

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**ANTALYA İLİ KORKUTELİ İLÇESİ MANTAR ÜRETİM ALANLARINDA
YAYGIN GÖRÜLEN BAZI FUNGAL HASTALIK ETMENLERİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Duygu ATEŞ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ANTALYA İLİ KORKUTELİ İLÇESİ MANTAR ÜRETİM ALANLARINDA
YAYGIN GÖRÜLEN BAZI FUNGAL HASTALIK ETMENLERİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Duygu ATEŞ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2018

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTALYA İLİ KORKUTELİ İLÇESİ MANTAR ÜRETİM ALANLARINDA
YAYGIN GÖRÜLEN BAZI FUNGAL HASTALIK ETMENLERİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Duygu ATEŞ
BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2017-2191 nolu proje ile desteklenmiştir**

HAZİRAN 2018

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTALYA İLİ KORKUTELİ İLÇESİ MANTAR ÜRETİM ALANLARINDA
YAYGIN GÖRÜLEN BAZI FUNGAL HASTALIK ETMENLERİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Duygu ATEŞ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 11/06/2018 tarihinde jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mürsel ÇATAL (Danışman)

Dr. Öğr. Üyesi Cengiz İKTEN

Dr. Öğr. Üyesi Kadir AKAN

ÖZET

ANTALYA İLİ KORKUTELİ İLÇESİ MANTAR ÜRETİM ALANLARINDA YAYGIN GÖRÜLEN BAZI FUNGAL HASTALIK ETMENLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Duygu ATEŞ

Yüksek Lisans Tezi Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mürsel ÇATAL

Mayıs 2018; 68 sayfa

Antalya ili Korkuteli ilçesi ülkemizin kültür mantarı ve mantar kompostu üretiminde ilk sırada yer almakta ve mantar fiyatlarını belirleyici konumda bulunmaktadır. Beyaz şapkalı mantar *Agaricus bisporus* Dünya’da olduğu gibi ülkemizde de ticari olarak kültürü yapılan en önemli kültür mantar türüdür. Ancak beyaz şapkalı mantar üretiminde farklı stres faktörleri ile karşılaşmaktadır. Bu sorunların başında hastalıkların sebep olduğu verim ve kalite kayıpları gelmektedir.

Özellikle kültür mantarlarında fungal etmenlerin sebep olduğu kuru kabarcık (*Verticillium fungicola*), yaş kabarcık (*Mycogone perniciosa*), örümcek ağı (*Cladobotryum* spp.) ve yeşil küf (*Trichoderma* spp.) yaygın görülen ve etkin bir mücadelesi olmayan hastalıklardır. Günümüze kadar bu konuda yapılan çalışmalar hastalık sürveyleri ve etmen fungusların morfolojik tanımlanması ile sınırlı kalmıştır. Korkuteli’de fungal hastalıklara sebep olan türlerin doğru olarak belirlenmesi ve incelenen etmenlerin mevcutsa nasıl alt tür yapısına sahip olduğu bilinmemektedir.

Bu çalışmada Korkuteli ilçesi mantarhanelerinden elde edilen 4 hastalık etmenine ait izolatların bölgedeki yaygın veya muhtemel tür ve alt tür yapılarının moleküler yöntemler kullanılarak tespiti ve tanımlaması çalışması yürütülmüştür. Bu amaçla yürütülen survey çalışmaları ile 30 farklı mantarhane Hastalıklı örnekler toplanmış ve fungus izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen izolatların ribosomal DNA ITS bölgeleri ITS1-F ve ITS4 primerleri ile Polymeraze Zincir Reaksiyon (PCR) ile çoğaltılarak DNA dizilimleri belirlenmiştir. Geliştirilen tüm fungal izolatların DNA dizilimleri Dünya’nın diğer bölgelerinde kültür ve diğer mantarlardan elde edilen ve Genbank veri tabanında bulunan izolatların dizilimleri ile alt alta dizilim ve filogenetik analizler yapılarak karşılaştırılmış ve 4 fungal hastalık etmeninin Korkuteli bölgesinde yaygın olan tür ve alt türleri tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda en sık karşılaşılan fungal hastalık etmenlerinin *Verticillium fungicola* var. *fungicola* olduğu bunu sırasıyla *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, *Cladobotryum mycophilum* ve *Mycogone perniciosa*’nın izlediği görülmüştür. Bu funguslara ait izolatların rDNA ITS bölgesi ITS1-F ve ITS4 primerleri ile yapılan PCR çoğaltmalarında 680 ila 730 bp uzunluğunda ürün verdiği görülmüştür. Dört hastalık etmeninin izolatlarının ITS bölgesi ürünlerinin dizilimlerinin NCBI BLAST analizleri bu izolatların GenBank veri tabanında mevcut izolatlarla % 99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Gerek NCBI BLAST analizleri gerekse

filogenetik analizler Korkuteli ilçesinin bazı mantar yetiştiricilik tesislerinden elde edilen 19 kuru kabarcık izolatının *V. fungicola* var. *fungicola*, 10 yaş kabarcık izolatının *Mycogone perniosa*, 10 örümcek ağı izolatının *Cladobotryum mycophilum*'e ait olduğunu göstermiştir. Yine elde edilen 11 yeşil küf izolatından 10'unun *T. aggressivum* f. *aggressivum* ve 1 izolatın da *T. aggressivum* f. *europaeum* olduğu tesbit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Cladobotryum* spp., *Mycogone perniosa*, *Trichoderma* spp., *Verticillium fungicola*, rDNA, ITS

JÜRİ: Doç. Dr. Mürsel ÇATAL (Danışman)

Dr. Öğr. Üyesi Cengiz İKTEN

Dr. Öğr. Üyesi Kadir AKAN



ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SOME COMMON FUNGAL PATHOGENS CAUSING DISEASES IN MUSHROOM PRODUCTION AREAS OF KORKUTELİ DİSTRİCT OF ANTALYA PROVINCE

Duygu ATEŞ

M.Sc. Thesis in Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mürsel ÇATAL

June 2018; 68 Pages

Korkuteli district of Antalya province is the leading cultivated mushroom and mushroom compost producer and play a pivotal role in the determination of mushroom prices in the country. White button mushroom *Agaricus bisporus* is commercially the most commonly grown cultivated mushroom species in the country as in the all around the world. However, growers face many problems in mushroom production and diseases are the major problem causing serious losses in mushroom yield and quality.

In particular, dry bubble (*Verticillium fungicola*), wet bubble (*Mycogone perniciosa*), cobweb (*Cladobotryum* spp.) ve green mold (*Trichoderma* spp.) are the important fungal diseases that are the most widespread and difficult to manage in mushroom production in the Korkuteli region. The research about these diseases are limited to survey studies and morphological identification of the causal fungi. There is no information about the species, subspecies and if present races structure of these fungi in region.

In this thesis research, attempts were made to identify and characterize the isolates of these 4 disease agent fungi collected from mushroom growing facilities of Korkuteli district by molecular methods. For this aim, mushroom samples displaying symptoms of each diseases were collected from 27 different mushroom growing farms and fungus isolations are made. The internal transcribed spacer region of ribosomal DNA of the isolates were amplified in Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequenced using universal primers ITS1-F and ITS4. ITS sequences of the isolates were compared with the sequences of isolates from other parts of the world available in the GenBank in NCBI Blast and filogenetic analyses and the common species, subspecies and races of 4 fungal diseases were identified.

In the studies, *Verticillium fungicola* var. *fungicola* (dry bubble) was the most commonly isolated pathogen followed by *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (Green Mold), *Cladobotryum mycophilum* (Cobweb) ve *Mycogone perniciosa* (Wet) from the diseased mushroom samples. A PCR product of 680-730 bp were obtained from PCR amplification of rDNA ITS regions with ITS1-F/ ITS4 primer pair. ITS sequences of Korkuteli isolates of 4 fungal pathogens were 99-100 % similar to the sequences of the isolates of each fungus available in the Genbank in Blast similarity analyses. In both Blast and Phylogenetic analyses revealed that 19 isolates of dry bubble

fungus belonged to *V. fungicola* var. *fungicola* while 10 isolates of wet bubble fungus were *M. pernisi*. All 10 isolates of cobweb disease fungus were identified as *C. mycophilum* contrary to common belief that the disease in the region is caused by *C. dendroides* in the analyses. The results of the analyses also revealed that out of 11 isolates of green mold fungus, 10 isolates were *T. aggressivum* f. *aggressivum* and 1 isolate *T. aggressivum* f. *europaeum*.

KEY WORDS: *Cladobotryum* spp., *Mycogone pernisi*, *Trichoderma* spp., *Verticillium fungicola*, rDNA, ITS

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Mürsel ÇATAL (Supervisor)

Asst. Prof. Dr. Cengiz İKTEN

Asst. Prof. Dr. Kadir AKAN



ÖNSÖZ

Mantar yetiştiriciliği, uygun koşullar sağlandığında yıl boyu üretim yapılabilen ekonomik getirisi fazla olan bir tarım koludur. Mantarın protein kaynağı olarak bilinmesinin yanında, insan sağlığı ve beslenme bakımından tespit edilen faydaları da bu ürüne olan talebin tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygınlaşmasına ve artmasına sebep olmuştur. Ayrıca birçok ülke için önemli bir gelir kaynağı olan *Agaricus bisporus* yetiştiriciliğinde birçok hastalık etmeni nedeni ile önemli derece ekonomik verim ve kalite kayıpları olmaktadır. Buna rağmen bu konuda yeterli çalışma bulunmamaktadır. Yürütülen çalışma ile; ülkemizde üretimin en fazla olduğu Antalya Korkuteli ilçesi mantarhanelerinde yaygın olarak görülen fungal hastalık etmenlerinin rDNA ITS bölge dizilim bilgisine göre moleküler karakterizasyonu ile toplanan izolatların tür ve ırkları edilmiş ve bu alanda yapılan ilk çalışmalar arasında yer almıştır.

Çalışma konumu belirleyerek bu konuda bilgi ve görüşleri ile yol gösteren danışman hocam Doç.Dr.Mürsel ÇATAL'a

Moleküler çalışmalarımın yürütülebilmesi için bana laboratuvarını açan ve bu konuda bilgilerini benden esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Cengiz İKTEN'e

Çalışmam boyunca benden yardımını esirgemeyen araştırma görevlisi Hilal Şule TOSUN 'a ve yine yardımlarından dolayı Yeliz YILMAZ ve Ahmet ÇAT'a

Bu çalışmada projeyi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu'na

Hayatım boyunca maddi manevi her türlü desteği benden esirgemeyen, benim için türlü fedakarlıklarda bulunan canım Anneciğim Saniye ATEŞ'e ve canım Babacığım Yusuf ATEŞ'e teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kültür Mantarları.....	1
1.1.1.Faydaları	2
1.1.2. Kültür Mantarların kısımları.....	2
1.1.3.Dünyada ve Türkiye’de Mantar Üretim ve Tüketim Miktarları.....	4
1.1.4. Kültür Mantarlarında Hastalığa Sebep Olan Yaygın Görülen Fungal Etmenler.....	6
1.2. ITS: Transkribe Edilen İnternal Ara Bölgeler (Internal Transcribed Spacer) ve rDNA.....	18
2.KAYNAK TARAMALARI.....	20
3. MATERYAL METOT.....	24
3.1. Enfekteli Örneklerin Toplanması ve Fungusların izolasyonu.....	24
3.2. İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu	26
3.3. PCR (Polimerase Chain Reaction) ile DNA Çoğaltılması.....	27
3.4. DNA dizilimlerinin çıkarılması, düzenlenmesi ve izolatların tanısı.....	28
3.5. Filogenetik analizler ve türlerin belirlenmesi	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. <i>Verticillium fungicola</i> , <i>Mycogone perniciosa</i> , <i>Cladobotryum</i> spp. , <i>Trichoderma</i> spp.’a ait izolatlarının elde edilmesi.....	29
4.2. <i>Verticillium fungicola</i> ’nın rDNA ITS bölgesinin PCR’ la çoğaltılması	29
4.3. <i>Verticillium fungicola</i> ’nın ITS bölgesinin DNA dizilim analizleri	31
4.4. <i>Verticillium fungicola</i> ’nın ITS DNA dizilimlerinin filogenetik analizleri	35
4.5. <i>Mycogone perniciosa</i> ’nın rDNA ITS bölgesinin PCR’ la çoğaltılması	38
4.6. <i>Mycogone perniciosa</i> ’nın ITS bölgesinin DNA dizilim analizleri.....	39

4.7. <i>Mycogone perniciosa</i> 'nın ITS DNA dizilimlerinin filogenetik analizler.....	42
4.8. <i>Cladobotryum</i> spp.'nin rDNA ITS bölgesinin PCR' la çoğaltılması.....	44
4.9. <i>Cladobotryum</i> spp.'nin ITS bölgesinin DNA dizilim analizleri	45
4.10. <i>Cladobotryum</i> spp.'nin ITS DNA dizilimlerinin filogenetik analizleri	50
4.11. <i>Trichoderma</i> spp.'nin rDNA ITS bölgesinin PCR' la çoğaltılması.....	52
4.12. <i>Trichoderma</i> spp.'nin ITS bölgesinin DNA dizilim analizleri	53
4.13. <i>Trichoderma</i> spp.'nin ITS DNA dizilimlerinin filogenetik analizleri	56
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ	62
7. KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum " Antalya ili Korkuteli ilçesi mantar üretim alanlarında yaygın görülen bazı fungal hastalık etmenlerinin moleküler karakterizasyonu" adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak bulunduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

11/06/2018

Duygu ATEŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dk	: Dakika
Mg	: Magnezyum
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromol
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
rpm	: Revolutions Per Minute
cm	: Santimetre
°C	: Santigrad Derece
spp.	: Türler
s	: Saniye
%	: Yüzde

Kısaltmalar

Bp	: Base pair
CLA	: Konjuge Linoleik Asit
dNTP	: Deoxynucleotide triphosphate
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	: Etidyum bromür
ETS	: External Transcribed Spacer
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü

IGS	: Intergenic Spacer
Kb	: Kilobaz
MEB	: Milli Eğitim Bakanlığı
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
Ph	: Potenz Hydrojen
ITS	: Internal Transcribed Spacer
PDA	: Patates Dekstroz Agar
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
rDNA	: Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit
SCAR	: Sequence characterized amplified region
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
TAE	: Tris Asetik Asit EDTA
Th2	: <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>
Th4	: <i>Trichoderma aggressivum</i>
vd	: ve diğerleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Şapkalı Mantarların Bölümleri	4
Şekil 1.2. Dünya mantar üretiminin cinslere göre dağılımı	4
Şekil 1.3. Türkiye mantar üretiminin türlere göre dağılımı	5
Şekil 1.4. <i>Verticillium fungicola</i> var. <i>fungicola</i> konidileri	7
Şekil 1.5. <i>Verticillium fungicola</i> 'nın PDA ortamında 5 gün sonraki gelişimi	8
Şekil 1.6. <i>Verticillium fungicola</i> 'nın PDA ortamında 14 gün sonraki gelişimi	8
Şekil 1.7. <i>Verticillium fungicola</i> 'nın şapka üzerinde meydana getirdiği lekele	9
Şekil 1.8. <i>Verticillium fungicola</i> 'nın mantar dokularında meydana getirdiği şekil bozuklukları	9
Şekil 1.9. <i>Mycogone perniciosa</i> 'nın meydana getirdiği şekil bozukluğu ve akıntılar	10
Şekil 1.10. <i>Mycogone perniciosa</i> 'nın meydana getirdiği şekil bozukluğu ve akıntılar ..	11
Şekil 1.11. <i>Mycogone perniciosa</i> 'nın PDA ortamında 7 gün sonraki gelişimi	11
Şekil 1.12. <i>Mycogone perniciosa</i> aleurisporları	12
Şekil 1.13. <i>Cladobotryum</i> spp. meydana getirdiği pamuğumsu beyaz miselleri	13
Şekil 1.14. <i>Cladobotryum</i> spp. PDA ortamında 3 gün sonraki gelişimi	14
Şekil 1.15. <i>Cladobotryum</i> spp. PDA ortamında 7 sonraki gelişimi	14
Şekil 1.16. <i>Cladobotryum</i> spp. konidileri	15
Şekil 1.17. <i>Trichoderma</i> spp. kompost üzerinde meydana getirdiği yeşil sporulasyonu.	16
Şekil 1.18. <i>Trichoderma</i> spp. PDA ortamında 7 gün sonraki gelişimi	17
Şekil 1.19. <i>Trichoderma</i> spp. yeşil sporları	17
Şekil 1.20. Funguslarda rDNA bölgesi	18
Şekil. 4.1. <i>V. fungicola</i> izolatlarının rDNA ITS bölgesinin ITS1-F ve ITS4 primer çifti kullanılarak PCR' da çoğaltılması.	30

Şekil 4.2. <i>Verticillium fungicola</i> var. <i>fungicola</i> izolatlarının ITS1-F ve ITS4 primerleri ile elde edilen ITS bölgesi DNA baz dizilimlerinin alt alta dizilmiş hali.	31
Şekil 4.3. <i>Verticillium fungicola</i> izolatlarının ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) bölgesinin DNA dizilimlerinin filogenetik analizi.....	37
Şekil 4.4. <i>Mycogone pernicioso</i> izolatlarının rDNA ITS bölgesinin ITS1-F ve ITS4 primer çifti kullanılarak PCR’ da çoğaltılması	39
Şekil 4.5. <i>Mycogone pernicioso</i> izolatlarının ITS1F ve ITS4 primerleri ile elde edilen ITS bölgesi DNA baz dizilimlerinin alt alta dizilmiş hali	39
Şekil 4.6. <i>Mycogone pernicioso</i> izolatlarının ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) bölgesinin DNA dizilimlerinin filogenetik analizi.....	44
Şekil 4.7. <i>Cladobotryum</i> spp. rDNA ITS bölgesinin ITS1-F ve ITS4 primer çifti kullanılarak PCR’ da çoğaltılması.	45
Şekil. 4.8. <i>Cladobotryum mycophilum</i> izolatlarının ITS1F ve ITS4 primerleri ile elde edilen ITS bölgesi DNA baz dizilimlerinin alt alta dizilmiş hali.	46
Şekil 4.9. <i>Cladobotryum mycophilum</i> izolatlarının ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) bölgesinin DNA dizilimlerinin filogenetik analizi.	52
Şekil 4.10. <i>Trichoderma</i> spp. izolatlarının rDNA ITS bölgesinin ITS1-F ve ITS4 primer çifti kullanılarak PCR’ da çoğaltılması	53
Şekil 4.11. <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> and f. <i>europaeum</i> izolatlarının ITS1F ve ITS4 primerleri ile elde edilen ITS bölgesi DNA bazlarının alt alta dizilmiş hali.....	54
Şekil. 4.12. <i>Trichoderma</i> spp. tür ve alt türlerine ait izolatlarının ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) bölgesinin DNA dizilimlerinin filogenetik analizi.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Enfekteli örneklerinin toplandığı yerler, örnek sayıları, mantarhane sahipleri ve tarihleri.....	25
Çizelge 3.2. PCR çalışmalarında kullanılan primerler.....	27
Çizelge 4.1. <i>Verticillium fungicola</i> izolatlarının toplandığı mantarhaneler ve tarihleri ..	30
Çizelge 4.2. Filogenetik analizlerde kullanılan Korkuteli'nden izole edilen ve GenBank'tan alınan <i>Verticillium fungicola</i> izolatları	35
Çizelge 4.3. <i>Mycogone pernisiosa</i> izolatlarının toplandığı mantarhaneler ve tarihleri ..	38
Çizelge 4.4. Filogenetik analizlerde kullanılan Korkuteli'nden izole edilen ve GenBank'tan alınan <i>Mycogone pernisiosa</i> izolatları	43
Çizelge 4.5. <i>Cladobotryum</i> spp. izolatlarının toplandığı mantarhaneler ve tarihleri	44
Çizelge 4.6. Filogenetik analizlerde kullanılan Korkuteli'nden izole edilen ve GenBank'tan alınan <i>Cladobotryum</i> türlerinin izolatları	51
Çizelge 4.7. <i>Trichoderma</i> spp. izolatlarının toplandığı mantarhaneler ve tarihleri	53
Çizelge 4.8. Filogenetik analizlerde kullanılan Korkuteli'nden izole edilen ve GenBank'tan alınan <i>Trichoderma</i> tür ve alt tür izolatları	57

1. GİRİŞ

Mantarlar, sitoplâzmalarında zarla çevrili bir çekirdeğe sahip olan ökaryot hücreli canlılardır. Tüm mantarlarda hücre duvarı vardır ve hücre duvarları kitinden oluşmaktadır. Mantarlar genellikle çok hücrelidir. Yedek besin maddesi olarak nişasta yerine yağ ve glikojen depolarlar. Klorofil içermeyen, yaşamalarını sürdürmeleri için gerekli olan besini hazır olarak sağlayan heterotrof canlılardır. Maya mantarları, küf mantarları, şapkaklı mantarlar ve diğer canlı organizmalarda enfeksiyon yapan mantarlar olarak sınıflandırılırlar (Anonim 1).

1.1. Kültür Mantarları

Geçmiş dönemlerde ağırlıklı olarak doğada tabii olarak yetişen mantarların toplanıp yenmesi, günümüzde yerini yapay ortamlarda yetiştirilen kültür mantarı yetiştiriciliğine bırakmıştır. Gıda maddesi olarak doğadan toplanıp yenen mantar miktarı, yetiştiriciliği yapılan kültür mantarlarına oranla giderek azalmaktadır. Tat ve aroma bakımından zengin olan doğa mantarları karşısında zehirsiz olmaları ve istenen miktarlarda kolayca temin edilebilmeleri nedeni ile kültür mantarlarını daha avantajlı duruma getirmiştir. Ayrıca mantar yetiştiriciliği, uygun koşullar sağlandığında yıl boyu üretim yapılabilen monokültür, karlı bir üretim faaliyetidir (Anonim 2012).

1.1.1. Faydaları

100 g' da yaklaşık 15-20 kalori olan mantarın %88-91'i sudur. Kolesterol içermeyen mantarda karbonhidrat ve protein içeriği daha yüksektir. Kolay hazm edilebilen proteinler içerirler. Doymuş yağ içermezler.

Sadece hayvansal gıdalarda bulunan B12 vitamini aynı zamanda mantar türlerinde de bulunur ve biyoyararlılığı (vücut için kullanılabilirlik) daha yüksektir.

Mantar folik asitçe zengin olduğundan anemi (kansızlık) hastalıklarının iyileştirilmesinde de tüketilmesi önerilmektedir.

Mantarlar kanserden koruyan ve bağışıklığı kuvvetlendiren antioksidan olarak da kabul edilen selenyum mineralince zengin içeriğe sahiptir.

Mantarlar sülfür içeren aminoasit olan ergothionoein içerir ve bu amino asit vücut hücrelerinde antioksidan rol oynamaktadır.

Tiamin, Riboflavin, Niasin, Biotin, Vitamin C, Fosfor, Potasyum ve Bakırdan zengin olup vitamin ve mineral içeriği açısından çok zengindir. Bu fitobesin içeriği mantarı; kalp sağlığını korumada, bazı kanser türlerinde ve kanser tedavisi sırasında bağışıklık sistemini kuvvetlendirmede etkin rol oynamasını sağlamaktadır.

İçeriğinde bulunan CLA (Konjuge Linoleik Asit) sayesinde yağ dokusu kaybını artırarak yağ dışı hücrelerin artmasında faydaları vardır. Dolayısı ile formunu korumak ve yağsız kas dokusunu artırmak için fayda sağlayan besinler arasındadır. Meme ve prostat kanserinde içerdiği CLA sayesinde yararlı etki sağladığı görülmüştür.

Biyoaktif içerikleri yüksek olan bazı mantar türleri medikal ilaç üretiminde tedavi amaçlı, antioksidan, antihipertansif, kolesterol düşürücü, antiviral, antibakteriyel ve antiparazitik etkileri nedeni ile kullanılmaktadır (Stamets 2000).

Kültür mantarları, toprak üstünde görülen sap ve şapka ile ve toprak içinde gelişen misellerden oluşmaktadır. Toprak üstündekiler generatif, toprak altındakiler vegetatif organları meydana getirir. Mantarın kendisi, toprak altında gelişen vegetatif organları yani miselleridir. Sap ve şapka aynı bir ağacın meyvesi gibidir. Şapkası açılmış bir mantar alınıp, şapkanın alt kısmı incelenirse uzunlamasına oluklu bir yapı gözlenir. Bunlara lamel adı verilir. Lamellerin üzerinde mantarın üremesini sağlayan sporlar bulunmaktadır. Mantar beyaz bir kağıdın üzerine konursa, lamellerdeki sporlar kağıt üzerine düşer ve siyah bir iz bırakır. Sporlar doğada şapkadan ayrıldıktan sonra, değişik şekillerde çevreye yayılır. Düşükleri yerde uygun koşullar bulduklarında çimlenip, ipliksi görünümde uzunlamasına bir yapı oluşturur. Bu ilk ipliksi oluşuma, hif adı verilmektedir. İlk mantar hifinin değişik yerindeki hücreler bölünerek değişik yönlerde doğru çoğalır. Böylece toprak içinde birbiri içine girmiş birçok hif meydana gelir. Bu hifle topluluğuna misel denir. Miseller yeteri kadar yoğunluk kazanıp bir yumak hâlini aldığı anda vegetatif büyüme durur, toprağın üst kısmına yakın yerlerde miseller sıklaşarak küçük iğne başı gibi çıkıntılar meydana gelir. Bu dönem mantarın vegetatif büyümeden generatif büyümeye geçiş dönemidir. Belli bir süre sonra toprak üstünde küçük yumrular oluşur. Bu yumruların daha da büyümesiyle şapka sap meydana gelir. Önce şapkanın kenar kısımları sapla birleşmiş durumdadır. Daha sonra şapkanın kenar kısmı saptan ayrılır ve şapka genişler. Şapkanın alt kısmında siyah renkli lameller üzerinde sporlar oluşur. Sporlar olgunlaştığında şapkadan ayrılıp tekrar etrafa yayılır. Bunlar bulundukları yerlerde çimlenerek yeni yeni mantarları meydana getirir. Böylece mantarın yaşam çemberi tamamlanmış olur (Anonim 2012).

1.1.2. Kültür Mantarların Kısımları

Hücre: Mantarın toprak altında gelişen miselleri topraktan su ve besin maddelerini alarak mantarın beslenmesini sağlar. Bir mantar hücresinin en dışında hücre zarı ve iç kısmında da protoplazma ile çekirdek (nükleus) ve çekirdek içinde de bir çekirdekçik bulunur. Mantarın hücre zarı oldukça farklı yapıya sahiptir. Hücre zarının birleşimi hücrenin yaşına, çevre koşullarına ve özellikle sıcaklığa, büyüme ve gelişme ortamının besin maddesi durumuna ve pH'ına bağlıdır. Hücre içinde birden fazla çekirdek bulunabilir. Kültür mantarlarında iki çekirdek vardır. Yaşlı hücrelerde büyüme durduğunda, hücre içindeki çekirdek birçok kere bölünerek hücreyi çok çekirdekli duruma getirebilir (Anonim 2012).

Hifler ve Miseller: Mantar sporunun çimlenmesi ile hücreler meydana gelir. Hücrelerin bölünerek çoğalmasıyla silindirik şeklinde tüpsü iplikçikler hifleri oluşturur (Şekil 1.1). Hifler renksizdir. Ancak bazı mantar türlerinde hücre duvarlarında melanin maddesinin birikmesiyle koyu bir görünüş ortaya çıkar. Hifler ilk büyüme dönemlerinde iki uçtaki hücrelerin bölünmesi ve çoğalmasıyla ipliksi bir şekil alır. Hif belli bir büyüklüğü aldığı anda ortadaki hücrelerde bölünerek hifler dallanır. Ortam içinde yumaklaşma meydana gelir. Bu hiflere primer misel adı verilir.

Primer misellerin birleşmesiyle sekonder miseller meydana gelir. Mantar miselleri hem vegetatif yani somatik ve hem de sap ve şapka meydana getirip, generatif üretim yapacak güçtedir. Şapkası açılmış bir mantar alınıp, şapkanın alt kısmı incelenirse uzunlamasına oluklu bir yapıya lamel adı verilir (Anonim 2012).

Sap ve Şapka (Karpofor): Mantarın yemeklik olarak tüketilen kısmını oluşturmaktadır (Şekil 1.1). Sap ve şapkanın yapı taşı hiflerdir. Hiflerin dik eksene paralel olarak bir araya gelmesiyle sap meydana gelmektedir. Böylece sap silindirik bir görünüm kazanır. Sapın üst tarafındaki uç hifler çevreye doğru yön değiştirerek şapkanın oluşmasını sağlamaktadırlar.

Şapkanın genişlemesi ve büyümesiyle, şapkanın alt yüzeyinde lameller ortaya çıkar. Bunlar mantarın üreme organlarını oluşturmaktadır. İlk önce pembe renkli olan lameller üzerindeki sporların olgunlaşmasıyla kahverengi siyaha dönüşür. Lameller, şapka bezelye büyüklüğünü aldığı sıralar oluşmaya başlar. Şapka kapalı olduğundan başlangıçta fark edilmemektedir. Ancak şapka açılınca varlıkları ortaya çıkar. Şapkanın büyüklüğü, tadı ve kokusu türlere ve kısmen mantarın yetiştiği ortama göre çok farklılık göstermektedir. Şapka rengi genellikle saman sarısı, beyazdır. Bazı çeşitlerde renk krem veya açık kahverengine dönüşebilmektedir (Anonim 2012).

Sporlar: Şapkanın açılmasıyla alt tarafta lameller ortaya çıkar. Lamellerin üzerinde sporlar oluşur. Sporların oluşum süresi 40 dakikadır. Ancak bu sürenin sonunda 5-7 saatlik bir olgunlaşma dönemi geçirir. Sporlar ilk iki saatte renksizdir. Daha sonra olgunlaşma dönemine girerek pigmentler oluşur. Renk önce açık kahverengi, sonra morumsu kahverengine döner.

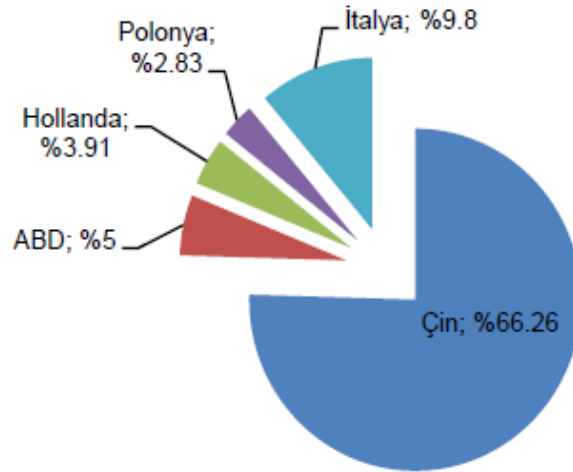
Sporların yüzeyleri düzdür. Çim borusunun çıkışına yardım eden uç kısım (por) fazla belirgin değildir. Bir şapkadan yaklaşık 6-7 milyar spor oluşabilir. Sporlar genellikle iki çekirdeklidir. Bazen 1-4 çekirdek taşıyan sporlara da rastlanır (Anonim 2012).

Kompost: Kültür mantarı (*Agaricus bisporus*) saprofit bir canlıdır, bitkisel kaynaklı ölmüş ve fermentasyona uğramış (çürümüş) organik maddeler üzerinde gelişir. Kültür mantarının yetişebilmesi için üzerinde geliştiği ortamdaki organik maddelerin kısmen ya da tümüyle parçalanmış ve mantar tarafından kolayca alınabilir formda olması gerekir. Mantar yetiştiriciliğinde organik maddece zengin bitkisel kaynaklı materyallerin belirli yöntemlerle parçalanması işlemine “kompostlaştırma”, hazırlanan ortama da “kompost” adı verilir.



Şekil 1.1. Şapkalı Mantarların Bölümleri (Arısoy 2018)

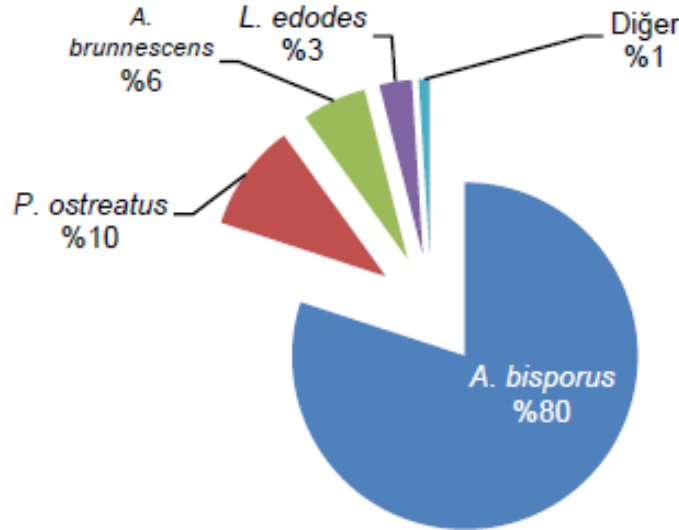
1.1.3. Dünyada ve Türkiye’de Mantar Üretim ve Tüketim Miktarları



Şekil 1.2. Dünyada başlıca mantar üretici ülkeler ve üretim payları (Eren ve Pekşen 2016)

Son 50 yıl içerisinde, dünya kültür mantarı üretiminde hızlı bir büyüme yaşanmıştır. Kültür mantarı yetiştiriciliği ilk olarak 1650 yılında Fransa'da başlamıştır. 1900'lü yıllardan sonra Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Macaristan, Danimarka ve Almanya gibi ülkelerde mantar üreticisi ülkeler arasında yer almışlardır (Günay 1995). 2000-2013 yılı mantar üretim miktarlarına göre en fazla kültür mantarı üreten 5 ülke olarak Çin, İtalya, Amerika Birleşik Devletleri, Hollanda ve Polonya sıralanmıştır (FAO 2015).

Dünyada yaklaşık olarak %30 ile en fazla kültür mantarı üretimi yapılan cins başlıca *Agaricus bisporus* ve *A. brasiliensis* türlerine sahip olmakla birlikte *Agaricus* cinsidir. Kültür mantarı üretiminde *Pleurotus* cinsi %27 ile ikinci sırada ve %17 ile *Lentinula* cinsi üçüncü sırada yer almaktadır. Dünya kültür mantarı üretim miktarlarının cinslere göre dağılımına benzer şekilde Türkiye'de de *Agaricus* cinsi %86 oranı ile birinci sırada, %10 oranı ile *Pleurotus* türleri ikinci ve %3 ile *Lentinula edodes* türü üçüncü sırada yer almaktadır (Şekil 1.3). 2013 yılı üretim miktarları dikkate alındığında Türkiye'de kültür mantarı üretiminde en büyük payı sırasıyla Antalya, Burdur, Konya, Kocaeli ve İzmir illeri oluşturmaktadır. Bunları Denizli, Malatya ve Kütahya illeri izlemektedir (TÜİK 2015). Antalya ilinde 2004 yılında Türkiye kültür mantarı üretiminin %74'ü gerçekleşirken 2013 yılında ise toplam üretimin %55'i gerçekleşmiştir. Antalya ili Korkuteli ilçesi Türkiye'nin kültür mantarı ve kompost üretim merkezi durumunda olup, 18.500 ton ile en fazla mantar üretiminin yapıldığı ilçe konumundadır. Türkiye kültür mantarı üretim miktarı 2017 itibarı ile 40.874 tondur.(TÜİK 2017).



Şekil 1.3. Türkiye mantar üretiminin türlere göre dağılımı (Eren ve Pekşen 2016)

1.1.4. Kültür Mantarlarında Hastalığa Sebep Olan Yaygın Görülen Fungal Etmenler

Kültür mantarı yetiştiriciliği birçok biyotik ve abiyotik faktöre bağlı olarak biyolojik bir sistem tarafından kontrol edilir. Yetiştiricilik süresince birçok mikroorganizmanın kontaminasyonu ile de karşı karşıya kalınmaktadır. Biyotik faktörler arasından özellikle fungal etmenler hem rakip hem de parazitik faaliyet gösterirler ve üretim boyunca da en fazla rastlanan biyotik stres faktörleri arasındadırlar (Singh vd. 2006). Temiz, uygun nem ve sıcaklık koşulları sağlanmış bir ortam ve pastörize edilmiş, karbonca zengin substrat yetiştiricilik için en uygun koşullardır. Ancak bu koşullar birçok parazitik mikroorganizmanın da gelişebilmesi için uygun bir ortam sağlar (Fletcher ve Gaze 2008).

Türkiye'de kültür mantarı yetiştiricilik işletmelerinde verim ve kalite kayıplarının başında hastalık ve zararlılar gelmesine rağmen, bu konuda ülkemizde istenilen düzeyde çalışma bulunmamaktadır. Günümüzde dünyada özellikle PCR temelli teknikler, bir çok önemli hastalık etmenlerinin tür ve ırklarının tanımlanmasında olduğu gibi kültür mantarında hastalığa sebep olan bazı fungusların teşhis ve tanımlanmasında da kullanılmaktadır. Yine bu teknikler fungusların ortaya çıkacak yeni virulent ırklarının izlenmesinde oldukça tercih edilmektedir. (Romaine vd. 2002). Ancak ülkemizde var olan bu hastalıklara hangi türlerin sebep olduğu dahi bilinmemektedir. Kültür mantar yetiştiriciliğinde hastalıklara karşı etkin bir mücadele yöntemi bulunmaması nedeni ile koruyucu önlemlere ağırlık verilmektedir. Enfeksiyondan sonra uygulanan mücadele yöntemlerinin hastalık etmenlerinin kontrolünde genellikle hiçbir faydası olmamaktadır. Bu nedenle hijyenik önlemlere uyulması, uygun pastörizasyon ve oda dezenfeksiyonu ile fungal hastalıkların çıkışı en aza indirilebilir. Ülkemizde kültür mantarı yetiştiriciliğinde (*A. bisporus*) en fazla rastlanılan fungal etmenler örümcek ağı hastalığı (*Cladobotryum* spp.), yaş (*Mycogone perniciosa*) ve kuru kabarcık (*Verticillium fungicola*) hastalığı, yeşil küf (*Trichoderma* spp.)'dir.

Kuru Kabarcık (*Verticillium fungicola*)

Verticillium fungicola ticari mantar üretim alanlarında verim kayıplarına sebep olan en önemli fungal hastalık etmenidir. Ticari anlamda yetiştiricilik yapan mantarhanelerde yıllık maliyeti toplam gelirin %2-4 arasına denk gelir (Berendsen ve ark. 2010). Yarattığı ürün kayıpları %10-20 arasında değişir. Bu oranlar kültür mantarlarında zarara neden olan diğer patojen ve böceklerden fazladır (Russel 1984). *Verticillium fungicola* 'nın virülensliği, enfeksiyonun zamanı, kültür mantarının gelişim evresi, mantarın genetik çeşitliliği ve başlangıçta enfeksiyona sebep olan konidi miktarı meydana gelen semptomlarda çeşitliliğe sebep olmaktadır (Del Carmen vd. 2002; Fletcher 1981; Nair ve Macauley 1987; Sharma ve Kumar 2005; Baar vd. 2007). Hastalığın bulaşmasıyla belirtilerinin ortaya çıkması arasındaki süre ortalama 14 gündür (Anonim 2012). Patojen kültür mantarının generatif organlarının morfolojik olarak gelişimini etkiler ve 3 tip semptom gösterir. Sapın ikiye bölünmesine, küre şekilli mantar kitlelerinin oluşmasına ve lekelenmeye neden olur. Erken enfeksiyonlar oldukça şiddetli yıkımlara sebep olur, şapka ve sap farklılaşması olmaz ve şekilsiz mantar

kitleleri oluşur. Bu kuru kabarcık olarak adlandırılır. Sapın enfekte edilmesi şapka kısmının olgunlaşmaya başlamasından sonra gerçekleşir ve sap deformasyona uğrar. Sap içeriği dışarı çıkar ve şapka ile komposttan su ve besin alışverişi ortadan kalkar. Ya da kısmi olarak dokuların çarpıtılmasıyla bir kısım sağlıklı görünürken diğer taraf deforme olmuş olarak görünür. Şapka üstünde düzensiz, merkezde grimsi renk tonunda büyük kahverengi lekeler oluşur. Bu grimsi renk tonu fungus sporulasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu belirtiler geç enfeksiyonlarda gerçekleşir (Piasecka 2010). *Verticillium fungicola* sporları toprakta bir yıldan fazla canlı kalabilir. Kuru ortamlarda 7-8 ay sporlar canlı kalabilir. Bu nedenle ilk önce üretim alanlarında görülür. Kompostta gelişemezler bu nedenle en önemli inokulum kaynakları örtü toprağıdır.

En önemli yayılma kaynakları sineklerdir. Sporlar vektörlerin bacaklarına yapışarak uzun mesafelere taşınabilirler. Rüzgarın, taşınmada önemli rolü olmadığı görülmüştür ki rüzgar hızının belli bir seviyenin üstünde olması gerekir. Hastalık etmenin yayılmasında önemli diğer bir etken sudur. Çalışanlar ve alet ekipmanla da taşındıkları bilinmektedir. Bu hastalığın kontrolünde hijyen kurallarına uyulması oldukça önemlidir. Kimyasal uygulamalar patojende direnç gelişimine neden olduğu için tercih edilmemektedir. Gelecekte yürütülecek çalışmalar arasında *Agaricus bisporus*'ta bu etmene karşı dayanıklılık sağlayacak geni bulmak ve nakletmek olacaktır (Berendsen vd. 2010).



Şekil 1.4. *Verticillium fungicola* var. *fungicola* konidileri



Şekil 1.5. *Verticillium fungicola* 'nın PDA ortamında 5 gün sonraki gelişimi



Şekil 1.6. *Verticillium fungicola* 'nın PDA ortamında 14 gün sonraki gelişimi



Şekil 1.7. *Verticillium fungicola*'nın şapka üzerinde meydana getirdiği lekeler



Şekil 1.8. *Verticillium fungicola*'nın mantar dokularında meydana getirdiği şekil bozuklukları

Yaş kabarcık (*Mycogone perniciososa*)

Yaş kabarcık hastalığı mantar yetiştiricilik işletmelerinde çok sık rastlanan ve oldukça büyük verim kayıplarına yol açan fungal patojenlerden birisidir. Hastalığın sporlarının kuru organik materyal üzerinde en az 3 yıl canlı kalabildiği görülmüştür. Enfeksiyon ile hastalığın belirtilerinin görülmesi arasındaki süre yaklaşık 10-14 gündür. Konukçu spesifik bir fungus olmamasına rağmen en uygun konukçusunun *A. bisporus* olduğu görülmüştür (Brady ve Gibson 1976; Sohi ve Grewal 1987). Hastalığın belirtileri, bulaşmanın şapka gelişiminin hangi devresinde olduğuna bağlı olarak değişir. Mantarların ilk oluşum devresi, yani sap ve şapka farklılaşmasından önceki bulaşmalarda, hastalık mantarın generatif organlarını etkiler ve bunların farklılaşmasını engeller bu nedenle ortaya promordia adı verilen bir yapı ortaya çıkar ki bu yapı şekli bozuk, tümörleşmiş, hiperplastik bir yapıyı andırır. Bunlar büyük, düzensiz, şişkinlikler oluşturur bu tümörlü yapı üzerinde ayrıca gözyaşı benzeri açık renkli akıntılar oluşur. (Umar vd. 2000). Mantarın generatif organları beyaz kabarcık patojen miselleriyle kaplanır. İlk başlarda beyaz renkli, kabarcık bu misel kütleleri sonradan kahverengi çürümüş yapıya döner. Şapka üzerinde açık renkli akıntılar görülür, bu akıntılar nedeniyle hastalık yaş kabarcık olarak adlandırılmıştır. Sonuçta çürümüş mantarlar bakteriler tarafından enfekte edildiğinde ortama kötü kokular yayılır. (Sharma ve Kumar 2000; Umar vd. 2000). *M. perniciososa*, *Verticillium* benzeri kondiofor üzerinde kısa kalın duvarlı phialokonidi ve daha genişçe bicellular konidi (aleuriospores) oluşturur. Vejetatif miselyum üzerinde bulunan bu iki yapıda enfeksiyon yapabilme yeteneğine sahiptir (Holland ve Cooke 1990).

Yaş kabarcığın yayılması, hastalık sporları ve miselleriyle olmaktadır. Bulaşık örtü toprağı, hava kanallarındaki tozlar, hava akımları, sinekler, hasat yapan personel ve kullanılan aletler hastalığın taşınmasında rol aldığı bilinmektedir. Örtü toprağının üzerinde ve içinde çok iyi geliştiğinden, kontrolü çok zordur. İlaçlama ile örtü toprağının içindeki fungal yapıya normalde ulaşılamaz. Bu nedenle mücadeleden çok koruyucu önlemlere ağırlık verilmelidir (Anonim 2012).



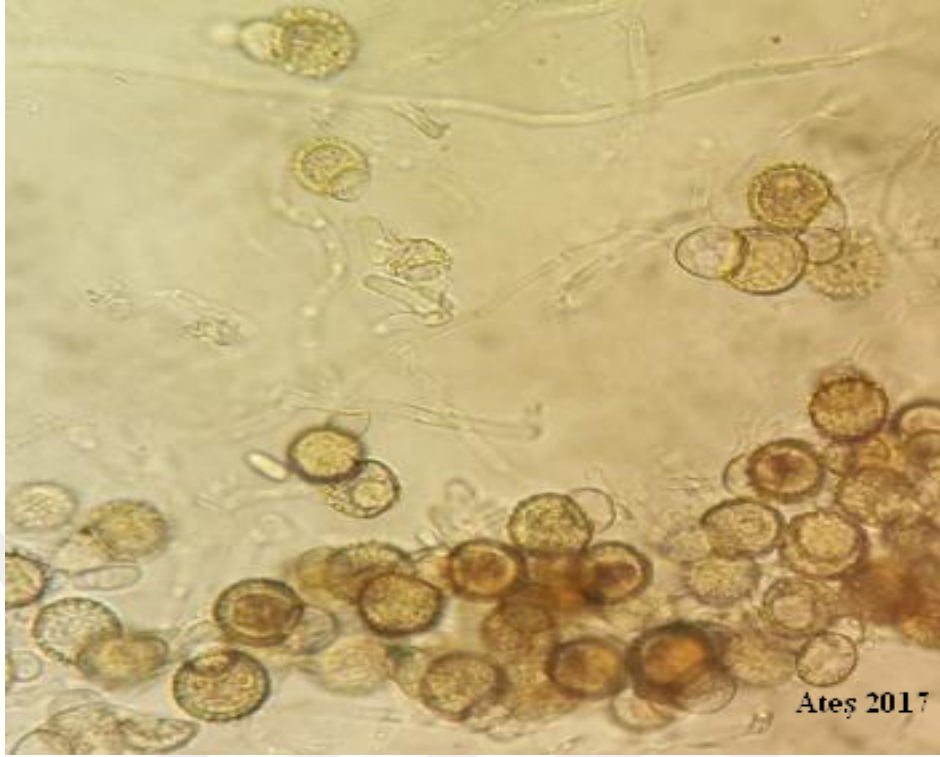
Şekil 1.9. *Mycogone perniciososa*'nın meydana getirdiği şekil bozukluğu ve akıntılar



Şekil 1.10. *Mycogone perniciososa* 'nın meydana getirdiği şekil bozukluğu ve akıntılar



Şekil 1.11. *Mycogone perniciososa* 'nın PDA ortamında 7 gün sonraki gelişimi



Şekil 1.12. *Mycogone perniciosae* aleuriosporları

Örümcek Ağı (*Cladobotryum* spp.)

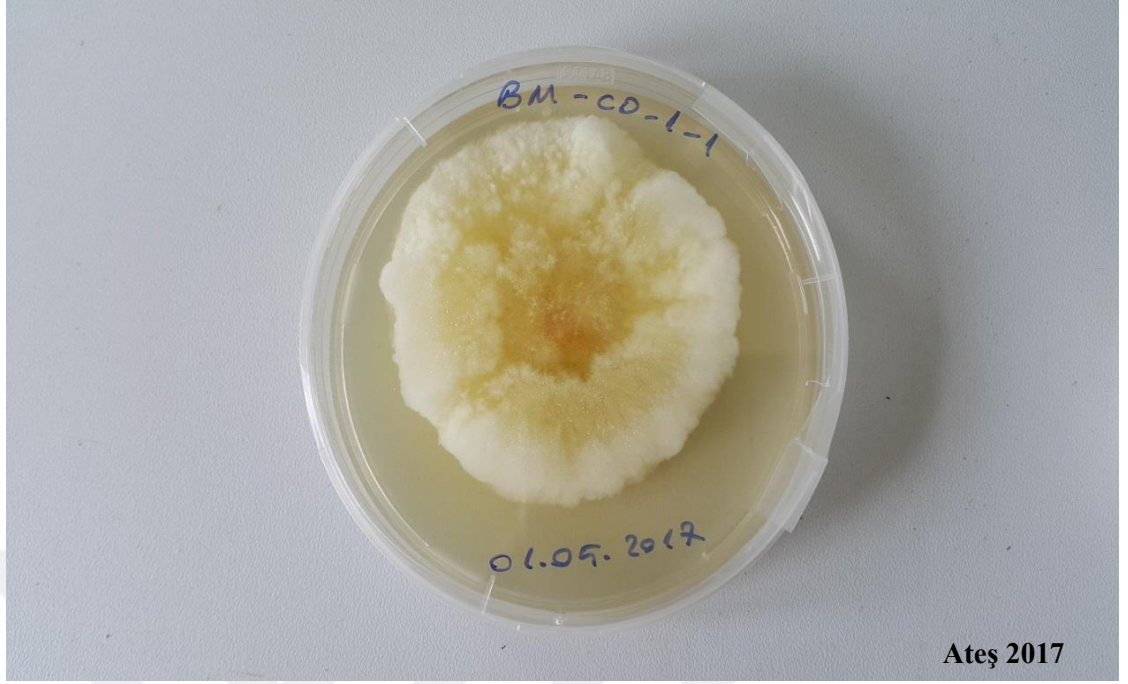
Verticillium fungicola ve *Mycogone perniciosae*'dan sonra mantar üretim alanlarında en önemli fungal patojendir (Potočník 2006). *Cladobotryum*'a ait 3 türün beyaz şapkali mantarlarda (*Agaricus bisporus*)'ta örümcek ağı hastalığına sebep olduğu bildirilmiştir. *Cladobotryum* türleri: *C. dendroides* (Bulliard : Fries) W. Gams ve Hoozemans (teleomorph *Hypomyces rosellus* (Albertini ve Schweinitz : Fries) Tulasne ve *C. Tulasne*), *C. mycophilum* (Oudemans) W. Gams ve Hoozemans (teleomorph *Hypomyces odoratus* G. R. W. Arnold) ve *C. varium* Nees : Fries (teleomorph *Hypomyces aurantius* (Persoon) Tulasne) (Eicker ve Van Greuning 1991). Bu üç tür az ya da çok benzer belirtiler gösterir. Konukçu mantar misellerinin yüzeyleri üstünde hızlı bir şekilde kolonize olurlar pamuğumsu kabarık grimsi beyaz renkli miselleriyle bütün yüzeyi kaplarlar ve konukçunun misellerini çürütürler. Zamanla miselleri sarımsı ya da aurofusarin pigmentinden dolayı kırmızımsı pembe renk alır. (McKay vd. 1998). *C. varium* diğerleri gibi tipik pembemsi kırmızı renkte misel oluşumu görülmez. *C. dendroides* belirgin basal hilum ile fialid ve konidi üretir. *C. mycophilum* bu karakteristik özellikleri göstermez. *Cladobotryum* türleri toprak kökenli kozmopolit kültür mantarı ekim alanlarında yaygın olarak görülen funguslardır (Van Zaayen ve Van Andrichem 1982; McKay vd., 1998, 1999). Sporları steril suda yedi gün canlı kalabilir. Miselleri koyu renkli mikroskleroti oluşturur. Oluşan mikrosklerotiler hastalık

etmenin uzun süre ortamda canlı kalmasını kolaylaştırır. Sporları kolaylıkla hava yoluyla , sinekler, insanlarla , alet ekipmanla ve vektörlerle uzun mesafelere taşınabilirler ve bu hastalık sadece örtü toprağı üzerinde ortaya çıkar(Adie ve Grogan 2000). *Cladobotryum* spp. türlerine ait konidioforlar vertisatillat yada düzensiz olarak dallanırlar. Dallanmış konidioforlar 3 ile 4 kadar fialid taşırlar. Konidioforlar şeffaf, başlangıçta tek hücreli olup sonradan 1 ila 3 bölmeye ayrılırlar. Önceden simetrik olarak dizilerek fialidleri oluşturan sporlar yaklaşık olarak 21-30 x 9-10.5 µm boyutundadır. Miseller siyah mikroskleroti üretirler (Hughes 1978). *Cladobotryum* spp. türlerine ait sporlar genel olarak nemli ortamda 7 yıl canlı kalabilirler. Mikrosklerotilerinin canlı kalabilme oranı ise bir hayli yüksektir. Steril sularda, aylar sonra bile mikrosklerotilerin % 100'nün çimlenme gücüne sahip olduğu görülmüştür. Örtü toprağı çok hızlı bir şekilde sporlar tarafından enfekte edilmesine rağmen simptomlar genellikle son flaşlarda görülür. Örtü toprağı patojenin miselleri ile önceden enfekteli ise simptomlar ilk flaştan önce görülür.

Cladobotryum spp. sporları hava vasıtası ile taşınarak kolayca yer değiştirebilirler (Adie ve Grogan 2000). Patojen ortamı sıcak ve nemli ortamlarda hızlı bir şekilde gelişir. Düşük havalandırma ve yüksek toprak nemi hastalığın gelişmesine olanak sağlar. Örtü toprağının 50 °C'de 4 saat sterilizasyonu etmenin eliminasyonu için önemlidir. Her hasattan sonra yastık yüzeyinde kalan sap artıkları ve ölü mantarlar temizlenmeli, sıcaklık ve nem kontrolü hastalığın önlenmesini sağlar (Sharma 1994).



Şekil 1.13. *Cladobotryum* spp. meydana getirdiğı pamuğumsu beyaz miselleri



Ateş 2017

Şekil 1.14. *Cladobotryum* spp. PDA ortamında 3 gün sonraki gelişimi



Ateş 2017

Şekil 1.15. *Cladobotryum* spp. PDA ortamında 7 sonraki gelişimi



Şekil 1.16. *Cladobotryum* spp. konidileri

Yeşil Küf (*Trichoderma* spp.)

Yeşil küf hastalığı dünya’da kültür mantarı yetiştiriciliği endüstrisinin en önemli problemlerinden birisidir. Sinden ve Houser ilk olarak bu hastalığa *Trichoderma* türlerinin sebep olduğunu tanımlamışlar ve bunu potansiyel olarak beyaz şapkalı mantarlara zarar veren önemli rakip patojenler arasında görmüşlerdir (Sinden ve Houser 1953). Yeşil küf hastalığı ticari mantar ekim alanlarında onların su, karbondioksit ve besinlerine ortak olarak mantar misellerinin gelişmesini olumsuz yönde etkiler ve bu nedenle önemli verim kayıplarına sebep olur (Morris vd. 1995). Aynı zamanda kültür mantarlarının hücrelerini yıkıcı hidrolitik enzimler salgılayarakta zararlı olurlar (Goltapeh ve Dnaesh 2000). Dünya’nın birçok yerinde %10-80 arasında değişen verim kayıplarına sebep olduğu bildirilmiştir (Rinker ve Alm 1977). *Trichoderma* spp. türleri uygun koşullarda hızla gelişir çok çeşitli besinlerden faydalanabilir (Eveleigh 1985; Singh vd. 2006).

Şimdiye kadar mantarhanelerde *Trichoderma* türlerinin sebep olduğu yeşil küf hastalığını eredike edecek çok etkili bir yöntem bulunmamakla birlikte yetiştirme ortamlarda *T. harzianum*, *T. viride*, *T. aureoviride*, *T. koningi*, *T. hamatum*, *T. piluriferum*, *T. psedokoningii*, *T. longibrachiatum*, *T. inhamatum*, *T. croceum*, *T. striciple*, *T. atroviride*, *T. cf. virens* ve *T. parceramosum*. gibi birçok tür tanımlanmıştır. Tüm bu türler arasında *Trichoderma harzianum* ve bu türe ait 4 ırkın önemli verim kayıplarına sebep olduğu görülmüştür (Sharma vd. 1999;

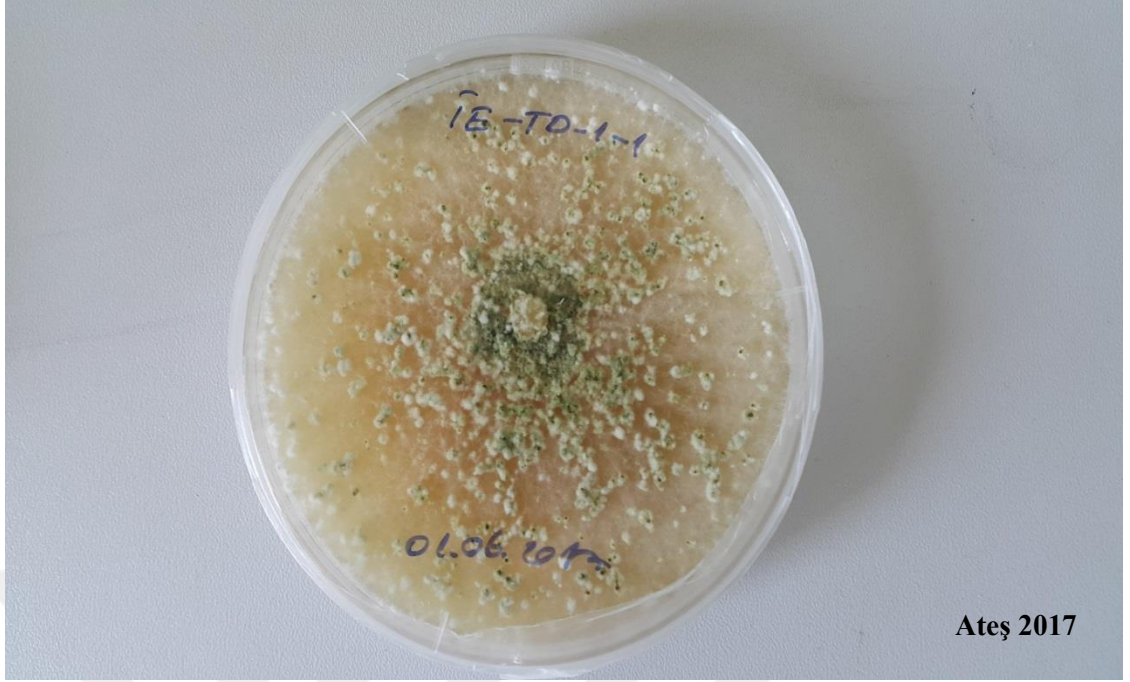
Fletcher ve Gaze 2008). *Trichoderma harzianum*'a ait 4 ırk arasından *Th2* ve *Th4* olarak tanımlanan ırkların şiddetli enfeksiyona sebep olurken *Th3* ve *Th1* ise şiddetli enfeksiyonlara sebep olmaz. Günümüzde ise *Th2* ırkı *T. aggressivum* f. *europaeum*, *Th4* ırkı *T. aggressivum* olarak tanımlanmaktadır. *Th4* ırkı özellikle Kuzey Amerika'da *Th2* ırkı ise Avrupa'da önemli epidemilere sebep olmuştur. *Th2* ve *Th4* ırkları *Trichoderma harzianum*'un benzer diğer ırklarından morfolojik ve gelişme oranlarında ki farklılıklarla ayrılırlar (Seaby 1996).

Uygun koşullarda kompost içinde ve örtü toprağı üzerinde yeşil küf hastalığı ortaya çıkabilir. Özellikle yeterince temizlenmemiş eski yastıklar önemli inokulum kaynaklarıdır (Anonim 2012). Örtü toprağı ya da kompost üzerinde *Agaricus bisporus* misellerine benzer bir misel gelişimi oluşur ve sonrasında yoğun sporulasyondan dolayı yeşil bir görünüm alır. Sonrasında enfekteli mantarlarda ve misellerinde kahverengileşme, şekil bozuklukları ve yarılmalar, *Verticillium fungicola* symptomlarına benzer sap üzerinde soyulma ve şapka üzerinde kahverengimsi lezyonlara sebep olur (Sharma vd. 2007).

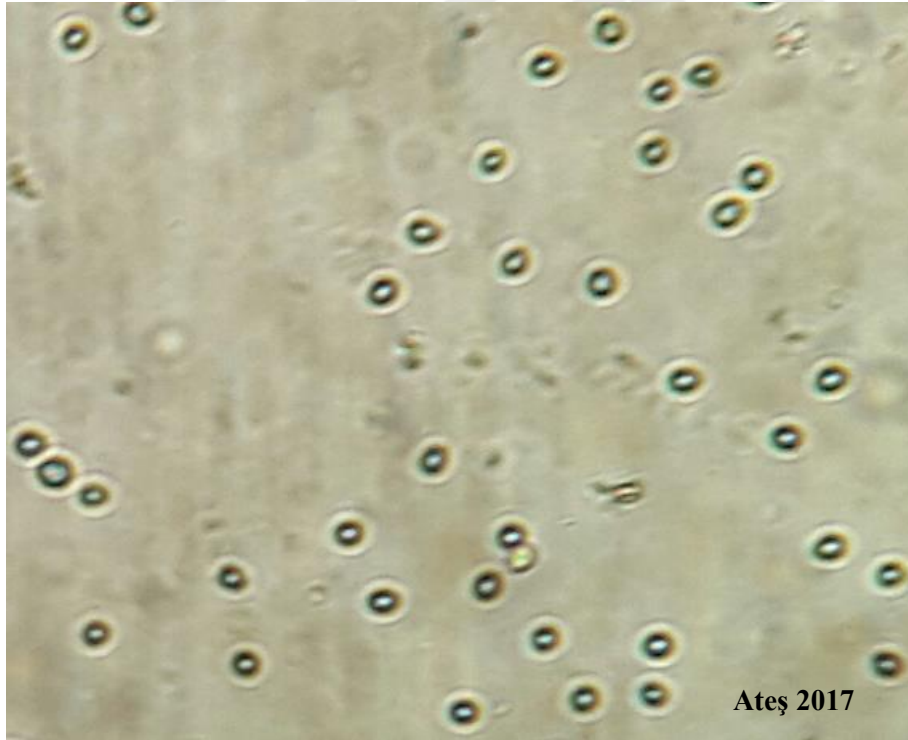
Yetiştirme ortamlarında hijyene dikkat edilmesi uygun bir şekilde kompostun pastörizasyonu ve havalandırılması etmenin gelişimini olumsuz etkiler.



Şekil 1.17. *Trichoderma* spp. kompost üzerinde meydana getirdiği yeşil sporulasyonu



Şekil 1.18. *Trichoderma* spp. PDA ortamında 7 gün sonraki gelişimi

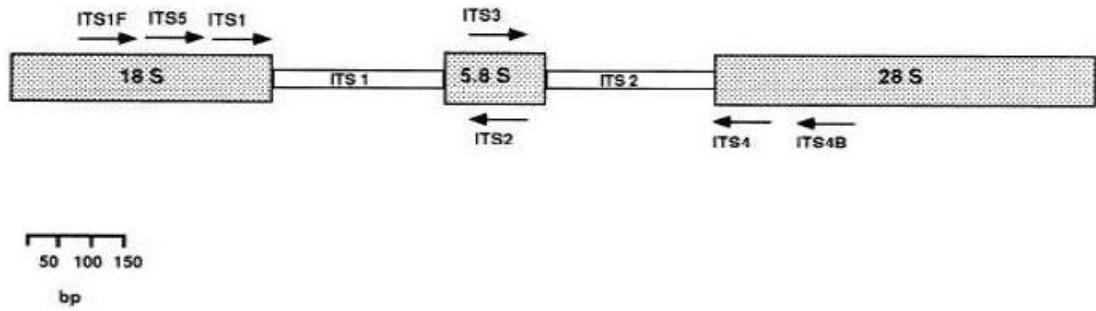


Şekil 1.19. *Trichoderma* spp. yeşil sporları

1.2. ITS: Transkribe Edilen İnternal Ara Bölgeler (Internal Transcribed Spacer) ve rDNA

rDNA ökaryotlarda çekirdekte yer alan, kopyaları peş peşe dizili, çoklu bir gen bölgesidir. Tekrarlanan her bir bölge 18S, 5.8S ve 28S rRNA genlerini içermektedir. Bu genler ITS1 ve ITS2 (Internal Transcribed Spacer), ETS (External Transcribed Spacer) ve IGS (Intergenic Spacer) isimli bölgelerle birbirinden ayrılmıştır. Yüksek frekanslı mutasyonlar gösteren ITS bölgesi cinsler içindeki türler arasında ya da popülasyonlar arasında farklılıklar göstermektedir (White vd. 1990).

Kodlanmayan iki değişken bölgeden meydana gelen ITS bölgesi, oldukça korunmuş küçük alt birim (SSU) ile 5.8S alt birimi arasında (ITS1 bölgesi) ve de büyük alt birim (LSU) rRNA genleri ile 5.8S alt birimi arasındaki bölgede (ITS2) yer almaktadır. IGS bölgesi ardışık iki tekrar bölgesini birbirinden ayırır. ETS ise bu tekrar bölgelerinin en dışında kalan bölgeleri oluşturmaktadır.



Şekil 1.20. Funguslarda rDNA bölgesi (Boysen vd.1996)

Protein sentezinin oldukça eski ve tüm organizmalarda ortak bir özellik olmasından dolayı organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi ayırt edebilmek için rRNAlar uygun moleküllerdir. rRNA fonksiyonel olarak sabit, evrensel olarak yayılış gösteren (yaygın) ve filogenetik farkı, ölçülü bir şekilde koruyabilen bir moleküldür. Ayrıca rRNA gibi büyük bir moleküldeki olasılıkların sayısı oldukça fazladır ve iki dizi arasındaki benzerlikler filogenetik bir ilişkiyi işaret etmektedir. rRNA dizi analizlerinin sonuçları ve moleküler genetik çalışmalar organizmalar arasındaki doğru evrimsel ilişkileri yansıtacak şekilde filogenetik ağaçların elde edilmesini sağlamıştır. (Madigan vd. 2003).

rRNA genlerinin kodlandığı DNA dizileri funguslarda taksonomik ilişkilerin ve genetik varyasyonun belirlenmesi çalışmalarında önemli oranda tercih edilmektedirler (Salazar vd. 2000).

ITS1F primeri funguslara özgü bir primerdir ve rDNA'nın SSU geninin 3' ucunda tamamlayıcıdır. ITS4 primeri ise evrensel bir primer olarak tanımlanmıştır ve LSU geninin 5' ucunun tamamlayıcısıdır (White vd. 1990; Gardes ve Bruns 1993). 18S rDNA nispeten yavaş evrim geçirir ve uzak akraba organizmaların karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. Kodlama yapmayan (ITS ve IGS) bölgeleri daha hızlı evrim geçirir ve bir cinse ait türlerin veya bir türdeki suşların karşılaştırılması için kullanılmaktadır. 28S rDNA'nın bazı bölgeleri türler arasında farklılık göstermektedir (Edel 1998). ITS gibi DNA dizileri diğer tüm türler içerisinde tek bir türün saptanması için uygundur. Örnek olarak; ITS dizilerindeki farklılık mantarın izolasyonuna gerek kalmadan konukçu bitkideki çoğu fitopatolojik fungus türünün saptanmasını sağlamıştır. rDNA'nın diğer dizileri örneğin 18S rDNA, 28S rDNA ve mitokondriyel rDNA dizileri de spesifik primerler geliştirmek için kullanılmaktadır (Gardes ve Bruns 1993).

ITS bölgesi 4 temel nedenle mantarlarda moleküler karakterizasyon çalışmaları için özellikle kullanışlıdır:

1. ITS bölgeleri nispeten küçük bölgelerdir (500-800 bp) ve evrensel tek bir primer çifti (rRNA alt birimleri içindeki korunmuş bölgelerin komplementeri) kullanılarak PCR ile kolaylıkla çoğaltılabilmektedirler.
2. rDNA birimlerinin çok sayıda tekrarlarının olması sebebi ile, seyreltilmiş ya da oldukça parçalanmış DNA örneklerinde dahi ITS bölgesi kolaylıkla çoğaltılabilir.
3. Morfolojik açıdan farklı türler arasında ITS bölgesi yeterince değişken olabilir ve bu nedenle ITS RFLP restriksiyon verileri genetik uzaklığı tahmin etmek için kullanılabilir, böylece filogenetik ve sistematik analizler için karakterler sağlayabilir.
4. ITS türe özgü problemleri, bir kromozomal kütüphaneye oluşturmaya gerek kalmaksızın hızlı bir şekilde PCR ile üretilebilir. Birçok araştırmacı dizilerin tekrarlayan birimler şeklinde olması ve türler arasında değişken, tür içinde benzer olma eğiliminde olmasından dolayı, türe özgü problemleri geliştirmek için dizileri ITS bölgesinden seçmektedir (White vd. 1990; Bruns vd. 1991; Lee ve Taylor 1992).

2. KAYNAK TARAMALARI

Eren ve Pekşen (2016), Yaptıkları araştırmada Türkiye’de kültür mantarı sektörünün durumu ve geleceği hakkında bilgi vermişler ve geçmişten günümüze Türkiye’de kültür mantarı üretimi ve tüketiminin arttığını vurgulamışlardır. Ayrıca yapılan çalışmada Dünya mantar üretim, tüketim, ithalat, ihracat verileri Türkiye ile karşılaştırılmış Türkiye’nin dünya mantar üretiminde hangi noktada olduğu, yetiştiriciliğin daha iyi noktalara gelebilmesi için teknolojik gelişmelerin takip edilmesi ,iyi tarım uygulamalarının giderek daha yaygın hale getirilmesi ve üreticilere üretim konusunda eğitim verilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Callopy vd. (2001) 1999 yılında Pensilvanya mantarhanelerinden toplanan yaklaşık *Verticillium fungicola* 40 izolat ve önceden koleksiyonda var olan 28 *Verticillium spp.* türleri r DNA ITS bölgesi sekans analizlerine göre 40 izolat ve koleksiyondaki 13 izolat *V. fungicola* var. *aleophilum*’a ait. Avrupa izolatlarının ise *V. fungicola* var. *fungicola* ile daha yakın benzerlik gösterdiği görülmüştür. Kuzey Amerika’da Avrupa izolatı olmayan *V. fungicola* var. *fungicola* izolatları da saptanmıştır. Ayrıca RAPD primerleri de Pensilvanya izolatlarının *V. fungicola*’nın klonal popülasyonlarını olduğu saptanmıştır.

Sergio Juarez Del Carmen vd. (2002), Bu çalışmada kültür mantarlarında kuru kabarcığa sebep olan *Verticillium fungicola* var. *aleophilum* ve *Verticillium fungicola* var. *fungicola* arasındaki genetik, morfoljik ve patojenik farklılıklar ortaya konmaya çalışılmıştır. Genetik çeşitliliğin varlığı RAPD primerleri ile miselyal gelişme, hücre dışı enzim üretimi, H₂O₂ duyarlılığı fiziksel farklılık ve patojenisite içinde in vitro ortamda kültür mantarları kullanılmıştır. Fiziksel özellikler göstermiştir ki *Verticillium fungicola* var. *aleophilum* ,*Verticillium fungicola* var. *fungicola* ’dan daha hızlı kolonize olabiliyor konukçu ile daha çabuk etkileşime girip daha çabuk hasta ediyor. *Verticillium fungicola* var. *fungicola* ayrıca daha az enzim salgılıyor ve onların spor çimlenmesi, miselleri hidrojen peroksit'e karşı daha hassas ve bu fizyolojik farklılıklar patojenisiteyi ve virülensliği etkiliyor. 5 izolat Fransa ve İngiltere, 40 izolat Kuzey Amerika’dan toplanmıştır. Şimdiye kadar bu iki varyeteden varlığından söz edilirken 2 farklı izolat bulunmuş ve bunların biyotip (farklı coğrafik bölge kaynaklı) olduğu düşünülmüştür.

Romaine vd. (2002), PCR yöntemi ile kültür mantarlarında kuru kabarcık hastalığına sebep olan *Verticillium fungicola* var. *aleophilum* (Vfa),’yı spesifik olarak tanımlamaya çalışmışlardır. Bunu 20 izolat üzerinde denemişlerdir ki bu 20 izolat 30 yıldır ekim alanlarından toplanmış primerlerde bu toplanan izolatların DNA’larına göre dizayn edilmiştir. Bu nedenle bu primerler toplanan *Verticillium fungicola* var. *fungicola* izolatlarının ve diğer türlerin DNA’larını çoğaltamamıştır. Kültür ortamlarında hastalığın tanınması 2 haftayı bulmaktadır, ancak bu yöntemle 3 saatten az bir sürede patojen tanılabilir. Bu yöntemle patojenin hızlı bir şekilde tanısının ve teşhisinin yapılmasını, hastalığın yönetim programları, ekim alanlarında potansiyel olarak enfeksiyon kaynağı olabilecek inokulum kaynaklarının taranmasında etkili olacaktır.

Berendsen vd. (2010), *Verticillium fungicola*’yı birçok yönden tanıtmaya çalışmışlardır. Taksonomik olarak *Lecanicillium fungicola* (Preuss) Zare ve Gams:

Kingdom Fungi; Phylum Ascomycota; Order Hypocreomycetidae; Family Cordycipitaceae; genus *Lecanicillium*. Konukçu aralığı *Agaricus bisporus*, *Agaricus bitorquis* ve *Pleurotus Ostreatus*'dır. Simptom kap üstünde nekrotik lekeler morfolojik bozukluk ya da kısmi morfolojik deformasyondur. Ekonomik önemi verdiği zarar yıllık gelirin %2-4'ünü denk gelir. İnokulum kaynağı 40 °C 'de sporları öldüğü için kompostta değil örtü toprağında bulunurlar. Yayılması yapışkan sporları böceklerin vücutların tutunarak uzun mesafelere taşınabilir ve su parçaları ile de taşınabilmektedir. Kontrolü için hijyen çok önemlidir çok tercih edilmese de fungusitler kullanılabilir.

Amey vd. (2007) *Verticillium fungicola* var. *fungicola* nitrat redüktaz genin tamamının sekansını ve *Verticillium fungicola*'nın ITS bölgesinin sekansını çıkarmışlardır. Filogenetik sonuçlara göre mantar patojeni olan *Verticillium* türlerinin bitki patojeni *Verticillia* türlerinden daha çok kitinolitik funguslar örneğin böcek patojeni olan *Verticillium lecanii* ve *Beauveria bassiana* ile daha yakın türleri oluşturdukları görülmüştür.

Miche` le L. vd. (2007), Real Time PCR kullanarak konukçu fungusun DNA miktarını ölçmüşler ve DNA miktarının meydana gelen semptomlarda değişikliğe sebep olup olmadığına bakmışlardır. Nitekim yaptıkları araştırmada ticari bir kültür mantarı çeşidini kullanmışlar ve *V. fungicola* izolatu inokule etmişler ancak DNA miktarının meydana gelen semptomlarda bir etkisinin olduğunu bulamamışlardır ve semptom farklılığını enfekte edilen kültür mantarının evresine , patojenin virülensliğine ve ırkın agresifliğine bağlamışlardır.

Zhou vd. (2014), Çin 'de kültür mantarlarından elde edilen 38 *Mycogone perniciosa* izolatının SRAP ile genetik farklılıkları ortaya konmaya çalışılmıştır. Test edilen ırklar%71.6 seviyesinde benzerlikle 4 kümede toplanmıştır ve bunlarda alt kümeler ayrılmıştır. Bu çalışma göstermiştir ki farklı kültür bölgelerinde önemli ölçüde farklılaşma olmuştur bu da genetik çeşitliliğin artmasına sebep olmuştur.

Kouser vd. (2015), yaptıkları araştırmada besi ortamında *Mycogone perniciosa* izolatlarının morfolojik karakterizasyonunu yapmışlar, bu hastalığın yayılmasında ve gelişmesinde etkili olan etmenleri değerlendirmişlerdir. Besi ortamına alınan örneklerin misel renkleri ilk başta açık kahverengi iken 12-14 gün sonra koyu kahverengi almıştır Konidioforları dik, uzun ve vertisatillat dallanma göstermiştir. Konidileri tek ,oval ,iki hücreli ve kalın duvarlıdır. Patojenin hem hücre içi hemde hücreler arası bir mikoparasit olduğu görülmüştür. Patojenin yayılmasında en önemli inokulum kaynağı kompost ve örtü toprağıdır. Ayrıca su parçaları ve sinekler yayılmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir.

Potočnik vd. (2008), Sırbistan'da yaptıkları bir araştırmada örümcek ağı hastalığının kuru ve yaş kabarcık hastalığından sonra kültür mantarları için en önemli hastalıklardan biri olduğunu vurgulayarak bu hastalığa ait *Cladobotryum dendroides*'i patojenisite testi ve morfolojik karakterizasyon baz alarak tanımlamaya çalışmışlardır. Sırbistan'da ki kültür mantarı ekim alanlarından örnek toplamışlar ve 20 adet izolat elde etmişlerdir. Elde edilen izolatlar besi ortamlarına alınarak koloni morfolojisine bakarak morfolojik karakterizasyon ve sağlıklı kültür mantarlarına inokulasyonla patojenisite testi yapmışlar ve sonuç olarak erken ve geç dönemlerdeki semptomlarda

koloni morfolojisinin değiştiğini, patojenisite testlerinde ise elde ettikleri 20 izolatında oldukça virölens olduğunu bulmuşlardır.

Carrasco vd. (2016), yaptıkları alışma İşpanya’da 2008 ve 2011 yılında ticari kültür mantarı üreten mantarhanelerde 3 yıl boyunca yapılan srvey çalışmalarında önemli ekonomik kayıplara sebep olan örümcek ağı hastalığının morfolojik ve moleküler analizler sonucunda *Cladobotryum mycophilum*’un neden olduğunu görmüşlerdir. Taksonomi ile ilgili karakterler Gams & Hoozemans (1970)’ın tarifine göre tanımlanmış izolatların klamidospore ürettikleri bazı izolatların mikroskleroti ürettikleri görülmüş kültürlerin ayırt edici bir kokuya sahip olmadıkları Conidiogenous hücreler 14–49 m uzunluğunda ve 3.2–8.8 m taban genişliğinde , fialid varlığına ratlanılmamış. Konidiler hyaline, silindirikten elipsoide, bazen ovoid şekillerde, belirgin ve merkezde hiluma sahip olduğu görülmüş ve 25 izolat *C. mycophilum* olarak tanımlanmıştır. Moleküler analizlerde 20 izolat ITS1 VE ITS4 primerleri oğaltılmış olan ITS bölgesinin sekans analizi sonucuna göre değerlendirilmıştır. Sekansların BLAST analizi sonucunda *C. mycophilum* ‘un (teleomorph *Hypomyces odoratus*) birçok ITS sekansı ile (99–100%) oranında benzerlik gösterdiği belirtilmiştir.

Back vd. (2012), 2010 yılında 4 farklı mantarhaneden toplanan 4 *Cladobotryum* izolatının r DNA ITS bölgesi filogenetik analizine göre *Agaricus bisporus* ve *Pleurotus eryngii*’den izole edilenlerin *C. mycophilum*, *Flammulina velutipes* ve *Hypsizygos marmoreus* izole edilenlerin *C. varium* olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca apraz patojenisite testlerine tabii tutulan izolatlardan *C. mycophilum*’un *C. varium*’a göre daha patojenik olduğu grlmştir.

Singh vd. (2006), Yenebilir mantarlarda yeşil kf hastalığına sebep olan *Trichoderma* türlerinin moleküler karakterizasyonu için RCR yöntemiyle 5.8S rRNA ITS1 ve ITS2 bölgeleri ITS1(forward) ve ITS4(reverse) primerleri ile çoğaltılarak tür içi, türler arası farklılıklar ortaya konmaya çalışılmıştır. 18 izolatında fragment uzunluğu 600-650 bpolarak belirlenmiş tür içinde ve türler arası uzunluk farklılığının oluşmadığı grlmştir .ITS bölgesi ile dizilimleri ile BLAST analizi sonucu var olan 18 *Trichoderma* izolatının içinde iki farklı tür *T. harzianum* ve *T. virens* olduğu tespit edilmiştir. RAPD primerleri ile yapılan testler sonucu izolatların arasında tür içi ve türler arasında varyasyonlar grlmştir ve bunları 8 farklı filogenetik alt sınıfa ayırmıştır. Türler arası farklılık potansiyel olabilecek yeni türlerin oluşmasında oldukça önemli olduğu vurgulanmıştır.

Chen vd. (1999), Kültür mantarı *Agaricus bisporus*’ta yeşil kf hastalığına sebep olan *Trichoderma harzianum* ırk 2 ve 4’n karakterizasyonunu yapmaya çalışmışlardır. Geçmişten bu yana Avrupa ve Kuzey Amerika’da birçok *Trichoderma* türünün yeşil kfe sebep olduğunu ama son zamanlarda epidemiyeye sebep olanın *Trichoderma harzianum*’un ırkları olduğunu görmüşlerdir. 4 tip ırkı birbirinden RAPD primerleri ile ayırt etmişler ve ırk 2 ve 4’n en yaygın ve patojenik ırklar olduğunu görmüşlerdir. Yapılan moleküler çalışmalar sonucu ırk 2 ve 4’n benzer dizilime sahip olduğu grlmştir. Bu önemli 2 patojenik tip spesifik olarak PCR yöntemi ile tanımlanmıştır. Ancak *Trichoderma harzianum* ticari olarak birçok hastalık etmenine karşı biyokontrol ajanı olarak kullanılır, arada hedefte olmayan kültür mantarlarını da

hastalandırabilir bu çalışma sayesinde salınmadan önce hangisinin ajan olarak kullanılabileceği değerlendirilebilir.

Ospina vd. (1999), yaptıkları çalışmada *Trichoderma* spp.'nin 81 izolatı PCR yöntemi ile rDNA ITS1 ve 2 bölgeleri çoğaltılmış ve *Trichoderma*'nın mantarhanedeki kültürleri ile bitki patojenlerine biyolojik kontrol sağlayan izolatları arasındaki ilişki araştırılmaya çalışılmış ve filogenetik analizler sonucunda *T. harzianum*'un agresif biyotipleri 2 ve 4 yerine biyolojik kontrol sağlayan izolatın *T. harzianum*'un biyotip 1 izolatına daha çok benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. Var olan izolatların çok çeşitli dizilimlere sahip olduklarını görmüşler ve bunun daha sonra *T. harzianum*'ün için yapılacak taksonomi ve tanımlama çalışmalarına kaynak olabileceğini belirtmişlerdir.

Hatvani vd. (2006), yaptıkları çalışmada Macaristan'da ticari olarak beyaz şapkalı mantar ve istiridye mantarı üreten alanlardan 66 adet *Trichoderma* izolatı toplanmış ve bunların ITS 1 ve 2 bölgeleri baz alınarak filogenetik ilişkileri araştırılmıştır. 7 adet *Trichoderma* türü tanımlamışlar izolatlardan 17 tanesi *T. aggressivum* f. *europaeum*, 3 izolat *T. harzianum*, 4 izolat *T. longibrachiatum*, 1 izolat *T. ghanense*, 4 izolat *T. asperellum* ve 9 izolatın *T. atroviride* olduğu görülmüştür. *T. aggressivum* f. *europaeum*'un coğrafik olarak Avrupa'da dağılım gösterdiği *P. Ostreatus* ve *Agaricus bisporus* yetiştikleri ortam kendilerine özeldir ve her iki mantar türünde hastalık yapan aynı *Trichoderma* türüdür ancak *P. ostreatus* hastalık yapan türde morfolojik ve kültür gelişimi olarak farklılık görülmüştür ve ticari mantar türleri fazlalığının yeni epidemelere davetiye çıkarttığı belirtilmiştir.

Gherbawy vd. (2014), Taif şehrinin farklı bölgelerinden alınan topraklardan elde edilen 90 *Trichoderma* (Teleomorph: *Hypocrea*) izolatı rDNA bölgesi, 18S ribosomal RNA gen (kısmi sekans); internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gen, ve internal transcribed spacer 2 (tüm sekans); ve 28S ribosomal RNA gen (kısmi sekans) içerecek şekilde türlerin tanımlanması için çoğaltılmıştır. Sekans sonuçları göstermiştir ki 78 izolat *Trichoderma harzianum* (Tel. *Hypocrea lixii*). 2 izolat *T. longibrachiatum* (Tel. H. *Orientalis*). Geriye kalan 10 izolatın filogenetik ağaca göre yeni türleri oluşturduğu görülmüştür. Çalışma boyunca toplanan *Trichoderma harzianum* izolatlarının yüksek derecelerde çeşitlilik göstermesinin sebebinin türlerin kompleks bir şekilde bulunması tarafından desteklendiği kanısına varılmıştır.

3. MATERYAL METOT

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Moleküler Mikoloji ve Entomoloji laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Enfekteli Örneklerin Toplanması ve Fungusların izolasyonu

Bu çalışma kapsamında ülkemizde günlük en yüksek mantar üretim miktarına sahip ve mantar piyasasını belirleyici konumda olan Antalya ili Korkuteli ilçesinde bulunan 30 mantarhane ziyaret edilmiştir. Kültür mantarlarında enfeksiyon yapan dört farklı hastalık etmeni gösterdikleri tipik belirtilere göre toplanmıştır. Her bir mantarhaneden alınan enfekteli örneklerden en az 3 tane alınmış, birbirlerine değdirilmeden naylon poşetlere konularak fungus izolasyonu yapılana kadar +4 °C’de saklanmıştır. Tüm fungusların izolasyonlarında yetiştirme ortamı olarak Patates Dextroz Agar (PDA) kullanılmıştır. Etiketinde tavsiye edildiği gibi 40 gr toz PDA 1 litre saf suya eklenmiş ve otoklavda 2 saat steril edilmiştir. Otoklav sterilizasyonundan sonra PDA ortamına bakteri gelişimini engellemek için 50 miligram Ampicillin veya Streptomycin antibiyotikleri konulmuş ve ortamlar steril petrilere (90 mm çapındaki) dökülerek katılaşana kadar oda sıcaklığında steril kabin içinde bekletilmiştir. Sonrasında laboratuvara alınan örneklerden;

Kuru kabarcık etmeni (*Verticillium fungicola*) izolasyonu için mantarların üzerindeki kahverengi lekeler üzerinde içinde 100 makrolitre su bulunan pipet ucuyla hafifçe eşeleme yapılarak sporların suya geçmesi sağlanmış ve yine çekilen bu spor içeren su PDA ortamına alınmış ve steril cam yayıcı ile PDA ortamına iyice yayılması sağlanarak ekim yapılmıştır (Fletcher ve Gaze 2008).

Yaş kabarcık (*Mycogone pernicioso*) etmeni izolasyonunda ise enfekteli mantar örnekleri üzerinde bulunan amber renkli akıntılar steril pipet ile çekilmiş ve steril suda seyreltilerek PDA ortamına ekim yapılmıştır. Bunun yanı sıra enfekteli örneklerden steril bisturi vasıtasıyla hastalık symptomlarının olduğu bölgelerden küçük bir parça alınmış, alınan bu parçalar 2 dk %96’lık etil-alkol çözeltisine daha sonra 1 dk steril suya batırılarak yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Steril edilen bu parçalar steril kağıt havlularda kurutulduktan sonra daha küçük parçalara ayrılıp önceden hazırlanmış PDA besi ortamına ekilerekte izolasyon yapılmıştır (Fletcher ve Gaze 2008).

Örümcek ağı hastalık etmeninin (*Cladobotryum* spp.) izolasyonunda mantar ve toprak üzerine yayılmış beyaz misel tabası üzerine pipetle eşeleme yapılarak suyun içine alınan konidiler PDA ortamına ekilmiştir. Daha sonra bu konidilerden gelişen izolatlar tek spor izolatu olarak alt kültüre alınmıştır.

Yeşil Küf (*Trichoderma* spp.) ile enfekteli örneklerden izolasyonlar için ise fungusun yeşil sporları ile kaplı toprak örneğinden steril bisturi ucu ile küçük bir parça alınmış ve steril eppendorf tüpleri içindeki 1000 makrolitre steril suyun içine konarak vortexlenmiştir. Spor solusyonu iyice karıştırıldıktan sonra mikro pipetle 100 makrolitre çekilerek PDA ortamına ekilmiş ve steril edilmiş çubuk ile ortama yayılmıştır.

Tüm örnekler için yaklaşık 5-7 günlük bir inkübasyon süresinden sonra ise PDA ortamlarında misel gelişimi görülmeye başlanmıştır. Gelişmiş misel tabakasından uç kısmından steril bisturi ile alınan küçük parçalar yeni PDA ortamına ekilmiş ve saf kültürler elde edilmiştir. Elde edilen saf kültürlerin her biri ışık mikroskopunda incelenmiş, hastalık etmenlerinin konidiofor ve konidi morfolojilerine göre hangi fungus türüne ait olduğu belirlenmeye çalışılmıştır.

Çizelge 3.1. Enfekteli örneklerinin toplandığı yerler, örnek sayıları, mantarhane sahipleri ve tarihleri

Örnek Alınan Yerler	Herbir Hastalık için Alınan Örnek Sayısı	Mantarhanelerin İsimlere Göre Kodları	Toplanma Tarihleri
Küçükköy	3	TE	25.04.2017
Küçükköy	3	CM	25.04.2017
Küçükköy	3	ER	25.04.2017
Küçükköy	3	MT	25.04.2017
Küçükköy	3	KM	25.04.2017
Yeni Mahalle	3	AT	25.04.2017
Yeni Mahalle	3	MB	25.04.2017
Yazır	3	KM	25.04.2017
Söğütçük	3	BM	25.04.2017
Yazır	3	İB	25.04.2017
Yazır	3	MD	23.05.2017
Yazır	3	RD	23.05.2017
Yazır	3	HD	23.05.2017
Yazır	3	TK	23.05.2017
Küçükköy	3	OS	23.05.2017
Yazır	3	MÖ	23.05.2017
Yazır	3	SŞ	23.05.2017
Yazır	3	YK	23.05.2017
Küçükköy	3	İK	23.05.2017
Küçükköy	3	İE	23.05.2017
Küçükköy	3	HİA	23.05.2017
Küçükköy	3	İK	23.05.2017
Yazır	3	MK	23.05.2017
Yazır	3	ŞD	06.10.2017
Yazır	3	KK	06.10.2017
Küçükköy	3	AB	06.10.2017

3.2. İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu

PDA ortamında geliştirilen tek spor izolatlarının uç kısımlarından steril bisturi vasıtasıyla alınan küçük parçalar yine üzerinde Sellofon membran bulunan PDA ortamına ekilmiştir. Yaklaşık 7- 10 günlük gelişimin ardından membran üzerinden sıyrılarak alınan taze miseller DNA izolasyonu için 1.5 ml'lik ependorf tüplerin içine konmuş, bu tüpler DNA çıkarma işlemi yapılana kadar -18 C' de buzdolabında tutulmuştur. Örneklerden DNA ekstraksiyonu CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) metodu veya DNeasy Plant Mini Kiti (Qiagen Inc., Valencia, CA). kullanılarak aşağıda tarif edildiği şekillerde yapılmıştır. CTAB metodu kullanarak DNA ekstraksiyonu için Doyle ve Doyle (1987) tarafından rapor edilmiş olan metot kullanılmıştır. Bu metoda göre:

1. 200 ml CTAB ve 300 makrolitre β -merkaptoetanol olacak şekilde solüsyonu hazırlanmıştır.
2. Steril ependorf tüplerin içinde bulunan yaklaşık 100 mg taze misel üzerine 150 makrolitre hazırlanan solüsyon eklenerek pestle yardımı ile iyice ezilmiştir.
3. İyice ezilmiş olan dokuların üzerine yine 300 makrolitre daha solüsyon eklenip biraz daha ezildikten sonra 2 saat 65 °C'de inkübasyona tabii tutulmuştur.
4. Yaklaşık 2 saat biraz sıcaklıklarının düşmesini bekledikten sonra 450 makrolitre 24:1 oranında kloroform:isoamilalkol eklenmiş ve yavaşça tüpler altüst edilmiştir. Ardından 140x100 rpm'de 10 dk santrifüj tabii tutulmuştur.
5. Santrifüj sonucu oluşan orta faza pipet ucu değdirilmeden üst faz dikkatlice alınmıştır.
6. Başka bir ependorf tüpüne alınan üst faza 300 makrolitre 24:1 oranında kloroform:isoamil alkol eklenmiş ve tüpler alt üst edilip 140x100 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra oluşan üst faz yeni bir tüpe alınmıştır.
7. Tüplere alınan üst faz kadar aynı oranda (1:1) isopropanol eklenmiş ve bir gece -20 °C'de bekletilmiştir.
8. Bir gece – 20 °C'de bekletilen örnekler çıkarıldıktan sonra yavaşça alt üst edilip soğutmalı santrifüjde 20 dk santrifüjden geçirilmiştir.
9. Soğutmalı santrifüjden sonra dipte oluşan pelletin dökülmemesine dikkat edilerek süpernatant yavaşça dökülmüştür.
10. Ardından DNA pelletinin üzerine 500 makrolitre %70 'lik soğuk etanol konulmuş ve 10 dk soğutmalı santrifüjden geçirilmiştir.
11. Ardından üst faz dikkatli bir şekilde dökümüş ve yine 500 makrolitre soğuk etanol eklendikten sonra sonra tekrar 10 dk soğutmalı santrifüje tabii tutulmuştur.

12. Üst faz dikkatli bir şekilde döküldükten sonra DNA pelleti içeren epondorf tüpleri kurumaya bırakılmıştır.

13. İyice kuruyan tüplere 100 makrolitre steril saf su eklenerek pellet suya geçene kadar oda sıcaklığında 3-4 saat kadar bekletilmiştir. Ardından izole edilen DNA'lar herhangi bir işlem yapılana kadar – 20 °C'de muhafaza edilmiştir.

DNeasy Plant Mini Kit ile yapılan ekstraksiyon için ise; üretici firmanın tarif ettiği şekilde bazı değişiklikler yapılarak DNA ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir (Catal vd. 2010). Yaklaşık 100 mg taze misel 300 makrolitre taze hazırlanmış CTAB bufferi içinde pestle vasıtasıyla iyice ezilmiştir. Ardından 300 makrolitre daha CTAB ve 6 makrolitre RNase eklenerek biraz ezildikten sonra vortexlenerek 65 °C'de 1 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Inkübasyondan alınan örnekler vortexlenip 10X100 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Ardından epondorf tüpün tabanında kalan dokuya pipet ucu değdirilmeden üstteki faz alınmış ve kolumlu tüplere aktarılmıştır. Tüpler 13x100 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Bu arada AE buffer 65 °C'de inkübasyona alınmıştır. Tüpün üstünden kolum atılıp ve dibe pipet ucu değdirilmeden tüpten 450 makrolitre çekilmiş ve steril epondorf tüplerine aktarılmıştır. Bunların üzerine 300 makrolitre soğuk %96'lık ethanol konmuş ve yavaşça 3-5 defa elle alt üst edilerek karıştırılmıştır. Ardından epondor tüplerinde ne kadar solüsyon varsa iyice pipetlenmiş ve hepsi mini spin kolumlu tüplere aktarılmıştır. Bu tüpler 1dk 13x100 rpm 'de santrifüj edilmiştir. Üstteki kolumlar tüpten çıkarılmış ve kolum collection tüplerine geçirilmiştir. Bu tüplere 500 makrolitre AW2 yıkama buffer'ı eklenmiş ve 13x100 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Kolumdan geçtikten sonra allta tüpte biriken solüsyon dökülüp tüpler ikinci bir yıkama işlemine daha tabi tutulmuştur. Ardından üstteki kolumlar epondorf tüplerin içine geçirilmiş ve önceden inkübasyona bıraktığımız AE buffer'dan 100 makrolitre kolumlu tüplere konmuş ve 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından tüpler 1 dk 13x100 rpm'de santrifüj edildikten sonra kolumlar çıkarılıp atılmış ve epondorf içine süzülen DNA solüsyonu ise bir işlem yapılana kadar -18 °C'de saklanmıştır.

3.3. PCR (Polimerase Chain Reaction) ile DNA Çoğaltılması

Moleküler analizi yapılacak olan örnekler DNA izolasyonu yapıldıktan sonra elde edilen DNA'lar ITS-1F forward (ileri) ve ITS-4 reverse (geri) primerleri (Gardes ve Bruns 1993,White vd. 1990) kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır (Çizelge 3.2).

PRİMER	OLİGONÜKLEOTİD DİZİSİ
ITS1-F	5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA'3 (Gardes ve Bruns 1993)
ITS 4	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC'3 (White vd. 1990)

Çizelge 3.2. PCR çalışmalarında kullanılan primerler

PCR reaksiyonları 24 µl reagent karışımı ve 1 µl DNA ekstrakt olmak üzere toplamda 25 µl den oluşmuştur. PCR reagentları 2 µl MgCl₂ (25 mM), 2.5 µl buffer(10x), 2.5 µl her bir dATP, dTTP, dGTP ve dCTP(2.5 mM) ile (10 µM) her bir

primerden 1.25 µl , Taq DNA polymerase(5U/ µl) 0.1µl enzimi ve 14.4 µl ddH₂O içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan PCR karışımıyla, 0.2 ml PCR tüplerinde PCR cihazı (primus 96 advanced) ile, PCR protokolü ITS1-F ve ITS4 primerleri için ilk denatürasyon 95 °C'de 3 dakika, daha sonra 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 59 saniye denatürasyon, 53 °C'de 59 saniye bağlanma (annealing), 72 °C'de 1.5 dakika uzama (extension) adımlarından oluşan reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Son olarak 72 °C'de 5 dakika ekstra uzama süresi ile reaksiyon devam ettirilmiş ve elde edilen PCR ürünü bir sonraki işleme kadar -18°C'de saklanmıştır.

PCR sonucunda oluşan ürünleri görebilmek için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Bunun için hassas terazide tartılan 1.5 gr agaroz 0.5x'lik 100 ml TAE buffer ile karıştırılarak mikrodalga fırında 5 dk kaynatılarak çözündürülmüştür. Oda sıcaklığında 15 dk kadar soğuması beklenmiş elle değilebilir sıcaklığa geldikten sonra 4 makrolitre ethidium bromide eklenmiştir. Daha sonra tarakları önceden hazırlanmış jel tepsisine dökülmüş ve jelin polimerleşmesi beklenmiştir ve jel katılaştıktan sonra taraklar dikkatli bir şekilde çekilmiştir. Katılaşmış olan jel, jel tankına yerleştirilmiş ve üzerine jeli örtecek kadar 0.5x'lik TAE buffer konmuştur. 5 µl PCR ürünü 1 µl loading dye ile birlikte kuyucuklara yüklenmiştir. PCR ürünlerinin büyüklüğünü belirlemek için her bir jel yürütülmesinde 1 kb DNA ladder kullanılmıştır. PCR ürünleri hazırlanmış agaroz jel üzerinde 80 voltta 45 dk yürütülmüş ve oluşan bantlar görüntüleme cihazı ile UV ışık altında görüntülenerek resmi çekilmiştir.

3.4. DNA dizilimlerinin çıkarılması, düzenlenmesi ve izolatların tanısı

Nükleotit dizilimleri Ankara'da bulunan BM laboratuvar sistemlerine hizmet alımı yoluyla yaptırılmıştır. Her bir izolatın ITS bölge DNA dizilimi PCR reaksiyonunda kullanılan primerler kullanılarak yapılmıştır. DNA dizi analizi sonuçları Chromas version 2.6.5 kullanılarak görüntülenmiştir. DNA dizi verileri, MEGA7'nin ikili ve çoklu hizalanması yöntemi Clustal W çoklu dizi hizalama programı (Clustal W multiple sequence alignment program) ile hizalanmıştır. Çalışmada tespit edilen ITS gen bölgesi dizileri BLAST benzerlik programı kullanılarak GenBank (NCBI, Bethesda, MD, USA) veri tabanında bulunan dizilimlerle karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada elde edilen 4 farklı etmene ait her bir izolatın DNA dizilimleri GenBank veri tabanına girilmiş ve GenBank ulaşım numaraları (accession) alınmıştır.

3.5. Filogenetik analizler ve türlerin belirlenmesi

Elde edilen *Verticillium fungicola*, *Mycogone pernisi*, *Cladobotryum* spp. , ve *Trichoderma* spp. ait her bir izolatın rDNA ITS bölge DNA dizilimlerinin filogenetik analizleri MEGA7 filogenetik analiz programı kullanılarak Neighbour Joining (Komşu Birleştirme) Metodunun Bootstrap test yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Filogenetik ağaçlar için her bir bootstrap değeri için 1000 tekerrür yapılmıştır. Model olarak Tajimi n- model kullanılmıştır (Tajima ve Nei 1984). *Verticillium fungicola*, *Mycogone pernisi*, *Cladobotryum* spp. , *Trichoderma* spp. izolatlarının hangi tür ve alt türe sahip oldukları yine bu izolatların çalışmada söz konusu gen bölgelerinin dizilimlerinin GenBank veri tabanında bulunan ve dünyanın değişik yerlerinden rapor edilen izolatların dizilimleri karşılaştırılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *Verticillium fungicola*, *Mycogone pernisiosa*, *Cladobotryum* spp. , *Trichoderma* spp.'a ait izolatlarının elde edilmesi

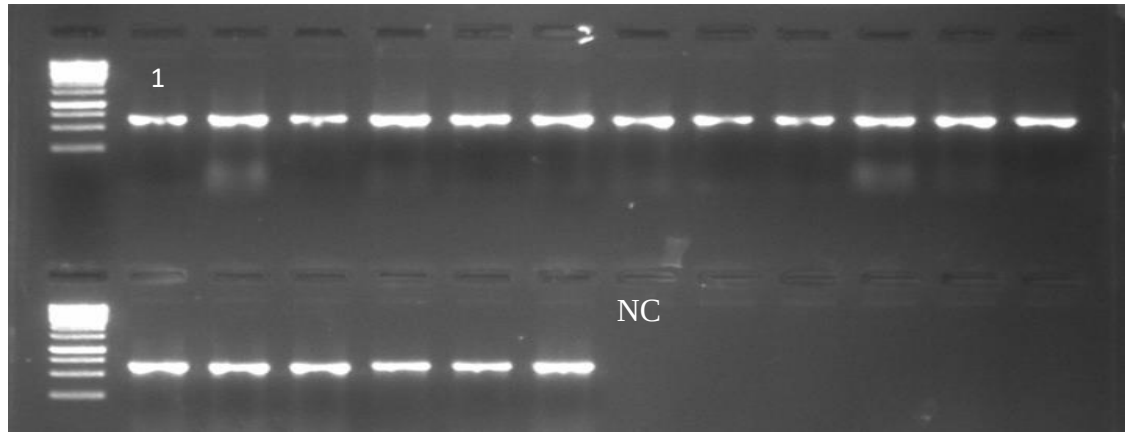
2017 Nisan, Mayıs ve Ekim aylarında Antalya Korkuteli ilçesinde toplamda 30 mantarhane gezilerek kuru kabarcık (*Verticillium fungicola*), yaş kabarcık (*Mycogone pernisiosa*), örümcek ağı (*Cladobotryum* spp.) ve yeşil küf (*Trichoderma* spp.) hastalıklarına ait belirtiler gösteren mantar örnekleri toplanmış ve etmen fungus izolasyonları için laboratuvara getirilmiştir. Her bir fungusa ait izolat mantarhane sahibine ve etmen fungusa göre kodlandırılmıştır. Bazı mantarhanelerde hiç hastalık bulunamamakla birlikte çoğunluğunda en az bir fungal hastalığın bulunduğu görülmüştür. Bu çalışmada araştırmamıza konu olan 4 fungal etmenden ise en fazla *Verticillium fungicola*'ya rastlanılmış olmakla birlikte bunu *Trichoderma* spp., *Cladobotryum* spp. ve *Mycogone pernisiosa* izlemiştir. Laboratuvara getirilen örneklerden hastalık etmeni funguslar dikkatli bir şekilde izole edilmiştir. Birlikte bulunmaları veya bulaşmaları halinde *Trichoderma* spp. ve *Cladobotryum* spp. izolatlarının *V. fungicola* ve *M. pernisiosa* izolatlarının büyümesini baskılayacak kadar güçlü bir gelişim gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca *M. pernisiosa*'nın izolasyonu en zor olan ve PDA ortamında en yavaş gelişen fungus olduğu görülmüştür. Toplamda 12 adet olarak toplanan *M. pernisiosa* enfekteli örneklerden iki tanesi kaybedilmiştir. Her bir izolatın hangi etmene ait olduğu mikroskop altında yapılan inceleme ve teşhisle teyit edilmiştir. Çalışmalarda 19 *Verticillium fungicola*, 10 *Mycogone pernisiosa*, 13 *Cladobotryum* spp. ve 14 *Trichoderma* spp. izolatı elde edilmiştir.

4.2. *Verticillium fungicola*'nın rDNA ITS bölgesinin PCR' la çoğaltılması

Antalya ili Korkuteli ilçesinde yaklaşık 30 mantarhaneden toplanan örneklerden elde edilen 19 *Verticillium fungicola* izolatının rDNA ITS bölgeleri ITS1-F ve ITS4 primerleri ile PCR testlerinde çoğaltılmıştır. Her izolat en az 3 defa PCR çoğaltmalarına tabii tutularak DNA dizimleri için gerekli PCR ürünü elde edilmiştir. PCR çoğaltmalarında *Verticillium fungicola* izolatlarının tamamı aynı büyüklükte yaklaşık 700-750 bp'lik bir PCR ürünü vermiştir. Agaroz jel üzerinde oluşan bandların büyüklüğüne bakıldığında farklı izolatları birbirinden ayırmak mümkün olmamıştır. (Şekil 4.1). Tüm PCR testlerinde negatif kontrol olarak kullanılan distile sudan (ddH₂O) herhangi bir ürün elde edilmemiştir.

Çizelge 4.1. *Verticillium fungicola* izolatlarının toplandığı mantarhaneler ve tarihleri

<i>Verticillium fungicola</i>	Alınan örnek sayısı	Mantarhanelerin İsimlere Göre Kodları	Örneklerin toplandığı tarih
Söğütçük	3	BM	25.04.2017
Yazır	3	TK	23.05.2017
Yazır	3	ŞD	06.10.2017
Küçükköy	3	AB	06.10.2017
Yazır	3	SŞ	23.05.2017
Küçükköy	3	OS	25.04.2017
Yazır	3	YK	23.05.2017
Yazır	3	MD	23.05.2017
Küçükköy	3	İE	23.05.2017
Yeni Mahalle	3	AT	25.04.2017
Yazır	3	MK	25.04.2017
Küçükköy	3	TE	25.04.2017
Küçükköy	3	CM	25.04.2017
Küçükköy	3	ER	25.04.2017
Küçükköy	3	MT	25.04.2017
Küçükköy	3	KM	25.04.2017
Küçükköy	3	HİA	23.05.2017
Küçükköy	3	İK	23.05.2017



Şekil. 4.1. *V. fungicola* izolatlarının rDNA ITS bölgesinin ITS1-F ve ITS4 primer çifti kullanılarak PCR’ da çoğaltılması. 1KB DNA ladder markır olarak kullanılmıştır. 1:HDVF-2, 2:YZVF-1, 3:IKVF-1, 4: OSVF-1, 5: IBVF-1 6:IEVF-1, 7:HDVF-1, 8:IKVF-2 9:SSVF-1, 10: HIAVF-1, 11:MTVF-1, 12: KBVF-1, 13:YKVF-1, 14:CMVF-1 15: BMVF-1, 16: RDVF-1, 17:TKVF-1, 18:KMVF-1, 19: NC

4.3. *Verticillium fungicola*'nın ITS bölgesinin DNA dizilim analizleri

PCR çalışmalarında elde edilen 19 *Verticillium fungicola* izolatının PCR ürünlerinin rDNA ITS bölgesi dizilimleri yapılmıştır. İki yönlü yapılan bu dizilimlerin alt alta sıralanması (alignment) ile her bir izolat için tek bir dizilim elde edilmiştir. *Verticillium fungicola* izolatlarından 18S rDNA ve 28S rDNA bölgelerinin kısmi dizilimlerinde dahil 690 ila 720 arasında bir dizilim alınmıştır. rDNA ITS bölge dizilimleri ise şekil 4.2'de olduğu gibidir. İzolatların MEGA7 Clustal W ile yapılan kendi aralarındaki dizilimler izolatların hemen hemen %99-100 arasında benzer olduğunu açığa çıkarmıştır. Her bir izolatın dizilimleri NCBI Blast benzerlik analizine tabii tutulmuştur. Blast analizleri Korkuteli izolatlarının *Verticillium fungicola* var. *fungicola* alt türüne ait olduğunu ve bu fungusun Genbank veri tabanında bulunan izolatları ile % 99-100 benzerlik gösterdiğini açığa çıkarmıştır.

HDVF-2 (MH183227)	CAGAGTTTACAACTCCCAAACCCAAATGTGAACATACCAATCGTTGCTTCG-GCGGACTC	[60]
YZVF-1 (MH183228)	-.....	[60]
IKVF-1 (MH183229)	-.....	[60]
OSVF-1 (MH183230)	-.....	[60]
IBVF-1 (MH183231)	-.....	[60]
IEVF-1 (MH183232)	-.....	[60]
HDVF-1 (MH183233)	-.....	[60]
IKVF-2 (MH183234)	-.....	[60]
SSVF-1 (MH183235)	-.....	[60]
HIAVF-1 (MH183236)	-.....	[60]
HIAVF-2 (MH183237)	-.....	[60]
MTVF-1 (MH183238)	-.....	[60]
KBVF-1 (MH183239)	-.....	[60]
YKVF-1 (MH183240)	-.....	[60]
CMVF-1 (MH183241)	-.....	[60]
BMVF-1 (MH183242)	-.....	[60]
RDVF-1 (MH183243)	G.....T-.....	[60]
TKVF-1 (MH183244)	-.....	[60]
KMVF-1 (MH183245)	-.....	[60]
MGB002 (KC964107)	-.....	[60]
Iran707C (EF641890)	-.....	[60]
CBS992.69 (NR119653)	-.....	[60]
CBS440.34 (AF324874)	-.....	[60]
CABI:IMI188936	-.....	[60]
V22B (KC987489)	-----A.--.....-.....	[60]
NBRC30620 (AB107135)	-.....	[60]
CBS171.80 (EF641886)	-.....	[60]
NBRC30728	-.....	[60]
CBS35780 (AF324876)	-.....	[60]
V.dahliae (LE1350)	-----TT.T..GT.GGTG..CC..--.GG.GGG...A..A.CGA.TATCT....	[60]
HDVF-2 (MH183227)	GTCCCGGCGTCCGGGTGGCCTTGCGCTGCCCGCGGCCCGGATCCAGGCGGCCCGCGGAGG	[120]
YZVF-1 (MH183228)		[120]
IKVF-1 (MH183229)		[120]
OSVF-1 (MH183230)		[120]
IBVF-1 (MH183231)		[120]
IEVF-1 (MH183232)		[120]
HDVF-1 (MH183233)		[120]
IKVF-2 (MH183234)		[120]
SSVF-1 (MH183235)		[120]
HIAVF-1 (MH183236)		[120]
HIAVF-2 (MH183237)		[120]
MTVF-1 (MH183238)		[120]
KBVF-1 (MH183239)		[120]
YKVF-1 (MH183240)		[120]
CMVF-1 (MH183241)		[120]
BMVF-1 (MH183242)		[120]
RDVF-1 (MH183243)		[120]
TKVF-1 (MH183244)		[120]
KMVF-1 (MH183245)		[120]
MGB002 (KC964107)		[120]
Iran707C (EF641890)		[120]

Şekil 4.2'nin devamı

CBS992.69 (NR119653)		[120]
CBS440.34 (AF324874)		[120]
CABI:IMI188936		[120]
V22B (KC987489)		[120]
NBRC30620 (AB107135)		[120]
CBS171.80 (EF641886)	...A...C...T...A...A...	[120]
NBRC30728 (AB111494)	...A...C...T...A...A...	[120]
CBS35780 (AF324876)	...A...C...T...A...A...	[120]
V.dahliae (LE1350)	A.AA.CCTT.GT.AACCATA...TTGCTT.G...T..T-..TGC.A.C.....-T	[120]
HDVF-2 (MH183227)	CCAT-CAAACCTCTTTGTAT-TACCAGTAT--CTTCTGAATCCGCCGCAAGGCAAAACAAA	[180]
YZVF-1 (MH183228)		[180]
IKVF-1 (MH183229)		[180]
OSVF-1 (MH183230)		[180]
IBVF-1 (MH183231)		[180]
IEVF-1 (MH183232)		[180]
HDVF-1 (MH183233)		[180]
IKVF-2 (MH183234)		[180]
SSVF-1 (MH183235)		[180]
HIAVF-1 (MH183236)		[180]
HIAVF-2 (MH183237)		[180]
MTVF-1 (MH183238)		[180]
KBVF-1 (MH183239)		[180]
YKVF-1 (MH183240)		[180]
CMVF-1 (MH183241)		[180]
BMVF-1 (MH183242)		[180]
RDVF-1 (MH183243)		[180]
TKVF-1 (MH183244)		[180]
KMVF-1 (MH183245)		[180]
MGB002 (KC964107)		[180]
Iran707C (EF641890)		[180]
CBS992.69 (NR119653)		[180]
CBS440.34 (AF324874)		[180]
CABI:IMI188936		[180]
V22B (KC987489)		[180]
NBRC30620 (AB107135)		[180]
CBS171.80 (EF641886)	...T.....	[180]
NBRC30728 (AB111494)	...T.....	[180]
CBS35780 (AF324876)	...T.....	[180]
V.dahliae (LE1350)	...-..GT....C...T.A....ACGATA.....G.GTT.T-----T.G.G..	[180]
HDVF-2 (MH183227)	TGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA	[240]
YZVF-1 (MH183228)		[240]
IKVF-1 (MH183229)		[240]
OSVF-1 (MH183230)		[240]
IBVF-1 (MH183231)		[240]
IEVF-1 (MH183232)		[240]
HDVF-1 (MH183233)		[240]
IKVF-2 (MH183234)		[240]
SSVF-1 (MH183235)		[240]
HIAVF-1 (MH183236)		[240]
HIAVF-2 (MH183237)		[240]
MTVF-1 (MH183238)		[240]
KBVF-1 (MH183239)		[240]
YKVF-1 (MH183240)		[240]
CMVF-1 (MH183241)		[240]
BMVF-1 (MH183242)		[240]
RDVF-1 (MH183243)		[240]
TKVF-1 (MH183244)		[240]
KMVF-1 (MH183245)		[240]
MGB002 (KC964107)		[240]
Iran707C (EF641890)		[240]
CBS992.69 (NR119653)		[240]
CBS440.34 (AF324874)		[240]
CABI:IMI188936		[240]
V22B (KC987489)		[240]
NBRC30620 (AB107135)		[240]
CBS171.80 (EF641886)		[240]
NBRC30728 (AB111494)		[240]
CBS35780 (AF324876)		[240]
V.dahliae (LE1350)	CT.-.T.....T.....C...A.....	[240]

Şekil 4.2'nin devamı

HDVF-2 (MH183227)	ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT	[300]
YZVF-1 (MH183228)		[300]
IKVF-1 (MH183229)		[300]
OSVF-1 (MH183230)		[300]
IBVF-1 (MH183231)		[300]
IEVF-1 (MH183232)		[300]
HDVF-1 (MH183233)		[300]
IKVF-2 (MH183234)		[300]
SSVF-1 (MH183235)		[300]
HIAVF-1 (MH183236)		[300]
HIAVF-2 (MH183237)		[300]
MTVF-1 (MH183238)		[300]
KBVF-1 (MH183239)		[300]
YKVF-1 (MH183240)		[300]
CMVF-1 (MH183241)		[300]
BMVF-1 (MH183242)		[300]
RDVF-1 (MH183243)		[300]
TKVF-1 (MH183244)		[300]
KMVF-1 (MH183245)		[300]
MGB002 (KC964107)		[300]
Iran707C (EF641890)		[300]
CBS992.69 (NR119653)		[300]
CBS440.34 (AF324874)		[300]
CABI:IMI188936		[300]
V22B (KC987489)		[300]
NBRC30620 (AB107135)		[300]
CBS171.80 (EF641886)		[300]
NBRC30728 (AB111494)		[300]
CBS35780 (AF324876)		[300]
V.dahliae (LE1350)	.C.....T...G.....G	[300]
HDVF-2 (MH183227)	GCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAGCTCC	[360]
YZVF-1 (MH183228)		[360]
IKVF-1 (MH183229)		[360]
OSVF-1 (MH183230)		[360]
IBVF-1 (MH183231)		[360]
IEVF-1 (MH183232)		[360]
HDVF-1 (MH183233)		[360]
IKVF-2 (MH183234)		[360]
SSVF-1 (MH183235)		[360]
HIAVF-1 (MH183236)		[360]
HIAVF-2 (MH183237)		[360]
MTVF-1 (MH183238)		[360]
KBVF-1 (MH183239)		[360]
YKVF-1 (MH183240)		[360]
CMVF-1 (MH183241)		[360]
BMVF-1 (MH183242)		[360]
RDVF-1 (MH183243)		[360]
TKVF-1 (MH183244)		[360]
KMVF-1 (MH183245)		[360]
MGB002 (KC964107)		[360]
Iran707C (EF641890)		[360]
CBS992.69 (NR119653)		[360]
CBS440.34 (AF324874)		[360]
CABI:IMI188936		[360]
V22B (KC987489)		[360]
NBRC30620 (AB107135)		[360]
CBS171.80 (EF641886)		[360]
NBRC30728 (AB111494)		[360]
CBS35780 (AF324876)		[360]
V.dahliae (LE1350)	TT.....T...C...GA.....C.....G.....C...C	[360]
HDVF-2 (MH183227)	CTTTGGGGAGCCCGGCGTTGGGGACCGGCTCTACCGCCGCCCCGAAATACAGTGGCGG	[420]
YZVF-1 (MH183228)		[420]
IKVF-1 (MH183229)		[420]
OSVF-1 (MH183230)		[420]
IBVF-1 (MH183231)		[420]
IEVF-1 (MH183232)		[420]
HDVF-1 (MH183233)		[420]
IKVF-2 (MH183234)		[420]

Şekil 4.2'nin devamı

SSVF-1 (MH183235)		[420]
HIAVF-1 (MH183236)		[420]
HIAVF-2 (MH183237)		[420]
MTVF-1 (MH183238)		[420]
KBVF-1 (MH183239)		[420]
YKVF-1 (MH183240)	C.....	[420]
CMVF-1 (MH183241)		[420]
BMVF-1 (MH183242)		[420]
RDVF-1 (MH183243)		[420]
TKVF-1 (MH183244)		[420]
KMVF-1 (MH183245)		[420]
MGB002 (KC964107)		[420]
Iran707C (EF641890)		[420]
CBS992.69 (NR119653)		[420]
CBS440.34 (AF324874)		[420]
CABI:IMI188936		[420]
V22B (KC987489)		[420]
NBRC30620 (AB107135)		[420]
CBS171.80 (EF641886)	.C.....A.....	[420]
NBRC30728 (AB111494)	.C.....A.....	[420]
CBS35780 (AF324876)	.C.....A.....	[420]
V.dahliae (GU461634)	----A.TG.....T.....T.TA.G...--TA.G...TT...AG.....	[420]
HDVF-2 (MH183227)	CCCCGTCACGGCGACCTCTGCGTAGTAACCTCAACCTCGCACCGGAAACCCGACGTGACCA	[480]
YZVF-1 (MH183228)	G...	[480]
IKVF-1 (MH183229)	G...	[480]
OSVF-1 (MH183230)	G...	[480]
IBVF-1 (MH183231)	G...	[480]
IEVF-1 (MH183232)	G...	[480]
HDVF-1 (MH183233)	G...	[480]
IKVF-2 (MH183234)	G...	[480]
SSVF-1 (MH183235)	G...	[480]
HIAVF-1 (MH183236)	G...	[480]
HIAVF-2 (MH183237)	G...	[480]
MTVF-1 (MH183238)	G...	[480]
KBVF-1 (MH183239)	G...	[480]
YKVF-1 (MH183240)	G...	[480]
CMVF-1 (MH183241)	G...	[480]
BMVF-1 (MH183242)	G...	[480]
RDVF-1 (MH183243)	G...	[480]
TKVF-1 (MH183244)	G...	[480]
KMVF-1 (MH183245)	G...	[480]
MGB002 (KC964107)	G...	[480]
Iran707C (EF641890)	G...	[480]
CBS992.69 (NR119653)	G...	[480]
CBS440.34 (AF324874)	G...	[480]
CABI:IMI188936	G...	[480]
V22B (KC987489)	G...	[480]
NBRC30620 (AB107135)	G...	[480]
CBS171.80 (EF641886)	G...	[480]
NBRC30728 (AB111494)	G...	[480]
CBS35780 (AF324876)	G...	[480]
V.dahliae (GU461634)	A....CGTG.C.CTT.AT.....GT.AC.G.....T....GT....CA.GCG.TT	[480]
HDVF-2 (MH183227)	CGCCGTAAACACC-----CCACTTC-----TGAAC	[519]
YZVF-1 (MH183228)		[519]
IKVF-1 (MH183229)		[519]
OSVF-1 (MH183230)		[519]
IBVF-1 (MH183231)		[519]
IEVF-1 (MH183232)		[519]
HDVF-1 (MH183233)		[519]
IKVF-2 (MH183234)		[519]
SSVF-1 (MH183235)		[519]
HIAVF-1 (MH183236)		[519]
HIAVF-2 (MH183237)		[519]
MTVF-1 (MH183238)		[519]
KBVF-1 (MH183239)		[519]
YKVF-1 (MH183240)		[519]
CMVF-1 (MH183241)		[519]
BMVF-1 (MH183242)		[519]
RDVF-1 (MH183243)		[519]

TKVF-1 (MH183244)		[519]
KMVF-1 (MH183245)		[519]
MGB002 (KC964107)		[519]
Iran707C (EF641890)		[519]
CBS992.69 (NR119653)		[519]
CBS440.34 (AF324874)		[519]
CABI:IMI188936		[519]
V22B (KC987489)		[519]
NBRC_30620 (AB107135)		[519]
CBS171.80 (EF641886)		[519]
NBRC_30728 (AB111494)		[519]
CBS35780 (AF324876)		[519]
V.dahliae (GU461634)	GC.TC....C.C..TACAAGC..G.C..GTGCGGCA.CG	[519]

Şekil 4.2. *Verticillium fungicola* var. *fungicola* izolatlarının ITS1-F ve ITS4 primerleri ile elde edilen ITS bölgesi DNA baz dizilimlerinin alt alta dizilmiş hali.

4.4. *Verticillium fungicola*'nın ITS DNA dizilimlerinin filogenetik analizleri

Filogenetik analizlerde Antalya Korkuteli ilçesi mantarhanelerinde izole edilen 19 izolatla beraberer Genbank veritabanından indirilen ABD, Hollanda, İngiltere, İran, İspanya, Japonya ve Polonya'dan hepsi *A.bisporus*'tan elde edilen 7 *Verticillium fungicola* var. *fungicola* izolatının ITS bölgesinin DNA dizilimlerinden yararlanılmıştır. Yine analizlere 2' si Hollanda ve biri Japonya'dan olmak üzere *Agaricus bitorquis*'ten izole edilen 3 *V. fungicola* var. *aleophilum* izolatı da dahil edilmiştir (Çizelge 4.2). *Verticillium fungicola*'nın Genbank izolatları aynı zamanda Blast programı ile yapılan benzerlik karşılaştırmalarında Korkuteli izolatlarına en yakın izolatları temsil etmektedir. Filogenetik analizler MEGA7 programının Neighbour Joining (Komşu Birleştirme) Metodunun Bootstrap test yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Filogenetik ağaçlar için her bir bootstrap değeri için 1000 tekerrür yapılmıştır. Model olarak Tajimi Nei kullanılmıştır. Ağaç kol uzunluğu toplamı 0.40628533 ye eşit olan filogenetik soy ağacı seçilmiştir (Şekil 4.3). Aynı grup içindeki izolatların ve farklı grupların birbirlerine benzerlik yüzdeleri ağacın dallarında gösterilmiştir. Toplamda dış grup *V. dahliae* izolatı da dahil 30 izolata ait DNA dizilimleri analize tabi tutulmuştur. En son veride toplam 460 pozisyon bulunmaktadır. Şekil 4.9' da görüldüğü gibi filogenetik analizler *V. fungicola* var. *fungicola* ve var. *aleophilum* izolatlarının birbirinden oldukça uzak iki grup oluşturduğunu göstermiştir. Analizler Korkuteli mantar üretim yerlerinden alınan izolatların *V. fungicola* türünün *fungicola* alt türüne ait olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada elde edilen 19 *Verticillium fungicola* var. *fungicola* izolatının ITS DNA dizilimleri Genbank veri tabanına girilmiş ve MH183227-MH183245 kayıt numaraları ile depolanmıştır (Çizelge 4.2).Yine analizler Korkuteli izolatlarının 18 tanesinin aynı grup içinde ABD, İngiltere, İran ve ıspanya izolatları ile çok yakın akraba olduğunu göstermiştir. Bir izolatın (RDVF-1) ise Polonya ve Japonya izolatları ile aynı gruba girdiğini göstermiştir.

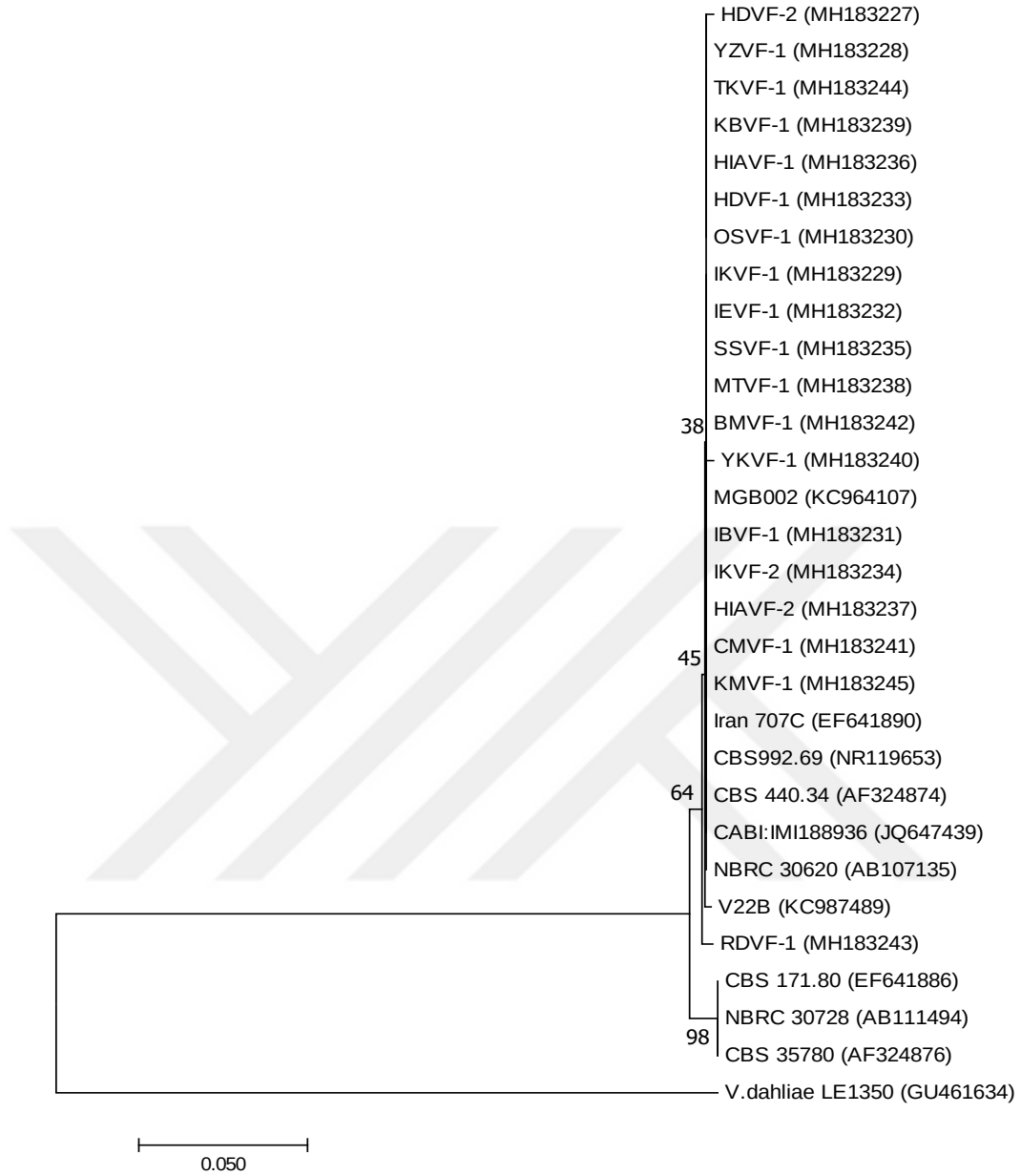
Çizelge 4.2. Filogenetik analizlerde kullanılan Korkuteli'nden izole edilen ve GenBank'tan alınan *Verticillium fungicola* izolatları

İzolat	Konukçu	GenBank No	Ülke	Tür/Alt tür
HDVF-2	<i>Agaricus bisporus</i>	MH183227	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>

Devamı Arkada

Çizelge 4.2'nin devamı

YZVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183228	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
IKVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183229	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
OSVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183230	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
IBVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183231	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
IEVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183232	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
HDVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183233	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
IKVF-2	<i>A.bisporus</i>	MH183234	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
SSVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183235	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
HIAVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183236	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
HIAVF-2	<i>A.bisporus</i>	MH183237	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
MTVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183238	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
KBVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183239	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
YKVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183240	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
CMVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183241	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
BMVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183242	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
RDVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183243	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
TKVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183244	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
KMVF-1	<i>A.bisporus</i>	MH183245	Türkiye	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
MGB0002	<i>A.bisporus</i>	KC964107	İspanya	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
IRAN 707C	<i>A.bisporus</i>	EF641890	İran	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
CBS 992.69	<i>A.bisporus</i>	NR119653	Hollanda	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
CBS 440.34	<i>A.bisporus</i>	AF324874	ABD	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
NBRC 30620	<i>A.bisporus</i>	AB107135	Japonya	<i>V. fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
CABI:IMI188936	<i>A.bisporus</i>	JQ647439	İngiltere	<i>V. fungicola</i>
V22B	<i>A.bisporus</i>	KC987489	Polonya	<i>V.fungicola</i> var. <i>fungicola</i>
CBS 171.80	<i>Agaricus bitorquis</i>	EF641886	Hollanda	<i>V. fungicola</i> var. <i>aleophilum</i>
NBRC 30728	<i>A.bitorquis</i>	AB111494	Japonya	<i>V. fungicola</i> var. <i>aleophilum</i>
CBS 357.80	<i>A.bitorquis</i>	AF324876	Hollanda	<i>V. fungicola</i> var. <i>aleophilum</i>
LE1350	<i>Lycopersicum esculentum</i>	GU461634	ABD	<i>V. dahliae</i>



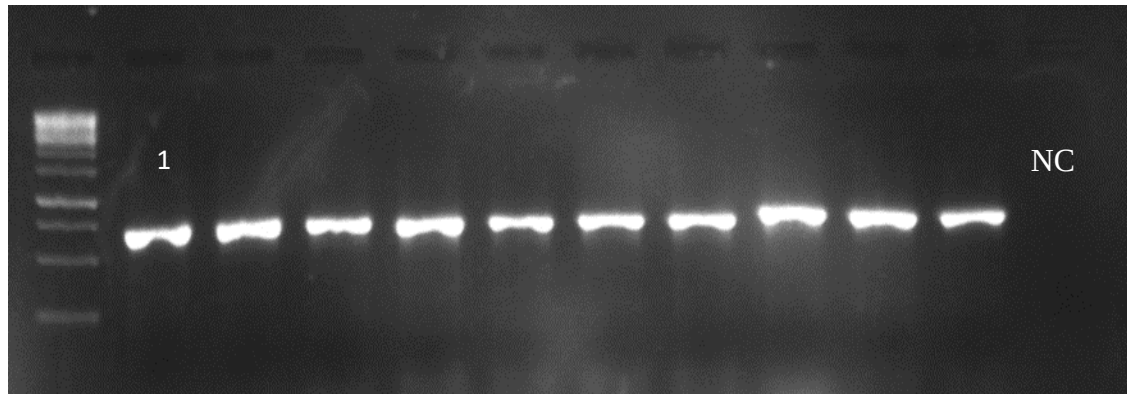
Şekil 4.3. *Verticillium fungicola* izolatlarının ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) bölgesinin DNA dizilimlerinin filogenetik analizi.

4.5. *Mycogone pernicioso*'nın rDNA ITS bölgesinin PCR' la çoğaltılması

Antalya ili Korkuteli ilçesinde gezilen mantarhanelerden 12'sinde *Mycogone pernicioso* etmeni bulunmuştur. Ancak 2 örnek bulaşıklık sebebi ile kaybedilmiştir. Toplanan örneklerden elde edilen 10 *Mycogone pernicioso* izolatının rDNA ITS bölgeleri ITS1-F ve ITS4 primer çifti kullanılarak PCR testlerinde çoğaltılmıştır. Her izolatlar en az 3 defa PCR çoğaltmalarına tabii tutularak DNA dizimleri için yeterince PCR ürünü elde edilmiştir. PCR çoğaltmalarında *M. pernicioso* izolatlarının hepsi aynı büyüklükte yaklaşık 700-750 bp'lik bir ürün vermiştir. Agaroz jel üzerinde oluşan bandların büyüklüğüne bakıldığında farklı izolatları birbirinden ayırmak mümkün olmamıştır (Şekil 4.4). Tüm PCR testlerinde negatif kontrol olarak kullanılan distile sudan (ddH₂O) herhangi bir ürün elde edilmemiştir.

Çizelge 4.3. *Mycogone pernicioso* izolatlarının toplandığı mantarhaneler ve tarihleri

<i>Mycogone pernicioso</i>	Alınan örnek sayısı	Mantarhanelerin İsimlere Göre Kodları	Örneklerin toplandığı tarih
Söğütçük	3	BM	25.04.2017
Yazır	3	TK	23.05.2017
Yazır	3	ŞD	06.10.2017
Küçükköy	3	AB	06.10.2017
Yazır	3	SŞ	23.05.2017
Küçükköy	3	OS	25.04.2017
Yazır	3	YK	23.05.2017
Yazır	3	MD	23.05.2017
Küçükköy	3	İE	23.05.2017
Yeni Mahalle	3	AT	25.04.2017
Yazır	3	MK	06.10.2017
Yazır	3	HD	23.05.2017



Şekil 4.4. *Mycogone perniciosa* izolatlarının rDNA ITS bölgesinin ITS1-F ve ITS4 primer çifti kullanılarak PCR’ da çoğaltılması. 1KB DNA ladder markır olarak kullanılmıştır. 1:YKMP-1, 2:MDMP-1, 3: IEMP-1, 4:YKMP-1, 5:BMMP-1, 6: SSMP-1, 7: ATMP-1, 8:MKMP-1, 9:OSMP-1, 10:HDMP-1, 11: NC (Negatif kontrol)

4.6. *Mycogone perniciosa*'nın ITS bölgesinin DNA dizilim analizleri

PCR çoğaltmalarında elde edilen 10 *M. perniciosus* izolatına ait ITS bölgesi PCR ürünlerinin DNA dizilimleri yapılmıştır. İki yönlü yapılan bu dizilimlerin alt alta sıralanması (alignment) ile her bir izolat için tek bir dizilim elde edilmiştir. *M. perniciosus* izolatlarından 18S rDNA ve 28S rDNA bölgelerinin kısmı dizilimleride dahil 680 ila 720 arasında bir dizilim elde edilmiştir. rDNA ITS bölgesi dizilimleri ise şekil 4.5’de olduğu gibidir. İzolatların MEGA7 Clustal W ile yapılan kendi aralarındaki dizilimler izolatların hemen hemen %99-100 arasında benzer olduğunu açığa çıkarmıştır. Her bir izolatın dizilimleri NCBI Blast benzerlik analizine tabii tutulmuştur. Blast analizleri izolatların *M. perniciosus* türüne ait olduğunu ve bu fungusun Genbank veri tabanında bulunan izolatları ile % 99 benzer olduğunu göstermiştir.

YKMP-1 (MH184588)	AGTCTCGTTGGTGACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAACCCTA-TGT	[60]
MDMP-1 (MH184589)	G.....	[60]
IENTP-1 (MH184590)	-----	[60]
YKMP-2 (MH184591)	-----	[60]
BMMP-1 (MH184592)	-----	[60]
SSMP-1 (MH184593)	-----	[60]
ATMP-1 (MH184594)	-----	[60]
MKMP-1 (MH184595)	-----	[60]
OSMP-1 (MH184596)	-----	[60]
HDMP-1 (MH184597)	-----	[60]
CBS648.82 (FJ904634)	TT..CGTAG.TGA...T.....	[60]
MGB0004 (KC964105)	-----	[60]
ND (EU380317)	-----	[60]
I35 (MG890628)	TTC.GTAGG.....T.....	[60]
WB6-1 (FJ904629)	-----	[60]
H2 (KY492331)	-----	[60]
WB5-1 (FJ904628)	-----	[60]
CBS100321 (AJ228693)	-----	[60]
YKMP-1 (MH184588)	GAACCTTACCATTCTGTTGCTTCGCGCGGGATCGTCCCGGGTGCGGTCAAAGGCCAGCCC	[120]
MDMP-1 (MH184589)		[120]
IENTP-1 (MH184590)		[120]
YKMP-2 (MH184591)		[120]
BMMP-1 (MH184592)		[120]
SSMP-1 (MH184593)		[120]
ATMP-1 (MH184594)		[120]
MKMP-1 (MH184595)		[120]

Şekil 4.5 'in devamı

OSMP-1 (MH184596)		[120]
HDMP-1 (MH184597)		[120]
CBS648.82 (FJ904634)		[120]
MGB0004 (KC964105)		[120]
ND (EU380317)		[120]
I35 (MG890628)		[120]
WB6-1 (FJ904629)		[120]
H2 (KY492331)	..-.....	[120]
WB5-1 (FJ904628)	-----	[120]
CBS100321 (AJ228693)	CG.GT....A.C..CCAAA.CC.T.T.AACATAC..----ATC..T.CCTC.G.G.TG.	[120]
YKMP-1 (MH184588)	CGGATCAAGGCGCCCGCCGG-GGACCTAAACTCTTCTGATTTT-ATCGGTTTCTTCTG	[180]
MDMP-1 (MH184589)	-.....-.....	[180]
IEMP-1 (MH184590)	-.....-.....	[180]
YKMP-2 (MH184591)	-.....-.....	[180]
BMMP-1 (MH184592)	-.....-.....	[180]
SSMP-1 (MH184593)	-.....-.....	[180]
ATMP-1 (MH184594)	-.....-.....	[180]
MKMP-1 (MH184595)	-.....-.....	[180]
OSMP-1 (MH184596)	-.....-.....	[180]
HDMP-1 (MH184597)	-.....-.....	[180]
CBS648.82 (FJ904634)	-.....-.....	[180]
MGB0004 (KC964105)	-.....-.....	[180]
ND (EU380317)	-.....-.....	[180]
I35 (MG890628)	-.....T.....	[180]
WB6-1 (FJ904629)	-.....-.....	[180]
H2 (KY492331)	-.....T.....	[180]
WB5-1 (FJ904628)	-.....-.....	[180]
CBS100321 (AJ228693)	.C.C..CG.CG.....A.A....CCC.AA..CT..--....-..ACAGCA.....	[180]
YKMP-1 (MH184588)	AGTGGCTTATTAAAGCAAAAATGAATCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGCTCTGGC	[240]
MDMP-1 (MH184589)		[240]
IEMP-1 (MH184590)		[240]
YKMP-2 (MH184591)		[240]
BMMP-1 (MH184592)		[240]
SSMP-1 (MH184593)		[240]
ATMP-1 (MH184594)		[240]
MKMP-1 (MH184595)		[240]
OSMP-1 (MH184596)		[240]
HDMP-1 (MH184597)		[240]
CBS648.82 (FJ904634)		[240]
MGB0004 (KC964105)		[240]
ND (EU380317)		[240]
I35 (MG890628)		[240]
WB6-1 (FJ904629)		[240]
H2 (KY492331)		[240]
WB5-1 (FJ904628)		[240]
CBS100321 (AJ228693)	...AA.ACGA.T..-----..A.....C.....T.....	[240]
YKMP-1 (MH184588)	ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA	[300]
MDMP-1 (MH184589)		[300]
IEMP-1 (MH184590)		[300]
YKMP-2 (MH184591)		[300]
BMMP-1 (MH184592)		[300]
SSMP-1 (MH184593)		[300]
ATMP-1 (MH184594)		[300]
MKMP-1 (MH184595)		[300]
OSMP-1 (MH184596)		[300]
HDMP-1 (MH184597)		[300]
CBS648.82 (FJ904634)		[300]
MGB0004 (KC964105)		[300]
ND (EU380317)		[300]
I35 (MG890628)		[300]
WB6-1 (FJ904629)		[300]
H2 (KY492331)		[300]
WB5-1 (FJ904628)		[300]
CBS100321 (AJ228693)		[300]
YKMP-1 (MH184588)	TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCG	[360]
MDMP-1 (MH184589)		[360]
IEMP-1 (MH184590)		[360]

Şekil 4.5 'in devamı

YKMP-2 (MH184591)		[360]
BMMP-1 (MH184592)		[360]
SSMP-1 (MH184593)		[360]
ATMP-1 (MH184594)		[360]
MKMP-1 (MH184595)		[360]
OSMP-1 (MH184596)		[360]
HDMP-1 (MH184597)		[360]
CBS648.82 (FJ904634)		[360]
MGB0004 (KC964105)		[360]
ND (EU380317)		[360]
I35 (MG890628)		[360]
WB6-1 (FJ904629)		[360]
H2 (KY492331)		[360]
WB5-1 (FJ904628)		[360]
CBS100321 (AJ228693)		[360]
YKMP-1 (MH184588)	TCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGATCGGTGTTGGGGACCGGCCCTGCCTAGCAG	[420]
MDMP-1 (MH184589)		[420]
IEMP-1 (MH184590)		[420]
YKMP-2 (MH184591)		[420]
BMMP-1 (MH184592)		[420]
SSMP-1 (MH184593)		[420]
ATMP-1 (MH184594)		[420]
MKMP-1 (MH184595)		[420]
OSMP-1 (MH184596)		[420]
HDMP-1 (MH184597)		[420]
CBS648.82 (FJ904634)		[420]
MGB0004 (KC964105)		[420]
ND (EU380317)		[420]
I35 (MG890628)	G.....	[420]
WB6-1 (FJ904629)		[420]
H2 (KY492331)	G.....	[420]
WB5-1 (FJ904628)		[420]
CBS100321 (AJ228693)	A.G.....C---...C.T.....T....GTGC...--TC..	[420]
YKMP-1 (MH184588)	CGGGTTGCCGCCCCCTAAATTCAGTGGCGGCCCTCGTCGCAGCCTCCCTTGCGTAGTAGCT	[480]
MDMP-1 (MH184589)		[480]
IEMP-1 (MH184590)		[480]
YKMP-2 (MH184591)		[480]
BMMP-1 (MH184592)		[480]
SSMP-1 (MH184593)		[480]
ATMP-1 (MH184594)		[480]
MKMP-1 (MH184595)		[480]
OSMP-1 (MH184596)		[480]
HDMP-1 (MH184597)		[480]
CBS648.82 (FJ904634)		[480]
MGB0004 (KC964105)		[480]
ND (EU380317)		[480]
I35 (MG890628)		[480]
WB6-1 (FJ904629)		[480]
H2 (KY492331)		[480]
WB5-1 (FJ904628)		[480]
CBS100321 (AJ228693)	...CGC...T.....CT.....T....CT.....T...TC.....A	[480]
YKMP-1 (MH184588)	CTTTTGAAACCTCGCACCGGA-GCGCGTCGTGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTTCTGA	[540]
MDMP-1 (MH184589)		[540]
IEMP-1 (MH184590)		[540]
YKMP-2 (MH184591)		[540]
BMMP-1 (MH184592)		[540]
SSMP-1 (MH184593)		[540]
ATMP-1 (MH184594)		[540]
MKMP-1 (MH184595)		[540]
OSMP-1 (MH184596)		[540]
HDMP-1 (MH184597)		[540]
CBS648.82 (FJ904634)		[540]
MGB0004 (KC964105)		[540]
ND (EU380317)		[540]
I35 (MG890628)		[540]
WB6-1 (FJ904629)		[540]
H2 (KY492331)		[540]
WB5-1 (FJ904628)		[540]

Şekil 4.5 ‘in devamı

CBS100321 (AJ228693)	.-----.....A.A..AG..C.....T.....CCAC.....	[540]
YKMP-1 (MH184588)	AAGGTTGACCTCGAATCAGGTAG-----	[600]
MDMP-1 (MH184589)	-----	[600]
IEMP-1 (MH184590)	G-AATACCCGCTGAA--CTTAAGCATA-----	[600]
YKMP-2 (MH184591)	G-AATACCCGCTGAA--CTTAAGCATA-----	[600]
BMMP-1 (MH184592)	G-AATACCCGCTGAA--CTTAAGCATA-----	[600]
SSMP-1 (MH184593)	G-AATACCCGCTGAA--CTTAAGCATA-----	[600]
ATMP-1 (MH184594)	GAA-----	[600]
MKMP-1 (MH184595)	-----	[600]
OSMP-1 (MH184596)	GAA-----	[600]
HDMP-1 (MH184597)	G-AATACCCGCTGAA-----	[600]
CBS648.82 (FJ904634)	G-AATACCCGCTGA?TACTTAAGCATATCAATTAAGC	[600]
MGB0004 (KC964105)		[600]
ND (EU380317)	G-AATACCCGCTGAA--CTTAAGCATA-----	[600]
I35 (MG890628)	G-AATACCCGCTGAA--CTTAAGCATATCAATAAGGC	[600]
WB6-1 (FJ904629)	GGAATACCCGCTGAA--CTTAAGCATA-----	[600]
H2 (KY492331)	G-AATACCCGCTGAA--CTTAAGCATATCAATAAG-C	[600]
WB5-1 (FJ904628)	G-AATACCCGCTGAA--CTTAAGCATATCATTAAG-C	[600]
CBS100321 (AJ228693)		[600]
YKMP-1 (MH184588)	-----	[607]
MDMP-1 (MH184589)	-----	[607]
IEMP-1 (MH184590)	-----	[607]
YKMP-2 (MH184591)	-----	[607]
BMMP-1 (MH184592)	-----	[607]
SSMP-1 (MH184593)	-----	[607]
ATMP-1 (MH184594)	-----	[607]
MKMP-1 (MH184595)	-----	[607]
OSMP-1 (MH184596)	-----	[607]
HDMP-1 (MH184597)	-----	[607]
CBS648.82 (FJ904634)	GGAGGAA	[607]
MGB0004 (KC964105)	-----	[607]
ND (EU380317)	-----	[607]
I35 (MG890628)	GGAGGAA	[607]
WB6-1 (FJ904629)	-----	[607]
H2 (KY492331)	GGAGGA-	[607]
WB5-1 (FJ904628)	GGAGGAA	[607]
CBS100321 (AJ228693)	-----	[607]

Şekil. 4.5. *Mycogone perniciosa* izolatlarının ITS1F ve ITS4 primerleri ile elde edilen ITS bölgesi DNA baz dizilimlerinin alt alta dizilmiş hali

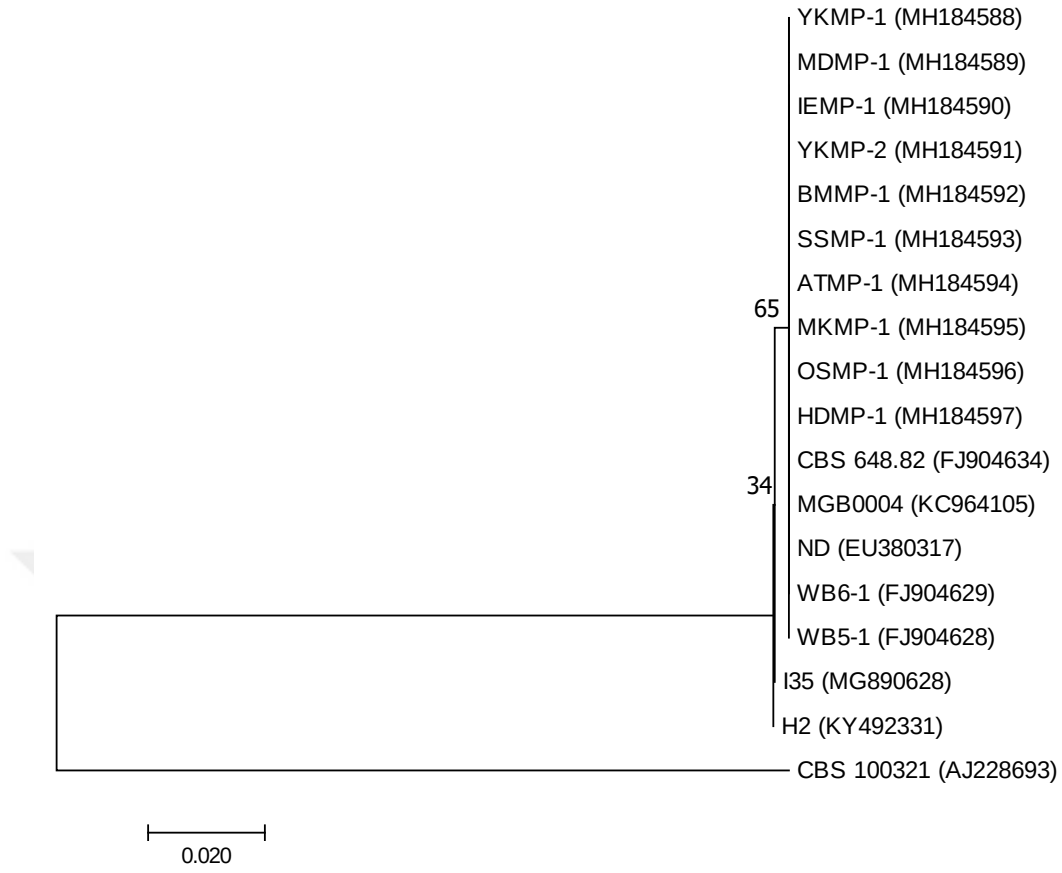
4.7. *Mycogone perniciosa*’nın ITS DNA dizilimlerinin filogenetik analizleri

Filogenetik analizlerde Antalya Korkuteli ilçesi mantarhanelerinden izole edilen 10 *M. perniciosa* izolatlarının yanı sıra Genbank veritabanından indirilen 3 Güney Afrika, 2 Çin, 1 Hindistan ve 1 İspanya’dan olmak üzere hepsi *A.bisporus*’tan elde edilen 7 *M. perniciosa* izolatının ITS bölgesinin DNA dizilimlerinden yararlanılmıştır (Çizelge 4.4). Genbank izolatları aynı zamanda ve Blast programı ile yapılan benzerlik karşılaştırmalarında Korkuteli izolatlarına en yakın izolatları temsil etmektedir. Filogenetik analizler MEGA7 programının Neighbour Joining (Komşu Birleştirme) Metodunun Bootstrap test yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Filogenetik ağaçlar için her bir bootstrap değeri için 1000 tekerrür yapılmıştır. Model olarak Tajimi Nei (Tajima ve Nei 1984) kullanılmıştır. Ağaç kol uzunluğu toplamı 0.25126512’ye eşit olan filogenetik soy ağacı seçilmiştir (Şekil 4.6). Aynı grup içindeki izolatların ve farklı grupların birbirlerine benzerlik yüzdeleri ağacın dallarında gösterilmiştir. Bu çalışmada elde edilen 10 *M. perniciosa* izolatının ITS DNA dizilimleri Genbank veri tabanına girilmiş ve MH184588-MH184595 kayıt numaraları ile depolanmıştır (Çizelge 4.4). Toplamda 18 izolata ait DNA dizilimleri analize tabi tutulmuştur. En son veride toplam 449 pozisyon bulunmaktadır. Şekil 4.6’da görüldüğü gibi filogenetik analizler *M.*

perniciosa izolatlarının birbirine çok yakın 2 farklı gruba ayırmıştır. Analizler Korkuteli mantar üretim yerlerinden alınan izolatların Güney Afrika, Hindistan ve İspanya izolatları ile benzerlik göstererek aynı grupta yer aldığını ve Çin izolatlarından azda olsa farklı olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.4. Filogenetik analizlerde kullanılan Korkuteli'nden izole edilen ve GenBank'tan alınan *Mycogone perniciosa* izolatları

İzolat	Konukçu	GenBank No	Ülke	Tür/Alt tür
YKMP-1	<i>A.bisporus</i>	MH184588	Türkiye	<i>M.perniciosa</i>
MDMP-1	<i>A.bisporus</i>	MH184589	Türkiye	<i>M.perniciosa</i>
IEMP-1	<i>A.bisporus</i>	MH184590	Türkiye	<i>M.perniciosa</i>
YKMP-2	<i>A.bisporus</i>	MH184591	Türkiye	<i>M.perniciosa</i>
BMMP-1	<i>A.bisporus</i>	MH184592	Türkiye	<i>M.perniciosa</i>
SSMP-1	<i>A.bisporus</i>	MH184593	Türkiye	<i>M.perniciosa</i>
ATMP-1	<i>A.bisporus</i>	MH184594	Türkiye	<i>M.perniciosa</i>
OSMP-1	<i>A.bisporus</i>	MH184596	Türkiye	<i>M.perniciosa</i>
HDMP-1	<i>A.bisporus</i>	MH184597	Türkiye	<i>M.perniciosa</i>
CBS 648.82	<i>A.bisporus</i>	FJ904634	Güney Afrika	<i>M.perniciosa</i>
MGB0004	<i>A.bisporus</i>	KC964105	İspanya	<i>M.perniciosa</i>
ND	<i>A.bisporus</i>	EU380317	Hindistan	<i>M.perniciosa</i>
I35	<i>A.bisporus</i>	M6890628	Çin	<i>M.perniciosa</i>
WB6-1	<i>A.bisporus</i>	FJ904629	Güney Afrika	<i>M.perniciosa</i>
H2	<i>A.bisporus</i>	KY492331	Çin	<i>M.perniciosa</i>
WB5-1	<i>A.bisporus</i>	FJ904628	Güney Afrika	<i>M.perniciosa</i>
CBS100321	<i>Acer spp.</i>	CBS100321	Kanada	<i>N. galligena</i>



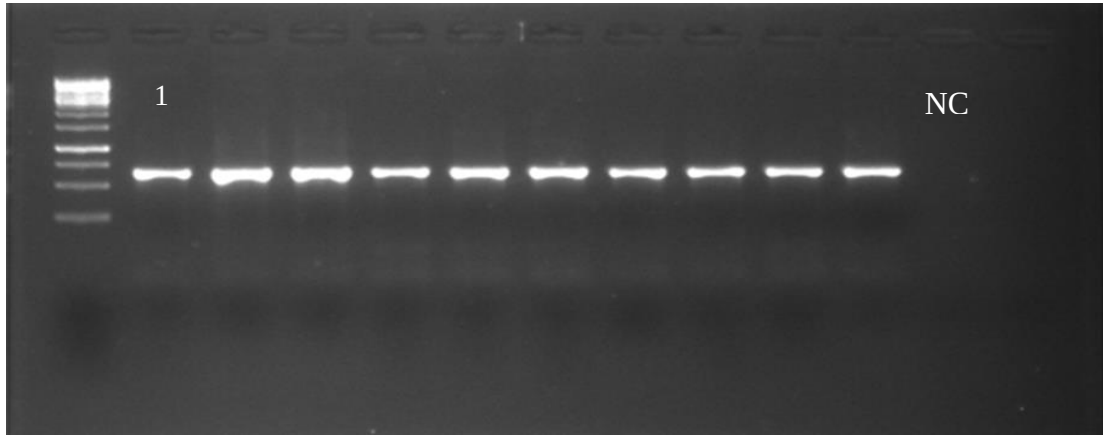
Şekil 4.6. *Mycogone pernicios* izolatlarının ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) bölgesinin DNA dizilimlerinin filogenetik analizi.

4.8. *Cladobotryum* spp.'nin rDNA ITS bölgesinin PCR' la çoğaltılması

Antalya ili Korkuteli ilçesinde 13 mantarhaneden toplanan örneklerden elde edilen 13 *Cladobotryum* spp. izolatının rDNA ITS bölgeleri ITS1-F ve ITS4 primerleri ile PCR testlerinde çoğaltılmıştır. Ancak 3 izolattan PCR ürünü elde edilememiştir. Her izolat en az 3 defa PCR çoğaltmalarına tabii tutularak DNA dizimleri için gerekli PCR ürünü elde edilmiştir. PCR çoğaltmalarında *Cladobotryum* izolatlarının tamamı aynı büyüklükte yaklaşık 700-750 bp'lik bir PCR ürünü vermiştir. Agaroz jel üzerinde oluşan bandların büyüklüğüne bakıldığında farklı izolatları birbirinden ayırmak mümkün olmamıştır (Şekil 4.7). Tüm PCR testlerinde negatif kontrol olarak kullanılan distile sudan (ddH₂O) herhangi bir PCR ürünü elde edilememiştir.

Çizelge 4.5. *Cladobotryum* spp. izolatlarının toplandığı mantarhaneler ve tarihleri

<i>Cladobotryum</i> spp.	Alınan örnek sayısı	Mantarhanelerin İsimlere Göre Kodları	Örneklerin toplandığı tarih
Yazır	3	SŞ	23.05.2017
Yazır	3	YK	23.05.2017
Küçükköy	3	İK	23.05.2017
Yazır	3	TK	23.05.2017
Küçükköy	3	İE	23.05.2017
Küçükköy	3	TE	25.04.2017
Küçükköy	3	ER	25.04.2017
Küçükköy	3	KM	25.04.2017
Söğütçük	3	BM	25.04.2017
Küçükköy	3	OS	25.04.2017
Yazır	3	MÖ	23.05.2017
Küçükköy	3	CM	25.04.2017
Küçükköy	3	MT	25.04.2017

**Şekil 4.7.** *Cladobotryum* spp. rDNA ITS bölgesinin ITS1-F ve ITS4 primer çifti kullanılarak PCR’ da çoğaltılması. 1KB DNA ladder markır olarak kullanılmıştır. 1: OSCD-1, 2: IECD-1, 3: ERCD-1, 4: İKCD-1, 5: KMCD-1, 6: TKCD-1, 7: SSCD-1, 8: KMCD-2, 9: BMCD-1, 10: YKCD-1, 11: NC

4.9. *Cladobotryum* spp.'nin ITS bölgesinin DNA dizilim analizleri

PCR'da çoğaltılan 10 izolatının ITS bölgesi PCR ürünlerinin DNA dizilimleri yapılmıştır. İki yönlü yapılan bu dizilimlerin alt alta sıralanması (alignment) ile her bir izolat için tek bir dizilim elde edilmiştir. *Cladobotryum* spp. izolatlarından 18S rDNA ve 28S rDNA bölgelerinin kısmi dizilimlerinde dahil 680 ila 720 arasında bir dizilim alınmıştır. rDNA ITS bölge dizilimleri ise Şekil 4.8'de olduğu gibidir. İzolatların MEGA7 Clustal W ile yapılan kendi aralarındaki dizilimler izolatların hemen hemen %99-100 arasında benzer olduğunu açığa çıkarmıştır. Her bir izolatın dizilimleri NCBI Blast benzerlik analizine tabii tutulmuştur. Blast analizleri Korkuteli izolatlarının *Cladobotryum mycophilum* türüne ait olduğunu ve bu fungusun Genbank veri tabanında bulunan izolatları ile % 99-100 benzerlik gösterdiğini açığa çıkarmıştır.

OSCD-1 (MH181858)	TCCGTTGGTGAACCGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATACAACTCCCAAACCCACTGTG	[60]
IECD-1 (MH181859)		[60]
ERCD-1 (MH181860)		[60]
IKCD-1 (MH181861)		[60]
KMCD-1 (MH181862)		[60]
TKCD-1 (MH181863)		[60]
SSCD-1 (MH181864)		[60]
KMCD-2 (MH181865)		[60]
BMCD-1 (MH181866)		[60]
YKCD-1 (MH181867)		[60]
491253 (AB527074)	-----	[60]
GT01 (MH040808)		[60]
MGB0005 (KC964103)		[60]
BAC03 (KJ808713)	A...GTG.A.C.....	[60]
1264 (KP698960)	A.....T.....	[60]
CL21 (JQ004737)	-----	[60]
PE70CD (KP267826)	-----	[60]
491253 (JF693809)	A.....T.....	[60]
ZC (KU500562)	-----	[60]
LE01 (MF99221)	-----	[60]
PSU 177 (Y17091)	-----	[60]
5132 (EU340833)	-----TT.....	[60]
MGW1401 (KY777358)		[60]
Cb (NR111427)	-----T.....A....	[60]
OSCD-1 (MH181858)	AACCTTACCAAATCGTTGCTTCGGCGGGACAGCCCCGGGCCCTCGCGGCACGGAACCAGG	[120]
IECD-1 (MH181859)		[120]
ERCD-1 (MH181860)		[120]
IKCD-1 (MH181861)		[120]
KMCD-1 (MH181862)		[120]
TKCD-1 (MH181863)		[120]
SSCD-1 (MH181864)		[120]
KMCD-2 (MH181865)		[120]
BMCD-1 (MH181866)		[120]
YKCD-1 (MH181867)		[120]
491253 (AB527074)		[120]
GT01 (MH040808)		[120]
MGB0005 (KC964103)		[120]
BAC03 (KJ808713)		[120]
1264 (KP698960)		[120]
CL21 (JQ004737)		[120]
PE70CD (KP267826)		[120]
491253 (JF693809)		[120]
ZC (KU500562)		[120]
LE01 (MF99221)	T.....A.....C.....C.....	[120]
PSU 177 (Y17091)	T.....A.....C.....C.....	[120]
5132 (EU340833)	T.TTT-.....C.....C.....	[120]
MGW1401 (KY777358)	TCTA.....C.....AC.CGT..C.....	[120]
Cb (NR111427)	T..A.....-C.CGT..C.....A....	[120]
OSCD-1 (MH181858)	CGCCCCCGGAGGCCAA-AAAACCTCTCCTGTTTCTCTTAGCGGAATTTAT-CTGAGTGG	[180]
IECD-1 (MH181859)	-.....-.....	[180]

Şekil 4.8'in devamı

ERCD-1 (MH181860)	-.....-.....	[180]
IKCD-1 (MH181861)	-.....-.....	[180]
KMCD-1 (MH181862)	-.....-.....	[180]
TKCD-1 (MH181863)	-.....-.....	[180]
SSCD-1 (MH181864)	-.....-.....	[180]
KMCD-2 (MH181865)	-.....-.....	[180]
BMCD-1 (MH181866)	-.....-.....	[180]
YKCD-1 (MH181867)	-.....-.....	[180]
491253 (AB527074)	-.....-.....	[180]
GT01 (MH040808)	-.....-.....	[180]
MGB0005 (KC964103)	-.....-.....	[180]
BAC03 (KJ808713)	-.....-.....	[180]
1264 (KP698960)	A.....-.....	[180]
CL21 (JQ004737)	A.....-.....	[180]
PE70CD (KP267826)	A.....-.....	[180]
491253 (JF693809)	-.....-.....	[180]
ZC (KU500562)	-.....-.....	[180]
LE01 (MF99221)	--.....-.....	[180]
PSU 177 (Y17091)	--.....-.....	[180]
5132 (EU340833)	--.....-.....	[180]
MGW1401 (KY777358)	A..CC-.....A.....A.-.A.....C.T.....	[180]
Cb (R111427)	A.CC-C.....T.....A..G.-.....C..GC.-.....	[180]
OSCD-1 (MH181858)	CCCTTC-ATGGGCAAGCAA---ATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT	[240]
IECD-1 (MH181859)	-.....-.....-.....	[240]
ERCD-1 (MH181860)	-.....-.....-.....	[240]
IKCD-1 (MH181861)	-.....-.....-.....	[240]
KMCD-1 (MH181862)	-.....-.....-.....	[240]
TKCD-1 (MH181863)	-.....-.....-.....	[240]
SSCD-1 (MH181864)	-.....-.....-.....	[240]
KMCD-2 (MH181865)	-.....-.....-.....	[240]
BMCD-1 (MH181866)	-.....-.....-.....	[240]
YKCD-1 (MH181867)	-.....-.....-.....	[240]
491253 (AB527074)	-.....-.....-.....	[240]
GT01 (MH040808)	-.....-.....-.....	[240]
MGB0005 (KC964103)	-.....-.....-.....	[240]
BAC03 (KJ808713)	-.....-.....-.....	[240]
1264 (KP698960)	-.....-.....-.....	[240]
CL21 (JQ004737)	-.....-.....-.....	[240]
PE70CD (KP267826)	-.....-.....-.....	[240]
491253 (JF693809)	-.....-.....-.....	[240]
ZC (KU500562)	-.....-.....-.....	[240]
LE01 (MF99221)	A-GG.-.....-.....	[240]
PSU 177 (Y17091)	CA-GG.-.....-.....	[240]
5132 (EU340833)	CA-GG.-.....-.....	[240]
MGW1401 (KY777358)	T-GC.-.....A.-.....	[240]
Cb (NR111427)	C.TAGC.....G.AA..CAAA.....	[240]
OSCD-1 (MH181858)	GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA	[300]
IECD-1 (MH181859)		[300]
ERCD-1 (MH181860)		[300]
IKCD-1 (MH181861)		[300]
KMCD-1 (MH181862)		[300]
TKCD-1 (MH181863)		[300]
SSCD-1 (MH181864)		[300]
KMCD-2 (MH181865)		[300]
BMCD-1 (MH181866)		[300]
YKCD-1 (MH181867)		[300]
491253 (AB527074)		[300]
GT01 (MH040808)		[300]
MGB0005 (KC964103)		[300]
BAC03 (KJ808713)		[300]
1264 (KP698960)		[300]
CL21 (JQ004737)		[300]
PE70CD (KP267826)		[300]
491253 (JF693809)		[300]
ZC (KU500562)		[300]
LE01 (MF99221)		[300]
PSU 177 (Y17091)		[300]
5132 (EU340833)		[300]
MGW1401 (KY777358)		[300]

Şekil 4.8'in devamı

Cb (NR111427)		[300]
OSCD-1 (MH181858)	TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCA	[360]
IECD-1 (MH181859)		[360]
ERCD-1 (MH181860)		[360]
IKCD-1 (MH181861)		[360]
KMCD-1 (MH181862)		[360]
TKCD-1 (MH181863)		[360]
SSCD-1 (MH181864)		[360]
KMCD-2 (MH181865)		[360]
BMCD-1 (MH181866)		[360]
YKCD-1 (MH181867)		[360]
491253 (AB527074)		[360]
GT01 (MH040808)		[360]
MGB0005 (KC964103)		[360]
BAC03 (KJ808713)		[360]
1264 (KP698960)		[360]
CL21 (JQ004737)		[360]
PE70CD (KP267826)		[360]
491253 (JF693809)		[360]
ZC (KU500562)		[360]
LE01 (MF99221)		[360]
PSU 177 (Y17091)		[360]
5132 (EU340833)		[360]
MGW1401 (KY777358)		[360]
Cb (NR111427)		[360]
OSCD-1 (MH181858)	GCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCCCGGGGGCATGGTGTGGGGGACGGCCCCGCCCCG	[420]
IECD-1 (MH181859)		[420]
ERCD-1 (MH181860)		[420]
IKCD-1 (MH181861)		[420]
KMCD-1 (MH181862)		[420]
TKCD-1 (MH181863)		[420]
SSCD-1 (MH181864)		[420]
KMCD-2 (MH181865)		[420]
BMCD-1 (MH181866)		[420]
YKCD-1 (MH181867)		[420]
491253 (AB527074)		[420]
GT01 (MH040808)		[420]
MGB0005 (KC964103)		[420]
BAC03 (KJ808713)		[420]
1264 (KP698960)		[420]
CL21 (JQ004737)		[420]
PE70CD (KP267826)		[420]
491253 (JF693809)		[420]
ZC (KU500562)		[420]
LE01 (MF99221)	T..	[420]
PSU 177 (Y17091)	T..	[420]
5132 (EU340833)	T..	[420]
MGW1401 (KY777358)	G.....CC.....T	[420]
Cb (NR111427)	G.AG.....CGTC.....A.....GC	[420]
OSCD-1 (MH181858)	CGCGGT-----CTGGCCGCCCCGAAATGCAGTGGCGACCCCGCCGAGCCTCCCTGC	[480]
IECD-1 (MH181859)		[480]
ERCD-1 (MH181860)		[480]
IKCD-1 (MH181861)		[480]
KMCD-1 (MH181862)		[480]
TKCD-1 (MH181863)		[480]
SSCD-1 (MH181864)		[480]
KMCD-2 (MH181865)		[480]
BMCD-1 (MH181866)		[480]
YKCD-1 (MH181867)		[480]
491253 (AB527074)		[480]
GT01 (MH040808)		[480]
MGB0005 (KC964103)		[480]
BAC03 (KJ808713)		[480]
1264 (KP698960)		[480]
CL21 (JQ004737)		[480]
PE70CD (KP267826)		[480]
491253 (JF693809)		[480]
ZC (KU500562)		[480]

Şekil 4.8'in devamı

LE01 (MF99221) C..... [480]
 PSU 177 (Y17091) C..... [480]
 5132 (EU340833) C..... [480]
 MGW1401 (KY777358) .T.A..GGGTGGTC..... [480]
 Cb (NR111427) .-...-..... [480]

OSCD-1 (MH181858) GTAGTAGCTATACAACTGGAACCTCGCACCAGAGCGGCGCT-GCTCAGCCGTGAAAC [540]
 IECD-1 (MH181859)-..... [540]
 ERCD-1 (MH181860)-..... [540]
 IKCD-1 (MH181861)-..... [540]
 KMCD-1 (MH181862)-..... [540]
 TKCD-1 (MH181863)-..... [540]
 SSCD-1 (MH181864)-..... [540]
 KMCD-2 (MH181865)-..... [540]
 BMCD-1 (MH181866)-..... [540]
 YKCD-1 (MH181867)-..... [540]
 491253 (AB527074)-..... [540]
 GT01 (MH040808)-..... [540]
 MGB0005 (KC964103)-..... [540]
 BAC03 (KJ808713)-..... [540]
 1264 (KP698960) TT..... [540]
 CL21 (JQ004737)-..... [540]
 PE70CD (KP267826)-..... [540]
 491253 (JF693809)-..... [540]
 ZC (KU500562)-..... [540]
 LE01 (MF99221)-..... [540]
 PSU 177 (Y170919) T.C.TC.GATCA.GTA.G.ATACCCGCTGAACTTAAGCATA [540]
 5132 (EU340833)-..... [540]
 MGW1401 (KY777358)-..T.....C.....G-...T...T... [540]
 Cb (NR111427) GTTCT.A.....T.....C.....GT...G..... [540]

OSCD-1 (MH181858) CCCAACT-TCTGAAAGGTGACCTCGGATCAGGTAGGAA----- [600]
 IECD-1 (MH181859)-..... [600]
 ERCD-1 (MH181860)-..... [600]
 IKCD-1 (MH181861)-..... [600]
 KMCD-1 (MH181862)-.....TGA.CTC.GATCA.GTA.----- [600]
 TKCD-1 (MH181863)-..... [600]
 SSCD-1 (MH181864)-..... [600]
 KMCD-2 (MH181865)-..... [600]
 BMCD-1 (MH181866)-..... [600]
 YKCD-1 (MH181867)-..... [600]
 491253 (AB527074)-.....TGA.CTC.GATCA.GTA.----- [600]
 GT01 (MH040808)-.....ATCAGTAG.TCCGATTACTTCCTTTTT----- [600]
 MGB0005 (KC964103)-..C..... [600]
 BAC03 (KJ808713)-..... [600]
 1264 (KP698960) ACT.....A.GTTGAC.TTCGGGAT.CA.GGAAGAGGATGCCCA----- [600]
 CL21 (JQ004737)-.....TGA.CTC.GATCA.GTA.G.ATACCCGCTGAACTTAAGCATA [600]
 PE70CD (KP267826)-.....TGA.CTC.GATCA.GTA.G.ATACCCGCTGAACTTAAGCATA [600]
 491253 (JF693809)-.....TGA.CTC.GATCA.GTA.G.ATACCCGCTGAACTTAAGCATA [600]
 ZC (KU500562)-..... [600]
 LE01 (MF99221)-.....TGA.CTC.GATCA.GTA.G.ATACCCGCTGAACTTAAGCATA [600]
 PSU 177 (Y17091)-.....TGA.CTC.G----- [600]
 5132 (EU340833)-..... [600]
 MGW1401 (KY777358) C.T..... [600]
 Cb (NR111427) T.....TGA.CTC.GATCA.GTA.G.ATACCCGCTGAACTTAAGCATA [600]

OSCD-1 (MH181858) ----- [615]
 IECD-1 (MH181859) ----- [615]
 ERCD-1 (MH181860) ----- [615]
 IKCD-1 (MH181861) ----- [615]
 KMCD-1 (MH181862) ----- [615]
 TKCD-1 (MH181863) ----- [615]
 SSCD-1 (MH181864) ----- [615]
 KMCD-2 (MH181865) ----- [615]
 BMCD-1 (MH181866) ----- [615]
 YKCD-1 (MH181867) ----- [615]
 491253 (AB527074) ----- [615]
 GT01 (MH040808) ----- [615]
 MGB0005 (KC964103) ----- [615]

Şekil 4.8'in devamı

BAC03 (KJ808713)	-----	[615]
1264 (KP698960)	-----	[615]
CL21 (JQ004737)	TCAATAAGCGGAGGA	[615]
PE70CD (KP267826)	TCAATAAGC-----	[615]
491253 (JF693809)	TCAATAAGCGGAGGA	[615]
ZC (KU500562)	-----	[615]
LE01 (MF99221)	TCAATA-----	[615]
PSU 177 (Y17091)	-----	[615]
5132 (EU340833)	-----	[615]
MGW1401 (KY777358)	-----	[615]
Cb (NR111427)	TCAATAAGCCGAGG	[615]

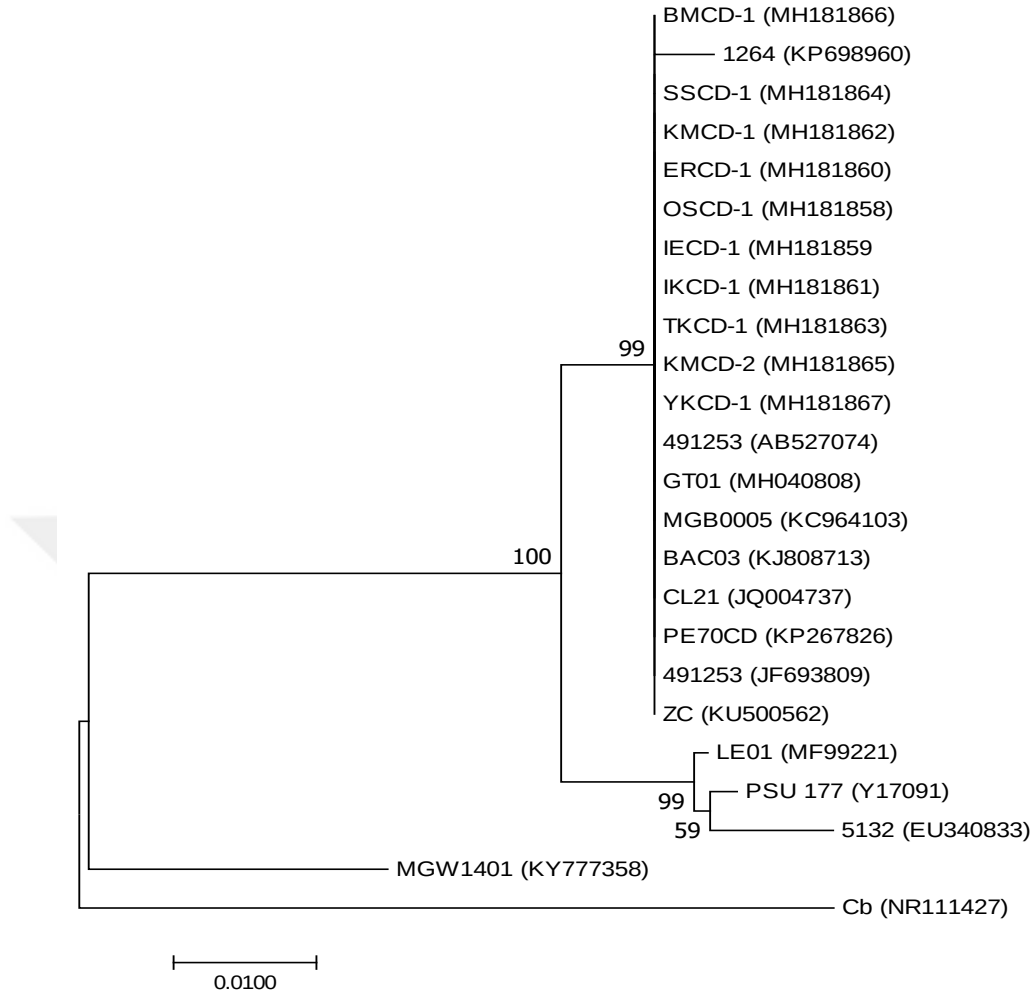
Şekil. 4.8. *Cladobotryum mycophilum* izolatlarının ITS1F ve ITS4 primerleri ile elde edilen ITS bölgesi DNA baz dizilimlerinin alt alta dizilmiş hali.

4.10. *Cladobotryum* spp.'nin ITS DNA dizilimlerinin filogenetik analizleri

Filogenetik analizlerde Antalya Korkuteli ilçesi mantarhanelerinden izole edilen 10 *Cladobotryum* izolatıyla beraber Genbank veritabanından indirilen *A.bisporus* 'tan izole edilen 3 ıspanya, 2 Güney Kore ve 1 Çin *C. mycophilum* izolatının ITS bölgesinin DNA dizilimlerinden yararlanılmıştır. Yine analizlere *Pleurotus eryngii* 'den izole edilen 1 ıspanya ve 1 Güney Kore ile *Agrocybe aegerita* ' dan izole edilen 1 Çin *C. mycophilum* izolatıda dahil edilmiştir. Analizlerde *Cladobotryum dendroides* 'in *A. bisporus* 'tan izole edilen İngiltere ve Hindistan 'dan birer izolati ile *Lentinula edodes* den izole edilen İspanyadan bir izolatıda kullanılmıştır. *Russula* sp.' den izole edilen 1 ABD *C. verticillatum* ile 1 Küba *C. cubitense* izolatı da dış grup olarak analizlere dahil edilmişlerdir (Çizelge 4.6). *C.mycophilum* 'un Genbank izolatları aynı zamanda Blast programı ile yapılan benzerlik karşılaştırmalarında Korkuteli izolatlarına en yakın izolatları temsil etmektedir. Filogenetik analizler MEGA7 programının Neighbour Joining (Komşu Birleştirme) Metodunun Bootstrap test yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Filogenetik ağaçlar için her bir bootstrap değeri için 1000 tekerrür yapılmıştır. Model olarak Tajimi Nei kullanılmıştır. Ağaç kol uzunluğu toplamı 0.14009790'ye eşit olan filogenetik soy ağacı seçilmiştir (Şekil 4.9). Aynı grup içindeki izolatların ve farklı grupların birbirlerine benzerlik yüzdeleri ağacın dallarında gösterilmiştir. Toplamda dış grup *C. cubitense* izolatı da dahil 24 izolata ait DNA dizilimleri analize tabi tutulmuştur. En son veride toplam 480 pozisyon bulunmaktadır. Şekil 4.9' da görüldüğü gibi filogenetik analizler Korkuteli izolatlarının dünyanın diğer bölgelerinde *Agaricus bisporus* başta olmak üzere diğer mantar türlerinden de elde edilen *C.mycophilum* izolatları ile çok benzer olup aynı grupta yer aldığını göstermiştir. Analizler yaygın örümcek ağı etmeni *C. dendroides* 'in *C.mycophilum* ' dan tamamıyla farklı bir grup oluşturduğunu ve bu sebeple Korkuteli mantar üretim yerlerinden alınan izolatların *C. mycophilum* türüne ait olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada elde edilen 10 *Cladobotryum mycophilum* izolatının ITS DNA dizilimleri Genbank veri tabanına girilmiş ve MH181858-MH181867 kayıt numaraları ile depolanmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Filogenetik analizlerde kullanılan Korkuteli'nden izole edilen ve GenBank'tan alınan *Cladobotryum* türlerinin izolatları

Izolat	Konukçu	GenBank No	Ülke	Tür/Alt tür
OSCD-1	<i>A.bisporus</i>	MH181858	Türkiye	<i>C.mycophilum</i>
IECD-1	<i>A.bisporus</i>	MH181859	Türkiye	<i>C.mycophilum</i>
ERCD-1	<i>A.bisporus</i>	MH181860	Türkiye	<i>C.mycophilum</i>
IKCD-1	<i>A.bisporus</i>	MH181861	Türkiye	<i>C.mycophilum</i>
KMCD-1	<i>A.bisporus</i>	MH181862	Türkiye	<i>C.mycophilum</i>
TKCD-1	<i>A.bisporus</i>	MH181863	Türkiye	<i>C.mycophilum</i>
SSCD-1	<i>A.bisporus</i>	MH181864	Türkiye	<i>C.mycophilum</i>
KMCD-2	<i>A.bisporus</i>	MH181865	Türkiye	<i>C.mycophilum</i>
BMCD-1	<i>A.bisporus</i>	MH181866	Türkiye	<i>C.mycophilum</i>
YKCD-1	<i>A.bisporus</i>	MH181867	Türkiye	<i>C.mycophilum</i>
491253	<i>A.bisporus</i>	AB527074	Güney Kore	<i>C.mycophilum</i>
GT01	<i>Agrocybe aegerita</i>	MH040808	Çin	<i>C.mycophilum</i>
MGB0005	<i>A.bisporus</i>	KC964103	İspanya	<i>C.mycophilum</i>
BAC03	<i>A.bisporus</i>	KJ808713	Güney Kore	<i>C.mycophilum</i>
1264	<i>A.bisporus</i>	KP698960	İspanya	<i>C.mycophilum</i>
CL21	<i>A.bisporus</i>	JQ004737	İspanya	<i>C.mycophilum</i>
PE70CD	<i>Pleurotus eryngii</i>	KP267826	İspanya	<i>C.mycophilum</i>
491253	<i>Pleurotus eryngii</i>	JF683909	Güney Kore	<i>C.mycophilum</i>
ZC	<i>A.bisporus</i>	KU500562	Çin	<i>C.mycophilum</i>
LE01	<i>Lentinula edodes</i>	MF992212	İspanya	<i>C.dendroides</i>
PSU177	<i>A.bisporus</i>	Y17091	İngiltere	<i>C.dendroides</i>
5132	<i>A.bisporus</i>	EU340833	Hindistan	<i>C.dendroides</i>
MGW1401	<i>Russula spp.</i>	KY777358	ABD	<i>C.verticillatum</i>
CBS 416.85		NR111427	Küba	<i>C.cubitense</i>



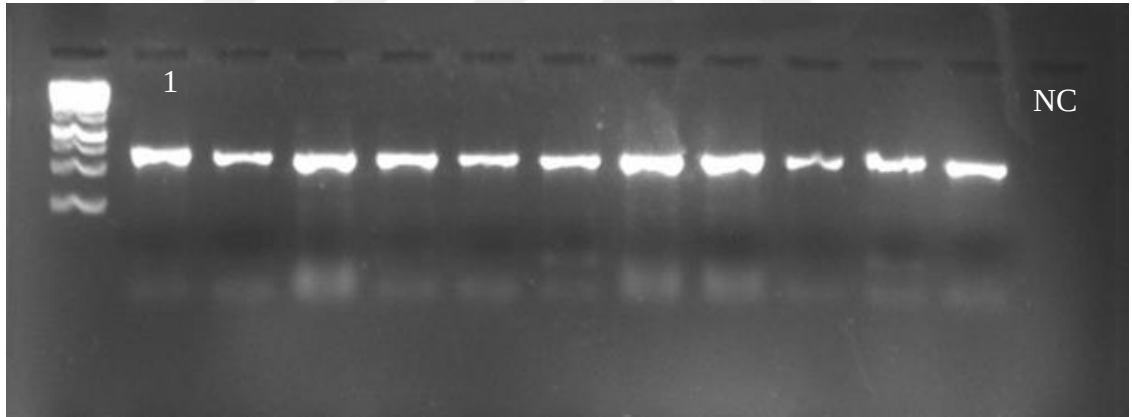
Şekil 4.9. *Cladobotryum mycophilum* izolatlarının ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) bölgesinin DNA dizilimlerinin filogenetik analizi.

4.11. *Trichoderma* spp.’nin rDNA ITS bölgesinin PCR’ la çoğaltılması

Antalya ili Korkuteli ilçesinde gezilen 30 mantarhaneden 14 tanesinde *Trichoderma* spp. enfekteli örnek alınmış ve laboratuvarında izole edilmiştir (Çizelge 4. 7). Ancak izolatların 11 tanesinin rDNA ITS bölgeleri ITS1-F ve ITS4 primerleri ile PCR testlerinde çoğaltılmış ve ürün vermiştir (Şekil 4.10). Her izolat en az 3 defa PCR çoğaltmalarına tabii tutularak DNA dizimleri için gerekli PCR ürünü elde edilmiştir. PCR çoğaltmalarında *Trichoderma* spp. izolatlarının tamamı aynı büyüklükte yaklaşık 700-750 bp’lik bir PCR ürünü vermiştir. Agaroz jel üzerinde oluşan bandların büyüklüğüne bakıldığında farklı izolatları birbirinden ayırmak mümkün olmamıştır (Şekil 4.10). Tüm PCR testlerinde negatif kontrol olarak kullanılan distile sudan (ddH₂O) herhangi bir PCR ürünü elde edilmemiştir.

Çizelge 4.7. *Trichoderma* spp. izolatlarının toplandığı mantarhaneler ve tarihleri

<i>Trichoderma</i> spp.	Alınan örnek sayısı	Mantarhanelerin İsimlere Göre Kodları	Örneklerin toplandığı tarih
Küçükköy	3	İE	23.05.2017
Yeni Mahalle	3	AT	25.04.2017
Söğütçük	3	BM	25.04.2017
Yazır	3	TK	23.05.2017
Yazır	3	İB	25.04.2017
Küçükköy	3	TE	25.04.2017
Küçükköy	3	CM	25.04.2017
Küçükköy	3	ER	25.04.2017
Yazır	3	SŞ	23.05.2017
Küçükköy	3	KM	25.04.2017
Yazır	3	HD	23.05.2017
Yazır	3	YK	23.05.2017
Yazır	3	MÖ	23.05.2017
Yazır	3	RD	23.05.2017

**Şekil 4.10.** *Trichoderma* spp. izolatlarının rDNA ITS bölgesinin ITS1-F ve ITS4 primer çifti kullanılarak PCR’ da çoğaltılması. 1KB DNA ladder markır olarak kullanılmıştır. 1:TETD-1, 2:IBTD-1, 3: TKTD-1, 4:CMTD-1, 5:BMTD-1, 6:ERTD-1, 7:SSTD-1, 8:KMTD-1, 9:YKTD-1, 10:IETD-1, 11:ATTD-1, 12: NC**4.12. *Trichoderma* spp.’nin ITS bölgesinin DNA dizilim analizleri**

PCR’da çoğaltılan 11 izolatının ITS bölgesi PCR ürünlerinin DNA dizilimleri yapılmıştır. İki yönlü yapılan bu dizilimlerin alt alta sıralanması (alignment) ile her bir izolat için tek bir dizilim elde edilmiştir. *Trichoderma* spp. izolatlarından 18S rDNA ve 28S rDNA bölgelerinin kısmi dizilimleride dahil 680 ila 720 arasında bir dizilim alınmıştır. rDNA ITS bölge dizilimleri ise Şekil 4.11’de olduğu gibidir. İzolatların MEGA7 Clustal W ile yapılan kendi aralarındaki dizilimler izolatların hemen hemen %99-100 arasında benzer olduğunu açığa çıkarmıştır. Her bir izolatın dizilimleri NCBI Blast benzerlik analizine tabii tutulmuştur. Blast analizleri Korkuteli izolatlarının

Trichoderma aggressivum türüne ve bu tür içindeki *agressivum* veya *europaeum* alt tür veya ırklarına ait olduğunu ve bu fungusun Genbank veri tabanında bulunan izolatları ile % 99-100 benzerilik gösterdiğini açığa çıkarmıştır.

TETD-1 (MH185818)	CCGAGTTTACAACCTCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATC	[60]
IBTD-1 (MH185819)		[60]
TKTD-1 (MH185820)		[60]
CMTD-1 (MH185821)		[60]
BMTD-1 (MH185822)	C.....	[60]
ERTD-1 (MH185823)		[60]
SSTD-1 (MH185824)		[60]
KMTD-1 (MH185825)		[60]
YKTD-1 (MH185826)		[60]
IETD-1 (MH185827)		[60]
ATTD-1 (MH185828)		[60]
DAOM (AY605756)		[60]
CBS450.95 (KP009379)	-.....	[60]
DAOM (AF443911)		[60]
DAOM (NR137299)		[60]
CBS (NR145035)	C.....	[60]
CCF3862 (FN549909)	C.....	[60]
T.viride (AY380908)	CA.....G.....	[60]
TETD-1 (MH185818)	TCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGG-ACCAACCCAAAA	[120]
IBTD-1 (MH185819)	-	[120]
TKTD-1 (MH185820)	-	[120]
CMTD-1 (MH185821)	-	[120]
BMTD-1 (MH185822)	C.....-	[120]
ERTD-1 (MH185823)	-	[120]
SSTD-1 (MH185824)	-	[120]
KMTD-1 (MH185825)	-	[120]
YKTD-1 (MH185826)	-	[120]
IETD-1 (MH185827)	-	[120]
ATTD-1 (MH185828)	-	[120]
DAOM (AY605756)	-	[120]
CBS450.95 (KP009379)	-	[120]
DAOM (AF443911)	-	[120]
DAOM (NR137299)	-	[120]
CBS100526 (NR145035)	C.....-	[120]
CCF3862 (FN549909)	C.....-	[120]
T.viride (AY380908)	A.-.....A.C.....G.....--	[120]
TETD-1 (MH185818)	CTCTTATTGTATACCCCTCGCGG--GTTATTTTACTATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTC	[180]
IBTD-1 (MH185819)	--	[180]
TKTD-1 (MH185820)	--	[180]
CMTD-1 (MH185821)	--	[180]
BMTD-1 (MH185822)	--C.....	[180]
ERTD-1 (MH185823)	--	[180]
SSTD-1 (MH185824)	--	[180]
KMTD-1 (MH185825)	--	[180]
YKTD-1 (MH185826)	--	[180]
IETD-1 (MH185827)	--	[180]
ATTD-1 (MH185828)	--	[180]
DAOM (AY605756)	--	[180]
CBS450.95 (KP009379)	--	[180]
DAOM (AF443911)	--	[180]
DAOM (NR137299)	--	[180]
CBS (NR145035)	--C.....	[180]
CCF3862 (FN549909)	--C.....	[180]
T.viride (AY380908)	TC.....GT.....AC.....-----GA.....	[180]
TETD-1 (MH185818)	TCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC	[240]
IBTD-1 (MH185819)		[240]
TKTD-1 (MH185820)		[240]
CMTD-1 (MH185821)		[240]
BMTD-1 (MH185822)	...G.....	[240]
ERTD-1 (MH185823)		[240]
SSTD-1 (MH185824)		[240]
KMTD-1 (MH185825)		[240]
YKTD-1 (MH185826)		[240]
IETD-1 (MH185827)		[240]
ATTD-1 (MH185828)		[240]

Şekil 4.11'in devamı

DAOM (AY605756)		[240]
CBS450.95 (KP009379)		[240]
DAOM (AF443911)		[240]
DAOM (NR137299)		[240]
CBS (NR145035)	...G.....	[240]
CCF3862 (FN549909)	...G.....	[240]
T.viride (AY380908)	----.AAAA..C--.....	[240]
TETD-1 (MH185818)	GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG	[300]
IBTD-1 (MH185819)		[300]
TKTD-1 (MH185820)		[300]
CMTD-1 (MH185821)		[300]
BMTD-1 (MH185822)		[300]
ERTD-1 (MH185823)		[300]
SSTD-1 (MH185824)		[300]
KMTD-1 (MH185825)		[300]
YKTD-1 (MH185826)		[300]
IETD-1 (MH185827)		[300]
ATTD-1 (MH185828)		[300]
DAOM (AY605756)		[300]
CBS450.95 (KP009379)		[300]
DAOM (AF443911)		[300]
DAOM (NR137299)		[300]
CBS100526 (NR145035)		[300]
CCF3862 (FN549909)		[300]
T.viride (AY380908)		[300]
TETD-1 (MH185818)	AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCGTGCCGAGCGTCA	[360]
IBTD-1 (MH185819)		[360]
TKTD-1 (MH185820)		[360]
CMTD-1 (MH185821)		[360]
BMTD-1 (MH185822)		[360]
ERTD-1 (MH185823)		[360]
SSTD-1 (MH185824)		[360]
KMTD-1 (MH185825)		[360]
YKTD-1 (MH185826)		[360]
IETD-1 (MH185827)		[360]
ATTD-1 (MH185828)		[360]
DAOM (AY605756)		[360]
CBS450.95 (KP009379)		[360]
DAOM (AF443911)		[360]
DAOM (NR137299)		[360]
CBS100526 (NR145035)		[360]
CCF3862 (FN549909)		[360]
T.viride (AY380908)		[360]
TETD-1 (MH185818)	TTTCAACCCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGA--TCGGCCCTCCCTCGCGGG	[420]
IBTD-1 (MH185819)	--.....	[420]
TKTD-1 (MH185820)	--.....	[420]
CMTD-1 (MH185821)	--.....	[420]
BMTD-1 (MH185822)	--.....	[420]
ERTD-1 (MH185823)	--.....	[420]
SSTD-1 (MH185824)	--.....	[420]
KMTD-1 (MH185825)	--.....	[420]
YKTD-1 (MH185826)	--.....	[420]
IETD-1 (MH185827)	--.....	[420]
ATTD-1 (MH185828)	--.....	[420]
DAOM (AY605756)	--.....	[420]
CBS450.95 (KP009379)	--.....	[420]
DAOM (AF443911)	--.....	[420]
DAOM (NR137299)	--.....	[420]
CBS100526 (NR145035)	--.....	[420]
CCF3862 (FN549909)	--.....	[420]
T.viride (AY380908)	CT....GAAC....AAGAC.	[420]
TETD-1 (MH185818)	GG---CCGTCTCCGAAATGCAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTG	[480]
IBTD-1 (MH185819)	..---.....	[480]
TKTD-1 (MH185820)	..---.....	[480]
CMTD-1 (MH185821)	..---.....	[480]
BMTD-1 (MH185822)	..---.....	[480]
ERTD-1 (MH185823)	..---.....	[480]

Şekil 4.11'in devamı

SSTD-1 (MH185824)	..---.....	[480]
KMTD-1 (MH185825)	..---.....	[480]
YKTD-1 (MH185826)	..---.....	[480]
IETD-1 (MH185827)	..---.....	[480]
ATTD-1 (MH185828)	..---.....	[480]
DAOM (AY605756)	..---.....	[480]
CBS450.95 (KP009379)	..---.....	[480]
DAOM (AF443911)	..---.....	[480]
DAOM (NR137299)	..---.....	[480]
CBS100526 (NR145035)	..---.....	[480]
CCF3862 (FN549909)	..---.....	[480]
T.viride (AY380908)	..ATC...G.C.....A.....A.....	[480]
TETD-1 (MH185818)	CACA-CTCGCACCGGAGCGCGGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTCTGAAAT	[539]
IBTD-1 (MH185819)		[539]
TKTD-1 (MH185820)	G.....	[539]
CMTD-1 (MH185821)		[539]
BMTD-1 (MH185822)		[539]
ERTD-1 (MH185823)		[539]
SSTD-1 (MH185824)		[539]
KMTD-1 (MH185825)		[539]
YKTD-1 (MH185826)		[539]
IETD-1 (MH185827)		[539]
ATTD-1 (MH185828)		[539]
DAOM (AY605756)		[539]
CBS450.95 (KP009379)		[539]
DAOM (AF443911)		[539]
DAOM (NR137299)		[539]
CBS100526 (NR145035)		[539]
CCF3862 (FN549909)		[539]
T.viride (AY380908)	...A.....GT...A.....	[539]

Şekil 4.11. *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* and f. *europaeum* izolatlarının ITS1F ve ITS4 primerleri ile elde edilen ITS bölgesi DNA bazlarının alt alta dizilmiş hali.

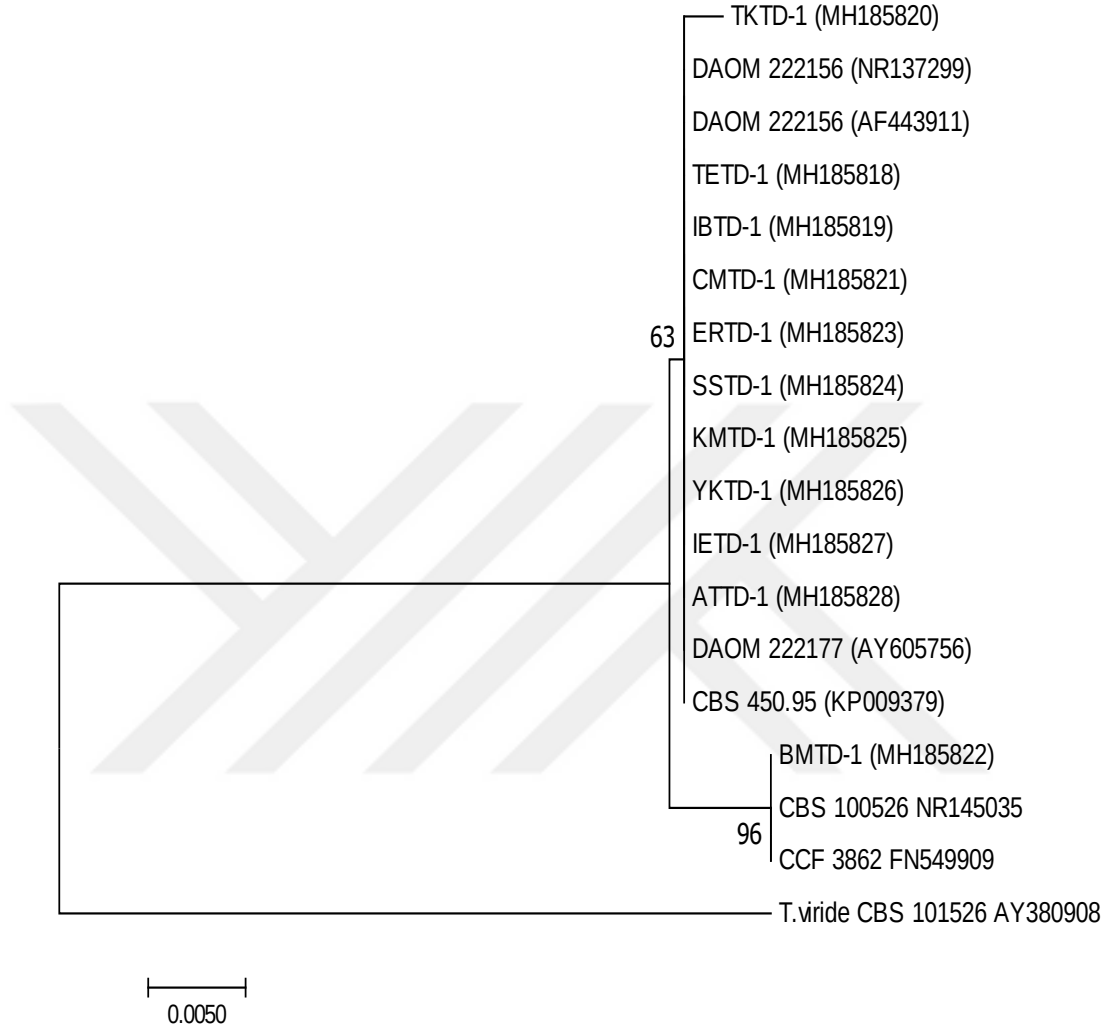
4.13. *Trichoderma* spp.'nin ITS DNA dizilimlerinin filogenetik analizleri

Filogenetik analizlerde Antalya Korkuteli ilçesi mantarhanelerinden izole edilen 11 *Trichoderma* izolatıyla beraber Genbank veritabanından indirilen *A. bisporus*'tan izole edilen ABD, Avusturya, Kanada ve Polonya' dan birer *T. aggressivum* f. *agressivum* (*Th-4*), Çekya ve İrlanda'dan birer *T. aggressivum* f. *europaeum* (*Th-2*) ve ABD'den 3 *T. harzianum* izolatı kullanılmıştır. Hollanda'dan bir *T.viride* izolatıda dış grup olarak analizlere dahil edilmiştir (Çizelge 4.8). *Trichoderma* spp.'nin Genbank izolatları aynı zamanda Blast programı ile yapılan benzerlik karşılaştırmalarında Korkuteli izolatlarına en yakın izolatları temsil etmektedir. Filogenetik analizler MEGA7 programının Neighbour Joining (Komşu Birleştirme) Metodunun Bootstrap test yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Filogenetik ağaçlar için her bir bootstrap değeri için 1000 tekrür yapılmıştır. Model olarak Tajimi Nei kullanılmıştır. Ağaç kol uzunluğu toplamı 0.07955858 ye eşit olan filogenetik soy ağacı seçilmiştir (Şekil 4.12). Aynı grup içindeki izolatların ve farklı grupların birbirlerine benzerlik yüzdeleri ağacın dallarında gösterilmiştir. Toplamda dış grup *T. viride* izolatı da dahil 21 izolata ait DNA dizilimleri analize tabi tutulmuştur. En son veride toplam 507 pozisyon bulunmaktadır. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi filogenetik analizler 10 Korkuteli izolatlarının dünyanın diğer bölgelerinde *Agaricus bisporus*'tan izole edilen *T. aggressivum* f. *aggressivum* (*Th-4*) izolatları ile çok benzer olup aynı

grupta yer aldığını göstermiştir. Korkuteli izolatu BMTD-1 in ise daha çok *T. aggressivum* f. *europaeum* (Th-2) izolatları ile daha yakın olduğu ve aynı gruba girdiği görülmüştür. Bu çalışmada elde edilen 11 *Trichoderma aggressivum* izolatının ITS DNA dizilimleri Genbank veri tabanına girilmiş ve MH185818-MH185828 kayıt numaraları ile depolanmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Filogenetik analizlerde kullanılan Korkuteli'nden izole edilen ve GenBank'tan alınan *Trichoderma* tür ve alt tür izolatları

İzolat	Konukçu	GenBank No	Ülke	Tür/Alt tür
TETD-1	<i>A.bisporus</i>	MH185818	Türkiye	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>
IBTD-1	<i>A.bisporus</i>	MH185819	Türkiye	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>
TKTD-1	<i>A.bisporus</i>	MH185820	Türkiye	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>
CMTD-1	<i>A.bisporus</i>	MH185821	Türkiye	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>
BMTD-1	<i>A.bisporus</i>	MH185822	Türkiye	<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>
ERTD-1	<i>A.bisporus</i>	MH185823	Türkiye	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>
SSTD-1	<i>A.bisporus</i>	MH185824	Türkiye	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>
KMTD-1	<i>A.bisporus</i>	MH185825	Türkiye	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>
YKTD-1	<i>A.bisporus</i>	MH185826	Türkiye	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>
IETD-1	<i>A.bisporus</i>	MH185827	Türkiye	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>
ATTD-1	<i>A.bisporus</i>	MH185828	Türkiye	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>
DAOM 222177	<i>A.bisporus</i>	AY605756	Avusturya	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>
CBS 450.95	<i>A.bisporus</i>	KP009379	Polonya	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>
DAOM 222156	<i>A.bisporus</i>	AF443911	ABD	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>
DAOM 222156	<i>A.bisporus</i>	NR137299	Kanada	<i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i>
T36-PA	<i>A.bisporus</i>	U78878	ABD	<i>Trichoderma harzianum</i>
T92-CA	<i>A.bisporus</i>	U78882	ABD	<i>Trichoderma harzianum</i>
T12	<i>A.bisporus</i>	U78877	ABD	<i>Trichoderma harzianum</i>
CBS 100526	<i>A.bisporus</i>	NR145035	İrlanda	<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>
CCF 3862	<i>A.bisporus</i>	FN549909	Çekya	<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>
CBS 101526		AY380908	Hollanda	<i>Trichoderma viride</i>



Şekil. 4.12. *Trichoderma* spp. tür ve alt türlerine ait izolatlarının ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) bölgesinin DNA dizilimlerinin filogenetik analizi.

5. TARTIŞMA

Ülkemizde kültür mantarı *Agaricus bisporus*'un tüketimi insan sağlığı ve beslenmesindeki önemi ve bu konuda halkın bilinçlenmeye başlamasıyla hızla artmaya başlamıştır. Bu durum ülkenin değişik bölgelerinde mantar üretim tesislerinin çoğalmasına ve üretimin artmasına yol açmıştır. Ülkemizde 2017 itibari ile 40.874 ton civarında olan kültür mantarı üretiminin yarıya yakını Korkuteli ilçesinde üretilmektedir (Eren ve Pekşen 2016). Korkuteli'nde mantar yetiştiriciliği büyük oranda aile işletmeciliği şeklinde yapılan, tarım ve hayvancılığın yanında ek bir uğraştır (Erkel 2000). İlçede bir yıl içinde 5 kez mantar yetiştirme imkânı vardır (Kadioğlu 2015). Bununla birlikte genelde ülkemiz yerelde Korkuteli bölgesinde kültür mantarı üretiminde son 10 yılda kayda değer bir artış olmamıştır. Yetersiz altyapı ve hijenik olmayan yetiştirme koşullarına ilave olarak mantar işletmelerinde üretim ve kalitenin artırılmasının en önemli nedenlerinin başında hastalıklar gelmektedir.

Bu çalışmada Korkuteli ilçesinde mantar işletmelerinde çok yaygın görülen ve ekonomik zarara sebep olan 4 fungal hastalık ele alınmıştır. Bunlar kuru kabarcık (*Verticillium fungicola*), yaş kabarcık (*Mycogone* spp.), örümcek ağı *Cladobotryum* spp.) ve yeşil küf (*Trichoderma* spp.) hastalıklarıdır (Eren ve Pekşen 2016). Bu hastalıklara sebep olan funguslar çoğunlukla hastalıklı mantar ve kompost üzerinde meydana getirdikleri belirtiler ve oluşturdıkları misel, spor taşıyıcı (konidiofor) ve sporların (konidi) morfolojik yapılarına bakılarak tanınmış ve yaygın bilinen türlere göre teşhis yapılmıştır. Bununla birlikte bu hastalıklara sebep olan fungusların ülkemiz ve Korkuteli bölgesinde yaygın türlerinin neler olduğu alt tür veya ırklarının olup olmadığı konusunda hiç bir çalışma yapılmamıştır. Bu hastalıklarla mücadelede kimyasal ve alternatif mücadele yöntemi geliştirilmesi için hastalığa sebep olan fungusların tür, alt tür ve ırklarının doğru teşhis edilmesi büyük önem arz etmektedir. Yine mantar misel tohumlarının tamamının yurtdışından ithal edildiği bu üretim alanlarımızda bu etmenlerin yeni tür, alt tür ve ırklarının giriş ve takibi için bu etmenlerin güvenilir teşhislerinin yapılması gerekmektedir. Bu nedenlerle bu çalışmada Antalya Korkuteli bölgesinde bulunan mantar üretim tesislerinde kuru kabarcık, yaş kabarcık, örümcek ağı ve yeşil küf hastalık surveyleri yapılarak örnekler toplanmış ve örneklerden elde edilen izolatlar ilk defa moleküler metodlar kullanılarak tanımlanmış ve karakterize edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında ziyaret edilen 30'dan fazla mantar tesisinin 19'unda kuru kabarcık, 12'sinde yaş kabarcık, 13'ünde örümcek ağı ve 14'ün de ise yeşil küf hastalığı bulunmuştur. Bu hastalıkların bazen 1-2'si aynı üretim yerinde tesbit edilmiştir. Bu veriler sözkonusu fungal hastalıkların Korkuteli bölgesinde oldukça yaygın olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada hastalıklı mantar örneklerinden izole edilen 19 kuru kabarcık, 10 yaş kabarcık, 10 örümcek ağı ve 11 yeşil küf etmeni fungus izolatının rDNA ITS bölgesi universal primer çifti ITS1F/ITS4 kullanılarak PCR çalışmalarında çoğaltılmış, elde edilen ürünlerin ITS bölgelerinin DNA dizilimleri çıkarılmıştır. Bu izolatların dizilimleri kendi aralarında ve NCBI blast ve filogenetik analizler yapılarak dünyada mantarlardan elde edilen izolatlarla kıyaslanarak Korkuteli mantar üretim yerlerinde bu hastalıklara sebep olan etmenler tür, alt tür ve ırk seviyesinde moleküler olarak tanımlanmış ve karakterizasyonları yapılmıştır.

Verticillium fungicola'nın sebep olduğu kuru kabarcık dünyada ticari mantar üretim alanlarında verim kayıplarına sebep olan en önemli fungal hastalık etmenidir. Yaklaşık %10-20 arasında verim kayıplarına sebep olmaktadır (Russel 1984). Taksonomik çalışmalar kültür mantarında 1930'lardan beri kültür mantarında salgınlara sebep olan *V. fungicola*'yı morfolojik ve patojenik özelliklerine göre 3 alt tür veya varyeteye (*fungicola*, *aleophilum* ve *flavidum*) ayırmaktadır (Gams vd. 1982). Bu tez çalışmasına benzer bir çalışmada Collopy vd (2001) ABD nin Pensilvanya eyaletindeki mantarhanelerden toplanan 40 ve diğer coğrafik bölgelerinden toplanan 28 *V. fungicola* izolatının rDNA ITS dizilimini incelemiş ve 40 pensilvanya, 13 Kuzey Amerika izolatının *V. fungicola* var. *aleophilum*'a olduğunu belirlemişlerdir. Yine bu araştırmacılar ITS dizilim analizleri sonucunda Avrupa izolatlarının *V. fungicola* var. *fungicola* olduğunu ve Kuzey Amerika izolatlarının klonal olduğunu ve içlerinde Avrupa izolatlarına benzer bir izolatın olmadığını göstermiştir. Bu tez çalışmasında Korkuteli bölgesi mantar üretim yerlerinden elde edilen 19 *V. fungicola* izolatının hepsinin *V. fungicola*'nın *fungicola* alt türüne ait olduğu ve dünyanın diğer bölgelerinde kültür mantarından elde edilen izolatlara benzer hem DNA dizilim hem de filogenetik analizlerle gösterilmiştir. Çalışmada özellikle Kuzey Amerika'da kültür mantarında yaygın olan *aleophilum* alt türüne rastlanmamıştır. ITS DNA analizleri izolatların muhtemelen klonal olduğuna işaret etmektedir. Bununla birlikte kurukabarcık etmeni *V. fungicola*'nın ülkemizdeki populasyon yapısının mantar üreten diğer bölgelerden toplanacak izolatlarında incelenmesi ile daha net bir şekilde ortaya konulabileceği açıktır. Yine yapılan çalışmalar *V. fungicola* var. *fungicola* izolatları arasında saldırganlık bakımından farklılık olduğu ve saldırgan türlerin mantarlarda daha fazla şekil bozukluğu ve kabarcığa sebep olduğunu göstermektedir (Largeveau ve Savoie 2008). Ülkemiz mantar üretim alanlarından toplanacak *V. fungicola* var. *fungicola*'nın farklı populasyonlarının incelenmesi bu konuda gelecekte yapılacak çalışmalardan biri olabilir.

Mycogone perniciosa fungusunun sebep olduğu yaş kabarcık hastalığı Korkuteli de dahil dünyada kültür mantarının yıkıcı hastalıklarından biridir ve şiddetli enfeksiyonlarda az veya hiç ürün alınmamasına sebep olmaktadır. Diğer bir tür olan *Mycogone rosae*'ninde kültür mantarı *Agaricus bisporus*'da hastalık yaptığı bilinmektedir (Fletcher ve Gaze 2008; Shaheen Kouser ve Shaiesta Shah 2013). Fungus örtü toprağında gelişerek şekli bozuk kültür mantarı oluşumuna sebep olarak önemli zararlara sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalar *M. perniciosa*'nın izolatları arasında morfolojik ve patolojik açıdan farklılıklar olduğunu göstermektedir (Fletcher vd. 1995). Bu tez çalışmasında Korkuteli bölgesinden elde edilen 10 izolatında *M. perniciosa* olduğunu göstermiştir. ITS bölgesi analizleri bu izolatlar arasında farklılık olmadığını ve bunların dünyanın diğer bölgelerindeki izolatlarla benzer olduğunu göstermiştir. Görünüşe göre klonal olan *M. perniciosa* izolatlarının patojenlik testleri diğer moleküler yöntemler kullanılarak ayırtılması bu çalışmanın devamı olacaktır.

Cladobotryum türlerinin sebep olduğu örümcek ağı, kuru ve yaş kabarcıktan sonra sonra mantar üretim alanlarında zarar yapan en önemli fungal hastalıktır (Potočník 2006). Genellikle *Cladobotryum dendroides* cinsi içindeki 3 türün beyaz şapkalı mantarlarda (*Agaricus bisporus*)'ta örümcek ağı hastalığına sebep olduğu bilinmektedir. Bunlar: *C. dendroides*, *C. mycophilum* ve *C. varium* 'dur. Bununla birlikte kültür mantarında örümcek ağı hastalığına sebep olan türün *C. dendroides*

olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte 1970'lerde İngiltere ve İrlanda'da hastalığın salgın yapması ve etmenlerin tmethylbenzimidazole carbamate (MBC) fungusitler Benomyl and Carbendazim'e dayanıklı olması üzerine yapılan çalışmada örümcek ağına sebep olan türün *C. mycophilum* olduğu elde edilen izolatların ITS dizilimlerinin analizi ile ortaya çıkarılmıştır ITS dizilim analizleri *C. mycophilum* izolatları arasında küçük nükleotid farklılıkları olduğunu göstermiş ve fungusun izolatları 3 gruba ayrılmıştır. İki grup MBC fungusitlere hassas bir grup ise dayanıklı bulunmuştur ve bunların kendi aralarında klonal olduğu belirtilmiştir (McKay vd. 1995). Bu tez çalışmasında da bilinenin aksine Korkuteli bölgesinde örümcek ağ hastalığına *C.mycophilum*'un sebep olduğu ilk defa belirlenmiştir. ITS DNA ve filogenetik analizler tabi tutulan izolatların dünyanın diğer bölgelerindeki *C.mycophilum* izolatlarına benzer ama *C. dendroides* izolatlarından farklı olduğunu göstermiştir. Bu çalışma gelecekte Korkuteli bölgesi izolatları ve ülkenin diğer bölgelerinden elde edilecek *C.mycophilum* izolatları ile yapılacak fungusun muhtemel grup ve ırklarının tesbit çalışmaları için bir öncü araştırma olmuştur. Korkuteli bölgesinden elde edilen bu izolatların daha ayırıcı morfolojik, patojenik ve moleküler yöntemler kullanılarak karakterizasyonu gerekmektedir.

Trichoderma türlerinin neden olduğu yeşil küf hastalığı dünyada kültür mantarı yetiştiriciliği sektörünün en önemli problemlerinden birisidir (Morris vd. 1995). *T. harzianum* ve *T. viride* de dahil 10' dan fazla *Trichoderma* türü şapkali mantarda kompost kökenli yeşil küf hastalığına sebep olmaktadır. *Trichoderma harzianum*'un *Th-2* ve *Th-4* olmak üzere 2 farklı ırkı tanımlanmıştır. Diğer *Trichoderma* türlerinden daha hızlı bir gelişim gösteren *Th-2* tüm Avrupa'da ciddi epidemilere sebep olmuştur. *Th-4* ırkı ise ABD'nin Pensilvanya eyaleti mantar üretim alanlarında 1994-1999 yılları arasında %30-100 arasında ürün kaybına sebep olmuştur (Anderson vd. 2001). Daha sonra *Th-2* ırkı *T. aggressivum* f. *europaeum* ve *Th-4* ırkı ise *T. aggressivum* f. *agressivum* olarak isimlendirilmiştir (Fletcher ve Gaze 2008). Bizim çalışmamızda Korkuteli bölgesi mantar üretim alanlarından toplanan örneklerden elde edilen 11 *Trichoderma* izolatıda PCR çoğaltmalarında aynı büyüklükte ITS bölgesi PCR ürünü vermiştir. ITS bölgesinin DNA dizilim, NCBI Blast ve filogenetik analizleri bu izolatlardan 10 tanesinin *T. aggressivum* f. *agressivum* (*Th-4*) ve bir tanesinin ise *T. aggressivum* f. *europaeum* (*Th-2*) olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar Korkuteli ve muhtemelen ülkemizin diğer mantar üretim alanlarında her iki ırkınında bulunduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ

Dünya’da kültür mantarında fungal hastalık etmenlerinin tür, alt ve ırklarını tespitine yönelik azda olsa bazı araştırmalar mevcutken ülkemizde bugüne kadar bu düzeyde bir çalışma yapılmamış bu hastalıklara sebep olan türler genelde morfolojik özellikler ve varsayımlara dayanarak belirlenmiştir. Bu çalışma Antalya Korkuteli ilçesi mantar üretim alanlarında yaygın olan 4 fungal hastalık üzerine yapılmıştır ve hastalıklara sebep olan fungusların tür ve ırkları DNA’ya dayanan moleküler yöntemlerle kesin olarak belirlenerek bilimsel kayda geçirilmiştir. Çalışma sonucunda Korkuteli bölgesinde kuru kabarcık hastalığına *Verticillium fungicola* var. *fungicola* ve yaş kabarcık hastalığına ise *Mycogone perniciosa*’nın sebep olduğu belirlenmiştir. Böylelikle ülkemizde kuru kabarcık hastalık etmeni alt tür seviyesinde tanımlanmıştır. Yine varsayım ve bilinenin aksine Korkuteli bölgesinde ilk defa örümcek ağı hastalığına *Cladobotryum dendroides*’in değilde *Cladobotryum mycophilum*’un yol açtığı kesin olarak kanıtlanmıştır. Bölgede hem kompost hem mantar üreticilerinin korkulu rüyası olan yeşil küf hastalığına ise *Trichoderma aggressivum*’un (*T. harzianum*) iki farklı ırkı olan f. *aggressivum* (*Th-4*) ve f. *europaeum* (*Th-2*)’un sebep olduğu belirlenmiştir. Bu yeşil küf etmeninin kültür mantarında ırk seviyesinde belirlendiği ilk çalışma olmuştur. Özellikle Avrupa’da salgın yapmış ırk f. *europaeum*’un ülkemizde varlığının tesbiti bu hastalığı önlemede alınacak tedbirleri belirlemeye ışık tutacaktır.

Bu tez çalışmasının sonuçları gözönünde bulundurularak ülkemiz ve Korkuteli bölgesinde daha sonra bu hastalık etmenlerinin ortaya çıkacak yeni ve daha saldırgan tür, alt tür veya ırkların tesbiti ve takibi yapılabilecek ve böylelikle zamanında ve uygun mücadele yöntem ve stratejileri geliştirilebilecektir. Yine bu çalışma ile tanım ve karakterizasyonu yapılan fungus tür ve ırkları hakkındaki veriler gelecekte bu hastalıklara dayanıklı kültür mantar çeşitlerinin geliştirilmesi konusunda yapılacak araştırmalara kaynak oluşturacaktır.

Kültür mantarındaki önemli bu fungal hastalıklara sebep olan etmenlerin doğru tanımlanması ile bunlar için ruhsatlı ilaçların geliştirilmesi veya önerilmesi daha kolay olacaktır. Uygun ilaçlar ile ruhsatsız ilaçların kullanılmasının önüne geçilebilecek ve kalıntı risk yönetimi daha etkin bir şekilde uygulanabilecektir. Yine bu etmenlere karşı biyolojik mücadele de dahi alternatif yöntem ve preparatlarının geliştirilmesine bu çalışmanın önemli katkısı olacaktır.

Sonuç olarak mantar yetiştiriciliğinde üretim yerlerinin alt yapı sorunlarının düzeltilmesi ve uygun hijyen koşullarının sağlanmasının yanısıra özellikle bu çalışmada ele alınan fungal hastalıklara sebep olan etmenlerin zamanında ve doğru teşhis ve tanımı mantar üretiminde verim ve kalite kayıplarının azalmasına neden olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Adie, B.A.T. and Grogan, H.M. 2000. The liberation of cobweb (*Cladobotryum mycophilum*) conidia within a mushroom crop. Science and Cultivation of Edible Fungi (Van Griensven, ed.), 2000, pp. 595-600.
- Amey, R.C., Athey-Pollard, A., Burns, C., Mills, P.R., Bailey, A., and Foster, G.D. 2007. Investigations into the Taxonomy of the Mushroom Pathogen *Verticillium fungicola* and its Relatives Based on Sequence Analysis of Nitrate Reductase and ITS Regions. ISSN 0026-2617, Microbiology, 2007, Vol. 76, No. 6, pp. 757– , 768. © Pleiades Publishing, Ltd., 2007.
- Anderson, M. G., Beyer, D. M., and Wuest, P. J. 2001. Yield comparison of hybrid *Agaricus* mushroom strains as a measure of resistance to *Trichoderma* green mold. Plant Dis. 85:731-734.
- Anonim. 2012. Milli Eğitim Bakanlığı, Tarım Teknolojileri, Kültür Mantarı Yetiştiriciliği kitabı, Ankara, 2012.
- Anonim1: <https://www.fenbilimlerinedir.com/2017/03/mantarlarin-genel-ozellikleri-nelerdir.html> [Son Erişim Tarihi: 13.05.2018].
- Aydın, Ö. 2004. RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistemiği .DPU Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) 6. Sayı (Ekim 2004).
- Arısoy, B. 2018. <http://wildpeaceacademy.com/makro-mantarlarin-incelenmesi-ve-makro-mantar-morfolojisi> [Son Erişim Tarihi: 15.5.2018].
- Baar, J., Straatsma G., Paradi I. and Amsing G.M. 2007. Edible mushrooms: from industrial cultivation to collection from the wild. In: Food ultifaceted Approach to Fungi and Food. Dijksterhuis J., Samson R.A. (Eds.). Pp. 361-374. CrC Press Taylor and Francis Group. ISBN 0-8493-9818-5.
- Barutçıyan, J. 2012. Türkiye'nin Mantarları 1, Oğlak Yayıncılık, İstanbul.
- Berendsen, R., Baars J., Kalkhove S., Lugones L., Wösten H. ve Bakker P. 2010. *Lecanicillium fungicola*: causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. Molecular Plant Pathology (2010) 11(5), 585–595.
- Boysen, M., Bojra, M., Del Moral, C., Salzar, O., Rubio, V., 1996. Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG4 isolates by direct sequence of asymmetric PCR Product of the ITS regions. Current Genetics 29, 174-181.
- Brady, BLK, Gibson IAS. 1976. *Mycogone perniciosa*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. London, UK, Commonwealth Agricultural Bureau.
- Bruns, T.D., Gardes, M., 1993. Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi-taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. Molecular Ecology 2, 233-242.
- Collopy, P. D., Largeteau-Mamoun, M. L., Romaine, C. P., and Royse, D. J. 2001. Molecular phylogenetic analyses of *Verticillium fungicola* and related species causing dry bubble disease of the cultivated button mushroom, *Agaricus*

- bisporus*. Phytopathology 91:905-912.
- Carrasco1, J., Navarro1, M.J., Santos,M., Di  nez F. & Gea, F.J. 2015. Incidence, identification and pathogenicity of *Cladobotryum mycophilum*, causal agent of cobweb disease on *Agaricus bisporus* mushroom crops in SpainAnn Appl Biol 168 (2016) 214–224.
- Catal, M., Adams, G. C., and Fulbrigt, D. W. 2010. Evaluation of resistance to Rhabdoclineneedlecast in Douglas fir variety Shuswap, with quantitative polymerase chain reaction. Phytopathology 100 (4):337-344.
- Back, C., Lee, C., Seo, G., and Jung, H. 2012. Characterization of Species of *Cladobotryum* which Cause Cobweb Disease in Edible Mushrooms Grown in Korea. Mycobiology 40(3) : 189-194 (2012).
- Chen , X., Romaine, C.P., Ospina, M.D., Royse, J.D. 1999. A polymerase chain reaction-based test for the identification of *Trichoderma harzianum* biotypes 2 and 4, responsible for the worldwide green mold epidemic in cultivated *Agaricus bisporus*. Appl Microbiol Biotechnol (1999) 52: 246-250.
- Choi, I.Y., Hong, S.B. and Yadav, M. C. 2003. Molecular and morphological characterization of green mold, *Trichoderma* spp. Isolated from oyster mushrooms. Mycobiology, 2003, 31, 74–80.
- Del Carmen, S.J., Mamoun, M.L., Rousseau, T., Roger C.R. ve Savoie J.M. 2002. Genetic and physiological variation in isolates of *Verticillium fungicola* causing dry bubble disease of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. Mycol. Res. 106 (10):1163–1170.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19:11-15.
- Edel, V. 1998. Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview, 1-20, Bridge PD(ed), CAB1 Publishing, Wallingford, 357 pages.
- Eren, E. 2014. K  lt  r mantarı yetiştiriciliğinde hastalık ve zararlılar. Yemeklik K  lt  r Mantarı   alıştay   (12-13 Mayıs 2014), 25-33, Antalya.
- Eren, E. ve Pekşen A. 2016. T  rkiye’de K  lt  r Mantarı Sekt  r  n  n Durumu ve Geleceğine Bakış. T  rk Tarım- Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 4(3): 189-196, 2016.
- Erkel, İ. 2000. K  lt  r Mantarı Yetiştiriciliğı. Kocaelik Yayınevi, İstanbul.
- Eveleigh, D. E. 1985. Biology of Industrial Microorganisms (eds Demainand, A. L. and Soloman, N. A.), Benjamin Cummings Publishing Co, Menlo Park, California, 1985.
- FAO. 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org> [Son Erişim Tarihi:13.05.2018].
- Fletcher, J.T. 1981. The control of bubble diseases of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. Mush. Sci. 11: 597-604.

- Fletcher, J.T., Jaffe, B., Muthumeenakshi, S., Brown, A.E. and Wright, D.M. 1995. Variations in isolates of *Mycogone perniciosa* and in disease symptoms in *Agaricus bisporus*. Pl. Pathol.,44:130-140.
- Fletcher, J.T. and Gaze R.H., 2008. Mushrooms pests and disease control. Manson Publishing Ltd. London. Pp. 192. ISBN 978-0-12-373984-1 and ISBN 0-12-373984-5.
- Gams, W., and Van Zaayen, A. 1982. Contribution to the taxonomy and pathogenicity of fungicolous *Verticillium* species I. Taxonomy. Neth. J. Plant Pathol. 88:57-78.
- Gardes, M., Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2, 113–118.
- Gherbawy, Y., Hussein, N. and Al-Qurashi, A. 2014. Molecular Characterization of *Trichoderma* Populations Isolated from Soil of Taif City, Saudi Arabia. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 2014. 3(9) 1059-1071.
- Goltapeh, E. M. and Danesh, Y. R. 2000. Studies on interaction between *Trichoderma* species and *Agaricus bisporus* mycelium. Science and Cultivation of Edible Fungi. 661-666.
- Günay, A. 1995. Mantar Yetiştiriciliği. İlke Kitabevi Yayınları: 2, Kültür Dizisi: 1, s. 469, Ankara.
- Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Nagy, A., Nagy, E., Vágvolgyi, C., and Kredics, L. 2007. Green mold diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. Phytopathology 97:532-537.
- Hughes, S.J. 1978. New Zealand fungi. 25. Miscellaneous species. New Zealand Journal of Botany, 16(3): 311-370, 1978.
- Holland, D.M. & Cooke, R.C. (1990) Activation of dormant conidia of the wet bubble pathogen *Mycogone perniciosa* by Basidiomycotina. Mycol. Res. **94**, 789–792.
- Kadıoğlu, Y. 2015. Korkuteli’nde Gelişen Yeni Bir Ekonomik Faaliyet Kolu: Mantar Yetiştiriciliği. Marmara Coğrafya Dergisi Sayı: 31.
- Kılıçoğlu, M.Ç. ve Özkoç İ. 2008. Fungal Sistematikteki Moleküler Gelişmeler. J. of Fac. of Agric., OMU, 2008,23(1):65-72.
- Kouser, S., Shah, S., Ahmed, M., Shah, M.D. and Sheikh, P.A. 2015. Morphological characteristics of wet bubble disease (*Mycogone perniciosa*) isolated from button mushroom and assessment of factors affecting disease development and spread. African Journal of Microbiology Research. Vol. 9(3), pp. 185-193, 21.
- Largeteau, M.L. and Savoie, J.M. 2008. Effect of the fungal pathogen *Verticillium fungicola* on fruiting initiation of its host, *Agaricus bisporus*. Mycol Res. 2008 Jul;112 (Pt 7):825-8.
- Lee, S.B., Taylor, J.W. 1992. Phylogeny of five funguslike protist *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Molecular Biology and evolution 9,636-653.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 2003. Brock Biology of Microorganisms, tenth edition, Pirentice Hall, Pearson Educatin İnternational.
- Mckay, G.L., Egan, D., Morris, E., And Brown, A.E. 1998. Identification of benzimidazole resistance in *Cladobotryum dendroides* using a PCR-based logical Research, 102: 671-676, 1998.
- Mckay, G.J., Egan, D., Morris, E., Scott, C. and Brown, A.E. 1999. Genetic and morphological characterization of *Cladobotryum* species causing cobweb disease of mushrooms. Applied and Environmental Microbiology, 65: 606- 610, 1999.
- Morris, E., Doyle, O., Clancy, K. J. and Elliott, T. J., A profile of *Trichoderma* species II – mushroom growing units. Science and Cultivation of Edible Fungi, Proceedings of the 14th International Congress, Oxford, 17–22 September 1995, pp. 619–625.
- Nair N.G. and Macauley B.J. 1987. Dry bubble disease of *Agaricus bisporus* and *Agaricus bitorquis*, and its control by prochloraz-manganese complex. New Zealand J. Agricul. Res. 30: 107-116.
- Ospina-Giraldo, M. D., Royse, D. J., Chen, X., and Romaine, C. P. 1999. Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold. Phytopathology 89:308-313.
- Pekşen, A. 2013. Mantarların insan hayatı ve sağlığındaki yeri. Bahçe Haber, 2(1): 10-15.
- Potočnik, I. 2006. Morfološke i patogene karakteristike prouzrokovala suve i mokre truleži šampinjona (*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach) u Srbiji. Pesticidi i fitomedicina, 21: 281-296, 2006.
- Potočnik, I., Rekanović, E., Milijašević, S., Todorović, B. and Stepanović, M. 2008. Morphological and Pathogenic Characteristics of the Fungus *Cladobotryum dendroides*, the Causal Agent of Cobweb Disease of the Cultivated Mushroom *Agaricus bisporus* in Serbia. Pestic. Phytomed. (Belgrade), 23 (2008) 175-181.
- Piasecka, J. 2010. Molecular and Microbiological Methods for the Detection and Measurement of Dry Bubble Disease caused by *Lecanicillium* (*Verticillium*) *fungicola* on Mushroom Farms. Thesis is submitted for the degree of doctor of Philosophy in the National University of Ireland, Maynooth.
- Rinker, D. L. and Alm, G. 1997. Effect of supplementation at spawning or casing on the expression of *Trichoderma harzianum* biotype *Th-4* in commercial mushroom production. Mushroom News, 6–11 Nov. 1977.
- Romaine, C.P., Schlagnhauer, B., Stone, M. 2002. A polymerase chain reaction-based test for *Verticillium fungicola* causing dry bubble disease on the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. Appl Microbiol Biotechnol (2002) 59:695–699.
- Russel, P. 1984. Sporgon on mushrooms. Mush. J. 141: 299-300
- Salazar, O., Julian, M.C., Rubia, V., 2000. Primers based on specific rDNA-ITS

- sequences for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG 2 subgroups and ecological types, and binucleate *Rhizoctonia*. Mycol.Res. 104, 281-285.
- Seaby, D. 1996. Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. 1996. Plant Pathol., 45, 905–912.
- Sharma, S.R, Kumar, S. 2000. Studies on the wet bubble disease of white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) caused by *Mycogone perniciosa*. In: Van Griesven L.J.L.D. (ed) Science and Cultivation of Edible Fung. Rotterdam, A.A. Balkema, pp 569–576, ISBN 90 5809 1430.
- Sharma, H.S.S., Kilpatrick, M., Ward, F., Lynnos G., Burns L. 1999. Colonization of phase II compost by biotypes of *Trichoderma harzianum* and their effect on mushroom yield and quality. Appl. Microbiol. Biotech. 51 (5): 572–578.
- Sharma, S.R. 1994. Survey for diseases in cultivated mushrooms. Ann. Rep. NRCM, pp23.
- Sharma, S.R. , Kumar, S. Sharma, V.P. 2007. Diseases and Competitor Moulds of Mushrooms and their Management. National Research Centre for Mushroom, Chambaghat.
- Sharma S.R. and Kumar S. 2005. Diseases of mushrooms and their management. In: Challenging problems in horticultural and forest pathology. Sharma S. R. and Sharma J.N. (Eds.). Pp. 256-250. Indus Publishing Company. New Delhi.
- Sinden, J. W. And Houser, E., 1953. Nature and control of three mildew diseases of mushrooms in America. Mushroom Sci., 1953, 1, 52–56.
- Singh, S. K., Sharma, V. P., Sharma, S. R., Kumar, S. and Tiwari M. 2006. Molecular characterization of *Trichoderma* taxa causing greenmould disease in edible mushrooms. Current Science, Vol. 90, No. 3.
- Sing, M. 2011. Mushroom Production: An Agribusiness Activity. Mushrooms – Cultivation, Marketing and Consumption (Eds. Singh M, Vijay B, Kamal S and Wakchaure GC). Directorate of Mushroom Research, Chambaghat, Solan.
- Stamets, P. 2000. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. United States by Ten Speed Press, a division of Random House, Inc., New York, 117 s.
- Tajima, F ve Nei, M .1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. Molecular Biology and Evolution 1:269-285.
- TÜİK, 2017. Türkiye istatistik Kurumu sayfası: <http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=istgosterge> [Son Erişim Tarihi: 13.5.2018].
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor. J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Umar, M.H., Geels, F.P., Van Griensven, L.J. 2000. Pathology and pathogenesis of *Mycogone perniciosa* infection of *Agaricus bisporus*. Mushroom Sci. 15:561-567.
- Van Griensven, L.J.L.D. 1988. The Cultivation of Mushrooms. Darlington Mushroom Laboratories, Ltd., Rustington, Sussex, England.

Van Zaayen, A. and Van Andrichem, J.C.J. 1982. Prochloraz for control of fungal pathogens of cultivated mushrooms. Netherland Journal of Plant Pathology, 88: 203-213, 1982.



ÖZGEÇMİŞ

DUYGU ATEŞ

duyguates_07@hotmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2015-2018	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2010-2014	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Ziraat Mühendisi	Tarım ve Orman Bakanlığı
2017- Devam Ediyor	Çameli İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Denizli

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Çatal M., Ateş D., Çat A.(2018). Molecular Characterization of *Mycogonea pernicios*a Causing Wet Bubble Disease of *Agaricus bisporus*. 3rd International Conference On Advance In Natural And Applied Sciences. **ICANAS'18** .(Davetli Konuşmacı).