraat*, *Samandağ* ve *Adana* ve *Pozantı* suşlarının RFLP analizinden sonra DNA'ları arasındaki farkın saptanması için, CHEF-PFGE (Şekil 9) sisteminde agaroz bloklar yürütülmüştür.



Şekil 11. CHEF Aparatus.

3.2.4.1. Agaroz Jelin Aparata Dökülmesi.

1.100 mL de 1gr olacak şekilde 0.5x TBE çözeltisinde çözünen agoroz mikrodalgada eritilir.

2. Elle tutulacak sıcaklığa gelen jel, agoroz jel aparatına dökülerek donması beklenir.

3.Donan Jele bloklar yerleştirilir (Şekil 10).

4. CHEF aparatusunda 0,5X TBE yürütme tamponu ile yürütülür.



Şekil 12. Agaroz jelin dökülmesi ve bloklara yerleştirilmesi.

3.2.4.2. Agaroz Jelin Boyanması

1. PFGE işleminden sonra mL de 0.5 µg Ethidium Bromid bulunan boya çözeltisi içinde bekletilir.

2. Fazla boyanın giderimi için jel 1 gece distile suda bekletilir.

3. Jel, süre dolduktan sonra U.V transillüminatör üzerine konarak boyamanın olup olmadığına bakılır.

4. Boyanan DNA moleküllerinin görüntüsü Mini-Bis jel görüntüleme sistemiyle fotoğraflanır.

5. Marker DNA fragment boyutları ile, örnekler kıyaslanarak, moleküler ağırlıklar hesaplanır.

4. BULGULAR

4.1. Monokaryonların Farklı Sıcaklıklardaki Gelişim Hızına Ait Bulgular

G. lucidum'un sporlarından sulandırma tekniği ile elde edilen monokaryonlar CYM katı besiyerinde, 27ºC (Çizelge 8), 32ºC (Çizelge 9), 35ºC (Çizelge 10), 37ºC (Çizelge 11), 40ºC sıcaklıklarda 2., 3., 4. günlerde, cetvel yardımıyla, misellerin çaplarındaki artış ölçülerek misel gelişim hızları saptanmıştır. Burada baz alınan günlere göre yapılan hesaplamada, 2. gün (Çizelge 12), 4. gün (Çizelge13) ,6. gün (Çizelge 14) lerde misel gelişim hızının 32ºC de en fazla olduğu, bunu takiben 27ºC de de gelişim hızının fazla olduğu ancak, sıcaklığın artmasıyla beraber bu gelişim hızlarının 35ºC, 37ºC sıcaklıklarda düştüğü, 40ºC de ise misel gelişiminin meydana gelmediği görülmüştür.

Çizelge 8. 27ºC sıcaklıkta Monokaryonların Misel Gelişimin Hızlarına (Çaplarının ölçülmesiyle) ait bulguların çizelgesi (cm).

	2.GÜN	4.GÜN	6.GÜN		2.GÜN	4.GÜN	6.GÜN
M_1	2.5	5.1	8	M_{41}	3	5	9
M_2	2.5	5	9	M_{42}	2,5	5,5	8,5
M_3	3	5,6	9	M_{43}	2	4,7	9
M_4	2,5	5	9	M_{44}	1,8	3,6	6,9
M_5	2,6	5,2	9	M_{45}	1,8	4,6	7
M_6	2,7	5,4	9	M_{46}	1,8	3	8
M_7	2	5	7,8	M_{47}	1,5	2,7	5
M_8	2,2	5,3	8,3	M_{48}	1,6	4	6,5
M_9	2,7	5,7	9	M_{49}	3,5	6,1	9
M_{10}	3	6	9	M_{50}	1,7	3	4,6
M_{11}	2,8	5,2	8,8	M_{51}	1,5	2,7	7,5
M_{12}	2,5	5,9	9	M_{52}	3	5	9
M_{13}	2,4	5,4	9	M_{53}	3,1	5,2	9
M_{14}	0,7	1,8	3	M_{54}	2,7	4,9	9
M_{15}	3	4,5	9	M_{55}	2,7	5	9
M_{16}	1,7	4	6,5	M_{56}	3,2	5,8	9
M_{17}	1,1	3	5	M_{57}	2,9	5,4	9
M_{18}	2,3	4,8	9	M_{58}	2,9	5,5	9
M_{19}	1,8	4,8	6,5	M_{59}	1,8	3,7	9
M_{20}	1,5	4	6,3	M_{60}	1,6	3	7
M_{21}	2,5	6	9	M_{61}	1,2	2,8	4,2
M_{22}	1,5	3	4,5	M_{62}	1,9	3,2	5,7
M_{23}	1,6	4	6,5	M_{63}	3	5,1	9
M_{24}	2,5	5,7	9	M_{64}	3	5,3	9
M_{25}	2,7	4,8	9	M_{65}	3	5,1	9
M_{26}	3,5	5,1	9	M_{66}	3	5,1	9
M_{27}	2,5	4,3	9	M_{67}	3,1	5,7	9
M_{28}	1,8	3,7	6,7	M_{68}	3,2	5,9	9
M_{29}	3,5	6,1	9	M_{69}	3,1	5	9
M_{30}	1,5	2,5	5	M_{70}	2,7	5	9
M_{31}	2	4,6	9	M_{71}	2,1	4,9	9
M_{32}	1,9	4	6	M_{72}	2	4,3	7,5
M_{33}	1,4	3	4,3	M_{73}	1,9	3	6,9
M_{34}	1	3,3	5	M_{74}	2,5	5	9
M_{35}	3,5	7	9	M_{75}	2,6	5,9	9
M_{36}	3,6	5,7	9	M_{76}	2,5	5,3	9
M_{37}	3,8	5,8	9	M_{77}	3,3	5,7	9
M_{38}	2,8	4,2	9	M_{78}	3,1	5	9
M_{39}	3,3	5	9	M_{79}	2,4	4,9	9
M_{40}	2	4,5	8	M_{80}	2,8	5	9

Çizelge 9. 32ºC sıcaklıkta Monokaryonların Misel Gelişimin Hızlarına (Çaplarının ölçülmesiyle) ait bulguların çizelgesi (cm).

	2.GÜN	4.GÜN	6.GÜN		2.GÜN	4.GÜN	6.GÜN
M_1	3	5,7	9	M_{41}	1,8	4	7
M_2	3,1	6,8	9	M_{42}	3,1	5,5	9
M_3	3,5	6,9	9	M_{43}	1,9	5,6	9
M_4	3	4,8	9	M_{44}	1	3	5,8
M_5	3	6,7	9	M_{45}	2,5	6,2	9
M_6	3,3	4,7	9	M_{46}	3	6,1	9
M_7	3,4	4,9	9	M_{47}	2,3	4,9	9
M_8	2,5	4,4	9	M_{48}	2	6	9
M_9	2,8	6,9	9	M_{49}	3	6,1	9
M_{10}	2,8	4	9	M_{50}	1,9	6	7,8
M_{11}	2,8	5,5	9	M_{51}	1,7	6,4	9
M_{12}	2	4	8,5	M_{52}	3,1	6	9
M_{13}	2,5	5	9	M_{53}	3,1	5,7	9
M_{14}	1	2,8	5	M_{54}	2,9	5,9	9
M_{15}	2,5	5	9	M_{55}	3	5,9	9
M_{16}	1,9	3	5	M_{56}	3,3	6	9
M_{17}	1,3	3	5	M_{57}	3	6,3	9
M_{18}	2,5	6,4	9	M_{58}	3	6,1	9
M_{19}	1,5	3	5	M_{59}	2,2	5,6	9
M_{20}	1	2,5	4,2	M_{60}	2	2,9	6,9
M_{21}	1,7	3,1	6,5	M_{61}	1	2	3,4
M_{22}	1,5	3	5,5	M_{62}	2	5,7	6,5
M_{23}	1,2	3,2	6,5	M_{63}	3,4	6	9
M_{24}	3	5,9	9	M_{64}	3,4	6,2	9
M_{25}	1	2,2	4,5	M_{65}	3,1	6,3	9
M_{26}	1,5	3,1	6	M_{66}	3,1	6	9
M_{27}	1	2	4	M_{67}	3,1	6	9
M_{28}	3	6,2	9	M_{68}	3,2	6	9
M_{29}	1,2	2,5	5,7	M_{69}	3	5,9	9
M_{30}	3	6	9	M_{70}	3	5,8	9
M_{31}	2,8	6,3	9	M_{71}	3,2	6	9
M_{32}	1,2	2,4	6,9	M_{72}	2,1	4	5,3
M_{33}	1,4	2,5	7,1	M_{73}	2	2,8	5,1
M_{34}	1	2,9	6	M_{74}	3	5,9	9
M_{35}	3,3	4,2	9	M_{75}	3	6,4	9
M_{36}	1	2,2	4	M_{76}	3	6	9
M_{37}	3,8	6	9	M_{77}	3,3	6,3	9
M_{38}	3	5,2	9	M_{78}	3,3	6,2	9
M_{39}	1,7	3,7	6	M_{79}	3	6	9
M_{40}	3,2	6,2	9	M_{80}	3	6,3	9

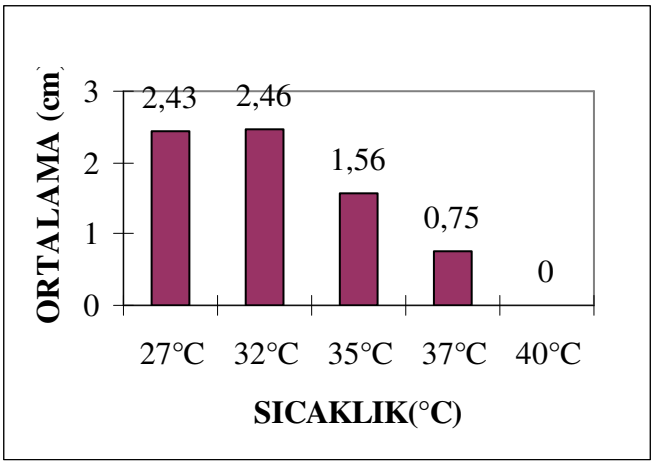
Çizelge 10. 35ºC sıcaklıkta Monokaryonların Misel Gelişimin Hızlarına (Çaplarının ölçülmesiyle) ait bulguların çizelgesi.

	2.GÜN	4.GÜN	6.GÜN		2.GÜN	4.GÜN	6.GÜN
M_1	2,5	3	3,1	M_{41}	-	1	2,7
M_2	2	2,3	2,5	M_{42}	3,1	5,5	9
M_3	2,5	3	5	M_{43}	3,1	5,8	9
M_4	2,8	5,5	8	M_{44}	-	2	2,5
M_5	2	3,2	5,5	M_{45}	-	1	2,2
M_6	2	4,1	5	M_{46}	1	1,9	2,5
M_7	1,8	3,7	5,5	M_{47}	1	2,3	3
M_8	2,5	5,3	8	M_{48}	0,7	1,3	1,9
M_9	2,5	4,5	6	M_{49}	1,8	2,4	3,3
M_{10}	3	6	9	M_{50}	0,5	1,2	1,7
M_{11}	2	4,6	7	M_{51}	1	1,7	2
M_{12}	-	1,2	3,1	M_{52}	2,5	2,7	3,5
M_{13}	1,7	3,3	5,5	M_{53}	2	2,1	3,3
M_{14}	-	1	2,3	M_{54}	1,9	2	2
M_{15}	3,2	5,5	7	M_{55}	2,5	3,4	8
M_{16}	-	1	2,3	M_{56}	3	5,1	8,3
M_{17}	-	1	2,2	M_{57}	1,9	2,1	2,7
M_{18}	3,6	5,5	9	M_{58}	2,5	3,5	4,6
M_{19}	1,8	2,8	3,2	M_{59}	2	2,3	2,7
M_{20}	-	1	2	M_{60}	1,7	2	2,5
M_{21}	1,5	3,7	6,5	M_{61}	-	-	-
M_{22}	-	1	2,8	M_{62}	2,5	3	3
M_{23}	-	1	2	M_{63}	2	3,1	5
M_{24}	1,5	2,7	3,9	M_{64}	2,2	3,3	5,2
M_{25}	-	1	3	M_{65}	2	2,3	2,4
M_{26}	-	1	3	M_{66}	2	2,9	3,5
M_{27}	-	-	1	M_{67}	2	3,1	4
M_{28}	-	1	2,7	M_{68}	2,3	3,5	5,1
M_{29}	-	1	2,5	M_{69}	1,9	2	2
M_{30}	3,8	6,7	9	M_{70}	1	2,1	2,9
M_{31}	2	4,5	9	M_{71}	2	3,1	5,4
M_{32}	1,8	1	2,3	M_{72}	-	-	-
M_{33}	-	1	3	M_{73}	0,9	1,2	1,2
M_{34}	-	1	2,7	M_{74}	2,7	4,2	7,6
M_{35}	2,2	3,3	4	M_{75}	2,5	4,6	8
M_{36}	-	-	1,7	M_{76}	2	3,2	7,7
M_{37}	2,5	5	7,8	M_{77}	2,4	4,3	8
M_{38}	2	2,9	4	M_{78}	2,6	4,8	8,1
M_{39}	-	1	2	M_{79}	2	2,5	3,1
M_{40}	1,7	3,2	4,2	M_{80}	1,9	3	5,1

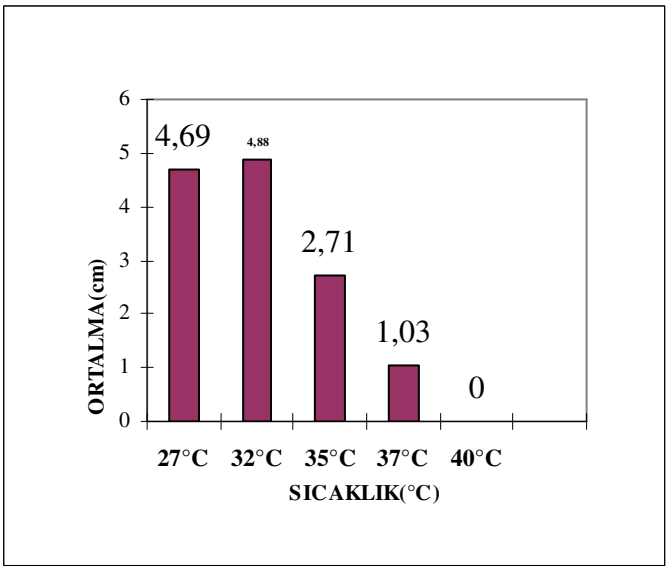
Çizelge 11. 37ºC sıcaklıkta Monokaryonların Misel Gelişimin Hızlarına (Çaplarının ölçülmesiyle) ait bulguların çizelgesi (cm).

	2.GÜN	4.GÜN	6.GÜN		2.GÜN	4.GÜN	6.GÜN
M_1	1,2	3	4,3	M_{41}	-	-	-
M_2	1,3	2	2	M_{42}	2,3	2,7	4
M_3	-	-	-	M_{43}	2,5	3	5,3
M_4	0,9	0,9	0,9	M_{44}	-	-	-
M_5	-	-	-	M_{45}	-	-	-
M_6	1	1	1	M_{46}	-	-	-
M_7	0,8	1	2	M_{47}	-	-	-
M_8	0,9	0,9	0,9	M_{48}	-	-	-
M_9	-	-	-	M_{49}	-	-	-
M_{10}	-	-	-	M_{50}	-	-	-
M_{11}	-	-	-	M_{51}	0,9	0,9	0,9
M_{12}	0,9	0,9	0,9	M_{52}	1	1	1
M_{13}	1	1	1	M_{53}	1	1	1
M_{14}	-	-	-	M_{54}	1	1,1	1,3
M_{15}	1	1,3	2,5	M_{55}	1,3	1,5	1,8
M_{16}	1,3	1,3	1,3	M_{56}	1,9	3,2	6,1
M_{17}	-	-	-	M_{57}	1	1	1
M_{18}	1	3	4	M_{58}	1,5	2,3	4,1
M_{19}	-	-	-	M_{59}	1	1	1
M_{20}	-	-	-	M_{60}	1,2	1,4	1,5
M_{21}	2	3	4,3	M_{61}	-	-	-
M_{22}	-	-	-	M_{62}	1	1,2	1,2
M_{23}	-	-	-	M_{63}	1,2	1,5	1,9
M_{24}	-	-	-	M_{64}	1,3	2	2,7
M_{25}	1	1	1	M_{65}	1	1	1
M_{26}	-	-	-	M_{66}	1,2	1,4	3
M_{27}	-	-	-	M_{67}	1	1,5	4
M_{28}	-	-	-	M_{68}	1,7	2	2,5
M_{29}	-	-	-	M_{69}	1	1,2	1,3
M_{30}	2	2,7	3	M_{70}	0,9	1	1
M_{31}	1	3	4,9	M_{71}	1,2	2,5	2,8
M_{32}	-	-	-	M_{72}	-	-	-
M_{33}	-	-	-	M_{73}	-	-	-
M_{34}	-	-	-	M_{74}	2	2,6	3,5
M_{35}	1,2	1,5	1,5	M_{75}	2,1	3,3	3,9
M_{36}	-	-	-	M_{76}	1,1	1,7	2,4
M_{37}	2	4,1	7,3	M_{77}	2	3,1	3,8
M_{38}	1	1	1	M_{78}	2	3,1	4,8
M_{39}	-	-	-	M_{79}	-	-	-
M_{40}	-	-	-	M_{80}	1	1,5	2

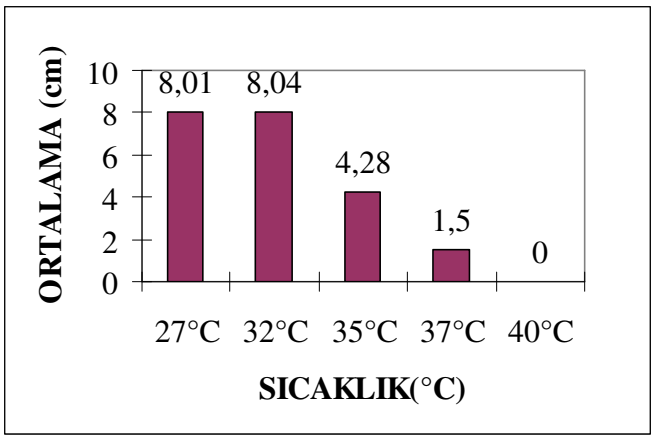
Çizelge 12. 2. Gün Misel Gelişim Hızlarına Ait bulguların Çizelgesi.



Çizelge 13. 4.Gün Misel Gelişim Hızlarına Ait Bulguların Çizelgesi

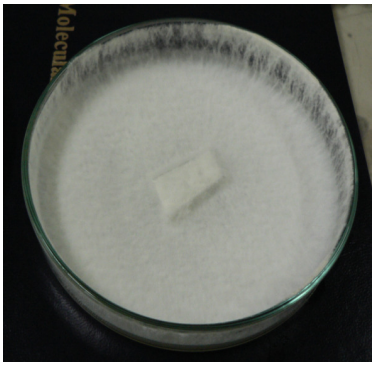


Çizelge 13. 6. Gün Misel Gelişim Hızlarına Ait bulguların Çizelgesi

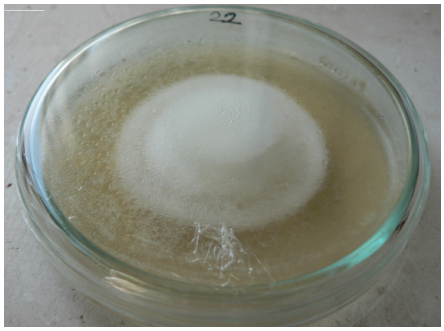




Şekil 13. 27ºC Sıcaklıkta Monokaryon Miselin 6.Günde petride gösterdiği gelişim



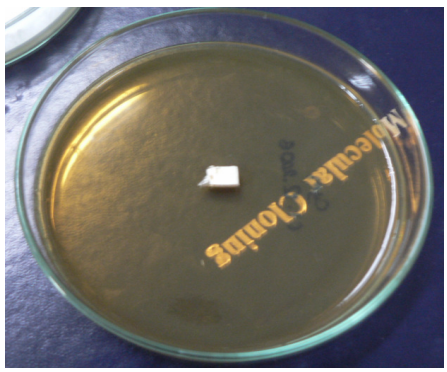
Şekil 14. 32ºC Sıcaklıkta Monokaryon Miselin 6.Günde petride gösterdiği gelişim



Şekil 15. 35ºC Sıcaklıkta Monokaryon Miselin 6.Günde petride gösterdiği gelişim



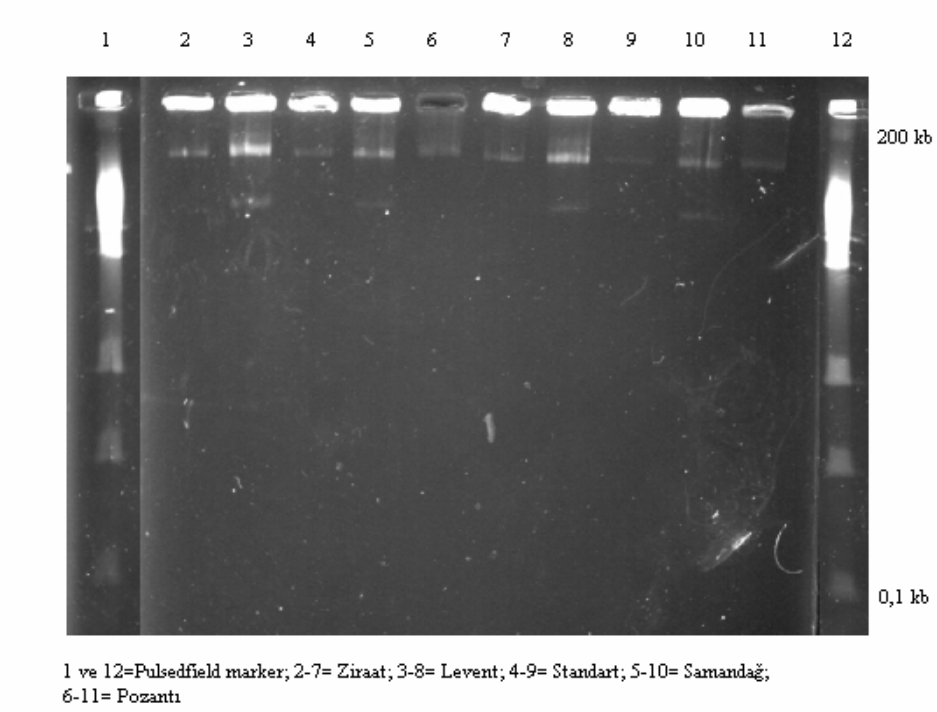
Şekil 16.37ºC Sıcaklıkta Monokaryon Miselin 6.Güdeki petride gösterdiği gelişim



Şekil 17.40ºC Sıcaklıkta Monokaryon Miselin 6.Günde petride gösterdiği gelişim.

4.2. PFGE'ne Ait Bulgular

Elimizdeki izolatların PFGE tekniğiyle vermiş olduğu DNA kalıpları, 0.1-200 kb'lık PFGE markeri ile karşılaştırıldığında, protoplastlardan serbest kalan kromozomların gerçektende hiç bozulmadan yapılarını koruyarak jelde hareket ettiklerini fakat boyutlarının çok büyük olması sebebiyle elimizdeki marker yardımıyla boyutlandırılamayacak şekilde henüz başlangıç noktasında kaldıkları anlaşılmaktadır.



Şekil 18. PFGE *Ganoderma lucidum* Türkiye İzolatlarının Separasyonu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ganoderma lucidum binlerce yıldır tıbbi olarak kullanılan bir Basidiomycetes mantardır ve onun meyvaleri, yüzyıllardır Doğu Asyada, halk arasında kanser, hipertansiyon, hepatit, nefrit, bronşit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Mizuno ve ark., 1995). Sağlık üzerine etkileri hakkında birçok çalışma yapılmasına rağmen genetiği konusunda çok az çalışma vardır (Sun ve ark., 2001).

Ganoderma lucidum'un tıbbi bir mantar olması, ekonomiyede katkı sağlamaktadır. Bu nedenle meyvalarının kalitesini artırmak ve çok fazla ürün elde edebilmek için bilimsel alanda çalışılmıştır (Stamets ve Chilton1983; Leonard ve Volk, 1992; Kozak ve Krawczyk 1993, Stamets, 1993)

Doğal ortamlarda çimlenmesi nadir olan *Ganoderma lucidum*'un sporlarının, laboratuar koşullarında çimlendirilerek istenilen özelliklere sahip ve kaliteli meyva elde edebilmek için, sporların çimlenmesini etkileyen faktörler, çimlenme için gereken optimum koşullar (nem, O_2, CO_2 düzeyi ve sıcaklık gibi) konusunda araştırmalar yapılmıştır (Lin ve ark., 2000).

Ganoderma lucidum'un sporlarının çimlendirilerek veya meyvalerinden doku kültürü tekniği ile üretilen misellerden ,dedikarytizasyon işlemleriyle elde edilen monokaryonların uyumlu olanlarının eşleştirilmesi yoluyla sağlanan dikaryon kültürler meyva üretimi için kullanılmıştır (Eger ve ark., 1981).

Monokaryotik suşlar özellikle yeni genlerin identifikasyonuyla alakalı genetik analizleri kolaylaştırmaktadır (Tello ve ark., 2001). Buna ek olarak monokaryonlar protoplast füzyonunda oldukça önemlidir (Dhitaphichit ve Chaninan, 2005).Genetiksel olarak araştırılması yapılmış olan monokaryonların seçilerek kullanılması üretim başarısını ve meyva verimini son derece artırmaktadır. Monokaryonların yada tek bir sporun yüksek sıcaklığa dayanıklı olmasının temelinde enzimler yatmaktadır. Bir spor yüksek sıcaklığa dayanıklı değilse genlerden kaynaklı letal faktörler devreye girerek spor çimlenemez veya büyüme belli bir noktada durur. Ancak yüksek sıcaklığa dayanıklı olan monokaryonlarda bu letal faktörlerin önüne geçilmiş olur. 2 uyumlu monokaryotik kültürün yüksek sıcaklık toleransları olduğunda, bunlardan elde edilecek dikaryotik hibriblerin

büyük çoğunluğu yüksek sıcaklığa dayanıklı olmaktadır. Kültürlerin biri yüksek sıcaklığa hassassa meydana gelecek dikaryotik hibridler farklı davranışlar göstermektedir (Chang ve Miles, 2004).

Yapmış olduğumuz çalışmada *Ganoderma lucidum*'un sporlarından elde etmiş olduğumuz monokaryonların 27°C ve 32°C'lerde optimum geliştiği, 35°C, 37°C sıcaklıklarda geliştiği ancak, gelişmenin giderek yavaşladığı ve 40°C sıcaklıkta artık monokaryon misellerin hiç gelişmediği görülmüştür.

Ganoderma lucidum'un sporlarının çimlenebilmesi amacıyla kullanılan proseslerde, sulandırıldıktan sonra besiyerine aktarılan sporların ortam sıcaklığı 18°C-48°C sıcaklığa ayarlanmış, ancak tercih edilen optimum sıcaklığın 25°C-35°C sıcaklıklar arasında olduğu bulunmuştur (Liu ve Chung, 2000). Yapılan bu araştırma, yapmış olduğumuz çalışmayı desteklemektedir.

Ganoderma lucidum'un yetiştirilmesi konusunda yapılan bir çalışmada Ganoderma lucidum'un misellerinin 10°C-38°C sıcaklıklar arasında geliştiği ancak, 25°C ve 32°C sıcaklıklar arasındaki inkübasyon sıcaklıklarında optimum gelişme göstermesi (Lee, 2000), *Ganoderma lucidum*'un meyvaleri ile yapılan bir çalışmada, misellerin optimum gelişimi için 25-35°C' lerin tercih edilmiş olması (Wada ve ark., 1984) yapmış olduğumuz çalışmayı doğrulamaktadır. Bu çalışmalara ek olarak, Sukarno ve arkadaşlarının, *Ganoderma lucidum*'u, yumuşak ve sert tahtalı odunlarda yetiştirerek içerdiği maddelerin miktarında meydana gelen farklılıklar konusunda yapmış oldukları çalışmada, besiyerindeki misellerin inkübasyonu için 28°C uygulanması (Sukarno ve ark., 2004), Ganoderma türlerinde sentetik boya giderimi ile yapılan çalışmalarda misellerin gelişmesi için 28°C (±4°C) sıcaklık kullanılması (Revankar ve Lee, 2006), Eger ve arkadaşlarının (1981), içinde *Ganoderma lucidum*'unda bulunduğu Basidiomycetes mantarların sporlarından ve meyvalerinden sağlanan miselleri dedikaryotize ederek, elde edilen monokaryonlar için inkübasyon sıcaklığını 28°C olarak uygulamaları yapmış olduğumuz bulguları desteklemektedir.*Ganoderma lucidum*'un tümör hücrelerini inhibe etmesi konusunda yapılmış bir araştırmada sporları çimlendirerek elde ettikleri miseller için kültür koşulu olarak 37°C uygulanmıştır (Xi ve ark.,).

Elimizdeki izolatların PFGE tekniğiyle vermiş olduğu DNA kalıpları, 0.1-200 kb'lık PFGE markeri ile karşılaştırıldığında, protoplastlardan serbest kalan kromozomların gerçektende hiç bozulmadan yapılarını koruyarak jelde hareket ettiklerini fakat boyutlarının çok büyük olması sebebiyle elimizdeki marker yardımıyla boyutlandırılamayacak şekilde henüz başlangıç noktasında kaldıkları anlaşılmaktadır. Beklenildiği gibi PFGE uygulamalarında farklı boyutlardaki moleküllerin farklı elektriksel alan güçleriyle farklı switch time aralıklarında separe edilebilmeleri mümkündür. Literatürde de ganoderma lucidumun gerçek kromozom sayısı ve genom büyüklüğü konusunda henüz kesin sonuç bulunmamaktadır. Bu konunun daha ileri düzeyle araştırılması gerekmektedir.

6. ÖNERİLER

Monokaryonlar, arzu edilen nitelikte meyva üretimi sağlayabilmek amacıyla yeni genetik kombinasyonların ortaya çıkarılması bakımından çok önemlidir.. Monokaryonların elde edilmeleri için dedikaryotizasyon, yüksek stresli besiyerinde üretim ve sporların tek düşürülüp çimlendirilmesi teknikleri kullanılır (Lara ve Hummel, 1982).

Dikaryonlar farklı iki tip nükleus içeren hiflerin oluşturduğu miseldir. Mekanik parçalanmalarla yapılan dedikaryotizasyon işleminde parçalanma sırasında şayet iki nükleus birbirinden ayrılacak şekilde hif parçalanır ve tek tip nükleus taşıyacak şekilde rejenere olursa monokaryon elde edilir. Dedikaryotizasyon işlemleri çok ustalaşmış personel ve son derece aseptik çalışma ortamı gerektirdiğinden uygulanmaları güçtür ve sadece iki monokaryon elde etmemize olanak verir.. Oysaki mantarın üretmiş olduğu milyarlarca spordan bir miktar alıp, monokaryon elde etmek daha kolay olduğu gibi istenilen miktarlarda farklı genotip taşıyan monokaryon misel elde edilebilir. Bu yüzden önemli olan, sporları çimlendirmenin yollarıdır. Yaptığımız çalışmada, sporların klasik doku kültürü metodlarında olduğu gibi, hipoklorit ile steril edilip besiyerine ekilmesinin yoğun kontaminant çeşitliliği sebebiyle pek başarılı olmadığı görülmüştür. Özellikle bakteriyel kontaminasyonundan çok küf mantarı kontaminasyonu problem yaratmaktadır.

Daha önceki araştırmalarda Ganoderma licudum sporlarının çimlenme frekanslarının %3 -15 oranında olduğu, çimlenmenin biotin, monobazik potasyum fosfat ve magnezyum sülfat gibi bileşiklerin bulunduğu zenginleştirilmiş besi yerinde daha başarılı olduğu vurgulanmaktadır (Liu ve ark., 2001).

Agaricus ve Volvariella türleri ile yapılan bir çalışmalarda spor ekilmiş besiyerine, bir parça kendilerine ait yapılardan konduğu zaman sporlar çimlenmiştir (Chiu ve Chang, 1987). Bu yöntemi Ganoderma lucidum'un sporlarına uyguladığımızda, misel çevresinde bulunan sporlar, 8 saat içerisinde çimlenmiştir. Ancak 24 saat sonra, miselin büyümesi ve sporlara karışmasından dolayı sporlar tek olarak izole edilememiştir.

3 gün steril su içerisinde bekletildikten sonra Ganoderma sporlarının, antibiyotikli besiyerine, sulandırılarak ekilmesi durumunda bütün sporların çimlendiği gözlenmiştir.

DNA isolasyonunda değişik metodlar kullanılsa da önemli olan DNA'nın protein ve benzeri kontaminantlardan en üst düzeyde temizlenmiş olmasıdır. Bütün izolasyon metodlarında; önce hifin veya hücrenin mekanik parçalanması, daha sonra lysis işlemi ve DNA'nın protein, lipid ve karbonhidrat gibi kontaminant bileşiklerden kurtarılması (Aygan, 2005) ve son olarak da DNA'nın çöktürülmesi aşamaları gerçekleştirilmektedir. Literatürde hemen heryerde, birbirine çok benzer işlemler dizisi şeklinde gerçekleştirilen genomik DNA izolasyonu çalışmalarına rastlanmaktadır. Ancak maalesef bu bilgilerin hemen tamamı sadece PCR teknolojisi kullanma olasılığı varsa işe yarar durumdadır. Nativ DNA elde etmeye yeterli değildirler çünkü söz konusu genomik DNA izolasyon tekniklerinde, fiziksel kırılmalar, DNA molekülünde kopma ve kayıplara yol açmaktadır. Bu durum, özellikle enzimatik işleme sokulacak DNA moleküllerinde yanlış sonuçlara ve çeşitli problemlere yol açmaktadır.

Protoplast haline getirilmiş örneklerde ise, uygun oranlarda agaroz ile bloklandıktan sonra, lysis ve separasyon işlemlerinin hiçbir tuz kirliliğine yol açmaksızın, DNA moleküllerinin doğal yapı ve durumlarında hiçbir değişiklik oluşturmadan her türlü işlemin sağlıklı ve güvenilir şekilde yürütüleceği açıktır. Çalışmamızda yukarıdaki olumlu özellikleri sebebiyle protoplast izolasyonu ve agaroz blok tekniği tercih edilmiştir.

KAYNAKLAR

ADASKAVEG., J. E., and R. L. GILBERTSON, 1987. Infection and colonization of grapevines by *Ganoderma lucidum*. Plant Dis. 71, 251-253.

AHMAD, S.S. and MILES, P.G., 1970. Hyphal fusions in the wood-rotting fungus *Schizophyllum commune*. The effects of incompatibility factors. Genetical Research, Cambridge 15**,** 19-28.

ARYANTHA, N.P., ADINDA, A., KUSMANINGATI, S., 2002.Occurance of Triterpenoids and Polysaccharıdes on *Gaoderma tropicum* with *Ganoderma lucidum* as Refference. Australasian Mycologist 20(3): 123-129.

AYGAN, A., 2006. Nucleic Acid Extraction from Clinical Specimens for PCR Aplications. Turk J. Biol. 107-120.

BABASAKI, K., MASUNO, K. and MURATA, H., 2002. Interactions of Heterologous Mycelia Colonized in the Substrate Govern Fruit Body Production in the Cultivated Homobasidiomycete *Pholiota nameko*. Mycologia 70, 100-120.

BENJAMIN, R.F, PETER, L.G, BRUCE, A., 1991. Metal and their compounds in the environmental (Weinheim, Newyork).

BIO-RAD, 1992. CHEF-DER II Pulsed Field Electrophoresis Systems. Instruction Manual and Applications Guide. 11-15.

BIRREN, B.W., LAI, E., CLARCK, S. M., HOOD, L. and SIMON , M.I., 1988. Optimized Conditions for Pulsed Field Gel Electrophoretic Separations of DNA. Nucleic Acids Res., 16, 7563-7582.

BENSAUDE, M., 1918.Recherches sur le cycle evolutif et la sexualite chez les Basidiomycetes, Ph. D. thesis, University of Paris, Published Nemours, France.

BURDSALL, H. H., BANIK, M. and COOKE, M.E., 1990. Serological Differention of Three Species of ,millaria and *Lentinula edodes* by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Immunized Chickens as a Source of Antibodies. Mycologia 82, 415-423.

CARLE, G. F., FRANK, M. and OLSON, M. V., 1986. Electrophoretic Separations of Large DNA Molecules by Periodic Inversion of the Electric Field. Science, 232, 65-68.

CASTLE, A.J., HORGEN, P.A. and ANDERSON, J. B., 1987. Restriction Fragment Length Polimorphisms in the Mushrooms *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*. Applied and Environmental Microbiology, 816-822.

CHANG, S.T., 1999a.Gobal of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolation, Int.J.Med.Mushrooms,1, 1-7.

CHANG, S.T. and BUSWELL, J.A., 1999b. *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P.Karst. (Aphyophoromycetideae)-a ushrooming medicinal mushroom, Int.J.Med.Mushrooms, 1, 139-146.

CHANG, S.T. and MILES, P.G., 2004.Mushrooms. CRC Pres. Boca Raton London Newyork Washington, D.C.CHEN, A. W.

CHEN, A. W., 1999.Cultivation of the Medicinal Mushroom Ganoderma lucidum (curt:fr.) P. Karst. (reishi) in North America. Int. J. Med. Mushrooms, 1, 207-215.

CHEN, R.Y. and YU, D.Q ., 1991. Studies on the Triterpenoid Constituents of the Spores from *Ganoderma lucidum*, Acta Pharm.Sin. 26,267-273.

CHEN, R.Y. and YU, D.Q., 1999. Studies on the Triterpeneoid Constituents of the Spores of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr)P.Karst., Int. J. Med: Mushrooms, 1, 147-152.

.CHEN, W.C., HAU, D.M., WANG, C.C., LIN, I.H., and LEE, S.S., 1995. Effects of *Ganoderma lucidum* and Krestin on subset T-cell in Spleen of Gamma-Irradiated Mice, Am.J.Chin.Med., 23, 289-298.

CHIU, S.W. and CHANG, S.T., 1987. The activation of Spore Germination in *Volvariella bombycina*. Mushroom Journal of the Tropics **7,** 61-66.

CHIU, S.W, KWAN, H. S, CHENG, S.C., 1993. Aplication of Arbitrarily-Primed Polymerase Chain Reaction in Molecular Studies of Mushroom Species With Emphasis on Lentinula edodes. Genetics and Breeding of Edible Mushrooms 13, 265-266.

CHU, G., VOLLRATH, D. and DAVIS, R. V., 1986. Separation of Large DNA Molecules by Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields. Science 234, 1582-1585.

DHITAPHICTIC, P., and PORNSURIYA, C., 2005. Protoplast Fusion Between *Pleurotus ostreatus* and *P. Djamor*. Songklanakarin J. Sci. Technol., 27(5), 975-982. Songklanakarin J. Sci. Technol, 27(5):975-982

EGER, G. and LARA, L. H., 1981. Process for Preparing Monokaryons by Dedikaryotizing Dikaryotic Strains of Basidiomycetes. Planta Med., 86, 861-868.

EL-MEKKAWY,S., MESELLHY,M.R., NAKAMURA,N., TESUKA, Y., HATTORI, M., KAKIUCHI, N., SHIMOTOHNO, K., KAWAHATA, T., and OTAKE, T., 1998. Anti-HIV and anti-HIV-Protease Substances from *Ganoderma lucidum*, Phytochemistry, 49,1651-1657.

EO, S. K., KIM, Y. S., LEE, C. K. and HAN, S. S., 1999. Antiviral Activities of Various Water and Methanol Soluble Substances Isolated from *Ganoderma lucidu*m. Journal of Ethnopharmocology Vol:68, pp. 129-136.

FRIES, N., 1966. Chemicial Factors in the Germination spores of Basidiomycetes. In the Fungal Spore, pp. 189-200. Edited by M. F. Madelin. London: Butterworths.

FRUSAWA,E., CHOU, S.C, FRUSAWA, S., HİRAZUMİ, A., and DANG, Y., 1992. Antitumour activity of *Ganoderma lucidum* an Edible Mushroom, on Intraperitoneal Lyimplanted Lewis Lung Carcinoma in Synergenic Mice. Phytoher.Res., 6, 300-304.

GLEN, M., TOMMERUP, I. C., BOUGHER, N. L. and O´BRIEN, P. A., 2000. Specifity, Sensitivity and Discrimination of Primers for PCR-RFLP of Larger Basidiomycetes and Their Applicability to Identification of Ectomycorrhizal Fungi in Eucalyptus Forests and Plantations.

GOODMAN, S., 1988. Therapeutis Effects of Organic Germanium, Med Hypotetheses.

GURRIERI, S., SMITH, S. B., WELLS, S. K., JOHNSON, I. D. and BUSTAMANCE, C., 1996. Real Time Imagıng of the Reorientation Mechanisms of Yoyo-Labelled DNA Molecules During 90ºC and 120°C Pulsed Field Gel Electrophoresis. Nucleic Acids Res., 24, 4759-4767.

HA, T.B., GERHAUSER, C., ZHANG, W.D., HO-CHONG-LINE, N., and FOURASTE, I. 2000. New Lanostanoids from *Ganoderma lucidum* that Induce NAD(P) H: Guinone Oxidoreductase in Cultured Hepatic 7-Murine Hepatoma Cells, Planta Med., 66,681-684.

HASEBE, K., TOKIMOTO, K. and KOMATSU, M., 1982. Dwarf Mutant of *Lentinus Edodes* (Berk) Sing. Reports of the Tottori Mycological Institute 20, 113-116.

HASEBE, K., MURAKAMI, S. and KOMATSU, M., 1987. Genetic Analysis of Some Morfological Mutations in Homokaryotic Mycelia of *Lentinus edodes*. Reports of the Tottori Mycological Institute 25, 56-61.

HASEBE, K., MURAKAMI, S. and TSUNEDA, A. 1991. Cytology and Genetics of a Sporeless Mutant of *Lentinus edodes*. Mycologia 83, 354-359.

HATTORI. M., EL-MEKKAWY, S., and MESELLHY, R., 1997. Inhibitory Effects of Components from *Ganoderma lucidum* on the Growth of Human Immunodeficiency Virus (HİV) and the Protease Activity ,In Proceedings of the lst International Symposium on *Ganoderma lucidum* in Japan, MIZUNO T., IDE, N.,and HASEGAWA, Y., Eds., 128-135.

HE, Y.Q. AND LI. R.Z., 1989. Studies of Active Polysaccharides of *Ganoderma lucidum* . J. Beijing med . Univ ., 21, 225-227.

HIKINO. H., KONNO,C., MIRIN, Y., and HAYASHI, T., 1985. Isolation and Hypoglycaemic Activity of *Ganoderma* A and B, Glycans of Ganoderma *lucidum* Fruit Bodies, Planta Med, 4, 339-340.

HIKINO, H., ISHIYAMA, M., SUZIKI, Y. and KONNO, C., 1989. Mechanisms of Hypogllycemic Activity of Ganoderans B: a Glycan of Ganoderma lucidum Fruit Bodies, Planta Med 55, pp. 423-428.

HIROTANI, M., INO. C., FYRUYA, T., and SHIRO, M. 1986. Ganoderic acids T, S, and R, new Triterpenoids from the Cultured Mycelia of *Ganoderma lucidum* , Chem. Pharm. Bull., 34, 2282-2285.

HUNG, Z., 1996. Artificial Cultivation of *Ganoderma lucidum* (in Chinese), in Modern Research on *Ganoderma lucidum* (in Chinese), Lin, Z. B., Bejing Medical Universty Pres, Bejing, China.

HSEU, R. S., WANG, H. H., WANG, H. F. and MONCALVO, C. M., 1996. Differantion and Grouping of Isoletes of the *Ganoderma lucidum* Complex by Random Amplified Polymorphic DNA-PCR Compared on the Basis of Internal Transcribed Spacer Sequences. Applied and Enviromental Microbiology, pp. 1354-1363.

HSU, Z. C., 1994. New Tecnology for Cultivation of *Ganoderma lucidum* (in Chinese), Chaoyang Edible Fungi Research Institute, Liaoning, China.

ITAVAARA, M., 1988. Identification of Shiitake Strains and Some other Basidiomycetes: Protein Profile, Esterase and Acide Phosphatase Zymograms as an Aid in Taxonomy. Transactions of British Mycologial Society 91, 295-304.

ITAVAARA, M., 1990. Chacterization of a Shiitake Mutant Strain Producing Ballshaped Fruiting Bodies. Physiologia Plantarum 80, 36-42.

JANG, S. C. and BIRMINGHAM, J. M., 1992. Medicinal Benefits of the Mushroom *Ganoderma*, Adv. Appl. Microb. 37, 101-134.

KAWAMURA, N. and GOTO, M., 1980. Biochemical Chacterization of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*). Reports of the Tottori Mycological Institute 18, 217-224.

KIM, H.W., SHIM, M.J., and KIM, B.K. 2000. *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr) P.karst. (Aphyllophoromycetideae) inhibits proliferation of Human Peripheral Blood Lymphocytes by Blocking Interleukin-2 Secretion, İnt. J.Med.Mush., 2, 313-321.

KIM, H. W. And KIM, B. K., 2002. RECENT advances on the Biologicaly Active Triterpenoids of Ganoderma lucidum. In Ganoderma: Genetics, Chemistry, Pharmacology and Therepeutics, Lin, Z. B., Ed., Bejing Medical University Press Bejing, 10-19.

KIMURA, Y., OKUDA, H., and ARICHI, S. 1988. Effects of the Extracts of *Ganoderma lucidum* on Blood Glucose Level in Rats, Planta Med., 54, 290-294.

KINO, K., YAMASHITA, A., YAMAOKA, K., WATANABE, J., TANAKA, S., KO, K., SIHİMIZU, K. and TSUNOO, H., 1989.Isolation and Characterization of a new Immunomodulatory Protein, Ling Zhi-8 From *Ganoderma lucidum* , J. Biol.Chem., 264, 472-478.

KINUGAWA, K. 1993. Pysiology and the Breeding of Flammulina velutipes. 5: 100-102.

KO. J. L., HSU, C.I., LIN, R.H., KAO, J.L., and LIN, J.Y. 1995. A new Fungal Immunomodulatory Protein, FİP-fve Isolated from the Edible Mushroom, *Flammulina velutipes* and its Complete Amino Acid Sequence, Eur. J. Biochem., 228,244-249.

KUBATO, T., ASAWA, Y., MIURA, I. and morı, h., 1982. structures of Ganoderic Acid A and B, Two New Lanostane Type Bitter Triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst., Chim. Acta, 65, 611-619.

KWAN, H. S.,and XU, H. L., 2002. Construction of a Genetic Linkage Map of Shiitake Mushroom *Lentinula edodes* Strain L-54. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 35, No. 5, pp. 465-471.

LARA, L.H. and EGER, H. G., 1982. A Monokaryotization Method and its Us efor Genetic studies in Wood-Rooting Basidiomycetes. Theoretical and Applied Genetics. 61, 65-68.

LARARYA, L. M., PE´REZ, G., PENAS, M. M., BAAARS, J. J. P., MIKOSCH, T. S. P., PISABARRO, A. G. and RAMI´REZ, L., 1999. Molecular Karyotipe of White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Enviromental Microbiology, p. 3413-3417.

LARARYA, L. M., PE´REZ, G., IRIBARREN, I., BLANCO, J. A., ALFANSO, M., PISABARRO, A. G. and RAMI´REZ, L., 2001. Relationship Between Monokaryotic Growth Rate and Mating Type in the Edible Basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*.

LARARYA, L. M., IDARETA, E., ARANA, D., RITTER, E., PISABARRO, A. G. and RAMI´REZ, L., 2002. Quantitative Trait Loci Controlling Vegetative Growth Rate in the Edible Basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*.

LE, S.S., CHEN, F.D., CHANG, S.C., WEI, Y.H., LIU, I., CHEN, C.F., WEI, R.D., CHEN, K.Y., and HAN, P.W. 1984. In vivo Antitumor Effect of Crude Extracts from the Mycelium of Ganoderma lucidum, J.Chin.Oncol.Soc., 5,22-28.

LEE, S.S., WEİ, Y.H., CHEN, C.F., WANG, S.Y., and CHEN, K.Y. 1995.Antitumor Effects of *Ganoderma lucidum*., J.Chin. Med. 6,1-12.

LEE, S. Y., 1990. Cardiovascular effects of Mycelium Extract of *Ganoderma lucidum*: Inhibition of Sympathetic Outflow as a Mechanism of Its Hypotensive Action, Chem Pharm. Bull. Vol. 38, p. 1359-1364.

LEUNG, S. W. S., YEUNG, K. Y., RICKY, Y. L. S. and MAN, Y. K., 2002. Lngzhi (Ganoderma) Research-the Past, Present and Future Perspectives, in *Ganoderma*: Genetics, Chemistry, Pharmacology and Therapeutics, Lin, Z. B., ED., Bejing Medical Universty Press, Bejing, 1-9.

LIEU, C.W., LEE, S.S., and WANG, S.Y. 1992. The effect of *Ganoderma lucidum* on induction of Differentiation in Leukemic U937 cells,Anticancer Res., 12,1211-1215.

LIN, S. J. and HSIES, T. C., 1991. Application of API-ZYM Enzyme Testing System to Rapid Identification of Strains *Lentinus Edodes* (Berk.) Sing. Bulletin of the Taiwan Forest Research Intitute, New Series 6, 21-26.

LIN, Z.B., 1996. Physiological Effects of *Ganoderma lucidum*., in Modern Research on *Ganoderma lucidum* [in Chinese], LİN, Z.B., ED., Beijing Medical University, Beijing,China, 148-177.

LIN, Z.B. and ZHANG, H. N., 2004. Anti-Tumor and Immunoregulatory Activities of *Ganoderma lucidum* and Possible Mechanisms. Acta Pharmacol 25 (11): 1387-1395.

LIN, W.H., HUNG, C.H., HSU, C.I.,and LIN, J.Y. 1997. Dimerization of the N-terminal Amphipathic β-helix domain of the Fungal Immunomodulatory Protein from *Ganoderma tisugae* (FİP-gts) Defined by a Yeast Two-Hybird System and Site-Directed Mutagenesis, J. Biol.Chem., 272, 20244-20048.

LINDEQUIST,U. 1995. Structure and Biological Activity of Triterpenes Polysaccharides and other Constituents of *Ganoderma lucidum* , in Recent Advances in *Ganoderma lucidum* Research, KİM, B.K., KİM, İ.H., and KİM, Y.S., Eds., Pharmaceutical Society of Korea, Seul, 61-91.

LIU, X. and KEUNG, C. C., 2000. Germination activated Red *Ganoderma lucidum* Spores and Method for Producing the same. J.Chin.Oncol.Soc., 9,32-45.

MAHMOOD, T., 1971 *Ganoderma lucidum*: a Virulent Incitant of Basal Stem Rot, a Malady of Hard Woods in West Pakistan. Plant Dis. Rep. 55: 1130-1131.

MA, J., YE, Q., HUA, Y., ZHANG, D., COOPER, R., CHANG, M. N., CHANG, J.Y., and SUN, H.H., 2002. New Lanostanoidsfrom the Mushroom *Ganoderma lucidum* , J. Nat.Prod., 65, 72-75.

MAYZUMI, F., OKAMOTO, H. and MIZUNO, T., 1997. Cultivation of Reishi (*Ganoderma lucidum*), Food Rev. Int., 13, 365-382.

MEKKAWY, S., 1998 Anti HIV-1 and Anti-HIV-A-Protease Substances from Ganoderma lucidum; Phytochemistry, vol. 49(6), p. 1651-1657.

MILLER, R. N. G., HOLDERNESS, M., BRIDGE, P. D. , PATERSON, R. R. M., SARIAH, M., HUSSIN, M.Z. and HILSLEY, E. J., 1995. A Multi-Disciplinary Approach to the Characterization of *Ganoderma* in oil-palm cropping systems, p. 57-66. In P. K. Buchanan, R. S. Hseu, and J. M. Moncalvo (ed.), Ganoderma systematics, phytopathology and pharmacology. Proceedings of Contributed Symposium 59A,B, 5th International Mycological Congress, August 14-21, 1994, Vancouver, Canada.

MILES, P. G. (1993). Biological Background for mushroom Breeding. 3:40-41.

MIN, C.N., NAKAMURA, N., MIYASHIRO, H., BAE, K.W., and HATTORI, M. 1998. Triterpenes from the Spores of Ganoderma lucidum and Their Inhibitory Activity Againts HİV-1 Protease, Chem. Pharm. Bull., 46, 1607-1612.

MIZUNO, T., WANG, G.Y., ZHANG, J., KAWAGIHI, H., NISHITOBA, T., and Lİ, J.X. 1995. Reishi, Ganoderma lucidum and Ganoderma tsugae: Bioactive Substances and Medicinal effects, Food Rev.Int., 11, 151-166.

OOI, L.S.M., OOI, V.E.C., and FUNG, M.C. 2002. Induction of Gene Expression of Immunomodulatory Cytokines in the Mouse by a Polysaccharide from Ganoderma lucidum (Curt.:Fr) P. Karst (Apyllophoromycetideae),Int. J. Med. Mush., 4, 27-35.

MURAKAMI, S., HASEBE, K. and TSUNEDA, A., 1987. A Mutant of Lentinus edodes Forming Aberrant Clamp Connections. Reports of the Tottori Mycological Institute 25, 49-55.

OHMASA, M. and FURUKAWA, H., 1986. Analysis of Esterase and Malate Dehydrogenase Isozymes of Lentinus edodes by Isoelektring focusing for the Identification and discrimination of Stocks.Transactions of the Mycological Society (Japan) 27, 79-80.

PILOTTI C. A., SANDERSON F. R. and AITKEN, E. A. B. RAPER, C.2002. Sexuality and interactions of monokaryotic and dikaryotic mycelia of Ganoderma boninense. Mycological Research ,106: 1315-1322 Cambridge University Pres.

RAPER, J., and MILLER, R. 1972.Genetic analysis of the life cycle of agaricus bisporus. Mycologia 64**,** 1088-1117.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. and MANNIATIS, T., 1989. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. United States of America.

STEYAERT, R. L. 1967. Les Ganoderma palmicoles. Bull. Jard. Bot. Natl. Belg. 37:465-492.

SHAW, W.L. and MILES, P.G. (1970). Inhibition of the devolopment of Schizophyllum commune germlings by the ammonium ion. Plant and Cell Physiology 11,487-497.

SCHWARTZ, D. C. and CANTOR, C. R. (1984). Separation of Yeast Artificial Chromosome-Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. Cell, 37, 67-75.

STAMETS, P., 2000. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms, 3RD ED., Ten Speed Press, Berkely, C. A., 352-366.

TSENG, T.C., SHIAO, M.S. SHIEH, Y.S. and HAO, Y.Y, 1984. Study on *Ganoderma lucidium* 1.Liquid culture and chemical composition of mycelium, Bot Bull Acad Sin 25, pp.149-157.

TELLO, M., SEELENFREUND, D., LOBOS, S.,GASKELL, J.,CULLEN, D.,VICUNA, R. 2001. Isolation and Characterization of Homokaryotic Strains from the ligninolytic Basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. FEMS Microbiology Letters 199; 91-96.

TURNER, P.D. 1965. Infectıon of oil palms by *Ganoderma.* Phytopathology 55:937. VOORHESS, D.A. and PETERSON, J.L. (1986). Hypha-spore attractions in Schizophyllum commune Fr. Wentina 13, 1-113.

WASSON, R. G. 1968. Soma-Divine Mushroom of Immortality, Harcourt, Brace & World, Newyork, 381.

SONE, Y., R. OKUDA, N. WADA, E. KISHIDA and A. MISAKI., Structure and antitumor activities of the polysaccaharide isoleted from fruting body and the growing culture of mycelium of Ganoderma lucidum,Agric Biol Chem.

REVENKAR, M. S., and LELE, S. S., 2006. Synthetic Dye Decolarization by White Rot Fungus, Ganoderma Sp. WR-1. Bioresource Technology, Volume 98, Pages 775-780.

SEO, G.S. 1987 Studies on cultural characteristics of Ganoderma lucidum (Fr.) Karst. MSc Thesis (in Korean).

SU, C.Y., SHİAO, M.S., and WANG, C.T. 1999. Predominant Inhibition of Ganodermic acid S on the Thromboxane A2- Dependent Pathway in Human Platelets Response to Collagen, Biochim, Biophys. Acta. 1437, 223-234.

SUKARNO, N., AINI, S. V., ROHAETI. and DARUSMAN, L. K., 2004. Devolopment of ganoderma lucidum on Soft and Hard Wood Logs and Determination of Organic Germanium and Ganoderic acid Content of the fruiting Body Produced. www.mushworld.com

WANG, C.N., CHEN, J.C., SHİAO, M.S., and WANG, C.T. 1997. The inhibition of Human platelet by Ganodermic acids, Biochem. J.,277, 189-197.

WANG, S.Y., HSU, M.L., HSU, H.C., TSENG, C.H., LEE, S.S., SHIAO, M.S., and HO, C.K. 1997. The Anti-Tumor Effect of Ganoderma lucidum is Mediated by Cytokines Released from Activated Macrophages and T lymphocytes ,Int. J. Cancer, 70, 669-705.

WASSON, R. G., 1968. Soma-Divine Mushroom of Immortality, Harcourt, Brace & World, New York, 381.

YANG, B.K., JEONG, S.C., PARK, J.B., CHO, S.P., LEE, H.J., DAS, S., YUN, J.W., LİM, W.J., and SONG, C.H. 2001. Swimming Endurance Capacity of Mice after Administration of Exo-Polymer Produced from Submerged Mycelial Culture of Ganoderma lucidum, J.Microbiol. Biotechnol. 11, 902-905.

YOSHIKUMU, C., OMURA, Y.,WADA, T., MAKITA, H., ANDO, T. (1979). Method of Producing a Stable Monokaryotic Mycelium of Coriolus versicolor and Its Use İn Polysaccharide Production.

WILLIAMS, E. N. D., TODD, N.K. and RAYNER, A.D.M. 1981.Spatial Development of Populations of Coriolus versicolor.

VAN DER HEUN, L.G., VAN DER VLEIT, J.A., BOCKEN, C.F.M., KINO, K., HOİSTMAN, A.J., and TAX, W.J.M. 1995. Lingh zhi-8: studies of a New Immunomodulatary Agent, Transplantation, 60, 438-443.

ZHU, S.N., and MORI, M. 1993. The Research on Ganoderma lucidum (Part one), Shanghai Medical University Pres, Shaghai, 346.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Hatayın İskenderun ilçesinde doğdum ilk ve orta öğrenimimi İskenderun'da tamamladıktan sonra 2001 yılnda Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü Kazandım. 2004 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ç.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisansa başladım.