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

TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN *MELANOLEUCA* PAT. CİNSİNE AİT BAZI TÜRLERİN FİLOGENETİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ayşenur KALMER
DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Ayten DİZKIRICI TEKPINAR

VAN-2017

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

TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN *MELANOLEUCA* PAT. CİNSİNE AİT BAZI TÜRLERİN FİLOGENETİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ayşenur KALMER

Bu çalışma VAN YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından FYP-2017-5560 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yrd. Doç. Dr. Ayten DİZKIRICI TEKPINAR danışmanlığında, Ayşenur KALMER tarafından sunulan "**Türkiye'de Yayılış Gösteren *Melanoleuca* Pat. Cinsine Ait Bazı Türlerin Filogenetik Analizi**" isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 20/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Yusuf UZUN

Üye: Yrd. Doç. Dr. Mehmet Emre EREZ

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ayten DİZKIRICI TEKPINAR

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 25/07/2017 tarih ve 2017/36-I sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Yrd. Doç. Dr. Ayhan BAŞTÜRK
Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdür ~~Yardımcısı~~ V.

TEZ BİLDİRİMİ

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

Ayşenur KALMER

ÖZET

TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN *MELANOLEUCA* PAT. CİNSİNE AİT BAZI TÜRLERİN FİLOGENETİK ANALİZİ

KALMER, Ayşenur
Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ayten DİZKIRICI TEKPINAR
Temmuz 2017, 44 sayfa

Melanoleuca Pat. cinsi *Tricholomataceae* familyasında sınıflandırılan ve birkaç yenilebilen türüyle dünya çapında dağılım gösteren bir makrofungustur. Bu cinse ait bazı türlerin taksonomik ve evrimsel ilişkileri moleküler teknikler kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan *Melanoleuca* türlerine ait örneklerin filogenetik ilişkileri, nükleer DNA'ya ait iki farklı gen bölgesinin [ITS (İnternal transcribed spacer) ve LSU (Large subunit)] çoklu dizi analizleri yapılarak belirlenmiştir. Türler arası evrimsel akrabalık ilişkileri, oluşturulan filogenetik ağaçlar yardımıyla değerlendirilmiş ve morfolojik karakterler kullanılarak yapılan teşhisleri destekleyip desteklemediği araştırılmıştır. Kullanılan gen bölgeleri arasında en fazla varyasyon gösteren ve tür ayrımında daha belirleyici olan bölge, ITS olmuştur. Yapılan değerlendirmeler sonucunda *Melanoleuca* cinsinin monofletik olduğu ve sadece iki alt cinsten (*Urticocystis* ve *Melanoleuca*) oluştuğu desteklenmiştir. *Acystis* alt cinsinin polifletik olduğu görülmüştür. Çalışılan türlerden *M. communis, M. dryophila, M. heterocystidiosa* ve *M. angelesiana* Türkiye mikobiyotası için yeni kayıt olan türlerdir.

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

ABSTRACT

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF SOME SPECIES OF *MELANOLEUCA* PAT. GENUS FOUND IN TURKEY

KALMER, Ayşenur
M. Sc. Thesis, Molecular Biology and Genetics
Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ayten DİZKIRICI TEKPINAR
July 2017, 44 pages

Melanoleuca Pat. is a macrofungus that classified in the *Tricholomataceae* family and distributed worldwide with several edible species. Taxonomic and evolutionary relationships of some species have been tried to be determined by using molecular techniques. The phylogenetic relationships of *Melanoleuca* species collected from different regions of Turkey were determined by performing multiple sequence analysis of two different nuclear DNA regions [ITS (Internal Transcribed spacer), LSU (Large subunit)]. Evolutionary relationships among species were evaluated with aid of phylogenetic trees and investigated whether they support the identifications using morphological characters. The region showing the most variation and more specific in species discrimination was ITS region. The assessments supported that the genus *Melanoleuca* was monophletic and only two subgenera (*Urticocystis* and *Melanoleuca*) were formed. *Acystis* subgenus was found to be polyphletic. *M. communis*, *M. dryophila*, *M. heterocystidiosa* and *M. angelesiana* were new records for mycobiota of Turkey.

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

ÖN SÖZ

Bilim insanları doğanın işleyişini, organizmaların faaliyetlerini ve doğayla olan etkileşimlerini araştırır ve problemleri tespit edip hipotez oluşturarak belirledikleri problemleri çözmeye yönelik çalışmalar yaparlar ve yapmalıdırlar. Ben de bir bilim insanı olarak doğanın bir parçası olan mantarlar ile çalışmalarıma başladım ve bu alanda heyecan verici gelişmeler ve sonuçlar elde etmeyi amaçladım. Yüksek lisans çalışmamda bu alanda uzmanlaşmam için beni yönlendiren ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayten DİZKIRICI TEKPINAR'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmamda mantar örneklerini aldığım Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fungaryum ekibine ve morfolojik analizlerin yapılması esnasında yardımlarını esirgemeyen Dr. İsmail ACAR'a, yüksek lisans eğitimim boyunca ilgi ve desteğini gördüğüm değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ayten EROĞLU'na, tez çalışmam boyunca yararlandığım biyoinformatik programların kullanımına dair bilgilerini benden esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Barış KAKİ ve Yrd. Doç. Dr. Mustafa USTA'ya ve bu çalışmayı FYP-2017-5560 No'lu proje olarak destekleyen Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına (BAPB) teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak her anımda yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

2017

Ayşenur KALMER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT iii
İÇİNDEKİLER vii
ÇİZELGELER LİSTESİ ix
ŞEKİLLER LİSTESİ xi
SİMGELER VE KISALTMALAR xiii
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ 6
3. MATERYAL VE YÖNTEM 12
3.1. Morfolojik Çalışmalar 12
3.2. Moleküler Çalışmalar 15
3.2.1. DNA izolasyonu 15
3.2.2. Analiz edilen gen bölgeleri 16
3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) 18
3.2.4. Agaroz jel elektroforezi 20
3.3. DNA Dizileme ve Filogenetik Aşamalar 20
4. BULGULAR 22
4.1. Morfolojik Değerlendirme 22
4.2. Moleküler Değerlendirme 23
4.2.1. Çoğaltılan gen bölgeleri 23
4.2.2. Dizi verilerinin tanımlanması 24
4.2.3. Çoklu dizi hizalama 27
4.3. Filogenetik Analiz 29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 36
5.1. *Melanoleuca* Alt Cinsinin Filogenetik Değerlendirilmesi 37
5.2. *Urticocystis* Alt Cinsinin Filogenetik Değerlendirilmesi 39
KAYNAKLAR 45
ÖZGEÇMİŞ 50

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 1.1. *Melanoleuca* cinsinin klasik sınıflandırılması.....3

Çizelge 3.1.Tez çalışmasında kullanılan ve morfolojik/mikroskobik karakterler kullanılarak tanımlanan türlerin isimleri, lokasyonları ve toplama tarihleri. 13

Çizelge 3.3. ITS bölgesini (ITS1+ITS2) amplifiye etmek için kullanılan primer çifti ve nükleotit dizileri 18

Çizelge 3.4. LSU bölgesini amplifiye etmek için kullanılan primer çifti ve nükleotit dizileri 19

Çizelge 3.5. Çalışılan gen bölgeleri için belirlenmiş optimum PZR sıcaklık koşulları.....20

Çizelge 4.3. Tüm sekanslar (Genbank dahil) kullanılarak elde edilen ITS ve LSU bölgelerinden hesaplanan genetik çeşitlilik parametreleri..... 32

Çizelge 5.1. Yapılan morfolojik ve moleküler değerlendirmeler sonucunda yeniden belirlenen tür isimleri..... 41

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 1.1. *Melanoleuca communis* a) bazidyokarp, b-c) bazidyosporlar, d) bazidyum e-f) sistit yapısı.....4

Şekil 3.1. *Melanoleuca* cinsine ait türlerin Türkiye'deki yayılış alanlarına ait harita. 14

Şekil 3.3. ITS gen bölgesinin şematik gösterimi. 17

Şekil 3.4. LSU gen bölgesinin şematik gösterimi. 18

Şekil 4.1. *Melanoleuca communis* türüne ait sistit yapılarının farklı belirteçlerde görünümü 22

Şekil 4.2. *Melanoleuca communis* türüne ait basidyospor yapılarının farklı belirteçlerde görünümü 23

Şekil 4.3. Çalışılan örneklerden bazılarının ITS bölgelerine ait PZR ürünlerinin bant profilleri.. 24

Şekil 4.4. Çalışılan örneklerden bazılarının LSU bölgelerine ait PZR ürünlerinin bant profilleri.. 24

Şekil 4.5. ITS gen bölgesine ait sekansın kromatogram görüntüsü. 25

Şekil 4.6. LSU gen bölgesine ait sekansın kromatogram görüntüsü 26

Şekil 4.7. *Melanoleuca* türlerinin ITS gen bölgesine ait hizalanmış sekansların görüntüsü.....28

Şekil 4.8. *Melanoleuca* türlerinin LSU gen bölgesine ait hizalanmış sekansların görüntüsü.....28

Şekil 4.9. ITS gen bölgesine ait ML metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç. Daire ile işaretli türler çalışmada kullanılan türlerdir. Diğer türler Genbank veri tabanından alınmıştır (*Pluteus cervinus* dış grup).....34

Şekil 4.10. LSU gen bölgesine ait ML metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç. Daire ile işaretli türler çalışmada kullanılan türlerdir. Diğer türler Genbank veri tabanından alınmıştır (*Pluteus cervinus* dış grup) 35

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	**Açıklama**
H_2O	Su
ml	Mililitre
mM	Milimolar
$MgCl_2$	Magnezyum Klorür
rpm	Dakikadaki devir sayısı
V	Hacim (Volume)
V	Volt
µl	Mikrolitre
gr	Gram

Kısaltmalar	**Açıklama**
bç	Baz çifti
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CTAB	Cetil Trimetil Ammonio Bromuro
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ETS	External spacer
ITS	Internal Transcribed Spacer
LSU	Large Subunit
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
ML	Maksimum Likelihood

MP	Maksimum Parsimony
NCBI	National Center of Biotechnology Information
nDNA	Nükleer Deoksiribonükleik Asit
pH	Hidrojen gücü
PVP	Polyvinylpyrrolidone
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonları
RNA	Ribonükleik Asit
rDNA	Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
rpb2	RNA Polymerase Second Largest Subunit
TAE	Tris Asetat EDTA
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA
tef	Translation Elongation Factor
Taq	*Thermus aquaticus*
VANF	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Fungaryumu

1. GİRİŞ

Moleküler filogenetik, moleküllerin yapı ve fonksiyonlarının zaman içinde nasıl değişim geçirdiklerini dikkate alarak canlıların evrimsel ilişkilerini açıklamaya çalışır. Bu bilim dalı moleküler biyoloji tekniklerinin gelişmesiyle birlikte 20. yüzyılın başlarında ortaya çıkmıştır (Dowell, 2008). Moleküler seviyedeki bilimsel çalışmalarda DNA en çok tercih edilen moleküllerden birisidir (Simon ve Weiß, 2008). Temel olarak, filogenetik çalışmalar homolog oldukları varsayılan genler arasındaki benzerlikler baz alınarak yapılır (Lemey ve ark., 2009). Moleküler filogenetik çalışmaların ilk amacı, evrimsel olayların sırasını belirleyerek türler veya genler arasındaki ilişkileri grafiksel olarak soy ağaçlarında göstermektir (Dowell, 2008). Son yirmi yılda moleküler filogenetik ve filogenomik alanındaki çalışmalar mantar sistematiğini büyük ölçüde değiştirmiş ve zenginleştirmiştir (Wang ve ark., 2009). Moleküler teknikler gelişmeden önce çoğunlukla morfolojik analizlere (karakterlere) dayanan taksonomik sınıflandırma yapılırken (Murrill, 1913; Gillman ve Miller, 1977), son yıllarda moleküler biyoloji ve genetik alanında yaşanan gelişmeler fungal sistematik alanında da yeni tekniklerin ortaya çıkışını sağlamıştır (Kılıçoğlu ve ark., 2008). Dolayısıyla günümüz fungus taksonomisi morfolojik verilerle birlikte moleküler verilerin de kullanılmasıyla belirlenmeye çalışılmaktadır.

Mantarlar alemi içerisinde bulunan çeşitliliğin belirlenmesi ve sınıflandırılması için yapılan çalışmalar oldukça eskidir. 2004 yılında başlatılan ve günümüzde de devam eden AFTOL (Assembling the Fungal Tree of Life) adı verilen bir çalışma ile fungusların moleküler filogenetik seviyede sınıflandırılması hedeflenmiştir (Hibbett ve ark., 2007). Fungus taksonomisinde moleküler açıdan devrim niteliğine sahip bir gelişme 1990'ların başında PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile amplifiye edilmiş ribozomal RNA (rRNA) genlerinin analizi ile başlamıştır (Hibbett ve ark., 2007). Ribozomal gen bölgeleri tüm canlı soylarında bulunan ve evrimsel anlamda uzun zamandır korunan genlerdir. Bu genler evrimsel olarak çok eskidirler ve yatay gen transferi (birbiriyle ilişkisiz organizmalar arasında genlerin geçmesi) göstermeden veya çok az göstererek tüm canlı soylarında bulunurlar (Woese ve Olsen, 1993). Bu sebepten taksonomik çalışmalarda ve tür teşhisi çalışmalarında rRNA gen bölgeleri yaygın

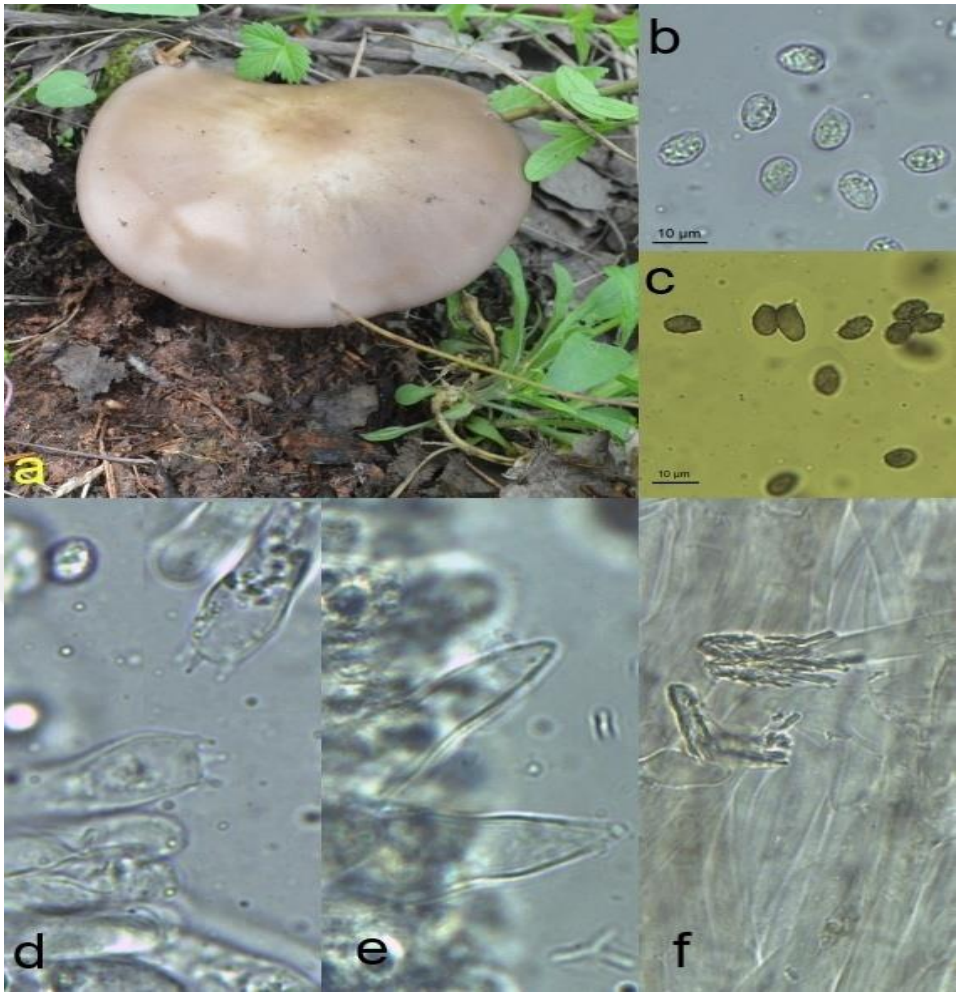
biçimde kullanılmaktadır (Abd-Elsalam ve ark., 2003). Ribozomal bölgelerden özellikle large subunit gen bölgesi (LSU, D1- D2 bölgesi) ve internal transcribed spacer bölgeleri (ITS1- ITS2) bazı fungusların moleküler tanımlanmasında umut vaad etmiştir (Hinrikson ve ark., 2005). Bu gen bölgeleri ekzonik ve intronik bölgeler içerdiği için filogenetik çalışmalarda kullanılabilecek gen bölgeleridir. Ökaryotik bir polipeptidi kodlayan DNA dizisi, kodlama yapan bölgeler arasına yerleşen kodlama yapmayan nükleik asit parçalarından oluşur. Aminoasitlere tercüme edilen gen bölgeleri ekzon, tercüme edilmeyen bölgeler ise intron olarak adlandırılır (Campbell ve Reece, 2010). İntronların farklı ekzon kombinasyonlarına neden olarak evrimsel süreçte yeni genlerin ve proteinlerin oluşumunda rol aldıkları söylenmektedir (Anonim, 2016). Bu sebepten intronlar evrimsel olarak önemli nükleotit parçalarıdır.

Funguslar kök, yaprak gibi kısımları bulunmayan ve spor yapıları ile üreyen ökaryotik heterotrof organizmalardır. Hücre dışı enzimler salgılayarak besinlerini parçalar ve hücre içine alırlar. Doğada funguslar, ekosistemdeki enerji döngülerinin genel düzenleyicisi olarak görev yaparlar. Makrofungus denen ve gözle görülebilen üreme yapılarına sahip olan funguslar (Kaşık, 2010) çeşitli simbiyotik yaşam biçimlerine sahiptirler. Bazı makrofunguslar bitki kökleriyle mikorizal ortaklık kurarken bazıları ise alglerle ortak bir yaşam içine girerek likenleri oluştururlar. Saprofit funguslar ise ölü bitkisel ve hayvansal yapıların parçalanmasına yardımcı olurlar. Funguslar bünyelerinde bakır, civa, çinko, gümüş, kurşun, mangan, nikel, selenyum, sezyum, uranyum gibi ağır metal biriktirirler (Işıloğlu, 2001) ve bu özelliklerinden dolayı kirlilik indikatörü olarak da kullanılırlar (Doğan, 2001). Bu çalışmada kullanılan *Melanoleuca* Pat. cinsine ait makrofunguslar, Agaricales ordosunun *Tricholomataceae* familyasında sınıflandırılan ve dünyada yayılış gösteren makrofunguslardır. Klasik sistematikte Çizelge 1.1'de gösterildiği gibi sınıflandırılmaktadırlar.

Çizelge 1.1. *Melanoleuca* cinsinin klasik sınıflandırılması (Anonim, 2017a)

Takson basamakları	
Alem	Fungi
Alt alem	Dikarya
Bölüm	Basidiomycota
Alt bölüm	Agaricomycotina
Sınıf	Agaricomycetes
Alt sınıf	Agaricomycetidae
Takım	Agaricales
Familya	*Tricholomataceae*
Cins	*Melanoleuca*

Melanoleuca ismi Antik Yunana ait olan melas (siyah) ve leucos (beyaz) kelimelerinden gelmektedir (Anonim, 2015). Bu cinse ait makrofunguslar, yenilebilen ve yenilemeyen türleriyle ülkemizde dağılım göstermektedir. *Melanoleuca alboflavida, M. cognata, M. evenosa*, ve *M. melaleuca* türlerinin yenilebildiği *M. strictipes* türünün ise toksik olduğu bildirilmiştir (Singer, 1986; Arora, 1986; Bessette ve ark., 1997). Ayrıca Acar ve ark. (2015) tarafından *M. grammopodia, M. polioleuca* ve *M. subalpina* türlerinin yenilebilir olduğunu bildirilmiştir. *Melanoleuca* türleri saprotrofiktir; otlakların yetiştiği topraklarda, yaprak döken ormanlarda ve kumullarda yetişirler (Singer, 1986; Boekhout, 1988; Vesterholt, 2012). Dünyada 331 türle temsil edilmekte (Anonim, 2017b) ve ülkemizde son kayıtlara göre 21 türü bulunmaktadır (Sesli ve Denchev, 2014; Solak ve ark., 2015). *Melanoleuca* cinsi tipik donuk renk, amiloid spor ve cheilosistit yapısı ile karakterizedir (Singer, 1986). Sporları bazidyum denen yapılar üzerinde bulunur ve bu şekilde bulunan sporlar bazidyosporlar olarak adlandırılırlar. Bu yapılar arasında üreme ile ilgili olmayan ancak teşhislerde kullanılan sistit denen yapılar vardır. Şekil 1.1'de *Melanoleuca* cinsine ait bir türün morfolojik ve mikroskobik yapıları örnek amaçlı gösterilmiştir. Bu morfolojik ve mikroskobik yapılar türlerin teşhisinde kullanılmaktadır. Bazidiokarp denen yapı makrofungusun tüm dış karakterlerini baz almaktadır. Bazidyumlar içerisinde sporlar bulunur ve Basidiomycetes sınıfına ait tüm mantarlarda bu yapı mevcuttur.



Şekil 1.1. *Melanoleuca communis* a) bazidyokarp, b-c) bazidyosporlar, d) bazidyum e-f) sistid yapısı.

Türlerin morfolojik yapıları çevre faktörlerinden güçlü bir şekilde etkilenmektedir (Bon, 1991; Boekhout, 1999). Bu sebeple cinse ait türlerin tanımlanması zordur ve birçok morfolojik karakterleri homoplazi sergilemektedir (Vizzini ve ark., 2011). Türler arasındaki morfolojik benzerliklerden dolayı kapsamlı mikroskobik analizler sonucu türler ayırt edilebilmektedir (Anonim, 2017c). Singer (1986); *Melanoleuca* cinsini şapka rengi, şapka boyutu ve spor özelliklerine göre dört seksiyona (*Alboflavidae, Humiles, Oreinae, Melanoleuca*) ayırmışken, Bon (1991); sistit varlığı ve şekline göre üç alt cinse (*Melanoleuca, Urticocystis* ve *Acystis*) ayırmıştır. Vizzini ve ark. (2011)'e göre cheilosistit yapısının varlığı veya yokluğu, sistit şekilleri, spor ölçüleri ve pileipellis yapısı gibi oldukça sınırlı makroskobik ve

mikroskobik karakterlerin analiziyle türlerin tanımlaması yapılmaktadır. Bu şekilde morfolojik karakterlerinin çok benzer olması, türler arasında taksonomik sınırların belirlenememesi, cinse ait bazı bireylerin henüz teşhis edilememiş olması, tür teşhisinde net bir tanımlama sağlanamaması ya da tanımlanan bireylerde hala şüphelerin var olması gibi önemli problemlere neden olmaktadır. Cinsin sınırlarının belirlenmesi, cinsin korunması adına önemli bir çalışmadır. Bu amaçla, Türkiye'de moleküler seviyede hiç çalışılmamış olan dünyada ise Vizzini ve ark. (2011), Antonin ve ark. (2015), Yu ve ark. (2014) gibi bu alanda uzman araştırmacılar tarafından çalışılan *Melanoleuca* cinsine ait türler bu tez çalışması için seçilmiş, ülkemizin farklı bölgelerinden toplanmış, morfolojik ve mikroskobik karakterler kullanılarak teşhis edilmeye çalışılmış ve daha sonra farklı gen bölgelerinin DNA dizileri elde edilerek moleküler analizleri yapılmış ve türler arası evrimsel ilişkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Melanoleuca cinsine ait moleküler seviyede olan çalışmalar oldukça azdır. Türkiye'de bu cinse ait hiçbir moleküler çalışma mevcut değildir. Sadece makroskobik ve mikroskobik karakterlere dayalı çalışmalar bulunmaktadır. Literatürde bulunan moleküler ve morfolojik çalışmalar şöyledir;

Antonin ve ark. (2014) tarafından yeni bir tür olarak tanımlanan *M. juliannae* türü ile *M. grammopodia* ve *M. humilis* türleri arasındaki filogenetik ilişki ITS ve tef1 (Translation Elongation Factor) gen bölgeleri kullanılarak belirlenmiştir. ITS ve tef1 sekans verileri kombine edilmiş ve Bayesian analizi ile elde edilen filogenetik ağaçta *M. juliannae'*nin *Urticocystis* alt cinsi içinde yer aldığı belirlenmiştir. ITS sekans verileri, çalışılan türlerde benzer homojeniteyi gösterirken tef1 bölgesi için aynı sonuç gözlenememiştir. Yeni tanımlanan bu türün *M. grammopodia* ile *M. humilis* türlerinden ayrı bir kladda yer aldığı gösterilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen verilere, bu türlerin ITS dizileri de ilave edilerek birlikte analiz yapılmış ve çalışılan türlerle olan filogenetik ilişkileri ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır.

Antonin ve ark. (2015) tarafından Avrupa'nın çeşitli bölgelerinden toplanan *Melanoleuca brevipes* türüne ait örneklerin ve *M. brevipes* olarak tanımlanan diğer türlerin makromorfolojik ve mikromorfolojik analizleri ile ITS sekans verilerine dayalı filogenetik analizleri yapılmıştır. *M. brevipes* olarak tanımlanan birçok fungus olduğu, bu nedenle bu türün sınırlarının belirsiz olduğu ifade edilmiştir. Türler arasındaki filogenetik ilişki hakkında daha fazla bilgi edinmek için tef1 ve rpb2 (RNA Polymerase-second Largest Subunit) gen bölgeleri de çalışılmıştır. ITS sekans verisi kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç ile ITS-tef1-rpb2 sekans verileri kombine edilerek oluşturulan filogenetik ağaçta *M. brevipes* olarak tanımlanan türler arasındaki genetik çeşitlilik gösterilmiştir. Bu verilere göre *M. brevipes* olarak tanımlanan türlerin üç farklı türe (*M. humilis, M. grammopodia* ve *M. malenconii*) ait oldukları belirlenmiştir.

Yu ve ark. (2014) tarafından Çin'in kuzeydoğusunda bulunan iki yeni *Melanoleuca* türü (*M. leucopoda* ve *M. porphyropoda*) morfolojik ve moleküler veriler kullanılarak tanımlanmıştır. Türler arasındaki morfolojik benzerliğin daha öncesinde tartışmalara neden olduğunu ve bu nedenle tanımlanamadıkları belirtilmiştir. ITS DNA

sekans verileri kullanılarak Bayesian metoduyla oluşturulan kladogramda *Melanoleuca* cinsinin açıkça monofletik olduğunu gösterilmiştir. Filogenetik ağaçta, *Melanoleuca* cinsi içinde iki temel klad tanımlanmıştır. Bu kladlar, Vizzini ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmanın sonucuna göre iki alt cins (*Urticocystis* ve *Melanoleuca*) olarak belirlenmiştir. Çalışılan *Melanoleuca* türleri bu alt cinsler içerisinde gösterilmiştir; *M. leucopoda*, *Melanoleuca* alt cinsinde tanımlanırken, *M. porphyropoda* türü *Urticocystis* alt cinsi içerisinde tanımlanmıştır. Ayrıca çalışma sonucunda bu türlerin Agaricales ordosunda yer aldıkları belirtilmiştir. *Melanoleuca* cinsinin durumunu açıklığa kavuşturmak için ek moleküler verilere ihtiyaç olduğu da vurgulanmıştır.

Saba ve Khalid (2014) tarafından Pakistan ormanlarından toplanan *Melanoleuca cinereifola* bireyleri, ITS gen bölgesini kullanılarak tanımlanmıştır. Yapılan BLAST analizi sonuçları, veri tabanında bulunan *Melanoleuca aff. cinereifolia*, *M. cinereifolia*, *M. communis* türleriyle %99 eşleşme göstermiştir. Filogenetik analiz sonuçlarını gösteren ağaç Maximum Likelihood algoritması ve Neighbor-Joining metodu ile oluşturulmuş ve ağaçta iki önemli kladı (*Melanoleuca* ve *Urticocystis*) belirlemişlerdir. *Melanoleuca cinereifola* türü *Melanoleuca* kladı içerisinde yer almıştır. Analiz sonuçlarına göre bu kladda yer alan *M. cinereifola* ile *M. communis* türünün açıkça benzerlik gösterdiğini belirtilmiştir. Yapılan BLAST değerlendirmesi de bunu desteklemiştir. Sadece morfolojik olarak şapka boyutu ve rengi açısından farklılık gösterdiklerini vurgulanmıştır. *Melanoleuca* türlerinin morfolojik benzerliklerinden dolayı tanımlanmasının zor olduğu ve bu nedenle moleküler analizler yapılmasının gerekli olduğu belirtilmiştir.

Vizzini ve ark. (2010) tarafından *Melanoleuca* cinsinin alt cinsi olarak gösterilen *Kinia* alt cinsi çalışılmıştır. Agaricales ordosu içerisinde gösterilen *Kinia* alt cinsinin filogenetik ilişkilerini moleküler teknikler kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. LSU DNA bölgesi kullanılarak yapılan Maximum Likelihood ve Bayesian analizleri aynı topolojiyi göstermiştir. Buna göre *Kinia privernensis* açıkça *Melanoleuca* türleri içinde kümelenmiştir. Böylece daha önceden *Kinia* alt cinsi içerisinde gösterilen *Kinia privernensis*, *Melanoleuca privernensis* olarak tanımlanmıştır.

Vizzini ve ark. (2011) bir diğer çalışmalarında geleneksel üçlü sınıflandırmada (*Acystis*, *Urticocystis* ve *Melanoleuca* alt cinsleri) yer alan *Melanoleuca* koleksiyonuna

ait 91 türü moleküler filogenetik verileri (ITS DNA sekans analizi) ile sistematik öneme sahip morfolojik karakterleri değerlendirerek analiz etmişlerdir. Filogenetik analiz için sekans verileri hem bu çalışmada oluşturulmuş hem de Genbank veri tabanından alınmıştır. Yapılan Bayesian ve Maximum Likelihood analizleri *Melanoleuca*'nın monofletik olduğunu güçlü bir şekilde desteklemiştir. *Acystis* olarak tanımlanmış alt cinsin ise polifletik olduğu gösterilmiştir. Filogenetik analiz sonuçlarının morfolojik temelli sınıflandırmada yer alan *Melanoleuca*'larla uyumlu olmadığını ifade edilmiştir.

Garnica ve ark. (2007) tarafından Agaricales ordosuna ait 88 mantarın rpb1 ve LSU gen bölgeleri kullanılarak moleküler filogenetik analizleri yapılmıştır. Bu mantarlar içerisinde tez çalışmasında kullanılan *Melanoleuca melaleuca* türü de mevcuttur. Morfolojik karakterleri kullanılarak sistematik sınıflandırılması yapılan bu mantarların filogenetik ilişkileri ile morfolojik ve ekolojik özelliklerinin evriminin tam olarak anlaşılamadığı belirtilmiştir. Yapılan filogenetik analizler dikkate alınarak, Basidiomycetes için geleneksel sınıflandırmada kullanılan karakterlerin homoplaziden etkilenebileceği iddia edilmiştir. Ayrıca Agaricales ordosu için bazidiospor morfolojisinin filogenetik bir marker olabileceği de ifade edilmiştir. Çünkü bazidiospor duvarlarının sinapomorfik bir karakter olarak filogenetik ağaçta paylaşıldığı görülmüştür. LSU sekans verilerine dayalı çizilen filogenetik ağaçta birkaç monofletik grup belirlenmiştir. Bu gruplar familya bazında kladlar oluşturmuştur. *Melanoleuca* cinsine ait *M. melaleuca* türü *Tricholomataceae* kladı içerisinde gösterilmiştir.

Moncalvo ve ark. (2002) tarafından LSU bölgesinin filogenetik analizine dayalı olarak Agaricales ordosuna ait fungus koleksiyonları çalışılmıştır. *Melanoleuca* cinsine ait *M. alboflavida* ve *M. cognata* sekansları analiz edilmiş ve morfolojik verilerden beklenenin aksine *Pluteus* grubu içerisinde yer aldığı ancak düşük bir bootstrap değeri ile kümelendiği bildirilmiştir. Bu iki taksonun morfolojik olarak benzer boyut ve pigment yapılarına sahip olduğu ama mikroanatomilerinde önemli farklılıklar olduğu da vurgulanmıştır.

Matheny ve ark. (2006) tarafından Agaricales ordosuna ait mantarların 6 gen bölgesi (rpb1, rpb1-intron 2, rpb2, 18S, 25S, 5.8S ribosomal RNA) çalışılmıştır. Bu sekans verileri ile Bayesien analizi kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçta *Agaricoid, Tricholomatoid, Marasmioid, Pluteoid, Hygrophoroid* ve *Plicaturopsidoi*

kladları elde edilmiştir. Çalışmada *Melanoleuca* cinsine ait *Melanoleuca verrucipes* türü *Pluteoid* kladı içerisinde gösterilmiştir.

Duriska ve ark. (2017) tarafından *Melanoleuca strictipes* türünün ITS gen bölgesi çalışılmıştır. Bu türün yıllardır farklı türler olarak tanımlandığı belirtilerek sekiz ülkeden toplanan örnekler analiz edilmiş ve filogenetik pozisyonu ve taksonomisi belirlenmiştir. Maksimum Likelihood ve Bayesian metodları ile oluşturulan filogenetik ağaçta *M. strictipes* olarak tanımlanan örnekler bir klad oluşturmuşlardır. Bu şekilde *M. strictipes* türü filogenetik olarak tanımlanmıştır.

Bu sonuçlar gösteriyor ki sadece morfolojik analizlere dayalı sınıflandırma ve tanımlama çalışmaları tek başına fungus sistematiği için yeterli olmamaktadır. Bu çalışmada da moleküler seviyede elde edilen veriler tür ayrımı yapmada ve türler arası evrimsel ilişkileri göstermede kullanılmıştır. Daha önceki kısımlarda da bahsedildiği gibi *Melanoleuca* cinsine ait olan türlerle yapılmış olan çalışmalar oldukça azdır. Filogenetik çalışmalarla elde edilen sonuçların bilim dünyasıyla paylaşılabilmesi için sekansların bazı diğer bilgilerle birlikte (tür isimleri, çalışan bilim insanları, çalışılan ülke vb.) mutlaka NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanına girilmesi gereklidir. Aşağıda literatür taraması yapılırken NCBI veri sisteminde bulunan *Melanoleuca* türleri hakkında yapılmış bazı araştırmalar ve sonuçları özetlenmiş şekilde verilmiştir.

Melanoleuca brevipes: Antonin ve ark. (2015) bu türün ve *M. brevipes* olarak tanımlanan diğer türlerin morfolojik analizleri ile ITS sekans verilerine dayalı filogenetik analizleri yaparak türlerin konumlarını belirlemişlerdir. Tez çalışmasında da bu bölge tercih edilmiştir, bu sayede Türkiye'de yayılış gösteren bir örnek ile aynı türe ait yurt dışında bulunan örneğin evrimsel pozisyonunu karşılaştırma şansımız da olacaktır (aynı durum aşağıda belirtilen tüm türler için de geçerlidir).

Melanoleuca grammopodia: Antonin ve ark. (2014) tarafından yeni bir tür olarak tanımlanan *M. juliannae* türü ile *M. grammopodia* ve *M. humilis* türleri arasındaki filogenetik ilişki ITS ve tef1 gen bölgeleri kullanılarak tanımlanmıştır. Filogenetik analiz sonuçlarına göre bu türlerin farklı oldukları ve birbirleriyle sadece bazı makroskobik karakterleri açısından benzerlik gösterdikleri belirtilmiştir.

Melanoleuca polioleuca: Sanchez ve ark. (2013) tarafından rpb1 (RNA polimeraz II largest subunit) gen bölgesi çalışılmıştır. Elde edilen filogenetik ağaçta *M. polioleuca*, *M. communis*, *M. arcuata* ve *M. cinereifolia* türleri bir grup oluşturmuştur. Filogenetik açıdan benzerlik gösteren bu türlerin morfolojik olarak farklı oldukları belirtilmiştir.

Melanoleuca microcephala: Vizzini ve ark. (2011) tarafından ITS gen bölgesi çalışılmış ve oluşturulan filogenetik ağaçta *Urticocystis* alt cinsinde gösterilmiştir.

Melanoleuca strictipes: Duriska ve ark. (2017) tarafından ITS gen bölgesi çalışılmış ve *M. strictipes* olarak tanımlanan birçok örneğin oluşturulan filogenetik ağaçta bir grup oluşturdukları görülmüştür. Bu türün özellikle *M. subalpina* ile olan benzerliğinden dolayı çoğu zaman yanlış teşhis edildiği belirtilmiş ve filogenetik ağaçta *M. subalpina* türü *M. strictipes*'ten farklı bir pozisyonda yer almıştır.

Melanoleuca substrictipes, M. graminicola ve *M. paedida:* Vizzini ve ark. (2011) tarafından ITS gen bölgesi çalışılmıştır. Oluşturulan filogenetik ağaç değerlendirildiğinde *M. substrictipes* ve *M. paedida* türlerinin *Urticocystis* alt cinsinde, *M. graminicola* türünün ise *Acystis* alt cinsinde yer aldığı belirlenmiştir.

Melanoleuca stridula: Vizzini ve ark. (2011) tarafından türün ITS gen bölgesi çalışılmış ve *Urticocystis* alt cinsinde yer aldığı bildirilmiştir.

Melanoleuca melaleuca: Garnica ve ark. (2007) tarafından morfolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Agaricales ordosuna ait 88 tür ile yaptıkları moleküler filogenetik çalışmalar sonucunda LSU ve rpb1 gen bölgeleri kombine edilip filogenetik bir ağaç oluşturarak *M. melaleuca* türü *Pluteaceae* kladında gösterilmiştir.

Melanoleuca exscissa: Sanchez ve ark. (2013) tarafından ITS gen bölgesi çalışılmış ve veri tabanına yüklenmiştir. Ayrıca Saba ve Khalid (2014); *M. cinereifolia*'nın filogenetik ilişkileri üzerine yaptıkları çalışmalarında *M. exscissa* türü de çalışılmış ve bu türün *M. cinereifolia* türünden farklı olduğu bildirilmiştir.

Melanoleuca angelesiana, Melanoleuca subalpina, M. stridula ve *M. nivea:* Vizzini ve ark. (2011) tarafından ITS gen bölgesi çalışılmıştır. Oluşturulan filogenetik ağaçta *M. angelesiana* ve *M. stridula* türleri *Acystis* alt cinsinde, *M. nivea* türü ise *Melanoleuca* alt cinsinde gösterilmiştir.

Melanoleuca dryophila ve *M heterocystidiosa:* Türlerin filogenetik ilişkileri 2017 yılında yapılan çalışmamızda gösterilmiştir. Nükleer DNA üzerinde bulunan ITS, LSU ve tef genleri analiz edilerek yapılan çalışmada bu türler *Urticocystis* alt cinsinde gösterilmiştir. Vizzini ve ark. (2011) çalışmalarında *M heterocystidiosa* türünü *Urticocystis* alt cinsinde göstermiş ve bu doğrultuda yaptığımız çalışma ile bu veri desteklenmiştir.

Melanoleuca langei, *M. luteolosperma, M. griseofumosa* ve *M. schumacheri:* Türlerin filogenetik ilişkisini gösteren herhangi bir çalışma literatürde yer almamaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Morfolojik Çalışmalar

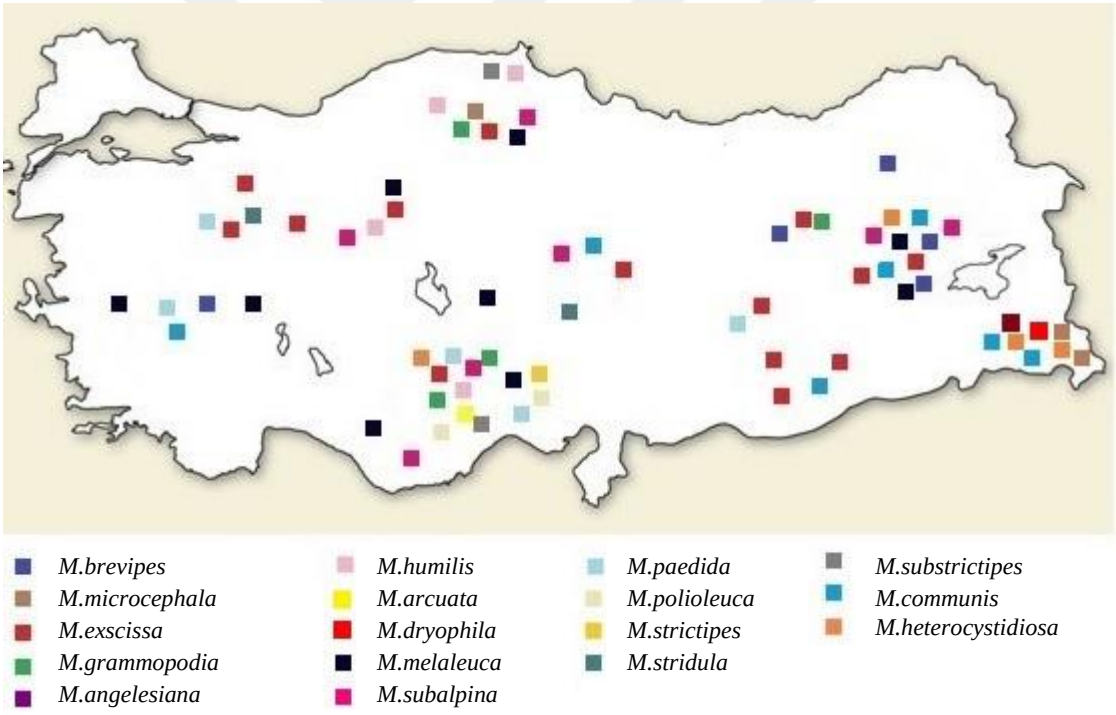
Türkiye'nin farklı bölgelerinden ilkbahar ve sonbahar aylarında toplanan *Melanoleuca* örneklerinin makroskobik ve mikroskobik karakterleri kullanılarak VANF ekibi tarafından teşhisleri yapılmıştır. Teşhis edilen 17 *Melanoleuca* türü ile teşhis edilemeyen 9 tane örnek bu tez çalışması için kullanılmış ve moleküler tekniklerle tür tanımlaması yapılmaya çalışılmıştır. Fungaryuma getirilen örnekler taze iken makroskobik karakterleri (şapka yapısı, şekli, boyutu, sap uzunluğu gibi) analiz edilmiş ve spor baskıları alınmıştır. Sonrasında etiketlenmiş ve fungaryum yöntemlerine uygun olarak kurutulmuştur. Fungaryum materyali haline getirilen kurutulmuş mantar örneklerinden kesit alınarak Congo kırmızısı, Melzer ayıracı ve KOH (%5) solüsyonu ile muamele edilmiş ve Leica EZ4 stereo mikroskop altında incelenmiştir. Mantarların teşhisinde kullanılan kimyasal maddeler ile oluşan renk değişiklikleri tür tespitine yardımcı olmaktadır. Bazidyosporlara uygulanan bu ayıraçlar familyaların, cinslerin hatta türlerin ayırımında kullanılır. Bu metodlar örneklerin toplandığı tarihlerde VANF ekibi tarafından yapılmıştır. Örneklerin teşhisleri; Murrill (1913), Bon (1991), Breitenbach ve Kränzlin (1991), Jordan (2004), Gerault (2005), Vizzini ve ark. (2011), Vesterholt (2008), Buczacki (2012), Garcia ve ark. (2013), Kuo ve Methven (2014) literatürleri kullanılmıştır.

Birkaç tür için (*M. subalpina*, *M.* sp. 167, *M. strictipes*, *M. microcephala*) örnek sayısının tek olması ve doğada başka örneklerine ulaşılamamasından dolayı tekrar yapılamamıştır. Sonuç olarak bu tez çalışmasında 17 türü temsil eden 26 örnek ve 9 tanımlanamayan örnek kullanılmıştır. Toplanan örneklerin isimleri, lokasyonları, toplama tarihleri ve bulundukları alt cinsler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *Melanoleuca* türleri, lokasyonları, toplanma tarihleri ve bulundukları altcinsler

Mantar ismi	Lokasyon Bilgisi	Toplanma Tarihi	Altcins
1.*Melanoleuca brevipes* (Bull.) Pat.	Bingöl, Tatvan-Bitlis	2009 2010-2011	*Urticocystis*
2.*Melanoleuca exscissa* (Fr.) Singer	Hani-Diyarbakır	2009-2010	*Urticocystis*
3.*Melanoleuca graminicola* (Velen.) Kühner & Maire	Baykan-Siirt	2012	*Acystis*
4.*Melanoleuca grammopodia* (Bull.) Murrill	Hani-Diyarbakır	2010	*Urticocystis*
5. *Melanoleuca humilis* (Pers.) Pat.	Bingöl	2009	*Urticocystis*
6. *Melanoleuca melaleuca* (Pers.) Murrill	Erzincan Bingöl	2006 2008	*Melanoleuca*
7.*Melanoleuca paedida* (Fr.) Kühner & Maire	Bingöl Tatvan-Bitlis	2009 2010	*Urticocystis*
8.*Melanoleuca polioleuca* (Fr.) Kühner & Maire	Hani-Diyarbakır	2009	*Melanoleuca*
9. *Melanoleuca strictipes* (P. Karst.) Jul. Schäff.	Tatvan-Bitlis	2011	*Melanoleuca*
10.*Melanoleuca subalpina* (Britz.) Bresinsky & Stangl	Hani-Diyarbakır	2010	*Melanoleuca*
11. *Melanoleuca substrictipes* Kühner	Selim-Kars Tatvan-Bitlis	2013 2011	*Urticocystis*
12. *Melanoleuca dryophila* Murrill	Şemdinli-Hakkari	2014	*Urticocystis*
13.*Melanoleuca microcephala* (P.Karst.) Singer	Hakkari	2014	*Urticocystis*
14. *Melanoleuca heterocystidiosa* (Beller & Bon) Bon	Hakkari-Yüksekova	2014	*Melanoleuca*
15. *Melanoleuca angelesiana* A.H. Sm.	Hakkari	2011	*Acystis*
16. *Melanoleuca communis* M. Sánchez-García&Cifuentes	Hakkari	2015	*Melanoleuca*
17. *Melanoleuca stridula* (Fr.) Singer	Siirt	2016	*Acystis*
***M*. sp. 6**	Kars	2016	
***M*. sp. 16**	Şirvan-Siirt	2015	
***M*. sp. 22**	Soğanlı-Kars	2015	
***M*. sp. 36**	Soğanlı-Kars	2015	
***M*. sp. 134**	Hani-Diyarbakır	2010	
***M*. sp. 159**	Hani-Diyarbakır	2010	
***M*. sp. 167**	Siirt	2012	
***M*. sp. 916**	Şemdinli-Hakkari	2014	
***M*. sp. x**	Gürpınar-Van	2016	

Melanoleuca cinsine ait çalışılan türlerin Türkiye'deki yayılış alanları Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Türlerin yayılışına dair harita bilgileri Sesli ve Denchev (2014) çalışması ve örneklerin toplandığı lokasyonlar dikkate alınarak oluşturulmuştur. Bu haritadan da görüleceği üzere cinse ait türler ülke çapında geniş bir yayılışa sahiptir. Ancak fruktifikasyon mevsimleri dışında türlere rastlamak pek mümkün değildir. Genellikle ilkbahar ve sonbahar aylarında meyve oluşumu gözlenmektedir. Bu çalışma için kullanılması hedeflenen *M. langei, M. luteolosperma, M. griseofumosa, M. schumacheri* türleri arazi çalışmalarında bulunamadığından dizi verileri elde edilememiştir. Analize dahil etmek için bu türlerin ITS ve LSU bölgelerine ait sekanslar Genbank veri tabanından alınmak istenmiş fakat burada da bulunamadığından analize dahil edilememiştir.



Şekil 3.1. *Melanoleuca* cinsine ait çalışılan türlerin Türkiye'deki yayılış alanları.

3.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.1. DNA izolasyonu

Modifiye edilen CTAB metodu (Doyle ve Doyle, 1987) kullanılarak *Melanoleuca* cinsine ait kurutulmuş örneklerin şapka kısmından genomik DNA izole edilmiştir. Her türü temsilen en az iki örnekten DNA izolasyonu yapılmıştır. Buna göre;

1. İlk olarak her örneğin şapka kısmından yaklaşık 0.1 gr parça alınarak steril edilmiş havanlarda 1000 µl özütleme tamponu (CTAB) ile ezilmiştir. (Tampon, işlemden önce yaklaşık yarım saat 55 ºC su banyosunda PVP eklenerek bekletilmiş ve DNA verimi artırılmaya çalışılmıştır)

2. Oluşan karışım homojen bir görünüm alana kadar havanda ezildikten sonra 2.0 ml'lik steril ependorf tüplerine konularak üzerine tekrar 700 µl CTAB ve 200 µl β-merkapto-etanol ilave edilmiştir (β-merkapto-etanol ilavesinin mutlaka çeker ocak içerisinde yapılması gerekir).

3. Ependorf tüpler 13000 rpm'de +4 ºC 10 dk santrifüj edilip, üst faz (süpernatant) alınarak yeni tüplere transfer edilmiş ve üzerine 20 µl Proteinaz K ilave edilmiştir. Ependorf tüpler 55 ºC'ye kadar ısıtılmış su banyosunda 30-50 dk bekletilmiştir. (Proteinaz K; DNase inaktivasyonu için kullanılmıştır. Tüpler belirli aralıklarla ters-düz edilerek veya kısa süreli vorteksten geçirilerek izolasyon verimliliği artırılmaya çalışılmıştır).

4. Örnekler 15000 rpm +4 ºC'de 15 dk boyunca yeniden santrifuj edilmiştir.

5. Alınan süpernatant yeni steril tüplere aktarılarak üzerine RNA'ları parçalamak ve DNA'ya kontaminasyonunu engellemek için 4 µl RNase eklenmiş ve vortekslenerek 55°C su banyosunda 1 saat bekletilmiştir.

6. Her bir ependorf tüpüne 0,6 V Kloroform: İzoamil alkol (24:1) eklenerek 13000 rpm'de +4 ºC'de 10 dk santrifüj edilmiştir.

7. Süpernatant yeni bir tüpe alınmış ve 30 µl Amonyum Asetat ile 300 µl soğuk izopropanol eklenmiş ve -20 °C'de bir gece bekletilmiştir (DNA'yı çöktürmek için).

8. Bir gece bekletilen örnekler 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst faz dökülmüş ve DNA %90'lık etil alkol ile görünür hale getirilmiştir.

9. Pellet, 500 µl %70'lik etanol ile yıkanmış ve süpernatant atılıp pellet oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

10. DNA'nın kuruduğundan emin olunduktan sonra her bir örnek 50-75 µl TE tamponunda (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0) çözdürülmüştür. Elde edilen stok DNA örnekleri -20 ºC'de muhafaza edilmiştir.

11. Her bir örneğin DNA miktarı ve saflığı NanoDrop2000c UV–Vis Spektrofotometre ile belirlenerek, PZR çalışmalarında kullanmak için 10 ng/µl'ye seyreltilmiştir.

12. İzolasyon aşamasında herhangi bir problem olup olmadığını anlamak için her bir örnek %0.8'lik agaroz jelde yaklaşık 30 dakika 80 V'da yürütülerek UV görüntüleme cihazında profillerine bakılmıştır.

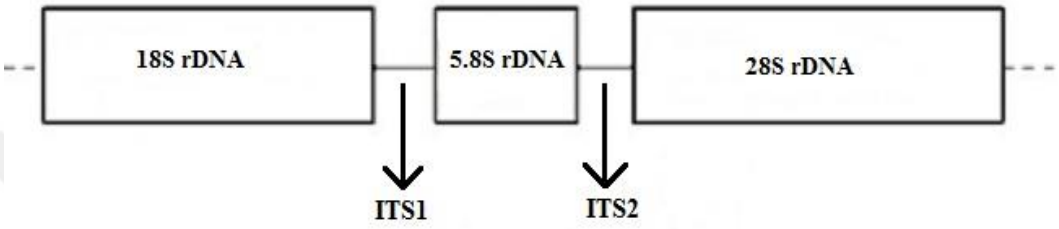
İzolasyon aşamasından sonra filogenetik ilişkileri belirleyebilmek için seçilen nükleer DNA gen bölgeleri PZR yöntemi ile çoğaltılarak her gen bölgesinin sekansları elde edilmiş ve analizleri yapılmıştır. Nükleer DNA bölgesinden seçilen gen bölgelerine ait bilgiler aşağıda verilmiştir.

3.2.2. Analiz edilen gen bölgeleri

Nükleer rDNA ITS bölgesi

Ökaryotlarda ribozomal RNA'ları kodlayan genler tekrarlayan transkripsiyonel bölgeler içerirler. Bu bölgeler 18S, 5.8S ve 28S rRNA bölgeleri ile iki transkripsiyonu yapılamayan (ITS1, ITS2) bölgelerdir. 5.8S geninin her iki yanında bulunan kodlanmayan bölgeler 'Internal Transcribed Spacer' (ITS1 ve ITS2) bölgeleridir (Şekil 3.3). Transkripsiyonu yapılamayan bölgelere, tür tanımlanması ve alt cinslerin filogenetik çalışmaları için mikolojik araştırmalarda çok sık rastlanmaktadır (Horton ve Bruns, 2001). Funguslarda 18S rDNA bölgesi yavaş bir şekilde evrim geçirir ve ancak uzak akraba organizmaların kıyaslanmasında kullanılmaktadır. Kodlanmayan bölgeler (ITS) daha hızlı evrim geçirir ve bir tür içindeki varyetelerin ya da bir cins içindeki

fungusların karşılaştırılması için kullanışlıdır (Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008). ITS bölgeleri fungus taksonomisinde kabul gören resmi bir moleküler barkod haline gelmiştir (Schoch ve ark., 2012). Bu bölgede görülen varyasyonun, gen bölgelerindeki varyasyonlardan daha yüksek olması filogenetik çalışmalarda tercih edilmesinin nedenlerinden biridir. Çizelge 3.3'de ITS bölgesini amplifiye etmek için kullanılan primer çifti ve bunların DNA dizileri gösterilmiştir.



Şekil 3.3. ITS gen bölgesinin şematik gösterimi.

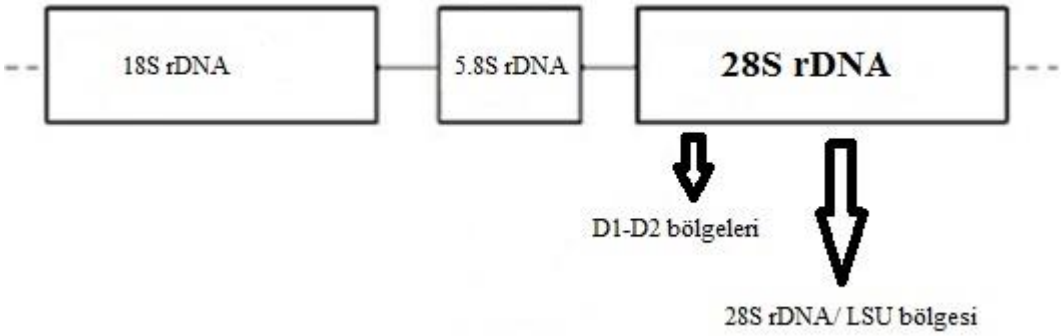
Çizelge 3.3. ITS bölgesini (ITS1+ITS2) amplifiye etmek için kullanılan primer çifti ve nükleotit dizileri (Wen ve ark., 1996)

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

Nükleer rDNA LSU bölgesi

Ribozom iki ana alt birimden oluşan ve protein sentezinde görev alan bir organeldir. Bu alt birimler; büyük alt birim [Large subunit (LSU)] ve küçük alt birim [Small subunit (SSU)] olarak isimlendirilir. Bu alt birimlerden her biri rRNA ve proteinlerden oluşur. LSU rRNA (aynı zamanda 28S rRNA olarak da bilinir) bir ribozim olarak peptit bağı oluşumunu katalizler. rDNA genleri son derece kararlı ve korunmuş mozaik yapı sergileyen genomdaki çeşitli bölgelerdir (Hibbett, 1992). Büyük

alt birimi kodlayan gen bölgesi iki yüksek değişken bölge (D1-D2) içerir. Taksonomik ve filogenetik parmak izine dayalı LSU ve ITS genlerinin sekans analizi fungus sistematiğinde bütünleyici parçalardır (Liu ve ark., 2012). Şekil 3.4'te LSU bölgesi şematik olarak verilmiş ve Çizelge 3.4'te de bölgeyi amplifiye etmek için kullanılan primer çifti isimleri ve DNA dizileri gösterilmiştir.



Şekil 3.4. LSU gen bölgesinin şematik gösterimi.

Çizelge 3.4. LSU bölgesini amplifiye etmek için kullanılan primer çifti ve nükleotit dizileri (Stielow ve ark., 2015)

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

3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu metodu ile DNA üzerinde hedeflenen gen bölgeleri uygun koşullar altında çoğaltılarak binlerce kopyası elde edilir. PZR, DNA ikili sarmalının yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılmasından sonra sıcaklığın düşürülmesiyle oligonükleotit primerlerin çoğaltılacak olan DNA fragmentine bağlanması ve DNA polimeraz enziminin zincirin 3' serbest ucuna nükleotit ekleyerek zinciri uzatmasına dayanan bir moleküler tekniktir (Anonim, 2014). In vitro bir ortamda

bu işlemi gerçekleştirmek amacıyla Taq DNA polimeraz, primer çifti, dNTP, tampon ve $MgCl_2$ gibi kimyasallar kullanılmaktadır.

PZR reaksiyonları 25 mikrolitrelik toplam hacimde yapılmıştır. Hedeflenen gen bölgelerini çoğaltabilmek için her bir kimyasalın belirli oranda kullanılması gerekir. İlk olarak yapılan işlem her bölge için ayrı ayrı optimizasyon çalışmalarıdır. Her gen bölgesi için 25 µl'lik reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Genomik DNA (10 ng/µl), 10X PZR tamponu, $MgCl_2$ (25 mM), dNTP (10 mM), primer çiftleri (10 µM), Taq polimeraz enzimi (5u/µl) bir karışım olarak hazırlanmış ve her gen bölgesi için farklı PZR sıcaklık koşullarında amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bölgelerin amplifiye olduğu optimum sıcaklık koşulları yapılan optimizasyon çalışmaları ile belirlenmiştir (Çizelge 3.5). PZR çalışmaları yapılırken, çevresel koşulların sebep olduğu bir kontaminasyonun olup olmadığını saptamak için çalışılan örneklere ilave olarak, içeriğine DNA ilave edilmeyen karışımlar kontrol olarak kullanılmıştır. PZR işleminden sonra hedef gen bölgelerinin çoğaltılıp çoğaltılmadığını anlamak için örnekler agaroz jelde yürütülmüştür.

Çizelge 3.5. Çalışılan gen bölgeleri için belirlenmiş optimum PZR sıcaklık koşulları

Çalışılan Bölge	Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
ITS	1	95°C	2 dk	**1**
	2	94°C	1 dk	**30**
		54°C	1 dk	
		72°C	2 dk	
	3	72°C	5 dk	**1**
LSU	1	95°C	2 dk	**1**
	2	94°C	45 sn	**30**
		52°C	50 sn	
		72°C	2 dk	
	3	72°C	5 dk	**1**

3.2.4. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, moleküler biyoloji alanında kullanılan ve molekülleri büyüklüklerine ve yüklerine göre ayıran bir yöntemdir. Polimerize olabilen bir jel üzerine yüklenen moleküller, elektrik enerjisi kullanılarak yürütülür. Agaroz jelin yüzde oranı, çoğaltılan gen bölgesinin uzunluğuna göre belirlenir. Kullanılan gen bölgelerinden LSU bölgesi ITS bölgesine göre daha büyüktür. Bu nedenle bu bölge için %0.8'lik jel kullanılırken, ITS için %1'lik jel kullanılmıştır. Agaroz 1XTBE (Tris Borat EDTA) veya 1XTAE (Tris Asetat EDTA) tampon solüsyonlarında çözdürülüp, polimerleşmesi için kaynatılır. Deneysel çalışmalar sırasında agaroz jel hazırlarken 1XTAE tamponu kullanılmıştır. Kaynatılan solüsyon biraz soğutulduktan sonra jelde DNA bantlarını görünür hale getirebilmek için 1-2 damla GelRed boyası solüsyonun içine damlatılmış ve tarakları yerleştirilmiş elektroforez tankına dökülerek polimerleşmesi için beklenmiştir. PZR ürünlerinden 2 µl alınıp 2 µl 6XDNA yükleme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme boyası, DNA molekülünü bir arada tutup kuyunun içinde dağılmadan kalmasını sağlamakta ve bantların jel içinde tahmini yürüme mesafesini anlamamıza yardımcı olmaktadır. Jelde bulunan kuyucuklara PZR ürünleri yüklenerek 80-100 V'da yaklaşık bir saat kadar yürütülmüştür. Elektroforez işleminin ardından jel, UV transilluminatör cihazı altında görünür hale getirilerek hedef bantların istenen kalitede olup olmadığı anlaşılmıştır.

3.3. DNA Dizileme ve Filogenetik Aşamalar

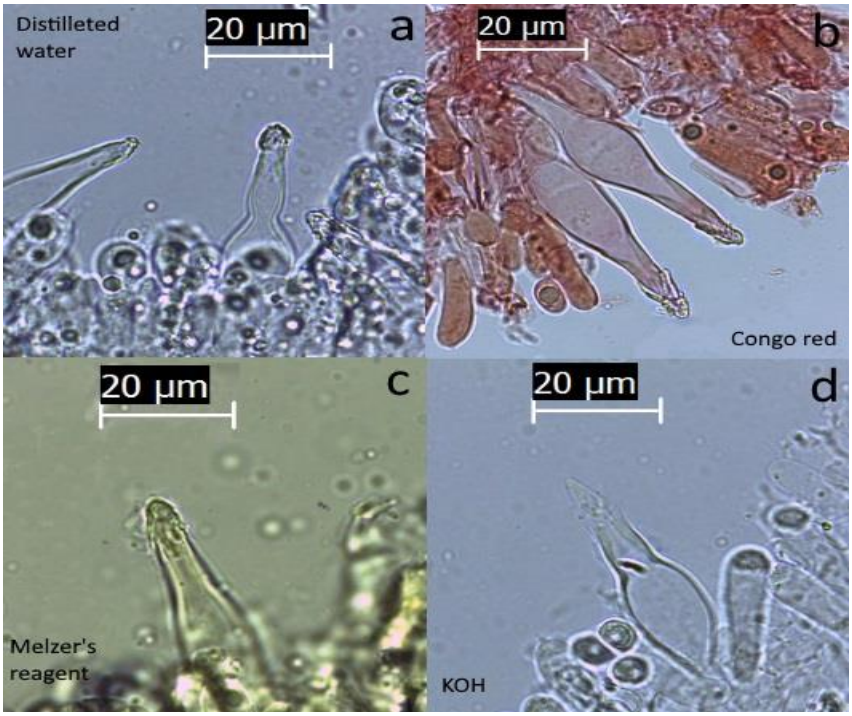
Her bireye ait ITS ve LSU gen bölgeleri için dizileme işlemi özel bir firmaya (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) yaptırılmıştır. Sekans (dizi) verileri oluşturulduktan sonra her örneğin kromatogram görüntüleri Finch TV (Patterson ve ark., 2004; 2006) programı kullanılarak görünür hale getirilmiştir. Forward ve reverse sekanslar her bir birey için kontrol edilmiş ve konsensus dizi MEGA 6.0 programı (Tamura ve ark., 2013) yardımıyla oluşturulmuştur. Genbank veri tabanından alınan *Melanoleuca* türlerine ait ITS ve LSU sekansları da analize dahil edilmiştir. Filogenetik analizler için gerekli olan moleküler çeşitlilik parametreleri aynı program üzerinden hesaplanmıştır. Filogenetik ağaçlar oluşturulurken Tamura-3 metodu kullanılarak

genetik uzaklıklar hesaplanmıştır. Maximum Parsimony ve Maximum Likelihood metodları kullanılarak filogenetik ağaçlar MEGA 6.0 yardımıyla çizdirilmiştir. Elde edilen ağaçların güvenirliliğini artırmak için 500 bootstrap tekrarı yapılmış (Felsenstein, 1985) ve %50'nin üzerindeki bootstrap değerleri ağaçlarda gösterilmiştir. Dış grup olarak *Pluteus cervinus* [ITS; Genbank erişim no: JF908614 (Osmundson ve ark., (2013), LSU; HM562221 (Justo ve ark., 2011)] kullanılmıştır. *Pluteus cervinus*, Agaricales ordosuna aittir ve bu nedenle dış grup olarak tercih edilmiştir.

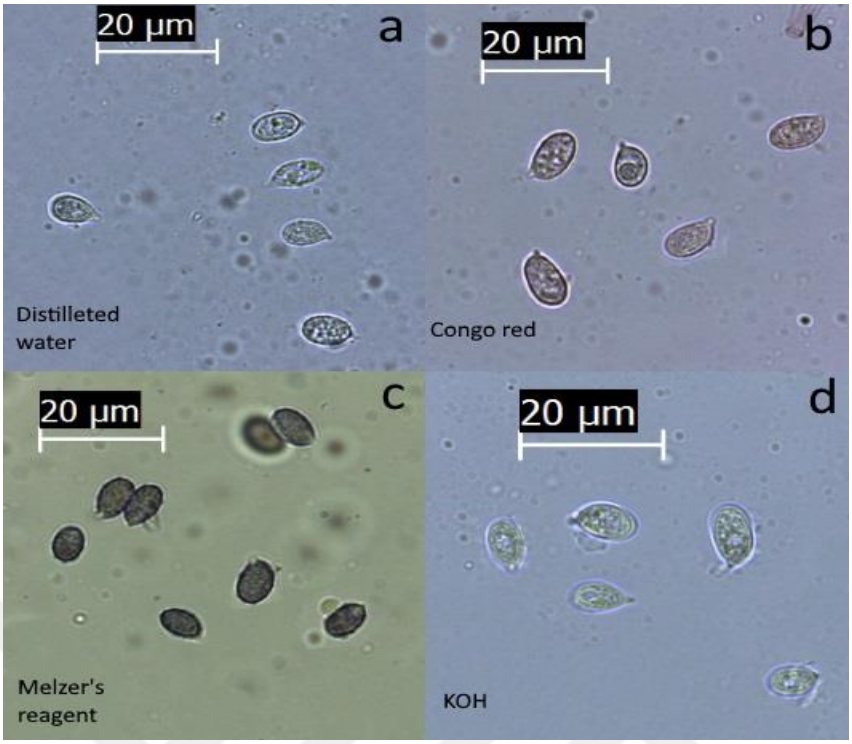
4. BULGULAR

4.1. Morfolojik Değerlendirme

Türkiye'de bulunan *Melanoleuca* türlerini ve cins içerisindeki taksonomik konumlarını belirlemek adına yapılan bu çalışma iki ana aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak morfolojik analizler yapılmış ve sonrasında moleküler teknikler kullanılarak çoğaltılan gen bölgeleri analiz edilerek türler arasındaki filogenetik ilişkiler belirlenmeye çalışılmıştır. Morfolojik analizlerde makroskobik ve mikroskobik karakterler değerlendirilmiş ve türler teşhis edilmeye çalışılmıştır. Sporların şekli, boyutları, yüzeyinin düz veya pürüzlü oluşu, siğillerin bulunup bulunmadığı, bazidyum üzerinde kaç tane spor bulunduğu (bazidyospor yapıları), çeşitli kimyasal ayıraçlarla verdiği reaksiyonlar, sistit yapıları ve cheilosistit yapısının varlığı teşhislerde ayırt edici veriler olarak kullanılmıştır. Morfolojik değerlendirmeler Dr. İsmail ACAR tarafından yapılmıştır. Şekil 4.1'de *M. communis* türüne ait sistit yapısı ve bu yapının farklı solüsyonlar ile gösterdiği reaksiyonlar, Şekil 4.2'de ise bazidyospor yapıları örnek olarak verilmiştir.



Şekil 4.1. *Melanoleuca communis* türüne ait sistit yapılarının farklı belirteçlerde görünümü.

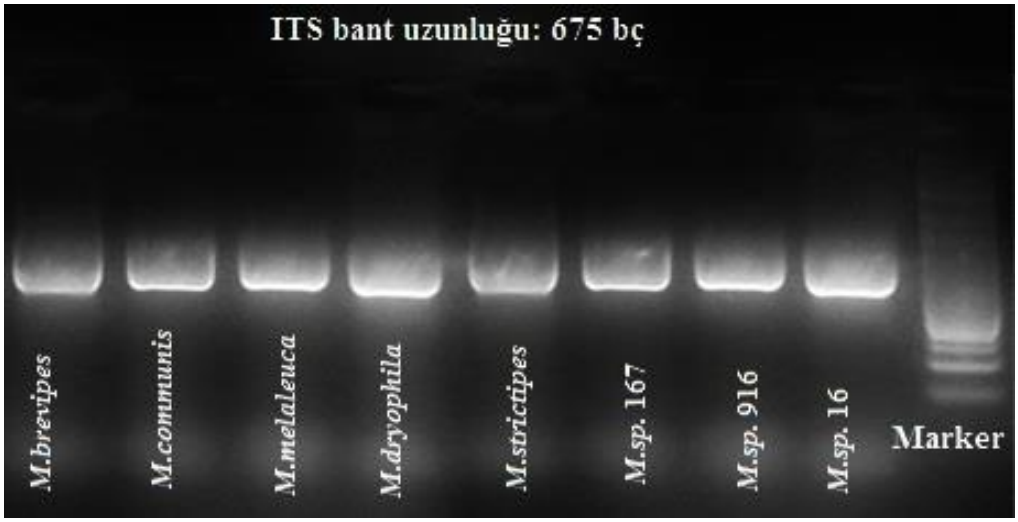


Şekil 4.2. *Melanoleuca communis* türüne ait bazidiospor yapılarının farklı belirteçlerde görünümü.

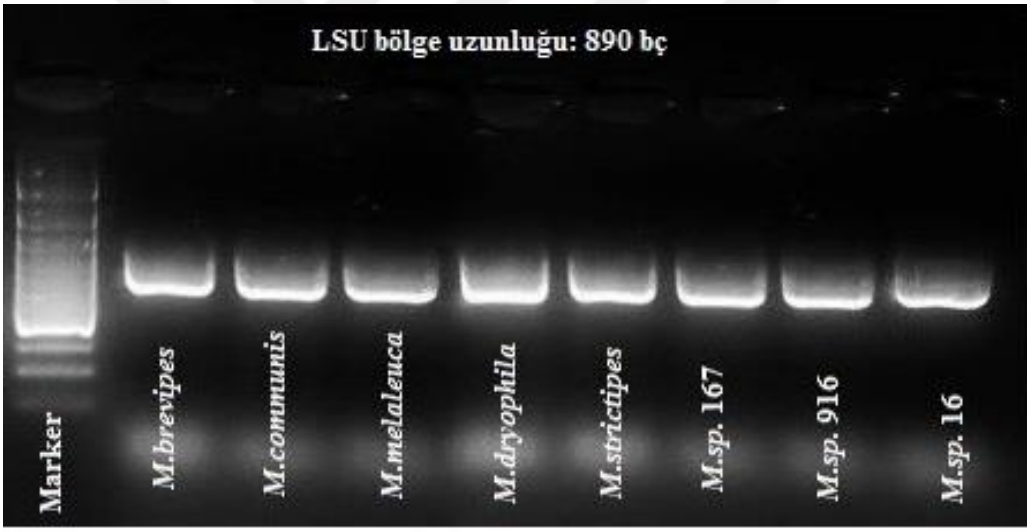
4.2. Moleküler Değerlendirme

4.2.1. Çoğaltılan gen bölgeleri

Optimize edilen PZR koşullarında (Çizelge 3.5) hedeflenen bölgeler çoğaltılmış ve elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi kullanılarak molekül büyüklüklerine göre yürütülmüştür. Oluşan bant profillerinin büyüklüklerini belirleyebilmek adına marker kullanılmıştır. ITS bölgesi için kullanılan primer çifti (Çizelge 3.3) ITS1, 5.8S ve ITS2 bölgelerini çoğaltmıştır. Çoklu dizi verileri üzerinden bu bölgeler belirlenebilmiştir. LSU için kullanılan primer çifti (Çizelge 3.4) 28S olarak ifade edilen ve D1-D2 değişken bölgelerini içeren ekzonik kısmı çoğaltmıştır. Her bölge için elde edilen bazı bant profilleri Şekil 4.3 ve 4.4'te gösterilmiştir. Bantların büyüklükleri belirlenmiş ve her bölgenin çoğaltıldığından emin olunduktan sonra DNA dizi verileri elde edilmiş ve analiz basamaklarına geçilmiştir.



Şekil 4.3. Çalışılan örneklerden bazılarının ITS bölgelerine ait PZR ürünlerinin bant profilleri (%1'lik agaroz jel). Marker: Thermo Scientific GeneRuler 50 bp.

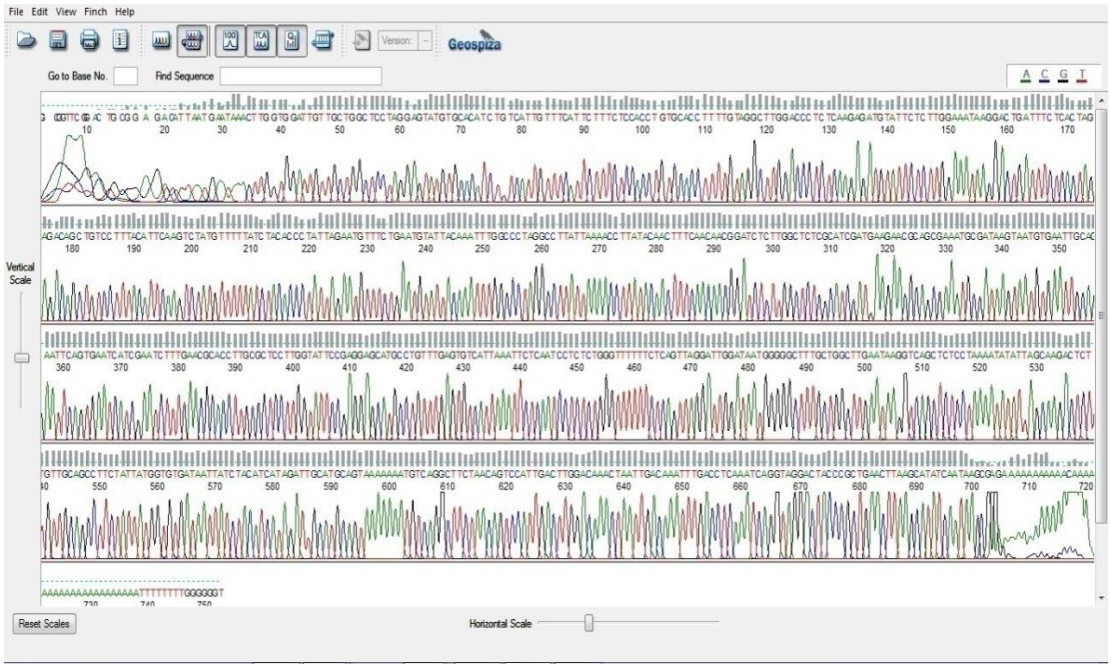


Şekil 4.4. Çalışılan örneklerden bazılarının LSU bölgelerine ait PZR ürünlerinin bant profilleri(%0.8'lik agaroz jel). Marker: Thermo Scientific GeneRuler 50 bp.

4.2.2. Dizi verilerinin tanımlanması

Her örneğe ait ITS ve LSU sekanslarının kromatogram görüntüleri Finch TV (Patterson ve ark., 2004; 2006) programı kullanılarak görünür hale getirilmiştir (Şekil 4.5 ve 4.6). Bazları temsil eden piklerin yeterince temiz olduğuna karar verildikten sonra her birey için forward ve reverse sekanslar çakıştırılarak konsensus dizi oluşturulmuştur. Oluşturulan konsensus dizi benzerlik oranını ve eşleştiği cinsi

belirlemek için Genbank veri tabanı üzerinden BLAST algoritması kullanılarak taranmıştır. Algoritma skoru her birey için en fazla benzerlik gösteren ve *Melanoleuca* cinsi içerisinde eşleşen bireyleri vermiştir, bu sonuç yapılan deneysel çalışmaların bu aşamaya kadar doğru olduğunu da ispatlamıştır.



Şekil 4.5. ITS gen bölgesine ait sekansın kromatogram görüntüsü.



Şekil 4.6. LSU gen bölgesine ait sekansın kromatogram görüntüsü.

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

ITS bölgesi;

Melanoleuca sp.

gtaggtgaacctgcggaaggatcattaatgaataaactcggtggattgttgctggctcttaggagcatgtgcacatctgccattgt
ttcattctttctccacctgtgcacctttgtaggcttggataactctcaaggatgatccttggacttggggattggtttcaagaaaacc
tctcctttgcatttccagtctatgtttttataaatatacaccccattagtatgtgttagaatgtttattatttggcctttcttttgataggcttt
aaaacttatacaactttcaacaacggatctcttggctctcgcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaatgtgaattg
cagaattcagtgaatcatcgaatctttgaacgcaccttgcgctccttggtattccgaggagcatgcctgtttgagtgtcattaaatt
ctcaatcccttctgggtttattctcagctgggcttggatatgggggttttgccggctttgcaaaggcaaagtcagctctcctgaaa
gacattagcaagactcttgttgcaaccttctatctggtgtgataattatctacatcatagattgtgcatggtctggcttctaatagtcc
attaaattggacaaaactctgacaatttgacctcaaatcaggtaggactacccgc

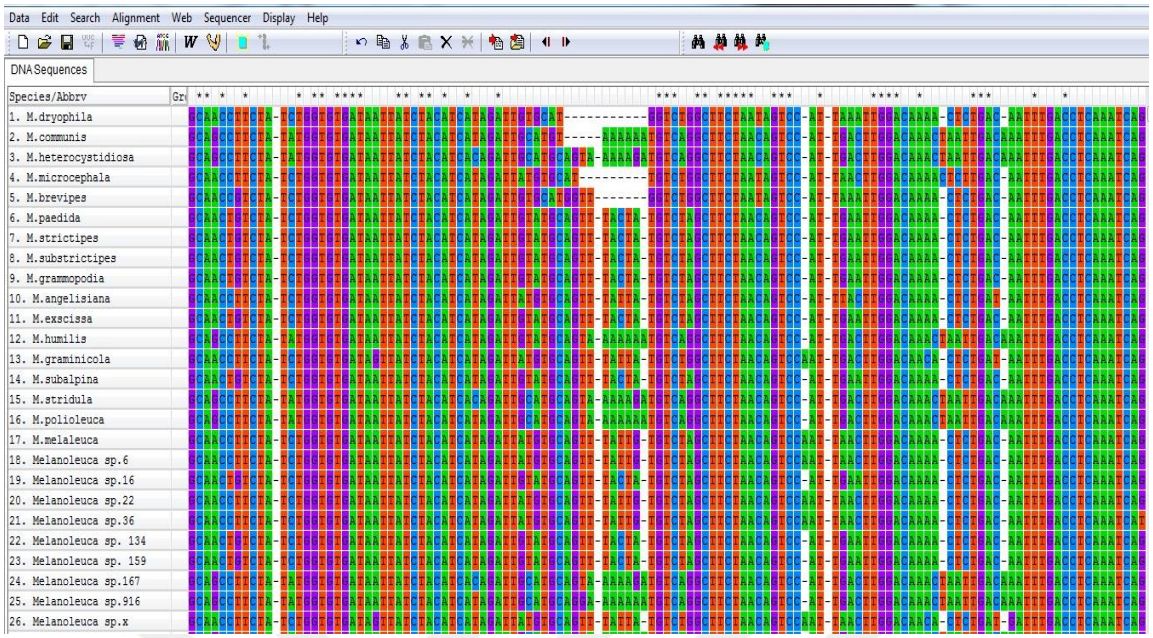
LSU bölgesi;

Melanoleuca sp.

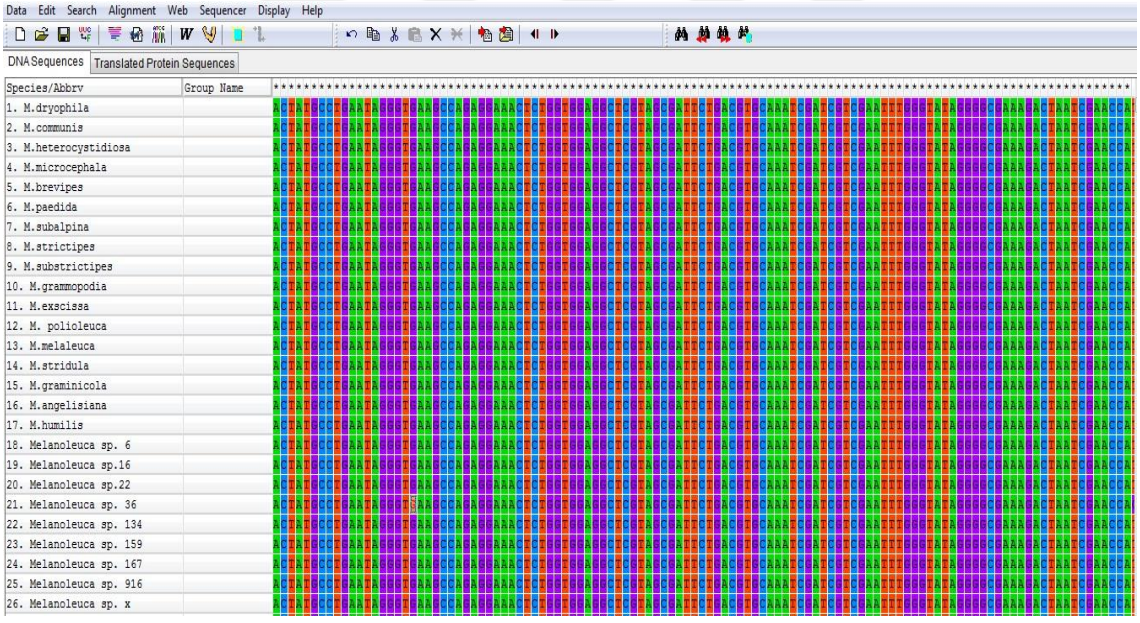
ggattcccctagtaactgcgagtgaagcgggaaaagctcaaatttaaaatctggcagtctctggctgtccgagttgtaatctaga
gaagtgttatccgcgctggaccatgtacaagtctcctggaacggagcgtcatagagggtgagaatcccgtctttgacatggact
accagggctttgtgatgcgctctcaaagagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaaatgggtggtaaattccatctaaagctaa
atattggcgagagaccgatagcgaacaagtaccgtgagggaaagatgaaaagaactttggaaagagagttaaacagtacgt
gaaattgttgaaagggaaacgcttgaagtcagtcgcattggccagggatcaaccttacatttgttgggtgtactttctggtcaatg
ggtcagcatcaattttgactgttggaaaaaggtcaggggaatgtggcatcttcggatgtgttatagcccttggttgtatacagcag
ttgggattgaggaactcagcacgccgcaaggccgggtttttaaccacgtacgtgcttaggatgctggcataatggctttaatcg
acccgtcttgaaacacggaccaaggagtctaacatgcctgcgagtgtttgggtggaaaacccatgcgcgtaatgaaagtgaa
agttgagatctctgtcgtggagagcatcgacgcccggaccagacctttgtgacggtcccgcggtagagcatgtatgttggga
cccgaaagatggtgaactatgcctgaatagggtgaagccagaggaaactctggtggaggctcgtagcgattctgacgtgcaa
atcgatcgtcgaatttgggtataggggcgaaagactaatcgaaccatc

4.2.3. Çoklu dizi hizalama

Her bireye ait ITS ve LSU gen bölgeleri için forward ve reverse sekansların çakıştırılmasıyla oluşturulan konsensus DNA sekans verileri MEGA 6.0 (Tamura ve ark., 2013) programı formatına göre düzenlenerek CLUSTALW programı ile hizalanmıştır. CLUSTAL programı genetik varyasyonları dikkate alarak diziler arası benzerliği en iyi şekilde hesaplayan ve filogenetik çalışmalarda en sık tercih edilen programlardan biridir. Materyal ve yöntem kısmında ifade edildiği gibi bu çalışmada elde edilen dizilere veri tabanından alınan diziler de ilave edilmiş ve çoklu dizi hizalama metodu ile tüm diziler bir araya getirilmiştir. Çoklu dizi hizalamanın amacı bireylerin dizileri arasındaki homolojiyi ve farklılıkları belirlemektir. Şekil 4.7 ve 4.8'de *Melanoleuca* türlerinin ITS ve LSU gen bölgelerine ait hizalanmış dizilerin görüntüsünden küçük bir kesit verilmiştir.



Şekil 4.7. *Melanoleuca* türlerinin ITS gen bölgesine ait hizalanmış sekansların görüntüsü.



Şekil 4.8. *Melanoleuca* türlerinin LSU gen bölgesine ait hizalanmış sekansların görüntüsü.

Hizalanan diziler arasındaki benzerlikler yıldız işareti ile gösterilir. Sekans içerisinde baz indeli veya nokta mutasyonu varsa yıldız işareti ile gösterilmez. Bu şekilde program üzerinden sekanslar analiz edilip populasyon içerisindeki varyasyonlar

değerlendirilmiş ve bundan sonraki filogenetik analizler bu değerlendirmeler üzerinden yapılmıştır. Türler arası genetik varyasyonu artırmak ve ülkemizde bulunan türlerle dünya genelinde bulunan türlerin evrimsel ilişkilerini göstermek için NCBI veri tabanından alınan sekanslar analize dahil edilmiştir. ITS bölgesi için toplamda 92 sekans, LSU bölgesi için toplamda 39 sekans analiz edilmiştir. Kullanılan *Melanoleuca* türlerinden, hedef bölgeler PZR metodu ile çoğaltıldıktan sonra materyal ve yöntem kısmında da bahsedildiği gibi sekanslar kendi aralarında MEGA programıyla hizalanarak moleküler çeşitliliği gösteren parametreler hesaplanmış ve bu işlemlerden sonra filogenetik ilişkileri gösteren ağaçlar çizdirilmiştir.

4.3. Filogenetik Analiz

Filogenetik analiz yapılırken ITS bölgesi için çalışılan 17 türün sekansları ile birlikte 9 tanımlanamayan birey ve Genbank veri tabanından alınan 30 türe ait 66 ITS sekansı analiz edilmiştir. Bölge uzunluğu 675 bç (*M. dryophila*) ile 694 bç (*M. paedida*) arasında değişmiştir. Tüm bireyler hizalandığında bölge uzunluğu 751 bç olmuştur. Bu durum bireylerin hizalanması ve aynı sekansların üst üste getirilmesi için çok fazla indel bölgelerinin kullanıldığını göstermektedir. MEGA programı kullanılarak her bir bölge için hesaplanan moleküler çeşitlilik parametreleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

ITS bölgesi için hizalanmış dizi setinde 95 baz bölgesinde indel ve 206 tanesi parsimoni informatif olan 296 nükleotit varyasyonu saptanmıştır. Özellikle genetik bilginin duplikasyonundaki hatalar, bir veya birkaç nükleotidin insersiyon veya delesyonuyla sonuçlanabilmektedir ve bu hatalar toplamda indel olarak ifade edilirler (Lemey ve ark., 2009). İndellerin ITS1 ve ITS2 bölgelerinde yoğunlaşması ve 5.8S bölgesinde olmaması da beklenen bir durumdur. DNA replikasyonu esnasında olan mutasyonlar ekzon olan bölgelerde dikkate alınıp DNA tamir mekanizması ile düzeltilmekte ama intron bölgelerinde her zaman düzeltilememektedir. Bu sebepten dolayı indel ve varyasyonlar ITS1 ve ITS2 bölgelerinde fazladır. Parsimoni informatif bölge sayısı varyasyondan her zaman daha az veya eşit sayıda görülmektedir, bunun sebebi ise bir bölgenin informatif sayılabilmesi için en az iki farklı dizide aynı yerde görülme zorunluluğunun olmasıdır (Dizkırıcı, 2012).

ITS dizi setinde ITS1 intron kısmında dikkat çeken bölgelerden bir tanesi "CTTATTAAAACC"dir. Bu bölge çalışılan türlerden *M. communis, M. heterocystidiosa, M. humilis, M. stridula, M. polioleuca*, *M.* sp. 167 ile Genbanktan alınan *M. polioleuca, M. arcuata*, *M. communis*, *M. heterocystidiosa*, *M. melaleuca, M. robusta, M. candida* ve *M. subpulverulenta* türlerinde görülmüştür. *M.* sp. 916 türünde bu dizi "CTTATTAAAACT" şeklinde olup Genbanktan alınan dört *M. cinereifolia* türünde de bu bölge bulunmaktadır. Türler arasında bu bölgede değişik uzunlukta indeller görülmüştür; bazı türlerde ise sadece "CTTTA" dizisine rastlanmıştır. ITS1 bölgesinde göze çarpan bir diğer kısım 240. bazlardan sonra "GTGGGGA" dizisi ile "ATTATAACA" dizisi sırasıyla *M. graminicola* ile *M. rasilis* (JF908355) türlerinde bulunmaktadır. "TTTTAATATAA" dizisi sadece *M. melaleuca* ile *M.* sp. 6 bireylerinde bulunurken diğer sekanslarda indellere rastlanmaktadır. 145. bazlarda "GGAAATTG" dizisi sadece *M.* sp. 36, *M.* sp. 6, *M.* sp. 22 ve *M. melaleuca* olarak tanımlanan bireylerde görülmektedir. Oluşturulan ITS ağacında bu bireyler aynı grupta kümelenmişlerdir. ITS2 bölgesinde en dikkat çeken bölge "AAAAGATGTCA" dizisidir. Bu dizi *M. heterocystidiosa, M. stridula* ve *M.* sp. 167 bireylerinde bulunurken, Genbanktan alınan türlerden *M. arcuata, M. heterocystidiosa, M. polioleuca, M. subpulverulenta* türlerinde de görülmüştür. Diğer tüm bireylerde bu bölgede delesyonlar saptanmıştır. ITS2 bölgesinde dikkat çeken diğer bir kısım "GGGGGGTCATT" dizisinin *M. graminicola* ile Genbanktan alınan *M. rasilis* (JF908355) türünde bulunmasıdır. *M.* sp. x bireyinde ise bu dizi "GGGGGACTGTT" şeklinde bulunmaktadır. Bir türün DNA dizisinde görülen bir varyasyonun aynı alt cinste yer alan diğer türlerde de görülmesi beklenir. *M. graminicola* ve *M. rasilis* türleri aynı alt cinse ait olmamalarına rağmen çok benzer varyasyonlar göstermişlerdir.

LSU bölgesi için Genbanktan alınan 8 türe ait 13 sekans ile tanımladığımız 17 tür ve tanımlayamadığımız 9 bireyle birlikte toplamda 39 sekans analiz edilmiştir. Tüm bireyler hizalandığında bölge uzunluğu 885 bç olmuştur. LSU bölgesi için 1 baz indeli ile 16 adet parsimoni informatif bölge saptanmıştır (Çizelge 4.3). Ekzon olan DNA bölgelerinde çerçeve kaymalarına neden olabileceği ve tüm protein yapısını bozabileceğinden dolayı LSU bölgesinde indel çok beklenmemektedir. Hizalanan dizi verisine bakıldığında oluşan indel, PolyT bölgesinden kaynaklı olduğu saptanmıştır.

PolyA, PolyT gibi bölgeleri oluşturan baz sayısı, dizileme esnasında çıkan hatalardan dolayı farklılık göstermektedir. Bu sebepten evrimsel çalışmalarda indel bölgeleri çoğunlukla analize dahil edilmemektedir. Çalışılan türler arasında en fazla genetik uzaklık *M.* sp. x ile *M. polioleuca* arasında belirlenmiştir. Bu bölgedeki indeller 545. bazlarda görülen PolyT dizilerinden sonra başlamaktadır. Varyasyon içeren kısımlar D1 ve D2 değişken bölgeleridir. Dizi setinde 63-195. bazlar arası D1 bölgesi, 355-753. bazlar arası D2 bölgesi olarak belirlenmiştir. Bu bölgelerin belirlenmesinde Guadet ve ark. (1989) çalışmalarından yararlanılmıştır. Referans sekans olarak *Saccharomyces cerevisiae* (NG_042623, Kurtzman ve Robnett, 2013) kullanılmıştır. Liu ve ark. (2012) fungal taksonlar arasında D2 bölgesinin D1 bölgesine göre daha değişken olduğunu ifade etmişlerdir. Oluşturduğumuz dizi seti değerlendirildiğinde bu bilgiyi destekler nitelikte olmuştur. Yani D2 bölgesi olarak belirlenen bölge D1 bölgesine göre daha fazla varyasyon içermektedir.

LSU dizi setinde en dikkat çeken varyasyon *M. graminicola* türünde görülen tek nükleotit varyasyonlarıdır. Tüm dizi değerlendirildiğinde transisyon mutasyonlar göze çarpmaktadır. Özellikle sitozin bazı yerine timin olması en göze çarpan sübstitüsyondur. Dizi seti genetik açıdan değerlendirildiğinde "TTTTTTACCACGT" dizisi sadece *M.* sp. x bireyinde tek nükleotit varyasyonu barındırarak "TTTATAACCACGT" şeklinde bulunmaktadır. Diğer bazı sekanslarda bu dizi içerisinde indeller oluşmuştur. *M. communis, M. melaleuca* ve *M. substrictipes* türlerinde ise bu dizi "TTTTTTACCACGT" şeklindedir. Yine *M.* sp. x bireyinde "TTTCTAGT" şeklinde bulunan dizi diğer tüm sekanslarda "TTTCTGGT" olarak görülmüştür. *M.* sp. x bireyinde dikkat çeken bu varyasyonlar, oluşturulan filogenetik ağaçta bu örneğin diğer tüm türlerden farklı bir pozisyon almasına neden olmuştur. Bir diğer göze çarpan varyasyon ise "CACATTGGTCAG" dizisinin *M. graminicola* ile *M.* sp. 167 bireylerinde bulunmasıdır ve bu türler filogenetik ağaçta aynı kladda yer alarak diğer akraba türlerden ayrı bir konumda yer almışlardır. Ancak bu varyasyon, bu türlerin farklı alt cinslere ait olmasından ötürü bilgi verici bulunmamıştır. Genbank veri tabanında *M. graminicola* türüne ait LSU sekans verisi olmadığı için çalışılan türün sekansı ile karşılaştırma yapılamamıştır.

Çizelge 4.3. Tüm sekanslar (Genbank örnekleri dahil) kullanılarak elde edilen ITS ve LSU bölgelerinden hesaplanan moleküler çeşitlilik parametreleri

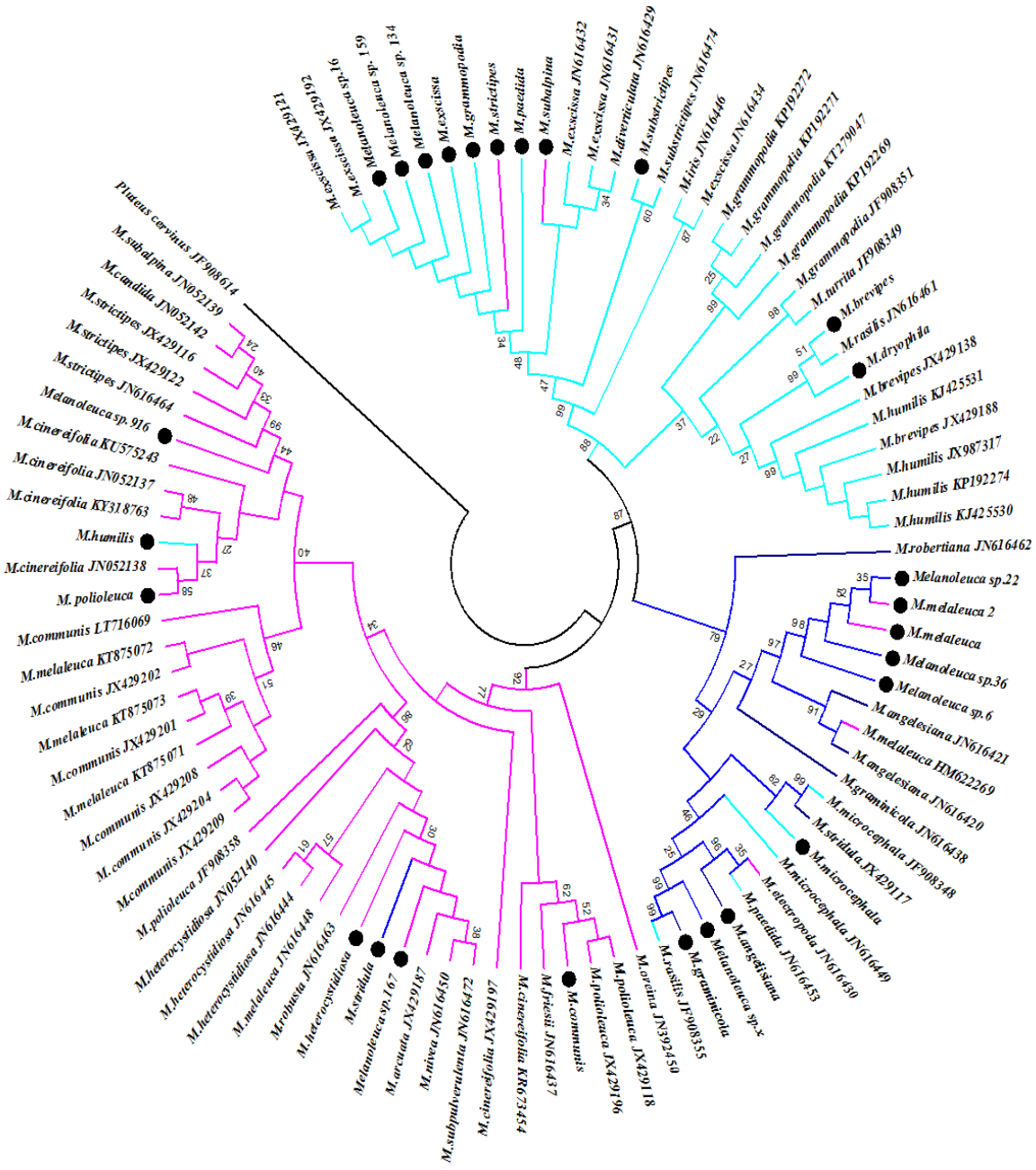
Parametreler	**ITS**	**LSU**
Takson sayısı	30	17
Sekans sayısı	93	39
Total uzunluk (bç)	751	885
Varyasyon	296	27
Parsimoni informatif sayısı	206	15
İndel sayısı (bç)	95	1
Ortalama uzaklık	0.068	0.005

Her gen bölgesi için oluşturulan dizi setleri filogenetik olarak analiz edilip moleküler çeşitlilik parametreleri hesaplandıktan sonra elde edilen bu verilerin grafiksel gösterimi için filogenetik ağaçlar çizdirilmiştir. Filogenetik ağaçlar oluşturulurken evrimsel uzaklıklar Tamura-3 metodu kullanılarak hesaplanmış ve elde edilen ağacın güvenirliliğini artırmak için 500 bootstrap tekrarı yapılmıştır (Felsenstein, 1985). T92+G (Tamura-3+Gamma) kullanımıyla Maksimum Likelihood bootstrap analizleri, Maksimum Parsimony bootstrap analizleri ile benzer sonuçlar vermiştir. Yapılan analizler ile oluşturulan filogenetik ağaç verileri alt cins bazında değerlendirilmiştir. Alt cins değerlendirmesi Bon (1991) ve Boekhout (1988, 1999) sınıflandırılmasına göre yapılmıştır. Oluşturulan filogenetik ağaçlar Şekil 4.9 ve 4.10'de gösterilmiştir. Her tür için iki örnekten sekanslar elde edilmiş ve diziler arası varyasyon görülmediğinden filogenetik ağaçta sadece bir örnek kullanılmıştır. Morfolojik olarak tanımlanan 17 örnek ile tanımlanamayan 9 örnek değerlendirilerek 25 örneğin tanımlaması yapılmış ve sadece 1 örnek tanımlanamamıştır. 11 örnek *Urticocystis* altcinsi içerisinde, 7 örnek *Melanoleuca* altcinsi içerisinde yer almıştır. 8 örnek ise belirsiz bir kladda kümelenmişlerdir.

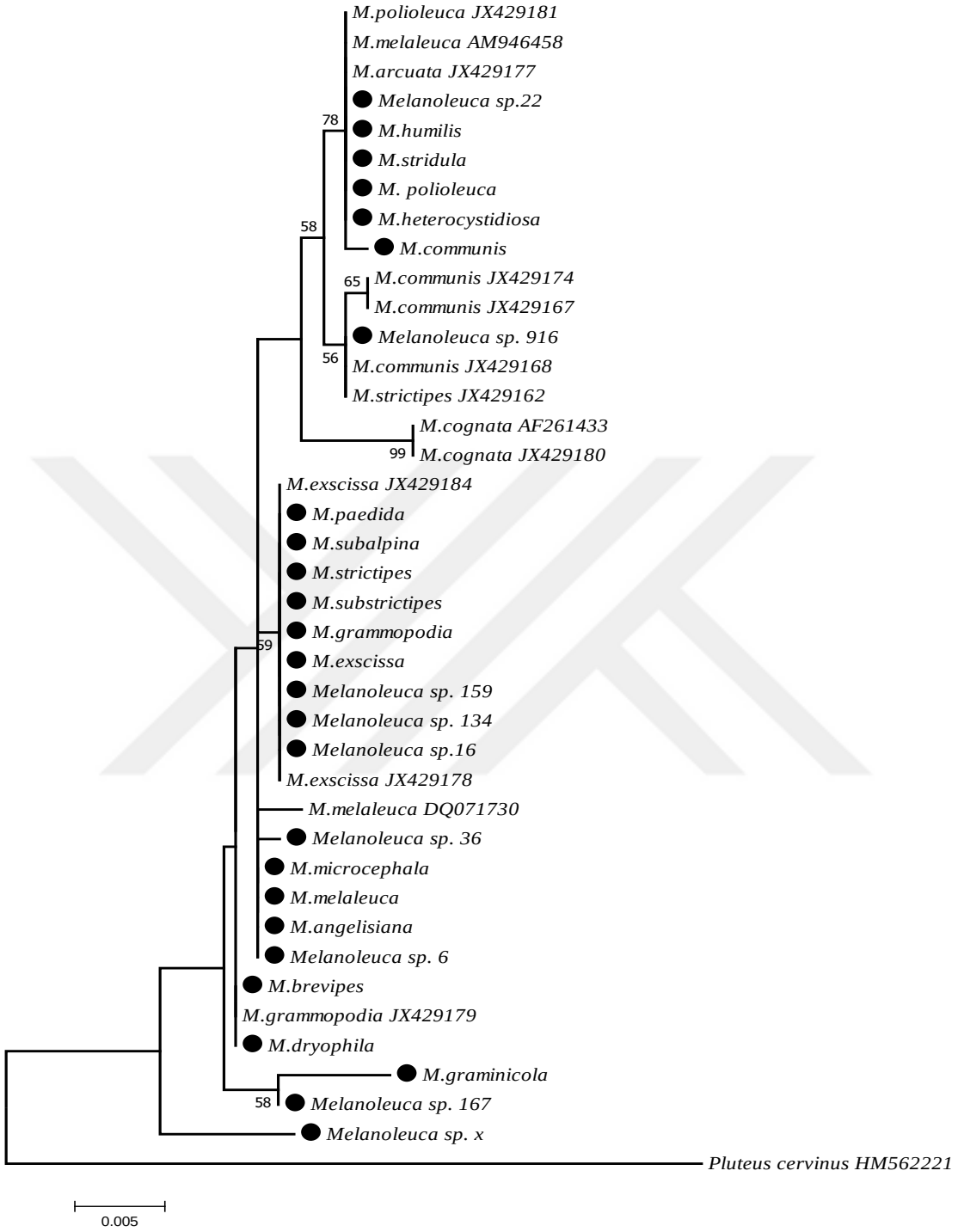
Türler arası evrimsel ilişkileri ve taksonomik pozisyonları görmek için ITS bölgesine ait DNA dizisi kullanılarak çizdirilen ağaçta iki ana klad oluşmuştur (Şekil 4.9). Bu kladlar *Melanoleuca* ve *Urticocystis* alt cinslerinde bulunan ve bu çalışmada

kullanılan türler ile veri tabanından alınan türleri içermektedir. *Acystis, Melanoleuca* ve *Urticocystis* alt cinsine ait bazı bireyler ITS ağacında farklı bir kladda kümelenmiş ancak tam olarak alt cins seviyesinde değerlendirilememiştir. Bu nedenle alt cins değerlendirmesi *Melanoleuca* ve *Urticocystis* şeklinde yapılabilmiştir. Bulundukları klada ait olmayan bireyler ait oldukları kladın renginde gösterilmiştir (Şekil 4.9). Morfolojik ve mikroskobik karakterler kullanılarak yapılan teşhislerde yaşanan problemlerden ötürü gösterilen türler beklenen alt cinslerde yer almamış olabilir. Elde edilen tüm veriler (makroskobik, mikroskobik ve moleküler) yeniden dikkate alınarak tür teşhisleri gözden geçirilmiştir.

Türler arası evrimsel ilişkiler LSU bölgesinden alınan diziler kullanılarak da anlaşılmaya çalışılmıştır. Fakat çizdirilen ağaçta (Şekil 4.10) evrimsel ayrım alt cins seviyesinde dahi yapılamamıştır. Oluşturulan ağaçta takson sayısı ITS ağacına göre daha azdır. Ayrıca dizi içerisinde bulunan parsimoni informatif bölge sayısı da yeterli değildir. LSU bölgesi ekzonik bir bölgedir ve kodlama yaptığı için evrimsel süreçte korunmuştur. Korunan bölgeler intronik bölgelere göre daha az varyasyon gösterir. Bundan dolayı çizdirilen ağaç evrimsel düzeyde yeterli ayrımı sağlayamamış ve yeterince bilgi verici bulunamamıştır.



Şekil 4.9. ITS gen bölgesine ait ML metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç. Daire ile işaretli türler çalışmada kullanılan türlerdir. Diğer türler Genbank veri tabanından alınmıştır (*Pluteus cervinus* dış grup). Mor dallar *Melanoleuca* alt cinsini, mavi dallar *Urticocystis* alt cinsini, lacivert dallar ise belirsiz kladı göstermektedir. Bulunduğu klada ait olmayan bireyler ait oldukları kladın renginde gösterilmiştir.



Şekil 4.10. LSU gen bölgesine ait ML metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç. Daire ile işaretli türler çalışmada kullanılan türlerdir. Diğer türler Genbank veri tabanından alınmıştır (*Pluteus cervinus* dış grup).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Organizmalar bulundukları habitata adaptasyon süreçlerinde hayatta kalabilmek için morfolojik ve genetik değişimler göstermektedirler. Biyoçeşitliliğin bir parçası olan funguslar da üremek ve canlılıklarını sürdürmek için bulundukları çevreye adapte olmak zorundadırlar. Bu adaptasyonun bir sonucu olarak yaşanan değişimler organizma için çoğu zaman homoplazik özellikler olarak karşımıza çıkabilmektedir. Evrimsel süreçte homoplaziyi homolojiden ayırmak zaman zaman güç olabilmekte ve araştırmacıları yanılgıya düşürebilmektedir. Bu sebeple fungus türlerinin tanımlanmaları çoğu zaman morfolojik özelliklerinin benzerliğinden dolayı zordur.

Bu çalışmada, doğadan toplanan ve *Melanoleuca* cinsine ait olduğu düşünülen mantarlar ilk olarak makroskobik ve mikroskobik karakterler kullanılarak teşhis edilmeye çalışılmıştır. Alanında uzman araştırmacıların yardımıyla yapılan teşhislerden sonra moleküler analizler yapılmış ve dizilerin gösterdikleri homolojiler dikkate alınarak türler en güvenilir şekilde teşhis edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla iki farklı gen bölgesi analiz edilmiş ve elde edilen veriler bir filogram üzerinde grafiksel olarak gösterilmiştir. Dizilerden elde edilen verilerle, çalışılan bireylerin evrimsel ilişkileri alt cins seviyesinde değerlendirilebilmiştir. Makroskobik ve mikroskobik karakterler kullanılarak tanımlanamayan 9 türün teşhisleri diğer türlerle olan evrimsel akrabalıkları değerlendirilerek yapılmıştır. ITS verisi için oluşturulan filogenetik ağaçta, LSU ağacına göre daha yüksek bootstrap değerleri alınmıştır. Filogenetik analizlerde, bootstrap değerinin 70 ve üzerinde olması evrimsel ilişkilerin belirlenmesinde güvenilir olarak kabul edilir. Elde edilen filogenetik ağaçlardan ITS ağacında alt cins seviyesinde filogenetik ayrım yapılabilmiştir. Ağaçta iki ana klad oluşmuş ve bu kladlar *Melanoleuca* (%92 bootstrap) ve *Urticocystis* (%88 bootstrap) alt cinsleri olarak belirlenmiştir. Bu alt cinsler aşağıda anlatılmıştır. Bu alt cinsleri oluşturan türler morfolojik açıdan ortak özellikler sergilemektedir. *Melanoleuca* alt cinsi sistit yapısına sahip değilken, *Urticocystis* alt cinsi urticoform sistit yapısına sahiptir (Boekhout, 1988). LSU ağacı için net bir alt cins ayrımı olmamıştır. Vizzini ve ark. (2011) tarafından ITS bölgesinin analizi sonucu *Melanoleuca* cinsinin monofletik olduğu ve

sadece iki alt cinse ayrıldığı bildirilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen veriler bu sonucu destekler nitelikte olmuştur.

5.1. *Melanoleuca* Alt Cinsinin Filogenetik Değerlendirilmesi

ITS bölgesi dizileri kullanılarak çizdirilen filogenetik ağaçta, *Melanoleuca* alt cinsi barındırdığı takson sayısı bakımından *Urticocystis* alt cinsine göre daha geniş bir içeriğe sahiptir. Bu grup %92 bootstrap değeri ile monofletik bulunmuştur. Taksonomik olarak bu alt cins içerisinde kümelenen *Melanoleuca* örnekleri ayrıntılı olarak aşağıda ele alınmıştır.

Genbanktan alınan *Melanoleuca stridula* türü belirsiz kladda yer alırken çalışılan *M. stridula* türü oluşturulan ITS ağacında *Melanoleuca* alt cinsi içerisinde yer almıştır. Hem ITS hem de LSU ağacında *M. heterocystidiosa* türleri ile grup oluşturmuştur. Detaylı mikroskobik analizler yapıldığında *M. stridula* türünün sistit yapısı bulundurmadığı belirlenmiştir (Bon, 1991). *Melanoleuca* alt cinsi, sistit yapısına sahip değildir (Boekhout, 1988) dolayısıyla çalışılan tür bu alt cinse ait olabilir. Ancak, Bon (1991) ve Boekhout (1988, 1999) tarafından *Acystis* alt cinsine ait olduğu bildirilmiştir. Moleküler olarak benzerlik gösterdiği türler de (*M. heterocystidiosa*, *M. communis*) incelenmiş ve bu türlerin sistit yapılarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla daha önceden *M. stridula* olarak teşhis edilen örneğin ismi değiştirilmeyip, muhtemel filocoğrafik etkilerden ötürü DNA yapısında meydana gelen değişiklikler ile farklı alt cins içerisinde yer almış olabileceği sonucuna varılmıştır.

Melanoleuca humilis türüne ait Genbank sekansları ITS ağacında *Urticocystis* alt cinsinde yer almalarına rağmen çalışılan *M. humilis* türü *Melanoleuca* alt cinsinde yer almıştır. Morfolojik açıdan *M. humilis* ve *M. polioleuca* türleri benzerlik göstermektedir. Ancak mikroskobik karakterleri detaylı incelendiğinde iki türün ayrımı yapılabilmektedir. *M. humilis*'in sistit ölçüleri 50-85 x 7-15 µm boyutlarında ve uç kısımları kalın duvarlı iken (Breitenbach ve Kränzlin, 1991), *M. polioleuca*'nın sistit ölçüleri 40-70 x 8-15 µm boyutlarında ve uç kısmı kristalize şeklindedir (Boekhout, 1999). Daha önceden *M. humilis* olarak tanımlanan örneğin, *M. polioleuca*'nın sistit ölçüleri ve şekline sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Genbankta bulunan *M.*

polioleuca türleri ile gösterdiği yüksek moleküler homoloji dikkate alınarak bu bireyin *M. humilis* değil *M. polioleuca* olabileceğine karar verilmiştir.

Melanoleuca alt cinsi içerisinde yer alan, ve *M. heterocystidiosa* olarak tanımlanan türün morfolojik ve genetik özellikleri değerlendirildiğinde teşhiste sorun olmadığı ve ağaçta taksonomik olarak beklenen pozisyonda yer aldığı görülmüştür. Tür, Türkiye mikobiyotası için yeni kayıttır.

M. communis olarak tanımlanan birey, her iki ağaçta da Genbank veri tabanından alınan *M. communis* türleri ile yakın konumda yer almıştır. Hem morfolojik hem de moleküler veriler doğrultusunda teşhiste problem olmadığı görülmüştür. Bu tür Türkiye mikobiyotası için yeni kayıttır.

Tam olarak teşhisi yapılamayan *M.* sp. 167, *M. arcuata* (JX429187) ile birlikte bu alt cinste yer alarak %100 moleküler homoloji göstermiştir. Morfolojik karakterleri; Şapka; 25-50 mm boyutlarında, kahverengi renkte, merkez hafif içe doğru basık ve siyahımsı renkte, Lameller; kirli beyaz renkte, Sporlar; 7-9.5 x 4.5-5 µm boyutlarında, elipsoid (Vesterholt, 2008) şeklinde belirlenmiştir. Makroskobik ve mikroskobik karakterleri incelendiğinde *M. arcuata* olabileceğine karar verilmiştir.

M. sp. 916 olarak tanımlanan birey, *M. cinereifolia* ve *M. communis* ile yüksek homoloji değerleri göstermiş ve ITS ağacında aynı grup içerisinde konumlanmıştır. *M.* sp. 916 ve *M. communis* bireyleri arasındaki yakın evrimsel ilişki LSU ağacında da gözlemlenmiş ve Genbanktan alınan *M. communis* türleriyle grup oluşturmuştur. Saba ve Khalid (2014) tarafından *M. cinereifolia* ile *M. communis* türlerinin hem morfolojik hem de filogenetik açıdan çok benzer oldukları ve sadece şapka rengi ve boyutu ile farklılık gösterdikleri bildirilmiştir. Ayrıca *M. cinereifolia* türü kumlu bölgelerde yetişmekteyken (Sánchez-Garcia ve ark., 2013), *M.* sp. 916 olarak tanımlanan birey *M. communis* ile aynı habitatı paylaşmaktadır. Morfolojik karakterleri; Şapka; 30-150 mm boyutlarında, kahverengi- grimsi kahverengi- sarımsı kahverengi renkte, Sap; 40-170 x 4-16 mm boyutlarında, cheilosistit; 50-80(90) × 8-18(20) µm boyutlarında, Sporlar; 6-9(10) × 4-6 µm boyutlarında, elipsoid, amyloid ve siğilsizdir (Sánchez-Garcia ve ark., 2013). Bu veriler değerlendirildiğinde *M.* sp. 916 bireyinin *M. communis* olabileceğine karar verilmiştir.

5.2. *Urticocystis* Alt Cinsinin Filogenetik Değerlendirilmesi

Bu grup %88 bootstrap değeri ile monofletik bulunmuştur. Alt cins içerisinde yer alan bireyler aşağıda ele alınmıştır.

Urticocystis alt cinsi içerisinde yer alan *M. brevipes* örneği Genbanktan alınan *M. brevipes* türleri ile yakın konumda yer almış ve *M. dryophila* ve *M. rasilis* (JN616461) ile %99 bootstrap değeri ile grup oluşturmuştur. ITS ağacında aynı grup içerisinde yer almalarına rağmen dal uzunlukları farklı olmuştur. Vizzini ve ark. (2011) tarafından bu iki türün morfolojik olarak çok benzer oldukları ancak moleküler açıdan farklı oldukları bildirilmiştir. *M. brevipes*'in, *M. rasilis*'e olan morfolojik benzerliği, *M. rasilis* olabileceğini düşündürmüş ancak morfolojik değerlendirmeler yapıldığında çok fazla homoplazi sergiledikleri ve birkaç morfolojik özellikleri bakımından ayrıldıkları belirlenmiştir. *M. brevipes* türünün sporları üzerinde geniş siğil yapıları bulunurken, *M. rasilis* türünde daha az siğil yapısı gözlenmektedir (Boekhout, 1988). Ayrıca *M. rasilis* daha küçük bazidyum yapısına sahiptir (Boekhout, 1999). Bu sebeple *M. brevipes* olarak tanımlanan bireyin isimlendirilmesi moleküler verilerden sonra da değiştirilmemiştir.

M. dryophila için beklenen alt cins içerisinde yer aldığı görülmüştür. Bu tür Türkiye mikobiyotası için yeni kayıttır. Türe ait dizi verisi Genbank veri tabanında mevcut değildir. Bu açıdan hem dünya hem de ülkemizde ilk olarak bu tez çalışmasıyla moleküler açıdan tanımlanmıştır. Morfolojik karakterleri; 30-150 mm şapka boyutu, beyazımsı düz konveks şapka yapısı, 60-130 x 10-45 sap boyutu, 5-7(8) × 3,5-4,5 µm spor ölçüleri, düz küresel hiyalin spor yapısı şeklinde Murrill (1913) literatürü esas alınarak belirlenmiştir. Ayrıca sporlarında siğil yapısı bulundurmadığı için bu özelliği ile neredeyse tüm türlerden ayrılmaktadır.

M. strictipes türü *Melanoleuca* alt cinsinde gösterilmesine rağmen ITS ağacında *Urticocystis* alt cinsinde konumlanmıştır. Moleküler açıdan *M. exscissa* ile %100 homoloji göstermiştir. Detaylı mikroskobik incelemeler neticesinde iki tür ayırt edilebilmektedir. *M. strictipes* türünün sistit ölçüleri; 40-50 x 10-13 µm boyutlarında ve uç kısmı kristalize şeklindeyken (Vesterholt, 2008), *M. exscissa* için sistit ölçüleri; 45-55 x 8-12 µm boyutlarında ve uç kısımlara doğru kalınlaşan bir yapıya sahiptir

(Breitenbach ve Kränzlin, 1991). Bu veriler ile çalışılan örneğin, *M. exscissa* olabileceğine karar verilmiştir.

M. paedida türü ağaçta beklenen konumda yer almış ve *M. exscissa* türleri ile grup oluşturmuştur. Morfolojik olarak *M. exscissa* ile benzerlik göstermektedir ancak mikroskobik karakterleri ile ayırt edilebilmektedir. *M. paedida* türünün sistit ölçüleri; 40-50 x 5-8 µm boyutlarında ve iğ şeklinde iken *M. exscissa* için; 45-55 x 8-12 µm boyutlarında ve tepeye doğru kalınlaşan sistit yapısı belirlenmiştir (Breitenbach ve Kränzlin, 1991). Bu veriler ile teşhiste problem olmadığı belirlenmiştir.

Tanımlanamayan üç tür olan *M.* sp. 16, *M.* sp. 134, *M.* sp. 159 türleri hem ITS hem de LSU ağaçlarında *M. exscissa* grubu içerisinde yer almış ve *M. exscissa* türü ile %99 moleküler homoloji göstermişlerdir. Morfolojik olarak değerlendirildiklerinde ise *M. exscissa* ile hem makroskobik hem de mikroskobik açıdan çok benzer oldukları görülmüştür. Bu veriler doğrultusunda *M. exscissa* olabilecekleri sonucuna varılmıştır.

Morfolojik analizlerle *M. strictipes* ve *M. subalpina* olarak tanımlanan bireyler oluşturulan filogenetik ağaçlarda aynı kladda ve yakın pozisyonda yer almış ancak *Melanoleuca* alt cinsi içerisinde bulunmaları gerekirken *Urticocystis* alt cinsinde konumlanmışlardır. *M. subalpina* türü Duriska ve ark. (2017) tarafından *M. strictipes* kladı içerisinde gösterilmiş ve bu iki türün benzer oldukları, bu benzerlikten ötürü *M. subalpina*'nın çoğu zaman *M. strictipes* olarak tanımlandığı belirtilmiştir. Bu bilgi doğrultusunda iki türün karşılaştırılması yapılmış ve morfolojik karakterlerinin çok benzer oldukları ve *M. exscissa* ile uyumlu oldukları belirlenmiştir. Morfolojik karakterleri; Şapka; 50-85 mm boyutlarında, parlak ve gri kahverengi renkte, Sap; 40-60 x 5-8 boyutlarında, silindirik ve kahverengimsi renkte, Sporlar; 6.6(7)-10 x 4-5.5 µm boyutlarında, eliptik, siğilli, Cheilosistit; 45-55 x 8-12 µm boyutlarındadır (Breitenbach ve Kränzlin, 1991). Ayrıca *M. subalpina*, %99 moleküler benzerlik oranıyla *M. exscissa* ile *M. strictipes* ise %100 moleküler benzerlik oranıyla *M. exscissa* ile eşleşmiştir. Bu veriler doğrultusunda bu iki türün *M. exscissa* olabileceklerine karar verilmiştir.

M. diverticulata ile *M. exscissa* hem morfolojik hem de filogenetik açıdan benzerlik göstermektedirler. Ancak Vizzini ve ark. (2011) tarafından *M. diverticulata*'nın *M. exscissa*'dan moleküler açıdan farklı olduğu bildirilmiştir. Oluşturulan ITS ağacında *M. diverticulata* türü, *M. exscissa* türleri ile aynı grupta yer

almasına rağmen *M. exscissa* türlerinden genetik uzaklığı farklı olmuştur (Şekil 4.3). Bu da, bu iki türün DNA dizileri arasında varyasyon olduğunu göstermektedir. *M. exscissa* olarak tanımlanan tür, beklenen konumda yer almış ve Genbanktan alınan *M. exscissa* türleri ile %100 bootstrap değeri ile aynı kladda konumlanmıştır. Yani *M. exscissa* türünün taksonomik pozisyonu için problem olmadığı görülmüştür.

M. grammopodia türü, morfolojik olarak diğer türlerden sapında bulunan uzunlamasına çizgilerden ötürü kolayca ayırt edilebilmektedir (Boekhout, 1999). Morfolojik ve moleküler veriler birlikte değerlendirildiğinde *M. grammopodia* türünün teşhisinde problem olmadığı belirlenmiştir.

ITS ağacında *Urticocystis* ve *Melanoleuca* kladları dışında *Urticocystis* kladı ile komşu olan belirsiz bir klad oluşmuş ve bu klad içerisinde Boekhout (1988, 1999) ve Bon (1991) sınıflandırmasına göre değerlendirildiğinde farklı alt cinslere ait bireyler yer almıştır. Bu sebeple bu grup polifletik bulunmuştur. Çalışılan türlerden *M. microcephala*, *M. graminicola*, *M. melaleuca*, *M.* sp. x, *M.* sp. 6, *M.* sp. 22, *M.* sp. 36 ve *M. angelesiana* bu kladda yer almışlardır. Boekhout (1988, 1999) ve Bon (1991) sınıflandırmasına göre *M. microcephala*, *M. graminicola* ve *M. angelesiana* türleri *Acystis* alt cinsi içerisinde gösterilmektedir.

M. graminicola olarak tanımlanan birey, Genbanktan alınan *M. rasilis* (JF908355) ile %99 bootstrap değeri ile aynı kladda yer almıştır. Morfolojik olarak benzerlik gösteren bu türlerin ayrımı detaylı analizlerle yapılabilmektedir. *M. graminicola* için Sporlar; 5.5- 8 x 4.5- 6 µm, eliptik ve siğilli, *M. rasilis* için; 6-8 x 4-6 µm boyutlarında, eliptik ve siğilli şeklinde belirlenmiştir (Vesterholt, 2008). Ayrıca *M. graminicola* türünün sistit yapısı bulundurmadığı ancak *M. rasilis* türünün sistit yapıları olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple, daha önceden *M. graminicola* olarak tanımlanan birey için teşhiste problem olmadığı görülmüştür.

M. sp. x, ITS ağacında *M. graminicola* ve *M. rasilis* (JF908355) ile aynı grupta %99 bootstrap değeri ile yer almıştır. LSU ağacında ise akraba türlerden uzak bir konumda *M. graminicola* ile birlikte konumlanmıştır. Yapılan morfolojik değerlendirmelerde *M. graminicola* ve *M. rasilis* (JF908355) türlerine benzemediği belirlenmiş ve tek başına moleküler veriler bu birey için yeterince bilgi verici olmamıştır. Bundan dolayı tam teşhisi yapılamamıştır. Bu türün çalışılan ve veri

tabanında bulunan türlerle net bir homoloji göstermemesinden ötürü yeni bir tür olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple bu tür üzerinde çalışmalar sürdürülecektir.

M. microcephala türü, *Urticocystis* alt cinsinde gösterilmesine rağmen Genbanktan alınan *M. microcephala* (JF908348) ve *M. stridula* (JX429117) ile %82 bootstrap değeri ile belirsiz kladda yer almıştır. Morfolojik karakterleri; Şapka; 10-30 mm boyutlarında, sarımsı kahverengiden koyu kahverengi renkte, Sporlar; 6-8 x 4-5 µm boyutlarında, elipsoid ve siğilli, cheilosistit; 40-60 x 6-10 µm şeklinde belirlenmiştir (Vesterholt, 2008). *M. stridula* türü, sistit yapısının olmayışı ile *M. microcephala*'dan ayırt edilebilmektedir. Bu veriler doğrultusunda *M. microcephala* için teşhiste problem olmadığı görülmüştür.

M. sp. 6, *M.* sp. 36 ve *M.* sp. 22 bireyleri, *M. melaleuca* türü ile %97 bootstrap değeriyle belirsiz klad içerisinde kümelenmişlerdir. *M. melaleuca* türü *Melanoleuca* alt cinsinde gösterilmesine rağmen hem çalışılan *M. melaleuca* türleri hem de Genbanktan alınan *M. melaleuca* (HM622269) türü bu kladda yer almışlardır. Morfolojik açıdan değerlendirildiğinde *M.*sp. 6 bireyi ile *M. melaleuca*; Şapka; 20-30 mm boyutlarında ve gri-kahverengi veya koyu kahverengi renkte, Sporlar; 5.5-8 x 4.5-6 µm boyutlarında, elipsoid amiloid siğilli ve cheilosistit yapısının yokluğu ile karakterizedir (Kuo ve Methven, 2014). Ayrıca bulundukları habitatlar benzer olmakla birlikte sıklıkla yol kenarları, ormanların açık alanlarında sonbahar aylarında gözlenmektedirler. Bu veriler ile *M.* sp. 6 bireyinin *M. melaleuca* olabileceği belirlenmiştir. *M.* sp. 22 ve *M.* sp. 36 için veriler yeterli olmamış ve net bir tanımlama yapılamamıştır.

Morfolojik analizlerle *M. angelesiana* olarak tanımlanan birey için teşhiste problem olmadığı görülmüştür. ITS ağacında Genbanktan alınan *M. angelesiana* türleriyle ve *M. melaleuca* (HM622269) türü ile belirsiz kladda kümelenmiştir. Morfolojik karakterleri *M. melaleuca* türüne çok benzemektedir (koyu kahverengi şapka ve cheilosistit yapısının olmayışı). Detaylı morfolojik analizlerle türler ayırt edilebilmektedir. *M. angelesiana* için morfolojik karakterler; Şapka; 30-90 mm boyutlarında, konveks ve merkezi bir tepe yapısı bulunduran koyu kahverengi renkte, Sporlar; 8-10 x 5.5-6.5 µm boyutlarında, eliptik amyloid siğilli şeklinde (Gillman ve Miller, 1977), *M. melaleuca* için; Şapka; 20-30 mm boyutlarında ve gri-kahverengi veya koyu kahverengi renkte, Sporlar; 5.5-8 x 4.5-6 µm boyutlarında, elipsoid, amyloid

ve siğillidir (Kuo ve Methven, 2014). *M. angelesiana*, Türkiye mikobiyotası için yeni kayıttır.

Tüm bu analizler ile yeniden değerlendirilen ve belirlenen türler tablo halinde Çizelge 5.1'de gösterilmiştir. Sonuç olarak çalışılan 35 örnek içerisinde 4 örneğin (*M. communis*, *M. dryophila*, *M. heterocystidiosa* ve *M. angelesiana*) Türkiye mikobiyotası için yeni kayıt oldukları tespit edilmiştir.

Çizelge 5.1. Yapılan morfolojik ve moleküler değerlendirmeler sonucunda belirlenen tür isimleri

Morfolojik teşhisler	**Morfolojik ve moleküler verilerin analiziyle yapılan teşhisler**
***Melanoleuca humilis* (Pers.) Pat.**	***Melanoleuca polioleuca*** (Fr.) Kühner & Maire
***Melanoleuca strictipes* (P. Karst.) Jul. Schäff.**	***Melanoleuca exscissa*** (Fr.) Singer
***Melanoleuca subalpina* (Britz.) Bresinsky & Stangl**	***Melanoleuca exscissa*** (Fr.) Singer
***M.* sp. 6**	***Melanoleuca melaleuca*** (Pers.) Murrill
***M.* sp. 16**	***Melanoleuca exscissa*** (Fr.) Singer
***M.* sp. 134**	***Melanoleuca exscissa*** (Fr.) Singer
***M.* sp. 159**	***Melanoleuca exscissa*** (Fr.) Singer
***M.* sp. 167**	***Melanoleuca arcuata*** (Bull.) Singer
***M.* sp. 916**	***Melanoleuca communis*** M. Sánchez-García&Cifuentes
***M.* sp. x**	Tanımlanamadı
***M.*sp. 22**	Tanımlanamadı
***M.*sp. 36**	Tanımlanamadı

LSU bölgesinden elde edilen diziler kullanılarak çizdirilen ağaçta kladların ayrımı net bir şekilde olmamış ve alt cins bazında evrimsel olarak bir ayrım belirlenememiştir. Bu sonucun LSU bölgesinde varyasyon sayısının az olmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Ayrıca bir filogenetik ağacın barındırdığı takson sayısı ne kadar fazla ise bilgi vericiliği ve güvenirliliği de o derece fazla olacaktır. Bu nedenle ITS verileri için oluşturulan filogenetik ağaç hem içerdiği takson hem de varyasyon sayısı bakımından daha bilgi verici bulunmuştur. LSU bölgesi ekzonik bir bölgedir ve çoğaltılan bölge içerisinde D1-D2 değişken bölgeleri de bulunmaktadır. Bu değişken bölgeler cins seviyesindeki sınıflandırmalarda kullanılabilmektedir (Liu ve ark., 2012). Ancak tek başına yeterli olduğu söylenemez. Bu sebeple hem ekzonik (5.8S) hem de

intronik (ITS1-ITS2) bölgeler içeren ITS bölgesi filogenetik analizler için birlikte kullanılmıştır. Çalışılan organizmanın filogenetik ilişkilerini anlamak için daha önce yayınlanmış birkaç çalışmanın olması en uygun bölgenin seçimi için avantaj sağlamaktadır. *Melanoleuca* cinsi için yapılan literatür araştırmalarında ITS bölgesinin bilgi verici olduğu anlaşılmıştır ve bu çalışmada da kullanılacak bölgelerden bir tanesinin ITS olmasına karar verilmiştir. *Melanoleuca* ve *Urticocystis* alt cinsleri olarak tanımlanan kladlar dışında ayrı bir klad daha ITS ağacında belirlenmişti. Bu kladda *Acystis* alt cinsinde gösterilen *M. angelesiana, M. microcephala* ve *M. graminicola* türleri ile birlikte diğer alt cinslerde gösterilen farklı türler kümelenmiş ancak bu klad tam olarak alt cins seviyesinde değerlendirilememiştir. Vizzini ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada *Acystis* grubunun bağımsız konumunu kaybettiğini ve homoplazi sergilediğini belirtmişlerdir. Çizdirilen ITS ağacında, *Acystis* grubunun net bir şekilde kümelenme göstermeyişi bu savı destekler niteliktedir. Bu nedenle *Melanoleuca* cinsi için alt cins değerlendirmesi *Melanoleuca* ve *Urticocystis* şeklinde yapılmıştır.

Melanoleuca türlerinin teşhis edilmesinde sadece morfolojik karakterlerin kullanılması sonucunda teşhiste yaşanan problemler beklenen bir durumdur. Çünkü *Melanoleuca,* Vizzini ve ark. (2011) ifade ettiği gibi çok fazla benzer özelliklere sahip, ayrımları zor yapılan bir gruptur. Antonin ve ark. (2014)'e göre ise klasik sınıflandırmada *Melanoleuca* cinsi hep belirsiz bir konumda yer almıştır. Bu çalışmada çoğunlukla genetik açıdan ele alınan taksonların gösterdikleri genetik varyasyonlar yetişme yerine bağlı doğal seleksiyonun bir sonucu olabilir. Bu nedenle *Melanoleuca* cinsi için filocoğrafya bilgisi de göz önüne alınarak daha kapsamlı taksonomik ve filogenetik çalışmalar yapılmalıdır. Bu noktada makroskobik ve mikroskobik karakterlere ilave olarak moleküler verilere de mutlaka ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışma bu açığın kapatılması, Türkiye'de fungus moleküler sistematik çalışmalarına temel oluşturulması ve mantar genetiğinin korunması çalışmalarına katkı sağlanması adına önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

Abd-Elsalam, K.A., Aly, İ.N., Abdel-Satar, M.A., Khalil, S.M., Verreet, J.A., 2003. PCR identification of Fusarium genus based on nuclear ribosomal DNA sequence data. ***African Journal of Biotechnology***, **2** (4): 82-85.

Acar, İ., Uzun, Y., Demirel, K., Keleş, A., 2015. Macrofungal diversity of Hani (Diyarbakır/Turkey) district. ***Biodicon***, **8** (1): 28-34.

Antonin, V., Rimoczi, I., Benedek, L., Papp, V., Szarkandi, J.G., Dima, B., Nagy, L.G., Papp, T., Duriska, O., Tomsovsky, M., 2014. *Melanoleuca juliannae* (Basidiomycota, Tricholomataceae), a new species from subgen. Urticocystis. ***Phytotaxa***, **170** (1):13-23.

Antonin, V., Jancovicova, S., Tomsovsky, M., 2015. Identity of Agaricus brevipes Bull. (*Melanoleuca brevipes*, *Tricholomataceae*, *Basidiomycota*). ***Mycol Progress***, **14**:107.

Anonim, 2014. Polimeraze Chain Reaction (PCR). ***https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/***. National Center for Biotechnology Information, USA. Erişim tarihi: 07.12.2016.

Anonim, 2015. First nature website, ***http://www.first-nature.com/fungi/melanoleuca-melaleuca.php***, Wales, UK. Erişim tarihi: 17.05.2017.

Anonim, 2016. What is known about the function of introns, the nonencoding sequences in genes?. ***https://www.scientificamerican.com/article/what-is-known-about-the-f/***. Scientific American. Erişim Tarihi: 13.11. 2016.

Anonim, 2017a. NCBI Taxonomy database, 2017. ***https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=104361***, National Center for Biotechnology Information, USA. Erişim tarihi: 11.05.2017.

Anonim, 2017b. Mycobak database, ***http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank_Advanced&Rec=56901&Fields=All***, Westerdijk Fungal Biodiversity Institue, München, Germany. Son erişim: 10.05.2017.

Anonim, 2017c. Encyclopedia of Life, ***http://eol.org/pages/16654/details***, Erişim tarihi: 10.05.2017.

Arora D., 1986. ***Mushrooms Demystified: A Comprehensive Guide to the Fleshy Fungi***. 2nd ed. Berkeley: Ten Speed Press.

Bessette A.E., Fischer D., Bessette A.R., 1997. ***Mushrooms of Northeastern North America***. 1st ed. Syracuse, N.Y.: Syracuse University Press.

Boekhout T., 1988. Notulae ad floram agaricinam neerlandicam, XVI – New taxa, new combinations in *Melanoleuca* Pat. and notes on rare species in the Netherlands. ***Persoonia,*** **13**(4): 397–431.

Boekhout, T., 1999. *Melanoleuca*., in: C Bas et al. (eds). ***Flora Agaricina Neerlandica*** 4.A.A. Balkema, Rotterdam. 153–165.

Bon, M., 1991. ***Flore Mycologique d'Europe***. 2 – Les Tricholomes et ressemblants. Doc. Mycol.,Mém. hors-Sér. 2, 163.

Breitenbach, J., Kränzlin, F., 1991. ***Fungi of Switzerland***. Verlag Mykologia. 3rd ed. Lucerne, Switzerland.

Buczacki, S., 2012. ***Collins Fungi Guide: The Most Complete Field Guide to the Mushrooms and Toadstools of Britain & Ireland***. Harper Collins Publishers, London, UK.

Campbell, N.A., Reece, J., 2010. ***Biology***. Altıncı baskı. Palme yayınları, No: 381, Ankara. 313.

Dizkırıcı, A., 2012. ***Evolutionary Relationships Among Astragalus Species Native to Turkey*** (doktora tezi). ODTÜ, Biyoloji Bölümü, Ankara.

Doğan, H.H., 2001. ***Karaman Yöresinin Makrofungusları Üzerinde Taksonomik Arastırmalar*** (doktora tezi). Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. ***Phytochemical Bulletin***, **19**:11-15.

Dowell, K., 2008. ***Molecular Phylogenetics***. Technical report, University of Maine.

Duriska, O., Antonin, V., Para, R., Tomsovsky, M., Jancovicova, S., 2017. Taxonomy, Ecology and Distribution of *Melanoleuca strictipes* (Basidiomycota, Agaricales) in Europe. ***Czech Mycology***, **69** (1): 15-30.

Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. ***Evolution***, **39**: 783-791.

Garcia, M.S., Blanco, J.C., Matheny, P.B., 2013. Taxonomic Revision of the Genus *Melanoleuca* in Mexico and Description of New Species, ***Revista Mexicana de Biodiversidad***, 111-127.

Garnica, S., Weiss, M., Walther, G., Oberwinkler, F., 2007. Reconstructing the Evolution of Agarics from Nuclear Gene Sequences and Basidiospore Ultrastructure, ***Mycological Research***, **111**, 1019–1029.

Geiser, D.M., Jime´nez-Gasco, M.M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A., O'Donnell, K., 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA Sequence Database for İdentifying Fusarium. ***European Journal of Plant Pathology***, **110**: 473–479.

Gerault, A., 2005. ***Florule Evolutive des Basidiomycotina Du finistere Heterobasidiomycetes Tricholomatales***. Version 2.1. France.

Gillman, L.S., Miller, O.K., 1977. A Study of the Boreal, Alpine, and Arctic Species of *Melanoleuca*. ***Mycologia***, **69**(5): 927-951.

Guadet, J., Julien, J., Lafay, J.F., Brygoo, Y., 1989. Phylogeny of Some Fusarium Species, as Determined by Large-Subunit rRNA Sequence Comparison. ***Molecular Biology Evolution***, **6** (3): 227-242.

Hibbett, D.S., 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. ***Mycological Society***, **33**: 533-556.

Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf , S., James, T., Kirk, P.M., Lucking, R., Lumbsch, H.T., Lutzoni, F., Matheny, P.B., Mclaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.C., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, C.M., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Koljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama,J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir,A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y., Zhang, N., 2007. A Higher-level Phylogenetic Classification of the Fungi, ***Mycological Research***, **111**, 509–547.

Hinrikson, H.P., Hurst, S.F., Lott, T.J., Warnock, D.W., Morrison, C.J., 2005. Assessment of Ribosomal Large-Subunit D1-D2, Internal Transcribed Spacer 1, and Internal Transcribed Spacer 2 Regions as Targets for Molecular Identification of Medically Important *Aspergillus* Species, ***Journal of Clinical Microbiology***, **43**:5, 2092-2103.

Horton, T.R., Bruns, T.D., 2001. The Molecular Revolution in Ectomycorrhizal Ecology: Peeking into the Black-box. ***Molecular Ecology***, **10**: 1855–71.

Işıloğlu, M., 2001. Sandras Dağı (Muğla) Makrofungusları. ***Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Fen Bilimleri Dergisi***, **9**: 127-136.

Jordan, M., 2004. ***The Encyclopedia of Fungi of Britain and Europe***. Frances Lincoln Publishers P. 51. UK.

Justo, A., Vizzini, A., Minnis, A.M., Nelson Menolli Jr., Capelari, M., Rodríguez, O., Malysheva, E., Contu, M., Ghignone, S., Hibbett, D. S., 2011. Phylogeny of the *Pluteaceae* (Agaricales, Basidiomycota): Taxonomy and Character Evolution. ***Fungal Biology***, **115** (1): 1-20.

Kaşık, G., 2010. ***Mantar Bilimi***. Birinci baskı, Marifet Yayınevi, No: 17981, Konya, 432.

Kılıçoğlu, M., Özkoç, İ., 2008. Fungal Sistematikteki Moleküler Gelişmeler. ***OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi***, **23** (1): 65-72.

Kuo, M., Methven, S.A., 2014. ***Mushrooms of the Midwest***, University of Illinois Press. Urbana, Chicago and Springfield.

Kurtzman, C.P., Robnett, C. J., 2013. Relationships among genera of the Saccharomycotina (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species. ***FEMS Yeast Research***, **13**: 23–33.

Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.M., 2009. ***The Phylogenetic Handbook A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing***. Cambridge University Press, New York. 723.

Liu, K., Liu, L., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Eichorst, S.A., Xie, G., 2012. Accurate, Rapid Taxonomic Classification of Fungal Large-Subunit rRNA Genes. ***Applied and Environmental Microbiology,*** **78** (5): 1523–1533.

Matheny, P.B., Curtis, J.M., Hofstetter, V., Aime, M.C., Moncalvo, J.M., Ge, Z.W., Yang, Z.L., Slot, J.C., Ammirati, J.F., Baroni, T.J., Bougher, N.L., Hughes, K.W., Lodge, D.J., Kerrigan, R.W., Seidl, M.T., Aanen, DK., DeNitis, M., Daniele, G.M., Desjardin, D.E., Kropp, B.R., Norvell, L.L., Parker, A., Vellinga, E.C., Vilgalys, R., Hibbett, D.S., 2006. Major Clades of Agaricales: A Multi-Locus Phylogenetic Overview, ***Mycologia***, **98**: 982-995.

Moncalvo, J.M., Vilgalys, R., Redhead, S.A., Johnson, J.E., James, T.Y., Aime, M.C., Hofstetter, V., Verduin, S.J.W., Larsson, E., Baroni, T.J., Thorn, R.G., Jacobsson, S., Clemençon, H., Jr. Miller, O.K., 2002. One Hundred and Seventeen Clades of euagarics. ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, **23**: 357–400.

Murrill, W.A., 1913. The Agaricaceae of the Pacific Coast - IV. New species of *Clitocybe* and *Melanoleuca*. ***Mycologia***, **5** (4): 206-223.

Osmundson, T.W., Robert, V.A., Schoch, C.L., Baker, L.J., Smith,A., Robich, G., Mizzan, L., Garbelotto, M.M., 2013. Filling Gaps in Biodiversity Knowledge for Macrofungi: Contributions and Assessment of an Herbarium Collection DNA Barcode Sequencing Project. ***Plos One***, **8** (4): e62419.

Patterson, J., Chamberlain, B., Thayer, D., 2004. ***Finch TV Version 1.4.0***. Geospiza Inc.

Patterson, J., Chamberlain, B., Thayer, D., 2006. ***Finch TV Version 1.4.0***. Geospiza Inc.

Saba, M., Khalid, A.N., 2014. New record of *Melanoleuca cinereifolia* in Himalayan moist temperate forests of Pakistan. ***Mycotaxon***, **129** (2): 317-327.

Sanchez-Garcia, M., Cifuentes-Blanco, J., Matheny, P.B., 2013. Taxonomic revision of the genus Melanoleuca in Mexico and description of new species, ***Rev Mex Biodivers***, **84**,111-127.

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., 2012. Fungal Barcoding Consortium Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi. ***PNAS***, **109**: 6241–6246.

Sesli, E., Denchev, C.M., 2014. Checklists of the Myxomycetes, Larger Ascomycetes, and Larger Basidiomycetes in Turkey. ***Mycotaxon***, **6**: 1–136.

Simon, K.U., Weiß, M., 2008. Intragenomic Variation of Fungal Ribosomal Genes is Higher than Previously Thought. ***Molecular Biology Evolution***, **25** (11): 2251–2254.

Singer R., 1986. ***The Agaricales in Modern Taxonomy***. 4th ed. Koenigstein Königstein im Taunus, Germany: Koeltz Scientific Books.

Solak, M.H., Işıloğlu, M., Erbil, K., Allı, H., 2015. ***Macrofungi of Turkey, Checklist Volume II***, Üniversiteliler Ofset, İzmir.

Stielow, J.B., Lévesque, C.A., Seifert, K.A., Meyer, W., Irinyi, L., Smits, D., Renfurm, R., Verkley, G.J.M., Groenewald, M., Chaduli, D., Lomascolo, A., Welti, S., Lesage-Meessen, L., Favel, A., Al-Hatmi, A.M.S., Damm, U., Yilmaz, N., Houbraken, J., Lombard, L., Quaedvlieg, W., Binder, M., Vaas, L.A.I., Vu, D., Yurkov, A., Begerow, D., Roehl, O., Guerreiro, M., Fonseca, A., Samerpitak, K., Diepeningen, A.D., Dolatabadi, S., Moreno, L.F., Casaregola, S., Mallet, S., Jacques, N., Roscini, L., Egidi, E., Bizet, C., Garcia-Hermoso, D., Martín, M.P., Deng, S., Groenewald, J.Z., Boekhout, T., Beer, Z.W., Barnes, I., Duong, T.A., Wingfield, M.J., Hoog, G.S., Crous, P.W., Lewis, C.T., Hambleton, S., Moussa, T.A.A., Al-Zahrani, H.S., Almaghrabi, O.A., Louis-Seize, G., Assabgui, R., McCormick, W., Omer, G., Dukik, K., Cardinali, G., Eberhardt, U., Vries, M., Robert, V., 2015. One fungus, which genes? Development and Assessment of Universal Primers for Potential Secondary Fungal DNA Barcodes. ***Persoonia***, **35**: 242–263.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., M., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. ***Molecular Biology Evolution***, **30**(12): 2725–2729.

Vesterholt, J., 2008. *Melanoleuca*. In Knudsen, H. And Vesterholt, J. (eds.). ***Funga Nordica***, 347-352.

Vesterholt, J., 2012. *Melanoleuca*. H. et al. (eds.). ***Funga Nordica: Agaricoid, Boletoid and Cyphelloid Genera***. 2nd ed. Copenhagen: Nordsvamp. 477–481.

Vizzini, A., Consiglio, C., Setti, L., Murat, C., 2010. The agaricoid genus *Kinia* is a new member of the Pluteoid clade subordinate to *Melanoleuca*, ***Mycosphere***, **1** (2): 141–145.

Vizzini, A., Para, R., Fontenla, R., Ghignone, S., Ercole, E., 2011. A preliminary ITS Phylogeny of *Melanoleuca* (Agaricales), With Special Reference to European Taxa. ***Mycotaxon***, **118**: 361–381.

Wang, H., Xu, Z., Gao, L., Hao, B., 2009. A Fungal Phylogeny Based on 82 Complete Genomes Using the Composition Vector Method. ***BMC Evolutionary Biology***, **9** (195): 1471-2148.

Woese, R.C., Olsen, J.G., 1993. Ribosomal RNA: A Key to Phylogeny. ***The FASEB Journal***, **7**: 113-122.

Wen, J., Zimmer, E.A., 1996. Phylogeny and Biogeography of Panax L. (the Ginseng Genus, Araliaceae): Inferences from ITS Sequences of Nuclear Ribosomal DNA. ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, **6** (2): 167–177.

Yu, X.D., Lv, S.X., Ma, D., Li, F.F., Lin, Y., Zhang L., 2014. Two New Species of *Melanoleuca* (Agaricales, *Basidiomycota*) from Northeastern China, Supported by Morphological and Molecular data. ***Mycoscience***, **55**: 456-461.

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Van'ın Erciş ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kazım Karabekir İlkokulu'nda tamamladı. 2011 yılında Sevim Kürüm Anadolu Lisesi'nden mezun oldu ve aynı yıl Cumhuriyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2015 yılında bu bölümden Onursal derece ile mezun oldu. Aynı yıl Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilimdalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.

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

Tarih: 22/07/2017

Tez Başlığı / Konusu: **Türkiye'de Yayılış Gösteren *Melanoleuca* Pat. Cinsine Ait Bazı Türlerin Filogenetik Analizi**

Yukarıda başlığı belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 44 sayfalık kısmına ilişkin, 22/07/017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından turnitin ...intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 1 (bir) dir.

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

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

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

22/07/2017

Adı Soyadı: Ayşenur KALMER

Öğrenci No: 159102073

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı:

Statüsü: Y. Lisans X Doktora ☐

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

Yrd. Doç. Dr. Aylin DİZKIRICI TEKPINAR

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

Yrd.Doç.Dr.Ayhan BAŞTÜRK
Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdür Yardımcısı