

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

**DENİZLİ İLİ'NDE DOĞAL OLARAK YETİŞEN *Tuber  
aestivum* TÜRÜNE AİT ÖRNEKLERİN GENETİK  
KARAKTERİZASYONU VE rDNA ITS BÖLGE  
DİZİLERİYLE FİLOGENETİK ANALİZİ**

**Tezi Hazırlayan  
Süleyman KUYUMCU**

**Tezi Yöneten  
Doç.Dr. Aziz TÜRKOĞLU**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Haziran 2011  
NEVŞEHİR**



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

**DENİZLİ İLİ'NDE DOĞAL OLARAK YETİŞEN *Tuber  
aestivum* TÜRÜNE AİT ÖRNEKLERİN GENETİK  
KARAKTERİZASYONU VE rDNA ITS BÖLGE  
DİZİLERİYLE FİLOGENETİK ANALİZİ**

**Tezi Hazırlayan  
Süleyman KUYUMCU**

**Tezi Yöneten  
Doç.Dr. Aziz TÜRKOĞLU**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Haziran 2011  
NEVŞEHİR**

Doç. Dr. Aziz TÜRKOĞLU danışmanlığında **Süleyman KUYUMCU** tarafından hazırlanan "**Denizli İli'nde Doğal Olarak Yetişen *Tuber aestivum* Türüne Ait Örneklerin Genetik Karakterizasyonu ve rDNA ITS Bölge Dizileriyle Filogenetik Analizi**" adlı bu çalışma jürimiz tarafından Nevşehir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

03 / 06 / 2011

### JÜRİ:

Başkan : Yrd. Doç. Dr. İskender Parmaksız

Üye : Doç. Dr. Aziz Türkoğlu

Üye : Yrd. Doç. Dr. Gençay Akgül

### ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 22 / 06 / 2011 tarih ve 2011 / 25-1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

22 / 06 / 2011

Doç. Dr. Seleuk Kervan

Enstitü Müdürü



## TEŞEKKÜR

“Denizli İli'nde Doğal Olarak Yetişen *Tuber aestivum* türüne Ait Örneklerin Genetik Karakterizasyonu ve rDNA ITS Bölge Dizileriyle Filogenetik Analizi” konulu tez çalışmasının seçiminde, yürütülmesinde, laboratuvar çalışmalarında, sonuçlandırılmasında ve sonuçlarının değerlendirilmesinde maddi ve manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam sayın Doç.Dr. Aziz Türkoğlu'na teşekkür ederim.

30 Ağustos 2010-7 Eylül 2010 tarihlerin arasında Bitki Genetiği Enstitüsü'nde (CNR, İtalya) yapılan laboratuvar çalışmalarında ve analizlerde her türlü yardımı yapan, zaman harcayan, emek veren, tecrübesini paylaşan Dr. Francesco Paolucci'ye, Dr. Andrea Rubini'ye, Dr. Claudia Riccioni'ye teşekkür ederim. Yaptığı çalışmalarla ve birebir bilgi paylaşımıyla bu tezin hazırlanmasında yardımcı olan Uppsala Üniversitesinden (İsveç) Dr. Christina Weden'e ve Yrd. Doç. Dr. İskender Parmaksız'a teşekkür ederim.

Bu tezin yürütülmesinde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve üniversitemizin imkânlarını sunan başta rektörümüz sayın Prof.Dr. Filiz Kılıç'a, rektör yardımcımız ve fakültemizin dekanı sayın Prof.Dr. Çetin Pekacar'a teşekkür ederim.

Ayrıca arazi çalışmalarında bulunan ve geçmişte edinmiş olduğu tecrübeleri cömertçe paylaşan Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Sekreteri Sayın Niyazi Uluçoban'a teşekkür ederim.

Tez çalışması boyunca bana verdiği manevi destek, göstermiş olduğu sabır ve anlayıştan dolayı annem, babam ve kardeşlerime, değerli arkadaşlarım Arş.Gör. Ömer Yunus GÜMÜŞ ve Arş.Gör. Soner DÖNMEZ'e teşekkür ederim.

**DENİZLİ İLİ'NDE DOĞAL OLARAK YETİŞEN *Tuber aestivum* TÜRÜNE AİT  
ÖRNEKLERİN GENETİK KARAKTERİZASYONU VE rDNA ITS BÖLGE  
DİZİLERİYLE FİLOGENETİK ANALİZİ**

**Süleyman KUYUMCU**  
**Nevşehir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2011**  
**Tez Danışman: Doç.Dr. Aziz Türkoğlu**

**ÖZET**

Trüf mantarları yüzyıllardan beri ‘Tanrıların yiyeceği’ olarak bilinen ekonomik olarak çok değerli ve hoş kokusu ve lezzeti ile mutfaklarda baş tacı edilen toprağın 5-20 cm altında ektomikorizal olarak yetişen bir mantar türüdür. Tüm dünyada bu mantarlar üzerine birçok çalışma yapılmasına rağmen, ülkemizde ancak son yıllarda çalışmalar başlamıştır.

*Tuber aestivum* trüf mantarları arasında değerli olan ve ülkemizde de doğal olarak bulunan bir türdür. Ancak *Tuber aestivum* üzerine yapılan çalışmalar diğer trüf türlerinde de olduğu gibi ülkemizde çok azdır ve ancak son yıllarda başlamıştır. Tüm dünyada ve Avrupada morfolojik ve moleküler çalışmaların hemen her ülkede yapıldığı *Tuber aestivum* için ülkemizde henüz hiç moleküler çalışma yayınlanmamıştır.

Bu tezde Denizli’de yetişen *Tuber aestivum* örneklerinin ITS bölgelerinin dizi analizleri yapılarak, filogenetik çalışma yapılmış ve Avrupa’daki örneklerle karşılaştırılmıştır. Bu tezin sonuçlarının tüm Türkiye’de yapılacak *Tuber aestivum* ve diğer trüf türleri üzerine yapılacak çalışmalara temel olması beklenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Trüf, *Tuber aestivum*, filogenetik, ITS, rDNA

**GENETIC CHARACTERISATION OF INDIGENOUS *Tuber aestivum*  
SAMPLES AND PHYLOGENETIC ANALYSES OF THEIR rDNA ITS  
REGIONS**

**Süleyman KUYUMCU**

**Nevşehir University, Graduate School of Natural and Applied Science**

**M.Sc. Thesis, June 2011**

**Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Aziz Türkoğlu**

**ABSTRACT**

Truffles known as ‘God’s Food’ are economically valued and living underground as ectomycorrhizal life forms are important food in kitchens for centuries. Although there are many studies on these fungi all over the world, studies have just begun recently in Turkey.

*Tuber aestivum* is one of the valued truffles and indigenous species in our country. However, studies on *Tuber aestivum* are not many and started, recently. Although, molecular and morphologic analyses performing in many countries in the world and Europe, there is no any molecular study on *Tuber aestivum*.

In this thesis, indigenous *Tuber aestivum* samples in Denizli sequenced by ITS regions and compared with European samples by phylogenetic analyses. Results of this thesis are expected to be used for studies on *Tuber aestivum* and other truffles all over Turkey.

**Keywords:** Truffle, *Tuber aestivum*, phylogenetics, ITS, rDNA

## İÇİNDEKİLER

|  |     |
|--|-----|
| KABUL VE ONAY .....                                      | i   |
| TEŞEKKÜR .....   | ii  |
| ÖZET .....   | iii |
| ABSTRACT .....   | iv  |
| İÇİNDEKİLER.....   | v   |
| KISALTMA VE SİMGELER .....                               | vii |
| 1.BÖLÜM  |     |
| GİRİŞ .....  | 8   |
| 1.1. Ektomikoriza.....                                   | 2   |
| 2.BÖLÜM  |     |
| GENEL BİLGİLER .....                                     | 5   |
| 2.1.Trüf Mantarları .....                                | 5   |
| 2.1.1. Tarihçe.....                                      | 8   |
| 2.1.2. Tuber aestivum.....                               | 11  |
| 2.2. Genetik karakterizasyon .....                       | 12  |
| 2.3. ITS Bölgeleri .....                                 | 14  |
| 2.4. ITS dizileriyle ile Filogenetik Analiz.....         | 14  |
| 3.BÖLÜM  |     |
| YÖNTEMLER.....   | 16  |
| 3.1 Örneklemeye .....                                    | 16  |
| 3.1.1. Arazi çalışmaları ve morfolojik teşhis.....       | 16  |
| 3.1.2. Laboratuvar çalışmaları ve moleküler teşhis ..... | 17  |
| 3.2.DNA izolasyonu.....                                  | 17  |
| 3.3. PCR .....   | 19  |
| 3.4. Dizi Analizi.....                                   | 20  |
| 3.5. Filogenetik Analiz.....                             | 20  |



## 4.BÖLÜM

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| BULGULAR .....                   | 21 |
| 4.1. PCR sonuçları .....         | 21 |
| 4.2. Dizi analizleri.....        | 22 |
| 4.3. Filogenetik analizler ..... | 22 |

## 5. BÖLÜM

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| TARTIŞMA; SONUÇ VE ÖNERİLER ..... | 27 |
| KAYNAKLAR.....                    | 30 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                     | 35 |

## KISALTMA VE SİMGELER

|       |  |
|-------|--|
| PCR   | : Polymerase chain reaction<br>Polimer Zincir Reaksiyonu                         |
| UPGMA | : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean                              |
| DNA   | : Deoxiribonucleic Acid<br>Deoksiribonükleik Asit                                |
| RNA   | : Ribonucleic Acid<br>RibonükleikAsit  |
| rDNA  | : Ribosomal DNA<br>Ribozomal DNA   |
| RAPD  | : Random Amplification of Polimorphic DNA<br>Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA |
| ITS   | :Internal transcribed spacer   |
| ETS   | :External transcribed sequence   |
| IGS   | : Intergenic spacer  |
| ABD   | : Amerika Birleşik Devletleri  |
| MÖ    | : Milattan Önce  |
| MS    | : Milattan Sonra   |

# 1.BÖLÜM

## GİRİŞ



Şekil 1. 1 Bir trüf türü olan *Tuber aestivum* [1]

Tuber türleri askomisetlerin açık tohumlu ve kapalı tohumlu birçok bitki türünün kökleriyle simbiyoz oluşturarak gelişen ve büyüyen geniş bir ektomikorizal mantar grubu olan Pezizales grubuna aittir. Bu mantarın askokarpı trüf olarak bilinmektedir. Trüf türlerinin (yaklaşık 100) coğrafi dağılımı kuzey yarım kürenin sıcak bölgelerinde bulunmaktadır ve en az üç farklı alanda bulunmaktadır: Avrupa, Güney-Doğu Asya ve Kuzey Amerika [2].

Bu ektomikorizal mantarlar ortak yaşadığı bitkilere sağladığı avantajlar ve mutualistik ilişkileri nedeniyle kolonize olduğu ekosistemler çok önemlidir [3]. Simbiyotik kapasiteleri nedeniyle mikorizal mantarlar, bugünkü odunsu bitkilerin evriminde çok kritik rol oynamışlardır. Tuber cinsi olan ve trüf olarak bilinen mantarlar ise mikorizal mantarlar arasında daha değerlidir [4].

### 1.1. Ektomikoriza

Ektomikorizaların yapısına bakıldığında, birçok ektomikoriza manto (mantle) adı verilen köklerin yüzeyinde uzanan mantar dokusuna sahiptir (Şekil 1). Mantodan köklerin dış çeperinin içine hiflerinin girmesi nedeniyle oluşan üç boyutlu yapıya Hartig ağı denir. Mantonun dışında hifler toprağa doğru uzayıp gidebilirler.



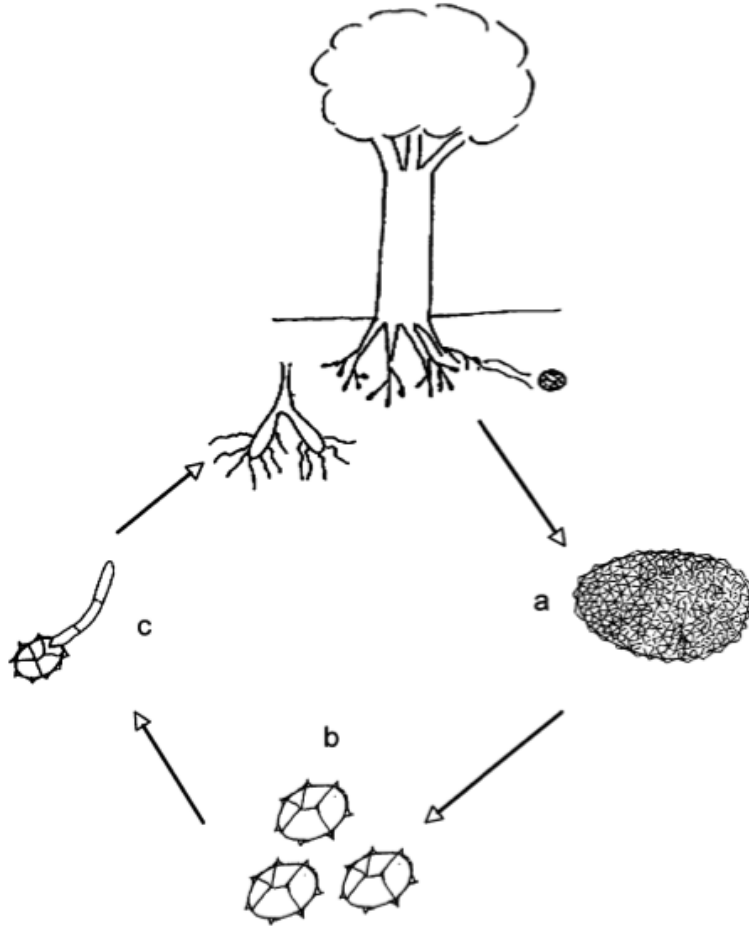
Şekil 1. 2 Bir ektomikoriza örneği: *Tuber aestivum* mikorizası [5]

Mikorizaların tanınması çok güçlü bir mikroskop ve iyi bir deneyim gerektirir. Örneğin uzman olmayan biri *Tuber melanosporum*'un küçük sosis benzeri mikorizalarını, *Sphaerospora brunnea* mikorizalarıyla karıştırabilir [6].

### 1.2. Trüf askokarplarının oluşumu

Birçok Tuber türü tadı ve kokusu nedeniyle çok iyi bilinir ve dünya çapında ticari olarak bulunurlar. Organoleptik kaliteleri nedeniyle iki Avrupalı tür olan *T. magnatum* Pico ve *T. melanosporum* rönesans boyunca çok kıymetli hale gelmişlerdir [7].

Trüflerin askokarp oluşumu biyolojik döngünün seksüel fazının aktivasyonu sonucudur (şekil 1. 3).



Şekil 1. 3 Trüf mantarı hayat döngüsü. a, yeraltındaki askokarp; b, askosporların üretimi; ve c, askospor ve köklerin enfeksiyonu (mikorizal simbiyoz) . c aşaması henüz bilinmemektedir [4].

Dikaryotik ikincil misellerin oluşumu ve askus hücresindeki askospor oluşumuyla birlikte mayozu takiben meydana gelen karyogami birçok yazar tarafından hipotez olarak öne sürülmüştür [8, 9, 10]. Askomisetler dikkate alındığında, Tuber yaşam döngüsünde askuslardaki spor sayısının çeşitli olması, homozigotluğunda popülasyonun sabitlenmesi gibi bir seri anomaliler göz önüne alındığında bazı şüpheler oluşmaktadır [11, 12, 13]. Bu nedenle Tuber üreme sistemi genellikle heterotallik somatogami ile üretilen dikaryotik misel varsayımından farklı olma ihtimali bulunmaktadır. Tuber'in çift çekirdekli dikaryotik hiflerinin kendini dölleme işlemi yoluyla olduğu hipotezi heterozigot yokluğu ile desteklenmektedir [14, 15].

Trüf hiflerinin ve mikorizanın ploidi seviyesi ve eşleşme sistemi hakkında çelişkili hipotezler vardır. Yakın zamanda Paolocci, et al. [16] askusların allelik düzenlemelerini polimorfik mikrosatellitlerle kıyaslamıştır. Bu analizlere göre, yazarlar *T. magnatum*'un türler arası eşleşme özelliği olduğuna ve hayat döngüsünün çoğunlukla haploid olduğuna dair direk delil bulmuşlardır. *Tuber aestivum*, *Tuber melanasporum*, *Tuber magnatum* ve *Tuber borchii* karyotipleri de Tuber sitogenetiği ve üreme döngüsü hakkında daha iyi bilgi edinmek için araştırılmıştır [17, 18]. Türler arası farklılıkları ayırt etmek için birçok trüf moleküler olarak DNA, rRNA diğer Polimeraz Zincir reaksiyonu (PCR) temelli tekniklerle analiz edilmiştir [19-22]. Bugünlerde Tuber türleri için genomik yaklaşım da başlamıştır. *T. borchii* için dizilerin yayınlandığı bir site oluşturulmuştur [23, 24] ve büyük çaplı mikroarray gen ekspresyon analizleri de eklenmektedir.

## 2.BÖLÜM

### GENEL BİLGİLER

#### 2.1.Trüf Mantarları

Trüflerin doğasına dair ilk yayın 1564 yılında yayınlanmıştır [25] ve eski zamanlarda trüfler hakkında çok az bilgi mevcuttur ve yüzlerce trüf türünden (Tablo 2.1) sadece birkaç tür yenilebilir trüf mantarı dünya çapında bilinir. Bunlardan çöl trüfü (Eremiomyces, Kalaharituber, Terfezia ve Tirmania) hala orta doğuda, Kuzey Afrika'da ve Kalahari'de bilinir. Ancak Fransa'nın Périgord siyah trüfü (*Tuber melanosporum*) ve İtalya'nın beyaz trüfü (*Tuber magnatum*) bugünkü trüf dünyasında baskındır.

Bordo trüf (*Tuber aestivum*) mükemmel lezzet kalitesine sahiptir ki bu da Fransa'da kültürüne sebep olmuştur. İklim, toprak yapısı ve birlikte yetiştiği ağaç özellikleri itibariyle daha kolay olduğu için muhtemelen Avrupa'nın en yaygın yenilebilen trüf mantarı türüdür. *Tuber aestivum* Akdeniz kıyılarından başlayarak İsveç'in doğu kıyısı Gotland'a, Atlantik sahillerinden henüz sınırları belli olmayan doğu Avrupa'ya kadar doğal olarak yetişmektedir. Bordo trüf aynı zamanda Çin'den Avrupa'ya ithal edilen trüf paketlerinde de görülmüştür.

Birçok trüf türü, en önemlisi olan *Tuber indicum* da dahil, Çin'de Yi ve Han halkının geleneksel yemeği ve tonik olarak kullanılmaktadır. *Wu-niang teng* (annesini olmayan) gibi yerel isimler erken Avrupalıların da yaşadığı kafa karışıklığını yansıtmaktadır. Genellikle bunlar ve diğer trüf türleri ticarete önemli bir yet tutmazken, Avrupa'ya ithalatı 1990'lı yıllardan beri anlamlı bir şekilde artmaktadır [6].

Tablo 2. 1 Bazı trüf mantarı türleri

|  |
|--|
| Périgord'un siyah trüfü- <i>Tuber melanosporum</i>                       |
| Burgundy ve Yaz Trüfü – ( <i>Tuber aestivum syn Tuber uncinatum</i> )    |
| Kış trüfü – <i>Tuber brumale</i>   |
| Bagnoli trüfü – <i>Tuber mesentericum</i>                                |
| Simsiyah Trüf – <i>Tuber macrosporum</i>                                 |
| İtalyan Beyaz Trüfü – <i>Tuber magnatum</i>                              |
| <i>Tuber borchii syn Tuber albidum</i>                                   |
| <i>Tuber maculatum</i>   |
| <i>Tuber dryophilum</i>  |
| <i>Tuber puberulum</i>   |
| <i>Tuber oligospermum</i>  |
| Kuzey Amerika Trüfleri   |
| Oregon beyaz trüfü – <i>Tuber oregonense ve Tuber gibbosum</i>           |
| Peka trüfü – <i>Tuber lyoniasyn Tuber texense</i>                        |
| Oregon siyah trüfü – <i>Leucangium carthusianum syn Picaocarthusiana</i> |
| Tatlı trüf – <i>Mattiolomyces terfezioides</i>                           |
| Çöl trüfleri – <i>Eremiomyces, Kalaharituber, Terfezia, Tirmania</i>     |
| Asya Trüfleri: <i>Tuber indicum, Tuber pseudoexcavatum,</i>              |
| Yenmeyen ve zehirli trüfler  |
| Yanlış trüfler (False)   |

Diğer trüfler, İtalya'nın bianchetto - beyazımtrak trüfü (*Tuber borchii*) gibi, yerel pazarlarda önemlidir. Sadece İtalya'da Ferrara ve Ravenna civarında gerçek değeri bilinen beyazımtrak trüf, daha pahalı olan *Tuber magnatum*'dan farklı olsa da, gün



geçtikçe mutfakta kredisi artıyor ve gastronomik memnuniyet kazanıyor. ABD’de ve Kanada’da sarımsak-kokulu Oregon beyaz trüfü (*Tuber gibbosum*) Douglas ormanlarında San Fransisco kuzeyinden British Columbia’ya kadar bol miktarda bulunmaktadır. Bu türler bazı Amerikan meraklıları tarafından Avrupalı türlerle eşdeğer tutulmuştur. Bu tür iddialar uzun süreçli olmamıştır ve Périgord siyah trüfü ve İtalyan beyaz trüfü seçkin olarak kalmıştır.

İtalyan beyaz trüfü birincil olarak İtalya’nın kuzeybatısındaki Piedmont, kuzey doğusundaki Emilia-romagna ve Güneydeki Calabria’da toplanmaktadır. Piedmont’ta yer alan Alba *Tuber magnatum* için merkez olarak kabul edilmekte ve 18.yy’dan beri *Tuber magnatum*’un merkezi olarak adlandırılmıştır.

Fransız Périgord siyah trüfü Bordeaux’un güneyinde yer almaktadır. Fransa’da Drôme ve Vaucluse, İtalya’da Umbria ve İspanyanın bir kısmı çok yüksek oranlarda *T. melanasporum* üretimi yapsa da Périgueux, Périgord bölgesinin merkezi ve Dordogne’nin başkenti, siyah trüfün dünyadaki başkenti olarak bilinir.

Piedmont ve Périgord yüzyıllardan beri benzer şekilde festivallere, halk kültürüne, geleneklerine, gizemine ve hilelerine bakıldığında birbirine benzemiştir.

Piedmont toprakları birçok Alp vadilerine sahiptir ve dalga gibi uzanan tepelerle doludur. Bölgenin yapısı ve iklimi trüfün bulunmasını sağlar. Ormanlar meşe, fındık ve ıhlamurdan oluşur ve kalkerli toprak yapısına sahiptir. Sonbaharın sonuna kışın başına doğru sisli ve hafif soğuk sabahlarda trüf avcıları tarafından trüf toplanır. Karakteristik olarak trüf alışverişleri ketumluk, hile ve gizem içerdiği kadar vergiden de muaf tutulmaya çalışılır.

Alba civarında, Langhe bölgesinin başkenti, orman ve otlaklar ormanlardan tepelere kadar neredeyse tamamen şarap üzümleri ve fındıklarla kaplıdır. Üzüm bağlarının muhteşem görüntüleriyle birlikte İtalya’nın en iyi şaraplarına ek olarak da beyaz trüf toplanır [6].

Périgord’un kalkerli platoları ve komşu ili Quercy Périgord siyah trüfü üretimi için uygun yerlerdir. Verimli ırmak vadileriyle birlikte, bölge mağaralar ve doğal kalker barınaklarıyla meşhurdur. Périgord Fransa’nın belki de en eski yerleşim yerlerindedir. İki büyük ırmak, yerleşime uygun mağaralar, Taş devri insanların iklimi ve bizon ve geyikler olarak gıdayı, uygun bulmalarına sebep olmuş olabilir. Yabani hayvanlara ek

olarak, trüf mantarlarını toplayarak duvarları boyalı mağaralarda pişirip yemiş olabilirler.

Ülkemizde çok eski zamanlardan beri trüf olduğu farklı yerel isimlerle bilinmekte ancak ekonomik değerinin farkında olunmamaktadır. Ülkemizde trüflerin ekonomik değeri ve ülkemiz potansiyeli göz önüne alınarak yapılan çalışmalar ancak 2009'da başlamıştır ve henüz istenilen seviyeye gelmemiştir [26].

Trüf mantarının toplanması ve pazarlanması hala geçmişten gelen bazı gizemleri ve entrikaları içermektedir ve insanlar gerçekle efsaneleri birbirine karıştırabilmektedir. Trüflere dünya çapında bir talep vardır ve bu talep karşılanamamaktadır. Bu nedenle de fiyatlar yüksek olmakta, ticari hileleri teşvik etmekte ve neredeyse iki yüzyıldır süren kültür çalışmaları yapılmaktadır [6].

### 2.1.1. Tarihçe

Fransızların geçmiş zamanda yaşanan trüfün nereden geldiği, toplanmasının tahmin edilemezliği ve benzeri nedenlerle *la grande mystique*(büyük gizem) olarak isimlendirdikleri sırların çözümü için bir miktar başarı sağlanmıştır. Bu yazarları, filozofları, araştırmacıları ve bohemlerin ilgisini çok eski zamanlardan beri çekmiştir.

MÖ 1600'lü yıllarda anonim bir tanımlama olarak "dünyanın gizemli ürünleri" olarak adlandırılırsalar da atıf yapılabilinecek ilk tanımlama Aristo'nun öğrencisi yunan filozof Theophrastus (MÖ 370-286) tarafından yapılmıştır. Theophrastus bitkileri genel olarak gözlemlemiştir. Onun bilimsel terminolojisi birçok türü daha önce mevcut olmayan genel gruplara ayırmış ve tohum çimlenmesi ve gelişimi hakkında çok dikkatli gözlemler yapmıştır. Yazdığı *Historia plantarum*'da Theophrastus trüfleri kökü, tohumu, dalı, yaprağı, çiçeği, meyvesi, kabuğu, yumuşak dokusu, lifi, ve damarları olmayan bitkiler olarak tanımlamıştır. Üretimi için ise o zamanlar bazı düşünürlerin inandığı ve 17. yy araştırmacıların da tahmin ettiği:" Bazı insanlar trüfler tohumdan üreyebilir ve ürüyor. Bütün vakalarda deniliyor Mitylenaen kıyılarında hiçbir zaman bulunamadı ancak Tiarae'den bazı tohumlar getirildikten sonra bu bölgeden çok fazla miktarda görülmeye başlandı" notunu kitabına düşmüştür. Modern botanik'in klasik kaynağı olmuş ve farmakolojik metinlere 1600 yıl boyunca öncülük etmiş *De materiamedica* adlı kitapta çalışmalarını toplayan yunan hekim ve eczacı Dioscorides (MS 40-90) , trüflerin yumru kökleri olduğunu düşünüyordu. Eski Yunan ve

Romalılarda 20 çeşit mantar biliniyordu ve “tanrıların yiyeceği” olarak adlandırılıyordu ancak bütün bilinen mantarlara rağmen eski yazarların ilgisini trüfler çekiyordu.

Ortaçağ boyunca bilimsel bir kaynak kitap olarak bilinen *Histori naturalis*'in yazarı Plinythe Elder (MS 23-79) trüflerin kökü olmadan büyümesini: “Her şeyin en mükemmeli herhangi bir şeyin köksüz olarak yaşabileceği gerçeğidir. Bunlar trüfler (tubera) olarak adlandırılırlar; dünyanın her yerinde bulunurlar ve hiçbir lif ya da kök tarafından desteklenmedikleri gibi kabartı ve çatlak oluşturdukları yerde yeryüzüne bağlı değildirler.” Pliny, trüflerin habitatını “Çalılarla çevrilmiş kuru toprak yerleri” olarak tanımlamıştır. İçeriği için de “kabukla çevrilidirler, bütün yeryüzünün kompozisyonu olduğu söylenemez ancak bir çeşit yeryüzü konsantresidir; ayva büyüklüğündedir ve yaklaşık yarım kilo ağırlığındadır. İki çeşidi vardır: bir tanesi kumludur ve dişleri yaralar, bir diğeri hiçbir yabancı madde içermez ve renkleri kırmızı, siyah ya da beyaz olabilir. Çürümeye yatkınlıklarından dolayı oduna benzerler.” Sonunda Pliny bir şekilde şaşırmıştır: “Bunların yeryüzünün bir bozukluğu mu, canlı mı değil mi gibi sorular bence kolaylıkla açıklanamaz.” Doğal tarihi ve üretimi hakkında Pliny: “Acayip insanlar trüflerin sonbahar yağmurları boyunca çoğaldığını ve özellikle şimşeklerin bunların üremesinde ana etken olduğunu ve bir seneden daha fazla dayanamadığını ve en iyi bahar aylarında yenilebildiğine inanıyorlar. Bazıları bunları tohumları olduğunu da düşünüyor.” diye de not etmiştir.

Trüflerin pişirilmesi için bulabilinen en eski tarif bilinen en eski Avrupalı yemek tarifi kitabı olan Roma imparatorluğu döneminde yazılan *Apics de re coquinaria* adlı kitapta bulunmuştur ve 6 farklı tarifte geçmektedir ki şarap ile servis edilmesini ve talaşa saklanmasını tavsiye etmektedir.

Her ne kadar Romalı ve Yunan yazarları ve gastronomları trüfün cezp ettiği hakkında tartışma olmasa da onların bildiği mantarın Périgord'un “siyah elmas”ı değil çöl trüfü olan *Terfezia* olduğu kesindir. Romalılar ve Yunanlar Kuzey Afrika, Türkiye, Ortadoğu, Akdeniz bölgesinin yarı çöllere ait çöl trüfünü biliyorlardı. Tarihsel olarak, pazarlarda Şam, Bağdat, İzmir, Halep, Bakü, Tiflis ve Kudüs'ten gelen trüfler bulunuyordu.

5 ila 12.yy arası Avrupa'da kültür ve öğrenmenin olmadığı karanlık çağlar olarak bilinir. Bu karanlık çağda Avrupa'da hiçbir bilgi eklenmemiştir.

Arkasından 17. yy'a kadar çeşitli doğa bilimciler ve trüf meraklılarının trüf mantarı hakkında köksüz ve tohumuz olduğuna dair düşünceleri devam etti. 1665 yılında İngiliz bilim insanı Robert Hook, tohum varlığından bahsetmiştir ve İngiliz Doğa bilimci Sir Tancred Robinson trüfleri “ lezzetli ve lüks zarif bir parça” olarak atıfta bulunmuştur ancak karanlıkta kaldığını da itiraf ederek: “ Bunlar neyse, ne eskiler nede bugünkü insanlar bizi net bir şekilde bilgilendirebiliyor; kimisi dünyanın nasırı ya da siğili kimisi de yer altı mantarları olarak isimlendiriyorlar.

Profesör Richard Bradley, Cambridge Üniversitesi Botanik bölüm başkanı, *Dictionarium botanicum* (1728)'un ekinde bütün İngiltere'yi gezdiğini ve trüf olmayan çok az orman olduğunu düşündüğünü yazmıştır. Ayrıca “ İngiltere'de bulunan trüfler Fransa ve İtalya'daki türlerden farklıdır ancak yine de yenilmeye layıktır” diye de eklemiştir. Ve ilginçtir ki Bradley, bilinen en eski kültür çalışması eğilimini de sunmuştur: “ İngiltere'nin ormanlarında çok miktarda var, anladığım kadarıyla bu yaz benim yönlendirmemle trüf toplayanların bir kısmı tavsiyelerimi dinlerse onları çoğaltmalarıyla daha da çok bulunacaktır.” 18. yy'da trüflerin üretilebileceği fikri daha da ileri seviyeye çıkmış ve trüflerin bir ağacın altında yetişmek zorunda olduğu neredeyse kesinleşmiştir.

Fransız botanikçi ve hekim Joseph Pierre de Tournefort trüflerin sporlarını gözlemlemiştir ve tarif etmiştir. İlk kez başarılı bir kültür çalışmasının nasıl olabileceğini anlatabilen yine De Tournefort olmuştur. Bu gözlemler Pier Antonio Micheli tarafından da onaylanmıştır ve mikolojinin doğumu olarak kabul edilen 1729 yayını *Nova plantarum genera* 'da sporları tarif etmiştir.

1831'de Vittadini bir düzineden fazla trüfü ‘*Monographia tuberaceum*’ adlı kitabında tanımlamıştır ancak aslında Fransız botanikçi Gaspard A. Chatin'in 1868'deki kitabı trüf hakkında hatalı teorileri bertaraf ederek gerçekleri en iyi gösteren kitap olmuştur. Chatin trüfün kültürünün yapılabilineceğini de belirtmiştir. Trüflerin sporla çoğaldığına, ağaç ile simbiyotik olarak ilişki kurduğuna ve ağaçtan ziyade trüfü sporuyla tanımlayabileceğimize inanıyordu.

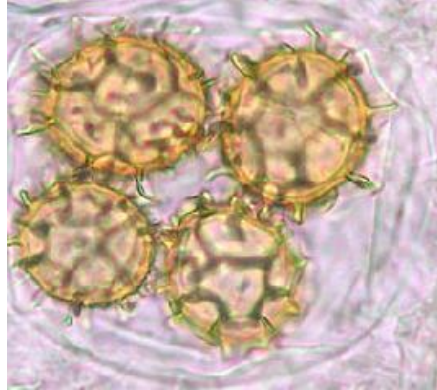
19. yy, tarihte hiç olmadığı kadar besin olarak tüketilen trüf için özellikle Fransa'da altın çağ olarak tanımlanabilir. Fransa'da soyluların arasında trüfün popülerliği arttıkça bu İtalya'ya da yayıldı ve artık krallar tarafından sofralarda aranan bir gıda

haline geldi. Birçok ünlü yemek tarifi kitabında özel tarifleri yayınlanmaya başladı ve 19. yy'ın ortalarında çok rahatlıkla trüfün başucunda tutulduğunu söyleyebiliriz.

### 2.1.2. *Tuber aestivum*

Burgundy trüfünün mükemmel gıda kalitesi vardır. Aroması yoğundur ve fındığı hatırlatan bir tadı vardır. Périgord Siyah trüfünün kullanıldığı tariflerde kullanılmaktadır. Ayrıca İtalya'da şişelenerek ya da tenekeye konularak dünyanın dört bir yanına gönderilmektedir. Kuzey yarım kürede Eylül'den başlayıp ile Aralık sonuna kadar toplanır. Ancak bazen Ocak sonuna kadar da bulunabilmektedir.

Burgundy trüfü göreceli olarak geniş ve askokarları 2 cm ile 10 cm çapında değişmektedir. Peridyum kahverengi ya da siyah olabilir, glebanın içine uzanır ve 5 ile 7 taraflı 3-9 mm genişliğinde boyuna yarıkların olduğu enine de işaretlerin yer aldığı piramidimsi şişlikler vardır. Olgun olduğunda glebası koyu kahverengidir ve havaya maruz kaldığında renk değiştirmeyen beyaz damarlara sahiptir (Şekil 1.1).



Şekil 2. 1. *Tuber aestivum* askosporu [27]

Sporlar düzenli olmayan çokgen eleksi yapıda ortalama 4  $\mu$ m yüksekliğinde retikulum ile çevrilidir. Her bir askusta bir ila 7 sarı-kahverengi sporlar vardır ve yükseklikleri 25-50  $\mu$ m ve 17-38  $\mu$ m'dir (süsler hariç) [6].

Yaz trüfü, adının da gösterdiği gibi Avrupa'da yaz aylarında genellikle Mayıs ile Ağustos arasında toplanmaktadır. Aroması ve tadı Burgundy trüfüyle aynıdır ancak aynı yoğunlukta değildir. Askokarlar büyüklük, şekil ve renk bakımından aynıdır ancak iç rengi fındık rengindedir ve soluktur. Yaz trüfünün şişlikleri daha büyük olmaya

yatkındır ancak çok miktarda çeşitlilikten dolayı teşhis etmede kullanılamaz [6]. Burgundy trüfünden en fazla fark eden morfolojik özelliği zannedilen spor retikulum yüksekliğinin de farklı olmadığı ortaya konmuştur. [28].

Ticari dünyada özellikle Fransa ve İtalya'da Burgundy trüfü yaz trüfünden ayrı tutulmaktadır ve *Tuber uncinatum* olarak etiketlenmektedir ki yaz trüfü de *Tuber aestivum* olarak etiketlenmektedir. Ancak birçok bilim insanı bu iki trüfün birbirinden farklı olmadığına aynı tür olduğuna sadece çevresel koşullardan dolayı farklılık meydana geldiğini ortaya koymuşlardır ve tek bir isim ile isimlendirmeyi önermektedirler: *Tuber aestivum* [6, 28]

*Tuber aestivum* ülkemizde doğal olarak bulunmaktadır [26, 29, 30]. Ülkemizde *Tuber aestivum* ve diğer trüf türleri halk arasında ya hiç bilinmemektedir ya da değeri anlaşılamamaktadır. Genellikle halk arasında keme – domalan gibi isimlerle bilinen yine diğer bir toprak altında yetişen *Terfezia* cinsi mantarlarla karıştırılmaktadır. Bu da ülkemizde ekonomik değerini azalttığı gibi mutfak kültüründe de doğru şekilde kullanılmamasına neden olmaktadır.

Çok az sayıda da olsa trüf mantarının gerçek değerini bilen ve doğal ortamlardan toplayarak yurt içinde ve yurt dışında pazarlayan trüf avcıları mevcut olsa da, bu mantarın ülkemizde iyi bilinmemesi, trüf avcılarının bu mantarı değerinde, doğru yerlere ulaşmasına büyük ölçüde engel olmaktadır. Ayrıca eğitimsiz trüf avcılarının, yanlış zamanda yanlış toplama yöntemleriyle *Tuber aestivum* toplaması doğal olarak bulunan bu mantarın ektomikorizal yapısının zarar görmesi nedeniyle yıldan yıla azalmasına sebep olabilmektedir. Bu nedenle dünyadaki diğer örnekleri gibi doğal olarak bulunan *Tuber aestivum* yerleri ifşa edilmemeli ve mümkünse kanunen de koruma altına alınmalıdır.

## 2.2. Genetik karakterizasyon

Bazen trüfleri olgun olmadıkları ya da sporları olgunlaşmadığı zaman morfolojik özelliklerini veya sporlarını kullanarak tanımlamak zor olmaktadır. Bazı durumlarda da örneğin yasal nedenlerle trüflerin türlerinin tanımlanması spor kontaminasyonu nedeniyle ya da trüf aşılmasını ispatlamak için gerekli olmaktadır. Bu nedenle yüksek teknolojik moleküler metotlar kullanılmaya başlanmıştır. Babalık testi ya da suç mahallindeki bir damla kanla sahibini bulmak için sıklıkla kullanılan bu tekniklere çok

benzemektedir. Bu moleküler teknikler tüm türlerdeki DNA farklılıklarına dayanmaktadır.

Türleri tanımlamak için kullanılan moleküler tekniklerin ilk adımı DNA izolasyonudur. Daha sonra DNA ısıtılarak çift zinciri birbirinden ayrılır ve soğutarak özel bir enzim ve primer adı verilen kısa bir tamamlayıcı zincir kullanarak yeni bir zincir sentezlenmesi sağlanır. Birinci döngü DNA miktarını iki katına, ikincisi dört katına ve üçüncüsü sekiz katına çıkarır ve böyle devam ederek sadece birkaç saat içerisinde çok yüksek miktarda istenilen DNA kısmı çoğaltılmış olur. Bu teknik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) olarak adlandırılmaktadır.

Trüf türlerini tanımlamak için bir yöntem RAPD tekniğidir. Bu teknikte primer kısadır ve dört nükleotidin (adenin, guanin, sitozin ve timin) rastgele sıralanmasıyla oluşturulur. Primer DNA parçalarını çoğaltmak için kullanılır. Bu parçaların agaroz jel üzerinde boyutlarına göre ayrılabilmesini sağlayan iyonik yükleri vardır ve içeriği bu jel üzerinde yürütülür. Buna elektroforez adı verilir ve sonuçta elde edilen motif her tür için parmak izi spesifikliğindedir. RAPD, ilk önce trüfler için seçilen tekniktir çünkü türün, DNA'sının nükleotidleri için hiçbir bilgi gerektirmemektedir. RAPD tekniği çok güçlü bir araç olsa da mikorizal mantarı simbiyotik faz da tespit edemez çünkü kısa primerler rastgele olarak bitkinin DNA'sına bağlanır. Bu kısıtlamayı kaldırmak için mantar için RAPD markır dizilerinden türe özgü primerler tasarlanır.

En güçlü genetik materyal kısımları ribozomal gen grubunda genler arasında bulunan ITS1 ve ITS2 spacerlarıdır. Bu bölgeler genlerin kendisinden daha hızlı evrimleşmektedir ve böylece birçok türü ve alt türün birbirinden farkını ayırt etmekte kullanılabilir. *T. brumale* - *T. melanasporum* ve *T. borchii* – *T. drophilum* gibi bazı tür çiftleri için ITS bölgelerinin uzunluğuna göre birbirinden ayırt edilebilir. Türleri birbirinden ayırt etmek için her türden alınan ITS bölgelerinin nükleotid dizisi de kullanılabilir. Çünkü her trüf türünün farklı ITS dizisi vardır ve türleri sadece ITS dizilerini kıyaslayarak da ayırt edebiliriz. Bu bilgi bilim insanlarına birçok türü tek bir elektroforez jeli üzerinde tanımlayabilecek özgün PCR veya multipleks PCR gibi daha güçlü, daha etkili teknikler geliştirme imkanı sağlamıştır.

Benzer teknikler trüfün nereden geldiğine dair bilgi elde etmek için de kullanılabilir. Örneğin bir trüf İtalya'nın Alba şehrinden toplanmış olsun. Moleküler veriler, bu trüfün

Alba'dan geldiğine emin olmamızı sağlar ve Alba'dan geldiği gerçeğini gösterdiği gibi başka bir ülkeden hatta İtalya'nın başka bir bölgesinden dahi gelmediğini gösterebilmektedir.

DNA'lar arasındaki benzerlikler ve farklılıkları gösteren ve bilim dünyasını hızla değiştiren bu moleküler metotlar, evrim ağaçlarını çizmek için kullanılır ve trüf uzmanları için önemlidir. Trüflerin moleküler tanımlanması için protokoller İtalya orijinli web sitesi [www.truffle.org](http://www.truffle.org) mevcuttur.

### **2.3. ITS Bölgeleri**

ITS (internal transcribed spacer: Transkripsiyonu yapılmayan ara bölgeler) bir öncü transkript üzerinde; fonksiyonel olmayan RNA ile yapısal ribozomal RNA'ların(rRNA) arasında yer alan bölgeleri ifade etmektedir. RNA olgunlaştığında kesilerek çıkartılmaktadır ve bu nedenle DNA üzerindeki bir bölgeyi ifade etmektedir.5'-3' olarak okunduğunda bu polisistronik rRNA öncü transkriptlerinde 5' ETS (external transcribed sequence), 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA ve son olarak 3'ETS bölgeleri yer almaktadır.

RNA olgunlaşması sırasında ETS ve ITS bölgeleri kesilmektedir ve yıkılmaktadır. Ribozomal RNA'yı kodlayan gen ve her birinden binlerce kopya bulunan tekrarlar içeren ara bölgelerin her birinin arasına transkribe olmayan DNA anlamında IGS (interngenic spacer) veya NTS (non-transcribedspacer) terimiyle ifade edilen bölgeler girmektedir [31].

ITS bölgelerinin kullanılmasının bugünlerde özellikle ektomikorizal mantarların tiplendirmesinde morfolojik ve diğer moleküler metotlardan daha hassas ve güçlü olduğu ispatlanmıştır [32]. Diğer gen bölgelerinden daha yüksek derecede çeşitlilik içerdiği bilinen rDNA'nın kendi içinde ITS ve IGS bölgelerinin de çeşitlilik gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle de ITS bölgeleri filogenetik analizler için özellikle mantarlarda tercih edilmektedir. [31]

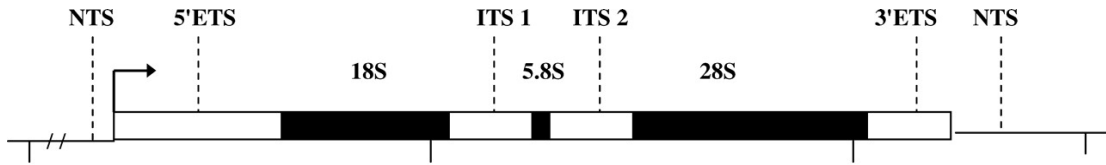
### **2.4. ITS dizileriyle ile Filogenetik Analiz**

1990'lı yılların başından beri ITS rDNA dizi bilgileri ektomikorizal toplulukların kompozisyonunu ve dinamiğini analiz etmekte kullanılmaktadır [33, 34]. Yeni türlerin



keşfi bu trendle birlikte artmış ve dizileme teknolojisinin gelişmesi ile daha da artması beklenmektedir [35]. Ancak ITS dizileriyle BLAST kullanarak tür teşhisi veritabanlarındaki yeterince gönderilmiş dizi olmaması, yanlış etiketleme ve yanlış teşhisler nedeniyle her zaman kolay olmamaktadır [36, 37]. GenBank'a 'tanımlanamamış' dizilerin gönderilmesi oldukça yaygındır. Bu tamamen tanımlanmış dizilerden oldukça farklı olan az tanımlanmış ya da tanımlanamamış diziler için geçerlidir [38]. GenBank'taki tanımlanamamış Tuber dizilerinin sayısı (1 Nisan 2010'da 1924), GenBank'taki iyi tanımlanamamış mikorizal cinsler arasında ilk 10'a girmektedir [39, 40].

Tuber cinsinde bulunan bazı türleri veya varyeteleri birbirinden ayırmak morfolojik karakterlerin birbirine çok benzemesinden dolayı ya da tariflerin



Şekil 2. 2. ITS1 ve ITS2 bölgeleri - rDNA [41].

birbirine benzemesinden dolayı çok zor olabilmektedir. Örneğin *Tuber aestivum* ile *Tuber uncinatum* iki farklı tür olup olmadığı çok uzun yıllar tartışılan ve ancak moleküler filogenetik çalışmalarla sonuca ulaşılan bir sorudur [42, 7]. Her ne var ki halen bu tartışmayı sürdürmeye devam eden araştırmacılar da bulunmaktadır [43]. Yine de filogenetik analizler, morfolojik analizlere göre kesin ve objektif sonuçlar vermektedir. Avrupa'daki tüm *Tuber aestivum* suşlarının filogenetik analizi yapılarak genetik yapısı anlaşılmaya çalışılmaktadır [44].

Organizmaların filogenisi, türlerin belirlenmesi problemiyle sınırlandırılmaktadır. Tuber cinsi için örnek verilirse izozimpolimorfizmine [45, 46] ve RAPD motiflerine [47] dayalı filogenetik analizlerle birçok örnek üzerinde çalışılmışlardır ve bu analizlerin uymayan bazı sonuçları olmuştur. Bu nedenle ITS bölgelerinin filogenetik analizlerde kullanılması öngörülmektedir ve daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [28].

## 3.BÖLÜM

### YÖNTEMLER

#### 3.1 Örnekleme

##### 3.1.1. Arazi çalışmaları ve morfolojik teşhis

157 trüf örneği Denizli'den 4 farklı ilçeden farklı lokasyonlardan toprağın 5-20 cm altından Mayıs-Ağustos 2010 yılları arasında 20 gün arazi yapılarak toplanmıştır. Arazide örneklerin renkli fotoğrafı çekilerek numaralandırılmıştır. ekolojik ve morfolojik özellikleri, ölçüleri, yetiştiği substrat gibi özellikleri arazi bilgi defterine kaydedilmiştir. Terlemeyi önlemek için beyaz pamuk kumaşlı torbanın içine konulmuştur. Dış fırçasıyla suyun altında dikkatlice temizlenmiştir ve gelecekte kullanmak üzere tekrar fotoğraflanmıştır.

Tablo 3. 1. Çalışmada kullanılan örnekler ve lokasyonları

| Kod        | BölgeAdı | Örnekkodu | Kod         | BölgeAdı | Örnekkodu |
|------------|----------|-----------|-------------|----------|-----------|
| <b>T1</b>  | Honaz    | 180610-1  | <b>T52</b>  | Bozkurt  | 050610-7  |
| <b>T8</b>  | Honaz    | 010810-3  | <b>T54</b>  | Bozkurt  | 050610-9  |
| <b>T13</b> | Honaz    | 080810-3  | <b>T56</b>  | Bozkurt  | 060610-2  |
| <b>T16</b> | Honaz    | 040610-3  | <b>T119</b> | Bozkurt  | 100710-1  |
| <b>T23</b> | Honaz    | 040610-4  | <b>T120</b> | Çal      | 300510-1  |
| <b>T26</b> | Honaz    | 040610-7  | <b>T122</b> | Çal      | 300510-3  |
| <b>T30</b> | Honaz    | 040610-11 | <b>T123</b> | Çal      | 310510-1  |
| <b>T32</b> | Honaz    | 040610-13 | <b>T125</b> | Çal      | 310510-3  |
| <b>T34</b> | Honaz    | 050610-1  | <b>T126</b> | Çal      | 310510-4  |
| <b>T35</b> | Honaz    | 050610-2  | <b>T127</b> | Çal      | 010610-1  |
| <b>T36</b> | Honaz    | 050610-3  | <b>T128</b> | Çal      | 010610-2  |
| <b>T44</b> | Bozkurt  | 290510-3  | <b>T129</b> | Çal      | 010610-3  |
| <b>T45</b> | Bozkurt  | 290510-4  | <b>T130</b> | Çal      | 010610-4  |
| <b>T48</b> | Bozkurt  | 050610-3  | <b>T132</b> | Çal      | 010610-6  |
| <b>T50</b> | Bozkurt  | 050610-5  |             |          |           |

Her bir örnek ikiye ayrılarak bir yarısı kurutulmak üzere ayrılırken, diğer yarısı da plastik poşet içine vakumlanarak  $-80^{\circ}\text{C}$  ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Mantarların kurutma işlemleri laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu esnada çabuk bozulabilecek veya kurtlu olan mantarlar kurutma dolabı içinde, sağlam olan mantarlar ise kurutma kâğıtları üzerinde hava sirkülasyonu olan uygun yerlerde bekletilerek kurutulmuştur. Kurutulan örnekler sporları incelenmek üzere LeicaDM2500 model (Almanya) mikroskopta incelenmiştir ve EC3 (Leica, Almanya) kamerasıyla sporlarının fotoğrafı çekilerek LasEZ 7 (Leica, Almanya) yazılımıyla spor boyutları ölçülmüştür. Böylece örnekler morfolojik olarak elde edilen veriler ve mevcut literatürün yardımıyla türler teşhis edilmiştir. Örnekler donmuş durumdayken polistein kutuların içinde etrafı Techni-ice (Avusturalya) ile sarılarak soğuk tutulmuştur ve derin dondurucudan CNR(II Consiglio Nazionale delle Ricerche, İtalya) laboratuvarlarına 24 saat içinde bu durumda taşınmıştır ve  $-80^{\circ}\text{C}$  derin dondurucuda saklanmıştır.

### **3.1.2. Laboratuvar çalışmaları ve moleküler teşhis**

Laboratuvar çalışmaları Bitki Genetiği Enstitüsü'nde (CNR, İtalya) Dr. Francesco Paolucci, Dr. Andrea Rubini, Dr. Claudia Riccioni ve Dr. Aziz Türkoğlu ile birlikte yapılmıştır. 157 örnek lokasyonlarına göre sınıflandırılmıştır ve her lokasyondan 3'ten fazlaysa 3, 3'ten az ise tamamı çalışmaya alınmıştır. Toplam 49 adet örnek çalışma için seçilmiş ancak DNA'sı çalışma için yeterli olacak şekilde izole edilemeyen örnekler çalışmadan çıkarılarak toplam 29 adet örnek ile dizileme yapılarak çalışma tamamlanmıştır.

### **3.2.DNA izolasyonu**

DNA izolasyonu Gardes, M. ve Bruns, T.D. 'nin [48]'ta tarif ettiği gibi yapılmıştır. Bu protokolün safhaları şu şekildedir:

1. Daha önce eppendorf tüpte  $-80^{\circ}\text{C}$  'de saklanan küçük örnek parçaları içinde metalik kürelerin (3mm) olduğu 2 ml'lik eppendorf tüpe konulmuştur.
2. Eppendorf tüpler daha önce  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de soğutulmuş spor içine konulmuş ve ardından mixermill'de (Retchs, Almanya) 15s-2 dk arası 30 titreşim/sn olacak şekilde örneğin parçalanma oranına göre sallanmıştır.

3. Önceden ısıtılmış (65°C) CTAB 2x tampon solüsyonundan(100mM Tris-HClpH 8, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8 ve 2% CTAB – otoklavlanır) + 0.2% v/v  $\beta$ -mercaptoethanol ) 500 ul eklenmiştir.
4. Örnekler 65°C'ye su banyosunda 15 dk bekletilmiş ve düzenli olarak ters yüz edilmiştir.
5. Aynı hacimde kloroform:isoamilik alkol (24:1, v/v) eklenmiştir.
6. Bir kaç dakika örnekler ters yüz edilmiş (5'e kadar) ve en yüksek hızda(14000 rpm) 5 dk santrifüjde çevrilmiştir.
7. Üst faz alınmış ve yeni 2 ml Eppendorf tüpe aktarılmıştır.
8. 6,7 ve 8. adımlar tekrarlanmıştır.
9. 0.7 hacim Ispropanol nükleik asidin çökmesi için eklenmiş ve -20°C'de en az 1 saat beklenmiştir.
10. En yüksek hızda(14000 rpm) 20 dk santrifüjde çevrilir mümkünse soğutmalı santrifüj (4°C) kullanılmıştır.
11. Süpernatant yavaşça alınarak eppendorflar ters çevrilerek kağıt üzerinde kurutulmuştur.
12. Pellet 500  $\mu$ l TE tamponu 10:1 (TrisHCl 10mM ph 8, 1mM EDTA pH 8) ile çözülmüştür.
13. RNAaz muamelesi: 10 $\mu$ l RNAaz solüsyonu (10mg/ml) eklenmiş ve 2 saat 37°C'de bekletilmiştir.
14. Fenol ekstraksiyonu: 1/10 hacim 1M TrisHClpH 7.5 ve eşit hacimde fenol:kloroform:isoamilik alkol (25:24:1, v/v/v) ve 10 sn vortekslenmiştir.
15. Örnekler 14.000 rpm'de 5 dk santrifüjde çevrilmiştir.
16. Supernatant alınmış (arafaz alınmadan) ve yeni Eppendorf tüpe transfer edilmiştir.
17. 1/10 hacim 3M NaOAc pH5.2 ve 2 hacim absolüt (%100) Etanol nükleik asidi çöktürmek için eklenmiştir.
18. -20°C veya daha iyisi -80°C'de 1 saat bekletilmiştir.

19. En yüksek hızda(14000 rpm) 20 dk santrifüjde çevrilir mümkünse soğutmalı santrifüj (4°C) kullanılmıştır.
20. Pellete dokunmadan (pellet görünmeyebilir) süpernatant uzaklaştırılmıştır.
21. 200 µl veya daha fazla %70'lik etanol ile tuzu yıkamak için eklenmiştir.
22. En yüksek hızda(14000rpm) 10 dk santrifüjde çevrilmiş mümkünse soğutmalı santrifüj (4°C) kullanılmıştır.
23. Örnek kurutulmuştur (hava ya da vakum ile).
24. Steril distile su eklenmiştir (50µl'ye kadar).
25. DNA kalitesi ve miktarı %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir.

Elde edilen DNA -20°C saklanmıştır.

### 3.3. PCR

*Tuber aestivum* örnekleri için White et al. [52]' un ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonu Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) ile gerçekleştirilmiş olup bütün örnekler için PCR koşulları da şu şekildedir: başlangıç safhası olan denaturasyon 94°C'de 2 buçuk dakikadır. Yüksek kalitede elde edilen DNA'lar için 35 döngü 94°C'de 20 sn, 63°C'de 15 sn, 72°C'de 45 sn aşamalarından oluşmaktadır. Son uzama aşaması ise 72°C, 7dakikadır. Düşük kalitede elde edilen DNA'lar için 50 döngü 94°C'de 20 sn, 55°C'de 15 sn, 72°C'de 45 sn aşamalarından oluşmaktadır. Son uzama aşaması ise 72°C , 7dakikadır.

PCR mastermiks karışımı ise yüksek kalitede DNA için 3 µl DNA, 2.5 µl 10x PCR tamponu (1.5 mM MgCl<sub>2</sub> içerir), dNTP 0.5 µl, ITS 1 ve ITS 4 primerleri 1 µl, MgCl<sub>2</sub> 1.3 µl, DMSO 2.5 µl, Taq enzimi 0.5 µl, H<sub>2</sub>O 12.7 olmak üzere toplam 25 µl hazırlanmıştır. Düşük kalitede DNA için ise 1 µl DNA, 2.5 µl Taq tamponu (1.5 mM MgCl<sub>2</sub> içerir), dNTP 0.5 µl, ITS 1 ve ITS 4 primerleri 1 µl, MgCl<sub>2</sub> 1.3 µl, DMSO 2.5 µl, daha kaliteli Taq enzimi 0.5 µl, BSA 2.5 µl, H<sub>2</sub>O 12.2µl olmak üzere toplam 25 µl hazırlanmıştır.

### 3.4. Dizi Analizi

*T. aestivum* dizi analizleri her örnek için ITS1 ve ITS4 primerleri ayrı ayrı kullanılarak iki kere gerçekleştirilmiştir. Dizileme PCR reaksiyonları GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) ile gerçekleştirilmiş olup bütün örnekler için PCR koşulları şu şekildedir: başlangıç safhası olan denaturasyon 96°C’de 1 dakikadır. 25 döngü 96°C’de 10 sn, 50°C’de 5 sn, 60°C’de 4 dakika aşamalarından oluşmaktadır. Son uzama aşaması ise yoktur.

PCR master miks karışımı ise 0.5µl DNA, 1.8 µl 5x PCR tamponu, 0,25 µl Big Dye, ITS1 veya ITS 4 primeri 0.8 µl, 1 µl DMSO, 5,65 µl H<sub>2</sub>O olmak üzere toplam 10 µl hazırlanmıştır.

Dizileme için presipitasyon işlemi 96 kuyulu reaksiyon plate’leri termal cycler’dan alındıktan sonra santrifüjle kısaca çevrilerek başlanmıştır. Her kuyuya 1 µl 3 M sodyum asetat eklenmiştir. Bunu takiben 25 µl %100 etanol eklenmiştir. Plate, üstü kapatılarak 4 defa ters yüz edilmiştir. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4°C’ye soğutulmuş santrifüjde 45 dakika 1650g’de (3100 rpm) çevrilmiştir. Plate ters çevrilerek santrifüjde 185 g’de (1000 rpm) 1 dakika döndürülmüştür. Daha sonra her kuyuya %70’lik 35 µl etanol eklenmiştir. 4°C’de 1650g’de 15 dakika çevrilmiştir. Tekrar platerler ters çevrilerek 185g’de 1 dakika döndürülmüştür ve kurumaya bırakılmıştır. Bu sırada plate ışıktan korunmuştur.

Dizileme reaksiyonları 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) ile gerçekleştirilmiştir.

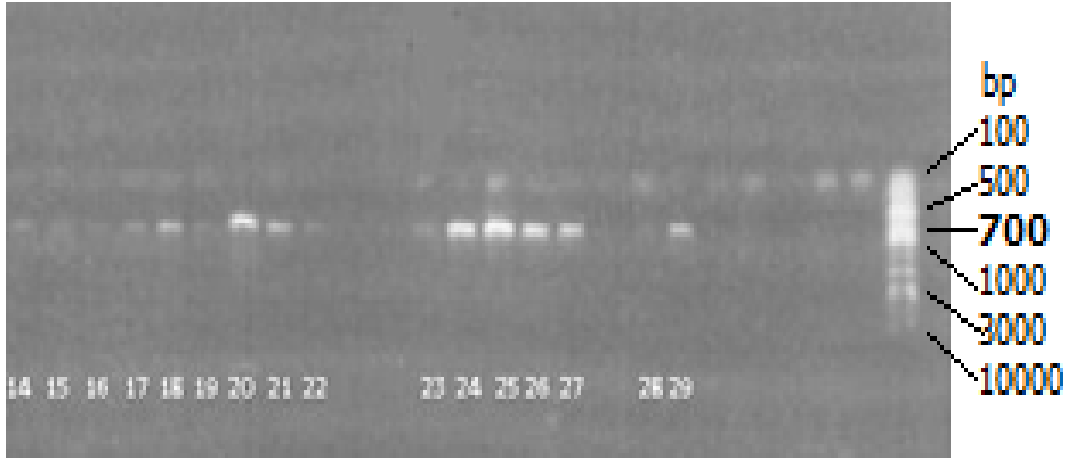
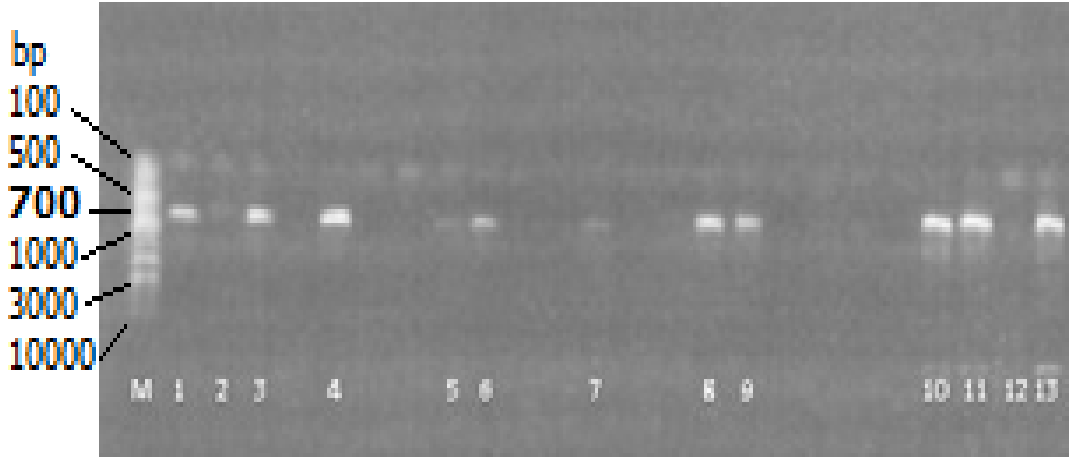
### 3.5. Filogenetik Analiz

Elde edilen diziler Bioedit (v7.0.9, ABD) programı [49] (clustalW algoritmalı) ile karşılaştırılmış ve filogenetik ilişki Neighbour Joining ve UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) metotları kullanılarak Mega 5.05 [50] yazılımı ile (Mac Os X v10.6.6 (Apple, USA) sistemi üzerinde yapılmıştır.

## 4.BÖLÜM

### BULGULAR

#### 4.1. PCR sonuçları



Şekil 4. 1. DNA'sı elde edilen trüf örneklerinden ITS bölgesi PCR ile çoğaltılabilen örnekler. PCR sonucu başarılı olan örnekler numaralandırılmıştır.

DNA örneklerinin ITS bölgeleri çoğaltılmıştır ve ITS bölgesi PCR ile elde edilebilen örneklerde dizi analizi yapılmıştır. Şekil 4. 1’de bazı örneklerin ITS bölgelerinin çoğaltılmadığı bazılarının ise elde edildiği görülmektedir. Görünen düşük DNA kalitesindeki örneklerde ise yöntemlerde anlatıldığı gibi tekrar PCR uygulanarak dizi analizi yapılmıştır. Şekil üzerindeki numaralar ’deki sıralamaya uygundur.

Markır (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, ABD) 100-10000 baz çifti aralığını göstermektedir ve PCR ürünlerinin büyüklüğü şekil 5’te görüldüğü gibi yaklaşık 700 baz çiftidir.

#### 4.2. Dizi analizleri

Her bir örnek ileri ve geri primer kullanılarak dizilenmiş ve konsensüs dizi bulunarak BioEdit (v7.0.9, ABD) programında hizalanmıştır.

Toplam 29 adet ITS bölgesi dizilenmiş ve Bioedit programındaki hizalamasına göre en uzun dizi 660 baz çifti uzunluğunda bulunmuş, en kısası ise 480 baz çifti olarak bulunmuştur. GenBank’taki *Tuber* cinsine ait ITS bölgesi dizilerinin uzunluklarıyla kıyaslandığında bu aralıktaki uzunlukta diziler normaldir.

Dizilerin hizalanması sonucu birbirlerine çok yüksek oranda benzer olduğu görülmüştür. Bu benzerlik filogenetik ağaçlarda da gözlenebilmektedir (

Şekil 4. 2 ve Şekil 4. 3.).

#### 4.3. Filogenetik analizler

Denizli’den toplanan *Tuber aestivum* türüne ait 29 adet örnek, 1 adet yine Denizli’den toplanan *Tuber rufum* türüne ait 1 örnek, İtalya’da daha önce toplanmış ve GenBank’a gönderilmiş 21 adet örnek MEGA 5 programı kullanılarak neighbour joining (

Şekil 4. 2) ve UPGMA (Şekil 4. 3) metotlarına göre dizilerin filogenetik ağacı çıkarılmıştır. ‘t’ ile başlayan örnek isimleri Denizli’den toplanan örnekleri, ‘gi’ ile başlayan kod ise İtalyan örneklerin Genbank’taki kodlarını göstermektedir.

Filogenetik ağaçlara göre Denizli’nin *T. aestivum* örnekleri, İtalyan örneklerden tamamiyle ayrılmamış ancak yine de bir miktar İtalyan ve Denizli örnekleri kendi içinde



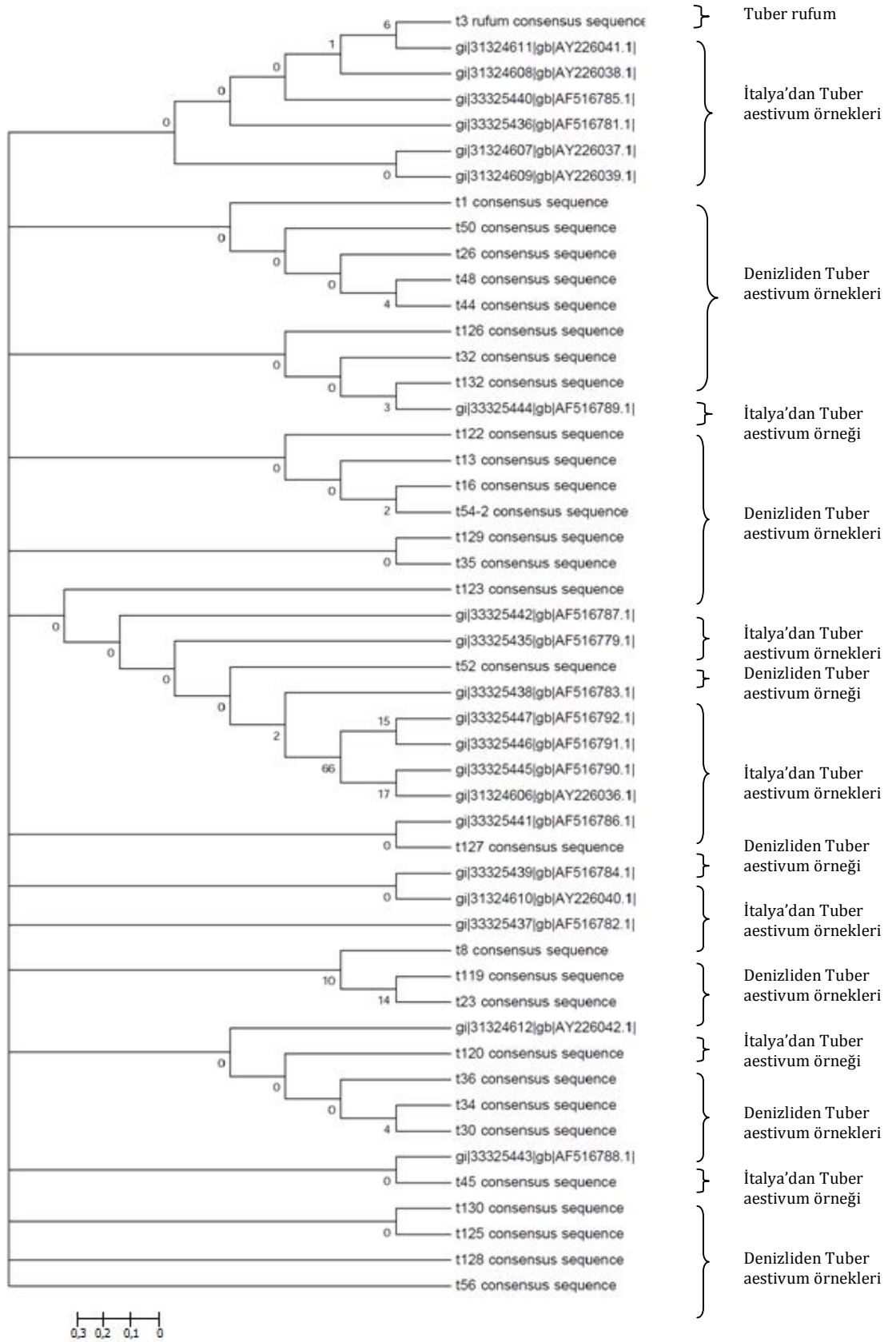
gruplandırma göstermiştir. Filogenetik ağaçlarla birlikte genetik uzaklık değerleri de belirlenmiş ve filogenetik ağaç üzerinde gösterilmiştir.

Şekil 4.2’de görüldüğü üzere *T. rufum* örneği en uç kolda yer almaktadır ve kol içinde genetik uzaklığı en fazla olandır. En üstte yer alan ilk kol *T. rufum* örneğiyle birlikte tamamen İtalyan örneklerinden oluşmuştur ve uzaklıkları neredeyse hiç yoktur. İkinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci kol bir tek İtalyan örneği hariç tamamen Denizli örneklerinden oluşmuştur.

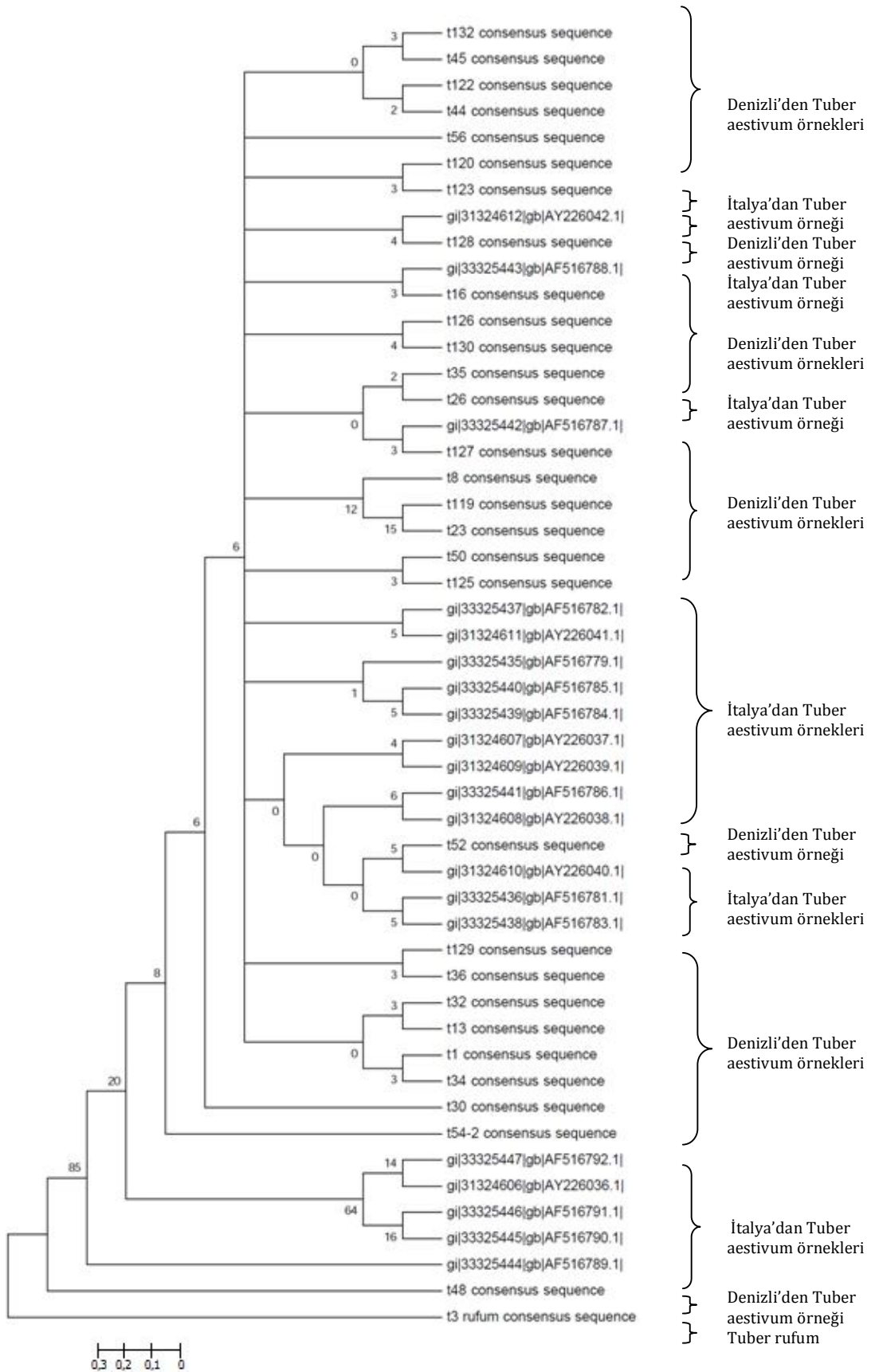
Bu kollardaki Denizli örnekleri toplandığı bölgeler göz önüne alındığında bölgelere göre ayrılmamış ve karışık bir şekilde kollara dağılmıştır.

Bir sonraki kolda ise t123 ilk kolu oluşturmuş, diğer kol da ikiye ayrılarak ilk kolda İtalyan örnek yer almıştır. Diğer kol da ikiye ayrılarak yine İtalyan örnek yer almıştır. Diğer kol da ikiye ayrılmıştır ve ilk kolda t52 örneği yer almaktadır. Diğer kolda ise tamamen İtalyan örnekler yer almıştır ve kollara ayrıldıkça uzaklıkları da çok miktarda artmaktadır. Yedinci ana kolda t127 ve İtalyan örnek yer almaktadır ve uzaklıkları yok gibi gözükmektedir. Sekizinci ve Dokuzuncu ana kolda İtalyan örnekleri yer almaktadır ve bu örneklerin de uzaklıkları fazla gözükmektedir. Onuncu ana kolda Honaz’dan toplanan t8, t23 ve Bozkurttan toplanan t119 yer almaktadır ve t119 ile t23’ün genetik uzaklığı fazladır.

Şekil 4.3’de görüleceği üzere *Tuber rufum* örneği ile diğer *T. aestivum* örnekleri iki farklı kol oluşturmuştur. Daha sonra t48 ayrı bir kol oluşturarak diğer örneklerden ayrılmıştır. Daha sonra İtalyan örneklerinden biri ayrı bir kol oluşturmaktadır ve t48’den genetik uzaklığı fazladır. Daha sonra 4 adet İtalyan örneğinin ayrı bir kol oluşturduğunu görülmektedir. Diğer kol da ikiye ayrılarak bir kolu t54 olmuştur ve bu aşamayla birlikte genetik uzaklıklar bir önceki kollara göre daha düşüktür. Daha sonra t30 ayrı iyi ayrı koldan birini oluşturmuştur. Diğer kol ise 14 kola bölünmüştür. İlk iki kolda Denizli’nin örnekleri olan t34, t1, t13, t32, t36 ve t129’u görmekteyiz. Bu örneklerden t129 hariç hepsi Honaz bölgesinden toplanan örneklerdendir. t129 ise Çal bölgesinden toplanmıştır.



Şekil 4. 2. Neighbour Joining metoduna göre dizilerin filogenetik ağacı



Şekil 4. 3. UPGMA metoduna göre oluşturulan dizilerin filogenetik ağacı

Daha sonra meydana gelen 3 kolun tamamen İtalya'dan toplanan örnekler olduğu görülmektedir.. Sonraki 9 koldaki 22 örneğin 19'unun Denizli örneği olduğu görülmektedir. Bu kollardaki Denizli örneklerinin toplandıkları bölgelere göre gruplanmadığı ve karışık bir şekilde kollara dağıldığını görülmektedir. Genetik uzaklık açısından da bu kollarda en uzak örneklerin t119 ve t23 olduğu görülmektedir ve bu sonuç da neighbour joining metoduna göre oluşturulan filogenetik ağaçla da benzerlik oluşturmaktadır.

## 5. BÖLÜM

### TARTIŞMA; SONUÇ VE ÖNERİLER

*T. aestivum* türlerine ait morfolojik verilere göre morfolojik olarak yaz trüfü olarak bilinen morfotipinden toplandığı belirlenmiştir. Askokarpları 2-10 cm genişliğinde ölçülmüştür. Trüflerin etrafında 5 ila 7 taraflı 3-9 mm genişliğinde boyuna yarıkların olduğu enine de işaretlerin yer aldığı piramidimsi şişlikler gözlenmiştir. Glebanın rengi fındık renginde olduğu belirlenmiştir. Sporların boyutu 25-50 µm ve 17-38 µm olarak belirlenen aralığa (süsler hariç) uyduğu tespit edilmiştir. Askosporlarda 1-7 spor sayılmış ve retikulum yüksekliği de yaklaşık 4 µm olarak ölçülmüştür. Kokusunun, haşlanmış mısır kokusunda olduğu rapor edilmiştir.

Bu bilgiler ışığında bu tezde çalışılan trüf mantarları *Tuber aestivum* olarak teşhis edilmiştir ve moleküler aşamaya geçilmiştir.

*T. aestivum* türlerine ait ITS bölgeleri çoğaltılmış, 700 baz çifti uzunluğunda olduğu tespit edilmiş ve dizilenmiştir. Dizilerin hizalandırılması sonrası, konsensüs dizi ortalama 550-650 baz çifti olarak bulunmuştur. Hizalandırma filogenetik ağaç için çok önemlidir.

Filogenetik analiz’de neighbour joining metoduna göre (

Şekil 4. 2) ve UPGMA (Şekil 4. 3) metoduna göre MEGA 5 [50] programında yapılmıştır. Her iki metot ile oluşan filogenetik ağaçlar bize göstermektedir ki Denizli’de bulunan *Tuber aestivum* suşları özel bir gruplanma göstermemektedir ancak İtalya’daki *Tuber aestivum* suşlarından da genel olarak ayrılmaktadırlar.

Bu çalışmada kullanılan ve İtalya’dan toplanan *T. aestivum* örneklerinin çalışıldığı yayına göre [42] filogenetik ağaç benzerlik göstermektedir. Çalışmada morfotip olan yaz trüfü ve burgundy trüfü ITS bölgeleri kıyaslanmış ve aralarında tür

olabilecek farklılığın gözlenmediği rapor edilmiştir. Bu çalışmada İtalya'dan gelen örneklerde her iki morfotipten de ITS dizisi aynı şekilde karışık olarak yer almış ve bu çalışmada hepsi yaz trüfü olarak belirlenen örneklerin ITS bölgelerinden de ayrışmaması neticesinde çalışmada belirtilen yaz trüfü ve burgundy trüfü aynı tür olduğu tezini de oluşturulan filogenetik ağaçlar desteklemiştir.

Pacioni et al. [14] Fransa'da yapmış oldukları çalışmada *Tuber aestivum* örnekleri için her bir simbiyotik ağaçta farklı bir genetik allel olabileceğini öne sürmüşler ve bulgularında da çok az durumda buna dair işaretler gördüklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarında bu hipotezi destekleyen bir işaret bulunmamaktadır.

Urban [44] yapmış olduğu çalışmada tüm Avrupa'daki *Tuber aestivum* örneklerini filogenetik analize tabi tutmuş ve coğrafi olarak bir gruplaşma olduğunu ancak tamamen coğrafyaya bağlı bir dağılım gözükmediğini bildirmiştir. Bu çalışmanın sonuçları çok küçük bir alanda yapılmış olsa da bu sonucu destekler mahiyettedir.

Bonito et al. [39] yapmış oldukları çalışmada tüm *Tuber* cinsi trüflerin filogenetik analizini yapmışlar ve ortalama olarak tüm türlerin ITS bölgelerinin kendi içinde ortalama %1-3 arasında farklılık gösterdiğini ancak *Tuber aestivum* için bu farklılığın %3.7 olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgu aynı zamanda Weden ve arkadaşlarının [28] bulgularına paraleldir. Bu çalışmada kullanılan *Tuber aestivum* örneklerinin dizilerinin farklılığı bu sonuçları destekler mahiyettedir. Ayrıca çalışmada *Tuber aestivum*'a ait en uzun ITS bölgesi 653 olarak tespit edilmişken bu tezdeki en uzun ITS bölgesine sahip *Tuber aestivum* dizisi 660 olarak bulunmuştur.

Neighbour joining metoduna göre oluşturulan filogenetik ağaçta genellikle genetik uzaklık sıfır olarak ortaya çıkmış, ancak 66'ya kadar bootstrap değeri filogenetik ağaçta belirlenmiştir. UPGMA metoduyla oluşturulan filogenetik ağaçta ise genetik uzaklık açısından en uzak olanın *Tuber rufum* örneği olduğu görülmektedir. t48 ve 5 adet İtalyan örneğin bütün örneklerden uzak olduğu ve diğer örneklerin de genetik olarak çok uzak olmadığı görülmektedir. t48 bozkurttan toplanmış ve aynı gün yakın yerlerden farklı örnekler de toplanmıştır ancak genetik uzaklığının fazla olması dikkate değer bir durumdur. Daha fazla lokasyondan ülke genelinde yapılacak olan bir filogenetik ağaç ve genetik uzaklık çalışmasında bu örneğin de dâhil edilmesiyle bu durum hakkında daha aydınlatıcı bir sonuca ulaşmamız mümkün olabilecektir. Ancak neighbour joining

metodunda t48'in diğer Denizli örneklerinden ayrılmamış olması da göz önünde bulundurulmalıdır.

ITS bölgelerinin dizilerinin analiziyle yapılan filogenetik ağaç ile Türkiye'de bulunan *Tuber aestivum* suşlarının ve Avrupa suşlarının akrabalıklarının tanımlanması sağlanmıştır. Trüf türlerinin ve *Tuber aestivum*'un akrabalık ilişkileri dünya ve Avrupa çapında çalışılmış olmasına rağmen bu çalışmalarda Türkiye'nin trüfleri dahil edilmemiştir. Ayrıca ülkemizde de trüf türleri ve *Tuber aestivum*'un filogenetik analizi daha önce yapılmamıştır. Bu çalışmada Denizlinin Trüf türlerinin filogenetik analizi yapılmış olup, diğer il ve bölgelerin de kapsama alınmasıyla birlikte oluşturulacak Türkiye'nin trüflerinin filogenetik analizinin önemli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca ülkemizin trüf türlerinin Asya ve Avrupa'daki türlerle akrabalık ilişkilerinin tanımlanması trüfün tarihi olarak göç yollarının ortaya çıkarılmasına yardımcı olacaktır. Bu ve benzeri çalışmalar da bunun temelini oluşturacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Saga of French delicacies Wines Travel <http://www.wines-travel.com/wp/wp-content/uploads/2010/10/Tuber-aestivum-Vittadini.jpg> , Mayıs 2011.
2. Pomarico, M., Figliuolo, G. ve Rana, G. L.Tuber spp. biodiversity in one of the southernmost European distribution areas., *Biodivers Conserv*, 16, 3447-3461, 2007.
3. Pacioni, G ve Comandini, O. Tuber. [yazan] JWG Cairney ve SM. Chambers. *Ectomycorrhizal fungi. Key genera in profile*. Berlin Heidelberg : Springer, , 163–186. 6,1999.
4. Poma, Anna, Limongi, Tania ve Pacioni, Giovanni. Current state and perspectives of truffle genetics and sustainable biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72, 437-441, Mart, 2006.
5. Ericsson, L. Cultivation of the Burgundy truffle in Sweden. Uppsala : Department of Forest Mycology and Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences, 2001.
6. Hall, Ian R.; Brown, G.; Zambonelli, A. *Taming the Truffle: The History, Lore, and Science of the Ultimate Mushroom* Portland Timber Press,2007.
7. Wedén, C., et al. The population of the hypogeous fungus *Tuber aestivum* syn. *T. uncinatum* on the island of Gotland. *Mycorrhiza*, 14, 19-23, 2004.
8. Ragnelli, AM, et al. Truffle melanogenesis: correlation with reproductive differentiation and ascocarp ripening. *Pigment Cell Res*, 5, 205-212,1992.
9. Pacioni, G, Ragnelli, AM ve Miranda, M. Truffle development and interactions with the biotic environment. Molecular aspects. [yazan] P. Bonfante and M. Nuti V. Stocchi. *Biotechnology of Ectomycorrhizae. Molecular Approaches*. New York : Plenum Press, 213-227, 1995.
10. Lanfranco, L, et al. Truffles, their life cycle and molecular characterization. [yazan] Bonfante P, Nuti M Stocchi V. *Biotechnology of ectomycorrhizae. Molecular approaches*. New York : Plenum Press, 139-150, 1995.
11. Greis, H. Acusentwicklung von *Tuber aestivum* und *Tuber brumale*. *Z Bot*, 34, 129, 1939.



12. Marchisio, V. Sulla cariologia degli aschi e delle spore di *Tuber maculatum* Vitt. *Allionia*, 10, 105-113, 1964.
13. Parguey-Leduc, A, Janex-Favre, M ve Montant, C. Formation et evolution des ascospores de *Tuber melanosporum* (truffe noire du Perigord, *Discomycetes*). *Can J Bot*, 65, 1491-1503, 1987.
14. Pacioni, G, et al. Genetics of a *Tuber aestivum* population. *Mycotaxon*, 47, 93-100, 1993.
15. Urbanelli, S, et al. Identification of *Tuber mycorrhizae* using multilocus electrophoresis. *Mycologia*, 90, 389-395, 1998.
16. Paolocci, F, et al. Reevaluation of the life cycle of *Tuber magnatum*. *Appl Environ Microbiol*, 72, 2390-2393, 2006.
17. Poma, A, et al. Ploidy and chromosomal number in *Tuber aestivum*. *FEMS Microbio Lett*, 167, 101-105, 1998.
18. Poma, A, et al. The karyotypes of three *Tuber* species (*Pezizales*, *Ascomycota*). *Caryologia*, 55, 307-313, 2002.
19. Lanfranco, L., et al. DNA probes for identification of the ectomycorrhizal fungus *Tuber magnatum* Pico. *FEMS Microbiol Lett*, 114, 245-252, 1993.
20. Lazzari, B., Gianazza, E. ve Viotti, A. Molecular characterization of some truffle species. [yazan] Bonfante P, Nuti M Stocchi V. *Biotechnology of ectomycorrhizae. Molecular approaches*. New York : Plenum Press, 139-150, 1995.
21. O'Donnell, K, et al. Phylogenetic relationships among ascomycetous truffles and the true and false morels inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. *Mycologia*, 89, 1-23, 1997.
22. Bertini, L, et al. Molecular markers for the identification of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii*. *New Phytol*, 56, 433-455, 1998.
23. [Çevrimiçi] [Alıntı Tarihi: 1 Nisan 2011.] <http://mycor.nancy.inra.fr/ectomycorrhizadb>.
24. [Çevrimiçi] [Alıntı Tarihi: 25 Nisan 2011.] <http://linuxbox.itb.cnr.it/estuber/>.
25. Ciccarelli, A. *Opusculum de Tuberibus*. Pavia : 1564.

26. Türkoğlu, A. ve Kuyumcu, S. Initial studies of *Tuber aestivum* in Turkey. Juva : Juva Truf Center. Second congress of the *Tuber aestivum* / *uncinatum* European Scientific Group. 21, 2010.
27. [Çevrimiçi] [Alıntı Tarihi: 30 Mayıs 2011.]  
<http://www.trufamania.com/Tuber%20aestivum%20English.htm>.
28. Wedén, C, Danell, E ve Tibell, L. Species recognition in the truffle genus *Tuber*: the synonyms *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*. *Environ Microbiol*, 7, 1535-1546, Ekim, 2005.
29. Gardes, M. ve Bruns, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol*, 2, 113-118, 1993.
30. CM, Sesli E & Denchev. Checklist of the Myxomycetes, Larger Ascomycetes, and Larger Basidiomycetes in Turkey, 95: *Mycotaxon*, 106, 68, 2008.
31. Solak MH, Işıloğlu M, Kalmış E & Allı H. Macrofungi of Turkey Checklist. İzmir : Üniversiteliler Ofset, 2007.
32. Paolocci, F., et al. Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber* spp. ectomycorrhizae. *Fems Microbiol Ecol*, 28, 23-30, Ocak, 1999.
33. Gardes, M, et al. Identification of Indigeneous and Introduced Symbiotic Fungi in Ectomycorrhizae by Amplification of Nuclear and Mitechondrial Ribosomal DNA. *Canadian J of Bot*, 69, 180-190, 1991.
34. Horton, TR ve Bruns, TD. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking in to the black box. *Molecular Ecology*, 10, 1885-1871, 2001.
35. Hibbet, DS, Ohman, A. ve Kirk, PM. Fungal ecology catches fire. *New Phytologist*, 184, 279-282, 2009.
36. Trappe, JM. The ways of herbaria: a cautionary note for users of herbarium collections. *Inoculum*, 55, 3-4, 2004.

37. Iotti, M, Amicucci, A ve Bonito, G. Selection of a set of spesific primers for the identification of *Tuber rufum*: a truffle species with high genetic variability . FEMS Microbiology Letters, 277, 223-231, 2007.
38. Nilsson, RH, et al. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases - a fungal perspective . PLoS ONE, 1, e59, 2006.
39. Bonito, GM, et al. A global meta-analysis of *Tuber* ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal. Molecular Ecology, 19, 4994-5008, 2010.
40. Ryberg, M, et al. Mining metadata from unidentified ITS sequences in GenBank: a case study in *Inocybe* (Basidiomycota). BMC Evolutionary Biology, 8, 50,2008.
41. Romanova, L., et al. High Resolution Mapping of Ribosomal DNA in Early Mouse Embryos by Fluorescence In Situ Hybridization. Biology of Reproduction, 74, 807-815,2006.
42. Paolocci, F., et al. *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*: two morphotypes or two species? FEMS Microbiol Lett, 235, 109-115, 2004.
43. Molinier, V., Gollotte, A. ve Wipf, D. *Tuber uncinatum* Chatin (the Burgundy truffle): Molecular and organoleptic characterization. Juva : Juva Truf Center, Second congress of the *Tuber aestivum* / *uncinatum* European Scientific Group. 43 2010.
44. Urban, A. The genetic diversity of *Tuber aestivum* revisited. Juva : Juva Truf Center, Second congress of the *Tuber aestivum* / *uncinatum* European Scientific Group. 44, 2010.
45. Gandeboeuf, D, et al. Typing *Tuber* ectomycorrhizae by polymerase chain amplification of the internal transcribed spacer of rDNA and the sequence characterized amplified region markers. Can. J. Microbiol., 43, 723-728, 1997.
46. Urbanelli, S., et al. Biochemical systematics of some species in the genus *Tuber*. Mycologia, 90, 537-546, 1998.
47. Gandeboeuf, D., et al. Grouping and identiçcation of (*Tuber*) species using RAPD markers. Can. J. Bot. Rev. Can. Bot., 75, 36-45, 1997.

48. Edwards, K., Jonstone, C ve Thompson, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acid Research*, 19, 1349, 1991.
49. Gouy, M, Guindon, A ve Gascuel, O. SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 221-224, 2010.
50. Tamura, K, et al., MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* , Article in Press, May 2011.
51. Mello, A, Murat, C ve Bonfante, P. Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy. *FEMS Microbiol Lett*, 260, 1-8, 2006.
52. White, T. J., et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. [yazan] MA Innis, et al. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York : Academic Press, Inc. 315-322, 1990.

## ÖZGEÇMİŞ

Süleyman Kuyumcu 1983 yılında Diyarbakır'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Konya'da tamamladı. 2001'de burslu olarak kazandığı Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden 2005 yılında mezun oldu. 2009 yılında Nevşehir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ABD'nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Aynı bölümde yüksek lisansa 2010 yılında başladı. Halen Nevşehir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ABD'nde görevine devam etmektedir.

Adres: Nevşehir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi  
Moleküler Biyoloji ABD  
50300 – NEVŞEHİR  
Telefon: 0 384 2281000 - 1380  
e-posta: [suleyman.kuyumcu@nevsehir.edu.tr](mailto:suleyman.kuyumcu@nevsehir.edu.tr)

