



Geliş(Received) :17/10/2019
Kabul(Accepted) :04/12/2019

Araştırma Makalesi/Research Article
Doi:10.30708.mantar.634261

***Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. İçin Yüksek Verimli Hibrit Bireylerin Belirlenmesi**

Erbil KALMIŞ¹, Mehmet ATMACA², Fatih KALYONCU³

Sorumlu Yazar: fatih.kalyoncu@cbu.edu.tr

¹TC Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, İzmir İl Müdürlüğü, İzmir
Orcid No: 0000-0001-5144-1779/ erbilkalmis@yahoo.com

²Agroma Gıda Tarım Hayvancılık, Hacıyüplü Mah. Merkezefendi, Denizli
Orcid No:0000-0002-9814-7144/ agromantar@yahoo.com

³Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Muradiye, Yunusemre, Manisa
Orcid no:0000-0003-3912-9373/fatih.kalyoncu@cbu.edu.tr

Öz: Bu araştırmada, ülkemize ait gen kaynaklarının belirlenmesi, korunması ve ekonomik katma değere dönüşebilmesi amacıyla; seçilen dört *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. makrofungusundan tek spor izolatlarının elde edilmesi, melezlenmesi ve oluşan melez bireylerin misel gelişim hızlarının saptanarak ticari olarak kültüre alma çalışmalarına aktarılması hedeflenmiştir. İlk aşamada dört *H. erinaceus* örneğinden alınan sporların çimlendirilmesi sonucu 230 tek spor izolatu elde edilmiştir. Bu izolatların karşılıklı ekimi ile gerçekleşen ikinci aşamada ise 52 adet melez bireyin gelişimi sağlanmıştır. Çalışmamızın son aşamasında bu melez bireyler kompost ortamına aktarılarak kompostu sarma süreleri, pin oluşum süreleri ve elde edilen ürün miktarı üzerinden verimlilikleri belirlenmiştir. Tüm denemeler on tekrarlı olarak yapılmış ve sonuçta 11 adet biyolojik verimliliği yüksek melez birey elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Aslan yelesi, Biyoverimlilik, *Hericium erinaceus*, Melezleme, Tek spor

Determination of High Yield Hybrid Strains for *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers.

Abstract: In this research, in order to identify, protect and turn into economic added value of our country's gene resources; to obtain single spores from four selected *Hericium erinaceus* samples, to hybridize and to determine mycelial growth rates of hybrid strains and to transfer them to commercial culturing studies was aimed. In the first stage, 230 single spore isolates were obtained by germinating spores from four *H. erinaceus* samples. In the second stage, the development of 52 hybrid strains were achieved by mating of these isolates. In the last stage of our study, these hybrid strains were transferred in the compost and their efficiencies were determined over the compost winding times, pin formation times and the amount of product obtained. All experiments were performed in ten replicates and as a result 11 biologically productive hybrid strains were obtained.

Key words: Bioproductivity, *Hericium erinaceus*, Hybridization, Lion's mane, Single spore

Giriş

Verimli bir zirai üretim yapabilmenin koşullarından birisi de kullandığınız tohumluk materyalin kaliteli olmasıdır. Günümüzde farklı mantar türlerinin üretimi için agronomik özellikleri tanımlanmış ticari misel satışı yapılmaktadır. *Hericium erinaceus* (aslan yelesi mantarı)

son zamanlarda yapılan çalışmalar ile popüleritesi hızla artan ticari türler arasındadır. İçerdiği hericenonenler sayesinde HeLa kanser hücreleri üzerinde büyüme engelleyici etkileri olması ve β -glukanlar ile de immüno-modulator aktivite göstermesi (Mizuno, 1999; Wang ve

XI. Türkiye Yemeklik Mantar Kongresi-2019



ark., 2005; Khan ve ark., 2013) nedeni ile ticari üretimi hızla artmıştır.

Hericium erinaceus özellikle Japonya ve Kuzey Amerika ülkelerinde yaygın olarak görülen, nadiren de Avrupa kıtasında bulunan bir makrofungus türüdür.

Avrupa ülkelerinde nadir görünmesinden dolayı Red List (Kırmızı Liste) içine dâhil edilmiştir (Guglielmo ve ark., 2007; Dahlberg ve ark., 2010). Ülkemiz mikoflorasında ise Batı Karadeniz bölgesi ve Sinop ilinde türe ait kayıtlar bulunmaktadır (Şekil 1) (Afyon ve ark., 2004; 2005).



Şekil 1. *Hericium erinaceus*

Doğal ortamından toplanan türler toplandığı ülke açısından genetik kaynak olarak değerlendirilmektedir. Doğanın bize sunduğu bu kaynakların araştırılması, yeni özelliklerinin açığa çıkarılması anlamında önem arz etmektedir. Ülkemize ait bazı yabancı makrofungusların gerek spor gerekse de doku formları kullanılarak misel kültürlerinin oluşturulması, biyolojik ve agronomik özelliklerinin belirlenmesi üzerine çalışmalar geçmişte gerçekleştirilmiştir (Kalyoncu ve ark., 2008; Kalmis ve Kalyoncu, 2008; Kalmis ve ark., 2008). Ticari öneme sahip türler için, spor çimlendirilmesi, elde edilen miseller arasında eşlendirme yapılması ve yeni hibrit bireylerin oluşturulması ile bunların *in vitro* ortamda özelliklerinin araştırılması ticari misel üretimi açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmada; TÜBİTAK tarafından desteklenen bir proje kapsamında *Hericium erinaceus* makrofungusunun hem ticari hem de yabancı türlerinden alınan sporların çimlendirilmesi ile üretilen primer miseller *in vitro* olarak kendi aralarında eşlendirilmiştir. Bu işlem sonucunda oluşan hibrit bireylerden spawn materyali hazırlanarak kompost ortamında misel sarma hızı ve biyoverimlilik gibi bazı agronomik özellikleri incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Hericium erinaceus makrofungusuna ait ticari örnekler Agroma Mantarcılık üretim odalarından elde

edilmiştir. Yabancı örnekler ise Trabzon, İzmit ve Kastamonu illerinde yapılan arazi çalışmalarından sağlanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan makrofungusların ait olduğu lokasyonlar ve kodları

Elde Edildiği İl	Kod
Denizli (Ticari)	D
Trabzon	T
Kastamonu	K
İzmit	i

Üretim odasından ve doğal ortamlarından toplanan *Hericium erinaceus* örnekleri sapsarı kesilerek steril petri kaplarına alınmıştır. Bir gece bekletilen makrofunguslar daha sonra uzaklaştırılmış ve petri kapları kapalı şekilde aseptik ekim kabineye getirilerek içlerine 5 ml steril distile su ilave edilmiştir. Daha sonra 5 dakika boyunca sporların birbirine yapışmasının önlenmesi için çok yavaş daire hareketi yaptırılarak karıştırılmıştır. Bu işlemi takiben ekim kabini içinde, aseptik koşullarda, steril distile su kullanılarak 10^{-2} – 10^{-5} 'lik dilüsyonlar hazırlanmış ve tüm dilüsyonlardan steril Patates Dekstroz Agar (PDA) ortamına ekim yapılmıştır. En son aşamada ise çimlenen

XI. Türkiye Yemeklik Mantar Kongresi-2019



sporların oluşturduğu primer miseller seçilip yeniden PDA besiyerine aktarılmıştır. 27°C'de gelişen primer miseller numaralandırılmış ve misellerin eşlendirilmesi işlemine geçilmiştir. Bu işlem PDA içeren petri kabında her bir primer miselden alınan 6 mm çapındaki disklerin karşılıklı ekimi ile gerçekleştirilmiştir. Misellerin temas noktaları ışık mikroskobu altında incelenmiş ve kanca oluşumu gözlenen yeni sekonder miseller hibrit birey olarak işaretlenip PDA ortamına alınmıştır (Akata ve ark., 2012).

Sonraki işlem olan spawn hazırlanmasında taşıyıcı materyal olarak buğday taneleri kullanılmıştır. Haşlama kazanlarına alınan buğdaylar 20 dakika kaynatılmış ve süzülerek soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan buğdaylar mikserde %1 oranında alçı ile karıştırılmış ve sonra 1.5 kg'lık polipropilen torbalara doldurulmuştur. Torbalar otoklavda 121°C derecede 45 dakika süre ile sterilize edildikten sonra soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan torbalar bir gece UV lambalı steril odada bekletildikten sonra ekim kabininde sekonder miseller ile aşılanmıştır. Aşılama işleminde 10 mm çapında 3 adet misel kaplı agar diski kullanılmıştır. Aşılama işlemi tamamlandıktan sonra torbalar 23-24°C'de inkübasyona bırakılmıştır (Kalyoncu ve Kalmış, 2007).

Verimlilik ve misel sarma hızı denemelerinde kullanılacak en uygun kompost materyali olarak; %3 buğday samanı, %60 meşe talaşı, %10 kavak talaşı, %25 buğday kepeği, %2 alçı içeren karışım seçilmiştir. 100 kg olarak hazırlanan kompost materyali 15 dakika süre ile mikserde karıştırılmıştır. Karıştırma esnasında su ilavesi yapılarak %70 nem seviyesine ulaşılmıştır. Kompost materyalinin pH seviyesi 6.5 olarak tespit edilmiştir. Denemelerde kullanacağımız kompost bileşenlerinin kuru madde analizleri 70°C'deki kurutma fırınında ağırlık sabit kalana kadar tutularak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan

kompost materyali 1600 g olacak şekilde (kuru madde miktarı 480 g) polipropilen torbalara doldurulmuştur. Torbalar 121°C 1.5 saat süre ile otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Soğuma işlemini tamamlayan torbalara aseptik koşullarda üst kısmından % 3 oranında spawn aşılanmıştır. Aşılama işlemi tamamlandıktan sonra torbalar 23-24°C derecedeki inkübasyon odasında gelişmeye bırakılmıştır (Kalmış ve ark., 2008). Misel gelişimini tamamlayan torbalar taslak ve şapka oluşumu için 20°C'de bulunan üretim odalarına alınmıştır. Üretim odalarının nem düzeyi %80-90 olacak şekilde ayarlanmış ve her 24 saatte 12 saat süre ile 400 lux aydınlatma yapılmıştır (Atıla ve Tüzel, 2016). Üretim odalarında biriken CO₂ dışarıdan alınan taze hava ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu denemelerde her bir melez birey için 10 torba kullanılmıştır. Kontrol materyali olarak ticari spawn kullanılmıştır. Denemelerimize ait ölçümlerimizde torba üstünden başlayıp her yere yayılan ve sağlıklı misel gelişimi sergileyen torbalarda miselin torbanın tamamını doldurma süresi gün olarak ölçülmüştür.

Biyolojik verimlilik (BE) ise aşağıda verilen eşitlik ile hesaplanmıştır;

$$BE = \frac{\text{Hasat edilen mantar miktarı}}{\text{Kullanılan substratın kuru ağırlığı}} \times 100$$

Bulgular

Çalışmamızda kullandığımız 3 yabancı ve 1 ticari *Hericium erinaceus* örneğinden toplam 230 adet tek spor izolatu elde edilerek zengin bir koleksiyon oluşturulmuştur (Tablo 2).

Tablo 2. Kültür koleksiyonundaki tek spor izolatlarına ait bilgiler

Orjini	Şapka I	Şapka II	Şapka III	Şapka IV	Toplam
Denizli	DA-1, DA-14	DB-1, DB-12	DC-1, DC-12	DD-1, DD-16	54
Trabzon	TA-1, TA-12	TB-1, TB-12	TC-1, TC-15	TD-1, TD-12	51
Kastamonu	KA-1, KA-21	KB-1, KB-14	KC-1, KC-12	KD-1, KD-16	63
İzmit	İA-1, İA-15	İB-1, İB-15	İC-1, İC-18	İD-1, İD-14	62

Yabancı mantar örneklerinden 60 civarında tek spor izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Doğal ortamından toplanan mantarların kontaminasyonlara açık olması nedeni ile sağlıklı spor çimlendirme işlemi oldukça güçleşmektedir. Tek spor izolatlarından elde edilen ve mikroskobik incelemelerde kanca oluşumu gözlenmeyen homokaryotik miseller daha sonra kendi aralarında

çaprazlanmıştır (Şekil 2). Petri kabı içinde yapılan eşleştirme denemelerinde bir biriyle uyumlu olmayan, miseller arası konjugasyon oluşturmayanlar elenmiştir. Eşleştirme denemeleri sonucunda birbirleriyle uyumlu olan, heterokaryotik misellerin misel büyüme hızlarına ve misel morfolojilerine bakılmış, tüm ölçümlerin en hızlı

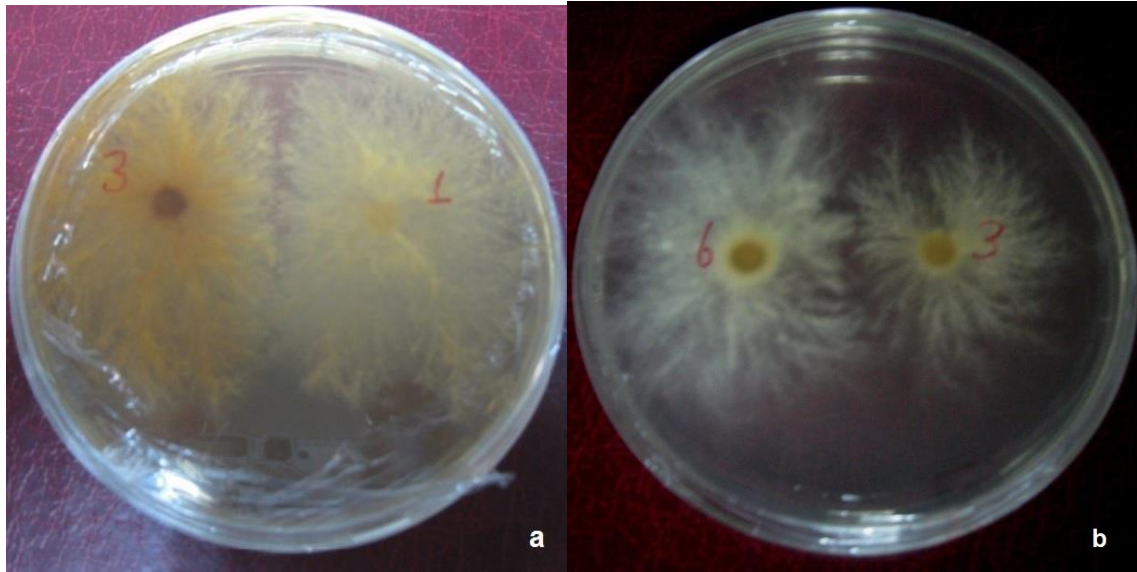
XI. Türkiye Yemeklik Mantar Kongresi-2019



olanları kültürel denemeler için ayrılmıştır. Elde edilen 11 hibrit bireye ait bulgular Tablo 3'de sunulmuştur.

Tablo 3. Hibrit bireylere ait ölçülen değerler

Sıra No	Miselin Petri Kabını Sarma Süresi (Gün)	Kompostu Sarma Süresi (Gün)	Pin Oluşturma Süresi (Gün)	Toplanan Mantar Miktarı (g)
1 (DxD)	23	41	55	302
2 (DxD)	21	42	62	308
3 (TxT)	26	44	58	288
4 (KxK)	26	44	58	304
5 (İxİ)	24	43	58	314
6 (İxİ)	21	43	54	328
7 (Dxİ)	21	36	52	312
8 (Dxİ)	22	38	50	322
9 (Dxİ)	24	42	54	324
10 (İxK)	22	38	54	302
11 (İxK)	22	34	56	300



Şekil 2. a; b. Farklı bireylerin petri kabı içinde çaprazlama denemeleri

Ticari D kodlu bireylerin Yabani İ kodlu bireyler ile çaprazlanmasından (8-9) elde edilen melezlerde hız ve verim açısından oldukça iyi sonuçların elde edildiği görülmüştür. 8 numaralı bireyden 322 g, 9 numaralı bireyden de 324 g ürün alınmıştır. Kompostu en hızlı saran ise 11 numaralı hibrit bireyken, verim açısından 6, 8 ve 9 numaralı bireylere kıyasla 20-28 g daha az ürün vermiştir. Ticari bireylerden elde edilen 1 ve 2 numaralı hibritlerin misel büyüme hızları iyi sonuçlar vermesine rağmen, verim açısından 6, 8 ve 9 numaralı hibritlere göre yaklaşık 20 g daha az ürün vermiştir. Ancak tüm denemeler içinde ticari bireyin İzmit ilinden toplanan yabani birey ile (Dxİ) çaprazlanmasından elde edilen 8 ve 9 numaralı hibrit bireylerden genel anlamda çok iyi

sonuçlar elde edilmiştir. Bu veriler ışığında hesaplanan Biyolojik Etki Değeri Tablo 4'de verilmiştir.

İzmit ilinden toplanan mantar sporlarının melezlenmesi sonucunda elde edilen 6 numaralı hibrit bireyde en yüksek verim ve biyolojik etki değeri tespit edilmiştir. Bunu yine aynı şapkadan elde edilen sporların ticari bireyler ile eşleştirilmesinden elde edilen hibrit (8-9) bireyler takip etmiştir. En düşük Biyolojik Etki Değeri sırasıyla 3, 11 ve 10 ile 1 numaralı, en yükseği ise 6, 8 ve 9 numaralı hibritlerden elde edilmiştir.

XI. Türkiye Yemeklik Mantar Kongresi-2019

**Tablo 4.** Hibrit bireylere ait biyolojik etki değerleri (%)

Hibrit Bireyler	Biyolojik Etki Değeri (%)
1 (DxD)	62.9
2 (DxD)	64.1
3 (TxT)	60.0
4 (KxK)	63.3
5 (İxİ)	65.4
6 (İxİ)	68.3
7 (Dxİ)	65.0
8 (Dxİ)	67.0
9 (Dxİ)	67.5
10 (İxK)	62.9
11 (İxK)	62.5

Tartışma

Doğadan toplanan yabani bireylerden farklı özellikler elde edilebileceği, bunların değerli birer gen kaynağı olacağı fikri, uzun zamandır kabul gören bir görüştür. Bu çalışmada tıbbi öneme sahip gıda olarak tüketilen *Hericium erinaceus* mantarının yabani ve ticari örneklerinden tek spor izolatları elde edilmiştir. Çimlendirilen spordan üretilen homokaryotik misellerin birbirleri ile eşleştirilmesinden birbiriyle uyumlu heterokaryotik miseller üretilmiştir.

Aynı organizma ile yapılan benzer bir çalışmada iki heterokaryotik birey PDA ortamında 23. günde 65 mm ve 27 mm büyüme göstermişler (Akata ve ark., 2012). Bu çalışmada 11 melez bireyin 3 tanesi 21 günde ve 3 tanesi 22 günde petri kabını (90 mm) sarmıştır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen hibrit bireylerin gerçekten misel büyümeleri farklılık göstermektedir. Ancak petri kabında misel gelişim hızı yüksek olan 2 ve 6 numaralı hibritler

Kaynaklar

- Afyon, A., Konuk, M., Yağız, D., ve Helfer, S. (2005). A Study of Wood Decaying Macrofungi of the Western Black Sea Region, Turkey. *Mycotaxon*, 93 319-322.
- Afyon, A. ve Yağız, D. (2004). Macrofungi of Sinop Province, Turkey. *Türk. J. Bot.*, 28 351-360.
- Akata, I., Kalmis, E., Kalyoncu, F., and Atmaca, M. (2012). A Comparative Study on the Growth Rate of Homokaryotic Mycelium Obtained from A Single Spore of *Hericium erinaceus* Isolates in different culture media. *J. Pure Appl. Microbiol.*, 6 (1) 171-174.
- Atila, F., ve Tüzel, Y. (2016). Yetiştirme Ortamlarının *Hericium* İzolatlarının Verim ve Şapka Özellikleri Üzerine Etkisi. *Türk Tarım-Gıda Bilim Teknol. D.*, 4 (3) 120-127.
- Dahlberg, A., Genney, D.R. ve Heilmann-Clausen, J. (2010). Developing A Comprehensive Strategy for Fungal Conservation in Europe: Current Status and Future Needs. *Fungal Ecol.*, 3 50-64.
- Guglielmo, F., Bergemann, S.E., Gonthier, P., Nicolotti, G. ve Garbelotto, M.M. (2007). A Multiplex PCR-Based Method for the Detection and Early Identification of Wood Rooting Fungi in Standing Trees. *J. Appl. Microbiol.*, 103 1490-1507.
- Kalmış, E., Atmaca, M.A. ve Kalyoncu, F. (2008). *Pleurotus eryngii* Şapkalı Mantarından Tek Spor İzolatlarının Eldesi, Melezlenmesi ve Yeni Melezlerin Misel Büyüme Hızları. *Türkiye VIII. Yemeklik Mantar Kongresi*, 15-17 Ekim, Kocaeli.
- Kalmis, E. ve Kalyoncu, F. (2008). Mycelial Growth Rate of Some Morels (*Morchella* spp.) in Four Different Microbiological Media. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 3 (6) 861-864.
- Kalyoncu, F. ve Kalmış, E. (2007). Pirininin Farklı *Pleurotus* türlerinin Yetiştiriciliğinde Kullanım Olanaklarının Araştırılması. *Balıkesir Üniv. Fen Bil. Enst. D.*, 9 (2) 87-92.

diğerine göre kompostu 6-7 gün daha geç sarmıştır. Mikrobiyolojik ortamda organizmanın misel gelişim hızı, kompost ortamından farklılık göstermiştir. Steril, kompozisyonu belli ve stabil bir ortamda hızlı misel gelişimi sergileyen hibrit, daha karmaşık kompost ortamında farklı davranış biçimine girmektedir. Fungal fizyolojik çalışmalarda da bu farklılık bilimsel olarak ortaya konulmuştur. Keza PDA ortamında misel gelişim hızı aynı olan, kompost ortamını da aynı sürede saran 2 ve 6 numaralı hibritlerden sırasıyla 308 ve 328 g olacak şekilde farklı ürün alınmıştır. Yaklaşık yarım kilogramlık kuru madde içeren kompostta 20 g, kiloda 40 g'lık bir ürün kaybı söz konusudur. *Hericium* organizmasının Agroma Firmasından temin edilen Denizli, Trabzon ve İzmit orjinli hibritleri ile yapılan ve farklı kompost formüllerinin uygulandığı güncel bir çalışmada; hibritler kompost ortamını 35-38 gün aralığında sarmış ve Biyolojik Etkinlik Değeri % Denizli için %40, Trabzon %43 ve İzmit için %44 olarak tespit edilmiştir (Atila ve Tüzel, 2016). Benzer çalışmalarda melezlerden farklı sonuçların elde edilebileceği, bunlardan ticari öneme sahip olanların seçilebileceği gösterilmiştir (Ko ve ark., 2005).

Bu tip klasik ıslah yöntemleri uzun zaman almaktadır. Günümüzde moleküler yöntemler kullanılarak daha kısa sürede bu sonuçlara ulaşmak mümkün olmaktadır. Ancak moleküler yöntemleri kullanmak, yetişmiş insan gücü ve iyi kurgulanmış alt yapı olanaklarını gerektirmektedir.

Teşekkür

Bu yayın TUBİTAK tarafından desteklenen 3090384 numaralı TEYDEB projesi verileri kullanılarak hazırlanmıştır.

XI. Türkiye Yemeklik Mantar Kongresi-2019



- Kalyoncu, F., Allı, H., Kalmış, E. ve Solak, M.H. (2008). Yabani Şapkalı Mantar Misellerinin Farklı Kültür Ortamlarında Misel Gelişim Hızlarının Belirlenmesi. *Türkiye VIII. Yemeklik Mantar Kongresi*, 15-17 Ekim, Kocaeli.
- Khan, A., Tania, M., Liu, R. ve Rahman, M.M. (2013). *Hericium erinaceus*: An Edible Mushroom with Medicinal Values. *J. Comp. Integ. Med.*, 10 253-258.
- Ko, H.G., Park, H.G., Park, S.H., Choi, C.W., Kim, S.H. ve Park, W.M. (2005). Comparative Study of Mycelia Growth and Basidiomata Formation in Seven Different Species of the Edible Mushroom Genus *Hericium*. *Bioresour. Technol.*, 96 1439-1444.
- Mizuno, T., (1999). Bioactive Substances in *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Yamabushitake) and Its Medicinal Utilization. *Int. J. Med. Mushrooms*, 2 105-119.
- Wang, J.C., Hu, S.H., Wang, J.T., Chen, K.S. ve Chia, Y.C. (2005). Hypoglycemic Effect of Extract of *Hericium erinaceus*. *J. Sci. Food Agric.*, 85 641-646.