

e-ISSN:2147-6845  
E-JOURNAL  
April 2019 Volume:10  
Issue:1



Selçuk University Mushroom Application and  
Research Center-KONYA-TURKEY

# JOURNAL OF FUNGUS

10 ŞUBAT 2019 TARİHİNDE HAKKIN RAHMETİNE KAVUŞAN  
DERGİMİZ EDITÖRLERİNDEN

**PROF.DR. KENAN DEMİREL**  
ANISINA



**Selçuk Üniversitesi**  
**Mantarcılık**  
**Uygulama ve Araştırma Merkezi**  
**KONYA-TÜRKİYE**



# MANTAR DERGİSİ

E-DERGİ/ e-ISSN:2147-6845

**Nisan 2019**

**Cilt:10**

**Sayı:1**



**e-ISSN 2147-6845**  
**Nisan 2019 / Cilt:10/ Sayı:1**  
**April 2019 / Volume:10 / Issue:1**

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
MANTARCILIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ MÜDÜRLÜĞÜ

**ADINA SAHİBİ**

PROF.DR. GIYASETTİN KAŞIK

**YAZI İŞLERİ MÜDÜRÜ**  
ÖĞR.GÖR.DR. SİNAN ALKAN

**Haberleşme/Correspondence**

S.Ü.  
Mantarcılık Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü  
Alaaddin Keykubat Yerleşkesi, Fen Fakültesi B Blok,  
Zemin Kat-42079/Selçuklu-KONYA

Tel:(+90)0 332 2233998/ Fax: (+90)0 332 241 24 99

Web: <http://mantarcilik.selcuk.edu.tr>  
<http://dergipark.gov.tr/mantar>

E-Posta:mantarcilik@gmail.com

Yayın Tarihi/Publication Date  
**25/04/2019**



**e-ISSN 2147-6845**  
**Nisan 2019 / Cilt:10/ Sayı:1**  
**April 2019 / Volume:10 / Issue:1**

## EDİTÖRLER KURULU / EDITORIAL BOARD

- Prof.Dr. Abdullah KAYA (Karamanoğlu Mehmetbey Üniv.-Karaman)  
Prof.Dr. Abdulnasır YILDIZ (Dicle Üniv.-Diyarbakır)  
Prof.Dr. Abdurrahman Usame TAMER (Celal Bayar Üniv.-Manisa)  
Prof.Dr. Ahmet ASAN (Trakya Üniv.-Edirne)  
Prof.Dr. Ali ARSLAN (Yüzüncü Yıl Üniv.-Van)  
Prof.Dr. Aysun PEKŞEN (19 Mayıs Üniv.-Samsun)  
Prof.Dr. A.Dilek AZAZ (Balıkesir Üniv.-Balıkesir)  
Prof.Dr. Ayşen ÖZDEMİR TÜRK (Anadolu Üniv.- Eskişehir)  
Prof.Dr. Beyza ENER (Uludağ Üniv.Bursa)  
Prof.Dr. Cvetomir M. DENCHEV (Bulgarian Academy of Sciences, Bulgaristan)  
Prof.Dr. Celaledin ÖZTÜRK (Selçuk Üniv.-Konya)  
Prof.Dr. Ertuğrul SESLİ (Trabzon Üniv.-Trabzon)  
Prof.Dr. Fatih KALYONCU (Celal Bayar Üniv.-Manisa)  
Prof.Dr. Giovanni PACIONI (Università Degli Studi Dell'Aquila- L'Aquila, İtalya)  
Prof.Dr. Hacı Halil BIYIK(Adnan Menderes Üniv.-Aydın)  
Prof.Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN (Selçuk Üniv.- Konya)  
Prof.Dr. Kadir KINALIOĞLU(Giresun Üniv.-Giresun)  
Prof.Dr. Macit İLKİT (Çukurova Üniv.-Adana)  
Prof.Dr. Mitko KARADALEV (Ss.Cyril and Methodius Univ.-Macedonia)  
Prof.Dr. Mustafa YAMAÇ (Eskişehir Osmangazi Üniv.-Eskişehir)  
Prof.Dr. Nur Münevver PINAR (Ankara Üniv.-Ankara)  
Prof.Dr. Sevda KIRBAĞ (Fırat Üniv.-Elazığ)  
Prof.Dr. Süleyha Hilmioğlu POLAT (Ege Üniv.-İzmir)  
Prof.Dr. Şule ÖZTÜRK (Uludağ Üniv.- Bursa)  
Prof.Dr. Vasyl P. HELUTA (M.G.Kholodny Botany Institute Mycology,Kiev, Ukraine)  
Prof.Dr. Yusuf UZUN(Yüzüncü Yıl Üniv. Van)  
Doç.Dr. Burhan ŞEN (Trakya Üniv.-Edirne)  
Doç.Dr. Cem ERGÜL (Uludağ Üniv.-Bursa)  
Doç.Dr. Faruk SELÇUK (Ahi Evran Üniv.-Kırşehir)  
Doç.Dr. Hasan AKGÜL (Akdeniz Üniv.-Antalya)  
Doç.Dr. Ilgaz AKATA(Ankara Üniv.-Ankara)  
Doç.Dr. Mehmet CANDAN(Anadolu Üniv. Eskişehir)  
Dr.Öğr.Üyesi Gönül EROĞLU(Selçuk Üniv.-Konya)  
Dr.Öğr.Üyesi İskender KARALTI(Azerbaijan Medical University-Bakü)  
Dr.Öğr.Üyesi Sinan AKTAŞ(Selçuk Üniv.-Konya)  
Dr.Öğr.Üyesi Şanlı KABAKTEPE(İnönü Üniv.-Malatya)  
Öğr.Gör.Dr. Sinan ALKAN(Selçuk Üniv.-Konya)



**e-ISSN 2147-6845**  
**Nisan 2019 / Cilt:10/ Sayı:1**  
**April 2019 / Volume:10 / Issue:1**

Bu sayımızda yer alan eserler hakkında aşağıda isimleri yazılı hakemlerimize yaptıkları değerlendirmeler için teşekkür ederiz.

Prof.Dr. Abdullah KAYA  
Prof.Dr. Aysun PEKŞEN  
Prof.Dr. Fatih KALYONCU  
Prof.Dr. Hacı Halil BIYIK  
Prof.Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN  
Prof.Dr. İbrahim TÜRKEKUL  
Prof.Dr. Mustafa YAMAÇ  
Prof.Dr. Yusuf UZUN  
Doç.Dr. Ahmet UYSAL  
Doç.Dr. Gökhan ZENGİN  
Doç.Dr. Hakan ALLI  
Doç.Dr. İlğaz AKATA  
Doç.Dr. Özlem Abacı GÜNYAR  
Doç.Dr. Rasime DEMİREL  
Doç.Dr. Suna ERTUNÇ  
Doç.Dr. Suzan ÖKTEN  
Öğr. Gör. Dr. Sinan ALKAN



e-ISSN 2147-6845  
Nisan 2019 / Cilt:10/ Sayı:1  
April 2019 / Volume:10 / Issue:1

## İÇİNDEKİLER/ CONSTENS

### ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES

- Cam Kavanozda Yetiştirilen Shiitake (*Lentinula edodes*)  
Mantarının Bazı Morfolojik Özellikleri ve Antibakteriyel Performansı.....1  
*Some Morphological Properties and Antibacterial Performance  
of Shiitake (Lentinula edodes) Mushroom Grown in Glass Jar*  
Elif Ayşe ERDOĞAN ELİUZ
- 
- Phylogenetic and Taxonomic Studies on *Cortinarius caerulescens* (Schaeff.) Fr.  
a New Record for Turkish Mycota .....8  
*Türkiye Mikotası İçin Yeni Bir Kayıt Olan Cortinarius caerulescens (Schaeff.) Fr.  
Üzerinde Filogenetik ve Taksonomik Çalışmalar*  
Ayşenur KALMER, İsmail ACAR, Ayten DİZKIRICI TEKPINAR
- 
- Düzkır Mağarasının (Niğde, Aladağlar) İçi ve Dışından Alınan Toprak Örneklerinde  
Cryptococcus neoformans ve Histoplasma capsulatum Varlığının Araştırılması*.....17  
*Investigation of Cryptococcus Neoformans and Histoplasma Capsulatum  
in Soil Samples Taken from Inside and Outside of Düzkır Cave (Niğde, Aladağlar)*  
Özlem ABACI GÜNYAR, Ayşegül YOLTAŞ, Mustafa YAMAÇ, Alev HALİKİ UZTAN
- 
- A New Genus (*Balsamia*) Addition for Turkish Mycota..... 23  
*Türkiye Mikotası İçin Yeni Bir Cins (Balsamia)*  
Hakan ALLI, Hasan Hüseyin DOĞAN
- 
- Biodiversity of Penicillium Species Isolated from Edirne Söğütlük Forest Soil (Turkey).....26  
*Edirne İli (Türkiye) Söğütlük Ormanı Toprağından İzole Edilen Penicillium Türlerinin Biyoçeşitliliği*  
Tuğba Korur KOLANLARLI, Ahmet ASAN, Burhan SEN, Suzan OKTEN
- 
- A New *Elaphomyces* Record for Turkey .....40  
*Türkiye İçin Yeni Bir Elaphomyces Kaydı*  
Yasin UZUN, Abdullah KAYA
- 
- Inocybe sphagnophila* Bandini & B. Oertel (*Agaricales, Inocybaceae*):  
A New Record for the Turkish Mycota ..... 44  
*Inocybe sphagnophila* Bandini & B. Oertel (*Agaricales, Inocybaceae*): Türkiye Mikotası İçin Yeni Bir Kayıt  
Ertugrul SESLI, Ditte BANDINI
- 
- Çorum İli'nden Toplanan *Agaricaceae* Familyasına Ait  
Bazı Mantarlarda Ağır Metal Birikiminin Belirlenmesi.....48  
*Determination of Heavy Metal Accumulation in Some Mushrooms  
of Agaricaceae Family Collected from Çorum Province*  
İlker AKIN, Sinan ALKAN, Gıyasettin KAŞIK
- 
- Pleurotus ostreatus* Alfa- ve Beta- Glukan Polisakkaritlerinin İzolasyonu  
ve Biyoyumluluklarının Yüzey Kaplaması Sonrasında İncelenmesi.....56  
*Isolation of Polysaccharides Alpha- and Beta-Glucans of Pleurotus ostreatus  
and Evaluation of Their Biocompatibility After Surface Coating*  
Leyla KAYIŞ, Gökhan DURUKSU



**e-ISSN 2147-6845**  
**Nisan 2019 / Cilt:10/ Sayı:1**  
**April 2019 / Volume:10 / Issue:1**

**DERLEME MAKALELERİ / REVIEW ARTICLES**

Fungal Biyokontrol Ajanları ve Metabolitleri.....	70
<i>Fungal Biocontrol Agents and Their Secondary Metabolites</i>	
Şenay ŞENTÜRK, Özlem ABACI GÜNYAR	

---



Geliş(Received) :11/07/2018  
Kabul(Accepted) :31/10/2018

Araştırma Makalesi/Research Article  
Doi:10.30708mantar.442578

## Cam Kavanozda Yetiştirilen Shiitake (*Lentinula edodes*) Mantarının Bazı Morfolojik Özellikleri ve Antibakteriyel Performansı

Elif Ayşe ERDOĞAN ELİUZ

Mersin Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu,  
Gıda Teknolojileri Bölümü, Mersin, Türkiye  
Orcid ID:0000-0003-4317-3000/ eliferdogan81@gmail.com

**Öz:** Bu çalışmanın amacı, cam kavanozda gürgen talaşı ile buğday kepeği karışımından hazırlanan yetiştirme ortamında yetiştirilen Shiitake (*Lentinula edodes* Berk.) mantarının bazı morfolojik özelliklerini ve antibakteriyel performansını belirlemektir. Çalışmamızda cam kavanozlar içerisinde hazırlanan yetiştirme ortamlarında mantar üretimi gerçekleştirildi. Elde edilen mantarlardan hazırlanan DMSO' lu (%10) ekstraktın *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* üzerine antibakteriyel aktiviteleri spektrofotometrik broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak araştırıldı. Buna göre, en düşük aktivite *B. subtilis* (71.28 g/ml) bakterisi üzerine iken, en yüksek aktivite *P. aeruginosa* (7.86 g/ml) üzerine bulundu. Sonuç olarak, cam kavanozda yetiştirilen Shiitake mantarının diğer yöntemlerle üretilen mantar tiplerine morfolojik olarak yakın özellikler taşıdığı ve patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** Shiitake (*Lentinula edodes*), Antibakteriyel, Mikrodilüsyon, Gürgen talaşı

### Some Morphological Properties and Antibacterial Performance of Shiitake (*Lentinula edodes*) Mushroom Grown in Glass Jar

**Abstract:** The objective of this study was to determine some morphological characters and antibacterial performance of Shiitake (*Lentinula edodes*) mushroom grown in the growing medium prepared from a mixture of hornbeam sawdust and wheat bran in the glass jar. In our work, mushroom production was carried out in the growing media prepared in glass jars. Antibacterial activities of the extract prepared in DMSO (10%) from the obtained mushrooms on *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* were investigated using spectrophotometric broth microdilution method. Accordingly, the highest activity was found *P. aeruginosa* (7.86 mg/ml) while the lowest activity was on *B. subtilis* (71.28 g/ml). As a result, it was determined that Shiitake mushroom grown in glass jar has morphologically close features to mushroom types grown by other methods and has antimicrobial activity against pathogenic bacteria.

**Key words:** Shiitake (*Lentinula edodes*), Antibacterial, Microdilution, Hornbeam sawdust





## Giriş

Shiitake mantarı (*L. edodes* (Berk.) Pegler 1976) sistematik olarak *Basidiomycetes* sınıfına ait, şapkalı bir mantar türüdür (Ağaoğlu ve ark. 1991). Shiitake dünyanın en önemli üçüncü kültürü yapılan yenen mantar türüdür. Türkiye'de de dünya mantar üretimine benzer olarak *Agaricus* cinsi %86 oranı ile birinci sırada, %10 oranı ile *Pleurotus* türleri ikinci ve %3 ile *Lentinula edodes* türü üçüncü sırada yer almaktadır. Türkiye'de *Pleurotus* türleri ve *L. edodes* ile ilgili akademik çalışmalar 1990'lı yıllarda yapılmaya başlanmış olmasına rağmen, bu türlerin ticari yetiştiriciliği 2010 yılından sonra hız kazanmıştır (Eren ve Pekşen, 2016).

Türkiye'de kültür mantarı üretim miktarının cinslere dağılımı incelendiğinde *Agaricus* cinsi %86 oranı ile birinci sırada, %10 oranı ile *Pleurotus* türleri ikinci ve %3 ile *Lentinula edodes* türü üçüncü sırada yer almaktadır (Eren ve Pekşen, 2016). Bu mantar, kültüre alınabilen bir mantardır ve suni metotlar ile kültüre alma çalışmaları üzerine giderek çeşitli yöntemler geliştirilmektedir (Royse ve Sanchez, 2007). Shiitake kültür çalışmalarının başladığı ülkeler olan Japonya ve Çin dışında Kore, Rusya, Amerika ve İtalya gibi diğer ülkelerde de doğal olarak yetişmektedir. Bu ülkelerde daha çok lezzet yönünden tercih edilse de tıbbi önemi giderek artmaktadır (Wasser and Weis, 1999; Manzi ve ark, 2001).

Shiitake mantarının çok önemli biyolojik aktiviteye sahip bileşenlerinin olduğu bir çok çalışma ile gösterilmiştir. İçeriğindeki beta-glukan benzeri polisakkarit, lentinan olarak bilinmekte, mantardan sulu ekstraksiyon yöntemiyle elde edilebilmektedir. Molekül,  $\beta$ -glukandan farklı olarak,  $\beta$ -1,3 ve  $\beta$ -1,6- D glukon şeklindedir ve 3'lü sarmal yapıdadır (Bohn ve BeMiller, 1995; Manzi and Pizzoferrato, 2000). Sahip olduğu eritadenin proteini ise, 2,3-dihidroksi-4-(9- adenil-butirik) asittir ve hipokolesteromik özelliğinin keşfedilmesi ile farmakoloji alanında önemli bir yere sahiptir. Shiitake mantarı, içerdiği lentinan ve eritadenin bileşikleri yanında vitamin, D, B2, B12, yağ asitleri ve önemli mineraller ile bir çok sağlık problemlerini engelleme özelliğine sahiptir. Metanol, etanol gibi farklı metotla elde edilen ekstraktlarının antitümör, antiviral, antioksidant, antimikrobiyal ve afrodizyak etkileri ortaya çıkarılmış, hatta insan sağlığına olan faydası nedeniyle uzun yaşamın sırrı olarak anılmıştır. (Hasegawa ve ark. 2005; Choi ve ark. 2006; Enman ve ark. 2007; Hearst ve ark. 2009; Woldegiorgis ve ark. 2014). Ayrıca mantarın degradasyon yeteneğinden faydalanılarak lakkaz, peroksidad gibi ekstrasellüler enzimleri ekstrakte edilmiştir. Bu yönü ile çevre kirliliğine sebep olan atıkların

parçalanmasında ve diğer sanayi kollarında kullanılabileceği bilinmektedir (Moreira ve ark. 2000; Nagai ve ark. 2002).

Bu çalışmada, cam kavanozda gürgen talaşı ile buğday kepeği karışımından hazırlanan yetiştirme ortamında Shiitake (*Lentinula edodes*) mantarı geliştirildi ve bazı morfolojik özellikleri ile antibakteriyel performansını belirledi.

## Materyal ve Metot

### Saf kültürün elde edilmesi

Shiitake (*L. edodes*) mantarı Agroma Mantar Üretim Çiftliği'nden temin edilmiştir. Laboratuvara getirildikten sonra saf misel elde edilmesinde doku kültüründen yararlanılmıştır. Mantarın spor izleri alınmış ve sporlar MEA (Malt Ekstrakt Agar) içeren petrilere ekilmiştir. Kontaminasyonun olmadığı miseller saf kültür olarak kullanılmıştır (Kibar ve Pekşen, 2011).

### Tohumluk misel üretimi

Tohumluk misel (spawn) gelişimi için, meşe odun yongaları kullanılmıştır. Meşe odun yongalarının nemi %70'e, pH'sı 5'e ayarlandıktan sonra 250 mL'lik cam kavanozlara doldurulmuş ve kavanozlar 1,5 saat boyunca 121°C'de sterilize edilmiştir. Ardından oda sıcaklığında soğutulan kavanozlara miseller aşılacaktır. Tohumluk misel üretimi sırasında inkübasyon odasının sıcaklığı 22-26°C olarak ayarlanmıştır. Yaklaşık 1,5-2 ay sonra kavanozlarda misel gelişimi tamamlanmış, bu miseller mantar üretim çalışmasında tohumluk misel olarak kullanılmıştır.

### Mantar üretimi

Çalışmada Shiitake mantar üretiminde %75 gürgen talaş, %25 buğday kepeği karışımından hazırlanan yetiştirme ortamı kullanılmıştır (kg/kg). Karışım homojen olarak karıştırılarak %65-70 nem olacak şekilde ıslatılmıştır. Yetiştirme ortamının pH'sı kalsiyum karbonat ilave edilerek 5.5-6.0'a ayarlanmıştır. Hazırlanan yetiştirme ortamları 1,5 kg olacak şekilde kavanozlara doldurulmuş ve otoklavda 1,5 saat boyunca 121 derecede steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra 20-25°C'ye soğuyan ortamlara 50 gr misel aşılacaktır. Aşılardan sonra kavanozlar 22-26°C'de 60-80 gün boyunca karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra yetiştirme ortamları kavanozlardan çıkarılmış ve primordium oluşumu teşvik edilmiştir. Bunun için, miselle sarılmış kompostlar 0-4°C arasında 24 saat boyunca şoklanmıştır. Şoklama işlemi tamamlandıktan sonra; iklimlendirme ünitesi sıcaklığı 16-18°C'ye, nemi % 80-90'a ayarlanmış; günde 2-4 saatlik





havalandırma ve 4-8 saatlik ışık (10 lüks) ile mantar oluşumu teşvik edilmiştir (Ağaoğlu ve ark. 1991; Boztok ve Erkip, 2002; Philippoussis ve ark., 2007). Mantar ağırlığı 5 adet mantarın sapı ile birleştiği noktadan kesilerek tartılıp 5'e bölünmesiyle, sap uzunlukları, sap kalınlıkları, şapka genişlikleri ve şapka kalınlıkları ise kumpas yardımıyla ölçülüp kaydedildi ve ortalamaları alınarak hesaplandı.

### Mantar ekstraksiyonu

Hasat edilen *L. edodes* mantarları küçük parçalar halinde doğranarak parçalara ayrılmış ve -80°C'de saklanmıştır. Daha sonra dondurulup -50 °C'de vakum altında 72 saat boyunca (5 µHg) liyofilizatörde kurutulmuştur. Kurutulmuş mantardan 100 gr alınarak 1 ml'lik çözücüde (%10 DMSO) 24 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde 25°C'de bekletilmiştir. Stok filtreden geçirilerek steril edilmiştir (Barros ve ark. 2008, Oyetayo ve ark. 2009).

### Antibakteriyel aktivite tayini

Çalışmada kullanılan *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Klebsiella pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* bakteri suşları Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezinden temin edilmiştir.

Test öncesi tüm suşlar katı besiyerine (TSA- triptik soya agar) ekim yapıldıktan sonra, 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 18-24 saatlik agar plağındaki tek düşmüş kolonilerden doğrudan serum fizyolojik ile McFarland 0.5 bulanıklık ayarlanmıştır (McFarland, 1987). Yöntemde steril 96 kuyucuklu mikropklara, bakteriler için hazırlanan Mueller Hinton Broth besiyerinden konulmuştur. Daha sonra, ilk kuyucuğa konsantrasyonu hazırlanmış mantar ekstraktı solüsyonundan 50 µl olacak şekilde konularak ilk on sıra sonuna kadar çift katlı dilüsyonlar yapılmıştır. Pozitif kontrol ve negatif kontroller son iki sütuna hazırlanmıştır. Son olarak mantar ekstraktı ve antibiyotik bulunan kuyucuklara 5 µl bakteri eklenmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon öncesi (t0.saat) ve inkübasyon sonrasında (t24. saat) 600 nm'de spektrofotometrik ölçümler alınmıştır. Deneyler 3 kez tekrar edilmiş ve ortalama değerlerin yüzde inhibisyon değerleri ( $=1-(OD_{t_{24-10}}/OD_{kontrol_{24-10}})*100$ ) hesaplanmıştır. Elde edilen doğrusal eğim çizgisi üzerinden R<sup>2</sup> ve

ardından MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) hesabı yapılmıştır (Patton ve ark. 2006, Erdogan ve ark. 2017).

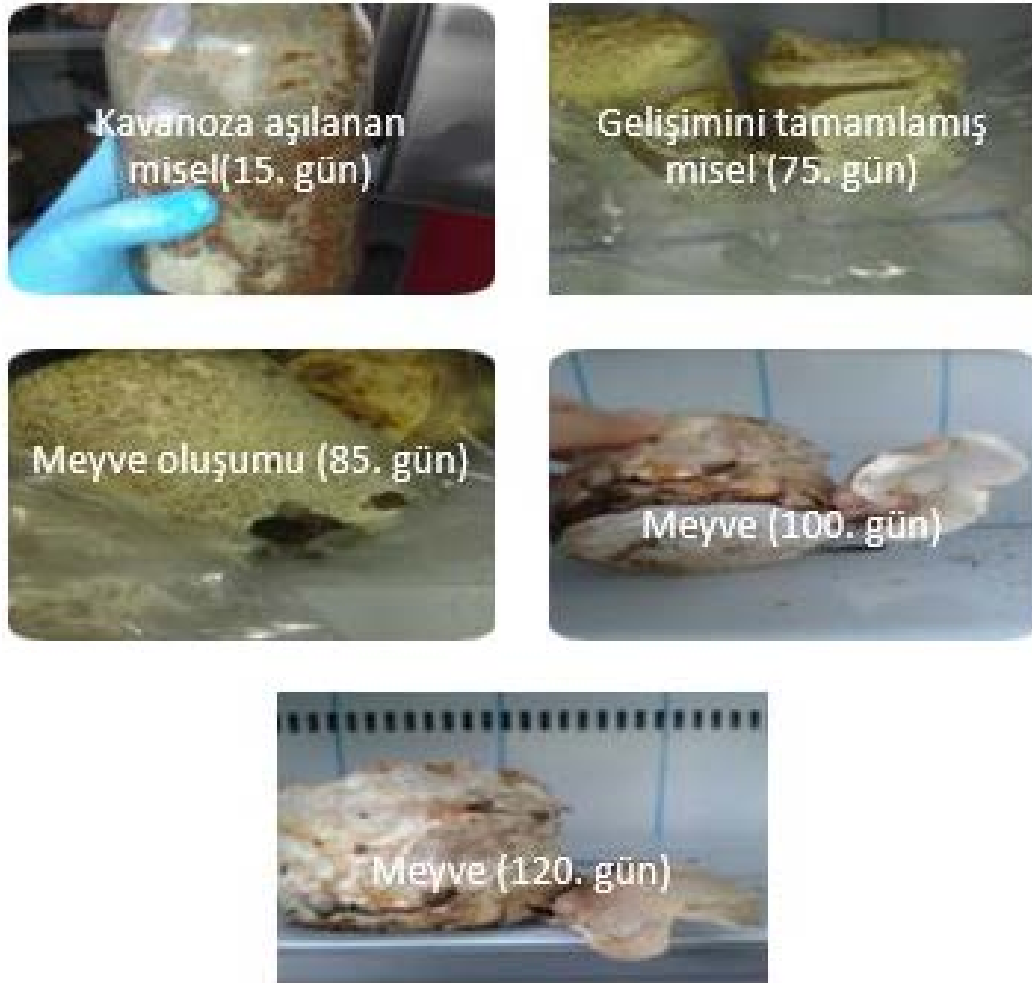
### Bulgular

Bu çalışmada, cam kavanozda gürgen talaşı ile buğday kepeği karışımından hazırlanan yetiştirme ortamında yetiştirilen Shiitake (*Lentinula edodes*) mantarının 15, 75, 85, 100 ve 120.günlük fotoğrafları gösterildi (Şekil 1). Toplanan mantarların ortalama mantar ağırlığı, 16.01 g, sap uzunluğu 28 mm, sap kalınlığı 9.01 mm, şapka genişliği 85.03 mm, şapka kalınlığı 7.96 mm olarak ölçüldü (Tablo 1).

Tüm mikroorganizmalar ampisilin pozitif kontrol antibiyotikine karşı duyarlı çıkmıştır (<12.5 µg/ml). Yapılan çalışmaya göre, en yüksek antimikrobiyal aktivite *P. aeruginosa* bakterisine karşı gözlenirken, en düşük aktivite *B. subtilis* bakterisine karşı olmuştur. Minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri *B. subtilis* için 71.28 g/ml, *K. pneumoniae* için 62.37 g/ml, *E. faecalis* için 35.6 g/ml, *E. coli* için 34.42 g/ml, *S. aureus* için 16.91 g/ml ve *P. aeruginosa* için ise 7.86 g/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 2).

### Tartışma

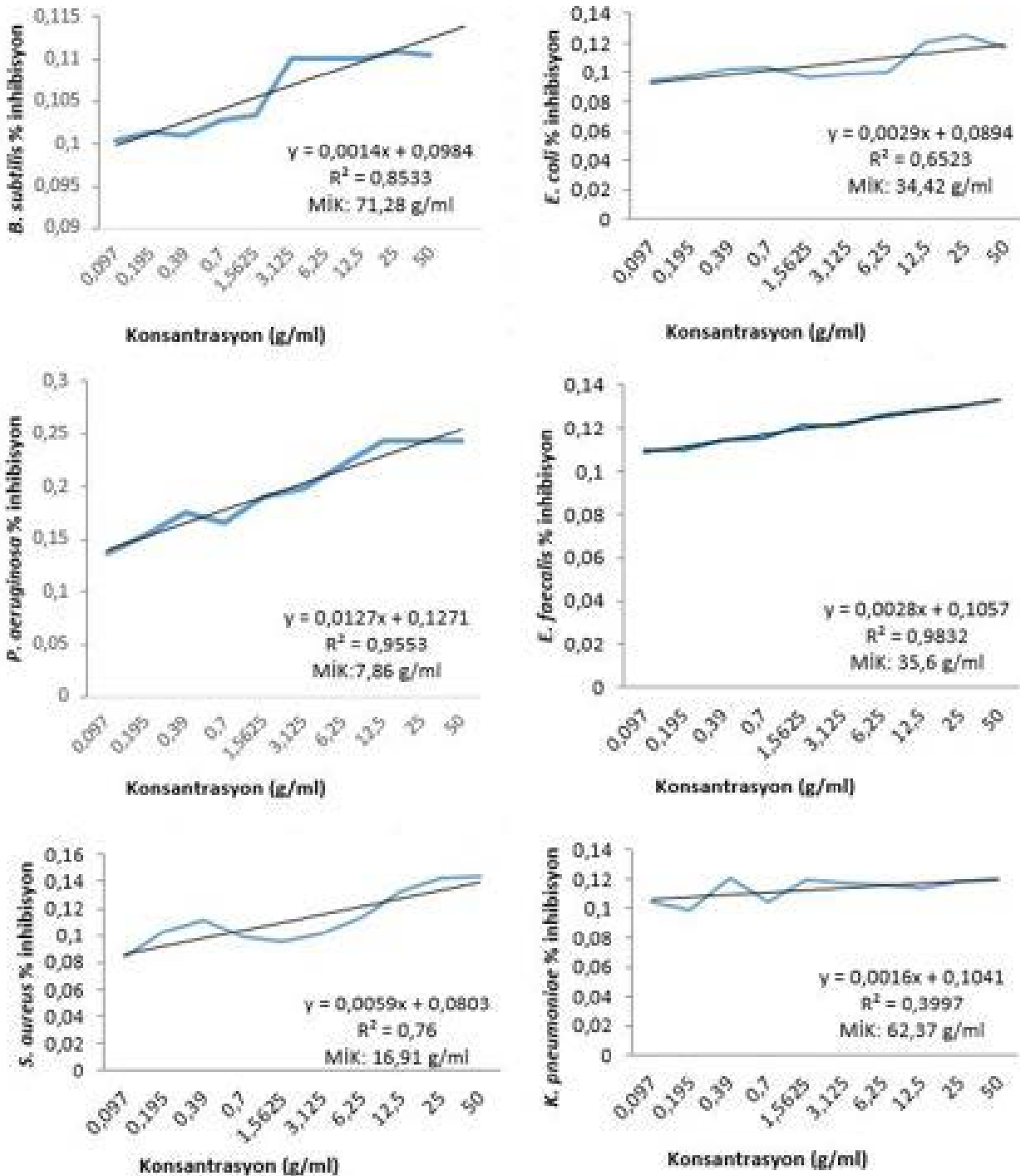
Yapılan pek çok çalışma *L. edodes* yetiştiriciliğinde kullanılan substratların mantar kalitesini etkilediğini göstermiştir. Kompost hammaddesi olarak fındık zuru ve buğday kepeğinin (1/3) kullanıldığı çalışmada (Özçelik ve Pekşen, 2006; Özçelik ve Pekşen, 2007), mantar kalite özelliklerinin oldukça yüksek olduğu bulunmuştur. Özçelik ve Pekşen (2006)'in çalışması ile bulgularımızı karşılaştırdığımızda, mantar ağırlığı (69.0 >16.01 g), sap uzunluğu (60.24 > 28 mm), sap kalınlığı (17.25 > 9.01 mm) ve şapka kalınlığı (140.46 > 7.96 mm) değerlerinin araştırmacıların bulgularına göre düşük olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, Hassan (2011)'in çalışmasına göre, zirai atıklar üzerinde geliştirilen *L. edodes* ağırlığı 17.4 g, sap uzunluğu 50 mm, sap kalınlığı 10.7 mm ve şapka kalınlığı 100 mm olarak bulunmuştur. Ayrıca, Erkip ve Boztok (2003)'ün çalışmasına göre, talaş ortamlarını sterilize ettikten sonra 0, 5, 10 ve 15 ml hidrojen peroksit uygulamanın yapıldığı ortamda gelişen *L. edodes* mantarının şapka çapının maksimum değerlerinin 90.9 mm, sap uzunluğunun ise 60.12 mm olduğu saptanmıştır.



Şekil 1. Gürge talaşı ve buğday kepeği kompostu üzerinde büyüyen bir mantarın gelişim fotoğrafları

Tablo 1. Yapılan çalışmada elde edilen mantarların bazı morfolojik özellikleri ve bunların diğer çalışmalarla kıyaslanması.

	Gürge talaşı+buğday kepeği üzerinde <i>L. edodes</i>	Fındık zurufu+buğday samanı üzerinde <i>L. edodes</i> (Özçelik ve Pekşen, 2006)	Zirai atık üzerinde <i>L. edodes</i> (Hassan, 2011)	Hidrojen-peroksitli talaş ortamında <i>L. edodes</i> (Erkip ve Boztok, 2003)
Mantar ağırlığı (g)	16.01 ± 3.02	69.00	17.4	-
Sap uzunluğu (mm)	28 ± 2.98	60.24	50	60.00
Sap kalınlığı (mm)	9.01 ± 3.89	17.25	10.7	-
Şapka genişliği (mm)	85.03 ± 6.89	-	-	90.9
Şapka kalınlığı (mm)	7.96 ± 4.01	140.46	100.4	-



Şekil 2. Spektrofotometrik broth mikrodilasyon yöntemi kullanılarak, mantar ekstraktının *Enterococcus faecalis*(ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 27853), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerine antibakteriyel inhibisyon grafikleri ve Mik değerleri



Makrofungusların doğal antimikrobiyal ajan olarak kullanılması, yeni antibiyotik ihtiyacının hızla arttığı bu yüzyılda oldukça önemlidir. Bu nedenle, mantarlardan elde edilen özütler ile ilgili çalışmalar günümüzde giderek artmaktadır (Yang ve ark., 2002; Rao ve ark. 2009). *L. edodes* ekstraktlarının bazı *P. aeruginosa*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas mevalonii*, *Klebsiella/Enterobacter sp.*, *Sphingobacterium multivorum*, *Microbacterium sp.*, *Stenotrophomonas*, *B. subtilis* gibi bakterileri güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (Rao ve ark. 2009). Ayrıca, *L. edodes* kültür ekstraktının, *B. cereus*, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* gibi gıda patojenlerini disk difüzyon yöntemine göre 3-13 mm zon aralığında inhibe ettiği gösterilirken, Gram negatif bakteriler olan *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşlarının *L. edodes*'e karşı dirençli oldukları dikkat çekmektedir. (Ishikawa, 2001). Başka bir çalışmada, süperkritik ekstraksiyon metoduna göre hazırlanan *L. edodes* örnekleri ile *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* ve *M. luteus* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal disk difüzyon testi yapılmıştır. Buna göre, *S. aureus* ve *C. albicans* suşlarının *L. edodes* ekstraksiyonlarına (40°C/30MPa, 40°C/20MPa, 30°C/15-20-30MPa) karşı oldukça dirençli oldukları tespit edilmiştir (Kitzberger ve ark. 2007). Çalışmamızda ise dirençli suş görülmemekle birlikte, mikroorganizmaların 7.84 g/ml ve 71.28 g/ml aralığında inhibe oldukları bulundu.

Yapılan bir çalışmada, *L. edodes* metanol ekstraktının *S. typhimurium* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı MİK değerlerinin 200 mg/ml olduğu belirlenmiştir (Karaca ve ark. 2017). Bu çalışmada ise mantar ekstraktının *P. aeruginosa* bakterisi üzerine MİK değeri 7.86 g/ml olarak belirlenmiştir. Başka bir çalışmada, *L. edodes* metanolik ekstraktının antimikrobiyal etkileri bizim çalışmamızla kıyaslandığında oldukça düşük bulunmuştur. Çalışmada, mantar ekstraktının MİK değerleri, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* için 3 mg/ml iken, *P. aeruginosa* için 4 mg/ml, *C. albicans* için ise 1 mg/ml olarak tespit edilmiştir (Chowdhury ve ark. 2015). *L. edodes* sulu ekstraktlarının *S. aureus*, *E. faecium* ve *E. coli* bakterilerine karşı MİK değerlerinin sırasıyla 50 mg/ml, >50 mg/ml ve >50 mg/ml olduğu belirlenmiştir (Hirasawa ve ark. 1999). Bu çalışma ile kıyaslandığında ise *S. aureus* (16.91 g/ml), *E. faecium* (35.6 g/ml) ve *E. coli* (34.42 g/ml) bakterilerinin DMSO'lu mantar ekstraktına karşı daha dirençli oldukları tespit edilmiştir. Rao ve ark (2009) *L. edodes*'in sulu ekstraktlarının *E. coli* 0157, MRSA *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* gibi çevresel patojenlere karşı inhibisyon etkisinin

yüksek olduğunu belirtmişler, bu nedenle mantarın mikrobiyal zararlılardan korunmak için önemli bir antimikrobiyal ajan olduğunu vurgulamışlardır.

Sonuç olarak, *L. edodes* ticari bir mantar olmasının yanında, biyolojik araştırmalarda kullanılacak önemli bir mantar türüdür. Bu nedenle, farklı substratlar kullanarak ve yeni metodlarla biyolojik aktivite çalışmaları için önemli bir doğal antimikrobiyal ajan özelliğine sahiptir. Ancak, daha fazla detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır.

### Teşekkürler

Bu çalışmada emeği geçen stajyer öğrencilerimiz Fatma Nur Alkan, Media Kolakan, Sema Aydın ve Havva Kırkık'a teşekkür ederim.

### Kaynaklar

- Ağaoğlu Y.S., İlbay M.E. ve Güler, M. (1991). Doğal ve Kültür Alınabilir Mantar Türleri: III. Shiitake Yetiştiriciliği. *T.C.Orm.B.Gen.Müd.*
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M. ve Ferreira, I. C. F. R. (2008). Wild and Commercial Mushrooms as Source of Nutrients and Nutraceuticals. *Food Chem Toxicol*, 46(8)2742-2747.
- Bohn, J.A. ve BeMiller, JN. (1995). (1-3)-Beta-D-Glucans as Biological Response Modifiers: A Review of Structure-functional Activity Relationships. *Carbohydr Polym*, 28: 3-14
- Boztok, K. ve Erkip, N. (2002). Plastik Torbalarda Meşe Mantarı (*Lentinula edodes*) Yetiştiriciliği. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg*, 39(3)145-152.
- Choi, Y., Lee, S. M., Chun, J., Lee, H. B. ve Lee, J. (2006). Influence of Heat Treatment on the Antioxidant Activities and Polyphenolic Compounds of Shiitake (*Lentinula edodes*) Mushroom. *Food Chem*, 99(2)381-387.
- Chowdhury, M.M.H., Kubra, K. ve Ahmed, S.R. (2015). Screening of Antimicrobial, Antioxidant Properties and Bioactive Compounds of Some Edible Mushrooms Cultivated in Bangladesh. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 14(8)1-6.
- Enman, J., Rova, U., ve Berglund, K. A. (2007). Quantification of the Bioactive Compound Eritadenine in Selected Strains of Shiitake Mushroom (*Lentinula edodes*). *J. Agric. Food Chem*, 55(4)1177-1180.
- Erdogan Eliuz, E.A., Ayas, D. ve Goksen, G. (2017). In Vitro Phototoxicity and Antimicrobial Activity of Volatile Oil Obtained from Aromatic Plants. *J Essent Oil Bear Pl*, 20(3)758-768.
- Eren, E. ve Pekşen A. (2016). Türkiye'de Kültür Mantarı Sektörünün Durumu ve Geleceğine Bakış. *Turkish Journal of Agriculture. Food Sci Tech*, 4(3) 189-196.
- Erkip, N. ve Boztok, K. (2003). Torba Kültürü Yöntemi ile *Lentinula edodes* Yetiştiriciliğinde Hidrojen Peroksit Uygulamasının Verime Etkileri. *Ege Üniv Ziraat Fak Derg*, 40(1) 1-7.



- Hassan, F.R.H. (2011). Utilization of Agro. and Agro-industrial Wastes for Cultivation of Shiitake (*Lentinula edodes*) an Edible and Medicinal Mushroom and Their Drying Aspects in Egypt. *RJABS*, 7(6)491-497.
- Hassegawa, R. H., Kasuya, M. C. M. ve Vanetti, M. C. D. (2005). Growth and Antibacterial Activity of *Lentinula edodes* in Liquid Media Supplemented with Agricultural Wastes, *Electron. J. Biotechnol*, 8(2)212–217.
- Hearst, R., Nelson, D., McCollum, G., Millar, B., Maeda, Y., Goldsmith, C., Rooney, P., Loughrey, A., Rao, J. Ve Moore, J.(2009). An Examination of Antibacterial and Antifungal Properties of Constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complement, Ther. Clin. Pract*, 15(1)5–7.
- Hirasawa, M., Shouji, N., Neta, T., Fukushima, K. ve Takada, K. (1999). Three Kinds of Antibacterial Substances from *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *Int. J. Antimicrob. Agents*, 11(2)151–157.
- Ishikawa, N.K., Kasuya, M.C.M. ve Vanetti, M.C.D. (2001). Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. *Braz. J. Microbiol.*, 32, 206- 210.
- Karaca B., Akata I. ve Cihan A.Ç. (2017). *Lentinula edodes*, *Lactarius delicious* ve *Ganoderma lucidum*'un Antibiyofilm ve Antimikrobiyal etkinlikleri. *Kastamonu Üniv.Orman Fak. Derg*, 17(4)660-668.
- Kibar B. ve Pekşen, A. (2011). Mycelial Growth Requirements of *Lactarius pyrogalus* and *Lactarius controversus*. *African J. Microbiol. Res*, 5(28)5107-5114.
- Kitzberger, C.S.G., Smania, A., Pedrosa, R.C. ve Ferreira S.R.S. (2007). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Shiitake (*Lentinula edodes*) Extracts Obtained by Organic Solvents and Supercritical Fluids. *J Food Eng*, 80, 631– 638.
- Manzi, P., Aguzzi, A. ve Pizzoferrato, L. (2001). Nutritional Value of Mushrooms Widely Consumed in Italy. *Food Chem*, 73(3)321–325.
- Manzi, P. ve Pizzoferrato, L. (2000). Beta-Glucans in Edible Mushrooms. *Food Chem*, 68(3)315–318.
- McFarland, J. (1987). Standardizasyon Bacteria Culture for the Disc Diffusion Assay. *JAm Med Assoc*, 49,1176-1178
- Moreira, M. T., Mielgo, I., Feijoo, G. ve Lema, J. M. (2000). Evaluation of Different Fungal Strains in the Decolourisation of Synthetic Dyes. *Biotechnol Lett*, 22(18)1499–1503.
- Nagai, M., Sato, T., Watanabe, Saito, K., Kawata, M. ve Enei, H. (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Appl Microbiol Biot*, 60, 327-335.
- Oyetayo, V.O., Dong, C.H. ve Yao, J. (2009). Antioxidant and Antimicrobial Properties of Aqueous Extract from *Dictyophora indusiata*. *The Open Mycol J*, 3(1)20-26
- Özçelik, E. ve Pekşen, A., Hazelnut Husk as a Substrate for the Cultivation of Shiitake Mushroom (*Lentinula edodes*). *Bioresour Technol*, *Bioresource Technology*, 98(14)2652-2658 (2007).
- Özçelik, E. ve Pekşen, A. (2006). *Lentinula edodes* Yetiştiriciliğinde Fındık Zurufundan Hazırlanan farklı Yetiştirme Ortamlarının Verim ve Bazı Mantar özelliklerine Etkileri. *OMÜ Zir. Fak. Derg*, 21(1)65-70
- Patton, T., Baret, J., Brennan, J. ve Moran, N. (2006). Use of a Spectrophotometric Bioassay for Determination of Microbial Sensitivity to Manuka Honey. *J Microbiol Methods*, 64(1)84-95.
- Philippoussis, A., Diamantopoulou, P. ve Israilides, C. (2007). Productivity of Agricultural Residues Used for the Cultivation of the Medicinal Fungus *Lentinula edodes*. *Int Biodeterior Biodegrad*, 59(3)216–219.
- Rao, J.R., Millar, B.C. ve Moore, J.E. (2009). Antimicrobial Properties of Shiitake Mushrooms (*Lentinula edodes*). *Int J Antimicrob Agents*, 33(6), 591-592.
- Royse, D. J. ve Sanchez, J. E. (2007). Ground Wheat Straw as a Substitute for Portions of Oak Wood Chips Used in Shiitake (*Lentinula edodes*) Substrate Formulae. *Bioresour Technol*, 98(11)2137–2141.
- Wasser, S.P. ve Weis, A.L.. Medicinal Properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives (Review). *Int J Med Mushrooms*, 1(1)31–62 (1999).
- Woldegiorgis, A.Z., Abate, D., Haki, G.D. ve Ziegler, G.R. (2014). Antioxidant Property of Edible Mushrooms Collected from Ethiopia. *Food Chem*, 57, 30-36.
- Yang, B.K., Kim, D.H., Jeong, S.C., Das, S., Choi, Y.S., Shin, J.S., Lee, S.C. ve Song, C.H. (2002). Hypoglycemic Effect of a *Lentinula edodes* Exopolymer Produced from a Submerged Mycelial Culture. *Biosci Biotech Bioch*, 66, 937-942.





Geliş(Received) :15/08/2018  
Kabul(Accepted) :07/11/2018

Araştırma Makalesi/Research Article  
Doi:10.30708mantar.453731

## Phylogenetic and Taxonomic Studies on *Cortinarius caerulescens* (Schaeff.) Fr. a New Record for Turkish Mycota

Ayşenur KALMER<sup>1</sup>, İsmail ACAR<sup>2</sup>, Ayten DİZKIRICI TEKPINAR<sup>3\*</sup>

\*Corresponding author: aytendizkirici@gmail.com

<sup>1,3</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Van Yüzüncü Yıl University, 65080 Van, Turkey.

<sup>1</sup>Orcid ID:0000-0001-6176-8812 / aysenurkalmer@gmail.com

<sup>3</sup>Orcid ID: 0000-0002-0578-5092/ aytendizkirici@gmail.com

<sup>2</sup>Department of Organic Agriculture, Başkale Vocational High School, Van Yüzüncü Yıl University, 65080 Van, Turkey. Orcid ID: 0000-0002-6049-4896/ iacar2011@gmail.com

**Abstract:** *Cortinarius caerulescens* (Schaeff.) Fr. was given as a new record for the Turkish macromycota from Şemdinli district of Hakkari province, Turkey. Short description of the newly reported species was given together with its photographs related to macro and micromorphologies and described briefly. In addition to macro/micro characters, DNA sequences of nrDNA ITS (Internal Transcribed spacer) and LSU (D1/D2, Large subunit) regions were used to support the recognition of the studied specimen as a new record.

**Key words:** *Cortinarius*, fungal phylogeny, ITS, LSU, new record

### Türkiye Mikotası İçin Yeni Bir Kayıt Olan *Cortinarius caerulescens* (Schaeff.) Fr. Üzerinde Filogenetik ve Taksonomik Çalışmalar

**Öz:** Bu çalışmada Hakkari ilinin Şemdinli ilçesinden *Cortinarius caerulescens* (Schaeff.) Fr. türü Türkiye makromikotası için yeni kayıt olarak verilmiştir. Türün kısa tanımı, makro ve mikromorfolojiyle ilgili fotoğraflarıyla birlikte verilir ve kısaca açıklanmıştır. Makro/mikro karakterlere ek olarak, incelenen örneğin yeni bir kayıt olarak tanınmasını desteklemek için nrDNA ITS (Transkripsiyonu yapılabilen aralayıcı bölgeler) ve LSU (D1 / D2, Büyük alt birim) bölgelerinin DNA dizileri kullanılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Cortinarius*, fungal filogeni, ITS, LSU, yeni kayıt

#### Introduction

*Cortinarius* (Pers.) Gray is a species-rich and morphologically challenging fungal genus of family Cortinariaceae within the order Agaricales. The genus is an ecologically important macrofungus due to ectomycorrhizal associations with a large range of forest trees (Stefani et al., 2014; Garnica et al., 2016). A considerable number of the species has distribution in the temperate areas of the Southern Hemisphere (Brandrud et al., 1990-2018). About 5000 published *Cortinarius* names are observed in Index Fungorum

(CABI Bioscience Databases, <http://www.indexfungorum.org>) and 116 of them have only been identified up to now in Turkey, (Sesli and Denchev, 2014; Akata et al., 2015; Güngör et al., 2015; Sesli and Moreau, 2015; Sesli et al., 2015; Sesli et al., 2016; Sesli, 2018; Sesli and Liimatainen, 2018).

The main problem within the genus is the appearance of different classification system particularly at the infrageneric level. For instance, Moser and Horak (1975) recognized the subgenera *Myxacium*, *Telamonina*, *Leproclybe*, *Phlegmacium*, *Dermocybe*, *Icterinula*,





*Sericeocybe*, *Cystogenes*, and *Paramyxa*cium whereas Moser (1983) added *Cortinarius* as subgenera and regarded *Dermocybe* as a separate genus nearly one decade later. Bidaud et al. (1994) divided the genus into the six different subgenera while several authors proposed four subgenera based on macroscopic features (Knudsen and Vesterholt, 2012; Niskanen and Kytövuori, 2012; Brandrud et al., 1990-2018). Therefore, in the present study we wanted to use not only morphological characters but also DNA sequences of two different regions to describe species and indicate taxonomic position within the genus reliably.

One of the most recognizable features of the genus is the presence of cortina that is found between the pileus and the stipe, and cinnamon brown to rusty brown spore print (Arora, 1986; Kirk et al., 2008; Uzun et al., 2013). The basidiomes of *Cortinarius* species demonstrate a remarkable variety of forms and colours (Garnica et al., 2005; Stensrud et al., 2014). Macroscopic features referring to the consistency of both pileus and stipe surface are considered as crucial characters to decide the boundaries of major divisions in *Cortinarius* (Garnica et al., 2005). The base of the stem is another valuable character for identification of *Cortinarius*. It may be more or less equal, clavate or swollen dramatically at the base that cause a rim on the basal bulb. As microscopic features, spore shape, size and the degree of ornamentation (smooth to strongly verrucose) appear useful to circumscribe clades and identification. Cystidia are almost never heard for *Cortinarius* species except *C. violaceus* which has distinct cystidia (Kuo, 2011). Interpretations of morphological characters often varied among mycologists and resulted in disagreements. Therefore, the application of the morphological species concept has led to very different results in the same groups (Brandrud et al., 1990-2018). For instance, there are too many synonyms for *Cortinarius caerulescens* (Schaeff.) Fr. such as *C. caerulescens* (Schaeff.) Fr., *Agaricus caerulescens* Schaeff., *C. cyanus* var. *caerulescens* (Schaeff.) Gray (Index fungorum, CABI Bioscience Databases, <http://www.indexfungorum.org>). *Cortinarius caerulescens* locating in the subg. *Phlegmacium* grows in woodland, mainly under *Fagus* trees in late summer and autumn. This species is not edible and characterized by a striking blue-violet cap that turns brown in the center as it matures, amygdaloid-verrucose and rusty brown spores (Breitenbach and Kränzlin, 2000; Knudsen and Vesterholt, 2008).

Recent molecular studies (Frøslev et al., 2007; Niskanen et al., 2013; Garnica et al., 2016) indicate that

there are a number of cryptic species in *Cortinarius* genus and this situation causes difficulties in the species identification within the genus when only morphological and ecological data were used. Molecular data may provide invaluable information to identify macrofungus correctly so rDNA ITS (ITS1-5.8S-ITS2) and nLSU (28S nuclear ribosomal large subunit rRNA) gene regions were used in the current study in addition to macroscopic/microscopic characters. Garnica et al. (2005; 2011) and Frøslev et al. (2007) concluded that the ITS region seems to be an appropriate marker for species level identification in *Cortinarius*. The suitability of ITS region has been indicated in many studies and the region has been proposed as barcode region for *Cortinarius* (Peintner et al. 2003; Ortega et al. 2008; Garnica et al. 2009; Garnica et al. 2011; Stefani et al. 2014; Garnica et al., 2016). In addition to the ITS region, the LSU gene located immediately downstream of the ITS was also analyzed to get more reliable results and compare usefulness of the regions. Whole length of the region was not used due to expectation of less nucleotide variations among sequences. Two hypervariable domains (D1 and D2) flanked by relatively conserved regions in most fungi were amplified and sequenced as indicated by several studies (Moncalvo et al., 2000; Peintner et al., 2004).

The purpose of this study is to describe a new record species of *Cortinarius* for Turkey based on ITS region including the gene coding the 5.8S ribosomal subunit and the D1-D2 regions of LSU.

## Material and Method

### Taxon sampling and morphological studies

The macrofungus samples were collected from Şemdinli district, Hakkari province of Turkey. Collected samples were deposited in the Fungarium of Van Yüzüncü Yıl University (VANF). During field work, specimens were photographed in situ using with a Canon (EOS 60D) camera equipped with Tokina 100 mm macro lens. Macroscopic characters (pileus, stipe, lamellae and cortina) were recorded using fresh materials. Microscopic characters (basidia, basidiospores and marginal cells) were observed in distilled water and 3% KOH solution under a Leica EZ4 stereo microscope while sections were examined under a Leica DM500 research microscope. Microscopic characters were measured with the Leica Application Suite (version 3.2.0) programme and described based on different studies (Ortega and Mahiques, 2002; Breitenbach and Kränzlin, 2000; Soop, 2014).



### DNA extraction, PCR amplification and sequencing

Genomic DNA was extracted from dried basidiomata using the CTAB method with minor modifications (Doyle and Doyle, 1987). The purity and quantity of extracted DNA were determined by using NanoDrop2000c UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific) and 0.8% agarose gel electrophoresis. DNA amplification was performed in a 25 µl volume mixture containing genomic DNA (10 ng/µl), 10X PCR Buffer, MgCl<sub>2</sub> (25 mM), dNTP mixture (10 mM), selected primer pair (10 µM), Taq polymerase (5u/µl) and sterile water. To amplify ITS (ITS1-5.8S-ITS2) and LSU (D1-D2) regions, primer pairs N-nc18S10 5'AGGAGAAGTCGTAACAAG3'/C26A 5'GTTTCTTTTCTCCGCT3' (Wen et al., 1996) and LR0R 5'ACCCGCTGAACCTAAGC3'/LR5 5'TCCTGAGGGAACTTCG3' (Vilgalys and Hester, 1990) were used, respectively. PCR products were run in a 1.0 % agarose gel and visualized by staining with Gelred dye. Positive reactions were sequenced with forward and reverse PCR primers using ABI 3730XL automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### Sequence alignment and phylogenetic analysis

Forward and reverse sequences were assembled and edited using Alibee Multiple Alignment 3.0 software from the GeneBee website ([www.genebee.msu.su/genebee.html](http://www.genebee.msu.su/genebee.html)). Ambiguous sites were checked manually and corrected by comparing the strands. One sequence of each region generated from the present study and additional sequences retrieved from NCBI were analyzed together to see phylogenetic relationships among *Cortinarius* species in the constructed tree. The sequences downloaded from NCBI were selected considering results of BLAST searches and several valuable studies (Garnica et al. 2005; Stensrud et al. 2014). *Hebeloma mesophaeum* and *H. subtortum* were chosen as outgroup taxa and these sequences were obtained from another our study that has not been published yet. All sequences were aligned with the aid of the program ClustalW (Thompson et al., 1994) and adjusted manually where it was necessary.

Prior to construction of phylogenetic tree, total nucleotide length (bp) and variable sites were calculated

using Molecular Evolutionary Genetics Analysis software (MEGA 6.0; Tamura et al., 2013). Phylogenetic tree of each studied region (ITS and LSU) was constructed using three different methods; Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP) and Neighbor Joining. The sequence data was analyzed by using the Maximum Likelihood (ML) method based on the Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993). To test branch support, bootstrap analysis was used with 500 replicates (Felsenstein, 1985). In the ML method, initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Joining and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then the topology with superior log likelihood value was selected. The Tree-Bisection-Reconnection (TBR) search method was employed with 100 random addition replications to construct the MP trees and the consensus tree inferred from 10 most parsimonious trees was used. All positions containing gaps and missing data were eliminated.

## Results

### Macroscopic and microscopic characters

**Pileus:** 50-100 mm, hemispherical when young, later convex to plane and somewhat indented in the center, surface silky-dull when dry, slimy and shiny when moist, blue-violet, later discoloring gray-ocher to pale ocher, covered with dingy white fugacious velar floccus when young, margin incurved and connecting to the stipe by a white-violet filamentous cortina when young. **Flesh:** light blue, thick in the center of the pileus, thin toward to margin. **Lamellae:** blue-violet when young, later gray-violet to ocher-brown. **Stipe:** 40-70 × 10-20 mm, cylindrical, base with a marginate bulb up to 45 mm, surface gray-violet and longitudinally fibrillose when young, later glabrescent. **Spores:** 8.8-11.5 × 5-6.5 µm, amygdaliform, weakly to moderately verrucose, yellow-brown. **Basidia:** 30-43 × 10-12 µm, clavate, with 4 sterigmata and a basal clamp. **Marginal cells:** 12-15 × 5-8 µm, basidiolate-like. **Pleurocystidia:** not seen. **Hyphae:** 2-9 µm, yellow, some septa with clamp (Figure 1). **Ecology:** Solitary to gregarious in montane hardwood forest. Under *Fagus* sp., Hakkari, Şemdinli, Durak village, 37° 24'210"N - 44° 30'661"E, 1640 m, 24.10.2014, Acar 471.

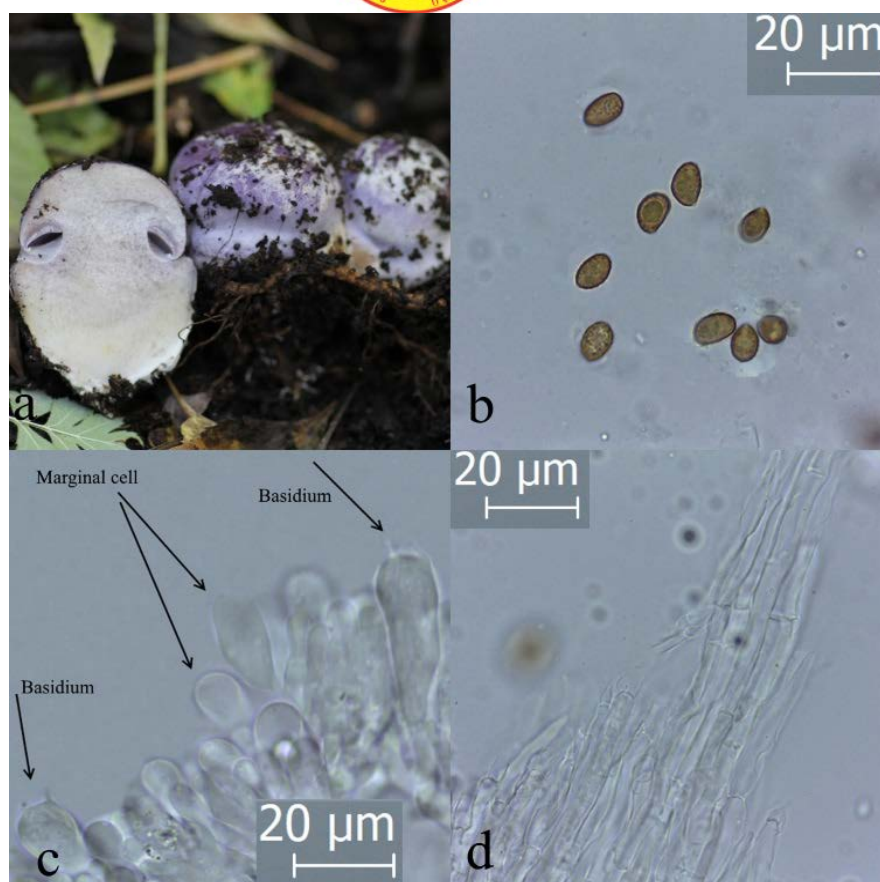


Figure 1. Macroscopic and Microscopic characters of *Cortinarius caerulescens* a. Basidiocarp b. Basidiospores (dH<sub>2</sub>O) c. Basidium and marginal cells (%3 KOH) d. Hyphae (dH<sub>2</sub>O)

### Molecular phylogeny

Accession numbers for sequences of ITS and LSU gene regions were assigned as MH718791 and MH718792, respectively. The amplified DNA fragment of the ITS region was approximately 650 bp length encompassing complete ITS1, 5.8S and ITS2 subregions. ITS data matrix comprised a total of 34 sequences including 33 from NCBI. The aligned data included a total of 675 positions, of which 481 were conserved, and 177 were variable (91 variable sites in ITS1, 2 in 5.8S and 84 in ITS2 subregion) nucleotides. The second region, LSU, comprised 23 sequences (22 from NCBI) and yielded the total lengths of 871 nucleotides with 54 nucleotide variations. The results received from ITS region were more informative compared to outcomes of LSU because of higher nucleotide variation number. LSU region is generally less variable than the ITS region and this situation may limit taxonomic resolution at the species levels and diversity analysis.

The Maximum Likelihood analysis resulted in similar phylogenetic topologies with Maximum

Parsimony and Neighbor Joining analyses so only ML tree was given to indicate phylogenetic relationships and taxonomic position of studied species and discussed. The trees constructed based on ITS and LSU regions showed no phylogenetic separation at the subgenus or section levels (Figure 2 and Figure 3).

The studied sample, *Cortinarius caerulescens*, grouped with only one of its representatives (AF389134) and several retrieved samples of *C. terpsichores* with high bootstrap value (100%) in the ITS tree (Figure 2). Intentionally, lots of *C. caerulescens* sequences were downloaded from NCBI to increase genetic diversity and figure out taxonomic position within the genus. Unexpectedly, all representatives but only one (AF389134) located in different clusters of the tree. The LSU tree showed close relationship between studied specimen and *C. terpsichores* as well (Figure 3). *Cortinarius caerulescens* and *C. terpsichores* can be distinguished from each other based on macroscopic/microscopic and ecologic characters even though phylogenetically located closely. For instance, *C. caerulescens* is generally found under *Fagus* whereas *C.*



*terpsichores* associated with primarily *Quercus* trees. Macroscopically, *C. caerulescens* has a dark blue violet cap whereas *C. terpsichores* has a light blue cap. Microscopically, they have different ornamented spores;

*C. caerulescens* has amygdaloid and verrucose spores while the other has ellipsoid ones.

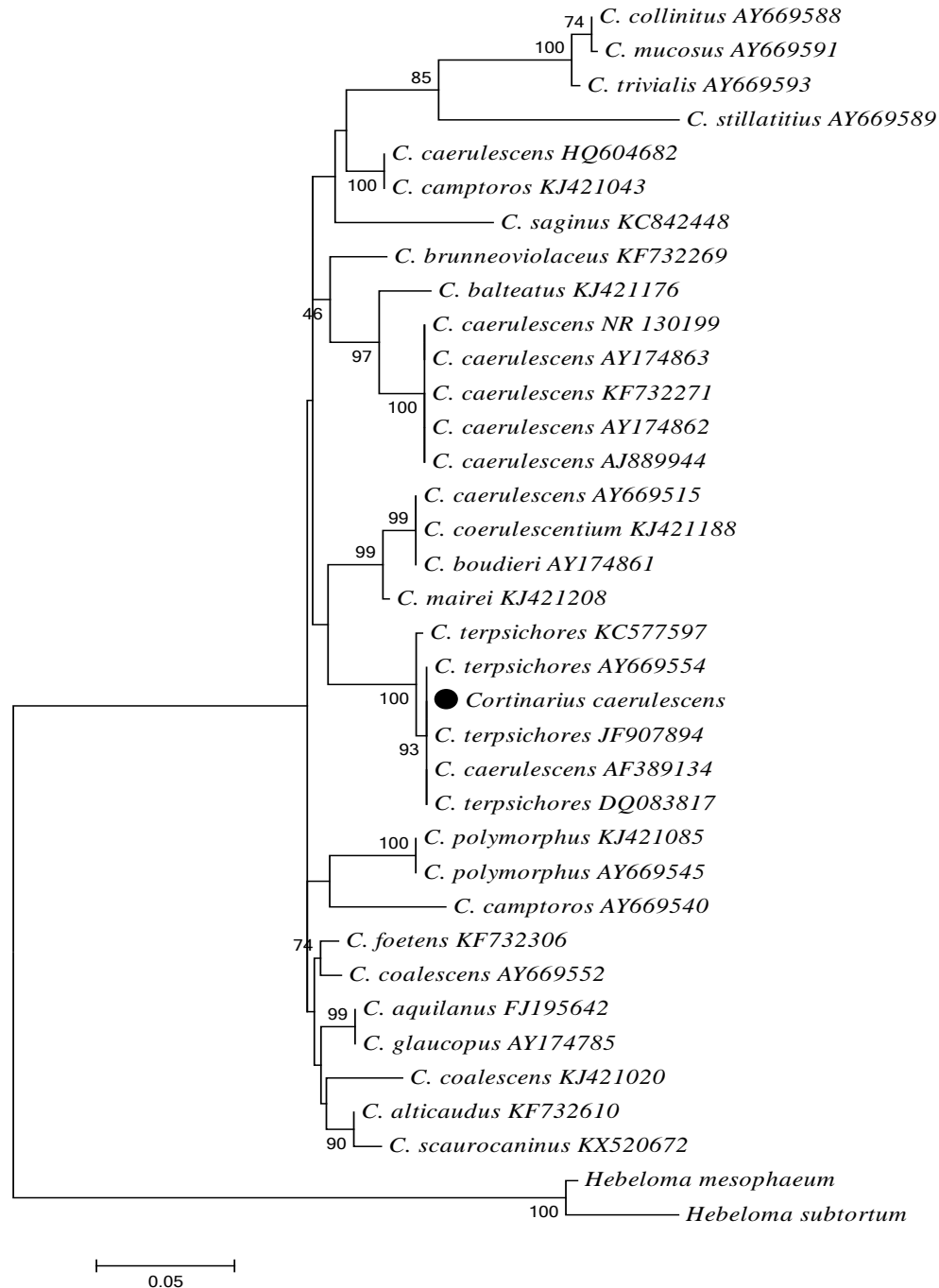


Figure 2. Phylogenetic tree of *Cortinarius* species based on ML analysis of the ITS region. Black circle indicates studied specimen. *Hebeloma subtortum* and *H. mesophaeum* were used as outgroups. Bootstrap analysis of ML was based on 500 replicates and values higher than 40% were indicated on branches.



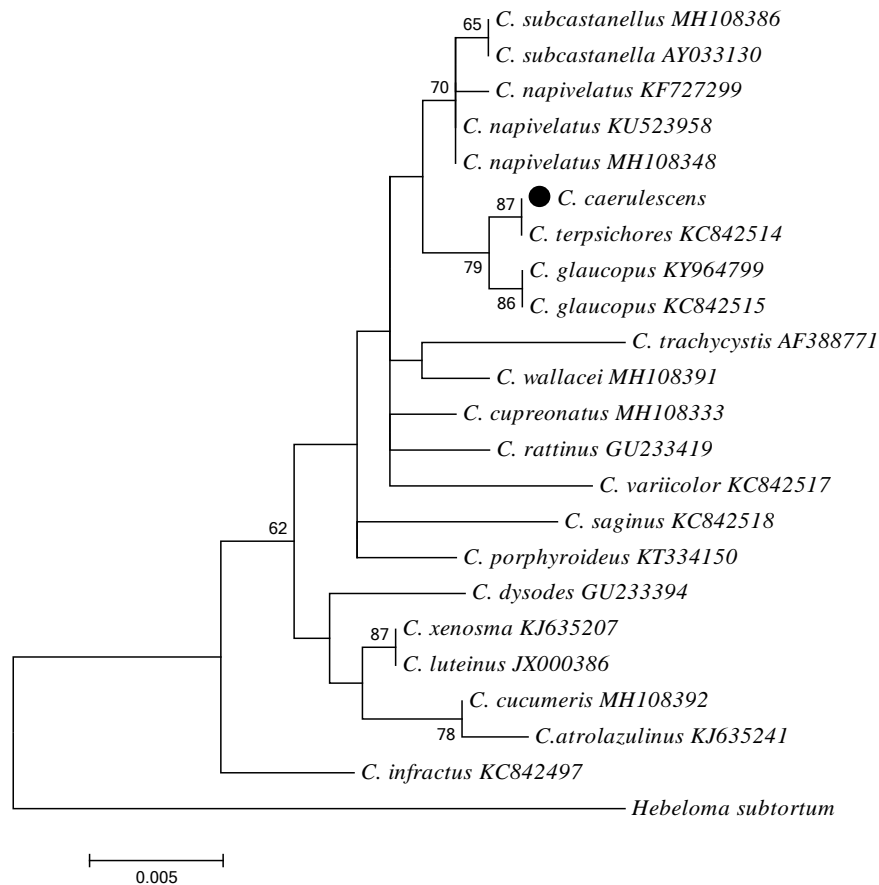


Figure 3. Phylogenetic tree of *Cortinarius* species based on ML analysis of the LSU region. Black circle indicates studied specimen. *Hebeloma subtortum* was used as outgroup. Bootstrap analysis of ML was based on 500 replicates and values higher than 40% were indicated on branches

## Discussion

Species delimitation within the *Cortinarius* genus is debatable due to high level of homoplasy and phenotypic plasticity for morphological and ecological characters. This circumstance causes poor resolution power while dividing the genus into subgenera and lower taxonomical levels. The delimitation of species based on both ITS and LSU sequences may not be enough to determine boundaries of *Cortinarius* so not only DNA sequences but also morphological features must be used to resolve boundaries of *Cortinarius* species correctly. The tree constructed based on DNA sequence of ITS region was more informative than the tree constructed by DNA sequence of LSU region due to presence of more nucleotide variation in ITS region. Similar situation was also proved by several researchers (Garnica et al., 2005; Schoch et al., 2012)

*Cortinarius caerulescens* belongs to subgenus *Phlegmacium*, and this subgenus is proved to be polyphyletic by several studies (Peintner et al., 2004; Garnica et al., 2005; Liimatainen et al., 2014). Our results supported this phenomenon; some species belonging different subgenus located within samples of subgenus *Phlegmacium* in the both trees. Some *Cortinarius caerulescens* samples downloaded from NCBI located distantly to each other in the ITS tree and our sample grouped with only one of representatives (AF389134). According to Garnica et al. (2016), *Cortinarius* is a complex genus and has many cryptic species which need both molecular and morphological data for correct identification. *Cortinarius caerulescens* is one of the complex species that needs detailed morphological and molecular analyses for reliable identification. So, we used both morphological and molecular data for correct identification of the species.



Interestingly, *C. caerulescens* and *C. terpsichores* grouped together in both ITS and LSU trees with 100% and 87% bootstrap values, respectively. Formerly, *Cortinarius caerulescens* sensu Marchand, Moser, NCL (1960) was accepted as synonym with *C. terpsichores* but the sample used for comparison was not holotype (*Cortinarius caerulescens* (Schaeff.) Fr. 1838 is holotype) one so these two species are not accepted as synonymous and showed red line in Index Fungorum database. These two species have different morphological and ecological properties. *Cortinarius caerulescens* grows in broad leaf forest (primarily *Fagus*) whereas *C. terpsichores* grows primarily with *Quercus* (sometimes also with *Pinus*). Macroscopically, *Cortinarius caerulescens* has a dark blue violet cap whereas *C. terpsichores* has a light blue cap. Microscopically, they have different ornamented spores; *C. caerulescens* has amygdaloid and verrucose spores and the other has ellipsoid ones. Furthermore, *C. caerulescens* has a thick a whitish filamentous cortina forming whitish remnants at bulb margin of young species.

We tried to mention the importance of not only molecular data but also morphological one considering the enormous diversities and cryptic species within the genus *Cortinarius*. Especially, close phylogenetic relationship between *C. caerulescens* and *C. terpsichores* proved that only molecular or morphological data may not be enough to determine species and resolve phylogenetic relationship within the tree.

## References

- Akata, I., Kabaktepe, Ş. and Akgül, H. (2015). *Cortinarius caperatus* (Pers.) Fr., A New Record for Turkish Mycobiota. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 15(1), 86-89.
- Arora, D. (1986). *Mushrooms demystified*. ten speed press: Berkeley, CA.
- Bidaud, A., Moëgne-Loccoz, P. and Reumaux, P. (1994). *Atlas des Cortinaires*. Cle generale des sousgenres, sections et series. Ed. Fédérat. Mycol. Dauphiné-Savoie.
- Brandrud, T.E., Lindström, H., Marklund, H., Melot, J. and Muskos, S. (1990-2018). *Cortinarius, Flora Photographica*. Vol. 1-5 (English version). Hännösand.
- Breitenbach, J. and Kränzlin, F. (2000). *Fungi of Switzerland*. Vol.5, Verlag Mykologia, Lucerne, Switzerland.
- 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.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.
- Frøslev, T.G., Jeppesen, T.S., Læssøe, T. and Kjøller, R. (2007). Molecular phylogenetics and delimitation of species in *Cortinarius* section *Calochroi* (Basidiomycota, Agaricales) in Europe. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44: 217–227.
- Garnica, S., Weiß, M, Oertel, B. and Oberwinkler, F. (2005). A framework for a phylogenetic classification in the genus *Cortinarius* (Basidiomycota, Agaricales) derived from morphological and molecular data. *Canadian Journal of Botany*, 83: 1457–1477.
- Garnica, S., Weiß, M., Oertel, B., Ammirati, J.F. and Oberwinkler, F. (2009). Phylogenetic relationships in *Cortinarius*, section *Calochroi*, inferred from nuclear DNA sequences. *BMC Evol Biol*, 9:1.
- Garnica, S., Spahn, P., Oertel, B., Ammirati, J. and Oberwinkler, F. (2011). Tracking the evolutionary history of *Cortinarius* species in section *Calochroi*, with transoceanic disjunct distributions. *BMC Evol Biol*. 11:213.
- Garnica, S., Schön, M.E., Abarenkov, K., Riess, K., Liimatainen, K., Niskanen, T., Dima, B., Soop, K., Frøslev, T.G., Jeppesen, T.S., Peintner, U., Kuhnert-Finkernagel R., Brandrud, T.E., Saar, G., Oertel, B. and Ammirati, J.J. (2016). Determining threshold values for barcoding fungi: lessons from *Cortinarius* (Basidiomycota), a highly diverse and widespread ectomycorrhizal genus. *FEMS Microbiol Ecol*. 2016;92(4). fiw045.
- Güngör, H., Solak, M.S., Allı, H., Işiloğlu, M. and Kalmış, E. (2015). New records for Turkey and contributions to the macrofungal diversity of Isparta Province. *Turk J Bot*, 39: 867-877.
- Index fungorum, CABI Bioscience Databases, <http://www.indexfungorum.org> (last accession: 03.06.18)





- Kirk, P.F., Cannon, P.F., Minter, D.W. and Stalpers, J.A. (2008). *Dictionary of the fungi*, 10th ed. CAB International. Wallingford, UK.
- Knudsen, H. and Vesterholt, J. (2008). *Funga Nordica*, 2nd edition, Nordsvamp, Copenhagen, 2. vols, 1083 pp.
- Knudsen, H. and Vesterholt, J. (2012). *Funga Nordica*, 2nd edition, Nordsvamp, Copenhagen, 2. vols, 1083 pp.
- Kuo, M., *The genus Cortinarius*. Retrieved from the MushroomExpert.Com Web site: <http://www.mushroomexpert.com/cortinarius.html> (last accession: 03.06.18)
- Liimatainen, K., Niskanen, T., Dima, B., Kytövuori, I., Ammirati, J.F. and Frøslev, T.G. (2014). The largest type study of Agaricales species to date: bringing identification and nomenclature of Phlegmacium (Cortinarius) into the DNA era. *Persoonia*, 33, 98–140.
- Moncalvo, J.M., Lutzoni, F.M., Rehner, S.A. and Vilgalys, R. (2000). Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Syst Biol*, 49, 278–305.
- Moser, M. and Horak, E. (1975). Cortinarius Fr. und nahe verwandte Gattungen in Südaamerika. Beihefte zur. *Nova Hedwigia*, 52: 1–628, 116 plts., 20 color plts.
- Moser, M. (1983). Die Röhrlinge und Blätterpilze. In *Kleine Kryptogamenflora*, Band II b/2. 5th ed. Edited by H. Gams. G. Fischer, Stuttgart.
- Niskanen, T. and Kytövuori, I. (2012). *Key F: subgenus Telamonia sects Bovini, Illumini, Saturnini, Sciophylli, Subbalaustini and Sordescentes*. In: Knudsen H, Vesterholt J, editors. *Funga Nordica*, 2nd revised edition. Agaricoid, Boletoid, Clavarioid, Cyphelloid and Gastroid Genera. Copenhagen, Denmark: Nordsvamp Press, pp. 847-856.
- Niskanen, T., Liimatainen, K. and Ammirati, J.F. (2013). Five new *Telamonia* species (Cortinarius, Agaricales) from Western North America. *Botany*, 91: 478-485.
- Ortega, A. and Mahiques, R. (2002). Study of some species of the genus *Cortinarius*, section *Caerulescens* (R. Henry) ex Moëne-Locoz & Reumaux in peninsular Spain. *Mycotaxon*, 83: 435-445.
- Ortega, A., Suarez-Santiago, V.N. and Reyes, J.D. (2008). Morphological and ITS identification of *Cortinarius* species (section *Calochroi*) collected in Mediterranean *Quercus* woodlands. *Fungal Divers*, 29: 73-88.
- Peintner, U., Moser, M.M., Thomas, K.A. and Manimohan, P. (2003). First records of ectomycorrhizal *Cortinarius* species (Agaricales, Basidiomycetes) from tropical India and their phylogenetic position based on rDNA ITS sequences. *Mycol Res*, 107 (4): 485–494.
- Peintner, U., Moncalvo, J.M. and Vilgalys, R. (2004). Toward a better understanding of the infrageneric relationships in *Cortinarius* (Agaricales, Basidiomycota). *Mycologia*, 96:5, 1042-1058.
- Schoch, C.L., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., and Chen, W. (2012). *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109, 6241–6246.
- Sesli, E. and Denchev, C.M. (2014). *Checklists of the myxomycetes, larger ascomycetes, and larger basidiomycetes in Turkey*. 6th edn. *Mycotaxon Checklists Online*. 1-136. (<http://www.mycotaxon.com/resources/checklists/sesli-v106-checklist.pdf>)
- Sesli, E. (2015). *Cantharellus ianthinoxanthus* (R.Maire) Kühner (Cantharellaceae) ve *Cortinarius rubicundulus* (Rea) A.Pearson (Cortinariaceae), Türkiye mikotası için iki yeni kayıt. II. *Ulusal Mikoloji Günleri*, İstanbul, Türkiye, 9-11 September, 1 (1):1-1.
- Sesli, E. and Moreau, P.A. (2015). Taxonomic studies on some new fungal records from Trabzon, Turkey. *Turk J Bot*, 39(5), 857-866.
- Sesli, E., Türkekel, İ., Akata, I. and Niskanen, T. (2016). New records of Basidiomycota from Trabzon, Tokat, and İstanbul provinces in Turkey. *Turk J Bot*, 40: 531-545.
- Sesli, E. (2018). *Cortinarius* ve *Lyophyllum* cinslerine ait yeni kayıtlar, *Mantar Dergisi*, 9:18-23.



- Sesli, E. and Liimatainen, K. (2018). *Cortinarius conicoumbonatus* (*Cortinarius* subgen. *Telamonia* sect. *Hinnulei*): a new species from spruce-beech forests of the East Black Sea Region of Turkey. *Turk J Bot*, 42:327-334.
- Soop, K. (2014). *Cortinarius in Sweden I + II*. 14. edition. Editions scientrix. Sweden.
- Stefani, F.O.P., Jones, R.H. and May, T.W. (2014). Concordance of seven gene genealogies compared to phenotypic data reveals multiple cryptic species in Australian dermocyboid *Cortinarius* (Agaricales). *Mol Phylogenet Evol*, 71:249-60.
- Stensrud, O., Orr, R.J.S., Roberg, K.R., Schumacher, T. and Hoiland, K. (2014). Phylogenetic relationships in *Cortinarius* with focus on North European species. *Karstenia*, 54: 57–71.
- Tamura, K. and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, 10: 512–526.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipksi, A.M. and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, *Mol. Biol. Evol*, 30(12): 2725–2729.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994). Clustal W improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22: 4673–4680.
- Uzun, Y., Acar, İ., Akata, I. and Akçay, M.E. (2013). Three new records for Turkish *Cortinarius* from Bingöl province. *Biological Diversity and Conservation*, 6 (3): 160-163.
- Vilgalys, R. and Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol*, 172: 4239-4246.
- Wen, J. and Zimmer, E.A. (1996). Phylogeny and Biogeography of *Panax* L. (the Ginseng Genus, Araliaceae): Inferences from ITS Sequences of Nuclear Ribosomal DNA, *Mol Phylogenet Evol*, 6:167–177.



Geliş(Received) :18/10/2018  
Kabul(Accepted) :12/12/2018

Araştırma Makalesi/Research Article  
Doi:10.30708mantar.471952

## Düz kır Mağarasının (Niğde, Aladağlar) İçi ve Dışından Alınan Toprak Örneklerinde *Cryptococcus neoformans* ve *Histoplasma capsulatum* Varlığının Araştırılması

Özlem ABACI GÜNYAR<sup>1\*</sup>, Ayşegül YOLTAŞ<sup>2</sup>,  
Mustafa YAMAÇ<sup>3</sup>, Alev HALİKİ UZTAN<sup>4</sup>  
Sorumlu yazar:ozlemabaci@yahoo.com

<sup>1,2,4</sup>Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ABD,  
Bornova-İzmir/TÜRKİYE

<sup>1</sup>Orcid ID: 0000-0002-4033-1862/ ozlemabaci@yahoo.com

<sup>2</sup>Orcid ID: 0000-0003-3115-0346/ ayoltas@gmail.com

<sup>4</sup>Orcid ID: 0000-0001-9246-5232/ alev.haliki@gmail.com

<sup>3</sup>Osmangazi Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 26480 Meşelik Kampüsü /  
Eskişehir/TÜRKİYE Orcid ID: 0000-0002-7262-0036/ myamac@ogu.edu.tr

**Öz:** Mağaralar, karanlık, düşük sıcaklık ve yüksek neme sahip ortamlar olup, organik madde girdisinin olmaması gibi koşullar nedeni ile çoğunlukla ekstrem ortamlar olarak tanımlanır. Bu ekstrem koşullar nedeni ile mağaraların mikrobiyal çeşitliliğini başlıca enerji kaynağı olarak indirgenmiş inorganik bileşikler kullanabilen kemolitotrofik mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Ancak insanlar aracılığı ile mağaralara yabancı mikroorganizmaların taşınması ve insan kaynaklı organik maddelerin mağaralara girişi sonucunda da mağaraların doğal biyolojik özellikleri bozulmaktadır. Bunun yanında mağaraların başta yarasalar gibi kanatlı memelilerin dışkıları olmak üzere doğal faunayı oluşturan hayvanların artıkları *Cryptococcus neoformans* ve *Histoplasma capsulatum* gibi birçok patojen organizma için uygun kolonizasyon ortamını oluşturmaktadır. Bu maya türünün insanlarda direkt temas veya solunum yolu ile bulaştığında ciddi hastalıklara yol açtığı düşünüldüğünde, bu mağarayı herhangi bir amaçla ziyaret eden bireyler için tehlike arz edeceği açıktır. Bu nedenle çalışmamızda Niğde'de bulunan Düz kır Mağarasının içinden ve dışından alınan toprak örneklerinde *Cryptococcus neoformans* ve *Histoplasma capsulatum* varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Mağara içine ait toprak örneklerinin birinden *Cryptococcus* genusuna ait bir izolat elde edilmiş, izolatın fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılarak tanısı doğrulanmıştır. Ancak *Histoplasma capsulatum* saptanmamıştır. Ayrıca çalışmamız ülkemizde mağara toprak örneklerinden *Cryptococcus neoformans* izolasyonu ile ilgili ilk çalışma olması açısından önem arz etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, mağara mikrobiyolojisi



## Investigation of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* in soil samples taken from inside and outside of Düzkir Cave (Niğde, Aladağlar)

**Abstract:** Caves are defined as extreme environments because of they are dark, in low temperatures and high in humidity and they lack the entries of organic materials. Due to these extreme conditions, the microbial diversity of caves is composed of chemolithotrophic microorganisms that can use reduced inorganic compounds as their energy source. However, the natural biological properties of caves are deteriorating because of the entrance of new microorganisms and human related organic matters due to humans. Besides this, caves are appropriate colonization environments for pathogenic microorganisms such as *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum*. Since the natural fauna of caves involve winged mammals such as bats and the faeces of these animals. Since this yeast is known to be causing serious health problems by direct contact or inhalation, it is clear that it will possess a risk for people who with any purpose visits these caves. For this reason, this study aims to determine the presence of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* in inside and outside of the soils of Duzkir Cave. As a result of this study, one isolate of *Cryptococcus* species was acquired from one of the soil samples taken from inside the cave and it is confirmed as *C. neoformans* by using phenotypical and genotypical methods. However, *Histoplasma capsulatum* was not detected. The presented study is the first study involving *Cryptococcus neoformans* isolation from cave soil samples in Turkey.

**Key words:** *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, cave microbiology

### Giriş

Mağaralar, yüzeyin altında, alacakaranlık bölgesinin ötesine uzanan ve insanların kullanımına açık olan doğal boşluklardır. Mağara ekosistemleri düşük sıcaklık, yüksek nem, daimi karanlık, organik madde girdisinin olmaması gibi koşullar sebebiyle çoğunlukla ekstrem ortamlar olarak tanımlanır. Bu ortamda yaşayan organizmalar genellikle kemolitotrofik ve bu ekstrem koşullara uyum sağlamış organizmalardır. Mağara mikrobiyotası aşırı açlığa adaptasyonlarıyla birlikte, önemli biyomolekülleri barındırma potansiyeline sahiptirler. Benzer ortamlar, yakıt için verimli etanol üretimine, çevre dostu kağıt işleme için enzimlerin üretimini sağlayan mikroorganizmaları barındırmaktadır. Mağara mikroorganizmaları aynı zamanda çok sayıda antibiyotik ve kanser tedavi ajanları üretimi potansiyeline sahiptir (Barton, 2006; Kumaresan ve ark., 2014; Wu ve ark., 2015; De Mandal, 2017; Yasir, 2018).

Bunun yanı sıra mağaralar öncelikle sportif, turistik ya da bilimsel amaçlarla insanlar tarafından ziyaret edilmektedir. ABD'de her yıl yaklaşık 2 milyon insanın milli parklarda bulunan mağaraları ziyaret ettiği belirtilmektedir. Mağaralara giren insanlar nedeniyle mağaraların izolasyon bariyeri yok edilir ve bu da mağara

habitatının dengesinin bozulmasına neden olur. Bu şekilde mağaralar bazı bakteri, filamentli fungus veya mayaların varlığı ve büyümesi için uygun çevresel koşullara sahip olmaktadır. *Cryptococcus neoformans* ve *Histoplasma capsulatum* nedeni ile meydana gelen hastalıklar mağara ile ilişkili en yaygın hastalıklar olarak belirtilmektedir. Özellikle kanatlı dışkıları *Cryptococcus neoformans* ve yarasa dışkıları ise *Histoplasma capsulatum* için uygun kolonizasyon ortamını oluşturmaktadır. Bu da insanlara temas ederek veya solunduğunda bulaşabilir ve ciddi hastalıklara yol açabilir (Bastian ve ark., 2010; Jurado ve ark., 2010; Igreja, 2011; Candiroglu ve Dogruoz Gungor, 2017).

Çalışmamızın amacı Aladağlar bölgesinde yer alan Düzkir mağarasında insan sağlığı için risk oluşturabilecek *C. neoformans* ve *H. capsulatum* varlığının araştırılmasıdır.

### Materyal ve Metot

**Mağara Bilgileri ve Çalışma Materyali:** Bu çalışmada Niğde ilinde bulunan ve giriş ağızı deniz seviyesinden 3344 metre yükseklikte olan Düzkir Mağarasının çeşitli noktaları (C1-C5) ve Aladağların



çeşitli yüksekliklerinden (D1-D5) alınmak üzere toplam 10 toprak örneği çalışma materyali olarak kullanılmıştır.

### **Cryptococcus neoformans Varlığının**

**Araştırılması:** Toprak örnekleri seyreltme plaka tekniği ile analize alınmıştır. İzolasyonda besiyeri olarak Sun Flower Seed (*Helianthus annuus*) Agar kullanılmış, petriler 30° C'de 30 gün inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi boyunca günlük olarak kontrol edilmiştir. Kahverengi-koyu kahverengi pigmentli maya benzeri koloniler saflaştırılmıştır (Cermeño ve ark., 2006).

### **Maya İzolatının Biyokimyasal Yöntemler ile**

**Tanısı:** *C. neoformans* olduğu düşünülen izolatların biyokimyasal tanısı için API test kitlerinden ID 32C maya tanılama kiti kullanılmıştır.

### **Maya İzolatının Genotipik Tanısı:**

DNA izolasyonu Liu ve ark. tarafından uygulanan yöntemde bazı modifikasyonlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Liu ve ark., 2000). Nüklear ribozomal DNA ITS1- 5.8-ITS2 (ITS) bölgesi ITS1ve ITS4 primerleri ile amplifiye edilmiştir (Leaw ve ark., 2006).

Çalışmamızda amplifiye edilmiş ITS bölgesi baz sırası tayini İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda yaptırılmıştır. Elde edilen veriler Finch TV (Blast) ve Ap E programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Tür tayini araştırmacıların kullanımına açık olan Gen Bankası'nın <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> web sayfasında, nükleotid dizisinin kıyaslanarak benzerliklerin incelenmesi ile yapılmıştır.

### **Histoplasma capsulatum varlığının**

**araştırılması:** Seyreltme plaka tekniği ile analize alınarak Sun Flower Seed (*Helianthus annuus*) Agara aktarılan toprak örnekleri, 30° C' de 2 ay inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi boyunca günlük olarak kontrol edilmiştir. Üreyen küf kolonilerinden selofan bant tekniği kullanılarak hazırlanan prepartlarda karakteristik tüberküllü makrokonidya varlığı araştırılmıştır (Cermeño ve ark., 2006).

### **Bulgular**

#### **Cryptococcus neoformans ve Histoplasma**

**capsulatum varlığının araştırılması:** Sun Flower Seed Agar' da üreyen kahverengi-koyu kahverengi pigmentli maya benzeri koloniler, bu renge ve mikroskopik morfolojisine dayanarak *C. neoformans* olarak düşünülmüş ve saflaştırılmıştır. İncelenen örneklerden

mağara içinden alınan C5 No'lu örnekte  $1 \times 10^1$ cfu/g *C. neoformans* kolonisi saptanmıştır. Ancak *Histoplasma capsulatum* izolasyonu yapılamamıştır.

### **Maya İzolatının Biyokimyasal Yöntemler ile**

**Tanısı:** İzolatın ileri biyokimyasal tanısı amacıyla, API test kitlerinden ID 32C maya tanılama kiti kullanılmıştır. Mağara iç ortamından izole edilen C5 nolu izolatın biyokimyasal testler ile *C. neoformans* olduğu saptanmıştır.

### **Maya İzolatının Genotipik Tanısı:**

Moleküler identifikasyon için ITS bölgesi dizi analizi yapılmıştır. Sonuç olarak izolatımız *C. neoformans* olarak doğrulanmıştır. İlgili dizi GenBank' ta MH973850 erişim numarası ile depolanmıştır.

### **Tartışma**

Mağaralar fotosentezin olmadığı çoğu besin maddesinin sadece giriş zonunda bulunduğu besin yönünden fakir ortamlardır. Bu ekstrem koşullarda yaşayan mikroorganizmalar büyük öneme sahiptir. Örneğin, Schabereiter-Gurtner ve ark. (2002) İspanya' daki Altamira Mağarasından eski tarih öncesi resimlerinin bozulmasına neden olan mikroorganizmalar izole edip tanımlamışlardır. Bu çalışma mikroorganizmaların bu resimlerin parçalanmasındaki rolleri ve ardından korunması için alınacak önlemlerin anlaşılmasına ve kalsit biriktiren karbonat yüzeylerde kolonize olabilen organizmaların tanımlanmasına olanak sağlamıştır (Schabereiter-Gurtner ve ark. 2002). Benzer şekilde, Carlsbad Mağaraları içinde, plastiklerin üretiminde yer alan ve tehlikeli çevresel kirleticiler olan benzotiyazol ve benzeazülfonik asit gibi kompleks aromatik bileşikler parçalayabilen yeni bir mikroorganizma türü tanımlanmıştır. Bu şekilde mikroorganizmaların kirlenmiş ortamlara inokülasyonu ile bu tür kirleticilerin hızlı bir şekilde bozulması ve doğal remediasyonu sağlanmış olur (Barton, 2006).

Mağara mikrobiyotası aşırı açlığa adaptasyonlarıyla birlikte, önemli biyomolekülleri barındırma potansiyeline sahiptir. Mağara mikroorganizmaları çok sayıda antibiyotik ve kanser tedavi ajanları üretim potansiyeline sahiptir (Barton, 2006; Kumaresan ve ark., 2014; Wu ve ark., 2015; Mandal, 2017; Yasir, 2018).

Mağara mikrobiyotası ayrıca tüberküloz gibi enfeksiyöz ajanlar ve insan ve mağara kriketlerinin parazitlerini ve yarasalarda beyaz burun sendromuna neden olan *Pseudogymnoascus destructans* gibi yıkıcı invaziv mikroorganizmaları içermektedir (Reynolds and





Barton, 2014). Farklı mağara çalışmalarında birçok *Actinobacteria* türünün izole edildiği bildirilmiştir. Özellikle, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Streptomyces* ve *Rhodococcus*'a ait çeşitli türler tespit edilmiştir (Jurado ve ark., 2010). Bu türlerin farklı cilt, akciğer veya beyin enfeksiyonlarına neden olduğu bilinmektedir. Bu bakterilerin neden olduğu hastalıklar öncelikle immün sistemi baskılanmış hastalarda bildirilmiş olsa da, bağışıklık sistemi zarar görmemiş olan kişileri de enfekte edebilmeleri mümkündür. Mağaralarda potansiyel turizm tehlikelerini tespit etmek için yapılan çalışmalarda mağaraların henüz bilinmeyen ve fırsatçı mikroorganizmaların varlığı olasılığı nedeniyle mağara ziyaretçileri için potansiyel bir tehlike oluşturduğunu bildirilmiştir (Igreja 2011; Vanderwolf ve ark., 2013; Wu ve ark., 2015; Yasir ve ark., 2018; Mandal ve ark., 2017).

Yarasa biyologları, speleologlar ve turistlerde bazen mağaraları ziyaret ettikten sonra ateş öksürük gibi semptomların geliştiği görülmüştür. Kuzey ve Latin Amerika'nın yarasa mağaralarında yapılan çalışmalarda yaygın olarak *Histoplasma capsulatum* nedeni ile gelişen pulmoner bir hastalık olan histoplazmoz görülmektedir (Igreja, 2011; Zhang ve ark., 2018).

Yine mağara mikrobiyomu içerisinde sık rastlanan *Cryptococcus neoformans* ve *C. gattii* türleri fungal insan patojenleridir. İnsanların, akciğer alveollerine yerleşecek kadar küçük olan basidiyosporların inhalasyonu ile hastalığa neden olmaktadır. Organizma akciğerlerden merkezi sinir sistemine yayılarak meningoensefalite neden olmaktadır (Nielsen ve ark., 2007; Velagapudi, 2009; Botts ve Hull, 2010; Watkins ve ark., 2017). Mağara toprağı mineral içerikleri yönünden farklılıklar gösterse de içerdiği organik materyalin azlığı nedeni ile kriptokokların üremesi için uygun değildir. Hatta mağaralardan mayaların izolasyonu nadiren gerçekleşmiştir. Ancak güvercin dışkısının önemli rolü olduğu kabul edilmesine rağmen yarasalar da dahil olmak üzere yabani kuş ve hayvanların dışkısı, *Cryptococcus neoformans* ve *Cryptococcus gattii* gibi tıbbi açıdan önemli mayaları içerir ve mağaralardan da izole edildiğini gösteren çalışmalar vardır (Montagna ve ark., 2003; Nielsen, 2007; Chowdhary ve ark., 2011; Escandón ve Castañeda, 2015).

Mağara mikroorganizmaları ve diğer canlılar hakkında farklı bilimsel veriler elde etmek çok önemlidir. Bu konu da dünyada yürütülmüş çalışmaların çoğu son yirmi yıla ait olmakla beraber bu konu ile ilgili çalışmalar son on yılda hız kazanmıştır. Türkiye'de ise mağara mikrobiyolojisi ile ilgili çalışmalar yetersiz kalmıştır. Yücel ve Yamaç (2010), Türk karstik mağaralarından izole ettikleri *Streptomyces* spp.'nin antibiyotik direnci

gösteren mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Şen ve ark. (2011) Düzkır Mağarası'ndan (Aladağlar) izole edilen bakteriyel örneklerin antimikrobiyal aktiviteleri, statin üretme kabiliyeti ve sitotoksik etkilerini araştırmışlardır.

Bu çalışmada ise Niğde ilinde bulunan ve giriş ağızı deniz seviyesinden yaklaşık olarak 3344 metre yükseklikte olan Düzkır Mağarasının çeşitli noktaları ve Aladağların değişik yüksekliklerinden alınan toprak örneklerinde *Cryptococcus* ve *Histoplasma* türlerinin varlığını araştırılmıştır.

İncelenen örneklerden mağara içini temsil eden 5 Nolu örnekten *C. neoformans* izolasyonu yapılmıştır. ID 32C maya identifikasyon kiti ile *C. neoformans* olarak tanımlanan suşun tanısı moleküler yöntemler ile doğrulanmıştır. Toprak örneklerinin hiçbirinde *Histoplasma capsulatum* saptanmamıştır.

Montagna ve ark. (2003), yaptıkları bir çalışmada İtalya'nın Apulia bölgesinde yirmi beş mağarada *Cryptococcus* spp. varlığını araştırmışlardır. *C. neoformans*' in varlığı için sadece üç mağara pozitiftir. Bu veri, araştırmacılar tarafından bu mayanın mağara habitatlarında bulunuşu için ilk kayıt olarak vurgulanmıştır. Mağarabilimcilerin hayatı tehdit eden fungal enfeksiyonlarına maruz kalmasında mağaraların potansiyel rolünü gösteren bir çalışmadır.

Japonya'da kanatlıların yaşadığı mağaralarda yapılan araştırmalarda baskın fungal floranın *Trichoporon* spp ve *Cryptococcus* spp olduğu ortaya çıkarılmıştır. Yarasa gübresinin önceden tanımlanmamış maya türlerinden zengin potansiyel bir kaynak olacağını vurgulamışlardır (Sugita ve ark., 2005).

*C. neoformans* çevresel ortamda sıklıkla güvercin dışkılarında ve ağaçlarda kolonize olmaktadır. Yine ilk kez Rivas ve ark. topraktan izole etmişlerdir (Rivas ve ark., 1999). Bu kolonizasyon ortamlarından solunum yolu ile canlılara bulaşır. Ülkemizde yapılan çevresel *C. neoformans* taramalarında güvercin dışkılarının olduğu bölgelerden yapılan taramalar çoğunluktadır. Çevresel mikrobiyota araştırmalarında ise *Eucalyptus camaldulensis* ile birlikte *Punica granatum* ve *Platanus orientalis* ağaçlarından izolasyon yapılmıştır (Ergin ve ark., 2008; Pelek ve ark., 2011; Gökçen ve Ergin, 2014). Ergin ve ark. (2008), Turistik Denizli Dodurgalar (Keloğlan) mağarası'nda *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* varlığını araştırmak için yaptıkları çalışmada *C. neoformans* ve *H. capsulatum* izole edilemediğini belirtmişlerdir. Ayrıca mağara mikroorganizmalarının sıklıkla solunum sistemi enfeksiyonlarına neden olduğunu belirtmişlerdir (Ergin ve ark., 2008).





Çalışmamız ülkemizde mağara toprak örneklerinden *Cryptococcus neoformans*' in izolasyonu ile ilgili ilk çalışmadır. Mağaralar öncelikle sportif, turistik ya da bilimsel amaçlarla insanlar tarafından ziyaret edilmektedir. Mağaradaki mikrobiyomu mağarada yaşayan tüm canlılar ile birlikte mağara turizmi nedeni ile geçici olarak orada bulunan insanlar nedeni ile önem arz etmektedir.

### Kaynaklar

- Barton, H.A. (2006). Introduction to Cave Microbiology: A Review for the Non-Specialist, *Journal of Cave and Karst Studies*, 68 (2) 43–54
- Bastian, F., Jurado, V., Nováková, A., Alabouvette, C. ve Saiz-Jimenez C. (2010). The microbiology of Lascaux Cave. *Microbiology*, 156 (Pt 3) 644-52.
- Botts, M.R. ve Hull, C.M. (2010). Dueling in the lung: how *Cryptococcus* spores race the host for survival, *Curr Opin Microbiol.*, 13(4) 437-42.
- Candiroglu, B. ve Dogruoz Gungor, N. (2017). Cave Ecosystems: Microbiological View. *Eur J Biol.*, 76(1) 36-42.
- Cermeño, J.R., Hernández, I., Cabello, I., Orellán, Y., Cermeño, J.J., Albornoz, R., Padrón, E. ve Godoy, G. (2006). *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* in dove's (*Columbia livia*) excreta in Bolívar State, *Venezuela. Rev Latinoam Microbiol.*, 48 (1) 6-9.
- Chowdhary, A., Rhandhawa, H.S., Prakash, A. ve Meis, J. (2011). Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: An update. *Critical Reviews in Microbiology*, 38(1) 1-16.
- De Mandal, S., Chatterjee, R. ve Kumar, N.S. (2017). Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle. *BMC Microbiology*, 17 90. (2017).
- Ergin, Ç., Şengül, M., Mete, E. ve Karatepe, M. (2008). Screening of *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* and keratinophilic fungi in touristic Denizli dodurgalar (Keloğlan) cave. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.*, 38 (3-4) 132-136.
- Escandón, P. ve Castañeda, E. (2015). Long-term survival of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in stored environmental samples from Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32 (3) 197-199.
- Gökçen, H. ve Ergin, Ç. (2014). The isolation of *Cryptococcus neoformans* from Eucalyptus camaldulensis trees in Muğla-Milas city center. *Pamukkale Medical Journal*, 7(2) 109-112.
- Igreja, R.P. (2011). Infectious Diseases Associated with Caves. *Wilderness & Environmental Medicine*, 22 115–121.
- Jurado, V., Porca, E., Cuezva, S., Fernandez-Cortes, A., Sanches-Moral, S. ve Saiz-Jimenez, C. (2010). *Fungal Outbreak in a Show Cave*, *Sci Total Environ*, 408 3632-8.
- Jurado, V., Laiz, L., Rodriguez-Nava, V., Boiron, P., Hermosin, B., Sanchez-Moral, S. ve Saiz-Jimenez, C. (2010). *Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves*. *International Journal of Speleology*, 39 (1) 15-24.
- Kumaresan, D., Wischer, D., Stephenson, J., Hillebrand-Voiculescu, A. ve Murrell, J.C. (2014). Microbiology of Movile Cave-A Chemolithoautotrophic Ecosystem. *Geomicrobiology Journal*, 31: 186–193.
- Leaw, S.N., Chang, H.C., Sun, H.F., Barton, R., Bouchara, J. ve Chang, T.C. (2006). Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. *J Clin Microbiol.*, 44(3): 693–699.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R. ve Pedresen, J. (2000). Rapid minipreparation of fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol*, 38 471.
- Montagna, M.T., Santacroce, M.P., Caggiano, G., Tato, D. ve Ajello, L. (2003). Cavernicolous habitats harbouring *Cryptococcus neoformans*: results of a speleological survey in Apulia, Italy, 1999-2000. *Medical Mycology*, 41 451-455.
- Nielsen, K., De Obaldia, A. ve Heitman, J. (2007). *Cryptococcus neoformans* Mates on Pigeon Guano: Implications for the Realized Ecological Niche and Globalization. *Eukaryotic Cell*, 949–959.
- Pelek, Ş., Altinkaya, S., Korkmaz, U.B. ve Ergin, Ç. (2011). Investigation of *Cryptococcus neoformans* in excreta samples of urban pigeons (*Columba livia*) lived in Denizli city center. *Pamukkale Medical Journal*, 4(1) 21-4.
- Reynolds, H.T. ve Barton, H.A. (2014). Comparison of the White-Nose Syndrome Agent



- Pseudogymnoascus* to Cave-Dwelling Relatives Suggests Reduced Saprotrophic Enzyme Activity. *Plos One* | 9 (1), e86437.
- Rivas, F., De Martin, M.C. ve Rojas, V. (1999). *Cryptococcus neoformans* isolation from the soil in Panama. *Rev Med Panama.*, 24 (1) 4-6.
- Sen, M., Bayburt, C., Aydın, S., Onder, N.I., Incesu, Z., Atli, B. ve Yamac, M. (2011). Düzkır Mağarasından (Aladağlar) Elde Edilen Bakteri İzolatlarının Biyolojik Aktiviteleri. 5. *Ulusal Speleoloji sempozyumu*, İstanbul.
- Claudia Schabereiter-Gurtner, C., Cesareo Saiz-Jimenez, C., Guadalupe Pinar, G., Werner Lubitz, W. ve Sabine Rölleke, S. (2002). Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiology Letters*, 211: 7-11.
- Sugita, T., Kikuchi, K., Makimura, K., Urata, K., Someya, T., Kamei, K., Niimi, M. ve Uehara, Y. (2005). *Trichosporon Species Isolated* from Guano Samples Obtained from Bat-Inhabited Caves in Japan. *Appl Environ Microbiol.*, 71(11) 7626–7629.
- Vanderwolf, K.J., Malloch, D., McAlpine, D.F., Graham, J. ve Forbes G.J. (2013). A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. *International Journal of Speleology*. 42 (1) 77-96.
- Velagapudi, R., Hsueh, Y., Geunes-Boyer, S., Jo Rae Wright, JR. ve Joseph Heitman, J. (2009). Spores as Infectious Propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.*, 77(10) 4345–4355.
- Watkins, R.A., King, J.S. ve Johnston, S.A. (2017). Nutritional Requirements and Their Importance for Virulence of Pathogenic *Cryptococcus* Species. *Microorganisms*, 5(4) 1-20.
- Wu, Y., Tan, L., Liu, W., Wang, B., Wang, J., Cai, Y. ve Lin, X. (2015). Profiling bacterial diversity in a limestone cave of the western Loess Plateau of China. *Frontiers in Microbiology*, 6 (Article 244) 1-10.
- Yasir, M. (2018). Analysis of bacterial communities and characterization of antimicrobial strains from cave microbiota. *Brazilian Journal of Microbiology* 49 (2) 248-257.
- Yucel, S. ve Yamac, M. (2010). Selection of *Streptomyces* isolates from Turkish karstic caves against antibiotic resistant microorganisms. *Pak J Pharm Sci*, 23(1) 1-6.
- Zhang, Z., Peng, Zhao, P. ve Lei Cai, L. (2018). Origin of Cave Fungi. *Frontiers in Microbiology*, 9 (1407) 1-10.



Geliş(Received) :13/11/2018  
Kabul(Accepted) :02/01/2019

Araştırma Makalesi/Research Article  
Doi:10.30708mantar.482166

## A new genus (*Balsamia*) addition for Turkish mycota

Hakan ALLI<sup>1</sup>, Hasan Hüseyin DOĞAN\*<sup>2</sup>

\*Corresponding author: hhuseyindogan@yahoo.com

<sup>1</sup>Muğla Sıtkı Koçman University, Science Faculty, Biology Department, Muğla/TÜRKİYE  
Orcid ID: 0000-0001-8781-7029/ hakanalli@gmail.com

<sup>2</sup>Selçuk University, Science Faculty, Biology Department, Konya/TÜRKİYE  
Orcid ID: 0000-0001-8859-0188/ hhuseyindogan@yahoo.com

**Abstract:** A hypogeous fungus *Balsamia vulgaris* Vittad. was collected from Muğla. This species is well characterised by its peridial warts, long and elliptical spores with three oil drops. *Balsamia* genus grows together with true truffles and they can frequently found in autumn and winter.

**Key words:** False truffle, *Balsamia*, hypogeous fungi, Turkey.

### Türkiye mikotası için yeni bir cins (*Balsamia*)

**Öz:** Muğla'dan yeraltı mantarı, *Balsamia vulgaris* Vittad. toplandı. Bu tür peridyal siğilleri, üç yağ damlalı uzun ve eliptik sporlarıyla karakterizedir. *Balsamia* cinsi gerçek trüflerle beraber yetişmekte ve çoğunlukla sonbahar ve kış aylarında büyümektedir.

**Anahtar kelimeler:** Yalancı trüf, *Balsamia*, yeraltı mantarı, Türkiye

#### Introduction

According to Index Fungorum data base program (2018), *Balsamia* genus are in *Hellvellaceae* family and it has 19 species in the World. Within these 19 species, 7 of them were newly described from Western North America by Southworth et al. (2018). Southworth et al. (2018) extensively studied American *Balsamia* collections by sequenced DNA, assessed relationships by sequence similarity, and identified molecular taxonomic units from the Northwest part of America. According to their results, ITS sequences supported 12 *Balsamia* species in Northwest of America. While Harkness (1899) and Fischer (1907) had originally described five of them, seven are new species.

In recent years, some new species and new records had been added to Turkish macromycota (Sesli and Denchev, 2014; Akata and Gürkanlı, 2018; Akata et al. 2018; Doğan et al., 2018; Sesli et al., 2018a, 2018b; Sesli and Liimatainen, 2018). With these studies, important contributions have been done to the biodiversity of our country. However, there are many species that are not identified in our country. Therefore, studies on macrofungi must continue without interruption.

#### Material and Methods

From fresh and dried specimens, hand sections were mounted in water and ascospores measured (20 randomly selected spores per collection) at 1000 x with a Leica DM3000 microscope and Leica software. Digital images were captured with a Leica DFC 495 camera. Spore dimensions were reported as mean and range (in parentheses) for length, width, and the ratio of length to width (Q). Terminology for description of ascomata tissues follows Montecchi and Sarasini (2000), Gori (2005) and Southworth et al. (2018). Specimens were deposited at the Fungarium of Muğla Sıtkı Koçman University.

#### Results

##### Taxonomy

Ascomycota

Pezizomycetes

Pezizales

Helvellaceae

*Balsamia vulgaris* Vittad., Monogr. Tuberac.

(Milano): 30 (1831)



### Description

**Fruiting body:** Hypogeous or subepigeous tuberiform and knotted, sometimes lobed, lacking root and branch, 1-3 cm diam., varying in colour from light hazel brown when young to orange-ochre and rusty brown; exterior warty, finely papillate-verrucose with roundish, darker and separable papillae (Fig 1 a).

**Peridium:** Completely closed, 10-20(30)  $\mu\text{m}$  with a pseudoparenchymatous structure formed by polygonal-roundish, yellowish elements (Fig 1 b).

**Gleba:** Whitish to pale yellow, numerous chambers formed by labyrinthiform tramal plates.

**Asci:** Not visible due to very thin and hardly colourable wall.

**Ascospores:** Cylindrical with rounded apex, ellipsoid-cylindrical, with a thin and less than 1  $\mu\text{m}$ , hyaline, smooth, generally with 3 guttules, 25- 30  $\times$  11-14  $\mu\text{m}$  ( Fig 1 c).

**Habitat:** Under *Quercus robur* L.

**Collection examined:** Muğla: Yatağan, Doğanköy Village, 23 March 2018, A6866.

**Remarks:** According to Montecchi and Sarasini (2000), it is considered as a toxic species, but we did not check its edibility. The closest species is *Balsamia polysperma* Vittad.. *B. vulgaris* differs from *B. polysperma* (other European species) by its bigger, more elongate and having three oil droplets of the spores. Asci are sometimes hardly visible on mature specimens due to their very thin and hardly colourable wall.

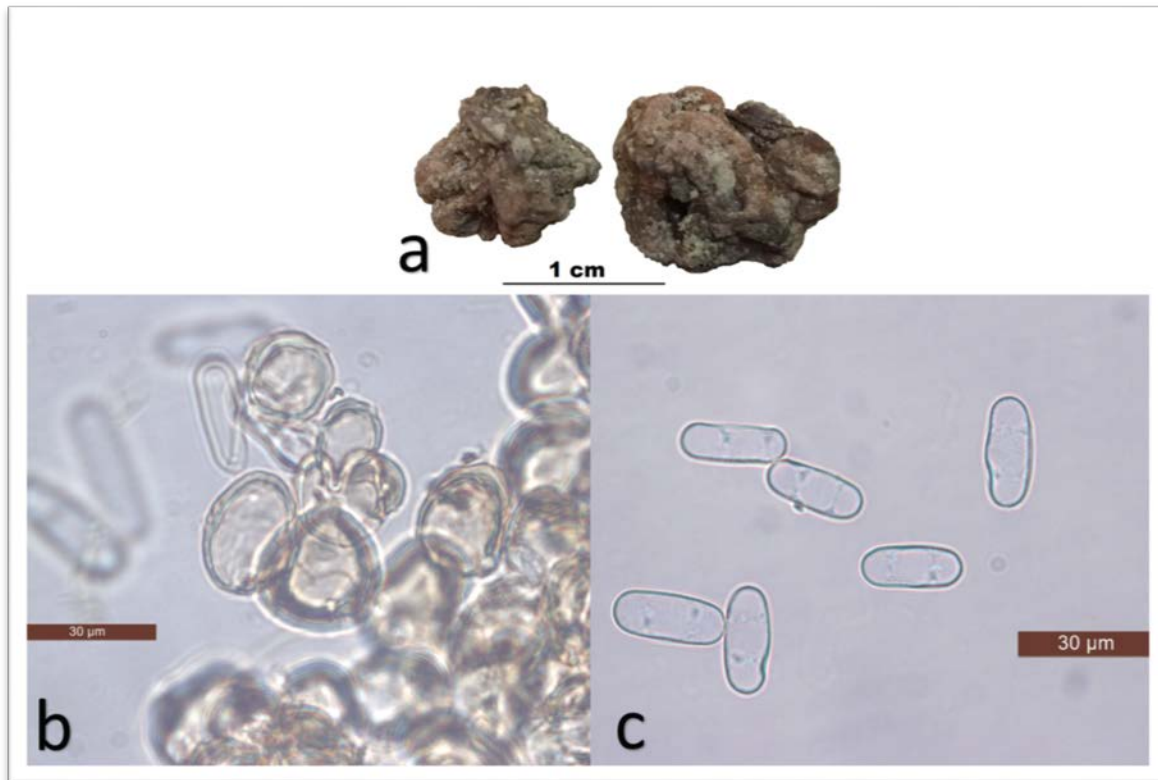


Figure 1: a; Ascocarps, b; Peridial cells, c; Ascospores.

### References

- Akata I. and Gürkanlı C.T. (2018). A New genus record for Turkish Clathroid fungi. *The Journal of Fungus*, 9(1) 36–38.
- Akata, I., Kabaktepe, Ş., Sevindik, M. and Akgül, H. (2018). Macrofungi determined in Yuvacık Basin (Kocaeli) and its close environs. *Kastamonu Univ. Journal of Forestry Faculty*, 18(2) 152–163

- Doğan, H.H., Bozok, F. and Taşkın, H. (2018). A new species of *Barssia* (Ascomycota, Helvellaceae) from Turkey. *Tr J Bot* 42: 636–643.
- Fischer, E. (1907). Über einige kalifornische Hypogaeen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 25: 373–376.
- Gori, L. (2005). *Funghi ipogei della Lucchesia*, Marlia, Lucca: Maria Pacini Fazzi Editore.



- Harkness, H.W. (1899). Californian hypogeous fungi. *Proceedings of the California Academy of Science, Series 3, Botany 1*: 241–286.
- Index Fungorum (2018). <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. Accessed 30 October 2018.
- Montecchi, A. and Sarasini, M. (2000). *Funghi ipogei d'europa*, A Vicenza, Italy: M.B.Fondazione Centro Studi Micologici.
- Sesli, E., Antonin, V. and Contu M. (2018 a). A new species of *Hygrophorus*, *H. yadigarii* sp. nov. (Hygrophoraceae), with an isolated systematic position within the genus from the Colchic part of Turkey. *Tr J Bot*, 42: 224–232.
- Sesli, E., Antonin, V. and Hughes, K.W. (2018 b). *Marasmiellus istanbulensis* (Omphalotaceae), a new species from Belgrade Forest (İstanbul-Turkey). *Plant Biosystems*, 152(4) 666–673.
- Sesli, E. and Denchev, C.M. (2014). Checklists of the myxomycetes, larger ascomycetes, and larger basidiomycetes in Turkey. *Mycotaxon*, 106: 65–67 (2008). + online version 2014: 1-136.
- Sesli, E. and Liimatainen K. (2018). *Cortinarius conicoumbonatus* (Cortinarius subgen. *Telamonia* sect. *Hinnulei*) a new species from spruce-beech forests of the East Black Sea Region of Turkey. *Tr J Bot*, 42: 1–8.
- Southworth, D., Frank, J.L., Castellano, M.A., Smith, M.E. and Trappe, J.M. (2018). *Balsamia* (Sequestrate Helvellaceae, Ascomycota) in western North America. *Fungal Systematics and Evolution*, 2: 11–36.





Geliş(Received) :02/08/2018  
Kabul(Accepted) :20/02/2019

Araştırma Makalesi/Research Article  
Doi:10.30708mantar.450370

## Biodiversity of *Penicillium* species isolated from Edirne Söğütlük Forest soil (Turkey)

Tugba Korur KOLANLARLI<sup>1</sup>, Ahmet ASAN<sup>2</sup>,  
Burhan SEN<sup>3</sup>, Suzan OKTEN<sup>4</sup>

\*Corresponding author: ahmetasan84@gmail.com

<sup>1,2,3</sup>Trakya University Faculty of Science, Department of Biology. 22030 Edirne-TURKEY.

<sup>1</sup>Orcid ID: 0000-0001-6561-7384/ tuba\_2707@hotmail.com

<sup>2</sup>Orcid ID: 0000-0002-4132-3848/ ahmetasan84@gmail.com

<sup>3</sup>Orcid ID: 0000-0002-8477-9570/ burhan\_sen@hotmail.com

<sup>4</sup>Trakya University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutic Microbiology. 22030 Edirne-TURKEY. Orcid ID: 0000-0003-3372-5617/ suzanokten@hotmail.com

**Abstract:** We studied *Penicillium* species isolated from forest soil and aimed to be detected with morphologically, colonial-molecular methods and species diversity. Soil sample was taken Edirne Söğütlük Forest in October, 2015 and 10 cm deep under aseptic conditions and Waksman's 'Soil Dilution Method' was used for the isolation of *Penicillium* species; some books and articles have been used for morphological and colonial identification. The service was purchased for the molecular diagnosis of fungi and the company used the Bio-Speedy™ Fungal DNA Isolation Kit for isolation. As PCR Kit, Bio-Speedy™, yeast and mould real-time PCR rapid detection kit was used. The obtained sequences were subjected to BLAST analysis similar sequences using the gene bank and to draw phylogenetic tree, used Mega 7 software. Twelve species belonging to the genus *Penicillium* were identified; these are: *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. commune*, *P. manginii* (current name: *Penicillium atosanguineum*), *P. ubiquetum* (New record for Turkey), *P. camemberti*, *P. sanguifluum*, *P. janczewskii*, *P. canescens*, *P. roseopurpureum*, *P. steckii* (current name: *Penicillium citrinum*), *P. hordei*.

**Key words:** Soil, Fungi, *Penicillium*, Sanger Sequencing Method, ITS, Edirne.

### Edirne İli (Türkiye) Söğütlük Ormanı toprağından izole edilen *Penicillium* türlerinin biyoçeşitliliğı

**Öz:** Çalışmamızda orman toprağından izole edilen *Penicillium* türlerinin, morfolojik, kolonyal ve moleküler yöntemlerle tespiti amaçlanmış ve *Penicillium* tür çeşitliliğı incelenmiştir. Toprak örnekleri, Edirne Söğütlük Ormanı'ndan 2015 yılı Ekim ayında, 10 cm derinden aseptik şartlarda alınmış olup, *Penicillium* türlerinin izolasyonu için Waksman'ın 'Toprağı Sulandırma Yöntemi' kullanılmış; morfolojik ve kolonyal tanımlaması için çeşitli eserler kullanılmıştır. Moleküler tanı amacıyla izolasyon işlemi için Bio-Speedy™ fungal DNA izolasyonu kiti kullanılmıştır. PCR kiti olarak ise Bio-Speedy™ Maya ve Küf Real-Time PCR Hızlı Tespit Kiti kullanılmıştır. Elde edilen sekanslar gen bankası kullanılarak benzer sekanslarla BLAST analizi yapılmış ve Mega 7 yazılımı kullanılarak filogenetik ağaç çizilmiştir. *Penicillium* cinsine ait 12 tür tanımlanmıştır, bunlar: *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. commune*, *P. manginii* (geçerli isim: *Penicillium atosanguineum*), *P. ubiquetum* (Türkiye için yeni kayıt), *P. camemberti*, *P. sanguifluum*, *P. janczewskii*, *P. canescens*, *P. roseopurpureum*, *P. steckii* (geçerli isim: *Penicillium citrinum*), *P. hordei* dir.

**Anahtar kelimeler:** Toprak, Fungus, *Penicillium*, Sanger dizileme, ITS, Edirne.





## Introduction

*Penicillium* genus is common in different environments such as soil, plant, air and food products. Some species can use in cheese production, also some of them are pathogens for human; in addition, some species can use for antibiotics production. Besides, *Penicillium* is important genus because of commercial and industrial such as using production anti-tumoral, anti-fungal and anti-viral compounds, and using production of extra cellular enzymes. There are over 250 species of *Penicillium* genus (Visagie et al., 2014; Abastabar, 2016).

One of the first study on soil fungi of Turkey was performed by Oner (1970). Many studies performed after mentioned study indicated that the soils of Turkey has rich fungal biodiversity. Hasenekoglu et al. (Hasenekoğlu, 1982; Hasenekoğlu and Azaz, 1991; Hasenekoğlu and Sülün, 1991) on soil fungi especially in North-East of Anatolia. In Izmir and environs (Ekmekçi, 1975; Öner, 1974) and the other cities (Ilhan and Asan, 2001; Asan and Ekmekçi, 2002; Azaz, 2003) for example.

The purpose of our study is isolation of *Penicillium* species from Edirne Söğütlük Forest soil and description of species by morphological, colonial and molecular methods.

## Materials and Methods

Soil samples were obtained 10 cm depth in aseptic conditions from Edirne Söğütlük forest in October 03, 2015, to put sterile plastic bags and returned to laboratory. Soil samples are weighed 10 gr and put petri plates that tared. Petri plates were put to oven in 105°C during 24 h and weighed again so, we obtained air-dry-soil. After considering the moisture content, we calculated amount of moistured soil that equaled to 25 gr oven dried soil. The soil corresponding to 25 g of soil was placed into erlenmeyer flask (500 ml capacity) and a 9 % NaCl solution was added ( $10^{-1}$  dilution). This suspension was agitated in the shaking machine for 25 minutes for homogenization. After shaking, 10 ml of the soil particles from the  $10^{-2}$  suspension were taken to the bottom, and 90 ml of NaCl solution was added there for to obtain a  $10^{-3}$  dilution. Then,  $10^{-5}$  and  $10^{-6}$  dilution series were prepared. 1 ml samples from all dilutions, starting from  $10^{-1}$  dilution series to  $10^{-6}$  dilution series, were transferred to Petri dishes containing PDA (without any antibiotic) medium was poured on them and the samples incubated at 25°C for 5-7 days. PDA culture includes carbohydrate and potato. These components support the development of yeast and mould, while low pH

suppresses bacterial growth. Molds develop in this medium by showing typical morphologies. Pure culture was isolated from the growing fungal samples and the isolates were transferred to the PDA medium (Marshall, 1992; Vanderzant and Splittstoesser, 1992; Waksman, 1922).

## Morphological Identification of Fungi

Species obtained from PDA medium were produced by three-point seeding on DG18 medium, from which glycerol stock solutions of molds were prepared. Czapek Yeast Extract Agar, Malt Extract Agar, 25 % Glycerol Nitrate Agar, Neutral Creatine Sucrose Agar and Yeast Extract Sucrose Agar media were prepared for the morphological and colonial identification of *Penicillium* species. Pitt (1979 and 2000), Samson et al. (2010) and Houbraken et al. (2010 and 2011) are used for identification of *Penicillium* species.

## Molecular Identification of Fungi

Bio-Speedy™, Fungal DNA Isolation Kit is used for isolation of fungi. As the PCR kit (<https://www.bioeksen.com.tr/fungal-dna-isolation-kit/>), Bio-Speedy™, Fungal DNA Isolation Kit and Universal ITS primers (White et. al., 1990) were used for this purpose. In addition, to draw the phylogenetic tree, the evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model. The tree with the highest log likelihood (-2044.9430) is shown. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7.

## Results

Eleven species of *Penicillium* genus have been identified in soil samples taken from Söğütlük Forest of Edirne City. These species are; *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. commune*, *P. manginii* (current name: *Penicillium atosanguineum*), *P. ubiqetum* (New record for Turkey), *P. camemberti*, *P. sanguifluum*, *P. janczewskii*, *P. canescens*, *P. steckii* (current name: *Penicillium citrinum*), *P. hordei* (Table 1 and Figure 2-13). The obtained sequences were not submitted to the genbank since the most similar ITS hit of the blast search



was 100 % similar to the query nucleotide for all of the isolates.

Table 1. Comparative list of fungi identified by molecular and morphological.

Isolate Code	Nucleotide Accession	Morphological Characterization	Matching Nucleotide			
			Organism	Accession	Identity	Cover
O6	MK179257	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	KC009774.1	100% (585/585)	100%
K31	MK179258	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>P. citrinum</i>	KX674625.1	100% (565/565)	100%
K19	MK179259	<i>Penicillium commune</i>	<i>P. commune</i>	KC009828.1	100% (584/584)	100%
K9	MK179262	<i>Penicillium manginii</i>	<i>P. manginii</i>	JN 617662.1	100% (604/604)	100%
O5	MK179266	<i>Penicillium ubiquetum</i>	<i>P. ubiquetum</i>	NR121514.1	100% (612/612)	100%
K15	MK179255	<i>Penicillium camemberti</i>	<i>P. camemberti</i>	KF285997.1	100% (557/557)	100%
K24	MK179264	<i>Penicillium sanguifluum</i>	<i>P. sanguifluum</i>	JN 617681.1	100% (584/584)	100%
K29	MK179261	* <i>Penicillium janczewskii</i>	<i>P. murcianum</i> <i>P. janczewskii</i> <i>P. canescens</i>	NR138358.1 KP016839.1 HQ607858.1	100% (599/599) 100% (599/599) 100% (599/599)	100%
G4	MK179256	* <i>Penicillium canescens</i>	<i>P. janczewskii</i> <i>P. murcianum</i> <i>P. canescens</i>	MH865548.1 NR138358.1 HQ607858.1	100% (599/599) 100% (599/599) 100% (599/599)	100%
K23	MK179265	<i>Penicillium steckii</i>	<i>P. steckii</i>	KP942904.1	100% (592/592)	100%
G5	MK179260	* <i>Penicillium hirsutum</i>	<i>P. hordei</i> (most suitable molecular matching for ITS) <i>P. hirsutum</i>	JN942853.1 AJ004817.1	100% (549/549) 100% (547/549)	100%
O9	MK179263	* <i>Penicillium roseopurpureum</i>	<i>P. sanguifluum</i> (according to phylogenetic tree) <i>P. roseopurpureum</i>	KJ191428.1 GU566236.1	100% (610/611) 100% (610/611)	100%

\*Nucleotide blast search for the isolate resulted in the same query cover and maximum identity.

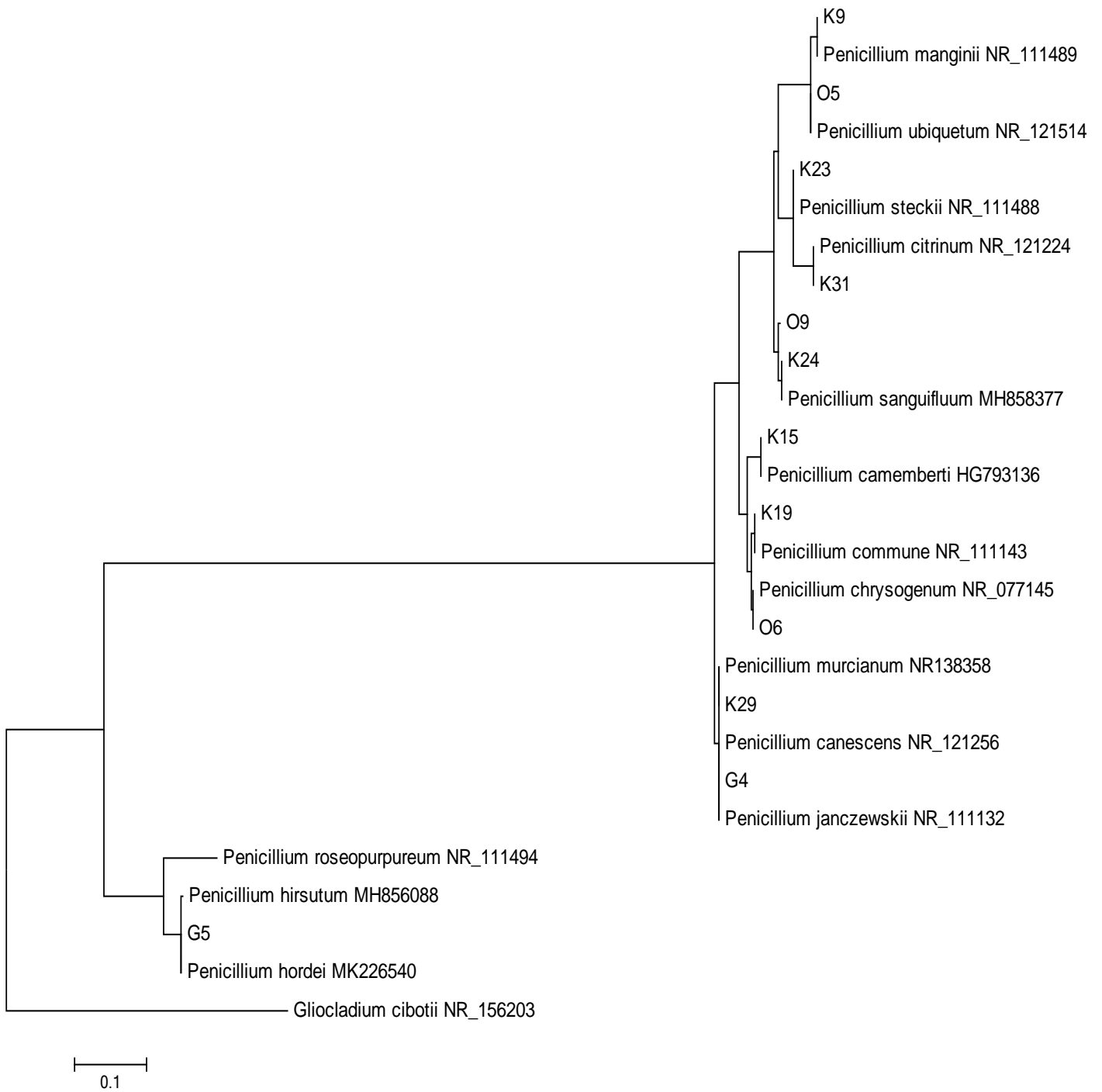


Figure 1. Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood Method.



Identification of *Penicillium chrysogenum* (Thom 1910) was performed according to Pitt (1979 and 2000).

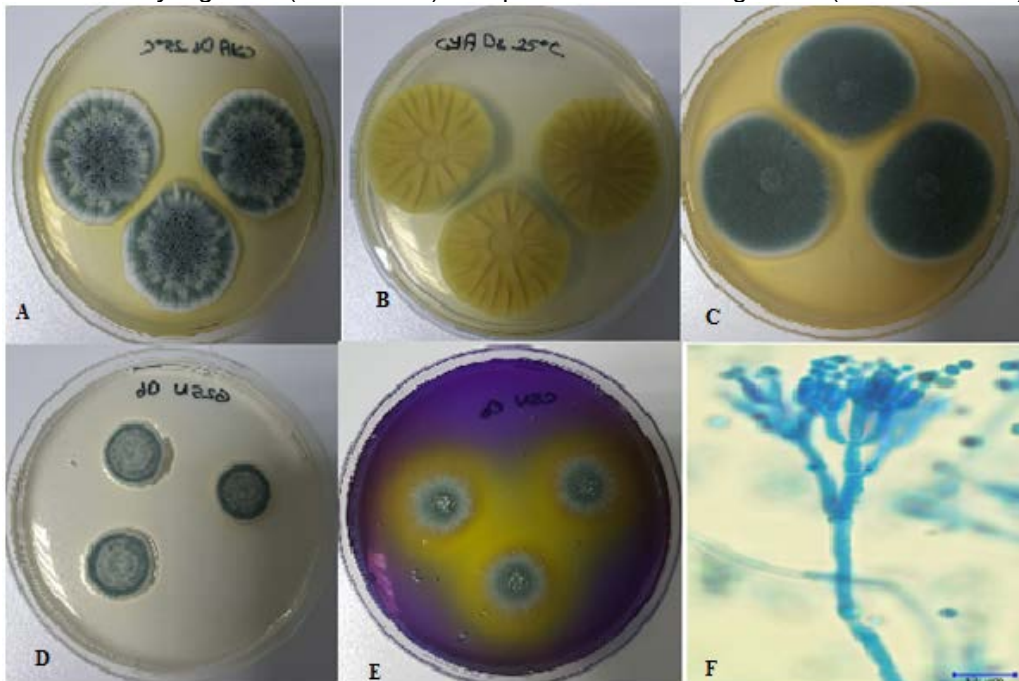


Figure 2. *P. chrysogenum* A. CYA medium, at 25°C, colonial morphology for seven days. B. CYA medium, 25°C, revers colonial morphology, C. MEA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. D. G25N medium, 25°C, colonial morphology for seven days, E. CSN medium, 25°C, colonial morphology for seven days, F. Microscopic image of *P. chrysogenum*.

Identification of *P. citrinum* (Thom 1910) was performed according to the Pitt (2000), Houbraken et al. (2010, 2011).

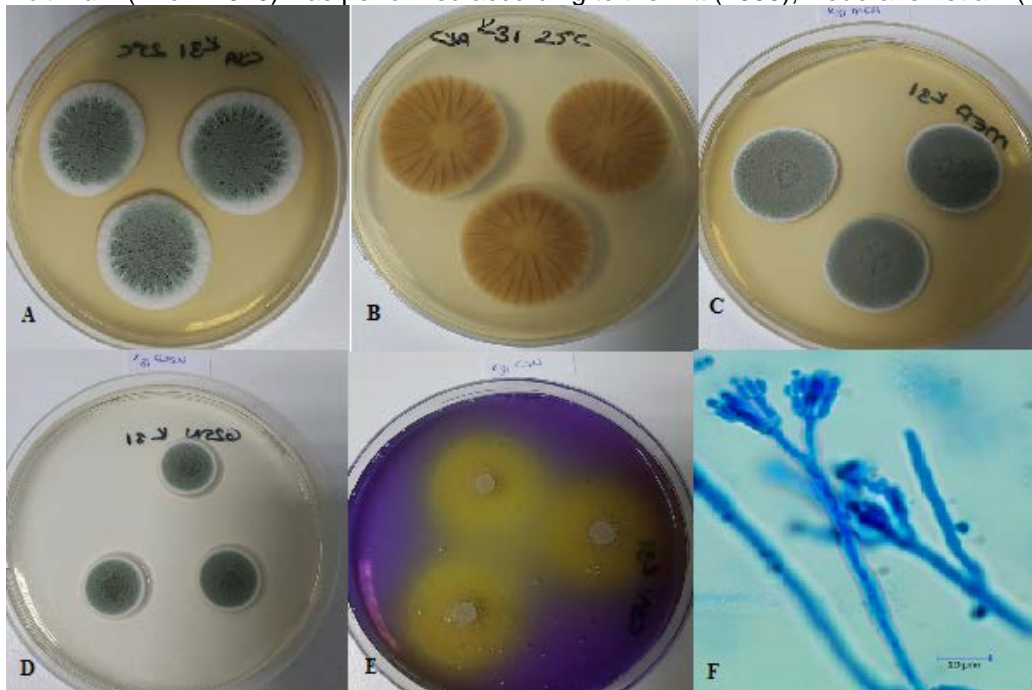


Figure 3. *P. citrinum* A. CYA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. B. CYA medium, 25°C, revers colonial morphology. C. MEA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. D. G25N medium, 25°C, colonial morphology for seven days, E. CSN medium, 25°C, colonial morphology for seven days. F. Microscopic image of *P. citrinum*.

Identification of *P. commune* (Thom 1910) was made by Pitt (2000).



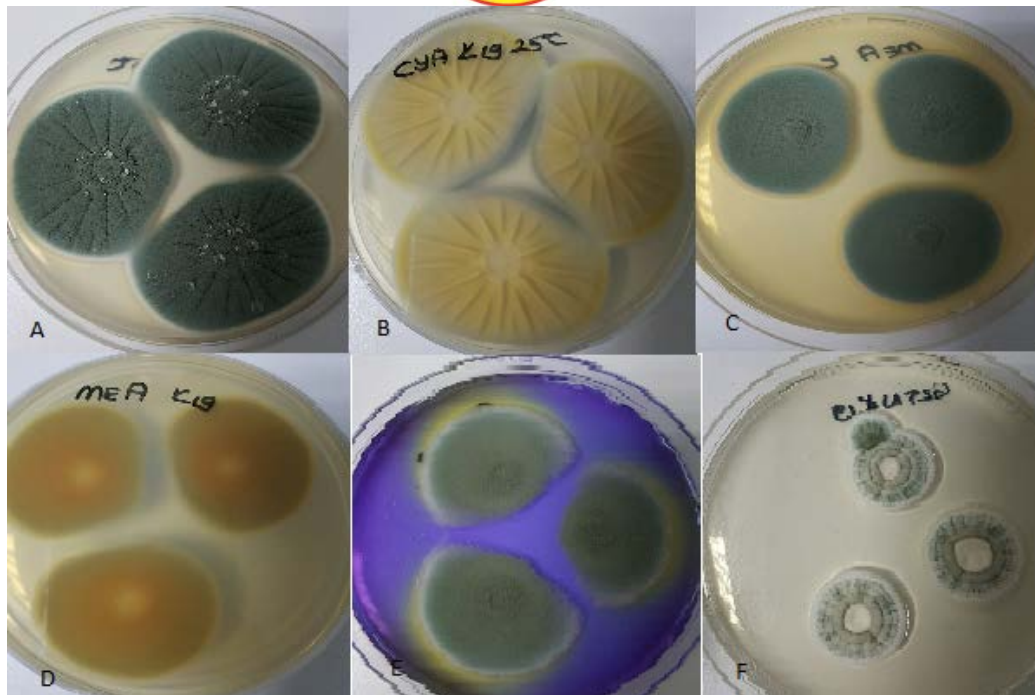


Figure 4. *P. commune* A. CYA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. B. CYA medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. C. MEA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. D. MEA medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. E. CSN medium, 25°C, colonial morphology for seven days. F. G25N medium, 25°C, colonial morphology for seven days.

Identification of *P. manginii* was made by Houbraken et al. (2011).

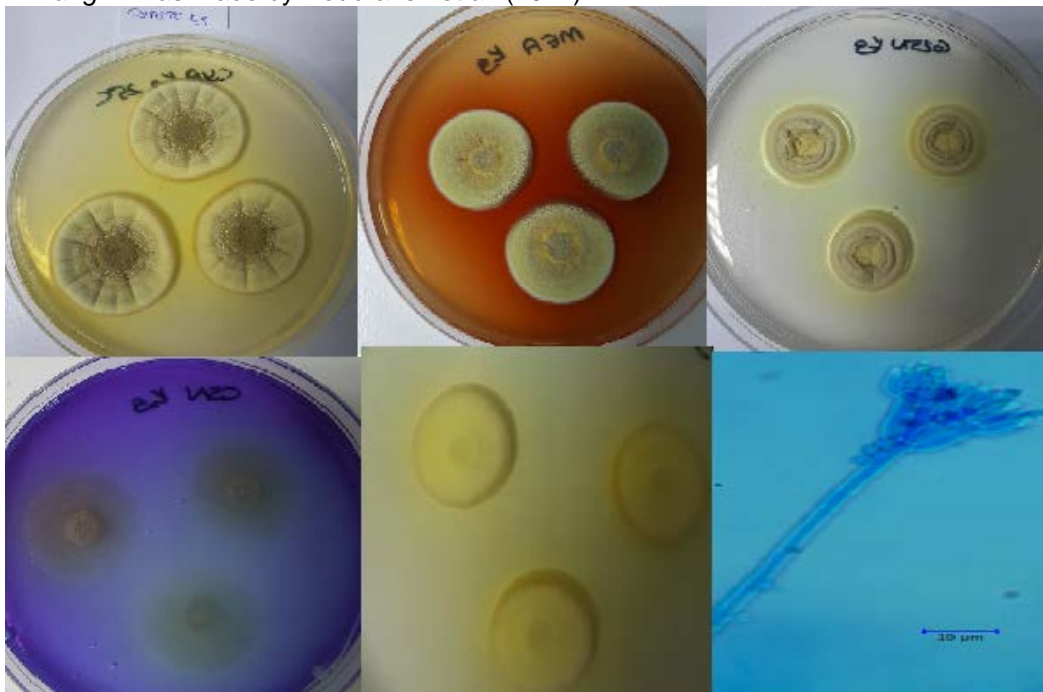


Figure 5. *P. manginii* A. CYA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. B. MEA medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. C. G25N medium, 25°C, colonial morphology for seven days. D. CSN medium, 25°C, colonial morphology for seven days. E. YES medium, 25°C, colonial morphology for seven days. F. Microscopic image of *P. manginii*.

Identification of *P. ubiquestum* was made by Houbraken et al. (2011).



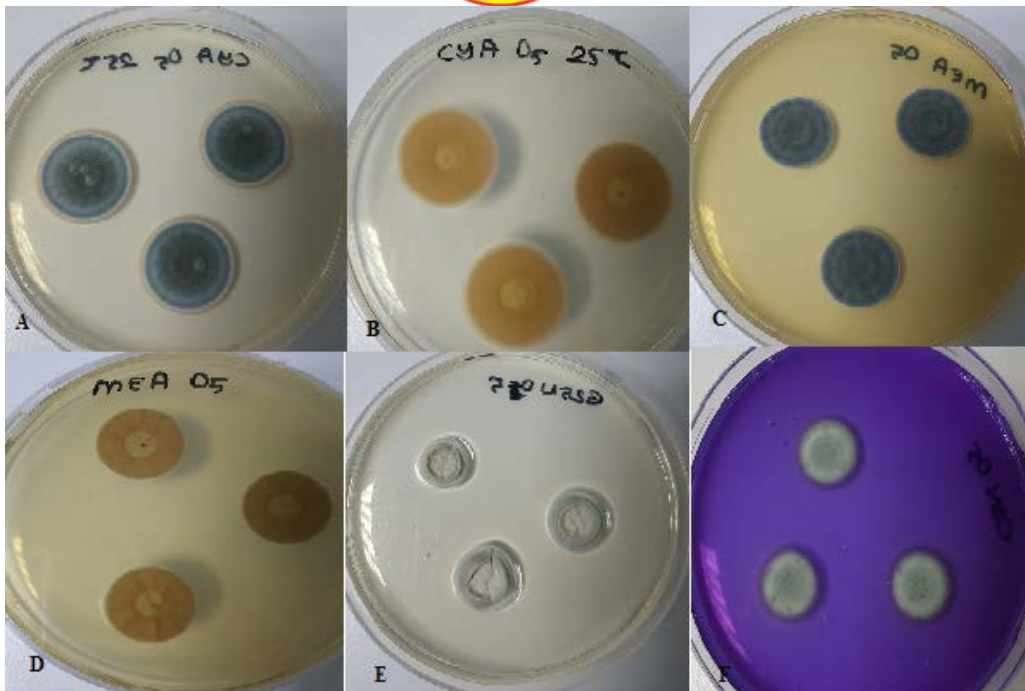


Figure 6. *P. ubiquestum* A. CYA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. B. CYA medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. C. MEA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. D. MEA medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. E. G25N medium, 25°C, colonial morphology for seven days. F. CSN medium, 25°C, colonial morphology for seven days.

Identification of *P.camemberti* was made by Houbraken et al. (2011) and Samson et al. (2010).

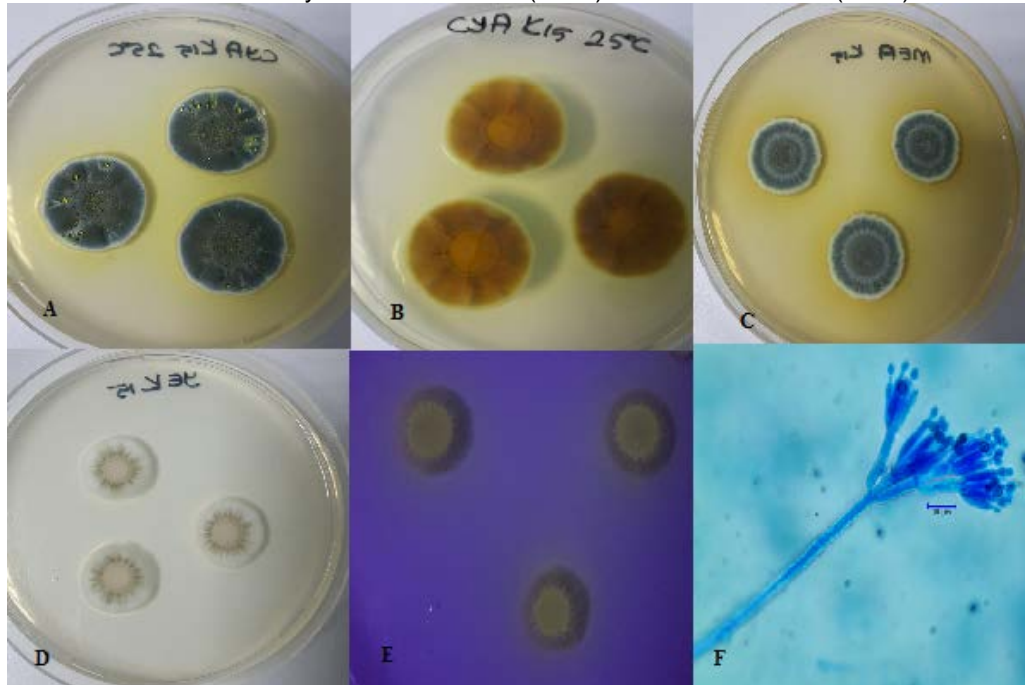


Figure 7. *P. camembertii* A. CYA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. B. MEA medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. C. G25N medium, 25°C, colonial morphology for seven days. D. CSN medium, 25°C, colonial morphology for seven days. E. YES medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. F. Microscopic image of *P. camembertii*.



Identification of *P. sanguifluum* was made by Houbraken (2011).

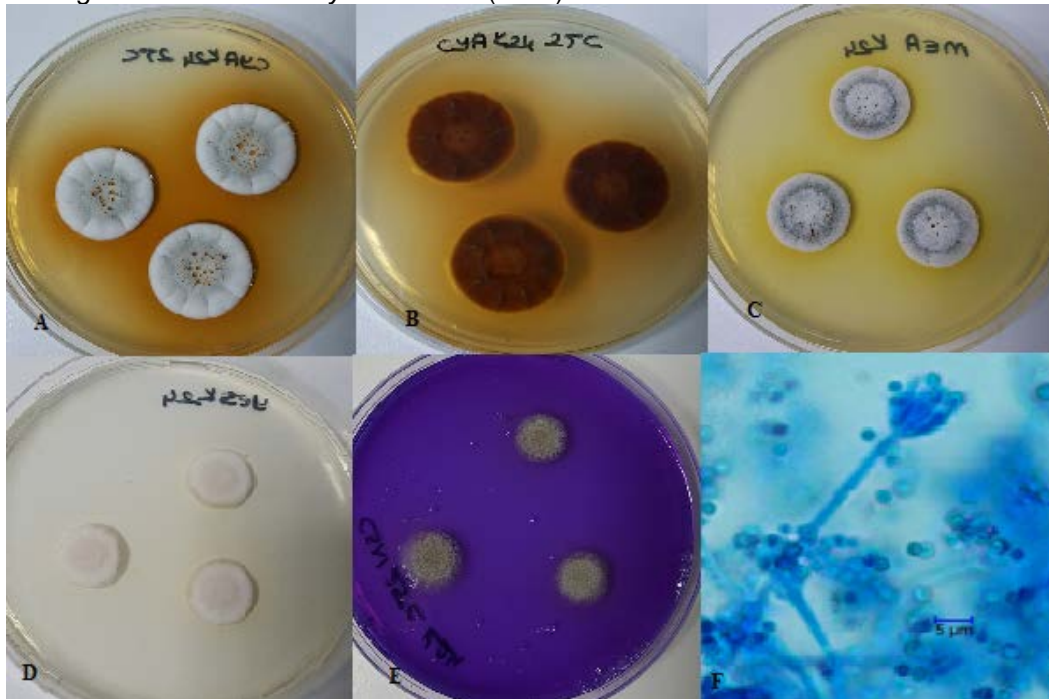


Figure 8. *P. sanguifluum* A. CYA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. B. MEA medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. C. G25N medium, 25°C, colonial morphology for seven days. D. CSN medium, 25°C, colonial morphology for seven days. E. YES medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. F. Microscopic image of *P. sanguifluum*.

Identification of *Penicillium janczewskii* was made by Pitt (2000).



Figure 9. *P. janczewskii*. CYA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. B. MEA medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. C. G25N medium, 25°C, colonial morphology for seven days. D. CSN medium, 25°C, colonial morphology for seven days. E. YES medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. F. Microscopic image of *P. janczewski*.





Identification of *P. canescens* was made by Pitt (2000).

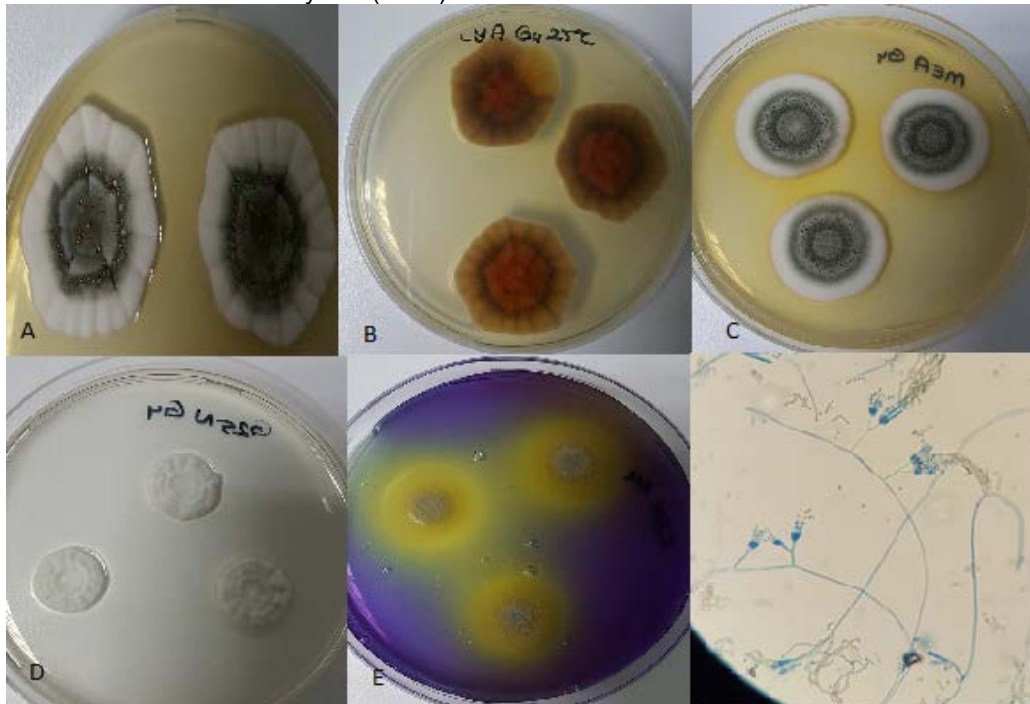


Figure 10. *Penicillium canescens* A. CYA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. B. CYA medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. C. MEA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. D. G25N medium, 25°C, colonial morphology for seven days. E. CSN medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. F. Microscopic image of *P. canescens*.

Identification of *P. steckii* was made by Houbraken et al. (2010 and 2011).

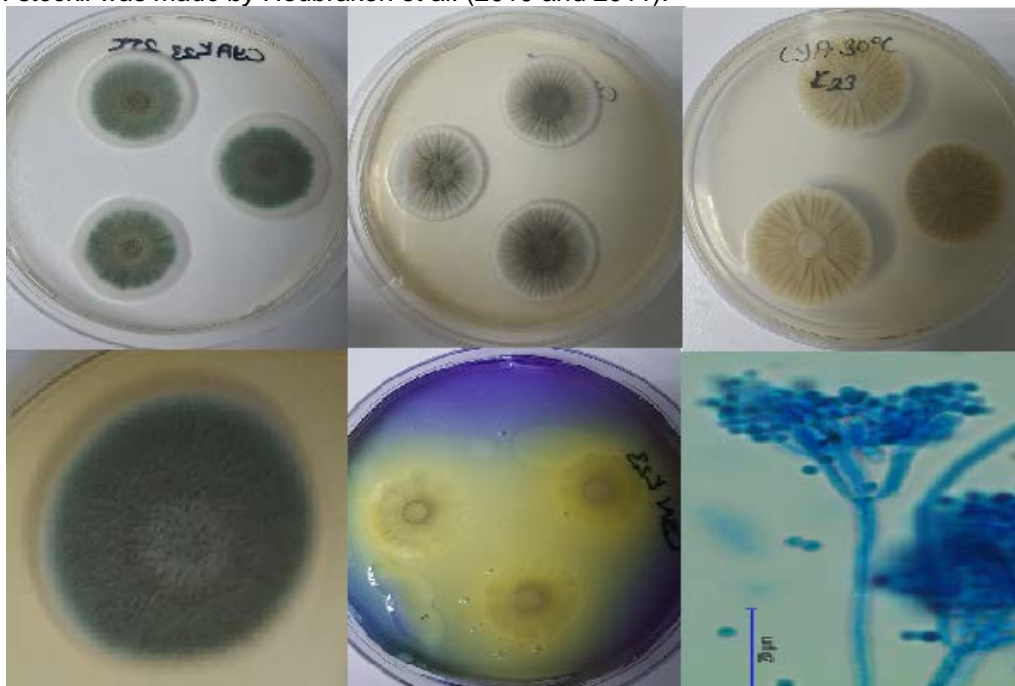


Figure 11. *Penicillium steckii* A. CYA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. B. CYA medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. C. MEA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. D. G25N medium, 25°C, colonial morphology for seven days. E. CSN medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. F. Microscopic image of *P. steckii*.



Identification of *P. hordei* was made by Pitt (2000).

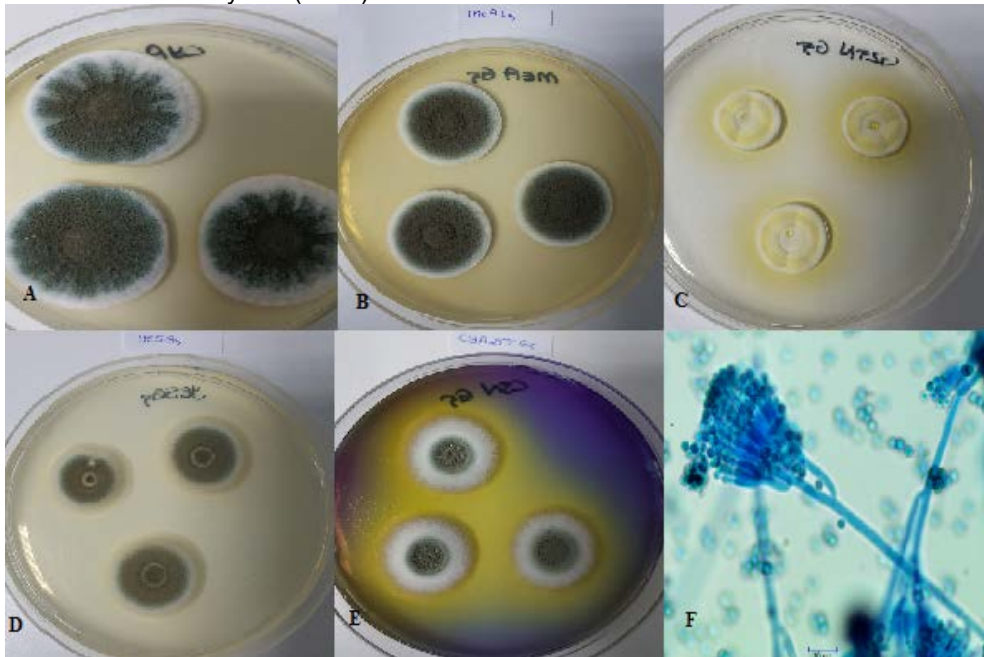


Figure 12. *Penicillium hordei* A. CYA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. B. CYA medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. C. MEA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. D. G25N medium, 25°C, colonial morphology for seven days. E. CSN medium, 25°C, ters colonial morphology for seven days. F. Microscopic image of *P. hirsutum*.

Identification of *P. roseopurpureum* was made by Houbraken et al. (2011).

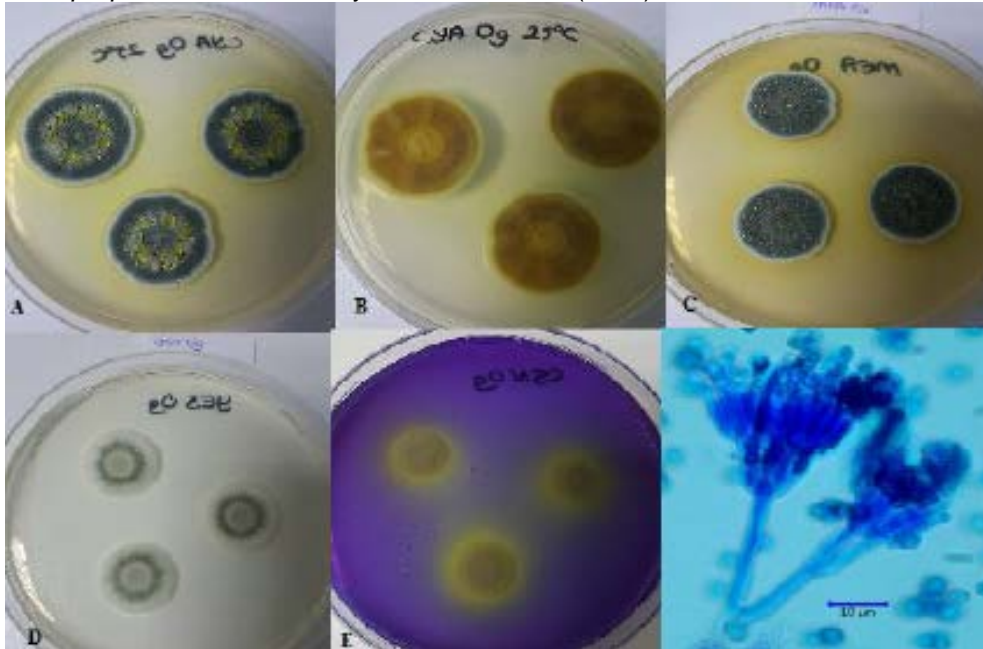


Figure 13. *Penicillium roseopurpureum* A. CYA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. B. CYA medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. C. MEA medium, 25°C, colonial morphology for seven days. D. G25N medium, 25°C, colonial morphology for seven days. E. CSN medium, 25°C, revers colonial morphology for seven days. F. Microcobic image of *P. roseopurpureum*.



### Discussion

Soil is a complex environment containing various microorganisms; the number and diversity of fungi in this habitat varies depending to the environmental conditions. Many research has been performed about soil fungi in the world and in Turkey. For example, Kara and Asan (2007) reported that the number of fungi in the soil profile is continuously decreasing from top to bottom in all research stations.

There are some the other fungal studies in the soil of Thrace Region of Turkey such as Asan and Ekmekçi (1994), Asan (1997a, 1997b) and Asan et al. (2010). Asan

and Ekmekçi (1994) obtained soil samples for study of fungi from seven different habitats in Edirne City and one of these habitats is the Edirne Söğütlük Forest. Thirteen *Penicillium* species were found in mentioned habitat, but only two of them (*P. camembertii* and *P. canescens*) were also isolated in our study. There are 21 years between the two studies and there are various reasons for the different outcomes. First of all, the Meriç river is overflowing every 2-3 years in the region where it is obtaining intense alluvium from river (Türkmenoğlu, 2012; and Zal, 2006) (Figure 14 and 15).



Figure 14. Overflowing of Meriç and Tunca Rivers in March 14, 2006 (Photo by Ahmet Asan).

Another important case is the methodology used in the two studies. Only morphological and colonial methods were used in 1994, whereas molecular methods were used in this study additively. Also there are intensive human activities (backpacking, walking, etc.) in the area studied. Therefore, it was thought that it would be useful to study only one fungal genus (*Penicillium*) in the same region and different results were seen.

ITS region is widely used for fungi and its universal primers. However, for *Penicillium* and many other Ascomycetes, ITS is not sufficiently to distinguish all species for identification at species level [Visagie et al., 2014]. Skouboe et al. (1999) indicated that the ITS1 and ITS2 regions contains information can be used to support

taxonomical, ecological and physiological data of *Penicillium* species of common food sources, but the level of ITS region variability is low to the separation of closely related species. Additional sequences data from other fungal genes may provide sufficient character to establish phylogenetic relationships between Tervertisillate *Penicillium*. Because of the ITS-related limitations in *Penicillium*, a secondary gene region is usually required to identifying isolates for species level. This gene region should be useful for phylogenetic investigations. The second identification marker for the genus *Penicillium* is  $\beta$ -tubulin; however, there are also problems with this region. Therefore, in addition to ITS,  $\beta$  tubulin is useful; also ITS,  $\beta$  tubulin, Cam and RPB2 regions are





recommended for the identification of new species [Visagie et al. 2014].



Figure 15. Normal state of Meriç River in August 15, 2008 (Photo by Ahmet Asan).

Özdil et al. (2017) indicated that the phylogenetic studies used protein-encoding genes and these genes contained highly variable intron regions. The most commonly used genes are elongation factor 1, calmodulin,  $\beta$  tubulin, actin and histone genes. These genes are more variable among species than the ITS region and are therefore more useful in identification of *Penicillium* species.

In our study, *Penicillium chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. commune*, *P. manginii*, *P. camemberti*, *P. ubiquetum* and *P. sanguifluum* species were identified by ITS region and the identification was also supported by morphological colonial studies. The ITS gene sequences of the G4, G5, K29 and O9 isolates were matching with more than one species. However, the ITS sequence of the G5 isolate showed the optimal matching with *P. hordei* (Table 1) which the position in the phylogenetic tree (drawn using their related type strains) also supports this (Figure 1). Although the ITS sequence of O9 isolate shows 100% matching with two different species (Table

1), the phylogenetic tree (Figure 1) indicates *P. sanguifluum*.

The ITS data set and phylogenetic tree results of K29 and G4 isolates indicate *Penicillium canescens*, *P. murcianum* and *P. janczewski* species within the same query cover and identity. Morphological data have also been used for identification of these isolates. In conclusion, our study showed that, in addition to the ITS region for the identification of *Penicillium* species, the examinations of other alternative gene regions may be useful for identification of these species.



## References

- Abastabar, M., Mirhendi, H., Hedayati, M.T., Shokohi, T., Matehkolaei, A.R., Mohammadi, R., Badali, H., Moazeni, M., Haghani, I., Ghoghji, A. and Akhtari, J. (2016). Genetic and morphological diversity of the genus *Penicillium* from Mazandaran and Tehran Provinces. *Jundishapur Microbiol.* 9 (1), 1-7.
- Asan, A. and Ekmekçi, S. (2002). Contribution to the colonial and morphological characteristics of some *Aspergillus* species isolated from soil. *J. Fac. Sci. Ege Univ.* 25 (1), 121-139.
- Asan, A. and Ekmekçi, S. (1994). The determination of *Penicillium* and *Aspergillus* species in Edirne soils and their seasonal distribution. *Turk. J. Biol.* 18 (4), 291-303.
- Asan, A., Okten, S. and Sen, B. (2010). Airborne and soilborne microfungi in the vicinity Hamitabat Thermic Power Plant in Kırklareli City (Turkey), their seasonal distributions and relations with climatological factors. *Environmental Monitoring and Assessment.* 164 (1-4), 221-231.
- Asan, A. (1997a). Trakya Bölgesi mısır tarlaları mikrofungus florası –I (Microfungi flora occurrence in the corn fields of European Part of Turkey-1). *Turk. J. Biol.* 21 (1), 89-101.
- Asan, A. (1997b). Trakya Bölgesi mısır tarlaları mikrofungus florasi üzerinde araştırmalar-II. (Studies on the microfungi flora occurrence in the corn fields of European Turkey-II). *Kukem Derg.* 20 (1), 9-18.
- Azaz, A.D. (2003). Isolation of soil borne fungi in fields irrigated by GAP in Harran plain using two isolation methods. *Turk. J. Bot.* 27 (2), 83-92.
- Ekmekçi, S. (1975). Güney yarı Ege Bölgesi topraklarından izole edilen *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri. *Bitki.* 2, 19-29.
- İlhan, S. and Asan, A. (2001). Soilborne fungi in wheat fields of Kırka Vicinity (Eskişehir - Turkey). *Biologia.* 56 (4), 363-371.
- Hasenekoğlu, İ. and Sülün, Y. (1991). Erzurum Aşkale çimento fabrikasının kirlendiği toprakların mikrofungus florası üzerine bir araştırma. *Turk. J. Bot.* 15 (1), 20-27.
- Hasenekoğlu, İ. and Azaz, A.D. (1991). Sarıkamış civarındaki traşlanmış orman alanları topraklarının mikrofungus florası ve bunun normal orman toprakları florası ile karşılaştırılması üzerine bir araştırma. *Turk. J. Bot.* 15, 214-226.
- Houbraken, J., Frisvad, J.C. and Samson, R.A. (2011). Taxonomy of *Penicillium* Section Citrina. *Stud. In Mycol.* 70, 53-138.
- Houbraken, J., Frisvad, J.C. and Samson, R.A. (2010). Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity.* 44, 117-133.
- Kara, Ö. and Asan, A. (2007). Microbial community structure from forest soils in Northern Thrace Region, Turkey. *Annals of Microbiol.* 57 (2), 149-155.
- Marshall, R.T. (1992). Standard methods for the examination of dairy products, 16th ed. APHA, Washington, D.C.
- Öner, M. (1970). Soil microfungi of Turkey. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 42, 81-87.
- Öner, M. (1974). Seasonal distribution of some *Fungi Imperfecti* in the soils of Western part of Anatolia. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 52, 267-268.
- Ozdil, S., Asan, A., Sen, B. and Okten, S. (2017). Evlerde kullanılan buzdolaplarının iç ortamında havayla taşınan fungusların biyoçeşitliliği (Biodiversity of airborne fungi in the indoor environment of refrigerators using in houses). *Mantar Derg.* 8 (2), 109-124.
- Pitt, J.I. (2000). A laboratory guide to common *Penicillium* species. Food Science, Australia.
- Pitt, J.I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London.
- Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. and Andersen, B. (2010). Food and Indoor Fungi. CBS KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, The Netherlands.
- Skouboe, P., Frisvad, J.C., Taylor, J.W., Lauritsen, D., Boysen, M. and Rossen, L. (1999). Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of Terveticillate *Penicillium* species. *Mycol. Res.* 103 (7), 873-881.
- Thom, C. (1910). Cultural studies of species of *Penicillium*. U.S. Dept. Agriculture. Bur. Anim. Ind. Bul. Washington. 118, 1-109.
- Türkmenoğlu, Y. (2012). Meriç Nehri'nin Kapıkule-Enez arasındaki yatak değişimlerinin taşkınlar ile ilişkisi. MSc Thesis. Istanbul Univ. Inst. Soc. Sci. Istanbul.
- Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F. (eds.). (1992). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd ed. APHA, Washington, D.C.



Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvard, J.C., Hong, S.B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T. and Samson, R.A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud. In Mycol.* 78, 343-371.

Waksman, S.A. (1922). A method for counting the number of fungi in the soil. *J. Bact.* 7 (3), 339-341.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. and Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 15, 315-322. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky,

J.J., White, T.J. (Eds). PCR protocols: a guide to methods and applications PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, Inc., New York.

Zal, N. (2006). Aşağı Meriç Vadisi taşkın ovası'nın biyosfer rezervi olarak belirlenmesi üzerine bir araştırma (A study on the implementation of lower Meric Valley flood plain as a biosphere reserve). PhD Thesis. Ankara Univ. The Graduate School of Natural and Applied Sciences. Ankara.





Geliş(Received) :18/12/2018  
Kabul(Accepted) :21/02/2019

Araştırma Makalesi/Research Article  
Doi:10.30708mantar.498766

## A New *Elaphomyces* Record for Turkey

Yasin UZUN<sup>1</sup>, Abdullah KAYA\*<sup>2</sup>

\*Corresponding author :kayaabd@hotmail.com

<sup>1,2</sup>Karamanoğlu Mehmetbey University, Science Faculty, Department of Biology, 70100  
Karaman, TURKEY

<sup>1</sup>Orcid ID:0000-0002-6423-6085/ yasinuzun\_61@hotmail.com

<sup>2</sup>Orcid ID: 0000-0002-4654-1406/ kayaabd@hotmail.com

**Abstract:** The hypogeous Ascomycete species, *Elaphomyces septatus* Vittad. was recorded for the first time from Turkey. Short description of the species was provided together with its photographs related to its macro and micromorphology.

**Key words:** Biodiversity, *Elaphomyces*, hypogeous fungi, new record, Turkey

### Türkiye İçin Yeni Bir *Elaphomyces* Kaydı

**Öz:** Toprakaltı Askomiset türü olan *Elaphomyces septatus* Vittad. Türkiye'den ilk kez kaydedilmiştir. Türe ait kısa betim, türün makro ve mikromorfolojisine ilişkin fotoğrafları ile birlikte verilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Biyoçeşitlilik, *Elaphomyces*, toprakaltı mantarlar, yeni kayıt, Türkiye

#### Introduction

*Elaphomyces* Nees is a macrofungus genus in the family *Elaphomycetaceae*. Most members of the genus are hypogeous, developing their sporocarps beneath the soil, although some are emergent or epigeous. Species of the genus are characterized by a globose to subglobose or irregular hypogeous ascomata, fleshy to leathery peridium, a single chamber gleba, a more or less powdery spore mass, globose to subglobose 1-8 spored asci, subglobose to globose spores (Trappe, 1979; Castellano et al. 2012; Castellano and Stephens, 2017; Castellano et al., 2016; Castellano et al., 2018).

*Elaphomyces* species have a cosmopolitan distribution, and occur in forest habitats ranging from tropics to temperate and subarctic conifer forests. They form ectomycorrhizal associations with roots of many trees and shrubs (Castellano et al., 2018).

Although many members of *Elaphomyces* have worldwide distribution (Castellano et al., 2018), only three species, *Elaphomyces granulatus* Fr., *E. leucocarpus* Vittad. and *E. muricatus* Fr., have so far been reported from Turkey (Türkoğlu et al., 2015; Uzun and Kaya, 2019). According to the current checklists (Sesli and Denchev, 2014; Solak et al., 2015) and the latest contributions (Kaya et al., 2016; Işık and Türkekul, 2017; Kaşık et al., 2017; Keleş and Oruç, 2017; Türkekul

2017; Uzun et al. 2017; Uzun and Acar, 2018; Sadullahoğlu and Demirel, 2018; Sesli, 2018; Uzun et al., 2018 a,b), *Elaphomyces septatus* Vittad. hasn't been previously reported from Turkey.

The study aims to make a contribution to Turkish mycobiota.

#### Materials and Methods

*Elaphomyces* samples were collected from Beykoz (Polonezköy) district of İstanbul province in 2018. Macro photos of the fruit bodies were taken in the field and necessary morphological and ecological characteristics were recorded. Then the collected specimens were brought to the fungarium within paper bags, for further investigations. Microscopic studies were carried out on dried specimens through a Nikon Eclipse Ci trinocular light microscope from the specimens mounted in water and Melzer's reagent. The samples were identified with the help of Vittadini (1831), Lange (1956), Montecchi and Sarasini (2000), Vidal (2000), Rubio et al. (2006), Paz et al. (2012) and Paz et al. (2017). The specimens are kept at Karamanoğlu Mehmetbey University, Kamil Özdağ Science Faculty, Department of Biology.



## Results

*Elaphomyces septatus* was presented with a brief description, habitat, locality and voucher number. The systematics of the species is given in accordance with Kirk et al. (2008) and the Index Fungorum ([www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org); accessed 15 December 2018).

**Ascomycota** Caval.-Sm.

**Eurotiales** G.W. Martin ex Benny & Kimbr.

**Elaphomycetaceae** Tul. ex Paol.

**Elaphomyces** Nees

***Elaphomyces septatus*** Vittad.

### Macroscopic and microscopic features:

Ascomata 18-35 mm in diameter, hypogeous, globose, subglobose or pyriform, with several depressions, without basal protuberance, blackish-brown. Cortex hard, dark brown, 350-700  $\mu\text{m}$ . Peridium thick, 1.5-2 mm, dark brown, similar to cortex in structure. Gleba white when young, cream with pinkish tones when mature. Ascospores 22-35  $\mu\text{m}$  in diameter, spherical, gray, grayish yellow or yellow, covered with rather fine delicate spines of up to 33.5  $\mu\text{m}$  in height.

**Ecology:** *Elaphomyces septatus* grows in deciduous montane forests, under *Quercus* L., *Fagus* L., *Carpinus* L. (Vittadini, 1831; Vidal, 2000).

**Specimen examined:** İstanbul, Beykoz, Polonezköy Nature Park, *Fagus*, *Quercus*, *Pinus* L., and *Tilia* L. mixed forest, around *Fagus* tree, under soil and plant debris, 41°06'N-29°11'E, 200 m, 05.03.2018, Yuzun 6279.

## Discussions

*Elaphomyces septatus* was reported for the first time from Turkey, and general characteristics of the specimen are generally in agreement with those given in literature. This species produces an ascoma similar to *E. maculatus* Vittad., but differs with pale spore coloration until the end of maturation and the absence of green mycelium and base protrusion, the presence of nodules in the capillitium, and the smaller spores. *Elaphomyces leucosporus* Vitt. also presents pale spores, but differs from *E. septatus* by its smaller size, greenish mycelial layer around the ascoma, and the smaller spores of 18-20  $\mu\text{m}$  (Vidal, 2000).

The fruit body had a very slight soft odor but it was not distinctly recognizable. Though Rubio et al. (2006) mentions about a pleasant and slightly menthol odor, we could not recognize it distinctly.

With the addition of *E. septatus*, current taxa number of the genus *Elaphomyces* in Turkey increased to four (Türkoğlu et al., 2015; Uzun and Kaya, 2019).

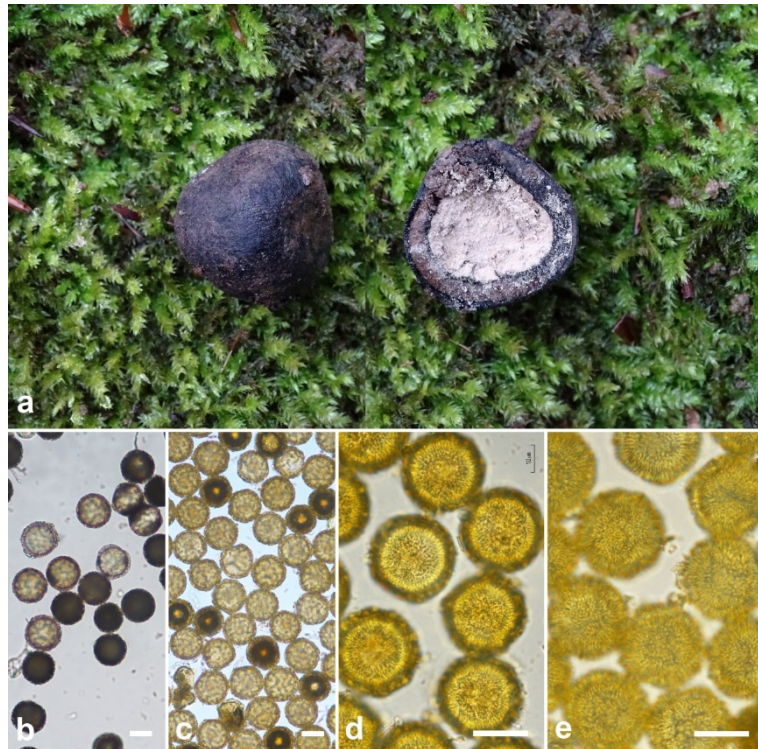


Figure 1. *Elaphomyces septatus*: a. ascocarps, b-e. ascospores (bars 20  $\mu\text{m}$ ) (b in water, c-e in Melzer)





### Acknowledgement

The authors would like to thank Ömer UZUN for his kind help during field study.

### References

- Castellano, M.A., Beever, R.E. and Trappe, J.M. (2012). Sequestrate fungi of New Zealand: *Elaphomyces* (Ascomycota, Eurotiales, Elaphomycetaceae). *New Zealand Journal of Botany*, 50(4): 423–433.
- Castellano, M.A., Dentinger, B.T.M., Séné, O., Elliot, T.F., Truong, C. and Henken, T.W. (2016). New species of *Elaphomyces* (Elaphomycetaceae, Eurotiales, Ascomycota) from tropical rainforests of Cameroon and Guyana. *IMA Fungus*, 7(1): 59-73.
- Castellano, M.A., Elliott, T.F. and Trappe, J.M. (2018). Three new black *Elaphomyces* species (Elaphomycetaceae, Eurotiales, Ascomycota) from eastern North America with notes on selected European species. *Fungal Systematics and Evolution*, 1: 1-12.
- Castellano, M.A. and Stephens, R.B. (2017). *Elaphomyces* species (Elaphomycetaceae, Eurotiales) from Bartlett Experimental Forest, New Hampshire, USA. *IMA Fungus*, 8(1): 49–63.
- Index Fungorum (2018): <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. Accessed 15 December 2018.
- Işık, H. and Türkekul, İ. (2017). A new record for Turkish mycota from Akdağmadeni (Yozgat) province: *Russula decolorans* (Fr.) Fr. *Anatolian Journal of Botany*, 1(1): 1-3.
- Kaşık, G., Aktaş, S., Alkan, S. and Öztürk, C. (2017). Additions to the Macrofungi of Selçuk University Alaeddin Keykubat Campus (Konya). *The Journal of Fungus*, 8(2): 129-136.
- Kaya, A., Uzun, Y., Karacan, İ.H. and Yakar, S. (2016). Contributions to Turkish Pyronemataceae from Gaziantep province. *Turkish Journal of Botany*, 40(3): 298-307.
- Keleş, A. and Oruç, Y. (2017). *Leucocoprinus brebissonii* (Godey) Locq, A New Record for Turkish Mycobiota. *Anatolian Journal of Botany*, 1(2): 49-51.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. and Stalpers, J.A. (2008). *Dictionary of the Fungi*, 10th ed., Wallingford: CAB International.
- Lange, M. (1956). *Danish Hypogeous Macromycetes*. Dansk Botanisk Arkiv Bind 16 Nr 1. Copenhagen: Ejnar Munkscaard.
- Montecchi, A. and Sarasini, M. (2000). *Fungi Ipogei D'Europa*. Vicenza: Fondazione Centro Studi Micologici dell'AMB.
- Paz, A., Bellanger, J.M., Lavoise, C., Molia, A., Ławrynowicz, M., Larsson, E., Ibarguren I.O., Jeppson, M., Læssøe, T., Sauve, M., Richard, F., Moreau, P.A. (2017). The genus *Elaphomyces* (Ascomycota, Eurotiales): a ribosomal DNA-based phylogeny and revised systematics of European 'deer truffles'. *Persoonia*, 38: 197–239.
- Paz, A., Lavoise, C., Barrio, L., Richard, F., Moreau, P.A. (2012). Propuesta de dos nuevas especies del género *Elaphomyces*, dos primeras citas para la Península Ibérica y una clave de identificación de las especies del género para Europa. *Bol. Micol. FAMCAL*, 7: 85-104.
- Rubio, E., Miranda, M.A., linde, J., Suárez, A., García, F., Juste, P. (2006). Catálogo provisional de hongos hipogeos de Asturias y posibles fitobiontes asociados. *Revista Catalana de Micologia*, 28: 1-40.
- Sadullahoğlu, C. and Demirel, K. (2018). *Flammulina fennae* Bas, A new record from Karz Mountain (Bitlis). *Anatolian Journal of Botany*, 2(1): 19-21.
- Sesli, E. (2018). *Cortinarius* ve *Lyophyllum* Cinslerine Ait Yeni Kayıtlar. *Mantar Dergisi*, 9(1): 18-23.
- Sesli, E. and Denchev, C.M. (2014). Checklists of the myxomycetes, larger ascomycetes, and larger basidiomycetes in Turkey. 6th edn. Mycotaxon Checklists Online (<http://www.mycotaxon.com/resources/checklists/sesli-v106-checklist.pdf>): 1-136.
- Solak, M.H., Işıloğlu, M., Kalmış, E. and Allı, H. (2015). *Macrofungi of Turkey, Checklist, Volume- II*. İzmir: Üniversiteler Ofset.
- Trappe, J.M. (1979). The orders, families, and genera of hypogeous *Ascomycotina* (truffles and their relatives). *Mycotaxon*, 9: 297-340.



- Türkeul, İ. (2017) *New Calbovista, Mycena, Rhizopogon, Stictis, and Symphyosirinia records from Turkey*. *Mycotaxon*, 132(3)503-512.
- Türkoğlu, A., Castellano, M.A., Trappe, J.M. and Yaratanakul Güngör, M. (2015). Turkish truffles I: 18 new records for Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 39(2): 359-376.
- Uzun, Y. and Acar İ. (2018). A New *Inocybe* (Fr.) Fr. Record for Turkish Macrofungi. *Anatolian Journal of Botany*, 2(1): 10-12.
- Uzun, Y., Acar, İ., Akçay M.E. and Kaya A. (2017). Contributions to the macrofungi of Bingöl, Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 41(5): 516-534.
- Uzun, Y., Karacan, İ.H., Yakar, S. and Kaya, A. (2018a). New bryophilic *Pyronemataceae* records for Turkish *Pezizales* from Gaziantep province. *Anatolian Journal of Botany*, 2(1): 28-38.
- Uzun, Y. and Kaya, A. (2019). *Elaphomyces granulatus*, A New Hypogeous Ascomycete Record for Turkey. *KSU Journal of Agriculture and Nature*, 22(1): 85-88.
- Uzun, Y., Yakar, S., Karacan, İ.H., and Kaya, A. (2018b). New additions to the Turkish *Pezizales*. *Turkish Journal of Botany*, 42(3)335–345.
- Vidal, J.M. (2000). Dos hipogeos de Carlo Vittadini a menudo confundidos: *Elaphomyces maculatus* y *Elaphomyces septatus*. *BULL. FAMM.*, N. S. 18: 119-126.
- Vittadini, C. (1831). *Monographia Tuberacearum*. Milano: Rusconi.



Geliş(Received) :17/01/2019  
Kabul(Accepted) :05/03/2019

Araştırma Makalesi/Research Article  
Doi:10.30708mantar.513976

## ***Inocybe sphagnophila* Bandini & B. Oertel (Agaricales, Inocybaceae): A new record for the Turkish mycota**

Ertugrul SESLİ<sup>1\*</sup>, Ditte BANDINI<sup>2</sup>

\*Corresponding author: ertugrulsesli@trabzon.edu.tr

<sup>1</sup>Trabzon University, Fatih Faculty of Education, Trabzon, TURKEY

Orcid ID: 0000-0002-3779-9704 / ertugrulsesli@trabzon.edu.tr

<sup>2</sup>Panoramastr. 47, 69257 Wiesenbach, GERMANY. / ditte.bandini@adw.uni-heidelberg.de

**Abstract:** *Inocybe sphagnophila* Bandini & B. Oertel belonging to the nodulose-spored *Inocybe* subsection *Napipedinae* (Agaricales, Inocybaceae) is described as a new record for the Turkish mycota. Basidiomata were collected from Haçkalı Baba Plateau, Düzköy, Trabzon. This species obviously is not uncommon, but has hitherto probably been confused with another species of the same subsection, as for instance *Inocybe assimilata* (Britzelm.) Sacc. Identification of the collection was made according to the morphological findings and has been confirmed by the molecular analysis.

**Key words:** *Basidiomycota*, Fungal taxonomy, Trabzon, Turkey

### ***Inocybe sphagnophila* Bandini & B. Oertel (Agaricales, Inocybaceae): Türkiye mikotası için yeni bir kayıt**

**Öz:** *Inocybe* cinsinin sporları nodüllü olan alt seksiyonu *Napipedinae* (Agaricales, Inocybaceae) grubuna ait *Inocybe sphagnophila* Bandini & B. Oertel Türkiye mikotası için yeni kayıt olarak tanımlanmıştır. Bazidiyomalar Trabzon, Düzköy Haçkalı Baba yaylasından toplanmıştır. Bu tür ender rastlanan bir tür olmamakla birlikte, muhtemelen şimdiye kadar aynı alt seksiyonun türleri ile, örneğin *Inocybe assimilata* Britzelm. ile karıştırılmış olabilir. Koleksiyonun teşhisi morfolojik bulgulara göre yapılmış ve moleküler analizlerle doğrulanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Basidiomycota*, Fungal taksonomi, Trabzon, Türkiye

#### **Introduction**

*Inocybe* (Fr.) Fr., the ectomycorrhizal large genus is represented with more than 2000 species worldwide and more than 80 in Turkey (Kirk et al., 2008; Akata et al., 2011; Keleş et al., 2014; Sesli and Denchev, 2014; Doğan and Kurt, 2016; Akata et al., 2018; Uzun and Acar, 2018). They can be seen almost all year round, especially during the autumn. Their basidiomata are similar to tricholomatoid, collybioid and mycenoid agarics and may be greyish, brownish, yellowish, whitish, greenish or violaceous. The pileus is usually of medium size, rimose to fibrillose or scaly and generally dry. The lamellae are adnexed to broadly adnate; at first often whitish, then greyish to brownish or slightly yellowish to olivaceous. The stipe is generally either only near the apex or entirely pruinose. The odor is mostly spermatic, and the taste is

usually indistinct or faintly bitter. Basidiospores are either smooth and (sub)amygdaloid, (sub)ellipsoid or (sub)ovoid in form, or angular-nodulose - and yellowish to pale brownish or grey-brownish in colour. Species of the subgenera *Malloocybe* and *Inosperma* have thin-walled cheilocystidia and no pleurocystidia, while species of the subgenus *Inocybe* mostly have thick-walled cheilocystidia and pleurocystidia (Knudsen and Vesterholt, 2008).

A revision of some Central European species of *Inocybe* (Fr.: Fr.) Fr. subgenus *Inocybe* was conducted by Bandini et al. (2018) with the description of five new species. Other recent studies show, that the *Inocybe praetervisa* group consists of several closely related species (Esteve-Raventós et al., 2015; Esteve-Raventós et al., 2016; Larsson et al., 2018). The aim of the present



study is to contribute to the Turkish mycota by introducing a new record.

### Materials and Methods

Basidiomata were collected from Haçkalı Baba Plateau in *Picea orientalis* L. dominated forest of the Euro-Siberian Floristic Region of Turkey on 18.10.2015. Floristic elements, morphological structures and mycorrhizal relationships were noted in the field after taking photos of the basidiomata. Free hand sections from the pileus, lamellae and stipe were obtained under stereo binocular microscope, mounted in concentrated ammonia, subsequently stained with Congo red and later examined under Zeiss A2 Axio Imager trinocular research microscope equipped with an AxioCamERc5s camera. Micro-slides of the pileipellis, cystidia, basidia and the basidiospores were obtained and the measurements were made by using the Axio Imager software (Cléménçon, 2009). Morphological findings have been confirmed by the molecular analysis (ITS, GenBank code: 6874 MK431097) using standard methods.

The exsiccata are kept at a personal fungarium of the Fatih Faculty of Education in the Trabzon University, Trabzon, Turkey.

### Taxonomy

#### *Inocybe sphagnophila* Bandini & B. Oertel, *Mycologia Bavarica* 18: 20 (2017) [Figures 1-3]

Pileus 20-50 mm, conical to campanulate; grey-brown, pale nut-brown, chestnut- or dark brown with a reddish hue, also almost blackish brown at the center; umbo very large, and pileus sometimes slightly depressed around the center when old; typically striate with darker fibers on lighter ground and therefore often with intense colour-contrast; margin involute or straight with whitish to greyish remnants of a cortina; somewhat hygrophanous; surface rimose, innately fibrillose and often verrucose at the center. Lamellae narrowly adnate to emarginate or subdistant with decurrent tooth; mostly irregular, moderately crowded ( $L = 35-45$ ,  $I = 1-3$ ); light greyish-brown, beige or slightly reddish brown. Stipe 40-70 × 5-10 mm, cylindrical, sometimes curved; generally widening towards the base. Stipe base usually thickened and covered typically with whitish mycelium; striate, glabrous; beige to pale brownish, light brown with a reddish hue; with whitish or reddish pruina towards apex. Context whitish to pale brownish; smell either none or subspermatocal when cut. Basidiospores angular-nodulose, sometimes (sub) isodiametric, with 8-11

irregular prominent mostly rounded nodules; 6.5-8.0 (9.7) × 4-5.5 (7)  $\mu\text{m}$ , on average 7.6 × 5.2  $\mu\text{m}$  ( $n = 50$ ). Basidia clavate, 27.6-34.9 × 9-10.9  $\mu\text{m}$ , generally 4-spored, sometimes 2-spored. Paracystidia thin-walled, hyaline, clavate, subglobose or subcylindrical. Pleurocystidia (sub)fusiform, (sub)clavate, (sub)utriform or (sub)cylindrical with or without crystals, 50.9-70.4 × 15-18.6  $\mu\text{m}$ . Cheilocystidia similar to pleurocystidia. Pileipellis consists of an epicutis made up of 4.5-10.8  $\mu\text{m}$  wide parallel hyphae with encrusting, parietal brownish pigment. Caulocystidia only at the extreme apex of a stipe, sublageniform or subfusiform, in combination with many long and narrow, sometimes subcapitate and forked elements, 25-136 × 9.3-13.6  $\mu\text{m}$ . Clamp-connections present at all tissues. Morphological findings are accordance with the ITS sequence (code: 6874 MK431097) submitted to the GenBank.

### Specimen examined

Turkey, Trabzon, Düzköy, Haçkalı Baba Plateau on, 40°49'30.76" N, 39°26'42.78" E, 1924 m alt., under *Picea orientalis*, 18.10.2015, Sesli 3571.

### Discussion

*Inocybe sphagnophila* is described by Bandini et al. (2017) from Germany under *Picea abies* Degen and *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. with *Sphagnum*. The Turkish collection was under *Picea orientalis* among mosses. Bandini et al. (2017) state that *I. sphagnophila* is not a rare species and up to now also recorded from Austria, France, Italy, and the USA. While the measurements given in Bandini et al. (2017) are 10-40 mm (pileus) and 20-60 × 3-5 mm (stipe), the pileus of the Turkish collection is slightly larger (20-50 mm) and the stipe is 40-70 × 5-10 mm. The spores of the holotype collection from Germany are on av. < 8  $\mu\text{m}$  long, and the pleurocystidia are on av. < 55  $\mu\text{m}$  long. The spores of the Turkish collection are of nearly the same size, on average 7.6 × 5.2  $\mu\text{m}$ , while the pleurocystidia are slightly larger 50.9-70.4 × 15-18.6  $\mu\text{m}$ . The basidia of the new record is 27.6-34.9 × 9-10.9  $\mu\text{m}$ , while the measurements of the German collections are 9-31 × 8-12  $\mu\text{m}$ . The differences between Turkish and German collections are thus rather negligible, and we think that they may be caused by different environmental conditions. However, colour and context of the pilei match those of the German collections and one crucial characteristic, the undate, often subcapitate and forked caulocystidia are to be observed in the Turkish collection as well.





Figure 1. *Inocybe sphagnophila*: a, b and c. basidiomata (scale bars: 20 mm).

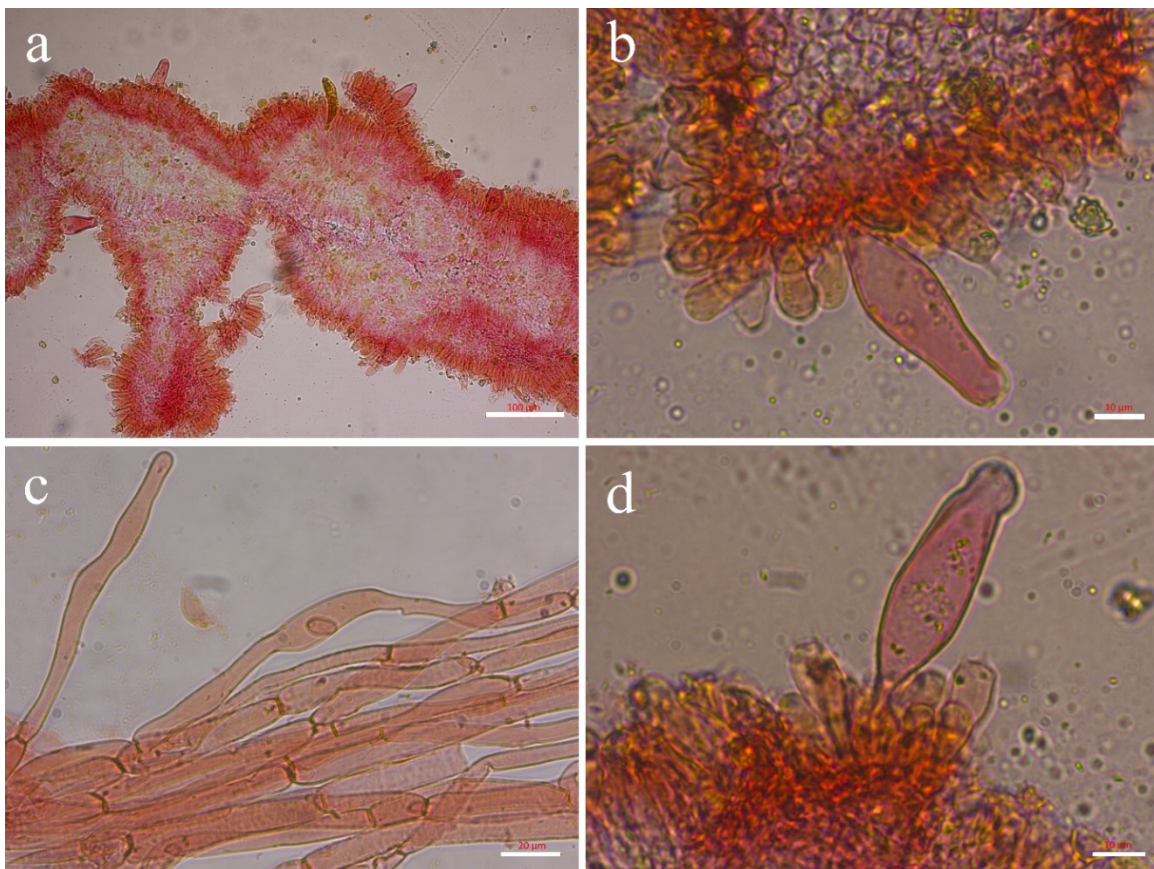


Figure 2. *Inocybe sphagnophila*: a. cross-sections through the lamella, b and d. pleurocystidia, c. pileipellis (scale bars: a= 100 µm, b and d= 10 µm, c= 20 µm).





On the whole thus both the macroscopical aspect as the microscopical details fit thus very well with the original description of *I. sphagnophila*. Furthermore, a genetical analysis (ITS= GenBank code: 6874 MK431097) shows molecular identity of the Turkish collection with the type collection. *I. sphagnophila* can mainly be distinguished from other species of the subsection *Napipedinae* such as *I. assimilata* (Britzelm.) Sacc., *I. napipes* J.E. Lange, or *I. acuta* Boud. by the combination of the often conspicuous whitish cortina, shape and/or size of spores and hymenial cystidia.

### Acknowledgment

This work was financially supported by the Karadeniz Technical University (BAP: FAT-2017-7044).

### References

- Akata I., Halıcı M.G., Uzun Y. (2011). Additional macrofungi records from Trabzon province for the mycobiota of Turkey. *Turk J Bot*, 35(3)309-314.
- Akata I., Kabaktepe Ş., Sevindik M., Akgül H. (2018). Macrofungi determined in Yuvacık basin (Kocaeli) and its close environs. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 18(2)152-163.
- Bandini D., Christan J., Eberhardt U., Ploch S., Tahir A., Oertel B. (2017). Thines M., *Inocybe sphagnophila* sp. nov., eine neue art der höckersporigen untersektion *Napipedinae* der gattung *Inocybe* (Agaricales). *Mycologia Bavarica*, (16)53-69 (in German).
- Bandini D., Oertel B., Ploch S., Ali T., Vauras J., Schneider A., Scholler M., Eberhardt U., Thines M. (2018, online version). Revision of some central European species of *Inocybe* (Fr.: Fr.) Fr. subgenus *Inocybe*, with the description of five new species. *Mycological Progress*, 24.10.2018, <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1439-9>.
- Cléménçon H. (2009). *Methods for Working with Macrofungi: Laboratory Cultivation and*
- Preparation of Larger Fungi for Light Microscopy*. Germany: Erchtesgadener Anzeiger.
- Doğan H.H., Kurt F. (2016). New macrofungi records from Turkey and macrofungal diversity of Pozanti-Adana. *Turk J Bot*, (40)209-217.
- Esteve-Raventós F., Moreno G., Alvarado P., Olariaga I. (2016). Unraveling the *Inocybe praetervisa* group through type studies and ITS data: *Inocybe praetervisoides* sp. nov. from the Mediterranean region. *Mycologia* (108)123-134.
- Esteve-Raventós F., Moreno G., Bizio E., Alvarado P. (2015). *Inocybe flavobrunnescens*, a new species in section *Marginatae*. *Mycol Prog* 14(14).
- Keleş A., Demirel K., Uzun Y., Kaya A. (2014). Macrofungi of Ayder (Rize/Turkey) high plateau. *Biological Diversity and Conservation*, 7(3)177-183.
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalfers J.A., *Authors of Fungal Names*, CABI Bioscience Wallingford, UK (2008).
- Knudsen H., Vesterholt J. (2008). *Funga Nordica. Agaricoid, Boletoid and Cyphelloid Genera*. Denmark: Nordsvamp.
- Larsson E., Vauras J., Cripps C.L. (2018). *Inocybe praetervisa* group - A clade of four closely related species with partly different geographical distribution ranges in Europe. *Mycoscience*, 59(4)277-287.
- Sesli E., Denchev C.M. (2014). Onward (Continuously Updated). Mycotaxon Webpage. Available online at <http://www.mycotaxon.com/resources/weblists.html>.
- Uzun, Y., Acar İ. (2018). A new *Inocybe* (Fr.) Fr. record for Turkish macrofungi. *Ant J Bot*, 2(1)10-12.



Geliş(Received) :29/01/2019  
Kabul(Accepted) :14/03/2019

Araştırma Makalesi/Research Article  
Doi:10.30708mantar.519223

## Çorum İli'nden Toplanan *Agaricaceae* Familyasına Ait Bazı Mantarlarda Ağır Metal Birikiminin Belirlenmesi

İlker AKIN<sup>1</sup> Sinan ALKAN<sup>2\*</sup> Gıyasettin KAŞIK<sup>3</sup>

\*Sorumlu yazar:sinanalkan42@gmail.com

<sup>1</sup>Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Bölümü,  
Meram/Konya/TÜRKİYE

Orcid ID: 0000-0002-8683-0210/ ilker0997@gmail.com

<sup>2,3</sup>Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Selçuklu/Konya/TÜRKİYE

<sup>2</sup>Orcid ID: 0000-0001-7725-1957/ sinanalkan42@gmail.com

Orcid ID: 0000-0001-8304-6554 / giyasettinkasik@hotmail.com

**Öz:** Mantarlar canlılar alemi içerisinde hem tür sayısı bakımından hem de besin değerleri açısından önemli bir yere sahiptir. Besin değerlerinin yanı sıra mantarların insan sağlığı için de önemi büyüktür. Ancak mantarların akümülatif özelliklerinden dolayı toprakta ve havadaki ağır metal iyonlarını bünyelerine toplayarak insan sağlığı için zararlı olabiliyorlar. Ayrıca mantarlar bu özellikleri sayesinde iyi bir çevre monitörüdürler. Bu çalışmada Çorum İl sınırları içerisinde toplanan bazı agarikoit mantar örneklerinin ağır metal (Al, As, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Se ve Zn) iyon içerikleri ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) spektrometresi kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada Çorum İl sınırları içerisinde farklı coğrafik bölgelerde yetişen *Agaricaceae* familyasına ait mantar örneklerindeki ağır metal element seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak yapılan çalışmada kullanılan mantar örnekleri için minimum ve maksimum ağır metal iyon konsantrasyonları tespit edilmiştir. İncelenen mantarların hepsinde arsenik ve nikel hariç, tüm mineraller tespit edilmiştir. Araştırmada mantarların içeriklerindeki ağır metaller bakımından en yüksek iyonlar Al, Fe ve Mg olarak, en düşük iyonlar ise Co, Pb ve Se olarak tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Yenilen mantarlar, Ağır metaller, ICP-OES, Çorum

### Determination of Heavy Metal Accumulation in Some Mushrooms of *Agaricaceae* Family Collected from Çorum Province

**Abstract:** Fungi have an important place in The World of Living in terms of both numbers of species and nutritional values. Besides nutritional values, fungi are important for human health. However, due to the accumulative properties of fungi, they can collect heavy metal ions harmful to human health in the soil and air. In addition, fungi thanks to these features are a good environmental monitor. In this study, It was determined using ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) spectrometry that the heavy metal (Al, As, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Se, and Zn) ion contents of some agaricoit mushroom samples, which were collected within the borders of Çorum province. In this study, it was aimed to determine the heavy metal element levels in the fungus samples belonging to the *Agaricaceae* family growing in different geographically regions within the boundaries of Çorum. In conclusion, minimum and maximum heavy metal ion concentrations were determined for the mushroom samples used in the study. In all mushrooms examined, all minerals except arsenic and nickel were determined. In the study, the highest ions in terms of heavy metals in the contents of fungi were Al, Fe and Mg, while the lowest ions were Co, Pb and Se.

**Key words:** Edible mushrooms, Heavy metals, ICP-OES, Çorum



## Giriş

Mantarlar doğadan direk olarak besin değerleri açısından toplanıp tüketilmektedir. Yüksek protein ve vitamin içerikleri nedeni ile son yıllarda doğadaki mantarların yanı sıra kültür mantarlarının da tüketimi önem kazanmaktadır. Ülkemiz sahip olduğu zengin biyoçeşitlilik ile gerek besinsel açıdan gerekse tıbbi açıdan birçok makromantar türünü bünyesinde barındırmaktadır (Sevindik ve ark., 2016).

Çalışma alanı olan Çorum İli, Türkiye'nin kuzey kesiminde Orta Karadeniz bölümünde yer almaktadır. İç Anadolu'nun karasal iklimi ile Karadeniz bölgesinin bol yağışlı iklimi arasında geçiş bölgesinde yer aldığı için il yağışlı ve karasal bir iklim özelliği göstermektedir. Bu nedenle özellikle bahar aylarında nem ve sıcaklık mantarların gelişmesi için ideal seviyelerde olmaktadır. Bu uygun koşulların neticesinde ilin ormanlık alanlarında yöre halkının toplayıp besin veya ticari olarak kullanabildiği mantar türlerini bolca bulmak mümkündür.

Mantarlar da diğer canlılar gibi metal iyonlarını kendileri üretmez. Doğada başlıca yenilebilir mantar türlerinin ağırlıklı olarak kadmiyum, cıva ve kurşun başta olmak üzere yüksek oranlarda ağır metalleri akümüle ettikleri bilinmektedir (Kalac ve Svaboda, 2000). Mantarlar yetiştikleri ortamlardaki besin maddelerini ve metal iyonlarını absorpsiyon özellikleri vasıtasıyla doğrudan veya dolaylı yolla hücre içerisine alırlar ve yüksek konsantrasyonlarda depo edebilirler. Bu nedenle özellikle insan sağlığı için zararlı etkiye sahip metal iyonlarının doğrudan besin olarak alınan mantarlarda olup olmadığını tespit etmek önemlidir. Bu sayede çalışma alanında ağır metal kirliliğinin olup olmadığı tespit edilebilmektedir.

Canlı organizmalar, demir, kobalt, bakır, manganez, krom ve çinkoyu da içine alan eser miktarda bazı ağır metallere gereksinim duyarlar. Bununla birlikte, bu metallerin aşırı seviyeleri, canlı organizmalara zarar verebilir. Kadmiyum ve kurşun gibi diğer ağır metallerin organizmalar üzerinde bilinen yararlı bir etkisi yoktur (Sarıkürkçü ve ark., 2011; Falusi ve Olanipekun, 2007; Ouzouni ve ark., 2009).

Doğal mantarların ağır metal içerikleri konusunda ülkemizde ve dünyada çok sayıda çalışmalar yapılmıştır (Sesli ve Tüzen, 1999; Demirbaş, 2001; Işıldak ve ark., 2004; Türkekul ve ark., 2004; Doğan ve ark., 2006; Yamaç ve ark., 2007; Chen ve ark., 2009; Genççelep ve ark., 2009; Kaya ve Bağ, 2010; Radulescu ve ark., 2010; Uzun ve ark., 2011; Akgül ve ark., 2016; Karapınar ve ark., 2017). Bu konuda daha önceki yapılan çalışmalarda özellikle, otoyollar, metal eritme yerleri

veya madencilik alanları yakınında toplanan mantarların bazı elementlerin nispeten diğer bölgelere oranla daha yüksek seviyelerine sahip (Şen, 2012) olduklarını göstermiştir.

Bu çalışma ile Çorum İl'inden farklı lokalitelerden tespit edilen *Agaricaceae* familyasına ait türlerin ağır metal iyon içeriklerinin tespiti, ülkemizde daha önce yapılmış benzer çalışmalarla karşılaştırılması ve çevresel kirlenmelerin biyoindikatörleri olarak mantarların değerlendirilme olasılığını belirlemek amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Mantar örnekleri 2011-2012 yılları arasında yapılan arazi çalışmaları sırasında Çorum İl'inden farklı lokalitelerden toplanmıştır (Tablo 1). Örnekler toplanırken önce sırasıyla fotoğrafları çekilmiştir. Daha sonra uygun bir alet yardımı ile subsrattan veya topraktan morfolojik yapısına zarar vermeden çıkarılmıştır. Aynı zamanda toplanan örneğin özel morfolojik bilgileri, habitat, rakım ve bakı, GPS koordinatları ve çekilen fotoğraf numaraları not edilmiştir. Bu bilgilerin olduğu küçük bir not ile birlikte çıkarılan mantar örneği uygun büyüklükteki kese kağıtlarına sarılmış ve zarar vermeden fungaryum laboratuvarına getirilmiştir. Mantar örnekleri bozulmadan kurutma dolaplarında 40-45°C sıcaklıkta nemi kaybettirilerek kurutulmuştur. Kuruyan örnekler mikroskop (DM 1000 görüntüleme sistemi) altında incelenirken uygun literatür yardımı ile teşhisleri yapılmıştır (Breitenbach & Kränzlin, 1991, 1995; Buczacki, 1992; Jordan, 1995; Pegler et al., 1995;). Tablo 1'de sırasıyla çalışmada kullanılan mantarlara verilen kod, mantarın latince ismi, GPS koordinatları, habitatları ve toplandığı ilçe verilmiştir.

Kuruyan ve teşhisleri yapılan mantar örneklerinde ağır metal tayini için mantarların kurutulmuş örnekleri ultra saf su ile yıkandı, 10 saat 80° C'de kurutuldu ve toz haline getirildi. Mikroalganın teflon hücreleri içerisine 1'er gr toz numune alınarak üzerine 18 mL HNO<sub>3</sub> ve 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilmiştir ve gaz çıkışının tamamen bitmesi için çeker ocak içerisinde 5 dk bekletildikten sonra teflon hücreler kapatılarak, 1800 watt 200° C'de 15 dk mikroalgada çözümleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Teflon hücreler soğutulduktan sonra toplam hacim 25 ml'ye saf su ilave tamamlanmıştır. Mantar örnekleri için minimum ve maksimum ağır metal içeriklerinin belirlenmesi ICP-OES'de ölçümler alınarak gerçekleştirildi. Bu ölçümler sayesinde toplamda 13 ağır metal iyonunun (Al, As, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Se, Zn, Cd) mantarlardaki miktarları tespit edilmiştir.



Tablo 1: Mantar isimleri ve lokaliteleri

Mantarin kodu	Mantarin ismi	GPS koordinatı	Habitat	Toplandığı yer
M1	<i>Agaricus bitorquis</i> (Quél.) Sacc.	40°47'02 Kuzey 034°16'03 Doğu	Çam, Köknar karışık orman	İskilip
M2	<i>Agaricus campestris</i> L.	40°45'04 Kuzey 034°16'01 Doğu	Çam, Köknar karışık orman	Bayat
M3	<i>Agaricus campestris</i> L.	40°47'02 Kuzey 034°16'03 Doğu	Çam, Köknar karışık orman	İskilip
M4	<i>Coprinus comatus</i> (O.F. Müll.) Pers.	41°13'05 Kuzey 034°37'38 Doğu	Çam, Köknar, Kayın karışık orman	Kargı
M5	<i>Cystoderma amianthinum</i> (Scop.) Fayod	41°14'36 Kuzey 034°28'21 Doğu	Çam ormanı	Kargı
M6	<i>Cystoderma amianthinum</i> (Scop.) Fayod	40°23'13 Kuzey 034°27'47 Doğu	Çam ormanı	Uğurludağ
M7	<i>Cystoderma carcharias</i> (Pers.) Fayod	40°23'13 Kuzey 034°27'47 Doğu	Çam ormanı	Uğurludağ
M8	<i>Cystodermella granulosa</i> (Batsch) Harmaja	40°17'14 Kuzey 035°13'06 Doğu	Çam, Meşe karışık orman	Ortaköy
M9	<i>Lycoperdon molle</i> Pers.	41°13'43 Kuzey 034°30'09 Doğu	Çam, Kayın karışık orman	Kargı
M10	<i>Macrolepiota permixta</i> (Barla) Pacioni	41°14'49 Kuzey 034°41'21 Doğu	Çam, Köknar, Kayın karışık orman	Kargı

### Bulgular

Bu çalışmada kullanılan mantarlarda tespit edilen ortalama ağır metal konsantrasyonları mg/kg<sup>-1</sup> (mantarın kuru ağırlığı hesaba katılarak) olarak Tablo 2'de

verilmiştir. Mantarlardaki ağır metal konsantrasyonunun miktarı mantarın türü, örneklerini toplanma alanı, mantar miselinin veya mantarın olgunluğu ve örneğin kirlenmiş alanlara olan mesafesi ile ilişkilidir (Kalac ve ark., 1991).

Tablo 2: Mantarların Metal İçerikleri

Mantar Kodları	Ağır Metaller(mg/kg)											
	Al	As	Co	Cr	Cu	Fe	Mg	Mn	Ni	Pb	Se	Zn
M1	246,9	n.d.	0,188	0,861	9,049	244,2	1432	22,87	n.d.	0,288	0,405	51,39
M2	348,3	4,109	0,453	1,79	46,14	374,9	1783	35,54	n.d.	1,671	2,368	221,7
M3	3564	0,83	2,294	16,55	51,19	4340	2124	176,7	2,77	1,588	1,296	88,69
M4	334,9	0,442	0,334	2,0	39,12	377,1	2107	28,83	n.d.	0,674	1,865	152,2
M5	2140	4,012	3,296	31,41	97,43	5044	5534	139,5	18,2	2,611	0,699	139,0
M6	145,1	n.d.	0,219	1,205	33,17	173,1	633,7	43,68	n.d.	0,746	1,161	45,66
M7	536	n.d.	0,852	1,327	23,41	536	1031	17,62	n.d.	0,754	1,352	55,32
M8	315,3	n.d.	0,356	1,479	19,08	369,3	912,7	17,71	n.d.	0,841	1,035	45,57
M9	568,9	n.d.	0,337	3,124	16,85	611,8	1179	48,02	n.d.	1,657	1,56	65,65
M10	1654	0,803	1,575	10,15	73,65	1599	2363	53,89	n.d.	2,52	1,255	201,9

n.d.: tespit edilememiş

Çalışmamızda kullanılan mantarlardaki metal konsantrasyonu sırasıyla Al (145,1-3564 mg/kg), As (0,803-4,109 mg/kg), Co (0,188-3,296 mg/kg), Cr (0,861-31,41 mg/kg), Cu (9,049-97,43 mg/kg), Fe (173,1-1599 mg/kg), Mg (912,7-5534 mg/kg), Mn (17,62-176,7 mg/kg), Ni (2,77-18,2 mg/kg), Pb (0,288-2,611 mg/kg),

Se (0,405-2,368 mg/kg), Zn (45,57-221,7 mg/kg) olarak tespit edilmiştir.

Ayrıca tüm mantar numunelerinde kadmilyum metal ölçümü gerçekleştirilmiştir, ancak hiçbir numunede Cd tespit edilmemiştir.





### Tartışma

Bu çalışmada kullanılan yenilebilir mantarlar arasında en düşük ve en yüksek Al iyon konsantrasyonu *Cystoderma amianthinum* (Uğurludağ) 145,1 mg/kg ve *Agaricus campestris* (İskilip) 3564 mg/kg olarak tespit edilmiştir (Şekil 1). Benzer şekilde As iyon konsantrasyonu için en düşük *Macrolepiota permixta* (Kargı) 0,803 mg/kg, en yüksek *Agaricus campestris* (Bayat) 4,109 mg/kg tespit edilmiştir (Şekil 2).

Co, Cr, Cu iyonlarının konsantrasyonu açısından bakılırsa en düşük *Agaricus bitorquis* (İskilip) 0,188 mg/kg -0,861 mg/kg – 9,049 mg/kg ve *Cystoderma amianthinum* (Kargı) 3,296 mg/kg -31,41 mg/kg -97,43 mg/kg türlerinde sırasıyla bulunmuştur (Şekil 3, 4, 5). Benzer çalışmalara bakıldığında örneklerde bu iyonlar için tespit edilen aralıklar benzerlik göstermektedir (Sarıkürkçü ve ark., 2011; Sevindik ve ark., 2015).

Mantar türlerinin Fe konsantrasyonu ise 173,1 ile 5044 mg/kg arasında değişmektedir (Şekil 6). Fe konsantrasyonu en düşük *Cystoderma amianthinum* (Uğurludağ), en yüksek ise *Cystoderma amianthinum* (Kargı) ilçelerinden toplanan mantar örneklerinden hesaplanmıştır. Benzer çalışmalarda ise Fe konsantrasyonu değerleri 4,15 – 51,42 mg/kg (Sarıkürkçü ve ark., 2011), 211 – 628 mg/kg (Mendil ve ark., 2005), 319,2 – 379,1 mg/kg (Sevindik ve ark., 2015), 102 – 1580 mg/kg (Soylak ve ark., 2005) olarak hesaplanmıştır.

En düşük Mg iyon konsantrasyonu *Cystoderma granulosa* (Ortaköy) 912,7 mg/kg, en yüksek konsantrasyon ise *Cystoderma amianthinum* (Kargı) 5534 mg/kg olarak bulunmuştur (Şekil 7).

Mantarlar arasında en düşük ve en yüksek Mn iyon konsantrasyonu sırasıyla *Cystoderma carcharias*

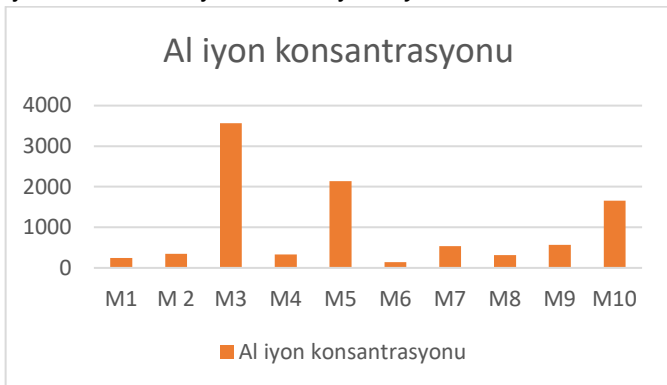
(Uğurludağ) 17,62 mg/kg, *Agaricus campestris* (İskilip) 176,7 mg/kg türlerinde hesaplanmıştır (Şekil 8). Ülkemizde ve dünyada yapılan benzer çalışmalarda ise Mn iyon konsantrasyonları 12,9-93,3 mg/kg (Kalac ve Svaboda, 2000), 5,5-135 mg/kg (Gençcelep ve ark., 2009), 18,1-103 mg/kg (Mendil ve ark., 2005) aralıklarında bulunmuştur.

Yapılan çalışmada Ni iyon konsantrasyonu bakımından pek çok örnekte bu metalin varlığına rastlanmamıştır. Sadece iki örnekte tespit edilmiştir. Bunlar *Agaricus campestris* (İskilip) 2,77 mg/kg ve *Cystoderma amianthinum* (Kargı) 18,2 mg/kg türleridir (Şekil 9).

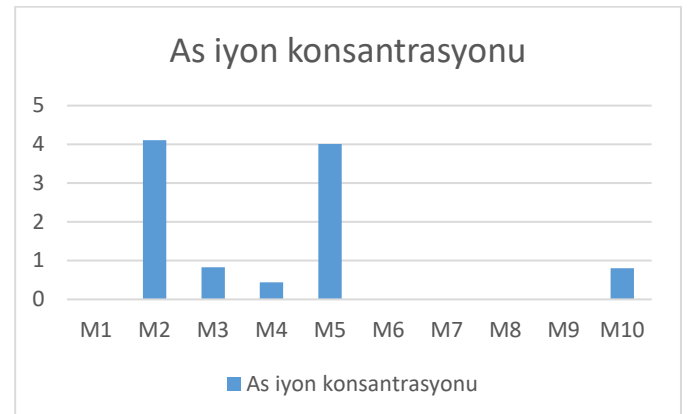
Pb konsantrasyonu minimum ve maksimum 0,288 – 2,611 mg/kg aralıklarında hesaplanmıştır. En düşük ve en yüksek Pb oranları sırasıyla *Agaricus bitorquis* (İskilip) ve *Cystoderma amianthinum* (Kargı) türlerinde tespit edilmiştir (Şekil 10).

En düşük *Agaricus bitorquis* (İskilip) 0,405 mg/kg, en yüksek *Agaricus campestris* (Bayat) 2,368 mg/kg türlerinde Se iyon konsantrasyonu tespit edilmiştir (Şekil 11).

Mantar türlerinin Zn konsantrasyonu ise *Cystoderma granulosa* (Ortaköy) 45,57 mg/kg en düşük, *Agaricus campestris* (Bayat) 221,7 mg/kg en yüksek miktar olarak hesaplanmıştır (Şekil 12). Benzer şekilde mantarlardaki ağır metaller için yapılan çalışmalarda Zn iyon konsantrasyonu için en düşük ve en yüksek değerler sırasıyla 51,5-118 mg/kg (Mendil ve ark., 2005), 43,3-90,2 mg/kg (Sevindik ve ark., 2015), 45,9-134,9 mg/kg (Sevindik ve ark., 2016) olarak tespit edilmiştir.

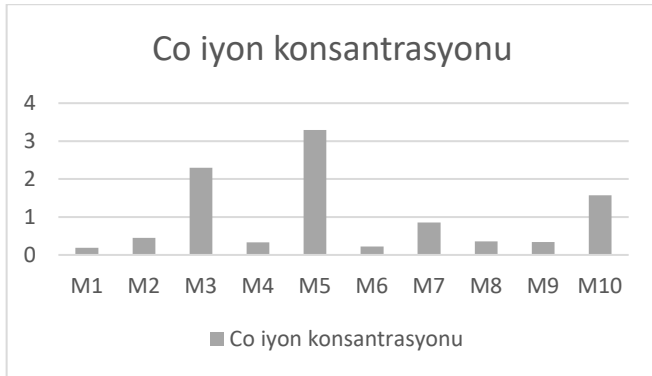


Şekil 1. Mantarlardaki Al iyon konsantrasyonu: *A. bitorquis* M1, *A. campestris* M2, *A. campestris* M3, *C. comatus* M4, *C. amianthinum* M5, *C. amianthinum* M6, *C. carcharias* M7, *C. granulosa* M8, *L. molle* M9, *M. permixta* M10.

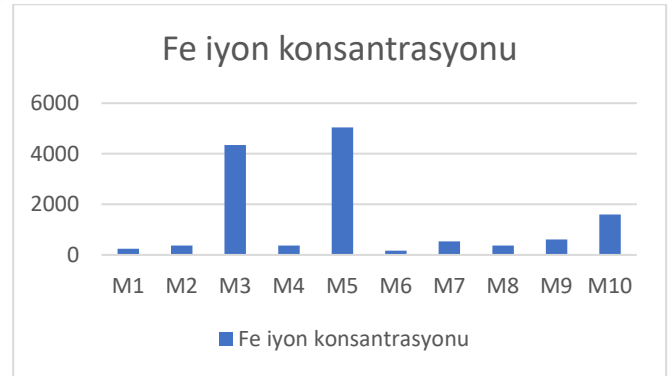


Şekil 2. Mantarlardaki As iyon konsantrasyonu: *A. bitorquis* M1, *A. campestris* M2, *A. campestris* M3, *C. comatus* M4, *C. amianthinum* M5, *C. amianthinum* M6, *C. carcharias* M7, *C. granulosa* M8, *L. molle* M9, *M. permixta* M10.

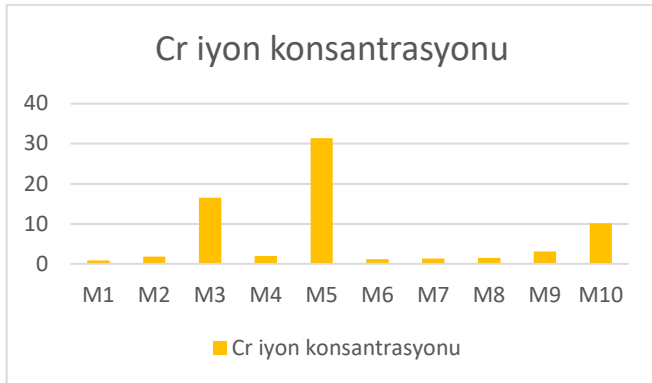




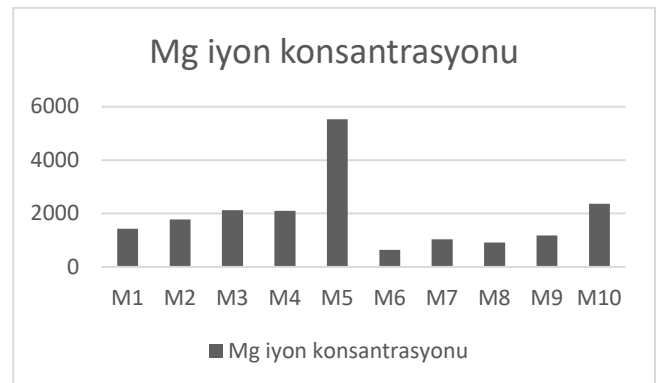
Şekil 3. Mantarlardaki Co iyon konsantrasyonu: *A. bitorquis* M1, *A. campestris* M2, *A. campestris* M3, *C. comatus* M4, *C. amianthinum* M5, *C. amianthinum* M6, *C. carcharias* M7, *C. granulosa* M8, *L. molle* M9, *M. permixta* M10.



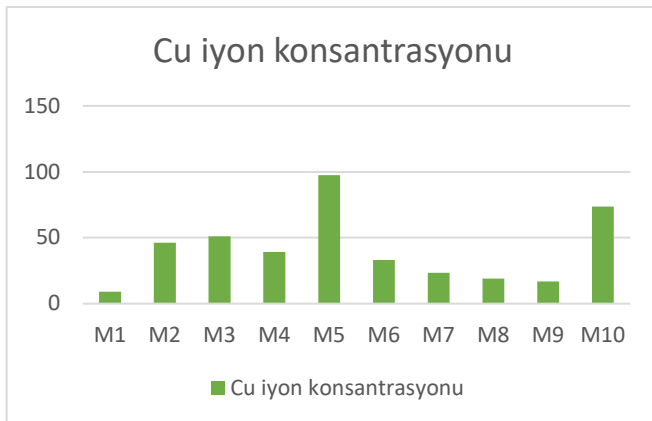
Şekil 6. Mantarlardaki Fe iyon konsantrasyonu: *A. bitorquis* M1, *A. campestris* M2, *A. campestris* M3, *C. comatus* M4, *C. amianthinum* M5, *C. amianthinum* M6, *C. carcharias* M7, *C. granulosa* M8, *L. molle* M9, *M. permixta* M10.



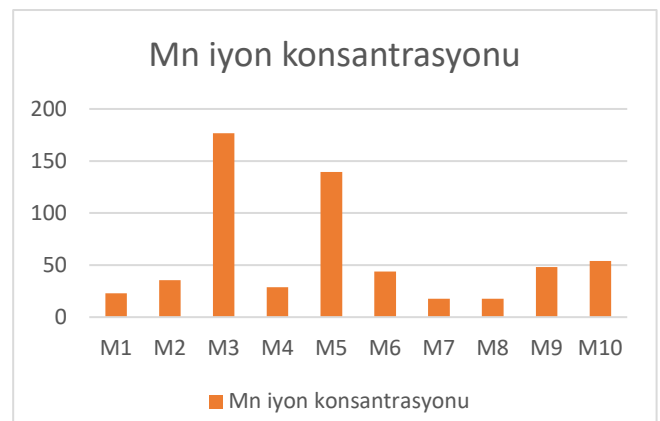
Şekil 4. Mantarlardaki Cr iyon konsantrasyonu: *A. bitorquis* M1, *A. campestris* M2, *A. campestris* M3, *C. comatus* M4, *C. amianthinum* M5, *C. amianthinum* M6, *C. carcharias* M7, *C. granulosa* M8, *L. molle* M9, *M. permixta* M10.



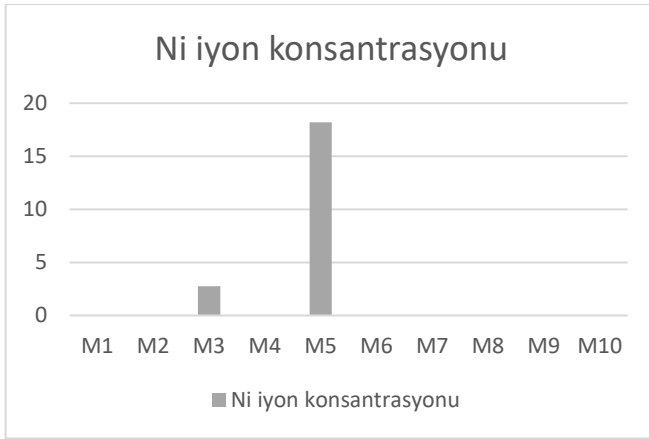
Şekil 7. Mantarlardaki Mg iyon konsantrasyonu: *A. bitorquis* M1, *A. campestris* M2, *A. campestris* M3, *C. comatus* M4, *C. amianthinum* M5, *C. amianthinum* M6, *C. carcharias* M7, *C. granulosa* M8, *L. molle* M9, *M. permixta* M10.



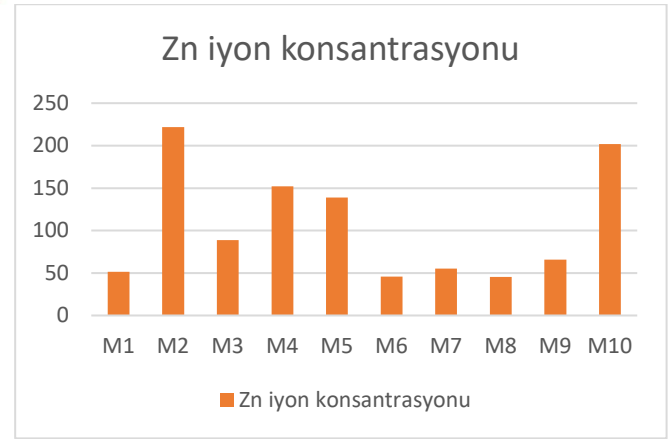
Şekil 5. Mantarlardaki Cu iyon konsantrasyonu: *A. bitorquis* M1, *A. campestris* M2, *A. campestris* M3, *C. comatus* M4, *C. amianthinum* M5, *C. amianthinum* M6, *C. carcharias* M7, *C. granulosa* M8, *L. molle* M9, *M. permixta* M10.



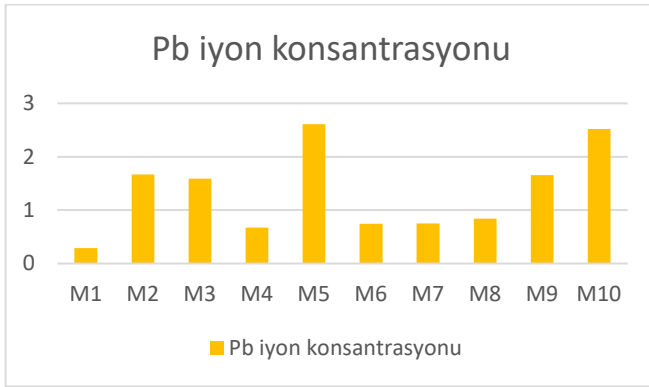
Şekil 8. Mantarlardaki Mn iyon konsantrasyonu: *A. bitorquis* M1, *A. campestris* M2, *A. campestris* M3, *C. comatus* M4, *C. amianthinum* M5, *C. amianthinum* M6, *C. carcharias* M7, *C. granulosa* M8, *L. molle* M9, *M. permixta* M10.



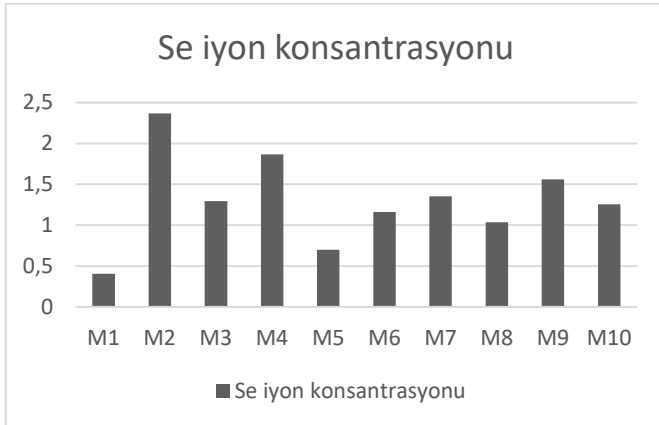
Şekil 9. Mantarlardaki Ni iyon konsantrasyonu: *A. bitorquis* M1, *A. campestris* M2, *A. campestris* M3, *C. comatus* M4, *C. amianthinum* M5, *C. amianthinum* M6, *C. carcharias* M7, *C. granulosa* M8, *L. molle* M9, *M. permixta* M10.



Şekil 12. Mantarlardaki Se iyon konsantrasyonu: *A. bitorquis* M1, *A. campestris* M2, *A. campestris* M3, *C. comatus* M4, *C. amianthinum* M5, *C. amianthinum* M6, *C. carcharias* M7, *C. granulosa* M8, *L. molle* M9, *M. permixta* M10.



Şekil 10. Mantarlardaki Pb iyon konsantrasyonu: *A. bitorquis* M1, *A. campestris* M2, *A. campestris* M3, *C. comatus* M4, *C. amianthinum* M5, *C. amianthinum* M6, *C. carcharias* M7, *C. granulosa* M8, *L. molle* M9, *M. permixta* M10.



Şekil 11. Mantarlardaki Se iyon konsantrasyonu: *A. bitorquis* M1, *A. campestris* M2, *A. campestris* M3, *C. comatus* M4, *C. amianthinum* M5, *C. amianthinum* M6, *C. carcharias* M7, *C. granulosa* M8, *L. molle* M9, *M. permixta* M10.

Bunların dışında çalışma alanında toplanan tüm mantar örneklerinde yapılan ölçümlerde As ve Ni iyonlarının bazı türlerde çok az bulunmasının yanı sıra mantar örneklerinde ayrıca Cd iyon araştırması da yapılmıştır. Ancak örneklerin hiç birinde Cd iyon konsantrasyonuna rastlanmamıştır.

Arsenik ve nikel haricinde, incelenen mantarlarda tüm mineraller tespit edilmiştir. *Agaricus campestris* (Bayat-İskilip), *Coprinus comatus* (Kargı), *Cystoderma amianthinum* (Kargı), *Macrolepiota permixta* (Kargı)'de arsenik saptanmıştır. *Cystoderma amianthinum* türünde Kargı bölgesinde arsenik gözlemlenirken Uğurludağ bölgesinde arsenik tespit edilememiştir. *Agaricus campestris* türünde Bayat bölgesinde arsenik miktarı 4.1 mg/kg olarak tespit edilirken İskilip bölgesinde aynı türde 0.8 mg/kg olarak tespit edilmiştir. *Agaricus campestris* (İskilip) ve *Cystoderma amianthinum* (Kargı) 'da nikel tespit edilmiştir. Belirtilen mantar türleri ve bölgeleri dışında çalışılan diğer türlerde arsenik ve nikel görülmemiştir. Çalışılan mantarların hiçbirinde kadmiyum saptanamamıştır. *Cystoderma amianthinum* türünde Kargı bölgesindeki demir miktarı aynı türün Uğurludağ bölgesinden toplanan mantarların yaklaşık 30 kat daha fazladır.

*A. campestris* türünün Bayat ve İskilip örneklerinin iyon konsantrasyonuna bakılacak olursa Al, Fe, Mg ve Cu metal yoğunlukları oldukça farklılık göstermektedir. Özellikle İskilip ilçesinden toplanan örnekte bu ağır metal iyonlarının konsantrasyonu oldukça yüksek çıkmaktadır. Diğer iyonlar için çok fazla göze çarpan bir farklılık belirlenememiştir (Şekil 13-14).

Benzer şekilde *C. amianthinum* Kargı ve Uğurludağ örneklerinin iyonlarına bakılacak olursa Al, Fe, Mg ve Cu metal konsantrasyonları oldukça farklılık

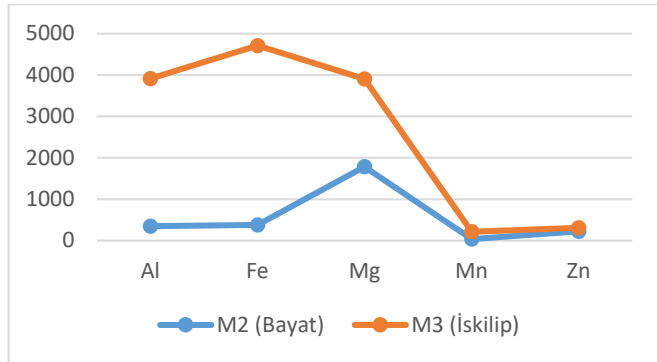


göstermektedir. Özellikle Kargı ilçesinden toplanan örnekte bu ağır metal iyonlarının konsantrasyonu oldukça yüksek çıkmaktadır. Diğer iyonlar için çok fazla göze çarpan bir farklılık belirlenememiştir (Şekil 15-16).

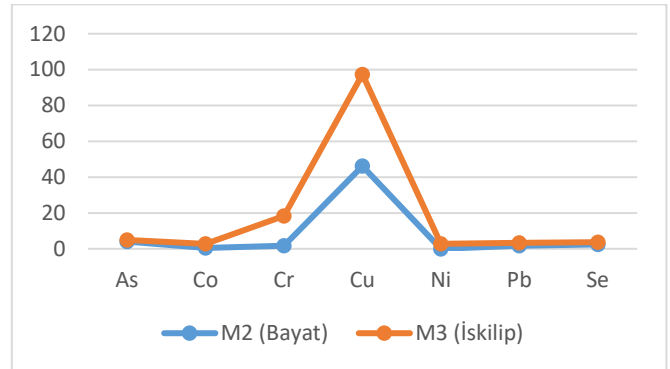
Aynı tür mantarlardan farklı lokalitelerden toplanan örnekler karşılaştırıldığı zaman her bir ağır metal iyonu için bariz bir farklılık grafiklerde de görülmektedir. Bunun sebebi elbette ki mantarların yetiştiği ortamlardaki ağır metal iyon konsantrasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu sonuçlar bize göstermiştir ki mantarlar yetiştiği ortamdaki iyonları bünyesine alma konusunda çok iyi birer akümülatör ve

çevredeki ağır metal yoğunluğunu göstermek için de çok iyi birer indikatörlerdir (Şekil 13-14 ve Şekil 15-16).

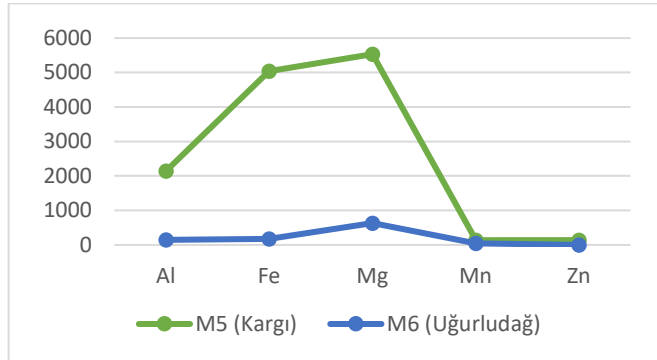
Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile Türkiye'nin Orta Karadeniz bölgesinde yer alan Çorum İl'inden toplanan mantar örneklerinin ağır metal içerikleri tespit edilmiş, özellikle ülkemizde daha önceden yapılmış benzer çalışmalardaki sonuçlar karşılaştırılmış ve farklı lokalitelerdeki aynı mantar örneklerindeki ağır metal iyon farklılığı mantarların topraktan veya üzerinde yetiştiği substrattan metal iyonlarını doğal olarak akümüle ettiği bu sayede de iyi birer çevre kirliliği indikatörü oldukları tespit edilmiştir.



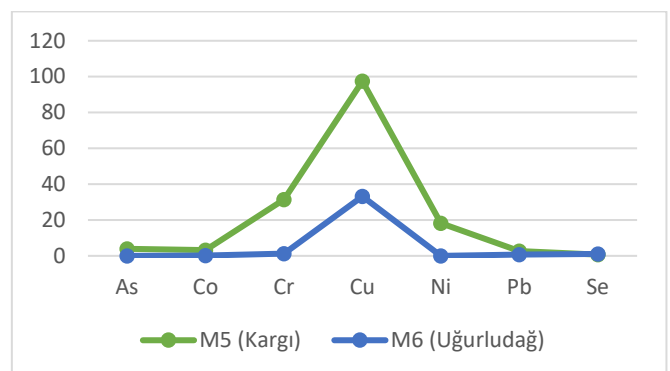
Şekil 13. *A. campestris* Bayat ve İskilip örneklerinin iyon konsantrasyonu karşılaştırılması



Şekil 14. *A. campestris* Bayat ve İskilip örneklerinin iyon konsantrasyonu karşılaştırılması



Şekil 15. *C. amianthinum* Kargı ve Uğurludağ örneklerinin iyon konsantrasyonu karşılaştırılması



Şekil 16. *C. amianthinum* Kargı ve Uğurludağ örneklerinin iyon konsantrasyonu karşılaştırılması

### Kaynaklar

Akgül, H., Sevindik, M., Akata, I., Altuntaş, D., Bal, C. ve Doğan, M. (2016). *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer. Mantarının Ağır Metal İçeriklerinin ve Oksidatif Stres Durumunun Belirlenmesi *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi Cilt 20, Sayı 3, 504-508.*

Breitenbach, J. ve Kränzlin, F. (1991). *Fungi of Switzerland, Vol: 3.* Switzerland: Verlag Mykologia Luzern.

Breitenbach, J. ve Kränzlin, F. (1995). *Fungi of Switzerland, Vol: 4.* Switzerland: Verlag Mykologia Luzern.

Buczacki, S. (1992). *Mushrooms and Todstools of Britain and Europe.* Glasgow: Harper Collins Publishers.

Chen, X. H., Zhou, H. B. ve Qiu, G. Z. (2009). Analysis of several heavy metals in wild edible mushrooms from region of China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83: 280-285.



- Demirbaş, A. (2001). Concentrations of 21 metals in 18 species of mushrooms growing in the East Black Sea region. *Food Chemistry* 75: 453-457.
- Doğan, H. H., Şanda, M. A., Uyanöz, R., Öztürk, C. ve Çetin, Ü. (2006). Contents of Metals in Some Wild Mushrooms Its Impact in Human Health. *Biological Trace Element Research Vol. 110*, 79-94.
- Falusi, B. A. ve Olanipekun, E. O. (2007). Bioconcentration factors of heavy metals in tropical crab (*Carcinus* sp.) from River Aponwe, Ado-Ekiti, Nigeria. *Journal of Applied Sciences & Environmental Management*, 11, 51-54.
- Gençcelep, H., Uzun, Y., Tunçtürk, Y. ve Demirel, K. (2009). Determination of mineral contents of wild-grown edible mushrooms. *Food Chemistry* 113: 1033-1036.
- Işıldak, Ö., Türkekel, İ., Elmastaş, M. ve Tüzen, M. (2004). Analysis of heavy metals in some wild-grown edible mushrooms from the middle black sea region, Turkey. *Food Chemistry* 86: 547-552.
- Jordan, M. (1995). *The Encyclopedia of Fungi of Britain and Europe*, David & Charles Book Co. Devon. UK: John Taylor Book Ventures Ltd.
- Kalac, P. ve Staskova, I. (1991). Heavy metals in fruiting bodies of wild growing mushrooms of the genus *Agaricus*. *Potravinarske Vedy*, 12: 185-195.
- Kalac, P. ve Svaboda, L. (2000). A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry* 69: 273-281.
- Karapınar, H. S., Uzun, Y. ve Kılıçel, F. (2017). Mineral Contents of Two Wild Morels. *Anatolian Journal of Botany* 1(2): 32-36.
- Kaya, A. ve Bağ H. (2010). Trace element contents of edible macrofungi growing in Adiyaman, Turkey. *Asian Journal of Chemistry* 22: 1515-1521.
- Mendil, D., Uluözlü, Ö. D., Tüzen, M., Hasdemir, E. ve Sarı, H. (2005). Trace metal levels in mushroom samples from Ordu, Turkey. *Food Chemistry* 91: 463-467.
- Ouzouni, P. K., Petridis, D., Koller, W. D., Kyriakos, A. ve Riganakos, K. A. (2009). Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry*, 115, 1575-1580.
- Pegler, D. N., Læssøe, T. ve Spooner, B. M. (1995). *British Puffballs, Earthstars and Stinkhorns, Royal Botanic Gardens*. Kew: Whitstable Litho.
- Radulescu, C., Stihl, C., Busuioc, G., Gheboianu, A. ve Popescu, I. V. (2010). Studies concerning heavy metals bioaccumulation of wild edible mushrooms from industrial area by using spectrometric techniques. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84: 641-646.
- Sarıkürkçü, C., Çopur, M., Yıldız, D. ve Akata, I. (2011). Metal concentration of wild edible mushrooms in Soguksu National Park in Turkey. *Food Chemistry* 128 (3): 731-734.
- Sesli, E. ve Tüzen, M. (1999). Levels of trace elements in the fruiting bodies of macrofungi growing in the East Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry* 65: 453-460.
- Sevindik, M., Akgül, H., Günal, S. ve Doğan, M. (2016). *Pleurotus ostreatus'un* Doğal ve Kültür Formlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri ve Mineral Madde İçeriklerinin Belirlenmesi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* 1: 153-156.
- Sevindik, M., Eraslan, E. C. ve Akgül, H. (2015). Bazı Makrofungus Türlerinin Ağır Metal İçeriklerinin Belirlenmesi. *Ormanlık Dergisi* 11(2): 48-53.
- Soylak, M., Saraçoğlu, S., Tüzen, M. ve Mendil, D. (2005). Determination of trace metals in mushroom samples from Kayseri, Turkey. *Food Chemistry* 92: 649-652.
- Şen, İ., Allı, H., Çöl, B., Çelikkollu, M. ve Balcı, A. (2012). Trace metal contents of some wild-growing mushrooms in Bigadiç (Balıkesir), Turkey. *Turk J Bot*, 36, 519-528.
- Türkekel, İ., Elmastaş, M. ve Tüzen, M. (2004). Determination of iron, copper, manganese, zinc, lead, and cadmium in mushroom samples from Tokat, Turkey. *Food Chemistry* 84: 389-392.
- Uzun, Y., Gençcelep, H., Kaya, A. ve Akçay, M. E. (2011). The Mineral Contents of Some Wild Edible Mushrooms. *Ekoloji* 20, 80, 6-12.
- Yamaç, M., Yıldız, D., Sarıkürkçü, C., Çelikkollu, M. ve Solak, M. H. (2007). Heavy metals in some edible mushrooms from the Central Anatolia, Turkey. *Food Chemistry* 103: 263-267.





Geliş(Received) :30/07/2018  
Kabul(Accepted) :03/04/2019

Araştırma Makalesi/Research Article  
Doi:10.30708mantar.449309

## ***Pleurotus ostreatus* alfa- ve beta- glukan polisakkaritlerinin izolasyonu ve biyoyumluluklarının yüzey kaplaması sonrasında incelenmesi**

Leyla KAYIŞ<sup>1</sup>, Gökhan DURUKSU<sup>\*2</sup>

\*Sorumlu yazar: gokhan.duruksu@kocaeli.edu.tr

<sup>1</sup> Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre AD, İzmit, Kocaeli, TÜRKİYE

Orcid ID: 0000-0002-0119-3065/ leyla-kayis@hotmail.com

<sup>2</sup> Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre ve Gen Tedavileri AUM, İzmit, Kocaeli, TÜRKİYE

Orcid ID: 0000-0002-3830-2384/ gokhan.duruksu@kocaeli.edu.tr

**Öz:** Glukanlar mantarların hücre duvarında bulunan O-glikozidik bağlar ile bağlanmış glikoz monomerlerinin oluşturduğu polisakkaritlerdir. Glukanların birçok tıbbi uygulamalarının yanı sıra en öne çıkan özelliklerinden biri ise beta-1,3 ve -1,6 glikozidik bağlarıyla birleşmiş glikoz zincirinin oluşturduğu beta-glukanların bağışıklık sistemi üzerindeki uyarıcı etkisidir. Bu çalışmada *Pleurotus ostreatus* 'tan (istiridye mantarı) sıcak su ve sıcak kostik çözelti ile ekstraksiyonu sonrasında alfa- ve beta-glukan izolasyonu gerçekleştirilerek elde edilen polisakkaritlerin hücre canlılığı ve çoğalması üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Toplam glukan miktarları fenol-sülfürik asit metoduyla ve alfa/beta-glukan saflıkları enzimatik yöntemle analiz edilmiştir. Kültür kapları glukanla kaplandıktan sonra toksisite ve hücre çoğalma analizleriyle mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkileri incelenmiştir. İşlemler sonucunda %97.87 ±1.45 saflıkta alfa-glukan ve %97.79 ±0.28 saflıkta beta-glukan *P. ostreatus* 'tan elde edilmiştir. Hücre tutunma analizinde alfa-glukanların tutunmayı desteklediği (%88.10-95.75) gözlemlenmişken beta-glukan kaplı yüzeylerde tutunma oranının %61.26 ±8.04 değerine düştüğü belirlenmiştir. Alfa-glukan kaplı yüzey üzerindeki hücreler beta-glukan kaplı yüzey üzerindeki hücrelere göre 1.44 kat, kaplı olmayan yüzey üzerindeki hücrelere göre 1.56 kat daha hızlı çoğalmışlardır. Sonuç olarak sıcak su/kostik işlemleriyle elde edilen alfa- ve beta-glukanların hücreler üzerinde toksik etkisinin olmadığı ve her iki glukanın biyoyumlu bir malzeme olduğu in vitro testlerle gösterilmiştir. Ancak beta-glukan kaplı yüzeylerde hücre tutunması düşük olduğu gözlemlenmiştir. Alfa-glukanın hücre tutunmasını ve çoğalmasını desteklediği görülmüştür. Bu özellikleri ile hücre kültürü ve doku mühendisliği çalışmaları alfa-glukanın potansiyel uygulama alanlarının olabileceği ortaya konmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Biyomalzeme, Mantar, Polisakkarit, Glukan, Yüzey Kaplama



## Isolation of polysaccharides alpha- and beta-glucans of *Pleurotus ostreatus* and evaluation of their biocompatibility after surface coating

**Abstract:** Glucans, which are polysaccharides in the fungal cell wall, are formed by glucose monomers linked by O-glycosidic bonds. Besides of their medical applications, one of the most promising features of glucans is the stimulatory effect on the immune system of beta-glucans, in which glucose units are linked by beta-1,3 and -1,6 glycosidic bonds. In this study, it was aimed to investigate the effect of alpha- and beta-glucans on the cell viability and proliferation, which were derived from *Pleurotus ostreatus* by hot water/caustic extraction. Total glucan was quantified by the phenol-sulphuric acid method, and alpha/beta-glucan purity was determined by the enzymatic method. After coating the surface of culture flask with the glucans, their effects on mesenchymal stem cells were examined by toxicity and cell proliferation assays. Alpha- and beta-glucans from *P. ostreatus* were obtained with a purity of 97.87%  $\pm$ 1.45 and 97.79%  $\pm$ 0.28, respectively. In cell adhesion analysis, alpha-glucans were found to support the attachment (88.10-95.75%), while the adhesion ratio on beta-glucan-coated surfaces decreased to 61.26%  $\pm$ 8.04. The cells on alpha-glucan-coated surfaces were proliferated 1.44 times faster than those on beta-glucan, and 1.56 times faster than those on the uncoated surface. As a result, alpha- and beta-glucan, obtained by hot water/caustic extraction processes, have been shown to have no toxic effects on the cells, and both glucans were demonstrated to be biocompatible biomaterials by in vitro tests. However, the cell adhesion on beta-glucan coated surfaces was observed to be low. Alpha-glucan was shown to promote both cell adhesion and proliferation. Therefore, alpha-glucan may have potential applications in cell culture and tissue engineering studies.

**Key words:** Biomaterials, Fungi, Polysaccharides, Glucan, Surface Coating

### Giriş

*Pleurotus* cinsi mantarların 200'den fazla türü Index Fungorum'da tanımlanmış olup bitkisel artık ve çürümüş ağaç gövdelerinde yetişmektedir (Correa ve ark. 2016). Bu türler arasında en çok bilineni ve insanlar tarafından en yaygın kültürü yapılanı istiridye mantarı olarak da bilinen *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (phylum Basidiomycota) olup çok eski zamanlardan beri bu türün tıbbi özelliklerinden faydalanılmaktadır (Piska ve ark., 2017; Doğan ve ark., 2014). *P. ostreatus* ile ilgili hücre kültürü ve canlı hayvan çalışmaları sonucunda bu mantarın kanser önlemeden, kolesterol düşürmeye kadar birçok hastalığın tedavisine etkin rol oynayabileceği gösterilmiş ve bu medikal etkilerinde glukanların önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Deepalakshmi ve Mirunalini, 2014).

Mantarlardan elde edilen beta-glukanlar günümüzde çoğunlukla ilaç üretiminde ve gıda sanayisinde kullanılmalarına rağmen gösterdikleri farklı özellikler göz önüne alındığında sağlık ve biyomalzeme alanlarında potansiyel uygulamaları mevcuttur (El Enshasy ve Hatti-Kaul, 2013; Papaspyridi ve ark. 2018). Önceki çalışmalarda nutrasötik olarak kullanılan beta-glukanların anti-oksidant, anti-kanser, anti-enflamatuar, anti-mikrobiyel özelliklerinin gösterilmesinin yanı sıra kalp ve damar hastalıklarını önlediği ve karaciğeri koruduğu da ortaya konmuştur (Chen ve Seviour, 2007;

Wasser, 2010; Higashi ve ark., 2012; Du ve ark., 2015). *P. ostreatus* kaynaklı beta-glukan olan pleuranın kullanılmasıyla humoral ve hücresele immünitenin kontrol altına alınabileceği ve çocuklarda ölümle sonuçlanan solunum yolu enfeksiyonlarının azaltılabileceği gösterilmiştir (Jesenak ve ark., 2013). Kozmetik sektöründe yaygın olarak yaşlanma karşıtı (anti-aging) etkilerinden dolayı kullanılmaktadırlar (Hyde ve ark., 2010). Beta-glukanların immünmodulasyon, anti-inflamatuvar ve anti-tümör etkileri tanımlanmış olmasına karşın alfa-glukanlar üzerine olan çalışmalar sınırlıdır (İşsever ve ark., 2018). *Pleurotus albidus* 'tan izole edilen  $\alpha$ -1,6- and  $\beta$ -1,3-D-glukanların makrofajları modüle ettikleri ve böylece lipid kaynaklı inflamasyonun önlenebileceği bildirilmiştir (Castro-Alves ve Nascimento, 2018).

Doku mühendisliğiyle üretilebilecek canlı doku ve organlar günümüzde çözümü zor ya da mümkün olmayan sağlık sorunlarının düzeltilmesinde büyük potansiyele sahiptirler. Ancak bu alanda kullanılacak malzeme ve bunların işlenmesinde bir takım zorluklarla karşılaşmaktadır. Metal ya da seramik gibi abiyotik malzemelerin olumsuzluklarına karşın biyolojik kökenli biyomalzemeler nakil sonrasında dokular içerisinde daha iyi uyum göstermektedirler (Fontana ve ark., 2017). Her biyolojik malzeme bu uyumu sağlamadığından mutlaka gerekli analizlerinin yapılması gerekmektedir (Jantova ve



ark., 2015; Mukhopadhyay ve ark., 2017). İnsan ya da hayvan kökenli biyomalzemelerin kullanımı taşıyabilecekleri potansiyel kontaminantlardan dolayı tercih edilmemektedir. Daha çok bitki kaynaklı biyomalzemeler kullanılsa da mantar kaynaklı olanlar da tercih edilmektedirler (Nwe ve ark., 2008; 2011; Fontana ve ark., 2017). *P. ostreatus* kaynaklı beta-glukan (pleuran) başka bir malzemeye (coladerm) karıştırılmış ve üretilen bu membranın fibroblast hücreleriyle yara iyileştirilmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir (Jantova ve ark., 2015).

Bu çalışmada *P. ostreatus* kullanılarak sıcak su ve sıcak kostik çözelti ardışık yıkama işlemleri sonrasında alfa- ve beta-glukanların izolasyonlarının gerçekleştirilmesi ve bu fungal polisakkaritlerin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerinde hücre canlılığı ve çoğalmasına olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmayla *P. ostreatus* 'tan izole edilen alfa- ve beta-glukanların kök hücre kültüründe toksik etki yaratmadan güvenle kullanılabileceği ve doku mühendisliği çalışmalarında kaplama materyali olarak yararlanılabilecek biyomateryaller olduğu hipotez edilmiştir.

### Materyal ve Metot

#### Alfa- ve beta-glukan izolasyonu

Alfa- ve beta-glukan izolasyonu için lokal marketlerden *P. ostreatus* temin edilerek Palacios ve ark. (2012) tarafından oluşturulan glukan izolasyon yöntemi kullanılmıştır. İzolasyon için paketlenmiş ve ticari olarak satılan beş farklı *P. ostreatus* örneği (n=5) kullanılmıştır. Bu protokole göre distile su ile yıkandıktan sonra mantarlar küçük parçalara ayrılmış ve 40°C'de kurutularak içerdiği su mantardan uzaklaştırılmıştır. Katı parçalar öğütülerek saf metanol (1:10) içerisinde 60°C'de, 100 rpm hızda 24 saat çalkalanmıştır. Katı parçalar süzildükten sonra distile suyla (20-25°C) 1:5 oranında karıştırılarak 100 rpm hızda 24 saat inkübe edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 3800g hızda 20 dakika santrifüj edilerek (Eppendorf R5801, Mannheim, Almanya) çözünmeyen parçalar çöktürülmüştür. Katı parçalar toplanarak 1:10 oranında sıcak distile su ile karıştırılarak 95°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Karışım 6000g'de 5 dakika boyunca santrifüj sonrası alfa-glukan içeren sıvı kısım ayrı kaba aktarılmıştır. Katı kısım alınarak 1:10 oranında 2M NaOH (Merck, Darmstadt, Almanya) ile 95°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Karışım 3800g'de 20 dakika boyunca santrifüj edilerek beta-glukan içeren sıvı ayrılmıştır.

Alfa- ve beta-glukan içeren sıvılar santrifüj işlemi sonrasında 40 µm'lik naylon filtreye süzülerek tekrar 6000g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Sıvı kısım alınarak

2:1 oranında etanol ile karıştırılmış ve polisakkaritlerin çökmesi için ekstraksiyon sıvıları 4°C'de gece boyu bekletilmiştir. Çöken katı maddeler 8000g'de 30 dakika santrifüj edilerek toplanmış ve %20 trikarboksilik asit (TCA; Merck) içeren 10 mL distile su içerisinde çözdürülmüştür. 24 saat inkübasyon ve 8000g'de 30 dakika santrifüj sonrasında çöken proteinler uzaklaştırılmıştır. Sıvı kısım son konsantrasyonu %1 olacak şekilde NaCl (Merck) çözeltisi eklenmiş ve 2:1 oranında etanol ilave edilerek 4°C'da polisakkaritler çöktürülmüştür. Çöken glukanlar 8000g'de 30 dakika santrifüj işlemi sonrasında toplanmış ve eklenen 5 mL saf asetonun (Merck) oda sıcaklığında uçması ile kuru bir ekstrakt elde edilmiştir.

Alfa-glukan içeriğindeki safsızlığın yüksek olmasından dolayı örnek tekrar 1:10 oranında sıcak distile su ile karıştırılarak 95°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve alfa-glukan saflaştırma prosedürü tekrar edilmiştir. Alfa-glukan ve beta-glukan izolasyonu sonuçları 5 ayrı örnek (parti) için ortalama değer alınarak standart sapma hesaplanarak sunulmuştur.

#### Fenol-sülfürik asit metodu

Toplam polisakkarit miktarını ölçmek için polimerik yapılar sıcak sülfürik asit içerisinde monomerlerine ayrıştırılarak fenol ile reaksiyona sokulmuştur (DuBois ve ark., 1956). Analiz edilecek örneğe 0.05 mL %80'lik fenol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) çözeltisi ve 5mL sülfürik asit (Merck) eklenerek 25-30°C su banyosunda 10-20 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Örnekten 200 µL alınarak spektrofotometre (VersaMax microplaka okuyucu, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, ABD) kullanılarak 480 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçülmüştür. Her örnek için analiz beş kez tekrar edilmiştir. Kantitatif veri için glukoz standart eğrisi hazırlanmıştır. Distile su içerisinde çözülmüş glukoz (0.02-0.1 mg/mL) çözeltisi yöntemin aynı basamakları kullanılarak fenol ile reaksiyona sokulmuş ve renk değişimi sonrası optik yoğunluk ölçülmüştür. Analiz sonrasında hesaplanan polisakkarit ve toplam glukan miktarları içinde çözüldüğü sıvının hacmiyle çarpılarak kütlesi hesaplanmıştır.

#### Alfa- ve beta-glukan miktarının belirlenmesi

Ekstraksiyon işleminden önce kurutulmuş mantar örneklerinde ve ekstraksiyon sonrasında her fraksiyonda glukan miktarlarının ölçümü için β-Glucan Yeast & Mushroom Assay Kit (K-YBGL, Megazyme, Belfast, İrlanda) kullanılmıştır (Sari ve ark., 2017). Test üretici firmanın belirtmiş olduğu protokol uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Kit sıvı örneklerde çözünür toplam



glukan ve beta-glukan miktarlarını ayrı deney aşamalarında enzim reaksiyonuna göre farklı glikozidik bağların kesimi ve ortaya çıkan monomerlerin miktarının ölçülmesi esasıyla çalışmaktadır. Polisakkaride özgün enzimlerin reaksiyonu sonucunda renk değişimi spektrofotometre kullanılarak 560 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçülmesiyle glikoz standartına karşı hesaplanmıştır. Toplam glukan tayini için ekzo-1,3-β-glukanaz ve β-glukosidaz ve alfa glukan için amiloglukosidaz ve alfa-amilaz kullanılmıştır. Glukan kitinin üretici firma (Megazyme) tarafından sağlanan kullanım kulavuzunda yer alan hesaplama yöntemiyle toplam glukan, alfa-glukan ve beta-glukan miktarları analiz başlangıcındaki toplam madde miktarına göre kütle oranı (w/w) hesaplanmıştır. Toplam glukan ve alfa-glukan miktarları arasındaki fark alınarak beta-glukan miktarı belirlenmiştir.

#### İzolasyon veriminin ve saflık değerlerinin hesaplanması

İzolasyon veriminin belirlenebilmesi için ilgili izolasyon sonrasında elde edilen alfa-glukan ya da beta-glukan miktarı ekstraksiyon öncesinde kuru mantar kütleindeki alfa- ya da beta-glukan miktarına oranlanmasıyla bulunmuştur (Temelli, 1997; Symons ve Brennan, 2004). Alfa- ve beta-glukan miktarları kit (Megazyme) kullanılarak ölçülmüştür. Verim hesabı için aşağıdaki formüller kullanılmıştır:

$$\text{Verim}_{\text{alfa-glukan}} (\%) = \frac{[\text{alfa-glukan miktarı}]_{\text{ekstraksiyon sonrası}}}{[\text{alfa-glukan miktarı}]_{\text{kuru mantar}}} \times 100$$

$$\text{Verim}_{\text{beta-glukan}} (\%) = \frac{[\text{beta-glukan miktarı}]_{\text{ekstraksiyon sonrası}}}{[\text{beta-glukan miktarı}]_{\text{kuru mantar}}} \times 100$$

Saflık derecesi aseton ile kurutulan örneğin tekrar çözülmesinden sonra belirlenmiştir. Bu aşamada analizde kullanılan toplam polisakkarit miktarı fenol-sülfirik asit yöntemiyle tekrar ölçülmüş ve bu polisakkarit karışımı içerisinde ne kadar alfa- ve beta-glukan bulunduğu kit (Megazyme) kullanılarak ölçülmüştür. Saflık değerlerinin hesaplanabilmesi için aşağıdaki formüller kullanılmıştır:

$$\text{Saflık}_{\text{alfa-glukan}} (\%, w/w) = \frac{[\text{ekstraksiyon sonrası alfa-glukan miktarı}, (w/w)]}{[\text{toplam polisakkarit miktarı}]} \times 100$$

$$\text{Saflık}_{\text{beta-glukan}} (\%, w/w) = \frac{[\text{ekstraksiyon sonrası beta-glukan miktarı}, (w/w)]}{[\text{toplam polisakkarit miktarı}]} \times 100$$

#### Kaplanan yüzeylerdeki glukan miktarının ölçümü ve kaplama süresinin optimizasyonu

Alfa-glukan %3'lük asetik asit (1:1; Merck) içinde, beta-glukan %3'lük asetik asit (1:1) ve DMSO (20:1; Sigma-Aldrich) içinde çözülerek 100 µg/mL olacak miktarda seyreltilmiştir. Polistren malzemesinden üretilmiş hücre kültürü kabını (SPL Life Sciences, Pocheon-si, Güney Kore) kaplamak için 0.16 mL/cm<sup>2</sup> sıvı eklenmiş ve inkübatörde 37°C'de farklı sürelerde bekletilerek kaplama gerçekleştirilmiştir. Kaplama süresinin optimizasyonu için literatürde tercih edilen kaplama süreleri dikkate alınarak 1 saat, 8 saat, 16 saat, 24 saat, 48 saat ve uzun sürenin etkisinin gözlemlenmesi için 72 saat inkübasyonlar tercih edilmiştir. Negatif kontrol olarak kaplanmamış yüzey kullanılmıştır. Hücre kültürü öncesinde kültür kapları DPBS (Gibco, Paisley, İngiltere) ile 2 kez yıkanmıştır. Yüzeyi kaplayan glukanın miktar tayini için fenol-sülfirik asit metodu kullanılmıştır.

#### Hücre kültürü ve canlılık, çoğalma ve hücre adezyonu

Çalışma için KÜ-GOKAEK 2016/20.3 no.lu etik kurul onayı alınmış ve çalışmada KÖGEM hücre arşivinden insan kemik iliği kök hücreleri kullanılmıştır (Erdem ve ark., 2013). Hücreler DMEM-F12 besiyeri (%10 FBS, %1 Antibiyotik) içerisinde 37°C, %5 CO<sub>2</sub> kontrollü atmosfer ortamında kültüre edilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları sırasında kullanılan tüm sarf malzemeler Thermo/Gibco'dan (Paisley, İngiltere) alınmıştır. Yüzeyi kaplanmamış kültür kabının kullanıldığı grup kontrol olarak çalışmada yer almıştır. Hücre canlılığı, çoğalması ve tutunması çalışmalarında literatürle karşılaştırma yapabilmek için kolajen kaplı yüzeyler kullanılmıştır. Yüzeylerin kolajen tip 1 (C3867, Sigma-Aldrich) ile kaplanması için stok solüsyon PBS ile sulandırılarak 100 µg/mL çözelti elde edilmiştir. Kaplamak için 0.16 mL/cm<sup>2</sup> sıvı kültür kabına eklenmiş ve inkübatörde 37°C'de 1 saat bekletilerek kaplama gerçekleştirilmiştir.

Hücre canlılığı için WST-1 (Roche) analizi kullanılmıştır. Test üretici firmanın talimatları doğrultusunda önce hücreler DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Gibco) ile yıkanmış ve her bir kuyucuğa 100 µL WST-1/DMEM-F12 solüsyonu (%10, v/v) eklenmiştir. 37°C %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde 1 saat inkübe edilmiş ve spektrofotometrede 480 nm'de ölçüm yapılarak canlı hücrelerin sayısı belirlenmiştir. Hücre çoğalma analizi için 96 saat süre içerisinde hücre sayılarındaki artış WST-1 ile belirlenmiştir.

Hücre tutunma (adezyon) analizi için hücreler aynı koşullar altında 48 saat boyunca kültüre edilmiş ve sonra





iki kez DPBS ile yıkanarak yıkanma sonrası yüzeyde asılı kalan hücreler WST-1 yöntemiyle sayılmıştır (Duruksu ve Aciksari, 2018).

#### LDH toksisite testi

Glukanların hücre üzerindeki toksik etkisinin ölçülmesinde LDH Cytotoxicity Detection Kit Plus (Roche, Mannheim, Almanya) kullanılmıştır. Kit sıvı besiyeri ortamında laktat dehidrogenaz enzim aktivitesinin ölçülmesi temeline dayanmaktadır. 48 saat kültür sonrasında kültür ortamından 300 µL örnek alınarak substrat çözeltisiyle karıştırılmış ve karışım 30 dakika 37°C inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 490 nm'de ölçüm yapılarak toksisite oranı belirlenmiştir. Kaplanmamış yüzey üzerinde kültür edilen hücreler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanmak ve %100 toksisite optik soğurma değerini belirlemek için kit ile birlikte gelen lizis solüsyonu ile hücre membranı tamamen sindirilmiştir. Açığa çıkan LDH enzim aktivitesi aynı yöntemle belirlenmiştir. Ölçümler en az beş kez tekrar edilmiştir.

#### İstatistiksel analiz

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir. Çoklu gruplar, çift yönlü varyans analizi ve ardından post-hoc karşılaştırmalar için Student-Newman-Keuls metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her deney eğer belirtilmediyse en az üç kez tekrar edilmiş ve deney ve kontrol grupları arasındaki fark  $p < 0.05$  olduğunda anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Sonuçların istatistiksel analizleri için SPSS10.0 (SPSS, Chicago, ABD) programı kullanılmıştır.

#### Bulgular

##### Alfa- ve beta-glukan izolasyonu ve saflık oranı

Sıcak su ekstraksiyonu sonucunda alfa-glukan ve sıcak kostik çözeltisi ekstraksiyonundan sonra beta-glukan polisakkaritleri elde edilmiştir. İzolasyon beş farklı parti halinde tekrarlanmış olup sırasıyla 34 g, 31 g, 30 g, 30 g ve 35 g kuru mantar kütlesi kullanılmıştır. Elde edilen toplam glukan miktarı her parti başına ortalama başlangıç miktarının  $\%2.66 \pm 0.19$  'ü seviyesinde olup parti başına ortalama 55.25 mg  $\pm 8.50$  alfa-glukan (n=4) ve 789.91 mg  $\pm 33.71$  beta-glukan (n=5) elde edilmiştir. İlk sıcak su ekstraksiyonu sonrasında elde edilen örneğin alfa-glukan miktarının bu örnekteki toplam polisakkarit miktarına oranlanmasıyla alfa-glukanın  $\%68.29 \pm 28.30$  saflıkta olduğu hesaplanmıştır. Bu örnekte beta-glukan miktarının ölçülmesiyle alfa-glukan ekstraksiyonu sonrasında örneğe yüksek oranda beta-glukanın ( $\%31.71 \pm 28.30$ ) karıştığı belirlenmiştir. Alfa-

glukan için aynı işlem basamakları tekrar edilerek daha saf örnek  $\%97.87 \pm 1.45$  olan alfa-glukan elde edilmiştir. Her iki saflıktaki alfa-glukan örnekleri saklanarak sonraki deney aşamalarında kullanılmıştır.

Beta-glukanın saflaştırılmasında tek bir ekstraksiyon basamağı kullanılmış olup işlem sonrasında beta-glukanın saflık oranı  $\%97.79 \pm 0.28$  olarak bulunmuştur (Tablo 1).

##### Kaplanan kültür yüzeylerindeki glukan miktarı

Alfa- ve beta-glukanlar ayrı polistren yüzeylerin kaplanması kullanılmış olup optimum kaplama süresinin yaklaşık 24 saat olduğu bulunmuştur. 24 saatten kısa sürelerde alfa- ve beta-glukan kaplamalarının belirgin olarak daha az miktarda gerçekleşirken 48. saatten sonra kaplanan beta-glukan miktarının azaldığı görülmüştür. 24 saat sonunda kaplanan alfa-glukan miktarı  $32.55 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 5.83$  ve beta-glukan miktarı  $32.33 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 3.85$  olarak ölçülmüştür. Alfa- ve beta-glukan kaplama oranları arasında belirgin bir farkın olmadığı belirlenmiştir ( $p > 0.05$ ).

##### Hücre toksisitesi

Hücrelerin alfa- ve beta-glukan kaplı yüzeyler üzerinde kültürü sonrasında hücre morfolojilerinde belirgin bir farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 1 A-E). Sağlıklı mezenkimal kök hücrelerde gözlemlenen fibroblasta benzeyen hücre morfolojisine sahip tek çekirdekli hücrelerin kültür kabını kapladığı gözlemlenmiştir. 48 saat sonunda gerçekleştirilen toksisite analizi sonucunda toksik oranların %1'in altında ölçülerek alfa- ve beta-glukanların yol açtığı bir toksisitenin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 1 F; Tablo 1).

##### Hücre tutunması (adezyonu)

Hücre tutunması (adezyonu) ölçüldüğünde alfa-glukan ( $\%97.87$  saflıkta) kaplı yüzeylerde tutunma kontrole göre  $\%95.75 \pm 6.70$  oranında olduğu hesaplanmıştır. Saflık oranı  $\%68.29$  olan alfa-glukan kullanıldığında hücre tutunması  $\%88.10 \pm 2.04$  oranına kadar indiği görülmüştür (Şekil 2). Alfa-glukanın içindeki beta-glukan kirliliğinin artmasıyla hücre tutunmasının düştüğü gözlemlenmiştir. Beta-glukan kaplı yüzeylerde ise hücre tutunmasının ciddi oranda azaldığı ve  $\%97.79$  saflığa sahip beta-glukan üzerinde kültüre edilen hücrelerin kaplanmamış yüzey (kontrol) üzerindeki göre  $\%61.26 \pm 8.04$  oranında olduğu ölçülmüştür. Kolajen kaplı yüzey üzerinde hücrelerin tutunması kontrole göre  $\%107.34 \pm 3.14$  olup alfa-glukan ve beta-

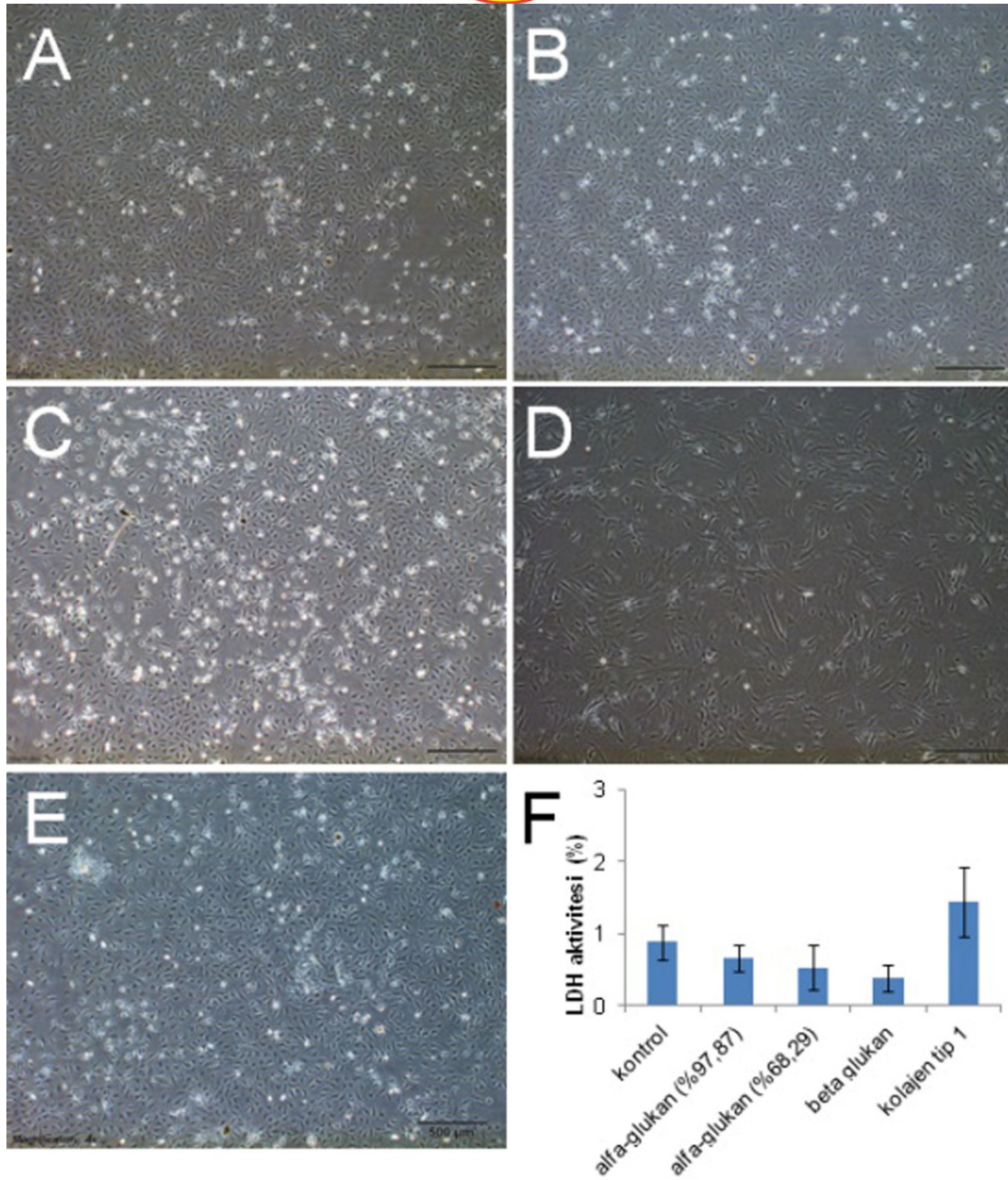


glukan gruplarıyla karşılaştırıldığında hücreler kolajen kaplı yüzeye daha yüksek oranda tutunmuştur ( $p < 0.05$ ).

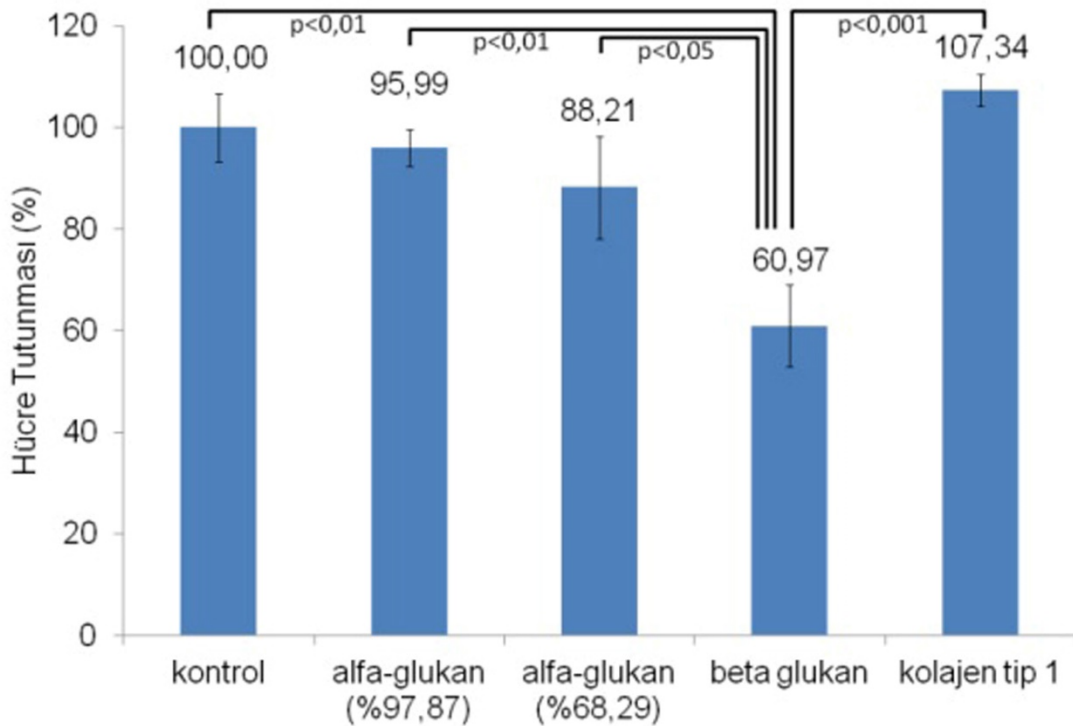
Tablo 1. *P. ostreatus*'tan alfa- ve beta-glukan ekstraksiyonu sonrası ürün özellikleri ve hücreler üzerindeki etkileri

	<b>Alfa-glukan (1× Saflaştırma)</b>	<b>Alfa-glukan* (2× Saflaştırma)</b>	<b>Beta-glukan</b>	<b>Kolajen Tip 1</b>
Saflık	%68.29 ±28.30	%97.87 ±1.45	%97.79 ±0.28	>%99
Verim	%0.06		%2.37	
Yüzeye tutunurluk (polistiren)	32.55 µg/cm <sup>2</sup> ±5.83	32.55 µg/cm <sup>2</sup> ±5.83	32.33 µg/cm <sup>2</sup> ±3.85	
Hücre Adezyonu (Kontrol yüzeye göre)	%88.10 ±2.04	%95.75 ±6.70	%61.26 ±8.04	%107.34 ±3.15
Hücre Toksisitesi (LDH) (Kaplı yüzey üzerinde)	<%1	<%1	<%1	<%2
Hücre Çoğalması (Başlangıçtaki hücre sayısına göre)	10.97 kat	12.35 kat	8.56 kat	12.86 kat
Hücre Çoğalması (96. saatin sonunda Kontrolle göre)	1.39 kat	1.56 kat	1.08 kat	1.62 kat

\* Alfa-glukanın ilk izolasyonu sonrası beta-glukan ile kirliliğin fazla olması nedeniyle ikinci kez ekstraksiyon yenilenmiştir.



Şekil 1. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin farklı glukanlarla kaplı yüzeyler üzerinde 96 saat kültürü sonrası ışık mikroskobu altındaki görüntüleri (A-E) ve toksisite (LDH) analizi (F). Alfa-glukan (%97.87 saflıkta, A), alfa-glukan (%68.29 saflıkta, B), beta-glukan (C), kolajen tip-1 (D) kaplı ve kaplı olmayan (kontrol, E) yüzeyler. Ölçek çubuğu: 500  $\mu$ m.



Şekil 2. Hücre tutunma (adezyon) deneyi sonrasında 48 saat sonra yüzey üzerinde asılı kalan hücrelerin kontrole göre oranları

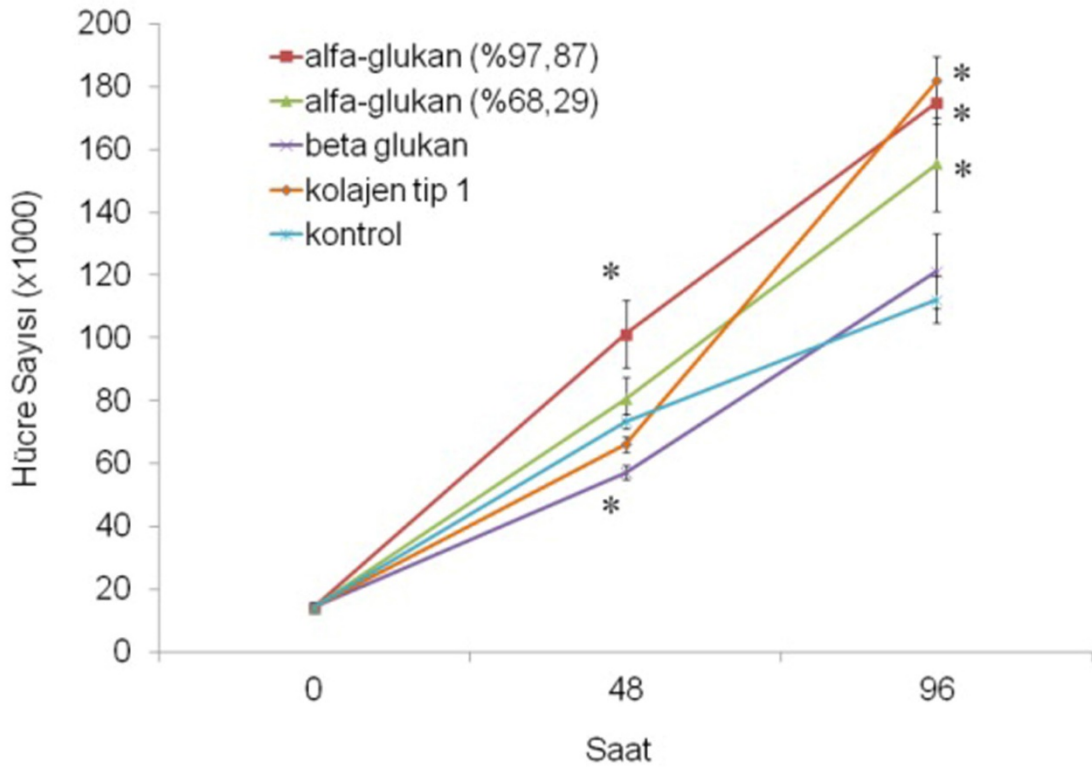
### Hücre çoğalması ve sitotoksinite

96 saat boyunca kültüre edilen hücreler alfa-glukan üzerinde en yüksek çoğalma hızı göstermişlerdir. Saflık derecesi %97,87 olan alfa-glukan üzerinde 96 saat içerisinde sayıları 12,35 kat artarken saflık oranı %68,29 olan alfa-glukan üzerinde hücre sayısı 10,97 kat artmıştır (Şekil 3). Kontrol grubu hücreleri bu süre içerisinde 7,92 kat artışı gerçekleştirerek alfa-glukanlar üzerinde kültüre edilen hücrelerin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermiştir ( $p<0,05$ ). Beta-glukan üzerinde kültüre edilen hücreler 96 saat sonra sayılarını 8,56 kat artmış olup bu artışın kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ). Beta-glukan üzerinde kültüre edilen hücrelerde 48 saat sonra kontrole göre daha düşük bir çoğalma gözlemlenmiş olup bu verinin yüzeye tutunabilen daha düşük hücre sayısı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ancak 96 saat sonunda beta-glukan kaplı yüzey üzerindeki hücre sayısının kaplanmamış (kontrol) yüzeyine yakın bir seviyeye ulaştığı gözlemlenmiştir. Yüzeylerin hücre çoğalması üzerine

etkileri incelendiğinde 96 saatin sonunda beta-glukan kaplı yüzey ve kaplanmamış yüzey arasında istatistiksel olarak belirgin bir farkın olmadığı görülmüştür. Alfa-glukan kaplı yüzeylerin hücre çoğalmasını desteklediği ve alfa-glukan saflığı arttıkça mezenkimal kök hücrelerin daha hızlı çoğaldıkları belirlenmiştir (Şekil 3). Kolajen kaplı yüzey üzerinde hücreler 96 saat sonrasında sayıları başlangıca göre 12,86 kat artmış ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede fark göstermesine karşın yüksek saflıktaki alfa-glukan grubuyla karşılaştırıldığında hücre çoğalmaları arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark bulunamamıştır.

LDH analizi sonucunda yüzey kaplamasında kullanılan malzemelerin hücre toksisitesi (sitotoksinite) üzerine bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Alfa- ve beta-glukanın, hücre membranının bütünlüğüne olumsuz bir etkisinin olmadığı enzim aktivitesiyle belirlenmiştir. Kolajen kaplı yüzeyin toksisite değeri %2 değerinin altında çıkmış olması gene toksik etkinin olmadığını göstermektedir (Tablo 1).





Şekil 3. Alfa- ve beta-glukan kaplı yüzeyler üzerinde 96 saat boyunca kültüre edilen hücrelerin çoğalma hızları.

### Tartışma

*P. ostreatus* 'tan alfa- ve beta-glukan ekstraksiyonları sonunda alfa-glukan ekstraksiyon verimi başlangıç kuru mantar kütlelerine göre %0.06 oranında ve beta-glukan ekstraksiyon verimi %2.37 oranında gerçekleşmiştir. Farklı mantar türlerinde ölçülmüş beta-glukan miktarı değişkenlik göstermektedir: *Pleurotus* cinsine ait çözünebilir beta-glukan içeriği %0.6 iken Shiitake mantarında (*Lentinus edodes*) bu oran kuru ağırlığın %1.5'i olarak bildirilmiştir (Otakar ve ark., 2009). Yüksek miktarda beta-glukan içeren *Sparassis crispa*'nın kuru kütlelerinin %40'ının çözünür beta-glukandan oluştuğu ölçülmüştür (Kimura, 2013). *P. ostreatus* and *P. eryngii* mantarlarında gerçekleştirilen bir çalışmada toplam glukan miktarları sırasıyla %3.02 ± 31.2 ve %48.27 ± 2.35 olarak bulunmuştur (Vetvicka ve ark., 2019). İlgili çalışmada alfa- ve beta-glukan miktarları *P. ostreatus* için sırasıyla %3.93 ± 0.87 ve %2.72 ± 27.27 oranında ve *P. eryngii* için ise sırasıyla %4.57 ± 0.07 ve %43.70 ± 0.89 oldukları gösterilmiştir. Bu çalışmada ulaşılan beta-glukan ekstraksiyon verimi (%2.37) ilgili yayında belirtilen değere (%2.72) yakın çıkmıştır. Ancak alfa-glukan miktarları arasındaki fark yüksek olup bu yüksek fark ilgili çalışmada soğuk su ekstraksiyonu yapılmadan doğrudan sıcak su ekstraksiyonu ile hem

alfa-glukan hem de alfa-galaktan miktarları beraber hesaplanmış olmasıyla açıklanabilir.

Bu çalışmada kullanılan benzer bir yöntemi kullanmış, Palacios ve ark.'nın (2012) çalışmasında alfa ve beta glukan ekstraksiyon verimleri kuru ağırlığa göre %1.5 ve %4.5 olarak gerçekleştiği bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada ise ekstraksiyon verimleri alfa-glukan için %1.39 verimle yakın bir değer bulunmuş olsa da %14.18 beta-glukan ekstraksiyon verimiyle çok daha yüksek değer bildirilmiştir (Khan ve ark., 2017). Sıcak su ve alkali çözeltinin kullanıldığı başka bir çalışmada yulaftan elde edilen beta-glukanın ekstraksiyon verimi %5'in altında çıkarken protein, selüloz ve diğer hemiselülozları hedef alan enzimatik işleme ekstraksiyon verimi %5'in üstüne çıktığı ve beta-glukanın geri kazanımının ise %82.1-86.6 aralığında olduğu bildirilmiştir (Ahmad ve ark., 2010). Enzim kullanılmadığında bu geri kazanım yulafta %60-76 oranında olduğu ve geri kazanımının alkali işlemlerde düşük çıktığı belirtilmiştir (Dawkins ve Nnanna, 1993; Ahmad ve ark., 2009). Yapılan çalışmada ise elde edilen ekstraksiyon verimi literatürdeki değerlerin çok altında çıkmış olup ticari ölçüde glukan üretimi için metot optimizasyonunu gerektirdiğini göstermektedir. Metilotrofik bir maya olan *Pichia pastoris* 'ten temelde sıcak su ekstraksiyonu ve ultrasonikasyon tekniklerini kullanarak çok basamaklı bir saflaştırma yöntemi



kullanılmış ve saflaştırma sonrasında %11.7 verimlilikle toplam gluklan eldesi gerçekleştirirken elde edilen ürünün saflığı %85.3 oranında olduğu belirtilmiştir (Xing ve ark., 2018). Verimin bu kadar yüksek çıkmasının sebeplerinden bir tek hücreli süspanse bir kültürden ekstraksiyonu gerçekleştirmeleri olabilir. Ayrıca bir sebep de tercih ettikleri yöntemde kullandıkları ultrasonikatör (20 kHz ve 10 s) ile daha küçük parçaların elde edilebilmesi ve ekstraksiyon verimini artırabilmesidir. Ancak bu yöntemin orta ve büyük ölçekte kullanımı sınırlı olacaktır. Ultrasonikasyonun dışında yüksek basınç homojenizasyon yöntemini de kullanıldığı ve yüksek verim alındığı (verim %11.18 ve saflık %93,12) belirtilmişse de özellikle 1,6-D-beta-glukanların yapısının bozulduğu belirtilmiştir (Sandula ve ark., 1999; Liu ve ark., 2008). Daha küçük parçaların elde edilmesiyle daha yüksek ekstraksiyon verimlilik değerlerinin eldesi ilgili çalışmalarda mümkün olmuştur. Çalışmamızdaki tek basamaklı ekstraksiyon yönteminde elde edilen beta-glukanların verimi düşük olmasına karşın saflığı literatürde belirtilen bir diğer beta-glukan ekstraktına göre daha yüksektir. Satitmanwivat ve ark.'nın (2012) çalışmasında HPLC saflaştırması sonrasında *Pleurotus sajor-caju* beta-glukan saflığı %90.2 olduğu bulunmuştur. *Agaricus blazei* Murill'in su ile ekstraksiyonu sonrasında alfa-glukan DEAE-Sepharose ve Sephacryl S-500 kolonlarıyla saflaştırılmış ve %96 saflıkta ürün elde edilmiştir (Zhang ve ark., 2018). Ancak çoğu çalışmada elde edilen alfa- ve beta-glukanların saflıkları incelenmemiş ya da bildirilmemiş olduğundan karşılaştırılması mümkün olmamıştır. Buna karşın ticari birçok beta-glukan saflığı >%95 olduğu belirtilmiştir. Arpadan elde edilmiş beta-glukanın (Sigma, Cat. No. G6513) HPLC saflaştırması sonrasındaki saflığının %95 olduğu bildirilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* 'dan gluklan izolasyonunda asetik asit, kostik ve sıcak su ekstraksiyon sisteminin kullanıldığı çalışmada elde edilen gluklanın %8.4 verimlilikte ve %55 saflıkta (Thammakiti ve ark., 2004), asetik asit ve %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ekstraksiyonunun kullanıldığı sistemde %80.5 saflıkta (Hunter ve ark., 2002) ve sodyum hipoklorat ve DMSO'nun kullanıldığı sistemde verimin %3.7 (Ohno ve ark., 2001) olduğu belirtilmiştir.

Kit ile birlikte temin edilen enzimlerin kullanılmasıyla alfa- ve beta-glukan ekstraktlarının diğer gluklan ile ne kadar karıştığı ölçülmüştür. Beta-glukan izolasyonunda yüksek saflıkta ürün elde edilirken alfa-glukan izolasyonuna beta-glukanın karıştığı bulunmuştur. Ancak gluklan miktarları farklı türler arasında farklılıklar gösterebileceği gibi aynı tür içerisinde kültür koşullarına bağlı olarak da farklı

miktarlarda olabilmektedir (Rop ve ark., 2009). Daha iyi bir saflaştırma için DEAE-Sepharose/Sephacryl S-500, Sephadex G-15 ya da DEAE-cellulose kolon kromatografisi kullanılmış olsa da doğal malzemelerde görülen ve polimerin dallanmasından kaynaklanan yüksek heterojenite tek tip bir ürünün elde edilmesini zorlaştırmaktadır (Camelini ve ark., 2005; Kao ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2018).

Bu çalışmada ulaşılmak istenen hedeflerden biri elde edilen gluklanların hücre üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve rejeneratif tıpta bir biyomalzeme olarak kullanılabilirliğinin ortaya konmasıdır. Bu çalışmada beta-glukan üzerine olan hücre tutunmasının düşük (%61,26) olduğu görülmüştür. Arpadan %95 saflıkta elde edilen beta-glukanın fibroblast hücrelerinin çoğalmasını ve hücre migrasyonunu desteklediği ve böylece yara iyileştirmede kullanılabileceği ortaya konmuştur (Fuste ve ark., 2019). Ancak ilgili çalışmada arpa beta-glukan hücre tutunmasını engelleyerek kontrole göre yaklaşık %60 oranda kalmasına sebep olmuş ve bu çalışmada ortaya konan %61.26 tutunma değerine yakın olduğu görülmektedir. Kolajen tip-1 kaplı yüzeylerin hücre tutunmasını iyi destekleyen polistiren malzemesine göre daha iyi bir tutunma sağladığı görülmüştür. Yüksek saflıktaki (%97.87) alfa-glukanın hücre tutunmasını ve hücre çoğalmasını kolajen tip-1 kaplı yüzeye yakın bulunmuş ve bu bulgu alfa-glukanın bir biyomalzeme olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. α-1,4- ve α-1,6-glikosidik bağ ile bağlı glukoz monomerlerinden oluşmuş ve bir alfa-glukan olan *Aureobasidium pullulan* kaynaklı pullulan kullanılarak yapılan çalışmalarda toksik olmaması, immün cevap oluşturmaması ve karsinojenik etki taşıyamaları nedeniyle iyi bir ilaç taşıyıcı ve kaplama malzemesi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Jo ve ark., 2006; Singh ve ark., 2017). Pozitif yüklenmiş (katyonize) pullulanların kalp-damar cerrahisinde kullanılan stentlerin kaplanması kullanılabileceği öngörülmüştür (Singh ve ark., 2017). Belirtilen çalışmalarda ilaç olarak kullanılacak kapsüllerin kaplanması amacıyla kullanıldığından kaplanan alfa-glukanın miktarı bildirilmemiştir. Alfa-glukanın kontrol grubuna göre hücre çoğalmasını yaklaşık 1.6 kat artırdığı bu çalışmada ölçülmüştür. Literatürde yalnız alfa-glukanların hücre kültürü veya doku implantının kullanımını içeren yayına rastlanmamıştır. Kolajen tip-1 kaynağının hayvansal olmasından dolayı oluşturacağı kontaminasyon riski yüzünden medikal alanda kullanımı oldukça sınırlandırılmıştır. Bu yüzden alfa-glukan gibi hayvan ya da insan kaynaklı olmayan bir kaplama malzemesinin medikal ya da doku mühendisliği



alanlarındaki kullanımı oldukça yüksek potansiyele sahiptir.

Beta-glukan ile yapılan çalışmada bu polimerin hücre tutunması üzerinde olumlu ya da olumsuz bir etkisinin olduğu veya hücre canlılığını azaltacak bir toksisite gösterdiği belirlenememiştir. Beta-glukanın hücre çoğalmasında da desteklemeyerek kültür ortamında kullanılmasının bir avantaj sağlamadığı gösterilmiştir. Beta-glukanlar hidrojel ya da diğer biyo-malzemelerle birleştirilerek sağlık alanında kullanılabilir biyo-film ya da 3-boyutlu yapıların oluşturulmasında kullanılabilirliği birçok çalışmada gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2016; Borkowski ve ark., 2017; Klimek ve ark., 2017). Ancak beta-glukanların hücrelerde laktosil seramidler ile bağlantı kurduğu ve bunun sonucunda MAPK sinyal yolağında fosforilasyonu sağladığı tespit edilmiştir (Brown ve ark., 2002; Lin ve ark., 2007). Bu yüzden bu malzemenin tek başına kullanımının organizma üzerindeki etkilerinin araştırılması devam etmektedir. Kitosan nano-parçacıkların 1,3-β-glukan (%1) ile kaplanması sonrasında partiküllerin negatif yüklendiği (-33 ± 2 mV) ölçümlerle ortaya konmuştur (Singh et al., 2018). Ancak beta-glukan kaplı bu nano-parçacıkların taşıdığı ilaçların C6 ve LN18 glioblastoma hücre hatlarına daha etki bir şekilde endositoz ile aktarıldığı ve bunu gerçekleştirirken hücre yüzey reseptörü aracılığıyla gerçekleştirebileceği belirtilmiştir (Singh et al., 2018). Fungal alfa- ve beta-glikozidik bağların immün sistemi üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada belirtildiği gibi bu zincirlerin uzunluğu, dallı yapısı veya polisakkariti oluşturan zincir dizisinin heterojenitesi bu immün tepkiyi belirlemektedir (Kataoka ve ark., 2002). *Saccharomyces cerevisiae* kaynaklı beta-glukanın karaciğer kanseri hücreleri üzerine dolaylı toksik etkisinin olduğu gösterilmiştir (Javmen ve ark., 2015). İlgili çalışmalar dallanma dışında aynı moleküler omurgaya sahip *S. cerevisiae* kaynaklı glukanlar kullanılarak gerçekleştirildiğinden *P. ostreatus* kaynaklı beta-glukanların etkisi bu çalışmayla gösterilmeye çalışılmıştır. *Pleurotus tuber-regium* 'tan elde edilen beta-glukanın biyo-uyumlu olma özelliği kullanılarak kanser tedavisinde kullanılacak toksik nanomalzemenin beta-glukan ile kaplanması sonrasında sitotoksik etkisinin azaltıldığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2018). İlgili çalışmada beta-glukanla kaplama yöntemiyle biyo-uyumlu fonksiyonel nanomalzemelerin tasarlanabileceği ve klinik uygulamalar için daha geniş fırsatlar sunabileceği belirtilmiştir.

Yapılan çalışmada alfa- ve beta-glukanların biyo-uyumlu oldukları yüzey kaplaması sonrasında incelenmiştir. Sıvı besiyerine eklenmesi yerine

mezenkimal kök hücrelerin tutunduğu yüzeyin üzerine kaplanmasıyla bu malzemenin biyomedikal uygulamalara uygun bir biyomateryal olduğu gösterilmeye çalışılmıştır. Yüksek oranda dallanmış bir polimer yapısının immün tepkinin kuvvetinin azalmasına hatta immün modülatör etkinin yaratılabileceği ortaya konmuştur (Paulik ve ark., 1996; Sun ve Liu, 2009; Carbonero ve ark., 2012).

Sonuç olarak bu çalışmada *P. ostreatus* 'tan alfa- ve beta-glukan izolasyonları gerçekleştirildi ve biyomedikal uygulamalar için uygun biyo-uyumlu malzemeler oldukları gösterildi. Ayrıca alfa-glukanın hücre tutunması ve çoğalması gibi hücre canlılığına özgü belirteçleri desteklediği ortaya kondu. *P. ostreatus* kaynaklı alfa-glukanın özelliklerinin daha iyi incelenmesiyle bir biyo-malzeme olarak kullanılabilirliğinin önündeki belirsizlik ortadan kalkacaktır.

#### Kaynaklar

- Ahmad, A., Anjum, F.M., Zahoor T., Nawaz H., and Din, A. (2009). Physicochemical and functional properties of barley β-glucan as affected by different extraction procedures. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44 181–187.
- Borkowski, L., Sroka-Bartnicka, A., Polkowska, I., Pawlowska, M., Palka, K., Zieba, E., Slosarczyk, A., Jozwiak, K., ve Ginalska, G., (2017). New approach in evaluation of ceramic-polymer composite bioactivity and biocompatibility., *Anal. Bioanal. Chem.*, 409, 5747-5755.
- Brown, G.D., Taylor, P.R., Reid, D.M., Willment, J.A., Williams, D.L., Martinez-Pomares, L., Wong, S.Y., ve Gordon, S., (2002). Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages., *J. Exp. Med.*, 196, :407-412.
- Camelini, C.M., Maraschin, M., de Mendonça, M.M., Zucco, C., Ferreira, A.G. ve, Tavares, L.A. (2005)., Structural characterization of beta-glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products., *Biotechnol. Lett.*, 27, 1295-1299.
- Carbonero, E.R., Ruthes, A.C., Freitas, C.S., Utrilla, P., Gálvez, J., da Silva, E.V., Sassaki, G.L., Gorin, P.A. ve, Iacomini, M., (2012). Chemical and biological properties of a highly branched β-glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*., *Carbohydr. Polym.*, 90, 814-819.



- Castro-Alves, V.C., ve Nascimento, J.R.O.D., (2018).  $\alpha$ - and  $\beta$ -d-Glucans from the edible mushroom *Pleurotus albidus* differentially regulate lipid-induced inflammation and foam cell formation in human macrophage-like THP-1 cells,. *Int J Biol Macromol.*, 111, 1222-1228.
- Chen, J., ve Seviour, R., (2007). Medicinal importance of fungal beta-(1->3), (1->6)-glucans,. *Mycol. Res.*, 111, 635–652.
- Choromanska, A., Kulbacka, J., Harasym, J., Dubinska-Magiera, M. ve, Saczko, J., (2017). Anticancer activity of oat  $\beta$ -glucan in combination with electroporation on human cancer cells,. *Acta Pol. Pharm.*, 74, 616-623.
- Correa, R.C.G., Brugnari, T., Bracht, A., Peralta, R.M., . ve Ferreira, I.C.F.R.,(2016). Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings,. *Trends Food Sci. Technol.*, 50, 103-117.
- Dawkins N.L. ve Nnanna I.A. (1993). Oat gum and  $\beta$ -glucan extraction from oat bran and rolled oats: Temperature and pH effects. *Food Sci.* 58 562–566.
- Deepalakshmi, K. ve, Mirunalini, S., (2014). *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties,. *J. Biochem. Tech.*, 5, 718-726.
- Doğan, N., Doğan, C.ve, Hayoğlu, İ., (2014). Farklı sıcaklık ve süre uygulamalarının *pleurotus ostreatus* (istiridye mantarı)'un bazı özelliklerine etkisi. , *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 18, 10-16.
- Du, B., Lin, C.Y., Bian, Z.X. ve, Xu, B.J., (2015). An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucan,. *Trends Food Sci. Technol.*, 41, 49–59.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. ve, Smith, F., (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances,. *Anal Chem.*, 28, 350-356.
- Duruksu, G., ve Aciksari, A., (2018). Guiding the Differentiation Direction of Pancreatic Islet-Derived Stem Cells by Glycated Collagen,. *Stem Cells Int.*, 2018, 6143081.
- El Enshasy, H.A., ve Hatti-Kaul, R. (2013)., Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications,. *Trends Biotechnol.*, 31, 668-677.
- Erdem, A., Duruksu, G., Congur, G., and Karaoz, E., (2013). Genomagnetic assay for electrochemical detection of osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells,. *Analyst*, 138, 5424-5430.
- Fontana, G., Gershlak, J., Adamski, M., Lee, J.S., Matsumoto, S., Le, H.D., Binder, B., Wirth, J., Gaudette, G. ve, Murphy, W.L., (2017). Biofunctionalized Plants as Diverse Biomaterials for Human Cell Culture, *Adv Healthc Mater.*, 6, 1-9.
- Fuste, N.P., Guasch, M., Guillen, P., Anerillas, C., Cemeli, T., Pedraza, N., Ferrezuelo, F., Encinas, M., Moralejo, M. ve Garí, E. (2019). Barley  $\beta$ -glucan accelerates wound healing by favoring migration versus proliferation of human dermal fibroblasts. *Carbohydr. Polym.* 210 389–398.
- Gutierrez, A., Prieto, A., ve Martínez, A.T., (1996). Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*, *Carbohydr Res.*, 281, 143-154.
- Higashi, D., Seki, K., Ishibashi, Y., Egawa, Y., Koga, M., Sasaki, T., Hirano, K., Mikami, K., Futami, K., Maekawa, T. ve, Sudo, M., (2012). The effect of lentinan combination therapy for unresectable advanced gastric cancer,. *Anticancer Res.*, 32, 2365-2368.
- Hunter, K. W., Jr., Gault, R. A. ve Berner, M. D. (2002). Preparation of microparticulate  $\beta$ -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 267–271.
- Hyde, K.D., Bahkali, A.H. ve, Moslem, M.A., (2010). Fungi-an unusual source for cosmetics,. *Fungal Divers.*, 43, 1-9.
- İşsever, H., Ezirmik, E., ve Şeker, N., (2018). Beta glukanolara sağlık üzerine etkileri,. *Turk. Klin. J. Public Health-Special Topics*, 4,13-17.
- Jantova, S., Bakos, D., Birosova, L. ve, Matejov, P., (2015). Biological properties of a novel coladerm-beta glucan membrane. In vitro assessment using human fibroblasts,. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 159, 67-76.





- Javmen, A., Nemeikaite-Ceniene, A., Grigiskis, S., Jonauskienė, I., Rudenkov, M., Kacianauskas, D., ve Mauricas, M., (2015). *S. cerevisiae*  $\beta$ -glucan reduced viability of mouse hepatoma cells in vitro., *Turk J Biol*, 39, 562-566.
- Jesenak, M., Majtan, J., Rennerova, Z., Kyselovic, J., Banovcin, P., ve Hrubisko, M., (2013). Immunomodulatory effect of pleuran ( $\beta$ -glucan from *Pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections., *Int Immunopharmacol.*, 15, 395-399.
- Jo, J., Yamamoto, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., ve Tabata, Y.,(2006). Liver targeting of plasmid DNA with a cationized pullulan for tumor suppression., *J Nanosci Nanotechnol.*, 6, 2853-2859, (2006).
- Kao, P.F., Wang, S.H., Hung, W.T., Liao, Y.H., Lin, C.M. ve Yang, W.B., (2012). Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights beta-1,3-glucan from the residue of extracted *Ganoderma lucidum* fruiting bodies., *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012, 673764.
- Karacsonya, S. ve Kuniakb, L., (1994). Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble  $\beta$ -D-glucan., *Carbohydr. Polym.*, 24, 107-111.
- Kataoka, K., Muta, T., Yamazaki, S. ve Takeshige, K., (2002). Activation of macrophages by linear (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans: implications for the recognition of fungi by innate immunity., *J. Biol. Chem.*, 277, 36825–36831.
- Khan, A.A., Gani, A., Masoodi, F.A., Mushtaq, U., ve Naik, A.S., (2017). Structural, rheological, antioxidant, and functional properties of  $\beta$ -glucan extracted from edible mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Coprinus atrimentarius*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 11, 67-74.
- Kimura, T., (2013) Natural products and biological activity of the pharmacologically active cauliflower mushroom *Sparassis crispa*., *BioMed Res Int.*, 2013, 982317.
- Klimek, K., Przekora, A., Benko, A., Niemiec, W., Blazewicz, M., ve Ginalska, G., (2017). The use of calcium ions instead of heat treatment for  $\beta$ -1,3-glucan gelation improves biocompatibility of the  $\beta$ -1,3-glucan/HA bone scaffold., *Carbohydr. Polym.*, 164, 170-178.
- Li, X., Zhou, J., Dong, X., Cheng, W.Y., Duan, H. ve Cheung, P.C.K., (2018). In Vitro and In Vivo Photothermal Cancer Therapeutic Effects of Gold Nanorods Modified with Mushroom  $\beta$ -Glucan., *J Agric Food Chem.*, 66, 4091-4098.
- Lin, H., Cheung, S.W., Nesin, M. ve Cassileth, B.R., (2007). Cunningham-Rundles S., Enhancement of umbilical cord blood cell hematopoiesis by maitake beta-glucan is mediated by granulocyte colony-stimulating factor production., *Clin. Vaccine Immunol.*, 14, 21-27.
- Liu, X., Wang, Q., Cui, S. ve Liu, H. (2008). A new isolation method of  $\beta$ -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocolloid* 22, 239–247.
- Mukhopadhyay, S.K., Naskar, D., Bhattacharjee, P., Mishra, A., Kundu, S.C. ve Dey, S. (2017)., Silk fibroin-Thelebolan matrix: A promising chemopreventive scaffold for soft tissue cancer., *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 155, 379-389.
- Nwe, N., Furuike, T., ve Tamura, H., (2011). Production, Properties and Applications of Fungal Cell Wall Polysaccharides: Chitosan and Glucan. Jayakumar R., Prabakaran M. ve Muzzarelli R.A.A. (Ed.) *Chitosan for Biomaterials II. Advances in Polymer Science* (Jayakumar R., Prabakaran M., Muzzarelli R.A.A. ), (ss. 187-207). Berlin: Springer-Verlag Berlin, 2011;244:187-207.
- Nwe, N., Stevens, W.F., Tokura, S. ve Tamura, H. (2008). Characterization of chitosan and chitosan-glucan complex extracted from the cell wall of fungus *Gongronella butleri* USDB 0201 by enzymatic method. , *Enzyme Microb. Technol.*, 42, 242-251.
- Ohno, N., Miura, T., Miura, N. N., Adachi, Y. ve Yadomae, T. (2001) Structure and biological activities of hypochlorite oxidized zymosan. *Carbohydr. Polym.* 70, 339–349.
- Otakar, R., Mlcek, J. ve Jurikova, T., (2009). Beta-glucans in higher fungi and their health effects, *Nutr. Rev.*, 67, 624–631.
- Palacios, I., García-Lafuente, A., Guillamón, E. ve Villares, A., (2012). Novel isolation of water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms, *Carbohydr. Res.*, 358, 72-77.



- Papaspyridi, L., Zerva, A. ve, Topakas, E., (2018). Biocatalytic Synthesis of Fungal  $\beta$ -Glucans. *Catalysts*, 8, 274.
- Paulik, S., Mojzisova, S.J., Durove, A., Benisek, Z. ve, Huska, M., (1996). The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan (*Pleurotus ostreatus*) on delayed hypersensitivity and phagocytic ability of blood leucocytes in mice,. *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, 43, 129-135.
- Piska, K., Sułkowska-Ziaja, K. ve, Muszyńska, B., (2017). Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) – Its dietary significance and biological activity,. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 16, 151-161.
- Rop, O., Mlcek, J. ve Jurikova T. (2009). Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutr. Rev.* 2009; 67(11): 624-631.
- Ruthes, A.C., Smiderle, F.R., ve Lacomini, M., (2015). D-glucans from edible mushrooms: a review on the extraction, purification and chemical characterization approaches,. *Carbohydr. Polym.*, 117, 753-761.
- Sandula, J., Kogan, G., Kacurakova, M., Machova, E. (1999). Microbial (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans, their preparation, physio-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydr. Polym.*, 38, 247–253.
- Sari, M., Prange, A., Lelley, J.I., ve Hambitzer R., (2017). Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms,. *Food Chem.*, 216, 45-51.
- Satitmanwivat, S., Ratanakhanokchai, K., Laohakunjit, N., Chao, L.K., Chen, S.T., Pason, P., Tachaapaikoon, C. ve, Kyu K.L., (2012). Improved purity and immunostimulatory activity of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-glucan from *Pleurotus sajor-caju* using cell wall-degrading enzymes,. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 5423-5430.
- Singh, P.K., Srivastava, A.K., Dev, A.D., Kaundal, B., Choudhury, S.R. ve Karmakar, S. (2018). 1, 3- $\beta$ -Glucan anchored, paclitaxel loaded chitosan nanocarrier endows enhanced hemocompatibility with efficient anti-glioblastoma stem cells therapy. *Carbohydr. Polym.* 180 365–375.
- Singh, R.S., Kaur, N., Rana, V. ve, Kennedy, J.F., (2017). Pullulan: A novel molecule for biomedical applications,. *Carbohydr. Polym.*, 171, 102-121.
- Sun, Y. ,ve Liu, J., (2009). Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*,. *Bioresour. Technol.*, 100, 983-986.
- Thammakiti, S., Suphantharika, M., Phaesuwan, T. ve Verduyn, C. (2004). Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans for potential applications in the food industry. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 21–29.
- Vetvicka, V., Gover, O., Karpovsky, M., Hayby, H., Danay, O., Ezov, N., Hadar, Y. ve Schwartz, B. (2019). Immune-modulating activities of glucans extracted from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*. *J. Funct. Food.* 54 81–91.
- Wasser S.P. (2010)., Medicinal mushroom science: History, current status, future trends, and unsolved problems,. *Int. J. Med. Mushrooms*, 12, 1–16.
- Xing, Y., Chen, C., Sun, W., Zhang, B., Sang, Y., Xiu, Z. ve Dong, Y. (2018). An environment-friendly approach to isolate and purify glucan from spent cells of recombinant *Pichia pastoris* and the bioactivity characterization of the purified glucan. *Eng. Life Sci.* 18, 227–235.
- Zhang, A., Deng, J., Liu, X., He, P., He, L., Zhang, F., Linhardt, R.J. ve Sun P. (2018). Structure and conformation of  $\alpha$ -glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill by high-speed shearing homogenization. *Int. J. Biol. Macromol.* 113 558-564.
- Zhu F., Du B. ve, Xu B. (2016)., A critical review on production and industrial applications of beta-glucans,. *Food Hydrocolloid.*, 52, 275-288.



Geliş(Received) :27/06/2018  
Kabul(Accepted) :02/11/2018

Derleme Makale/Review Article  
Doi:10.30708mantar.437622

## Fungal Biyokontrol Ajanları ve Metabolitleri

Şenay ŞENTÜRK<sup>1</sup>, Özlem ABACI GÜNYAR\*<sup>2</sup>  
\*Sorumlu yazar:ozlemabaci@yahoo.com

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,  
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ABD, Bornova-İzmir/TÜRKİYE  
<sup>1</sup>Orcid ID: 0000-0002-4849-2900/ sntrk.89@gmail.com  
<sup>2</sup>Orcid ID: 0000-0002-4033-1862/ ozlemabaci@yahoo.com

**Öz:** Funguslar poliketidler, ribozomal olmayan peptitler ve terpenler olarak adlandırılan düşük moleküler ağırlıklı çok fazla sayıda sekonder metabolitler üretirler. Büyüme ve enerji üretimi gibi temel metabolik süreçlere doğrudan dahil olmasalar da, sekonder metabolitler işgal edilen bir ekolojik niş içinde üretici organizmanın hayatta kalmasına katkıda bulunan bir dizi biyolojik aktivite sergilerler. Sergilenen biyoaktivite nedeniyle zararlı böceklerin, yabancı otların ve hastalıkların biyokontrolüne yönelik olarak fungusların ürettikleri sekonder metabolitlerin kullanımı ile ilgili çalışmalar son 10 yılda önemli ölçüde yoğunlaşmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Fungus, Biyokontrol, Sekonder metabolit, Biyoaktivite

## Fungal Biocontrol Agents and Their Secondary Metabolites

**Abstract:** The fungus produces a large number of secondary metabolites of low molecular weight called polyketides, non-ribosomal peptides and terpenes. Although not directly involved in basic metabolic processes such as growth and energy production, secondary metabolites exhibit a range of biological activities that contribute to the survival of the producer organism in an occupied ecological niche. Studies on the use of secondary metabolites produced by fungi for biocontrol of pests, weeds and diseases due to exhibited bioactivity have been intensively concentrated in the last 10 years.

**Key words:** Fungus, Biocontrol, Secondary metabolite, Bioactivity

### Giriş

#### 1-Fungal Sekonder Metabolitler

Canlıların metabolik faaliyetleri sonucu oluşan ürünlere metabolit denir. Büyüme, gelişme ve çoğalma için gerekli olan maddeler primer metabolit adını alırken, eksponansiyel fazın sonunda üretilen, düşük moleküler ağırlıklı doğal bileşiklere ise sekonder metabolitler denilmektedir (Cantürk, 2015). Sekonder metabolitler, primer metabolizmada kullanılan metabolitlerin manipülasyonu ve dönüşümü ile oluşan kompleks ürünleri içerir (Calvo ve ark., 2002; Pelaez, 2005; Fox ve Howlett, 2008; Brakhage ve Schroeckh, 2011; Brakhage, 2013; Boruta, 2018).

Funguslar geniş bir yelpazede sekonder metabolitler üretebilen olağanüstü organizmalardır. Funguslar predatörlerine ve rakiplerine karşı kimyasal iletişim için veya patojenik funguslarda olduğu gibi hayvan ve bitki konakçılarına manipüle etmek için sekonder metabolitleri kullanırlar. Bunların birçoğu, yararlı olan antibiyotik, antiviral, antitümör, antihipersolesterolemik ve immünoşüpresan aktivitelerinin yanı sıra arzu edilmeyen fito ve mikotoksik aktiviteler sergilemektedir (Calvo ve ark., 2002; Pelaez, 2005; Fox ve Howlett, 2008; Brakhage ve Schroeckh, 2011; Brakhage, 2013; Boruta, 2018).



## 2-Biyokontrol ve Biyokontrolde Fungusların Önemi

Biyokontrol; canlı doğal düşmanlar, antagonistler, rekabetçiler ve diğer kendi çoğalabilen biyolojik varlıkların kullanılmasıyla yapılan zararlılarla biyolojik mücadele stratejisidir (Uygun ve ark., 2010).

Bitkinin içinde veya üzerinde kendiliğinden üreyebilirler ve bitki büyüdükçe sürekli koruma sağlayabilirler. Genellikle insanları veya diğer memelileri etkilemezler, bu da onları son derece güvenli kılar. Böcekler için parazit olan çok sayıda Hyphomycetes sınıfında yer alan fungusun sporunu üretmek nispeten daha kolaydır; bu nedenle diğer biyolojik kontrol ajanları ile karşılaştırıldığında kullanımda ön plana çıkarlar. Fungusların geniş konukçu yelpazesi, çoğu kez aynı ürünle birçok zararlının kontrolünü sağlamak anlamına gelmektedir. Bu nedenler ile funguslar biyolojik kontrol ajanlarıdır (Butt ve ark., 2001; Ghorbanpour ve ark., 2017).

Mikro funguslar, laboratuvarında kültürasyon işlemlerinin kolaylığından dolayı sekonder metabolit üretiminde önemli bir potansiyele sahiptirler. Fungusların ürettiği sekonder metabolitler hem çok çeşitlidir hem de birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Oldukça farklı koşullarda yaşayabilmek için adaptasyon mekanizmaları gelişmiş olan fungusların biyoteknolojik önemi de gün geçtikçe artmaktadır (Cantürk, 2015).

## Bulgular ve Tartışma

### 1-Fungal Biyokontrol Ajanların Etki Mekanizmaları

Faydalı fungusların koruyucu etkileriyle bağlantılı mekanizmaları anlamak, olumlu sonuçların elde edilmesi ve yeni stratejilerin geliştirilmesi için gereklidir. Faydalı fungusların biyokontrol mekanizmaları; Alan ve besin maddeleri için patojenlerle rekabet etme, Mikoparazitizm, Antibiyosis, Mikovirüs aracılı çapraz koruma (mycovirus-mediated cross protection - MMCP) ve Uyarılan sistemik direnç (ISR) olmak üzere beş sınıfa ayrılabilir. Bu farklı biyokontrol mekanizmaları, tek başına veya kombinasyon halinde faydalı funguslar tarafından kullanılabilir (Ghorbanpour ve ark., 2017).

#### a-Alan ve besin maddeleri için patojenlerle rekabet

Faydalı funguslar, paylaşılan habitatı yani bitki dokularını, rizosferleri veya filozferleri kolonize ederek, yer ve besinden patojenleri yoksun bırakarak onları inhibe edebilirler. İstilacı patojenlerden kurtulmak için, faydalı

funguslar etkili bitki kolonizasyon stratejilerine sahip olmalı ve habitat içinde yüksek populasyon yoğunluğunda olmalıdırlar (Ghorbanpour ve ark., 2017).

*Trichoderma* türleri bitki kök sistemini yoğun bir şekilde kolonize etmek için kök kolonizasyonu sırasında adezyonda görev alan hidrofobin genlerinin (*TasHyd1* ve *tvhydii1* gibi) ekspresyonu ile, hifal filamentlerin hidrofobik kök yüzeylerine bağlanmasını kolaylaştırır (Viterbo ve Chet, 2006; Guzmán-Guzmán ve ark., 2017). Bitki hücre duvarını parçalayan enzimlerin (Endopoligalakturonaz *ThPG1* gibi) ve selülozu tanıyabilen (swollenin *TasSwo* gibi) expansin benzeri proteinlerin de bitki kök kolonizasyonuna dahil olduğu gösterilmiştir (Brotman ve ark., 2008; Morán-Diez ve ark., 2009). Ayrıca, *Trichoderma* suşları, bitkiler tarafından üretilen antimikrobiyal bileşiklere (fitoaleksine, fenolik bileşikler ve flavonoidler gibi) karşı dirençlidir ve bu da onları kolonize köklerde ve rizosferde üstün kılmaktadır (Shoresh ve ark., 2005; Viterbo ve Chet, 2006; Błaszczyk ve ark., 2014).

Bazı *Trichoderma* suşları demir şelatlayıcı bileşikler olan siderofor da üretebilir. *Trichoderma*, paylaşılan nişlerden ferrik iyonlarını yakalayarak, *Botrytis cinerea* gibi toprak kaynaklı patojenlerin büyümesini ve aktivitesini engelleyebilir (Chet ve Inbar, 1994; Harman ve ark., 2004). Bu, tek bir besinin tükenmesinin, biyokontrolün fonksiyonel bir mekanizması olabileceği bir örnektir. *T. Harzianum* ve bazı kök patojenleri (*Fusarium acuminatum*, *Alternaria alternata* ve *Alternaria infectoria* izolatları) arasındaki etkileşimler üzerine yapılan in vitro çalışmalar, açlığın test edilen patojen funguslarda en sık görülen ölüm nedenlerinden biri olduğunu göstermiştir (Mokhtar ve Aid, 2013).

Bitki hastalıklarına karşı Arbuskular Mikorizal Funguslar önemli bir biyokontrol ajanı olarak kullanılmaktadır (Tahat ve ark., 2010). AM fungusları bitki kök sistemi, rizosfer kolonizasyonu için etkili stratejiler benimsemişlerdir ve bu da onları bitki patojenlerine karşı üstün rakipler haline getirmiştir (Vos ve ark., 2014). Arbuskular mikoriza fungusları ayrıca, konukçuda fizyolojik ve anatomik değişiklikler yaparak, köklerde hücre içi patojenlerin gelişimini kök lignifikasyonunun artırılması, konukçu hücre duvarının pektin ile kalınlaştırılması gibi mekanizmalar ile dolaylı olarak kısıtlayabilir (Malik ve ark., 2016).

#### b-Mikoparazitizm

Bir fungusun (konukçunun) başka bir fungus (mikoparazit) tarafından parazit olarak yaşaması "mikoparazitizm" olarak adlandırılır. Mikoparazitizm, mikoparazit bir fungusun haustorium gibi kendine özgü





organları ile konukçu hifine fiziksel olarak penetre olması ve böylece fungal yapıların bozulmasına neden olan çeşitli enzimlerin veya sekonder metabolitlerin salgılanmasının ardından konukçu fungustan besin/metabolit alımının sağlanması ile gerçekleşir (Daguerre ve ark., 2014).

*Trichoderma* tipik bir mikoparazitik fungustur. *T. atroviride*, *T. virens* ve *T. reesei* genomlarının karşılaştırmalı analizi, mikoparazitizmin *Trichoderma*'nın atalarından kalma yaşam tarzı olduğunu göstermiştir (Kubicek ve ark., 2011). Hücre duvarını parçalayan enzimler, *Trichoderma*'daki mikoparazitizm olayının anahtar bileşenleridir. Endokinitazlar,  $\beta$ -1,3-glukanazlar ve proteazlar gibi ekstraselüler enzimler, *Trichoderma* tarafından fungal hücre duvarını parçalamak için salgılanan başlıca enzimlerdir (Lopes ve ark., 2012; Geraldine ve ark., 2013; Vos ve ark., 2015).

Kitinazlar, gerçek fungusların hücre duvarlarının degradasyonunda rol oynayan *Trichoderma* tarafından salgılanan en önemli litik enzimlerdir. *Trichoderma harzianum*'daki kitinolitik etki, içerdikleri kitinaz ekspresyonundan sorumlu genler (*ech42*, *chi33*, *nag1*, *chi18-13* gibi) ile ilişkilidir (Seidl ve ark., 2005). *T. harzianum*'daki *ech42* geninin (endokitinaz) bozulması, *Botrytis cinerea* ve *Rhizoctonia solani*'ye karşı biyokontrol etkisini azaltırken, hücre duvarında kitin bulunmayan *Pythium ultimum*'su küfüne karşı değişmeden kalmıştır (Woo ve ark., 1999). *Trichoderma*'nın selülaz enzimleri, *Pythium*, *Phytophthora* türleri de dahil olmak üzere *Oomycetes* sınıfındaki patojenlerinin lignosellüloz biyokütlesini ve hücre duvarlarını hidrolize eder (Gajera ve ark., 2013).

### c-Antibiyozis

Antibiyozis, fitopatojenlerin büyümesini ve/veya çoğalmasını baskılayan veya azaltan biyokontrol ajanları tarafından çeşitli antimikrobiyal bileşiklerin üretimi ile gerçekleşir. Bu fenomen; selülaz, ksilanaz, pektinaz, glukanaz, lipaz, amilaz, arabinaz ve proteaz gibi hücre duvarını parçalayan enzimler; 6-n-pentil-2H-piran-2-on (6-PAP) gibi uçucu metabolitler ve trikodermin, trikodermol, gliovirin, gliotoksin, viridin, herzianolit, pironlar, peptaiboller, etilen ve formik aldehit gibi antibiyotikler, antagonistik özelliklere sahip çok sayıda bileşik üretebilen *Trichoderma* da dahil olmak üzere çeşitli funguslarda gözlemlenmiştir (Jelen ve ark., 2013; Hermosa ve ark., 2014; Strakowska ve ark., 2014).

*Trichoderma atroviridae* miselinden elde edilen etil asetatın 0.66mg/ml'lik bir minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) ile *Fusarium solani*'nin spor

çimlenmesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bir diketopiperazin halkası ile karakterize edilen epipolitiiodioksopiperazinler (ETP'ler), *Trichoderma* tarafından üretilen yüksek derecede toksik sekonder metabolitlerden bazılarıdır (Błaszczuk ve ark., 2014). Çeşitli ETP sınıfları sadece belirli izolatlar tarafından üretilebilir. Örneğin, gliotoksin *Trichoderma virens*'in Q suşları tarafından sentezlenirken; gliovirin, güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olan P suşları tarafından üretilir (Butt ve ark., 2001; Mukherjee ve ark., 2012; Scharf ve ark., 2016).

Biyokontrol ajanı *Purpureocillium lilacinum*, fitopatojenler den *Phytophthora infestans* ve *Phytophthora capsici*'nin biyokontrolünde geniş çaplı biyolojik etki (antimalarial, antiviral, antibakteriyel, antifungal, antitümör, ve fitotoksik aktivite) gösteren antibiyotik leucinostatinleri üretebilir (Wang ve ark., 2016). Ayrıca, *Purpureocillium lilacinum*'un kök-düğüm nematodu *Meloidogyne incognita*'nın yumurta kuluçkasını inhibe ettiği ve yavru (juvenile) ölümlerine neden olduğunu gösterilmiştir (Singh ve ark., 2013).

Ektomikorizal (ECM) funguslarda antibiyozis; antibiyotiklerin, uçucu ve uçucu olmayan bileşiklerin ve hücre duvarını parçalayan enzimlerin sentezini gerektirir. *Alnicola* sp., *Laccaria fraterna*, *Lycoperdon perlatum*, *Pisolithus albus*, *Russula parazurea*, *Scleroderma citrinum*, *Suillus brevipes* ve *Suillus subluteus* olmak üzere sekiz ektomikorizal fungusun antagonistik potansiyeli test edilmiş ve *Alternaria solani*, *Botrytis* sp., *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* ve *Subramanospora vesiculosa* da dahil olmak üzere birçok fungal patojene karşı antagonistik etki gösterdiği gösterilmiştir. *Suillus brevipes* ve *Suillus subluteus* patojenlere karşı en etkili izolatlar olarak bulunmuştur ve yine her ikisinin de yüksek miktarda kitinaz ürettiği saptanmıştır (Mohan ve ark., 2015).

### d-Mikovirüs aracılı çapraz koruma (MMCP)

Bu biyokontrol mekanizması, anastomoz ile bir avirulent/hipovirulent izolattan, virulent izolata hipovirülans bir mikovirüsün (çoğunlukla dsRNA) aktarılmasıyla patojenik izolatın virülansının azaltılması ile gerçekleşir (Ghabrial ve Suzuki, 2009). Örneğin; *Cryphonectria parasitica*'nın hipovirulent suşları, Avrupa *Castanea sativa* bitkisinde kestane yanıklığına (chestnut blight) neden olan virulent suşların patojenitesini azalttığı gösterilmiştir (Ghorbanpour ve ark., 2017).



### e-Uyarılan sistemik direnç (ISR)

Faydalı funguslar, patojenler tarafından enfeksiyona uğramadan önce savunma sinyal yollarını tetikleyip aktive edebilir ve esas olarak bitki hormonları tarafından düzenlenen konukçu bitkilere uyarılan sistemik direnci kazandırır (Ghorbanpour ve ark., 2017).

Çeşitli metabolit grupları, *Trichoderma*'nın bitkiler ile etkileşimlerinde direnç indükleyicileri olarak işlev görebilir. Bu metabolitler; enzimatik aktivite gösteren (Ksilanazlar, kitinazlar, fenil alanin amonyum liyaz ve glukanaaz) proteinleri, avirulent genler tarafından kodlanan proteinleri, fungal hidrolitik enzimler yoluyla fungusların veya bitkilerin hücre duvarlarından salgılanan moleküler bileşikler ve konukçu bitkilerde fitoaleksinin birikimini içerir (Błaszczuk ve ark., 2014; Tuão Gava ve Pinto, 2016). Bu çeşitli yollar aracılığıyla, *Trichoderma* konukçu bitkilerde, istilacı patojenlere karşı daha hızlı ve etkili tepki vermek için başlatılan sistemik savunmayı indükler (Hermosa ve ark., 2013; Kumar, 2013; Rubio ve ark., 2014; You ve ark., 2016). *Trichoderma* tarafından sağlanan ISR, hem *Phytophthora* (Hoitink ve ark., 2006) hem de *Botrytis cinerea* patojenleri için fonksiyonel etki şekli olarak önerilmiştir (Rubio ve ark., 2014).

Arbuskular mikorizal funguslar bitki savunma sistemini etkileyerek bitki-patojen etkileşimlerini değiştirebilirler. AM fungus *Glomus fasciculatum* tarafından lipoksigenazlar (LOX) ve fenilalanin amonyum liyazını (PAL) kodlayan jasmonik asit (JA) yolu savunma genlerinin ekspresyonunda üç kat artış ile, fungal patojen *Alternaria alternata*'ya karşı domateste sistemik direnci indüklemiştir (Nair ve ark., 2014). Endofit fungus *Piriformospora indica*'nın hidrojen peroksit birikimi ve süperoksit dismutaz ve guaiacol peroksidaz gibi antioksidatif yolların uyarılması yoluyla pirinçte kılıf yanıklığına (sheath blight) karşı ISR'yi indüklediği gösterilmiştir (Nassimi ve Taheri, 2017).

*Verticillium nigrescens* (zayıf patojen) ile pamuk bitkilerinin aşılınması, agresif patojen olan *Verticillium dahliae*'nin neden olduğu pamuğun *Verticillium* solgunluğunu başarılı bir şekilde kontrol edebilmektedir (Vagelas ve Leontopulos, 2015). Buğday bitkilerinin, *Gaeumanomyces graminis* var. *graminis* ve *Phialophora* sp. ile eş zamanlı olarak inokülasyonu, saha koşulları altında *G. graminis* var. *tritici*'nin neden olduğu tüm hastalıkları önemli ölçüde azaltabilmiştir (Ghorbanpour ve ark., 2017).

## 2-Fungal Biokontrol Ajanlarının Önemli Sekonder Metabolitleri

### a-Entomopatojen Fungusların Toksinleri Destruksin

Destruksinlerin, hücrelerdeki kalsiyum dengesinin bozulması ve vakuoler adenozin trifosfatların (ATPaz) inhibisyonu gibi birçok biyolojik faaliyete sahip oldukları görülmektedir. Örneğin, Dtx E'nin; kromatin agregasyonu, nükleus deformasyonu, mitokondrium ve granüllü endoplazmik retikulumun degradasyonu, ribozom fonksiyonunda degradasyonlar gibi birçok etkisi vardır. In vitro ve enfekte olmuş larvalarda fagositozu inhibe ettiği saptanmıştır. Düşük dozlarda bile DNA, RNA ve proteinlerin sentezini inhibe eder. H<sup>+</sup>-ATPaz aktivitesini bloke eder. Yine yapılan çalışmalarda antiviral etkisi de rapor edilmiştir (Butt ve ark., 2001).

Entomopatojen fungus *Metarhizium anisopliae*'den izole edilen destruksin A, destruksin B ve destruksin E; insan hepatoma hücrelerinde hepatit B virüsünün (HBV) replikasyonu üzerinde güçlü bir baskılayıcı etki göstermiştir. *M. anisopliae* var. *dechyium*'den ekstrakte edilen ham destruksinlerin anti-HBV etkileri, hem in vitro hem de in vivo olarak tespit edilmiştir (Dong ve ark., 2013). Entomopatojenik *Aschersonia* sp. fungusundan A4, A1 ve A5 destruksinler ve homodestruksin B izole edilmiştir (Saxena, 2015).

Böceklerin destruksinlere duyarlılıkları değişmektedir. Bazı Lepidoptera türleri oldukça duyarlıdır. Destruksinin *Spodoptera litura* larva evrelerinde insektisidal etkinliği yaş arttıkça LD<sub>50</sub> değerlerinde artma görülmüştür (Sree ve ark., 2008). İpek böceği (*Bombyx mori*) larvalarına enjekte edilen destruksin A ve B'nin ortalama ölümcül dozu (LD<sub>50</sub>), enjeksiyondan 24 saat sonra 0.015-0.030 mg g<sup>-1</sup> dir (Fan ve ark., 2013). Yusufçuk (*Anisoptera*) kurtçukları, destruksin E'ye, A veya B'den daha duyarlı olduğu saptanmıştır (Butt ve ark., 2001).

Toksinler böceklerin büyümesini de etkiler. Hurdal böceği (*Phaedon cochleariae*) ve patates böceği (*Epilachna sparsa*) larvaları, destruksinlerle muamele edilen yapraklara maruz kaldıklarında, işlenmemiş yapraklarla beslenenlere kıyasla daha yavaş büyürler. Destruksin E, *Musca domestica*'ya göre *Galleria* larvaları için daha toksiktir ve bu toksin, soğan kurdu sineği olarak bilinen *Delia antiqua*'ya karşı daha hassastır (Butt ve ark., 2001).



### Efrapeptinler

Efrapeptinler, hücre içi protein taşınması ve mitokondriyal ATPazların inhibitörleridir. Efrapeptinler örümcek akarları, patates böceği, tütün tomurcuk solucanı (tobacco bud-worm) ve elmas güvesi gibi eklembacaklılara karşı insektisidal etki göstermektedir. *Tolypocladium* türleri, enfeksiyon süreci boyunca böcek hemokoelinde düşük miktarda efrapeptin salgılamaktadır. Ölü, enfekte olmuş *Galleria mellonella* ve *Calliophora* sp. 'de az miktarda fungus hifinin tespit edilmesi ölümün toksikozise bağlı olduğunu düşündürmektedir (Butt ve ark., 2001).

### Oosporein

Çok sayıda toprak fungusu ve *Beauveria* cinsine ait fungus tarafından üretilmektedir. Proteinler ve aminoasitlerle reaksiyona girerek enzim aktivitesini bozmaktadır. Oosporein, 200 µg ml<sup>-1</sup> konsantrasyonda eritrositlerin membran ATPaz aktivitesini %50 oranında inhibe etmektedir (Butt ve ark., 2001). Oosporein aynı zamanda herpes simpleks virüs tip1' in DNA-polimerazını inhibe eden bir antiviral bileşiktir. Oosporein, Gram pozitif bakterilere karşı etkili bir antibiyotiktir, ancak Gram negatif bakteriler üzerinde çok az etkiye sahiptir (Gilbert ve Gill, 2010). *Nerium oleander* L bitkisinin bir endofitik fungusu olan *Cochliobolus kusanoi* deki Oosporein, in vitro antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik aktivite göstermektedir (Ramesha ve ark., 2015).

### Beauvericin, bassianolide ve beauveriolide

Beauverisin, entomopatojen fungus *Beauveria* spp. ve *Paecilomyces* spp'den izole edilmektedir. Beauverisin, Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> komplekslerini oluşturarak doğal ve yapay zarların geçirgenliğinin artmasına yol açmaktadır. Beauverisin; *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei*, *Sarcinea lutea*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus faecalis* gibi çeşitli bakterilere karşı antibiyotik aktivite göstermektedir (Butt ve ark. 2001).

*Beauveria bassiana* tarafından salgılanan bir başka toksin ise bassianoliddir. Bu bileşiği az miktarda içeren yapay bir diyet ile beslenen ipekböceği larvalarında atonik semptomları indükler, ancak daha yüksek dozlarda ise öldürücüdür (13 ppm) (Sree ve Varma, 2015). *Beauveria* türleri ayrıca beauverisin ve bassianolide ile yapısal olarak ilişkili peptitler olan beauveriolidler ve beauverolidler üretmektedir. Bassianin ve tenellin de *Beauveria* türlerinden izole edilmektedir. Bu sarı renkli sekonder metabolitler eritrosit membran ATPazlarını inhibe etmektedir (Butt ve ark. 2001).

### Hirsutellin

Hyphomycete *Hirsutella thompsonii*, insectisidal protein olan hirsutellin A üretmektedir. Hirsutellin A üretimi, miselial gelişim ile doğrudan ilişkilidir. Narenciye pas akarı *Phyllocoptruta oleivora*' yı *Hirsutella thompsonii* ürettiği hif ağı ile enfekte etmektedir. 40 pmol konsantrasyonda saf hirsutellin A, *Galleria mellonella* larvaları için oldukça toksiktir (Maimala ve ark., 2002).

Hirsutellin A aynı zamanda yenidoğan sivrisineği (*Aedes aegypti*) larvası için toksiktir. ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri'ne göre (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), *Aedes aegypti* sivrisineği dünyanın belirli kısımlarında zika virüsü, dang humması, chikungunya virüsü ve sarıhumma virüsünü bulaştırmaktan sorumludur. 0.5 ve 5.0 µM konsantrasyonlarında hirsutellin A, *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) hücrelerinde 2-4 saat içinde saptanabilir sitopatik etkilere neden olmaktadır ve tedaviden 4 gün sonra Sf-9 hücre büyümesini tamamen inhibe etmektedir (Butt ve ark., 2001).

### Organik Asitler

Organik asitler arasında oksalik, kojik, cyclopiazonic, fusarik ve 4'-hidroksimetilazoksibenzen-4-karboksilik asitler, omurgasızlara karşı patojenik funguslardan izole edilmişlerdir. Lepidopteranlara veya dipteranlara toksiktirler. Zigomycetes üyesi *Entomophthora virulenta*; azoksibenzen-4,4'-dikarboksilik asit ve 4'-hidroksimetil-zoksibenzen-4-karboksilik asit üretmektedir. Hidroksiasit, *Calliphora erythrocephala* için enjeksiyonla uygulandığında toksiktir ve kültür filtratlarındaki insektisidal aktiviteden sorumludur (Butt ve ark., 2001).

### b-Mikoparazit Fungusların Toksinleri

#### Peptaibol

Peptaiboller genellikle antimikrobiyal aktivite gösterirler. Bugüne kadar bilinen peptaibollerin ana kaynakları *Trichoderma* ve *Emericellopsis* funguslarıdır (Szekeres ve ark., 2005).

*Trichoderma harzianum* tarafından trikorzianinler, trikokindinler, trikorzinler ve harzianinler salgılanmaktadır. *Trichoderma viride*; alametisinleri ve trikotoksini üretmektedir. Başlangıçta *Trichoderma reesei* nin bir metaboliti olarak tanımlanan paracelsin, aslında birçok *Trichoderma* türü tarafından üretilmektedir. Paracelsin *Artemia salina* larvası için oldukça toksiktir (hesaplanan LD<sub>50</sub> = 2.2 µM) (Gupta ve ark., 2015).



### Gliotoxin

Gliotoksin, 1934 yılında bir antifungal madde olarak keşfedilmiştir. Daha sonra çeşitli biyolojik aktivitelerde antimikrobiyal, antiviral ve bağışıklık düzenleyici etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, trombosit agregasyonunu indükleyen platelet aktive edici faktörün (PAF) bir inhibitörü olduğu bilinmektedir. Gliotoksinin antifungal özellikleri, *Trichoderma harzianum* ve *Gliocladium virens*' in hücre duvarını parçalayan enzimleriyle sinerjik olarak artırılmıştır. Gliotoksin oksidasyona duyarlıdır ve hızlı bozulma nedeniyle herhangi bir sağlık riski taşımamaktadır. Bu veri sıçanlar üzerinde yapılan oral ve pulmoner çalışmaların gösterdiği toksisite eksikliği ile desteklenmektedir (Butt ve ark., 2001).

### *Trichoderma* ve *Gliocladium* mikoparazit fungus türlerinin diğer önemli metabolitleri

*Trichoderma* ve *Gliocladium*; poliketidler, terpenoidler, polipeptidler ve  $\alpha$ -amino asitlerden türetilmiş metabolitler de dahil olmak üzere antibiyotik özelliklerine sahip çeşitli sekonder metabolitleri salgılamaktadır. Harzianik asit, terpenoid siklonerodiol, oktaketide ketodiol, 6-pentil- $\alpha$ -piron antibiyotikleri ve yeni bir seskiterpen antibiyotik olan heptelidik asit *Trichoderma harzianum* ve *Gliocladium virens* tarafından üretilmektedir. Heptelidik asit, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı antibiyotik etkiye sahiptir ve bazı anaerobik bakterilerin büyümesini engellemektedir. Antifungal aktivite gösteren bir trikotesen olan harzianum A *Trichoderma harzianum* tarafından salgılanmaktadır. Ayrıca, *Trichoderma viride*' den trikolin antifungal proteini tanımlanmıştır. Bu ribozomu inaktive eden protein *Rhizoctonia solani*' ye karşı aktiftir. Siklonerodiol ve koningininler *Trichoderma koningii*' den karakterize edilmiştir. Bu bileşiklerin bazıları, buğday köklerinden izole edilen bir *Trichoderma harzianum* suşunun kültür filtratlarından saflaştırılmıştır ve *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*' ye karşı aktiftirler. *Gliocladium* spp., fungistatik bileşik viridin ve gliovirin gibi antibiyotikleri üretmektedir. Yine *Gliocladium* kültür filtratında verticillin, glisoprenin ve poliketid antibiyotikleri gibi çeşitli başka metabolitler de keşfedilmiştir. Glisopreninler fitopatojenik fungus *Magnaporthe grisea*' nın appressorium oluşumunu inhibe etmektedir (Butt ve ark., 2001).

### c-Mikoherbisit Fungusların Toksinleri

Bazı mikroorganizmalar (fitopatojenik ve fitopatojenik olmayan bakteri ve funguslar) ve sekonder mikrobiyal ürünler (fitotoksinler) biyolojik yabancı ot

kontrol maddeleri olarak potansiyel göstermektedir. Bu organizmalara ve doğal ürünlere biyoherbisit; potansiyel biyoherbisit aktiviteye sahip funguslara da mikoherbisit denmektedir (Butt ve ark., 2001).

İnsanların yetişmesini istemediği, yarardan çok zararları olan bitkiler olarak tanımlanan yabancı otlar, kültür bitkilerinde doğrudan veya dolaylı yoldan zarara neden olan bitki koruma problemlerinin başında yer almaktadır. Tarım alanlarında yabancı otlar kültür bitkileri ile besin maddeleri, su ve ışık gibi nedenlerle rekabete girmektedir. Ayrıca kültür bitkilerinde zarara yol açan pek çok hastalık etmeni ve zararlıları barındırmaktadır. Bu nedenlerle yabancı otların kontrolüne önem verilmektedir (Özaslan, 2017). Bazı önemli mikoherbisit fungal türler ve fitotoksinleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Ülkemizde istilacı yabancı otların mikrobiyal etmenlerle biyolojik mücadelesi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Diğer taraftan genel olarak yabancı otların biyolojik kontrolüne ilişkin araştırmalar (daha ziyade fungal etmenlerle biyolojik mücadele) ise sadece tespit niteliğindeki çalışmalardır (Atay ve Onen, 2015).

Yabancı otlar üzerinde saptanan bu fungal patojenlerin etkinlik çalışmaları dahi son derece sınırlı kalmıştır. Bu sebeple ülkemizde her geçen gün artan oranda sorun oluşturan istilacı bitkiler başta olmak üzere yabancı otların mikrobiyal etmenlerle biyolojik kontrolüne ilişkin detaylı çalışmalara ağırlık verilmelidir (Atay ve Onen, 2015).

### 3-Biyolojik Mücadelenin Avantajları

Biyolojik mücadele diğer mücadele yöntemleri ile karşılaştırıldığında; doğal dengenin korunması, sadece hedef alınan zararlı ile mücadele edilmesi, hedef alınan zararlılarda dayanıklılık sorunu oluşturmaması ve en önemlisi insan ve çevre üzerinde olumsuz etkilerinin görülmemesi gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca sürdürülebilir tarımsal üretimi, kaliteli ve ilaç kalıntısı olmayan ürün elde edilmesini, biyolojik çeşitliliğin korunmasını da sağlamaktadır (Akbaş ve ark., 2015).

Biyolojik Mücadele Ürünleri ile Kimyasal Mücadele Ürünü üretmenin maliyetler ve getirdiği fayda arasında önemli farklar vardır. Uluslararası Bitki Kontrol Ürün üreticisi firmaların bu konuya ilgi duyması Biyolojik Mücadele çalışmaları için önemli avantajlardan biridir (Birişik ve ark., 2012).





Tablo1. Önemli Bazı Mikoherbisit Türlerin Fitotoksinleri

Fitotoksin	Mikoherbisit Fungus	Hedef Yabancı Ot	Referans
AAL-Toksin	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria eichorniae</i>	Su sümbülü ve diğer bazı sucul yabancı otları	Salar ve ark., 2013.
Destruksin B, homodestruksin B ve desmetil destruksin B	<i>Alternaria brassicae</i> , <i>Trichothecium roseum</i> ve <i>Ophiosphaerella herpotricha</i>	<i>Brassica</i> türleri	Hoagland ve ark., 2008.
Anhidromonalonolaton, tirosol, (R)-(-)-moronolakton ve sikloglisilprolin	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Varejão ve ark., 2013.
Maculosin	<i>Alternaria alternata</i>	Knapweed (mor top çiçekli bitki)	Bobylev ve ark., 1996.
Colletotrichin	<i>Colletotrichum</i> sp. <i>Colletotrichum coccoides</i> (VELGO)	<i>Abutilon theophrasti</i>	Jayawardena ve ark., 2016.
Trikotesen	<i>Myrothecium verrucaria</i>	<i>Amaranthus palmeri</i>	Anderson ve Hallett, 2003.
Enniatin	<i>Fusarium</i> sp.	Witchweed ( <i>Striga hermonthica</i> – Canavar Otugiller)	Boari ve ark., 2003.
Fumonisin B <sub>1</sub>	<i>Fusarium moniliforme</i> suşuMRC 826	Jimsonweed ( <i>Datura stramonium</i> – Boru Çiçeği)	Abbas ve ark., 1999.
Fusarik asit	<i>Fusarium</i> sp.	Jimsonweed ( <i>Datura stramonium</i> – Boru Çiçeği) ve duckweed ( <i>Lemna minor</i> – Su Mercimeği)	An, 2004.
Moniliformin	<i>Fusarium</i> sp.	Duckweed ( <i>Lemna minor</i> – Su Mercimeği)	An, 2004.
Vulculic asit	<i>Nimbya alternantherae</i>	<i>Alternanthera philoxeroides</i>	Xiang ve ark., 2013.



Gelişmiş ülkelerde kimyasal ilaçların kullanımı konusunda daha büyük kısıtlamalar ve dünya çapında yasaklar getirilmiştir. Hem ABD hem de İngiltere'de, her formdaki kimyasal maddelerin kullanımını ciddi şekilde kısıtlayan organik tarım sertifikasyon standartları bulunmaktadır (Butt ve ark., 2001).

#### 4-Sorunlar ve Dezavantajlar

Biyolojik Mücadele'nin çok sayıda faydası ve avantajı sıralanabileceği gibi olası bazı sorunlar ve dezavantajlardan da bahsetmek gereklidir.

#### Biyolojik Mücadele konusundaki bazı sorunlar ve riskler şöyle sıralanabilir;

Biyolojik Mücadele Ürünleri canlı materyallerdir ve muhafazası, nakli ve uygulaması zordur. Biyolojik Mücadele Ürünlerinde FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) tarafından yayınlanmış olan ISPM 3 (Guidelines for the export, shipment, import and release of biological control agents and other beneficial organisms) ve EPPO tarafından yayınlanan PM 6 (Safe use of biological control) uluslararası standartlarına uyulması son derece önemlidir. Faydalı Organizmaların hedef dışı canlılara (bitki ve diğer canlılar) zarar vermesi önemli bir risktir (Birişik ve ark., 2012).

Fungal BCA'ların ticarileştirilmesindeki büyük ekonomik engelden biri de risk değerlendirmesidir. Risk değerlendirmesi çalışmaları, kayıt amaçları için şarttır. Fungal BCA'ların hem insanlara hem de hedef olmayan diğer organizmalara karşı güvenli olduğu gösterilmelidir. Bütün bunlar çok zaman alır ve pahalıdır. Bu ürünün pazara alınmasındaki gecikme çoğu zaman tahmin edilenden daha fazladır. Bazı şirketler satışların başlamasını bekleyerek iflas etmiş durumdadır (Butt ve ark., 2001).

İthal edilecek doğal düşmanlarda olması gereken özellikler ve yapılması gereken ön çalışmalar şu şekilde sıralanabilir:

-Konukçu spektrumu dar olmalıdır. Bu nedenle konukçusuna özelleşmiş parazitoitler polifag predatörlere tercih edilmelidir.

-Yerli doğal düşmanlardan daha başarılı olmalıdır. Girdikleri bölgeye uyum sağlamalıdır. Girdikleri bölgenin ekolojik koşullarında yeteri kadar çoğalamıyorlarsa etkili olmaları mümkün değildir.

-İthal edilecek doğal düşman kolay üretilebilmelidir. Çünkü ithal edilen doğaldüşmanların girdiği bölgeye yerleştirme şansını arttırmak için birkaç yıl belli sürelerle milyonlarcasının üretilip salınması gerekebilir.

-İthal edilecek doğal düşman, girdiği bölgede belli bir süre sonra zararlı durumuna geçmemelidir. Bunun için ithal edilmeden önce, yerleştirileceği bölgede oluşturabileceği olumsuzlukları yaşamamak için her türlü risk faktörleri araştırılmalıdır (Uygun ve ark., 2010).

#### 5-Fungal Biyokontrol Ajanlarının Etkinliğinde Çevresel Faktörlerin Etkisi

Biyokontrol ajanlarının etkinliği, çeşitli çevresel faktörlerden etkilenerek, antagonistik etkilerinin azaltılmasına veya geliştirilmesine yol açabilir. Sıcaklık, su varlığı, pH, pestisitlerin/fungisitlerin varlığı, metal/ağır metal iyonları ve antagonistik mikroorganizmalar; biyokontrol ajanlarının yaşamını ve işlevselliğini etkileyen temel faktörler arasındadır (Kredics ve ark., 2003; Compant ve ark., 2010).

##### a-Sıcaklık

Çoğunlukla mezofilik olan *Trichoderma* izolatları için önemli bir faktör gibi görünmektedir ve bunların biyokontrol etkinliği düşük sıcaklıkta azalmaktadır (Kredics ve ark., 2003). Bir *Trichoderma harzianum* izolatı ile *Sclerotinia sclerotiorum*' un 25°C'deki mikoparazitizmi, 15°C' ye göre daha yüksektir. *Trichoderma virens*, 25-30°C' ye kıyasla 15°C'de daha düşük miktarlarda antibiyotik etki gösteren gliotoksin üretmiştir (Ghorbanpour ve ark., 2017). *Trichoderma asperellum* izolatlarının 12 ile 37°C arasında değişen sıcaklıklarda büyüyebildiğini ve maksimum büyümenin 27°C'de gözlemlendiğini göstermiştir. İzole edilen IBLF 914 suşu, 22-32°C' lik sıcaklık aralığında, marul fidelerinde *Sclerotinia minor* ve *Sclerotinia sclerotiorum*' un neden olduğu hastalığın şiddetini azaltmıştır (Domingues ve ark., 2016). Bununla birlikte, bazı *Trichoderma* türleri daha düşük sıcaklıklarda daha iyi çalışabilir. Örneğin, *Trichoderma viride* tarafından beyaz çürükçül patojen *Sclerotium cepivorum*'un mikoparazitliği, 10°C'de en yüksektir ve sıcaklık yükseldikçe azalan bir eğilim göstermektedir (Clarkson ve ark., 2004).

##### b-pH

*Trichoderma* hücre dışı enzimlerinin in vitro aktiviteleri çeşitli pH seviyelerine farklı tepki vermektedir. Cripps-Guazzone ve ark. (2016) β-glukozidaz, sellobiohidrolaz ve NAGaz için 5.0, β-ksilosidaz için 3.0, tripsin benzeri proteaz için 6.0 ve kimotripsin benzeri proteaz için 6.0-7.0 optimal pH değerini rapor etmiştir (Cripps-Guazzone ve ark., 2016).



### c-Su varlığı

$\beta$ -glukosidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve kimotripsin benzeri proteazın en yüksek aktiviteleri, düşük su potansiyeli değerlerinde, miselyumun optimal büyümesi için gerekli olandan daha fazladır. Ayrıca, çoğu enzim için miselial büyümenin durduğu çok düşük bir su potansiyelinde (14.8MPa) önemli in vitro aktiviteler tespit edilmiştir. Bu nedenle, daha düşük su potansiyeline sahip olan topraklarda kserotolerant mutantların kullanılması önerilmiştir. Düşük su varlığı genellikle Arbuskular Mikoriza kolonizasyonunu azaltır, ancak bazı AM suşları kuraklık stresinde arbuskül oluşumuna ve hif gelişimine sahip bir *Glomus* sp. suşunda gözlemlendiği gibi kuraklık koşullarına iyi adapte olabilirler (Ghorbanpour ve ark., 2017).

### d-Metaller ve ağır metaller

Toprakta yüksek konsantrasyonlarda fungusun büyümesini ve işlevini olumsuz yönde etkileyebilir. Farklı *Trichoderma* türlerinde on metalin (alüminyum, bakır, nikel, kobalt, kadmiyum, çinko, manganez, kurşun, cıva ve demir dahil) misel gelişimi üzerindeki etkilerini ve tripsin benzeri proteaz, kimotriptik proteaz, NAGaz,  $\beta$ -1,3-glukanaz,  $\beta$ -glukosidaz, selobiohidrolaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve endoksilanaz gibi çeşitli enzimlerin in vitro aktivitelerini araştırmışlar. Miselial büyüme, metallere maruz kalmaktan önemli derecede etkilenmiştir. En düşük inhibitör konsantrasyon (IC50) değerleri bakır için gözlemlenirken, en yüksek değer alüminyuma aittir. Metal-dirençli *Trichoderma* suşları (UV mutagenesi ile üretilen mutantlar), fungal patojen *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*, *Pythium debaryanum* ve *Rhizoctonia solani* suşlarının etkili antagonistleri olduğu gösterilmiştir. Metal-dirençli *Trichoderma* mutantları, aynı anda patojenlere karşı kesin etki gösterebilen ve direnç gelişimini azaltan metal içeren fungusitler ile kombine edilebilir (Ghorbanpour ve ark., 2017).

### e-Antagonistik mikroorganizmalar

Fungal ajanların yayılımını ve biyokontrol aktivitesini olumsuz yönde etkileyebilir. Toprak bakterilerinin, topraktaki fungal patojen *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*' ye karşı *Trichoderma koningii*' nin antagonistik aktivitelerini baskıladığı gösterilmiştir. Buna göre, antibakteriyel aktiviteye sahip olan biocontrol ajanı fungusların kullanımı topraklarda örneğin *Trichoderma* suşları için yararlı bir özellik olabilir. 18 *Trichoderma* suşunu bakteriyel hücreleri degrades etme yetenekleri açısından incelemişler ve bakteriyel hücrelerin degradasyonu ile

ilişkili anahtar enzimler olan en az 3 tripsin benzeri proteaz, 6 kimotripsin benzeri proteaz ve 4 NAGaz salgılayarak *Bacillus subtilis* hücrelerini parçalayabilen bir izolat (*T. harzianum* T19) bulmuşlardır (Ghorbanpour ve ark., 2017).

### f-Yüksek UV radyasyon ve CO<sub>2</sub> seviyeleri

Yüksek UV radyasyon ve CO<sub>2</sub> seviyeleri gibi iklim değişikliğine bağlı faktörler de fungal biyokontrol ajanlarının etkinliğini etkileyebilir. UV-B radyasyonunun, biyokontrol ajanları *Trichoderma* spp. ve *Clonostachys rosea*'nın konidia üzerinde inhibe edici etkileri olduğu gösterilmiştir. Yüksek CO<sub>2</sub> seviyeleri, topraktan izole edilen *Trichoderma* sp. aktivitesini arttırmıştır. Araştırmalar, *Trichoderma* türlerinin, pH'ı 4.4 olan bir hava atmosferine kıyasla, % 2 CO<sub>2</sub> atmosferinde daha iyi bir aktivitesi olduğunu ve fungal büyümenin % 10 CO<sub>2</sub>'de durdurulduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, alkali pH'da (7.7), tüm *Trichoderma* türlerinin % 10 CO<sub>2</sub>'de büyüme oranları % 2 CO<sub>2</sub>'den daha yüksektir (Ghorbanpour ve ark., 2017).

### 6-Biyokontrol Ajan Olan Fungusların Kullanımında Yeni Yaklaşımlar

Doğal olarak oluşan biyokontrol olayları, biyokontrol kapasitesine sahip olan bitkileri üretmek için taklit edilebilir. En umut verici biyokontrol ajanlarından biri olan *Trichoderma*'nin içerdiği farklı genler, patojenlere karşı daha yüksek direnç gösteren transgenik bitkiler üretmek için kullanılabilir. *Rhizoctonia solani*'nin neden olduğu kılıf yanıklığına (Sheath blight) karşı direnç *Trichoderma atroviride*'den hücre duvarı parçalayıcı enzimleri kodlayan genlerin aktarılması ile oluşturulan pirinç transgeniklerinde başarılmıştır (Ghorbanpour ve ark., 2017; Liu ve ark., 2004). *Agrobacterium* delivery system kullanarak patates mikrotuberlerini, kitinaz (*chit42*, from *T. atroviride*) ve  $\beta$ -1,3-glukanaz (*bgn13.1*, from *T. virens*) genleri içeren pBIKE3 plasmidi ile transforme edilmiştir. Transformantlar, *Rhizoctonia solani*'ye (AG-3) karşı belirgin bir antifungal aktivite göstermiştir (Ghorbanpour ve ark., 2017; Efsani ve ark., 2010). Kanola bitkilerinin kotiledonlu petiolleri, bir endokitinaz geni (*chit33*, *Trichoderma atroviride*'den) kullanılarak transforme edilmiştir (Ghorbanpour ve ark., 2017; Solgi ve ark., 2015). Transgenik bitkiler kök çürüklüğü patojeni *Sclerotinia sclerotiorum*'a maruz bırakılmış ve lezyon boyutlarının, transgenik olmayan kontrol bitkilerine kıyasla önemli ölçüde daha düşük olduğu görülmüştür (Ghorbanpour ve ark., 2017).



Benzer şekilde, fungal biyokontrol ajanlarının etkinliği; genomik, metabolomik, proteomik, metagenomik ve transkriptomikler gibi biyoteknolojik araçlar ve "omik" yöntemler kullanılarak geliştirilebilir (Mukherjee ve ark., 2013; Massart ve ark., 2015). Örneğin, *Serratia marcescens* bakterisinden *Trichoderma harzianum*' a güçlü bir kitinaz geninin aktarılması, patojenik fungus *Sclerotium rolfsii*' ye karşı daha etkili litik aktivite ile sonuçlanmıştır. Yine, kitinaz genlerini aşırı ekspresyon eden *Trichoderma harzianum* transformantları, toprak kaynaklı patojenler *Rhizoctonia solani* ve *Sclerotinia sclerotiorum*' un büyüme inhibisyonunda daha etkili olmuştur (Ghorbanpour ve ark., 2017).

Mikovirüs aracılı çapraz korumada, bitki hastalıklarının kontrolü için yapılan bir çalışmada, bir DNA mikovirüsünün (*Sclerotinia sclerotiorum* hipovirulans DNA virüsü 1), ekstraselüler olarak uygulandığında *Sclerotinia sclerotiorum* hücrelerini başarılı bir şekilde enfekte edebildiğini göstermiştir. Bu yeni bulgu, bazı fungal patojenler için mikovirüs partiküllerinin doğal fungusitler olarak kullanılabilirliğini düşündürmektedir. Avrupa *Castanea sativa* bitkilerinde kestane yanıklığını kontrol etmek için MMCP yaklaşımı uygulanmıştır (Yu ve ark., 2013).

Biyolojik kontrol ajanlarının birlikte uygulanması, mümkün olduğunca geniş spektrumlu bir antagonistik etkinin kullanımı, daha çeşitli patojen gruplarını hedefleme ve bitki savunma enzimlerinin ve sekonder metabolizmanın daha yüksek oranda indüklenmesini sağlama avantajına sahip olmasından dolayı uygulanmalıdır. AMF ve *Trichoderma harzianum* tarafından yapılan domates ve patlıcanların çift aşılmasının, bu tedavilerin tek uygulamalarına kıyasla, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*' in neden olduğu solgunluk hastalığının daha iyi bir şekilde inhibe edilmesi ile sonuçlandığını belirtmiştir (Sghir ve ark., 2016).

Fungisitlerle kombinasyon halinde biyokontrol ajanının kullanılması için, daha düşük dozlarda kimyasal fungusitlerin kullanılmasıyla çevresel yüklerin azaltılmasının yanı sıra daha iyi sonuçların elde edilmesi için fungusite dirençli biyo-kontrol funguslarının üretimi gerçekleştirilmiştir. Fungisite dirençli faydalı funguslar ve kimyasal fungusitlerin çift uygulaması, özellikle, ciddi bitki hastalığı salgınlarını önlemek veya durdurmak ve patojenlerde direnç gelişimini azaltmak için kesin önlemler gerektiğinde yararlı olabilir (Ghorbanpour ve ark., 2017).

## Kaynaklar

- Abbas, H.K., Smeda, R.J., Gerwick, B.C. ve Shier W.T. (1999). Fumonisin B1 from the fungus *Fusarium moniliforme* causes contact toxicity in plants: evidence from studies with biosynthetically labeled toxin. *J Nat Toxins*, 8(3) 405-20.
- Akbaş, B., Yaşarer, A.H. ve Şimşek M. (2015). Biyolojik Mücadele Araştırmaları Ve Uygulamaya Yansımaları. *Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, TÜRKTOB*, <http://www.turktob.org.tr/dergi/makaleler/dergi18/47-51.pdf>.
- An, Z. (2004). *Handbook of Industrial Mycology, Mycology*, Marcel Dekker, New York.
- Anderson, K.I. ve Hallett S.G. (2003). Herbicidal spectrum and activity of *Myrothecium verrucaria*. *Weed Science*, 52(4) 623-627.
- Atay, T., Asav, Ü., Önen, H. ve Kara, K. (2015). İstilacı Yabancı Otlarla Biyolojik Mücadele (Biological Control of Invasive alien plants), *Türkiye İstilacı Bitkiler Kataloğu*. T.C. Gıda, Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı, Ankara.
- Birişik, N., Kütük, H., Karacaoğlu, M., Yarpuzlu, F., İslamoğlu, M. ve Öztemiz S. (2012). Teoriden Pratiğe Biyolojik Mücadele. *T.C Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı*, Ankara.
- Błaszczak, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J. ve Jędrzycka, M. (2014). *Trichoderma* spp, application and prospects for use in organic farming and industry. *J. Plant Protec. Res.*, 54 (4) 309–317,
- Boari, A., Evidente, A., Idris, A.E. ve Abouzeid M.A. (2003). Identification of phytotoxic metabolites of a new *Fusarium* sp. inhibiting germination of *Striga hermonthica* seeds. *Phytopathologia Mediterranea*, 42 (1): 65-70.
- Bobylev, M.M., Bobyleva, L.I. ve Strobel, G.A. (1996). Synthesis and Bioactivity of Analogs of Maculosin, a Host-Specific Phytotoxin Produced by *Alternaria alternata* on Spotted Knapweed (*Centaurea maculosa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (12).





- Boruta, T. (2018). Uncovering the repertoire of fungal secondary metabolites: From Fleming's laboratory to the International Space Station. *Bioengineered*, 9 (1) 12–16.
- Brakhage, A.A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1) 21-32.
- Brakhage, A.A., Schroeckh V. (2011). *Fungal secondary metabolites - Strategies to activate silent gene clusters*, Fungal Genetics and Biology, 48, 15–22.
- Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A. Ve Chet, I. (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol.*, 147 779–789.
- Butt, T.M., Jackson, C. ve Magan, N. (2001). Fungi as Biocontrol Agents, Progress, Problems and Potential, *CABI Publishing*, CAB International.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W. ve Keller N.P. (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (3) 447-59.
- Cantürk, Z. (2015). *Aspergillus ve Penicillium* cinslerine ait sekonder metabolitler ve sınıflandırılması. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 13 (2), 1-8.
- Chet, I. ve Inbar, J. (1994). *Biological control of fungal pathogens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 48 37–43.
- Clarkson, J.P., Mead, A., Payne, T. ve Whipps, J.M. (2004). Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma* spp. *Plant Pathol.*, 53 353–362.
- Compant, S., van der Heijden, M.G.A. ve Sessitsch A. (2010). Climate change effects in beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 73 197–214.
- Cripps-Guazzone, N., Jones, E.E., Condrón, L.M., McLean, K.L., Stewart, A. ve Ridgway, H.J. (2016). Rhizosphere and endophytic colonisation of ryegrass and sweet corn roots by the isolate *Trichoderma atroviride* LU132 at different soil pHs. *New Zealand Plant Protec.*, 69, 78–85.
- Daguerre, Y., Siegel, K., Edel-Hermann, V. ve Steinberg C. (2014). Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens. *Fungal Biol. Rev.*, 28 97–125.
- Domingues, M.V.P.F., de Moura, K.E., Salamao, D., Elias, L.M. ve Patricio F.R.A. (2016). Effect of temperature on mycelial growth of *Trichoderma*, *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*, as well as on mycoparasitism. *Summa Phytopathol., Botucatu*, 42 (3) 222-227.
- Dong, C., Yu J., Zhu, Y. ve Dong C. (2013). Inhibition of hepatitis B virus gene expression & replication by crude destruxins from *Metarhizium anisopliae* var. *Dcjhium*. *Indian J Med Res.*, 138(6) 969-76.
- Esfahani, K., Motallebi, M., Zamani, M.R., Sohi, H.H. ve Jourabchi, E. (2010). Transformation of potato (*Solanum tuberosum* cv. Savalan) by chitinase and  $\beta$  1,3 glucanase genes of mycoparasitic fungi towards improving resistance to *Rhizoctonia solani* AG-3. *Iranian Journal of Biotechnology*, 8 (2) 73–81.
- Fan, J.Q., Chen, X.R. ve Hu, Q.B. (2013). Effects of Destruxin A on Hemocytes Morphology of *Bombyx mori*. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(6) 1042-1048.
- Fox, E.M. ve Howlett B.J. (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11 481–487.
- Gajera, H., Domadiya, R., Patel, S., Kapopara, M. Ve Golakiya, B. (2013). Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.*, 1, 133–142.
- Geraldine, A.M., Cardoso, Lopes, F.A., Costa Carvalho, D.D., Barbosa, E.T., Rodrigues, A.R., Brandão, R.S., Ulhoa, C.J. ve Junior, M.L. (2013). Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors onfield biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biol. Control*, 67 308–316.
- Ghabrial, S.A. ve Suzuki, N. (2009). *Viruses of plant pathogenic fungi*, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 47, 353–384.
- Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Omidvar, R. ve Kariman, K. (2017). Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*, 117 147-157.



- Gilbert, L.I. ve Gill, S.S. (2010). *Insect Control Biological And Synthetic Agents*. Chapter 11, *Academic Press*, Elsevier 2010,
- Gupta, V.K., Mach, R.L. ve Sreenivasaprasad, S. (2015). *Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments*, Wiley-Blackwell.
- Guzmán-Guzmán, P., Alemán-Duarte, M.I., Delaye, L., Herrera-Estrella, A. ve Olmedo Monfi, V. (2017). Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. *BMC, Genetics*, 18 16.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. ve Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2 43–56.
- Hermosa, R., Cardoza, M.B., Rubio, M.E., Gutiérrez, S. ve Monte, E. (2014). *Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of Trichoderma*, In: Gupta, V.K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina, i., Tuohy, M. (Eds.), *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, Elsevier, The Netherlands.
- Hermosa, R., Rubio, M.E., Cardoza, M.B., Nicolás, E., Monte, E. ve Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *Int. Microbiol.*, 16 69–80.
- Hoagland, R.E., Boyette, C.D., Weaver, M.A. ve Abbas, H.K. (2008). Bioherbicides: Research And Risks, *Toxin Reviews*, 26 (4) 313-342.
- Hoitink, H.A.J., Maden, L.V. ve Dorrance, A.E. (2006). Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp. interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopathology*, 96 (2) 186–189.
- Jayawardena, R.S., Li, X.H., Liu, M., Zhang, W. ve Yan, J.Y. (2016). Mycosphere Essay 16: *Colletotrichum*: Biological control, biocatalyst, secondary metabolites and toxins. *Mycosphere*, 7(8) 1164-1176.
- Jelen, H., Blaszczyk, L., Chelkowski, J., Rogowicz, K. ve Strakowska, J. (2013). Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycol. Progress*, 13 (3) 589–600.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F. ve Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technol., Biotechnol.*, 41 37–42.
- Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D.A., Druzhinina, I.S. ve Thon, M. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol.*, 12 (R40) 1-15.
- Kumar, S. (2013). *Trichoderma*; a biological weapon for managing plant diseases and promoting sustainability. *Int. J. Agric. Sci. Vet. Med.*, 1 (3) 1–16.
- Liu, M., Sun, Z.X., Zhu, J., Xu, T., Harman, G.E. ve Lorito, M. (2004). Enhancing rice resistance to fungal pathogens by transformation with cell wall degrading enzyme genes from *Trichoderma atroviride*. *J. Zhejiang Univ. Sci.*, 5 133–136.
- Lopes, F.A., Steindorff, A.S., Geraldine, A.M., Brandao, R.S., Monteiro, V.N., Lobo, Jr. M., Coelho, A.S., Ulhoa, C.J. ve Silva, R.N. (2012). Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* isolates isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fung. Biol.*, 116 815–824.
- Maimala, S., Tartar, A., Boucias, D. ve Chandrapatya, A. (2002). Detection of the toxin Hirsutellin A from *Hirsutella thompsonii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 80 (2) 112-26.
- Malik, R.J., Dixon, M.H. ve Bever, J.D. (2016). Mycorrhizal composition can predict foliar pathogen colonization in soybean. *Biol. Control*, 103 46–53.
- Massart, S., Perazzolli, M., Hofte, M., Pertot, I. ve Jijakli M.H. (2015). Impact of the omic technologies for understanding the modes of action of biological control agents against plant pathogens. *Biocontrol*, 60 725.
- Mohan, V., Nivea, R. ve Menon, S. (2015). *Evaluation of ectomycorrhizal fungi as potential bio-control agents against selected plant pathogenic fungi*, *JAIR*, 3, 408–412.



- Mokhtar, H. ve Aid, D. (2013). Contribution in isolation and identification of some pathogenic fungi from wheat seeds, and evaluation of antagonistic capability of *Trichoderma harzianum* against those isolated Fungi in vitro. *Agric. Biol. J. N. Am*, 4(2) 145–154.
- Morán-Diez, E., Hermosa, R., Ambrosino, P., Cardoza, R.E., Gutiérrez, S., Lorito, M. ve Monte, E., (2009). The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*–plant beneficial interaction. *Mol. Plant Microbe Interact*, 22 1021–1031.
- Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A. ve Kenerley, C.M. (2012). Secondary metabolism in *Trichoderma* - genomic perspective. *Microbiology*, 158 (Pt 1): 35-45.
- Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Singh, U.S., Mukherjee, M. ve Schmoll, M. (2013). *Trichoderma* in Agriculture, Industry and Medicine: An Overview, *Trichoderma: Biology and Applications*, CABI, Oxford.
- Nair, A., Kolet, S.P., Thulasiram, H.V. ve Bhargava, S. (2014). Systemic jasmonic acid modulation in mycorrhizal tomato plants and its role in induced resistance against *Alternaria alternata*. *Plant Biol.*, 17 (3) 625–663.
- Nassimi, Z. ve Taheri, P. (2017). Endophytic fungus *Piriformospora indica* induced systemic resistance against rice sheath blight via affecting hydrogen peroxide and antioxidants. *Biocontrol Sci. Technol.*, 27 1–16.
- Özaslan, Ö. ve Mennan, H. (2017). Diyarbakır ili buğday tarlalarında bulunan yabancı otların belirlenmesi, *Bitki Koruma Bülteni*, 57(4) : 447– 461.
- Pelaez, F. (2005). Biological activities of fungal metabolites. *Handbook of Industrial Mycology*, (ed. An, Z.), 49–92, (Marcel Dekker, New York.
- Ramesha, A., Venkataramana, M., Nirmaladevi, D., Gupta, V.K., Chandranayaka, S. ve Srinivas, C. (2015). Cytotoxic effects of oosporein isolated from endophytic fungus *Cochliobolus kusanoi*. *Frontiers in Microbiology*, 1 1-12.
- Rubio, M.E, Quijada, N.M, Pérez, E., Dominguez, S., Monte, E. ve Hermosa, R. (2014). Identifying beneficial qualities of *Trichoderma parareesei* for plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80 1864–1873.
- Salar, R.K., Gahlawat, S.K., Siwach, P. ve Duhan, J.S. (2013). *Biotechnology: Prospects and Applications*, Springer.
- Saxena, S. (2015). Microbes in Production of Fine Chemicals (Antibiotics, Drugs, Vitamins, and Amino Acids). 83-120. *Applied Microbiology*, Springer India.
- Scharf, D.H., Brakhage, A.A. ve Mukherjee, P.K. (2016). Gliotoxin, bane or boon?, *Environ. Microbiol.*, 18(4) 1096–1109.
- Seidl, V., Huemer, B., Seiboth, B. ve Kubicek, C.P. (2005). A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS J.*, 272 5923–5939.
- Sghir, F., Touati, J., Mouria, B., Selmoui, K., Touhami, A.O., Filali-Maltouf, A., Modafar, C.E., Moukhli, A., Benkirane, R. ve Douira, A. (2016). Effect of *Trichoderma harzianum* and endomycorrhizae on growth and *Fusarium* wilt of tomato and eggplant. *WJPLS*, 2 (3) 69–93.
- Shoresh, M., Yedidia, I. ve Chet, I., (2005). Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95 76–84.
- Singh, S., Pandey, R.K. ve Goswami, B.K. (2013). Biocontrol activity of *Purpureocillium lilacinum* strains in managing root-knot disease of tomato caused by *Meloidogyne incognita*. *Biocontrol Sci. Technol.*, 23 (12) 1469–1489.
- Solgi, T., Moradyar, M., Zamani, M.R. ve Motallebi, M. (2015). Transformation of Canola by chit33 gene towards improving resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Protec. Sci.*, 51 (1) 1–5.
- Sree, K.S., Padmaja, V. ve Murthy, Y.L.N. (2008). Insecticidal activity of the mycotoxin, destruxin from *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales) strains against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larval stages. *Pest Manage. Sci.*, 64 119-125.



- Sree, K.S. ve Varma, A. (2015). Biocontrol of Lepidopteran Pests: Use of Soil Microbes and their Metabolites. *Soil Biology*, Springer International.
- Strakowska, J., Błaszczyk, L. ve Chełkowski, J. (2014). The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. *J. Basic Microb.*, 54 1–12.
- Szekeres, A., Leitgeb, B., Kredics, L. ve Vágvölgyi, C. (2005). Peptaibols and Related Peptaibiotics of *Trichoderma*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 52(2) 137-68.
- Tahat, M., Kamaruzaman, S. ve Othman, R. (2010). Mycorrhizal fungi as a biocontrol agent. *Plant Pathol. J.*, 9 198–207.
- Tuão Gava, C.A. ve Pinto, J.M. (2016). Biocontrol of melon wilt caused by *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *melonis* using seed treatment with *Trichoderma* spp. and liquid compost. *Biol. Control*, 97 13–20.
- Uygun, N., Ulusoy, M.R. ve Satar, S. (2015). Biyolojik Mücadele, *Türk. biyo. мүc. derg.*, 1(1) 1-14.
- Vagelas, I. ve Leontopoulos, S. (2015). Cross-protection of cotton against *Verticillium* wilt by *Verticillium nigrescens*. *Emir. J. Food Agric.*, 27 (9) 687–691.
- Varejão, E.V.V., Demuner, A.J., Barbosa, L.C.A. ve Barreto, R.W. (2013). Phytotoxic effects of metabolites from *Alternaria euphorbiicola* against its host plant *Euphorbia heterophylla*. *Quim. Nova*, 36 (7) 1004-1007.
- Viterbo, A. ve Chet, I. (2006). TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol. Plant Pathol.*, 7 249–258.
- Vos, C.M., De Cremer, K., Cammue, B.P.A. ve De Coninck, B. (2015). The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. *Mol. Plant Pathol.*, 16 400–412.
- Vos, C.M., Yang, Y., De Coninck, B. ve Cammue, B.P.A. (2014). Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. *Biol. Control*, 74 65–81.
- Wang, G., Liu, Z., Lin, R., Li, E., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Yin, W. ve Xie, B. (2016). Biosynthesis of antibiotic leucinostatins in bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum* and their inhibition on phytophthora revealed by genome mining,. *PLoS Pathog.*, 12 (7).
- Woo, S.L., Donzelli, B., Scala, F., Mach, R.L., Harman, G.E., Kubicek, C.P., Del Sorbo, G. ve Lorito, M. (1999). Disruption of the ech42 (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 12 419–429.
- Xiang, M., Chen, S., Wang, L., Dong, Z., Huang, J., Zhang, Y. ve Strasser, R.J. (2013). Effect of vulculic acid produced by *Nimbya alternantherae* on the photosynthetic apparatus of *Alternanthera philoxeroides*. *Plant Physiol Biochem*, 65 81-8.
- You, J., Zhang, J., Wu, M., Yang, L., Chen, W. ve Li, G. (2016). Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biol. Control*, 101, 31–38.
- Yu, X., Li, B., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S.A., Li, G., Yi, X. ve Jiang, D. (2013). Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110 1452–1457.





e-ISSN 2147-6845  
Nisan 2019 / Cilt:10/ Sayı:1  
April 2019 / Volume:10 / Issue:1

## YAYIN İLKELERİ

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ MANTARCILIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ'nin yayınladığı **MANTAR DERGİSİ (e-ISSN 2147 6845)**; Ulusal veya Uluslararası Mikoloji alanıyla ilgili araştırma sonuçlarını içeren orijinal araştırma ve derleme makalelerin yayımlandığı elektronik HAKEMLİ bir dergidir.

Dergiye yayınlanmak üzere sunulan makaleler, Baş Editör tarafından konusu açısından dergide yayınlanmasının uygunluğuna karar verildikten sonra, derginin yazım kurallarına göre ön kontrolden geçirilir. Sonra Editör Kurulu aracılığı ile ilgili uzmanlık alanındaki hakemlere bilimsel yönden değerlendirilmek üzere gönderilir. Baş Editör, Bilimsel Hakemlerin eleştiri ve önerileri ile yazarın bunlara verdiği cevaplar doğrultusunda eserin yayınlanıp, yayınlanamayacağına karar verir. Yayınlanması uygun görülmeyen eserler hakkında yazarlara bilgi verilir. Yayınlanması uygun görülen eserlerin matbaa provası yazarlara gönderilir ve son kontrol okuması yapılır. Son okumada imla ve şekilsel hatalar dışında düzeltme veya ekleme yapılmaz. Derginin yayın dili Türkçedir. İngilizce dilinde de yayın kabul edilebilir.

Mantar Dergisi [Creative Commons Atıf 4.0 Uluslararası Lisansı](#) ile lisanslanmıştır.

- Yazar eserin telif hakkını elinde tutar ve ilk yayımlama hakkını dergiye verir. Eser, yazarının belirtilmesi ve ilk yayımının bu dergide yapıldığının belirtilmesi koşuluyla diğerleri tarafından paylaşılmasına olanak veren Creative Commons lisansı altında lisanslanır.
- Yazarlar, makalenin yayımlandığı dergiye atıf yaparak makalelerinin yayımlandığı versiyonunu kurumsal bir arşive, kütüphaneye gönderebilirler.

- Lisans sahibine atıfta bulunarak eseri dağıtabilir, kopyalayabilir, üzerinde çalışmalar yapabilir, yine sahibine atıfta bulunarak türevi çalışmalar yapabilir veya buna benzer işler yapabilirsiniz.

Yazar makalesi ile ilgili en az 5 uzman ismini iletişim bilgileriyle beraber (cep tlf, e-posta adresi) word dosyası olarak, Hakem Öneri Formunu doldurarak sisteme ek dosya olarak yüklemelidir.

Sisteme yüklenen makalelerin bir an önce işleme alınabilmesi için; "Hakem Öneri Formu" ve "Son Kontrol Formu" renkli olarak taranmış şekilde sisteme ek dosya olarak yüklenmelidir.

## MAKALE YAZIM KURALLARI

Makale, **A4 boyutunda**, kenarlarda **2 cm** boşluk bırakılacak şekilde, **1.5 aralıklı, arial** yazı karakterinde, **10** punto kullanılarak Word 2003 veya daha üst sürümdeki programla yazılmalıdır. Makalenin word dosyasında otomatik numaralandırma kullanılmamalıdır. Makalenin bölümleri sırayla şöyle olmalıdır;

### (Türkçe Makaleler için);

**Türkçe Başlık, Yazarlar(sorumlu yazar belirtilmelidir) ve adresleri, E-postaları, Orcid numaraları, Öz, Anahtar kelimeler, İngilizce Başlık, Abstract, Key words, Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular, Tartışma, Kaynaklar.**

### (İngilizce makaleler için);

**İngilizce Başlık, yazarlar(sorumlu yazar belirtilmelidir) ve adresleri, E-postaları, Orcid numaraları, Abstract ve Key words, Türkçe Başlık, Öz ve Anahtar kelimeler, Introduction, Material and Method, Results, Discussion, References.**

**Derleme çalışmalarda** da mevcut başlıkların (materyal ve metot hariç) kullanılması gerekir. Bulgular ve Tartışma başlıkları tek başlık altında verilebilir.

Yazar gerekli görürse alt başlıklar kullanabilir. Her bölüme ait başlıklar kalın ve ilk harfleri büyük yazılmalıdır. Metin içinde geçen tüm bilimsel isimler italik olmalı, eğer başlık içerisinde yer alıyorsa hem italik hem de kalın olmalıdır. Tür isimleri ilk geçtikleri yerde yazarlarıyla birlikte verilmelidir. Daha sonraki yerlerde sadece takson isimleri yazılmalıdır. Bölümler arasında bir satır boşluk bırakılmalıdır.

**Başlık:** Türkçe makalelerde; makalenin Türkçe başlığı 14 punto, İngilizce başlığı 12 punto, İngilizce makalelerde ise İngilizce başlık 14 punto, Türkçe başlık 12 punto, sadece baş harfleri büyük ve kalın olmalıdır. Yazar isimlerinin baş harfi ve soyadı büyük olmalı, adresler ismin altına yazılmalı, sorumlu yazarın e-mail adresi mutlaka belirtilmelidir. Akademik unvanlar makalede yer almamalıdır.

**Anahtar kelimeler:** 4-10 kelimedenden oluşmalıdır.

**Giriş:** Araştırma konusu mümkün olduğu kadar güncel olarak kısa ve özlü değerlendirilir. Çalışmanın amacı da belirtilmelidir.

**Kaynaklar:** Kaynaklar metinde (soyadı, tarih ) parantez içinde belirtilerek yazılmalıdır. Kaynaklar bölümü alfabetik sıraya göre 10 punto olarak yazılmalı ve yararlanılan eserlerin Yazar (yazarlarının) Adı ve soyadının ilk harfleri büyük olmalıdır. Kitap, makale ve tam metin yayımlanmış bildiri isimlerinin ilk harfleri büyük yazılmalıdır. **Lisansüstü tezler kaynak olarak gösterilemez.**

Kaynak künyeleri **APA stiline** aşağıdaki sıraya uygun olarak yazılmalıdır (2019'dan itibaren).

### Periyodik ise aşağıdaki örneğe uygun olarak:

Aktaş, S., Kaşık, G., Doğan, H. H. ve Öztürk, C. (2006). Two New Taxa Records for the Macrofungi of Turkey. *Tr.J.of Bot.*, 30 (4) 209-212.

### Kitap ise aşağıdaki örneğe uygun olarak:

Kaşık, G., Öztürk, C., Doğan, H. H., Aktaş, S. ve Demirel, G. (2005). *Mikoloji Laboratuvarı*. Konya: Marifet Ofset Matbaa ve Kağıtçılık.

### Bilimsel Toplantı kitabı ise aşağıdaki örneğe uygun olarak:

Önay, A. O., Kaşık, G., Alkan, S. ve Öztürk, C. (2018). *Pleurotus ostreatus*'un Misel Gelişmesine Humik Maddelerin Etkisinin Araştırılması. Ö. Türkmen ve M. Paksoy (Ed.), *II. International Eurasian Agriculture and Natural Sciences Congress Book of Full Text*, (ss.22-29). Bakü-Azerbaycan.

**Tablo ve şekiller:** Tablo bulundurmeyen bütün görüntüler (fotoğraf, çizim, grafikler, harita vb.) şekil olarak isimlendirilmelidir. Bütün şekil ve tablolar metin içinde ardışık olarak numaralandırılmalıdır. Tablo ve şekillerin boyutları 14x20 cm.' den büyük olmamalıdır. Şekiller mutlaka orijinal olmalıdır. Fotoğraflar en az 600 dpi çözünürlükte olmalı veya taranmış olmalıdır. Şekiller mutlaka ana makalede yer almalı ve **"jpeg"** dosyası olarak ayrıca sisteme yüklenmelidir. Şekillerde el yazısı kullanılmamalı, bilgisayar yazılımı olmalıdır. Şekil ismi şekillerin altına, tablo ismi tablonun üstüne yazılmalıdır. Tablo üstü ve şekil altı yazıları 10 punto olmalıdır. Eserler **"http://dergipark.gov.tr/mantar"** adresinden online olarak gönderilir. **Belirtilmeyen konular bilimsel kurallara uygun olmalıdır.**

### İletişim Adresi:

S.Ü. Mantarcılık Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü

**Mantar Dergisi Editörlüğü**

Fen Fakültesi Binası B Blok Zemin Kat42079 Kampüs/KONYA

E-posta: [mantarcilik@gmail.com](mailto:mantarcilik@gmail.com)



**e-ISSN 2147-6845**  
**Nisan 2019 / Cilt:10/ Sayı:1**  
**April 2019 / Volume:10 / Issue:1**

## PRINCIPLES OF ARTICLES

**THE JOURNAL OF FUNGUS (e-ISSN 2147 6845)** is published by **SELÇUK UNIVERSITY MYCOLOGICAL APPLICATION RESEARCH CENTER**. The journal, which is a peer-reviewed journal, publishes original research and review articles. The journal includes national or international research of results with respect to the field of mycology.

Journal articles submitted for publication, after deciding for the eligibility in terms of issues to be published in the journal by the editors, articles will be sent to relevant expertise in the field of scientific referees for evaluation. Editorial Board decides whether it can be published or not in accordance with the referees decides and suggestions. Galley Proof of the articles which is accepted for the publication is sent to the authors then final inspection is done. The language of the journal is in Turkish and English.

The Journal of Fungus is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

• Authors retain copyright and grant the journal right of first publication with the work simultaneously licensed under a Creative Commons Attribution License that allows others to share the work with an acknowledgement of the work's authorship and initial publication in this journal.

• Authors are able to enter into separate, additional contractual arrangements for the non-exclusive distribution of the journal's published version of the work (e.g., post it to an institutional repository or publish it in a book), with an acknowledgement of its initial publication in this journal.

• Licensees may copy, distribute, display and perform the work and make derivative works and remixes based on it only if they give the author or licensor the credits (attribution) in the manner specified by these.

The author must upload the Reviewer Suggestion Form, contained at least 5 experts related to his / her article with the contact information (mobile tlf, e-mail address) as an additional file to the system.

To start the process of the Articles as soon as possible; Article, Reviewer Suggestion Form and Article Final Control Form should be uploaded to the system.

### **Articles preparation Rules**

The article must be 1.5 spaced in A4 size, 2 cm each margins, 10 font size and in Arial text character. Articles should be written in Word 2003 or higher. Sections of the article should be respectively like this:

#### **For Article in Turkish**

**Turkish title, Name(s) of author(s) and their addresses, E-mails, Orcid number(s), Turkish abstract, Turkish key words, English title, English abstract, Key words, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, References.**

#### **For Article in English**

**English title, Name(s) of author(s) and their addresses, E-mails, Orcid number(s), English abstract, Key words, Turkish title, Turkish abstract, Turkish key words, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, References.**

If necessary, authors may use sub-titles. The title of each section should be written in bold and the initial letters should be written big on title. All the scientific names should be italicized in the text, if it take part in the title should be both bold and italic. Genus and species names must first be supplied with the authors in their place. Then other place names should be used only species names. Should be a blank line between sections.

**Title:** Title of Turkish articles should be 14 points. English title should be 12 points. Initial letters and surname of the author's must be greater. Address should be written under the name of the author. E-mail address of corresponding author must be given. Academic qualifications are not included in the article.

**Key words:** Should consist of 4-10 words.

**Introduction:** Research topic as much as possible should be short and concise. The aim of the study should also be indicated.

**References:** References in the text must be written in parentheses (name, date). References section should be written as 10 points in alphabetical order. Names of books, articles and announcements initial letters should be big. The first letters of the names of the book, the article and the published submission should be written in large. Master's theses are not shown as a reference. References should be written in **APA style** in the following order (from 2019).

#### **For Article:**

Aktaş, S., Kaşık, G., Doğan, H. H. and Öztürk, C. (2006). Two New Taxa Records for the Macrofungi of Turkey. *Tr.J.of Bot.*, 30 (4) 209-212.

#### **For Books:**

Kaşık, G., Öztürk, C., Doğan, H. H., Aktaş, S. and Demirel, G. (2005). *Mikoloji Laboratuvarı*. Konya: Marifet Ofset Matbaa ve Kağıtçılık.

#### **For Congress Book:**

Önay, A. O., Kaşık, G., Alkan, S. and Öztürk, C. (2018). *Pleurotus ostreatus'un Misel Gelişmesine Humik Maddelerin Etkisinin Araştırılması*. Ö. Türkmen ve M. Paksoy (Ed.), *II. International Eurasian Agriculture and Natural Sciences Congress Book of Full Text*, (ss.22-29). Bakü-Azerbajjan.

**Tables and figures:** All images (photographs, drawings, graphs, maps, etc..) should be named as figure. All figures and tables should be numbered consecutively in the text. The sizes of tables and figures 14x20 cm should not be greater than. Figures must be original. Photos must be at least 600 dpi resolution or must be scanned. Figures must be separate from the main article "jpeg" should be sent to the file. Figure name should be written under figure and should be 10 points. Table name should be written on top of the table and should be 10 points.

Works are sent online at "http://dergipark.gov.tr/mantar". Unspecified subjects must comply with scientific rules.

#### **Contact Address:**

S.Ü. Mantarcılık Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü

#### **Mantar Dergisi Editörlüğü**

Fen Fakültesi Binası B Blok Zemin Kat42079 Kampüs/KONYA/TÜRKİYE

E-posta: [mantarcilik@gmail.com](mailto:mantarcilik@gmail.com)

Çorum İli'nden Toplanan *Agaricaceae* Familyasına Ait  
Bazı Mantarlarda Ağır Metal Birikiminin Belirlenmesi.....48

*Determination of Heavy Metal Accumulation in Some Mushrooms*

*of Agaricaceae Family Collected from Çorum Province*

İlker AKIN, Sinan ALKAN, Gıyasettin KAŞIK

*Pleurotus ostreatus* Alfa- ve Beta- Glukan Polisakkaritlerinin İzolasyonu  
ve Biyouyumluluklarının Yüzey Kaplaması Sonrasında incelenmesi.....56

*Isolation of Polysaccharides Alpha- and Beta-Glucans of Pleurotus ostreatus*

*and Evaluation of Their Biocompatibility After Surface Coating*

Leyla KAYIŞ, Gökhan DURUKSU

### **DERLEME MAKALELERİ / REVIEW ARTICLES**

Fungal Biyokontrol Ajanları ve Metabolitleri.....70

*Fungal Biocontrol Agents and Their Secondary Metabolites*

Şenay ŞENTÜRK, Özlem ABACI GÜNYAR



## İÇİNDEKİLER(CONTENTS)

### ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES

- Cam Kavanozda Yetiştirilen Shiitake (*Lentinula edodes*)  
Mantarının Bazı Morfolojik Özellikleri ve Antibakteriyel Performansı.....1  
*Some Morphological Properties and Antibacterial Performance  
of Shiitake (Lentinula edodes) Mushroom Grown in Glass Jar*  
Elif Ayşe ERDOĞAN ELİUZ
- Phylogenetic and Taxonomic Studies on *Cortinarius caerulescens* (Schaeff.) Fr.  
a New Record for Turkish Mycota .....8  
*Türkiye Mikotası İçin Yeni Bir Kayıt Olan Cortinarius caerulescens (Schaeff.) Fr.  
Üzerinde Filogenetik ve Taksonomik Çalışmalar*  
Ayşenur KALMER, İsmail ACAR, Ayten DİZKIRICI TEKPINAR
- Düz kır Mağarasının (Niğde, Aladağlar) İçi ve Dışından Alınan Toprak  
Örneklerinde *Cryptococcus neoformans* ve *Histoplasma capsulatum*  
Varlığının Araştırılması.....17  
*Investigation of Cryptococcus neoformans and Histoplasma capsulatum  
in Soil Samples Taken from Inside and Outside of Düz kır Cave (Niğde, Aladağlar)*  
Özlem ABACI GÜNYAR, Ayşegül YOLTAŞ,  
Mustafa YAMAÇ, Alev HALİKİ UZTAN
- A New Genus (*Balsamia*) Addition for Turkish Mycota.....23  
*Türkiye Mikotası İçin Yeni Bir Cins (Balsamia)*  
Hakan ALLI, Hasan Hüseyin DOĞAN
- Biodiversity of *Penicillium* Species Isolated  
from Edirne Söğütlük Forest Soil (Turkey).....26  
*Edirne İli (Türkiye) Söğütlük Ormanı Toprağından İzole Edilen Penicillium Türlerinin Biyoçeşitliliği*  
Tugba Korur KOLANLARLI, Ahmet ASAN, Burhan SEN, Suzan OKTEN
- A New *Elaphomyces* Record for Turkey .....40  
*Türkiye İçin Yeni Bir Elaphomyces Kaydı*  
Yasin UZUN, Abdullah KAYA
- Inocybe sphagnophila* Bandini & B. Oertel (*Agaricales, Inocybaceae*):  
A New Record for the Turkish Mycota .....44  
*Inocybe sphagnophila Bandini & B. Oertel (Agaricales, Inocybaceae):  
Türkiye Mikotası İçin Yeni Bir Kayıt*  
Ertugrul SESLI, Ditte BANDINI

Devamı kapak içindedir.



Nisan 2019

Cilt:10

Sayı:1

e-ISSN 2147-6845

**E-DERGİ**

**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**

**MANTARCILIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ-KONYA-TÜRKİYE**