

## ***Pleurotus eryngii* (DC.) Gillet MAKROFUNGUSUNDA FARKLI HİBRİD BİREYLERİN SPAWN SARMA SÜRELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Fatih KALYONCU<sup>1\*</sup>, Erbil KALMIŞ<sup>2</sup>, A. Mehmet ATMACA<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muradiye - Manisa, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Bornova - İzmir, TÜRKİYE

<sup>3</sup>Agroma Mantarcılık, Hacıyüplü Köyü - Denizli, TÜRKİYE

**Özet :** Bu çalışmada, doğadan toplanan farklı *P. eryngii* şapkalarından elde edilen tek sporların çimlenmesi ile oluşan homokaryon misellerin hibridizasyonu sonucu ortaya çıkan dokuz farklı heterokaryon bireyin spawn sarma süreleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda B<sub>2</sub>, D<sub>2</sub> ve C<sub>1</sub> hibrid strainlerine ait spawn materyalinin ticari *P. eryngii* straininden (M 2600) daha hızlı sardıkları belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler :** *Pleurotus eryngii*, Hibridizasyon, Spawn.

## **DETERMINATION OF SPAWN RUN TIME OF VARIOUS HYBRIDS OBTAINED FROM *Pleurotus eryngii* (DC.) Gillet**

**Abstract :** In this study, spawn run times of nine heterokaryon mycelium obtained from hybridization of different homokaryon mycelium belongs to wild *P. eryngii* fruit bodies were investigated. The results of the present study allow us to conclude that B<sub>2</sub>, D<sub>2</sub> and C<sub>1</sub> strains faster than commercial *P. eryngii* strain (M 2600)

**Keywords :** *Pleurotus eryngii*, Hybridization, Spawn.

---

\*Sorumlu yazar

fatih.kalyoncu@bayar.edu.tr

## 1. GİRİŞ

*Pleurotus eryngii* farklı aromatik yapısı ve daha uzun raf ömrüne sahip olmasından dolayı son zamanlarda Avrupa ve Amerika’da aranılan bir şapkaklı mantar türüdür [1]. Endüstriyel anlamda üretiminin yapılmasıyla beraber organizmaya ait farklı ticari strainlerin geliştirilmesine başlanılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile farklı ticari firmalara ait çeşitli strainler üreticilerin kullanımına sunulmuştur [2, 3]. Bu küresel gelişime rağmen ülkemizde *P. eryngii*’ye ait yerli gen kaynaklarımızdan geliştirilen bir ticari strain bulunmamaktadır.

Makrofunguslar sporlar ile çoğalan organizmalardır ve bu sporlar biyolojik çeşitliliğin açığa çıkmasına yardımcı olan mayoz bölünme ürünü elemanlardır [4]. Mikologların farklı genetik özelliklere sahip bireyleri elde etmek için yaptıkları çalışmaların temelini organizmanın sporları oluşturur. *Pleurotus* türlerinde sporlar çimlendiklerinde farklı homokaryotik miselleri oluştururlar. Ancak homokaryotik misel tek tip eşleşme faktörüne sahip olduğu için şapka oluşumunu gerçekleştiremez. Şapka oluşumu için, farklı eşleşme faktörüne sahip başka bir homokaryotik misel ile plazmogami yapması ve heterokaryotik miseli oluşturması gerekmektedir. Yeni oluşan heterokaryotik misele melez veya hibrid birey ismi verilir, genetik çalışmalarda, moleküler çalışmalarda ve ticari denemelerde kullanılabilir [5, 6].

*Pleurotus eryngii* homokaryonları ile yapılan çalışmaların büyük bir kısmını moleküler biyoloji çalışmaları oluşturmaktadır. Bu çalışmalarda, eşleşme faktörünün kromozomlar üzerindeki lokasyonu ve eşleşme faktörünün belirlenmesi için geliştirilen belirleyiciler açığa çıkarılmıştır [7]. Bir Tübitak projesi kapsamında ülkemizin değişik lokasyonlarından toplanan yabancı *P. eryngii* şapkalarından sporlar elde edilmiş ve bunların çimlenme süreleri tespit edilmiştir.

Elde edilen homokaryotik bireyler kendi içlerinde çaprazlanarak yeni hibrid bireyler elde edilmiş ve bunların içinden aktif misel gelişimine sahip olanlar selekte edilmiştir [8]. Aktif misel gelişiminin ticari bir strainin oluşturulmasını belirleyen faktörlerden biri olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya çıkarılmıştır.

Bu çalışmada aktif misel gelişimi gösteren hibrid bireylerin spawn sarma sürelerine bakılmıştır. Bu şekilde mikrobiyolojik ortamlarda hızlı misel gelişimine sahip hibrid bireylerin aynı performansı buğdaydan hazırlanmış spawn ortamında da gösterip gösteremediği belirlenmeye çalışılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Organizma

Bu çalışmada önceden homokaryonların çaprazlanması ile elde edilmiş ve bazı özellikleri aşağıda verilmiş 9 adet hibrid birey (heterokaryon) kullanılmıştır (Çizelge 1). Bunun yanında sonuçların mukayese edilmesi için ticari bir *P. eryngii* straini de (M 2600) çalışmaya dâhil edilmiştir.

### 2.2. Spawn Materyalinin Hazırlanması

Spawn hazırlanmasında taşıyıcı materyal olarak buğday taneleri kullanılmıştır. Haşlama kazanlarına doldurulan buğday taneleri 20 dakika süre ile kaynatılmıştır. Kaynama işlemi sonrasında taneler süzülerek soğumaya bırakılmışlardır. Soğuyan buğday taneleri mikserde yaş ağırlığının %1 oranında alçı ile karıştırılmış ve sonra 1,5 kg’lık polypropilen torbalara doldurulmuştur. Torbalar otoklavda 121°C derecede 45 dakika sterilize edilmiş ve sonra soğumaya bırakılmıştır. Oda sıcaklığına gelen torbalar ikinci kere aynı sıcaklık ve sürede otoklavlanmıştır. Soğuyan torbalar bir gece süre ile (UV) lambalı steril odada bekletilmiştir [9].

**Çizelge 1.** Çalışmada kullanılan hibrid bireylere ait bazı özellikler

Kod	Toplandığı Lokalite	Petri Kabında 90 mm Ø Çapa Ulaştığı Süre (Gün)
A <sub>1</sub>	Denizli	9
A <sub>2</sub>	Denizli	9
B <sub>1</sub>	Erzincan	9
B <sub>2</sub>	Erzincan	8
B <sub>3</sub>	Erzincan	9
C <sub>1</sub>	Aydın	8
C <sub>2</sub>	Aydın	9
D <sub>1</sub>	Kars	9
D <sub>2</sub>	Kars	8

### 2.3. İnokulasyon

İnokulasyon işleminde 10 mm çapında 3 adet aktif misel kaplı agar parçası kullanılmıştır. Agar parçaları Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerinde geliştirilen 4–5 günlük miselin uç kısımlarından alınmıştır. Tüm inokulasyon işlemleri UV lamba ile sterilize edilen aşılama kabini içinde gerçekleştirilmiştir. Aşılama işlemi tamamlandıktan sonra torbalar 23–24°C derecedeki inkübasyon odasında inkübasyona bırakılmıştır [10].

### 2.4. İstatistiksel Hesaplamalar

Bu çalışmada her bir melez için 5 torba kullanılmış ve elde edilen sonuçlar bu torbaların aritmetik ortalamaları alınarak bulunmuştur.

## 3. BULGULAR

Denemeye alınan tüm misel strainleri başarılı şekilde buğday tanelerinden oluşan ortamı sarmışlardır. Strainlere ait sarma sürelerini gösteren çizelge aşağıda verilmiştir (Çizelge 2).

Kontrol olarak kullanılan strain torbayı 15 gün içinde sarmıştır. Yeni hibridler arasından B<sub>2</sub> ve D<sub>2</sub> strainleri aynı şartlar altında torbayı 12 günde sarmıştır (Şekil 1). Bu iki strainde

kontrol organizmasına göre 3 gün daha erken sarma süresi tespit edilmiştir (Şekil 2). Bu iki melez bireyin Petri kabı denemelerinde de diğer bireylere göre daha hızlı misel gelişimi gösterdiği ve Petri kaplarını inkübasyonun sekizinci gününde tamamen kapladığı rapor edilmiştir [8] (Şekil 3). Bu strainleri 13 günlük spawn sarma süresi ile C<sub>1</sub> hibridi takip etmiştir. Kontrole göre hızlı gelişim gösteren bu melez bireyler yanında A<sub>1</sub> ve C<sub>2</sub> strainlerinin torbaları 16 günlük bir sürede sardıği tespit edilmiştir.

**Çizelge 2.** Hibridlerin spawn ortamını sarma süreleri.

Kod	Torbayı Sarma Süresi (gün)
A <sub>1</sub>	16
A <sub>2</sub>	14
B <sub>1</sub>	15
B <sub>2</sub>	12
B <sub>3</sub>	14
C <sub>1</sub>	13
C <sub>2</sub>	16
D <sub>1</sub>	15
D <sub>2</sub>	12
Kontrol	15



Şekil 1. B<sub>2</sub> straininin 12. günde torbayı sarması



Şekil 2. 12. günde kontrol straini



Şekil 3. B<sub>2</sub> straininin 8. günde Petri kabını doldurması

Torbaları 12 günde saran yeni hibridlerin miselleri buğday tanelerine hızla penetre olmuşlardır ancak çıplak gözle yapılan incelemeler sonucunda misellerin zayıf iplikli formda olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber 15 ve 16 günde torbaları saran melezlerin misellerinin daha kalın formda olduğu gözlenmiştir. Sarma süresi ve miselin yapısal morfolojisi dışında, aromatik koku oluşumunda, miselin ilerleyen uç morfolojisinde, buğday tanelerinin sterilizasyonunda ve havai hif oluşumu gibi özelliklerde bir anormallik tespit edilmemiştir.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada daha önceki denemelerimizden elde edilen yeni hibrid bireylere ait spawn sarma süreleri, kontrol olarak kullanılan bir ticari strain ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Ekonomik öneme sahip bir makrofungusu ticari anlamda üretebilmek için sporlarını çimlendirerek veya şapka dokusundan doku kültürü hazırlayarak miseline ulaşmak gerekir. Sporların çimlendirilmesi ile genetik açıdan birbirinden farklı bireyleri elde etmek mümkündür. *Lentinula edodes*'in üç straini ile yapılan bir çalışmada farklı strainlerden elde edilen basidiosporlar farklı büyüme ortamları kullanılarak çimlendirilmiş ve sonuçta 5 – 10 gün arasında değişen çimlenme süreleri elde

edilmiştir [11]. Yine 9 farklı *Hericium spp.* straini ile yapılan bir araştırmada altı farklı substrat üzerinde inkübasyonun 28. gününde ölçülen misel gelişimleri 23 mm ile 118 mm arasında olmuştur [12]. Farklı özellikler gösteren bireylerin birbiriyle çaprazlanması sonucunda yeni hibridler (melezler) ortaya çıkmaktadır. Bu temel biyolojik yaklaşımların sonucunda elde edilen bulgulara göre ticari bir strainin belirlenmesinin yolu açılmış olur.

Bir Tübitak projesi kapsamında gerçekleştirilen bu çalışmada da görüleceği üzere kontrol olarak kullanılan ticari bir strainden daha hızlı gelişim gösteren yeni strainler ortaya çıkmıştır. Denemeye alınan melez bireyler arasından B<sub>2</sub> ve D<sub>2</sub> strainleri kontrolden 3 gün daha erken misel sarımını gerçekleştirmiştir. Bu açıdan bakıldığında mikrobiyolojik bir besiyerinde hızlı gelişim gösteren misellerin aynı performanslarını bu çalışmada da sergilediği açıkça söylenebilir. Ancak daha önceden besiyerinde B<sub>2</sub> ve D<sub>2</sub> melezleri ile aynı hızda gelişim gösterdiği rapor edilen C<sub>1</sub> melezinde bir miktar misel büyüme hızı düşüşü gözlenmiştir. Burada dikkat edilmesi gereken, fungal organizmaların değişik besin ortamlarında farklı performanslar sergileyebileceği ve bunun organizmanın doğasından kaynaklandığı gerçeğidir. Mikrobiyolojik bir besiyerinde oldukça hızlı gelişim sergileyen bireyler farklı bir ortamda değişik gelişim hızları sergileyebilirler, hatta buldukları bu ortamdan farklı bir ortama transfer edildiklerinde kendi içlerinde varyasyonlar sergileyebilirler [13, 14]. *Pleurotus eryngii*'ye ait 154 strain ile yapılan bir çalışmada strainlerin ilk hasat zamanları karşılaştırılmış ve 12,8 gün ile 85,8 gün arasında değişen sonuçlar elde edilmiştir [15]. Bir başka çalışmada *Lentinus tigrinus* türüne ait 3 strainin spawn sarma süreleri incelenmiş ve 28-30 gün arası sonuçlar elde edilmiştir [16]. Curvetto ve ark. [17] tarafından yapılan bir araştırmada *Pleurotus ostreatus* türünün beş farklı straininin ilk primordium verme zamanları 24-28 gün arası olarak

belirlenmiştir. Endüstriyel strainlerin elde edilmesinde her bir basamağın ayrı ayrı kontrol edilerek sonuçların bir bütün olarak yorumlanması gerekmektedir.

Misel morfolojisindeki farklılaşma da organizmalar arasında gözlenen ayrı bir varyasyon tipidir. Miselin dallanma şekli, miseli oluşturan hiflerin kalınlığı, anastomoz sıklığı gibi varyasyonlar fungal organizmalar hakkında araştırmacılara ipuçları sunmaktadır. Bu çalışmada hızlı gelişme gösteren bireylerde misel dallarının daha zayıf, yavaş gelişme gösteren bireylerde ise daha kalın olduğu gözlenmiştir. Bir sonraki adım olan kompost ortamında misellerin gelişimi ile ilgili çalışmalarda bu verilerin göz önünde bulundurulmasının oldukça faydalı olacağını düşünmekteyiz.

### Teşekkür

Bu çalışma Tübitak tarafından desteklenen "Biyoteknolojik yöntemler kullanılarak *Pleurotus* türlerine ait farklı spawn çeşitlerinin üretimi ve sertifikasyonu" (TIDEB-3050131) projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

### Kaynaklar

- [1] Royse, D.J., Estrada, A.E.R., Yield, size and bacterial blotch of *Pleurotus eryngii* grown on cottonseed hulls/oak sawdust supplemented with manganese, copper and whole ground soybean. Bioresour. Technol. 98: 1898-1906, (2007).
- [2] [www.mycelia.be](http://www.mycelia.be)
- [3] [www.sylvaninc.com](http://www.sylvaninc.com)
- [4] Cole, G., Models of cell differentiation in conidial fungi. Microbiol. Rev. 50: 95-132, (1986).
- [5] Gioia, T., Sisto, D., Rana, G.L., Figliuolo, G., Genetic structure of the *Pleurotus eryngii* species-complex. Mycol. Resour. 109: 71-80, (2005).
- [6] Tanrısever, A., Tanyolaç, B., Solak, M.H., Kalmış, E., Karaçancı, I.Ş. *Agaricus bisporus* (Lge.) Sing. türünde ıslah materyalinin

- oluşturulması ve genetik analizi. Ebiltem-Sanayi, 98/BİL/10 no'lu projesi kesin raporu, İzmir, (2001).
- [7] Ro, H.S., Kim, S.S., Ryu, J.S., Jeon, C.O., Lee, T.S., Comparative studies on the diversity of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*: ITS sequence analysis, RAPD fingerprinting and physiological characteristics. Mycol. Res. 3: 710-715, (2007).
- [8] Kalmış, E., Atmaca, M.A., Kalyoncu, F. *Pleurotus eryngii* şapkalı mantarından tek spor izolatlarının eldesi, melezlenmesi ve yeni melezlerin misel büyüme hızları. Türkiye VIII. Yemeklik Mantar Kongresi, 15–17 Ekim, Kocaeli, (2008).
- [9] Kalmış, E., Sargın, S. Cultivation of two *Pleurotus* species on wheat straw substrates containing olive mill waste water. Int. Biodet. Biodegr. 53: 43 – 47, (2004).
- [10] Zervakis, G., Yiatras, P., Balis, C. Edible mushrooms from olive oil mill wastes. Int. Biodet. Biodegr. 38: 237–243, (1996).
- [11] Kalmış, E., Kalyoncu, F. Variations in the isolates obtained from basidiospores of commercial mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake). Int. J. Sci. Technol. 1 (2): 99 – 103, (2006).
- [12] Ko, H.G., Park, H.G., Park, S.H., Choi, C.W., Kim, S.H., Park, W.M. Comparative study of mycelial growth and basidiomata formation in seven different species of the edible mushroom genus *Hericium*. Biores. Technol. 96 (13): 1439-1444, (2005).
- [13] Yang, H., King, R., Reichl, U., Gilles, E.D. Mathematical model for apical growth, septation and branching of mycelial microorganisms. Biotechnol. Bioeng. 39: 49–58, (1992).
- [14] Jones, C.L., Lonergan, G.T., Mainwaring, D.E. A rapid method for the fractal analysis of fungal colony growth using image processing. Binary, 5: 171–180, (1993).
- [15] Gioia, T.D., Sisto, D., Rana, G.L., Figliuolo, G. Genetic structure of the *Pleurotus eryngii* species-complex. Mycol. Res. 109 (1): 71-80, (2005).
- [16] Lechner, B.E., Alberto, E. Optimal conditions for the fruit body production of natural occurring strains of *Lentinus tigrinus*. Biores. Technol. 98: 1866-1869, (2007).
- [17] Curvetto, N.R., Figlas, D., Devalis, R., Delmastro, S. Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and/or Mn(II). Biores. Technol. 84: 171-176, (2002).

Geliş Tarihi: 12/01/2009

Kabul Tarihi: 14/04/2009