

**BAZI YENİLEBİLİR EKTOMİKORİZAL
MANTAR TÜRLERİNİN KÜLTÜRE
ALINMASI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

BEYHAN KİBAR

DOKTORA TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

T.C
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI YENİLEBİLİR EKTOMİKORİZAL MANTAR TÜRLERİNİN KÜLTÜRE
ALINMASI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

BEYHAN KİBAR

DOKTORA TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

AKADEMİK DANIŞMAN

Doç. Dr. AYSUN PEKŞEN

SAMSUN- 2009

BAZI YENİLEBİLİR EKTOMİKORİZAL MANTAR TÜRLERİNİN KÜLTÜRE ALINMASI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

ÖZ

Bu çalışmada *Lactarius controversus*, *Lactarius pyrogalus* ve *Tricholoma terreum* gibi ektomikorizal mantar türlerinin kültüre alınabilme olanakları araştırılmıştır. Bu amaçla ektomikorizal mantar türlerinin saf kültürlerinin elde edilmesi, en uygun besin ortamlarının saptanması, misel gelişim koşullarının (pH, sıcaklık, C ve N kaynakları) optimizasyonu ve vejetatif inokulumun elde edilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Çalışmada ayrıca fındık (*Corylus avellana*) ile ektomikorizal ilişkisi bulunan *L. pyrogalus* türüne ait değişik inokulumların farklı yöntemlerle fındık fidanlarına inokulasyonu yapılarak fidan gelişimi ve ektomikoriza oluşumu üzerine etkisi belirlenmiştir. Aynı zamanda ektomikorizanın teşhisi ve tanımlanması yapılmıştır. Çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait misel üretim laboratuvarında 2005 ve 2008 yılları arasında yürütülmüştür.

L. controversus, *L. pyrogalus* ve *T. terreum* ektomikorizal mantar türlerinin misel gelişimi için PDA besin ortamının, 25 °C sıcaklığın, 4.5-6.0 pH değerlerinin ve N kaynağı olarak malt ekstrakt, pepton ve maya ekstratın kullanılmasının uygun olduğu belirlenmiştir. En iyi C kaynakları *L. controversus* türü için mannitol, *L. pyrogalus* için mannitol ve glikoz, *T. terreum* türü için de dektroz, ksiloz ve maltoz olarak belirlenmiştir. *L. controversus* türünde torf ortamının, *L. pyrogalus* ve *T. terreum* mantar türlerinde ise torf:vermikülit (1:4) ortamının vejetatif inokulum için en uygun ortamlar oldukları tespit edilmiştir. Farklı inokulasyon yöntemlerinin fidan gelişimi üzerine etkisi önemli bulunmuştur. İnokule edilmeyen fındık fidanları hariç, tüm inokulasyon uygulamalarında ektomikoriza oluşumu saptanmıştır. *L. pyrogalus* mikorizasının turuncu renkli ve basit dallanmış, mikorizal köklerin ise kısa, kalın, yüzeyinin düz, parlak ve fungal örtü ile kaplı olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Ektomikoriza, *Lactarius controversus*, *Lactarius pyrogalus*, *Tricholoma terreum*, misel, optimizasyon, inokulasyon, fındık fidanı

STUDIES ON THE DOMESTICATION OF SOME EDIBLE ECTOMYCORRHIZAL FUNGI

ABSTRACT

In this study, the domestication possibilities of ectomycorrhizal mushroom species such as *Lactarius controversus*, *Lactarius pyrogalus* and *Tricholoma terreum* were investigated. For this aim, some studies have been carried out on the obtaining of the pure mycelium cultures of the ectomycorrhizal mushroom species mentioned above, determination of the most suitable mycelial nutrient media, optimization of the mycelium growth conditions as pH, temperature, C and N sources, and also obtaining of the vegetative inoculum. In addition, the effects of the different *L. pyrogalus* mushroom inoculum, showing ectomycorrhizal association with hazelnut (*Corylus avellana*), on the development of the hazelnut seedling and ectomycorrhiza formation were determined by using different inoculation methods. Ectomycorrhiza were also identified and defined. This study was carried out at the mycelium production laboratory of the Ondokuz Mayıs University, Agricultural Faculty, Department of Horticulture between 2005 and 2008 years in Samsun, Turkey.

It was determined that PDA nutrient media, temperature of 25 °C, pH between 4.5 and 6.0, malt extract, peptone and yeast extract as N source were the best for mycelium growth of *L. controversus*, *L. pyrogalus* and *T. terreum*. The best C sources were determined as mannitol for *L. controversus*, mannitol and glucose for *L. pyrogalus* and dextrose, xylose and maltose for *T. terreum*. The most suitable media for vegetative inoculum were turf in *L. controversus* and turf:vermiculite (1:4) for *L. pyrogalus* and *T. terreum*. The effect of different inoculation methods on seedling growth was found to be significant. Ectomycorrhiza formation was determined in all inoculum application except for non inoculated hazelnut seedlings. It was determined that ectomycorrhiza associated with *L. pyrogalus* was orange in color and had simple branched, short, thick, smooth and brilliant roots and also was covered with fungal sheath.

Key words: Ectomycorrhiza, *Lactarius controversus*, *Lactarius pyrogalus*, *Tricholoma terreum*, mycelium, optimization, inoculation, hazelnut seedling

TEŞEKKÜR

Araştırma konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve yazımı sırasında yakın ilgisi, yönlendirici katkıları ve yardımları için tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Aysun PEKŞEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın yürütülmesi esnasında bilgi ve görüşlerinden faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Sezgin UZUN ve Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ'a çok teşekkür ederim.

Projeye maddi destek sağlayan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonuna, deneme ortamını sağlayan Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne, denemedeki analizlerin yapılmasında yardımcı olan Toprak Bölümü Başkanı ve laboratuvar sorumlusu araştırma görevlilerine, çalışmamın yürütülmesi ve yazımı sırasında yardım ve desteğini gördüğüm tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimin yürütülmesi sırasında her türlü desteğini gördüğüm Doç. Dr. Erkut PEKŞEN'e teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını gördüğüm Araş. Gör. Gökçen YAKUPOĞLU'na teşekkür ederim.

Çalıştığım kurum olan Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ve desteğini gördüğüm tüm mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yaşamımda olduğu kadar tez çalışmam süresince de hep yanımda olan ve her zaman desteğini gördüğüm eşim Araş. Gör. Hakan KİBAR'a gösterdiği sabırlı desteği, yardımı ve anlayışlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tüm aileme, dostlarıma, tezimin yürütülmesi ve yazılması sırasında emeği geçen herkese şükranlarımı sunarım.

Beyhan KİBAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÇİZELGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Ektomikoriza, Ektomikorizal Bitki ve Mantar Türleri	8
2.2. Ektomikorizal Mantarların Saf Kültürlerinin Elde Edilmesi ve Misel Gelişimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar	12
2.3. Ektomikorizal İnokulum Üretimi, İnokulasyon Yöntemleri ve Ektomikorizal Oluşum ile İlgili Yapılan Çalışmalar	18
2.4. Ektomikoriza Teşhisi ve Tanımlanması ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	28
2.5. Ektomikorizanın Bitki Gelişimine Olan Etkisi ile İlgili Yapılan Çalışmalar	31
2.6. Ektomikorizal Mantar Yetiştiriciliği ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	34
3. MATERYAL ve YÖNTEM	38
3.1. Materyal.....	38
3.1.1. Çalışmada Ele Alınan Ektomikorizal Mantar Türlerinin Tanıtımı ve Sistematikteki Yeri	38
3.2. Yöntem.....	41
3.2.1. Mantar Örneklerinin Toplanması	41
3.2.2. Saf Kültürlerin Elde Edilmesi	41
3.2.3. Misel Gelişimi İçin En Uygun Besin Ortamı, pH, Sıcaklık Karbon (C) ve Azot (N) Kaynaklarının Belirlenmesi.....	42
3.2.4. Anastomoz Durumlarının Belirlenmesi.....	44
3.2.5. Ektomikorizal Mantar Türlerinin Yetiştigi Alanlardaki Toprak Özelliklerinin Saptanması	45
3.2.6. Vejetatif İnokulum Elde Edilmesine Yönelik Çalışmalar... ..	45
3.2.7. Farklı İnokulasyon Uygulamaları.....	46
3.2.8. Farklı İnokulasyon Uygulamalarının Bitki Gelişimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi ve Mikorizal Aşılama Etkinliği.....	51
3.2.9. Ektomikoriza Oluşumu, Teşhisi ve Tanımlanması.....	52

3.2.10.	Verilerin Değerlendirilmesi	54
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA	55
4.1.	Mantar Örneklerinin Toplanması	55
4.2.	Saf Kültürlerin Elde Edilmesi	55
4.3.	En Uygun Besin Ortamları, C ve N Kaynaklarının Belirlenmesine Yönelik Çalışmalarda Kullanılan Ortamların Başlangıç pH Değerleri	57
4.4.	Misel Gelişimi İçin En Uygun Besin Ortamı, pH, Sıcaklık, C ve N Kaynaklarının Belirlenmesi	58
4.4.1.	<i>Lactarius controversus</i>	58
4.4.1.1.	Misel Gelişimi İçin Uygun Besin Ortamlarının Belirlenmesi	58
4.4.1.2.	Misel Gelişimi İçin Uygun pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi	61
4.4.1.3.	Misel Gelişimi İçin Uygun C ve N Kaynaklarının Belirlenmesi.....	69
4.4.2.	<i>Lactarius pyrogalus</i>	76
4.4.2.1.	Misel Gelişimi İçin Uygun Besin Ortamlarının Belirlenmesi	76
4.4.2.2.	Misel Gelişimi İçin Uygun pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi	78
4.4.2.3.	Misel Gelişimi İçin Uygun C ve N Kaynaklarının Belirlenmesi	85
4.4.3.	<i>Tricholoma terreum</i>	91
4.4.3.1.	Misel Gelişimi İçin Uygun Besin Ortamlarının Belirlenmesi	91
4.4.3.2.	Misel Gelişimi İçin Uygun pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi	93
4.4.3.3.	Misel Gelişimi İçin Uygun C ve N Kaynaklarının Belirlenmesi	98
4.5.	Anastomoz Durumlarının Belirlenmesi	104
4.6.	Ektomikorizal Mantar Türlerinin Yetiştigi Alanlardaki Toprak Özelliklerinin Saptanması	106
4.7.	Vejetatif İnokulum Elde Edilmesi	106
4.8.	Farklı İnokulasyon Uygulamalarının Ektomikoriza Oluşumu ve Bitki Gelişimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	113
4.8.1.	Farklı İnokulasyon Uygulamalarının Ektomikoriza Oluşumu Üzerine Etkisi.....	113
4.8.2.	Farklı İnokulasyon Uygulamalarının Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi.....	118
4.8.3.	Mikorizal Aşılama Etkinliği	134
4.9.	Ektomikoriza Teşhisi ve Tanımlanması	136
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	143
6.	KAYNAKLAR.....	146
	ÖZGEÇMİŞ.....	164

ÇİZELGELER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 3.1. <i>Lactarius controversus</i> , <i>Lactarius pyrogalus</i> ve <i>Tricholoma terreum</i> 'un sistematikteki yeri	39
Çizelge 3.2. Saf kültür ve misel geliştirme çalışmalarında kullanılan besin ortamları ve içerikleri	42
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan inokulasyon uygulamaları ve özellikleri	48
Çizelge 4.1. Çalışmada ele alınan ektomikorizal mantar türlerinin toplandığı yerler	55
Çizelge 4.2. Saf kültürlerin elde edilmesi ve misel gelişimi için kullanılan besin ortamlarının pH değerleri	58
Çizelge 4.3. Farklı C ve N kaynaklarından hazırlanan MMN besin ortamının pH değerleri	58
Çizelge 4.4. Farklı besin ortamlarının <i>L. controversus</i> türünün misel gelişim hızı, misel gelişim süresi ve misel gelişim alanı üzerine etkisi	59
Çizelge 4.5. <i>L. controversus</i> türünün farklı besin ortamı, sıcaklık ve pH derecelerindeki misel gelişim süresi, misel gelişim hızı ve misel gelişim alanlarına ait ortalamalar.....	63
Çizelge 4.6. <i>L. controversus</i> türünün misel gelişim süresi, misel gelişim hızı ve misel gelişim alanına ait pH x sıcaklık interaksiyon ortalamaları	65
Çizelge 4.7. <i>L. controversus</i> türünde C kaynaklarının misel gelişim hızı, misel gelişim alanı ve misel yapısı üzerine etkileri ..	69
Çizelge 4.8. <i>L. controversus</i> türünde N kaynaklarının misel gelişim hızı, misel gelişim alanı ve misel yapısı üzerine etkileri ..	72
Çizelge 4.9. Farklı besin ortamlarının <i>L. pyrogalus</i> türünün misel gelişim hızı, misel gelişim süresi ve misel gelişim alanı üzerine etkisi	76
Çizelge 4.10. <i>L. pyrogalus</i> türünün farklı besin ortamı, sıcaklık ve pH derecelerindeki misel gelişim süresi, misel gelişim hızı ve misel gelişim alanlarına ait ortalamalar	79
Çizelge 4.11. <i>L. pyrogalus</i> türünün misel gelişim süresi, misel gelişim hızı ve misel gelişim alanına ait pH x sıcaklık interaksiyon ortalamaları	81
Çizelge 4.12. <i>L. pyragalus</i> türünde C kaynaklarının misel gelişim hızı, misel gelişim alanı ve misel yapısı üzerine etkileri	85

Çizelge 4.13.	<i>L. pyragalus</i> türünde N kaynaklarının misel gelişim hızı, misel gelişim alanı ve misel yapısı üzerine etkileri	88
Çizelge 4.14	Farklı besin ortamlarının <i>T. terreum</i> türünün misel gelişim hızı, misel gelişim süresi ve misel gelişim alanı üzerine etkisi	91
Çizelge 4.15.	<i>T. terreum</i> türünün farklı sıcaklık ve pH derecelerindeki misel gelişim süresi, misel gelişim hızı ve misel gelişim alanına ait ortalamalar.....	94
Çizelge 4.16.	<i>T. terreum</i> türünde C kaynaklarının misel gelişim hızı, misel gelişim alanı ve misel yapısı üzerine etkileri	98
Çizelge 4.17.	<i>T. terreum</i> türünde N kaynaklarının misel gelişim hızı, misel gelişim alanı ve misel yapısı üzerine etkileri	101
Çizelge 4.18.	Çalışmada yer alan ektomikorizal mantar türlerinin yetiştği alanlardaki toprak örneklerinin özellikleri	106
Çizelge 4.19.	Vejetatif inokulum olarak hazırlanan ortamların pH ve nem değerleri	107
Çizelge 4.20.	<i>L. pyragalus</i> , <i>L. contraversus</i> ve <i>T. terreum</i> mantar türlerinde torf ve torf:vermikülit karışımlarından hazırlanan ortamlarda misel gelişim hızı ve misel gelişim süreleri	108
Çizelge 4.21.	Farklı inokulasyon uygulamalarının sterilizasyondan sonraki pH değerleri, her uygulama için incelenen fidan sayısı ve ektomikoriza oluşumu.....	114
Çizelge 4.22.	Farklı inokulasyon uygulamalarının bitki gelişimi üzerine etkisi	119
Çizelge 4.23.	Farklı inokulasyon uygulamalarına ait mikorizal kısa köklerin yoğunluğu	136
Çizelge 4.24.	Farklı inokulasyon uygulamalarına ait ve doğal ortamdan izole edilen mikorizal köklerin kimyasallara reaksiyonu .	142

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. <i>Lactarius controversus</i> türünün genel görünümü	39
Şekil 3.2. <i>Lactarius pyrogalus</i> türünün genel görünümü	40
Şekil 3.3. <i>Tricholama terreum</i> türünün genel görünümü	41
Şekil 3.4. A) Açık mikorizal sistemde, B) Kapalı mikorizal sistemde bitki gelişim substratı ile doldurulmuş kavanoz ve şişelerin görünümü, C) Soğukta katlama sonucunda kökçük oluşumu gerçekleşmiş dikime hazır fındık tohumu, D) Tohum ekimi yapılmış açık mikorizal sistemdeki kavanozların genel görünüşü	50
Şekil 3.5. Ektomikoriza teşhisinde kullanılan stereomikroskop	53
Şekil 4.1. Saf kültürleri elde edilen <i>L. controversus</i> , <i>L. pyrogalus</i> ve <i>T. terreum</i> ektomikorizal mantar türlerine ait izolatların misel gelişimleri	56
Şekil 4.2. Farklı besin ortamlarında <i>L. controversus</i> türüne ait kümülatif misel koloni yarıçapları	59
Şekil 4.3. Farklı besin ortamlarında <i>L. controversus</i> türüne ait misel gelişimleri	60
Şekil 4.4. <i>L. controversus</i> türünün BAF ve PDA besin ortamlarında farklı sıcaklıklardaki misel gelişimleri	64
Şekil 4.5. <i>L. controversus</i> türünde farklı pH ve sıcaklık derecelerinin misel gelişim alanı üzerine etkisi	66
Şekil 4.6. <i>L. controversus</i> türünün BAF ortamında farklı sıcaklıklardaki kümülatif misel koloni yarıçapları	67
Şekil 4.7. <i>L. controversus</i> türünün PDA ortamında farklı sıcaklıklardaki kümülatif misel koloni yarıçapları	68
Şekil 4.8. <i>L. controversus</i> türünde farklı C kaynaklarının misel gelişim hızı üzerine etkisi	70
Şekil 4.9. <i>L. controversus</i> türünde farklı C kaynaklarının misel gelişim alanı üzerine etkisi	70
Şekil 4.10. <i>L. controversus</i> türünün farklı C kaynaklarındaki misel gelişimleri	71
Şekil 4.11. <i>L. controversus</i> türünde farklı N kaynaklarının misel gelişim hızı üzerine etkisi	72
Şekil 4.12. <i>L. controversus</i> türünde farklı N kaynaklarının misel gelişim alanı üzerine etkisi	73

Şekil 4.13.	<i>L. controversus</i> türünün farklı N kaynaklarında misel gelişimleri	74
Şekil 4.14.	Farklı besin ortamlarında <i>L. pyrogalus</i> türüne ait kümülatif misel koloni yarıçapları.....	76
Şekil 4.15.	Farklı besin ortamlarında <i>L. pyrogalus</i> türüne ait misel gelişimleri	77
Şekil 4.16.	<i>L. pyrogalus</i> türünün BAF ve PDA besin ortamlarında farklı sıcaklıklardaki misel gelişimleri	80
Şekil 4.17.	<i>L. pyrogalus</i> türünde farklı pH ve sıcaklık derecelerinin misel gelişim alanı üzerine etkisi	81
Şekil 4.18.	<i>L. pyrogalus</i> türünün BAF ortamında farklı sıcaklıklardaki kümülatif misel koloni yarıçapları.....	83
Şekil 4.19.	<i>L. pyrogalus</i> türünün PDA ortamında farklı sıcaklıklardaki kümülatif misel koloni yarıçapları	84
Şekil 4.20.	<i>L. pyragalus</i> türünde farklı C kaynaklarının misel gelişim hızı üzerine etkisi	86
Şekil 4.21.	<i>L. pyragalus</i> türünde farklı C kaynaklarının misel gelişim alanı üzerine etkisi	86
Şekil 4.22.	<i>L. pyragalus</i> türünün farklı C kaynaklarındaki misel gelişimi	87
Şekil 4.23.	<i>L. pyragalus</i> türünde farklı N kaynaklarının misel gelişim hızı üzerine etkisi	88
Şekil 4.24.	<i>L. pyragalus</i> türünde farklı N kaynaklarının misel gelişim alanı üzerine etkisi	89
Şekil 4.25.	<i>L. pyragalus</i> türünün farklı N kaynaklarındaki misel gelişimi	90
Şekil 4.26.	Farklı besin ortamlarında <i>T. terreum</i> türüne ait kümülatif misel koloni yarıçapları.....	91
Şekil 4.27.	Farklı besin ortamlarında <i>T. terreum</i> türüne ait misel gelişimleri	92
Şekil 4.28.	<i>T. terreum</i> türünde farklı pH ve sıcaklık derecelerinin misel gelişim alanı üzerine etkisi	95
Şekil 4.29.	<i>T. terreum</i> türünün farklı sıcaklık derecelerindeki misel gelişimi (pH 5.5)	95
Şekil 4.30.	<i>T. terreum</i> türünün farklı sıcaklıklardaki kümülatif misel koloni yarıçapları.....	97
Şekil 4.31.	<i>T. terreum</i> türünde farklı C kaynaklarının misel gelişim hızı üzerine etkisi	99

Şekil 4.32.	<i>T. terreum</i> türünde farklı C kaynaklarının misel gelişim alanı üzerine etkisi	99
Şekil 4.33.	<i>T. terreum</i> türünün farklı C kaynaklarında misel gelişimi.	100
Şekil 4.34.	<i>T. terreum</i> türünde farklı N kaynaklarının misel gelişim hızı üzerine etkisi	101
Şekil 4.35.	<i>T. terreum</i> türünde farklı N kaynaklarının misel gelişim alanı üzerine etkisi	102
Şekil 4.36.	<i>T. terreum</i> türünün farklı N kaynaklarındaki misel gelişimi	103
Şekil 4.37.	<i>L. pyrogalus</i> türünün Terme ve Ünye'den elde edilen mantar örneklerinden geliştirilen izolatların (a) aynı petride misel gelişimleri ve (b) mikroskopta birleşme şekilleri	105
Şekil 4.38.	<i>L. contraversus</i> türünün torf ve torf:vermikülit karışımlarından hazırlanan ortamlardaki kümülatif misel gelişimi.....	108
Şekil 4.39.	<i>L. pyrogalus</i> türünün torf ve torf:vermikülit karışımlarından hazırlanan ortamlardaki kümülatif misel gelişimi	109
Şekil 4.40.	<i>L. contraversus</i> türünün torf ve torf:vermikülit karışımlarından hazırlanan ortamlarda misel gelişimi	110
Şekil 4.41.	<i>L. pyrogalus</i> türünün torf ve torf:vermikülit karışımlarından hazırlanan ortamlarda misel gelişimi.....	111
Şekil 4.42.	<i>T. terreum</i> türünün torf ve torf:vermikülit karışımlarından hazırlanan ortamlarda misel gelişimi.....	112
Şekil 4.43.	<i>L. contraversus</i> , <i>L. pyrogalus</i> ve <i>T. terreum</i> mantar türlerinin torf ve torf:vermikülit karışımlarından hazırlanan ortamlarda misel gelişim süreleri	113
Şekil 4.44.	A) ve B) Açık sistemde bitki çıkışları, C) Kapalı sistemde bitki çıkışları, D) Sağlıklı gelişim gösteren bir fidan, E) Potasyum noksanlığı gösteren bir fidan, F) Kurumuş bir fidan	115
Şekil 4.45.	Fidanların çıkış ve genel görünümü	116
Şekil 4.46.	Farklı inokulasyon uygulamalarının bitki boyuna etkisi...	120
Şekil 4.47.	Farklı inokulasyon uygulamalarının gövde çapına etkisi ..	121
Şekil 4.48.	Farklı inokulasyon uygulamalarının kök uzunluğuna etkisi	122

Şekil 4.49.	Farklı inokulasyon uygulamalarının kök yaş ağırlığına etkisi	123
Şekil 4.50.	Farklı inokulasyon uygulamalarının sürgün yaş ağırlığına etkisi	123
Şekil 4.51.	Farklı inokulasyon uygulamalarının kök kuru ağırlığına etkisi	124
Şekil 4.52.	Farklı inokulasyon uygulamalarının sürgün kuru ağırlığına etkisi	125
Şekil 4.53.	Farklı inokulasyon uygulamalarının toplam bitki kuru ağırlığına etkisi	125
Şekil 4.54.	Farklı inokulasyon uygulamalarının kök:sürgün oranına etkisi	127
Şekil 4.55.	Farklı inokulasyon uygulamalarının kök kuru madde miktarına etkisi	127
Şekil 4.56.	Farklı inokulasyon uygulamalarının sürgün kuru madde miktarına etkisi	128
Şekil 4.57.	Farklı inokulasyon uygulamalarında gelişen fındık fidanlarının görünümü	129
Şekil 4.58.	Kontrol ve bazı inokulasyon uygulamalarının sürgün ve kök gelişimi bakımından karşılaştırılması	132
Şekil 4.59.	Farklı inokulasyon uygulamalarının mikorizal aşılama etkinliği	134
Şekil 4.60.	Farklı inokulasyon uygulamalarına ait mikorizal kısa köklerin stereomikroskopta görünümü (6X)	137
Şekil 4.61.	Doğal ortamından izole edilen <i>L. pyrogalus</i> mikorizası ...	140

KISALTMALAR LİSTESİ

Kısaltma	Açıklaması
BAF	Biyotin Aneurin Folik Asit Agar Ortamı
BSA	Bovin Serum Albümin
C	Karbon
C/N	Karbon/Azot Oranı
Ca(NO ₃) ₂	Kalsiyum Nitrat
ECM	Ektomikoriza
HG	Hagem Agar Ortamı
ING	Ingestad Agar Ortamı
MAE	Mikorizal Aşılama Etkinliği
ME	Malt Ekstrat Agar Ortamı
MMN	Modifiye Edilen Melin Norkrans Ortamı
MNC	Modifiye Edilen Norkrans C Ortamı
N	Azot
NH ₄ NO ₃	Amonyum Nitrat
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Amonyum Fosfat
O	Ortam
PDA	Patates Dekstroz Agar Ortamı
PO	Pachlewski Oddoux Ortamı
S	Sıcaklık
SAB	Sabouraud Agar Ortamı
T:V	Torf:Vermikülit

1. GİRİŞ

Mantarlar ekosistemin önemli bir parçası olup, birçoğu çok eski zamanlardan beri dünyada farklı milletler tarafından besin ve tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Dünya üzerinde 1.5 milyon kadar mantar türünün varlığından bahsedilmektedir. Bu sayı içerisinde günümüze kadar 69000 tür net olarak tanımlanmış olup, bu türlerden de 10000'i makromantar olarak değerlendirilmektedir. Bunlardan 5020 tanesi yenilebilir, 1820 tanesi tıbbi, 1010 tanesi zehirli, 2150 tanesi ise zehirli olmayıp yenilebilir nitelik taşımamaktadır. Yenilebilir 5020 tür içerisinde 35 tanesinin ticari anlamda kültürü yapılmakta, yaklaşık 120 türün ise ekonomik anlamda yetiştiriciliği yapılmak üzere çalışmalar devam etmektedir (**Chang, 1993; Anonymous, 2009a**).

Heterotrofik organizmalar arasında yer alan mantarlar, onların beslenme biçimlerine göre saprofitik, parazitik ve mikorizal (simbiyotik) mantarlar olmak üzere 3 farklı şekilde gruplandırılmaktadır. Bunlar arasında yer alan mikorizal mantarlar simbiyotik bir ilişki şeklinde uygun konukçu bitkilerin köklerinde yaşayan mantarları kapsamaktadır. Mikoriza olarak adlandırılan ve teşhisi mikroskop altında yapılan, bol miktarda hif üreten bu mantar türleri, doğadaki en yaygın bitki mikroorganizma simbiyotik ilişkisini gerçekleştirmektedir (**Marschner, 1995**).

Mikorizanın tiplerinden biri olan ektomikoriza (ECM), tarım ve ormancılık açısından oldukça önemlidir. Dünyadaki ormanların çoğu ektomikorizal ilişki gösterir. Toplamda 43 bitki familyasındaki 140 cinsin ECM meydana getirdiği tespit edilmiştir. Ektomikorizal ilişki gösteren başlıca bitki familyaları *Pinaceae*, *Betulaceae*, *Salicaceae*, *Fagaceae*, *Caesalpiniaceae* ve *Myrtaceae*'dir (**Brundrett ve ark., 1996**). Doğada mantarların çok geniş bir sınıfı ECM meydana getirmektedir. Çoğunluğu basidiomycota olan toplam 65 cins ECM oluşturmakta olup, bunun 45 tanesi basidiomycota, 18 tanesi ascomycota ve 2 tanesi de zygomycota'ya aittir (**Isaac, 1992**).

Ektomikorizal mantarlar birçok ekosistemde topraktaki mikrobiyal kitlenin en önemli üyelerindendir (**Högberg ve Högberg, 2002**). Ektomikorizal mantarların bitki besin maddesi alımı (**Osonubi ve ark., 1991; Marschner, 1995; Landeweert ve ark., 2001; Trudell, 2002; Hagerberg ve ark., 2003; Treseder ve ark., 2004**), bitki-su ilişkisini düzenleme ve kuraklığa dayanımı artırma (**Sylvia ve ark., 1993; Sanchez, 1994; Morte ve ark., 2000**), bitki büyümesini artırma (**Berman ve Bledsoe, 1998; Rincón ve ark., 2001; Guerin-Laguet ve ark., 2003**), hastalık ve zararlılara karşı bitkiyi koruma (**Smith ve Read, 1997; Branzanti ve ark., 1999; Hatat ve ark., 1999**),

stres koşullarına karşı bitkinin toleransını artırma (Marx ve Artman, 1978), genç fidanların hayatta kalma oranını artırma (Lu ve ark., 1998) ve toprak yapısını iyileştirme (Borchers ve Perry, 1992) gibi önemli işlevleri bulunmaktadır. Aynı zamanda bazı türleri dünyanın en pahalı yiyecekleri arasında yer alan yenilebilir ektomikorizal mantarlar önemli bir besin kaynağıdır (Hall ve ark., 2003a).

Dünyada bulunan 2500 yenilebilir mantar türünün yaklaşık yarısı ektomikorizal gruba aittir. Yenilebilir ektomikorizal mantarlar, mantar türleri içerisinde ekonomik olarak en önemli mantar gruplarından birini oluştururlar ve aynı zamanda dünyada büyük pazar payına sahiptirler. Ektomikorizal mantar türleri içerisinde en aranan ve en pahalı olan türler *Tuber magnatum*, *T. melanosporum*, *T. uncinatum*, *Tricholoma matsutake*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Lactarius deliciosus*, *Lyophilum shimeji* ve *Amanita caesarea*'dır. Bunların toplam pazarının milyarlarca Amerikan doları olduğu belirtilmektedir (Wang ve Hall, 2004). Bunların dışında dünyada bazıları lokal olarak önemli olan yaklaşık 200 yaygın yenilebilir ektomikorizal mantar türünün bulunduğu belirtilmektedir (Olivier, 2000; Boa, 2002; Wang ve ark., 2002a; Hall ve ark., 2003a).

Bununla birlikte, son yüzyılda dünyada bazı yenilebilir ektomikorizal mantar türlerinin doğadan toplanan miktarlarında önemli derecede azalmalar meydana gelmiştir (Arnold, 1991; Chevalier, 1998; Reyna ve ark., 2002; Hall ve Wang, 2002). Örneğin, Avrupa'da doğadan toplanan *Tuber melanosporum* miktarı 20. yy'ın başlarında 2000 ton iken, günümüzde 150 tona düşmüştür (Olivier, 2000; Lefevre ve Hall, 2001; Hall ve Wang, 2002). Japonya'da *Tricholoma matsutake* (Wang ve ark., 1997) ve Kuzey yarımkürede yetişen diğer önemli yenilebilir ektomikorizal mantar türlerinin (Cherfas, 1991) hasatları sırasındaki mantar miktarları da önemli derecede azalmıştır. Bu azalmaların başlıca sebepleri arasında ormanların tahrip edilmesi, hastalık ve zararlılar yüzünden ormanlardaki konukçu bitkilerin kaybı, doğal ormanlarda bulunandan daha sık olarak ağaç dikimi yapılması gibi değişen ormancılık uygulamaları, zayıf konukçu bitki türleri ile yapılan plantasyonların doğal ormanların yerini alması, küresel ısınma, kalabalık toplayıcılar tarafından toprağın sıkıştırılması, ağaç kesimleri, orman yangınları, asit yağmurları ve II. Dünya Savaşı sırasında özellikle *Tuber* gibi mantar türlerinin nerede bulunduğu ve nasıl hasat edileceği konusundaki bilginin kaybı yer almaktadır (Wang ve ark., 1997; Baar ve ark., 1999; Olivier, 2000; Lefevre ve Hall, 2001; Hall ve ark., 2003a).

Doğadaki ektomikorizal mantar miktarındaki azalma ve ektomikorizal mantarlara olan talep mikorizal mantarların yetiştiriciliği konusunda araştırmaların yapılmasına neden olmuştur. Ancak bu konudaki bilimsel literatür mikorizal araştırmanın diğer alanları ile karşılaştırıldığında yetersiz kalmıştır **(Hall ve ark., 2003b; Pilz ve ark., 2003)**.

Ektomikorizal mantarın yetiştiriciliği ilk kez Joseph Talon tarafından 18. yy'ın ilk yarısında başarılmıştır. Joseph Talon siyah *Tuber* mantarlarını üreten konukçu ağaçların kök bölgelerinden meşe fidanları şaşırtılırsa, bunlardan meydana gelecek yeni ağaçlarında *Tuber* üretebileceğini düşünmüştür. Çok gelişmiş bir yöntem olmamasına rağmen Talon'un tekniği 150 yıl boyunca dünyada geniş çapta kullanılmıştır. *Tuber uncinatum*, *T. borchii*, *Terfezia claveryi* ve *Lyophyllum shimeji* türlerini yetiştirmek için de benzer teknikler kullanılmıştır **(Chevalier ve Frochot, 1997; Fujita ve ark., 1990; Chevalier, 2002; Zambonelli ve ark., 2002)**.

Bununla birlikte 1970'li yılların başında seralarda ya sporlarla ya da bulaşık kök parçaları kullanarak *Tuber* türleri ile bitkileri inokule etmek için daha güvenilir metotlar bulunmuştur **(Chevalier ve Dupre, 1990; Kagan-Zur, 2002)**. Fransa ve İtalya'da *Tuber* türleri için ticari inokulasyon metotları 1970'lerden bu yana kullanılmaktadır **(Bencivenga ve ark., 1995)**. Son zamanlarda dünyada düzinelerce fidanlıkta *T. melanosporum* ve *T. uncinatum* ile inokule olmuş fidan üretilmesine rağmen **(Olivier, 2000; Lefevre ve Hall, 2001)**, hem sulama, gübreleme, sıcaklık, ışık seviyesi, yetiştirme ortamının formülasyonu ve pH hem de inokulumun miktarı, kalitesi ve uygulanması gibi başarıyı sağlayacak çoğu ayrıntı meslek sırrı olarak kalmaktadır **(Hall ve Wang, 1998a; Pacioni ve Comandini, 2000)**.

Kontrollü koşullarda inokule edilen bitkilerden yenilebilir ektomikorizal mantarların üretimi özellikle *Tuber* için **(Chevalier ve Frochot, 1997)** ve daha sonra *Cantharellus* **(Danell, 1997)** ile *Boletus* için **(Olivier ve ark., 1997)** geliştirilmiştir. Epigin (toprak üzerinde mantar meydana getiren) ektomikorizal mantar türlerinin yetiştiriciliği konusunda yapılan çalışmalar *Tuber* türleri ve *Rhizopogon rubescens* gibi hipogin (toprak altında mantar meydana getiren) türlere göre daha az başarılı olmuştur. *Rhizopogon rubescens* türü 1980'li yıllardan beri Japonya'da başarılı bir şekilde yetiştirilmektedir **(Iwase, 1997)**.

Yapılan çalışmalarda *Lyophyllum shimeji*, *Cantharellus cibarius* ve *Tuber melanosporum* türlerinin sporokarpları sırasıyla laboratuvar, sera ve plantasyon

koşullarında üretilmiştir (Ohta, 1994a; Danell ve Camacho, 1997; Hall ve Wang, 1998b). Spor süspansiyonları, basidiokarplar veya mikorizal kök uçlarından hazırlanan saf kültürlerle inokulasyonun ardından enfekte edilen bitkilerle *Lactarius deliciosus*, *Lyophyllum shimeji*, *Rhizopogon rubescens*, *Suillus granulatus*, *Terfezia* türleri ve *Tuber borchii*, *T. melanosporum*, *T. uncinatum*'un da içinde bulunduğu değişik *Tuber* türleri gibi yenilebilir mikorizal mantarların arazide basidiokarplarının oluşumu sağlanmıştır (Sisti ve ark., 1998; Morte ve ark., 2000; Hall ve ark., 2002; Wang ve ark., 2002b; Zambonelli ve ark., 2002; Hall ve ark., 2003b). Orman alanlarında fidanlar için inokulum olarak kullanılan farklı *Laccaria*, *Hebeloma*, *Thelephora*, *Rhizopogon*, *Pisolithus*, *Scleroderma* gibi mantar cinsleri yapılan inokulasyonların ardından açık saksı toprağı veya fidanlık koşullarında sık sık basidiokarp oluşturmaktadır (Brundrett ve ark., 1996; Castellano, 1996).

Ektomikorizal olduğu kabul edilen *Lyophyllum shimeji*, *Hebeloma* türleri ve *Chalciporus rubinellus* konukçu bitkiler olmadan besin ortamı üzerinde olgun basidiokarplar oluştururken (McLaughlin, 1970; Suzuki, 1979; Ohta, 1994b; Ohta, 1998; Marmeisse ve ark., 1999), *T. maculatum*, *T. melanosporum*, *C. cibarius* ve *Lactarius deliciosus* sera veya özel plantasyon koşullarında genç konukçu bitkiler ile ortak yaşayarak mantar oluşturmuşlardır (Fassi ve Fontana, 1969; Shaw ve ark., 1996; Hall ve Wang, 1998b; Danell, 1999). Bununla birlikte, laboratuvar veya serada steril koşullar altında konukçu bitkiler *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Lactarius akahatsu* ve *L. hatsutake* türleri ile aşılansmış, fakat arazide mantar üretimi sağlanamamıştır (Wang ve ark., 1998; Danell, 2002; Yamada ve ark., 2002). Ayrıca çok uzun yıllardır üzerinde çalışılan *Tricholoma matsutake* ve *Tuber magnatum* gibi türlerin yetiştiriciliği konusunda yapılan çalışmalar başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Bencivenga, 1998; Wang ve Hall, 2004).

Genellikle yenilebilir ektomikorizal mantarların yetiştiriciliği kontrollü çevresel koşullar altında çok başarılı değildir. Günümüzde *C. cibarius*, *Lyophyllum shimeji*, *Lactarius deliciosus*, *Tuber borchii*, *T. formosanum*, *Rhizopogon rubescens* ve *Terfezia laveryi* gibi ektomikorizal türlerin yetiştiriciliği konusunda metotlar geliştirilmekle birlikte (Godbout ve Fortin, 1990; Danell ve Camacho, 1997; Iwase, 1997; Guerin-Laguet ve ark., 2000; Yamada ve ark., 2001a; Danell, 2002; Honrubia ve ark., 2002; Wang ve Hall, 2002; Zambonelli ve ark., 2002) kontrollü koşullarda yalnızca *T. melanosporum* ve *T. uncinatum* türleri başarılı bir şekilde ve ticari olarak

yetiştirilebilmektedir (Ohta, 1994b; Kawai, 1997; Hall ve Wang, 1998a; Chevalier, 1998, 2002; Cairney ve Chambers, 1999; Olivier, 2000; Hall ve Wang, 2002; Hall ve ark., 2002). *T. magnatum*, *Tricholoma matsutake*, *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus* gibi ticari açıdan önemli ve dünyanın en pahalı ektomikorizal mantar türlerinin çoğu, yapılan çok sayıda çalışmaya rağmen yetiştirilememektedir (Bencivenga, 1998; Hall ve ark., 1998; Wang ve Hall, 2004). Sonuç olarak ticari açıdan önemli çoğu yenilebilir ektomikorizal mantar türünün mevcut miktarı günümüzde hala sonbahar veya kış aylarında doğadan hasat edilebilenlerle sınırlı kalmaktadır. Diğer birçok ektomikorizal mantarın yetiştiriciliği için yapılan çalışmalar da başarısızlıkla sonuçlanmıştır.

Ektomikorizal mantarların yetiştiriciliğinde en önemli engeller; başarılı bir şekilde gelişip mantar oluşturabilmeleri için konukçu bir bitkiye ihtiyaç duymaları, besin ortamında miselin yavaş gelişimi, ektomikorizal mantarların aksenik kültürlerinin oluşturulması, bu kültürlerin devamlılığının sağlanması ve ektomikorizal sentezin zorluğu, plantasyonların oluşturulmasından hem önce hem de sonra diğer ektomikorizal mantarlar ile kontaminasyonun olması, konukçu bir bitki ile mikorizal ilişkinin sürdürülme zorluğu ve mantar oluşum mekanizmaları konusundaki bilgi eksikliği olarak sayılabilir (Hall ve Wang, 1998a; Hall ve ark., 2003b).

Ektomikorizal mantarların kültüre alınmalarının zor olduğu belirtilmiştir (Hall ve ark., 1998; Hutchison, 1999). Ektomikorizal mantarları kültüre alabilmek için ilk olarak organizmayı izole etmek, onu saf kültürde geliştirmek ve yeterli miktarda inokulum üretmek gerekmektedir (Harvey, 1991). Fidanları ektomikorizal mantarlarla aşılama için doğal plantasyonlardan alınan toprak karışımından oluşan inokulum, mikorizal fidanlar ve kökler, sporlar ve ektomikorizal mantarların saf misel kültürleri kullanılmaktadır (Harris ve Jurgensen, 1977; Molina, 1979; Fries, 1987). Ektomikorizal mantarların saf misel kültürleri veya vejetatif inokulumu biyolojik olarak en güvenilir inokulum tipi olarak tavsiye edilmektedir (Marx ve Kenny, 1982; Brundrett ve ark., 1996). Fakat geniş ölçekli bir fidanlık inokulasyonu için yeterli miktarda, pratik ve ekonomik olarak vejetatif inokulum üretmek zordur (Marx ve ark., 1992).

Ektomikorizal mantarların inokulasyonu için serpmeye inokulasyon, bant halinde inokulasyon, süspansiyon halinde inokulasyon, basidiospor inokulasyonu, tohum

kaplama yöntemi ve ektomikorizal fidanların dikimi gibi yöntemler kullanılmaktadır **(Pekşen ve Kibar, 2007)**.

Ilıman ve yağışlı bir bölge olması nedeniyle hemen hemen her mevsimde doğada değişik mantar türlerinin bulunduğu Karadeniz Bölgesi makromantar florası bakımından ülkemizin en zengin bölgesi konumundadır. Samsun ili de bu zenginlikten nasibini almış, yenebilen doğa mantarları açısından yüksek bir potansiyele sahip illerimizden biridir. İlde makromantar florasını belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalarda birçok ektomikorizal mantar türü belirlenmiş **(Pekşen ve Karaca, 2000a ve 2000b; Pekşen ve Karaca, 2003)**, bu türlerden *Cantharellus cibarius*, *Lactarius controversus*, *L. deliciosus*, *L. pyrogalus*, *L. semisanguifluus* ve *Tricholoma terreum*'un bölgede pazarlarda satılan, halk tarafından sevilerek tüketilen ve aynı zamanda dış pazar değeri yüksek olan mantar türleri olduğu bildirilmiştir **(Pekşen ve Karaca, 2000b)**. **Pekşen ve ark. (2007)** *L. pyrogalus* ve *L. controversus* mantar türlerinin protein ve mineral maddeler yönünden zengin olduğu ve bölge halkı için yüksek kalitedeki bir besin kaynağı olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu belirlemişlerdir.

“Fındık mantarı” veya “Tirmit” olarak bilinen *L. pyrogalus*, Samsun, Giresun ve Ordu halkı tarafından çok sevilerek tüketilen bir türdür. Taze ya da salamurası yapılarak değerlendirilmektedir. Fındık altında, bahar aylarında görülmektedir. Ancak son yıllarda bu türün doğadan toplanan miktarlarında önemli azalmalar olduğu gözlenmiştir. “Söğüt mantarı” olarak bilinen *L. controversus* türü de halk pazarlarında satılan yaygın bir türdür. Söğüt veya kavak ağaçları altında, yaz sonları veya sonbaharda oluşmaktadır. Halk tarafından sevilerek tüketilen *Tricholoma terreum* “Karaoğlan”, “Karakız” ve “Karaca” olarak bilinmektedir. İğne yapraklı orman altında, genellikle sonbaharda oluşmaktadır. Kalitesi yüksek olan bu mantarın özellikle çorbalara lezzet kattığı bilinmektedir. Diğer doğa mantarlarının azaldığı dönemlerde bulunması da önemli bir avantajdır. Ancak küçük yapılı ve gevrek olması nedeniyle taşınması sorun olmaktadır.

Bu mantar türleri bölge halkı için yüksek kalitedeki bir besin kaynağı olarak kullanım potansiyeline sahip olmalarının yanı sıra **(Pekşen ve ark., 2007)** medikal olarak da kullanıma sahiptirler **(Özçelik ve ark., 2004)**. Gerek besin değeri gerekse taşıdığı tıbbi özellikler bakımından insan sağlığı açısından ve ticari olarak önemli olan bu ektomikorizal mantarların floramızda mevcut varyetelerinin kültüre alınması ve yetiştiriciliği konusunda birçok çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Bununla birlikte

yapılan literatür taramalarında ülkemizde bu konuda yapılan hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada *Lactarius controversus*, *L. pyrogalus* ve *Tricholoma terreum* ektomikorizal mantar türlerinin kültüre alınabilme olanakları araştırılmıştır. Bu amaçla *L. controversus*, *L. pyrogalus* ve *T. terreum* ektomikorizal mantar türlerinin saf kültürlerin elde edilmesi, uygun besin ortamlarının saptanması, misel gelişim koşullarının (pH, sıcaklık, C ve N kaynakları) optimizasyonu ve vejetatif inokulum çalışmaları yapılmıştır. Bunun yanı sıra ele aldığımız ektomikorizal mantar türleri arasında son yıllarda önemli ölçüde azalma gösteren ve özellikle bölgedeki ana ürünlerden biri olan fındık (*Corylus avellana*) ile ektomikorizal ilişkisi bulunan *L. pyrogalus* türünün farklı inokulumları fındık fidanlarına inokule edilmiş, farklı inokulasyon uygulamalarının fidan gelişimi ve ektomikoriza oluşumu üzerine etkisi belirlenmiştir. Ayrıca ektomikoriza teşhisi ve tanımlanmasına yönelik çalışmalar yürütülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ektomikoriza, Ektomikorizal Bitki ve Mantar Türleri

Yunanca mykes (mantar) ve rhiza (kök) kelimelerinden oluşan mikoriza, mantar miselleri ile yüksek bitkilerin kökleri arasındaki karşılıklı yararlanmaya dayanan oldukça gelişmiş uzun süreli mutualistik bir ilişkidir (**Le Page ve ark., 1997; Smith ve Read, 1997; Cairney, 2000; Redecker ve ark., 2000**). İlk kez 1885 yılında orman patolojisti olan A.B. Frank tarafından mantar ağaç ilişkisini tanımlamak için kullanılmıştır. Bu ilişkide mantar bitkiden C ve temel organik maddeleri temin ederken, bunun karşılığında bitkiye su, mineral besin maddeleri ve metabolitlerin alımında yardımcı olmaktadır (**Landeweert ve ark., 2001; Trudell, 2002**). Ekosistemdeki besin döngüsü ve bitki canlılığının devamında büyük bir öneme sahip olan mikorizal ilişki, dünyadaki bitkilerin yaklaşık % 92'sinde görülmektedir (**Isaac, 1992**). Orman ağaçları, narenciye, çayır-mera bitkileri ve tarımı yapılan bazı tarla ve bahçe bitkilerinin büyüme ve gelişmesi mikorizanın varlığına bağlıdır.

Taksonomik yönden mikorizalar sporlarının yapısı, bitkilerdeki enfeksiyon şekilleri, kök içindeki morfolojik ve fizyolojik yapıları itibariyle büyük farklılıklar göstermektedirler (**Sieverding, 1991**). Günümüzde mikoriza 7 farklı tipe ayrılmaktadır. Bunlar: 1-Vesiküler arbüsküler mikoriza, 2-Ektomikoriza, 3-Ektendomikoriza, 4-Erikoid mikoriza, 5-Arbutoid mikoriza, 6-Monotropoid mikoriza ve 7-Orkide mikoriza olarak belirtilmiştir (**Harley ve Smith, 1983; Anonymous, 2009b**). Bu mikoriza tiplerinden tarımsal açıdan önemli olanları vesiküler arbüsküler mikoriza (VAM) ve ektomikoriza (ECM)'dir.

Ektomikoriza, mikorizanın tarım ve ormancılık açısından önemli bir tipidir. Özellikle orman ağaçları ve çalılar gibi daha çok yüksek yapılı ağaçların köklerinde bulunan ektomikorizal simbiyoz (ortak yaşama) genellikle kuzey ve sıcak bölgelerde tropik bölgelerden daha yaygın olarak rastlanmaktadır.

Ektomikorizal ilişkinin kurulması; uygun bir konukçunun mantar tarafından tanınması, konukçu kök dokularının istilası ve son olarak bir dış kılıfın üretilmesi olmak üzere üç farklı safhada gerçekleşmektedir. Ektomikorizal ilişkinin fonksiyonunu anlatmak için üç anatomik yapının açıklanmasına ihtiyaç vardır;

a) Fungal örtü (mantle): Ektomikorizal bitkilerde kökün dış yüzeyi çokça dallanmış bir hif örtüsü ile örtülüdür. Bu örtünün yapısı ve kalınlığı türe ve çevresel koşullara bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir. Mantar için örtü besin maddesi ve karbon deposu olarak hizmet edebilir ve orman ekosistemlerinde N ve P'un önemli bir miktarı bu doku içerisinde depo edilebilir.

b) Hartig net: Kökün dış bölgelerindeki kortekste epidermal ve kortikal hücreler arasında yayılan hiflerin yoğun ve çok sıkı bir şekilde bir araya gelmesinden oluşan bir yapıdır. Hartig net karbonhidratlarla minerallerin değiş tokuş edildiği konukçu bitki ve mantar arasındaki bir ara yüzdür.

c) External (dış) miseller: Dış fungal örtüden toprak içerisine yayılan hiflerden oluşan miseller besin alımı, mineral besin maddelerinin hareketi, su alımı ve diğer toprak mikroorganizmaları ile karşılıklı etkileşimler için geniş bir yüzey alanı sağlamasından dolayı önemlidir (**Marschner, 1995; Peterson ve ark., 2004**).

Ektomikorizal ilişkide mantar konukçu bitki türünün korteksindeki hücreler arasında gelişir, hiçbir zaman hücre içinde gelişmez. Ektomikorizal ilişkide kökler kısa ve kalın olup, bir fungal doku örtüsü ile örtülüdürler. Emici kıllar azdır ya da hiç yoktur. Bu emici kıllar besinleri emme rolünü üstlenmektedir. Kısa köklerin üzerinde üzüm salkımı benzeri dallanmalar meydana gelebilir. Bu tür oluşum daha çok Angiosperm ve Gymnospermelerde gözlenir. *Pinus* türlerinde ise çatallanmış dallar şeklinde oluşumlara rastlanır. Zaman zaman uzun köklerin de mantar hiflerince enfeksiyona uğradığı görülür. Ancak bu tür enfeksiyon genellikle "Hartig net" tarafından önlenir (**Gür ve ark., 1993**).

Ektomikorizal ilişki gösteren konukçu bitkiler odunsu ve çok yıllık bitkilerdir. Bu gruba giren bitkilerden bazıları çam (*Pinus*), ladin (*Picea*), köknar (*Abies*), kavak (*Populus*), kayın (*Fagus*), huş ağacı (*Betula*), meşe (*Quercus*) ve okaliptüs (*Eucalyptus*)'tür (**Anonymous, 2009c**). Yine bahçe bitkilerinden kestane (*Castanea sativa*), fındık (*Corylus avellana*), ceviz (*Juglans regia*), kiraz (*Prunus avium*) ve vişne (*Prunus cerasus*) ektomikorizal ilişki gösteren türlerdir. Bir ağaç, bazen aynı zamanda birkaç fungal türe konukçu olabilir. Bununla birlikte bazı cinslerde hem ECM hem de VAM bulunabildiği (çınar, kestane, kayın, meşe, okaliptüs, ceviz, akasya, servi, kavak, söğüt, karaağaç, kızılğaç, gürgen) belirtilmektedir (**Smith ve Read, 1997; Anonymous, 2009b**).

Ektomikorizal mantarlar ekonomik olarak en önemli mantar gruplarından birini oluşturmaktadırlar. *Basidiomycota*'dan Agaricales (*Amanita*, *Boletus*, *Suillus*, *Tricholoma*), Russulales (*Russula*, *Lactarius*, *Cortinarius*), Aphyllophorales (*Thelephora*), Hymenogastres (*Rhizopogon*) ve Sclerodermatales (*Scleroderma*), *Ascomycota*'dan Tuberales (*Tuber* türleri) ve *Zygomycota*'dan Endogonales takımına giren türler ektomikorizal simbiyoz gösteren başlıca mantarlardır (**Isaac, 1992; Anonymous, 2009c**).

Doğada 5000-6000 arasında mantar türünün ECM meydana getirdiği tahmin edilmektedir (**Molina ve Trappe, 1982**). İtalyan beyaz tuber mantarı gibi bu mantarlardan bazıları dünyadaki en pahalı yiyecekler arasındadır ve dünya çapındaki marketlerde yerini çoktan almıştır. Dünyada 300'ün üzerinde yenilebilir ektomikorizal mantar türü içerisinde en fazla üzerinde durulan türler Périgord siyah tuber mantarı (*Tuber melanosporum*), İtalyan beyaz tuber mantarı (*Tuber magnatum*), *Cantharellus cibarius*, *Lactarius deliciosus* ve *Tricholoma matsutake*'dir (**Wang ve Hall, 2004**).

Ektomikorizal mantarları yaşam biçimleri bakımından 4 gruba ayırmak mümkündür (**Kibar ve Pekşen, 2007**).

Birinci grup: genellikle serbest yaşayan, fakat uygun konukçularla mikoriza da oluşturabilen saprofit türlerdir.

İkinci grup: genellikle ektomikorizal olan ve geniş bir konukçu sınıfına sahip olan, fakat serbest yaşayan türlerdir. Bu grup mantarlar saprofit bir yeteneğe de sahiptirler.

Üçüncü grup: bilinen ektomikorizal türlerin büyük bir çoğunluğunu içine alır. Bitki kökleri ile ortak bir yaşam biçimine ve geniş bir konukçu sınıfına sahiptir. *Lactarius* ve *Tricholoma* türleri bu grupta yer almaktadır.

Dördüncü grup: genellikle serbest yaşamayan ve son derece sınırlı bir konukçu sınıfına sahip olan, yalnızca birkaç mantar türünün olduğu gruptur.

Ektomikorizal mantarlar her zaman ektomikorizal bitki türlerinin yakınında ve ektomikorizal bitkileri çevreleyen toprakta meydana gelirler, fakat bazen kütükler veya ağaç gövdeleri üzerinde de bulunabilirler. Mantarlar dikkat çekici renklerde oldukça büyük veya çok küçük olabilirler. Bunlar kısa ömürlü yapılar olup, birkaç haftada veya sadece birkaç günde meydana gelebilirler. Bazı türler yılda bir ya da birkaç kere olmak üzere her yıl mantar üretirken, bazıları her yıl mantar oluşturmamaktadır (**Brundrett ve ark., 1996**).

Deacon ve Fleming (1992) ektomikorizal mantarları erken ve geç dönem mantarları diye iki gruba ayırmışlardır.

Erken dönem ektomikorizal mantarların özellikleri aşağıda verilmiştir.

1. Mantarın spor üreten üreme organı ilk yıllarda genç ağaçların altında gelişir.
2. Bu organlar ve mikorizalar kök sistemi uzantısının yakın çevresinde görülür.
3. Steril olmayan topraklara spor ve misel aşılandığında kolayca enfeksiyon gelişir.
4. Steril olan aşılı fidanlar toprağa dikildiğinde, onlara karşı direnç gösterirler.
5. Kültürde enfeksiyon ve fazla büyüme için az şekere gereksinim duyarlar.
6. Enfeksiyon, ortamın düşük fosfor içeriğinden etkilenmez.
7. Bitki köklerinde veya kültürde sporları çimlenebilir.

Geç dönem ektomikorizal mantarların özellikleri aşağıda verilmiştir.

1. Mantarın spor üreten üreme organları ileriki yıllarda, ağaçlar olgunlaştıkça gelişir.
2. Bu organlar ve mikorizalar esasen daha yaşlı kök bölgelerinde görülür.
3. Steril olmayan topraklara spor ve misel aşılandığında kolayca enfekte olmazlar.
4. Steril olan aşılı fidanlara karşı dirençleri zayıftır.
5. Kültürde enfeksiyon ve fazla büyüme için çok miktarda şekere gereksinim duyarlar.
6. Enfeksiyon, ortamın düşük fosfor içeriğinden etkilenir.
7. Sporları kültürde kolayca çimlenemez.

Gibson ve Deacon (1990)'un erken dönem mantarlarını geç dönem mantarlarından ayıran fizyolojik farklılıkları belirlemek için yaptıkları bir çalışmada, kültür besin ortamında glikozun olmadığı durumlarda erken dönem mantarlarının (*Hebeloma crustuliniforme* gibi) misel geliştirmesine rağmen, geç dönem mantarlarının misel gelişimi için mutlaka glikoza gereksinim duyduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca yapılan bir çalışmada erken dönem mantar türlerinin bitki büyümesinde, geç dönem mantarlarına oranla çok daha fazla etkili olduğu da belirlenmiştir (**Thomson ve ark., 1994**).

Çoğu *Lactarius* türü genellikle daha yaşlı orman alanlarında sporokarp ürettiği için geç dönem ektomikorizal mantarları olarak tanımlanmaktadır (**Hutchison, 1999**).

Yine *Tricholoma* türlerinin de geç dönem ektomikorizal mantarlar arasında yer aldığı belirtilmektedir (Fleming ve ark., 1986).

2.2. Ektomikorizal Mantarların Saf Kültürlerinin Elde Edilmesi ve Misel Gelişimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Ektomikorizal mantarların saf misel kültürleri biyolojik olarak en güvenilir inokulum tipi olarak tavsiye edilmektedir (Marx ve Kenny, 1982; Brundrett ve ark., 1996; Lakhanpal, 2000).

Birçok ektomikorizal mantar türü izole edilememekte ve saf kültürde geliştirilememektedir. Bazı türler ise kültürde genellikle çok yavaş gelişmektedir ve birkaç aydan sonra çoğunlukla ölmektedirler (Isaac, 1992).

Ektomikorizal mantarlar sporokarplar, eşeyssel sporlar, ektomikorizal kökler, sclerotia ve rizomorflardan izole edilebilmektedirler. Tür teşhis edilebildiği ve fungal materyal çok az ön muamele gerektirdiği için genellikle sporocarp izolasyonu tercih edilmektedir. Sporokarplardan saf kültürlerin elde edilmesinde ise çoğunlukla şapkadan elde edilen veya sapın en üst kısmından alınan doku ile lamellerin biraz üst kısmı kullanılmaktadır. Olgunlaşmamış sporokarplardan izolasyon olgun sporokarplardan yapılan izolasyona göre daha başarılı sonuçlar vermektedir. Ektomikorizal mantarlar sporokarplardan izolasyonun kolaylığı ve kültürde büyüme bakımından çok farklı olabilmektedir. Bazı türler kolayca izole edilip kültürde iyi bir gelişme gösterebilirken, bazılarını izole etmek imkânsızdır. Mantarlar toplandıktan sonra izolasyonlar mümkün olan en kısa sürede yapılmalıdır. İzolasyon hemen arazide yapıldığı zaman ise genellikle en iyi sonuçlar alınmaktadır. Eğer toplandıktan sonra birkaç gün içerisinde izolasyon yapılacaksa örnekler buzdolabında (3-5 °C) saklanılmalıdır. Fungal inokulasyonlar steril şartlarda laminar hava akışlı bir kabinde yapılmalıdır. İnokulasyon yapıldıktan sonra kültürler genellikle 20-25 °C’de inkübe edilmekte ve aktif misel gelişimlerini sağlamak için her 8-12 haftada bir taze alt kültürlerin yapılması gerekmektedir (Brundrett ve ark., 1996).

Ektomikorizal mantarların çoğu saf kültürde gelişim için basit karbonhidratlara ilave olarak tiamin ve biyotin gibi özel büyüme maddelerine gereksinim duymaktadırlar. Gelişimi teşvik etmek için besin ortamına vitaminler, büyümeyi düzenleyiciler ve antibiyotikler ilave edilebilmektedir. Dünyada ektomikorizal mantar türlerinin saf kültürlerinin elde edilmesinde MMN (Modifiye Edilen Melin-Norkrans),

BAF (Biyotin Aneurin Folik Asit Agar), PDA (Patates Dekstroz Agar), MEA (Malt Ekstrakt Agar), M40, PACH, FDA ve Gamborg ortamı yaygın olarak kullanılan besin ortamlarıdır (**Pekşen ve Kibar, 2007**).

Cantharellus cibarius ektomikorizal mantarının sporlarının çimlendirilmesi ilk kez **Fries (1979)** tarafından yapılan çalışmada kompleks bir besin ortamı kullanılarak başarılmıştır. **Straatsma ve ark. (1985)** yaptıkları çalışmada *C. cibarius* sporlarının çimlenme oranının çok düşük olduğunu tespit etmişler ve mantar dokusundan saf *C. cibarius* miseli elde etmeyi başarmışlardır. *C. cibarius*'un misel üretiminde 5 mM süksinat veya 25 mM MES katılmış sıvı Fries ortamının (pH 5.5) en iyi sonucu verdiği bildirilmiştir (**Straatsma ve Griensven, 1986**).

France ve Reid (1984) ektomikorizal mantarların saf kültür gelişimi üzerine inorganik N kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. Çalışmada 4 farklı ektomikorizal mantar türünün misel gelişimi amonyum ve nitrat içeren besin ortamlarında incelenmiştir. *Pisolithus tinctorius*, *Cenococcum geophilum* ve *Thelephora terrestris* türleri N kaynağı olarak amonyum içeren ortamda, *Suillus granulatus* türü ise nitrat içeren ortamda daha iyi bir gelişim göstermiştir.

Brundrett (1991) *Lactarius*'un kültürde yavaş gelişen ve zor kültüre alınabilen özelliklere sahip bir cins olduğunu bildirmiştir.

Saf kültürde farklı organik ve inorganik N kaynakları içeren sıvı ortamda 6 ektomikorizal mantar türünün (*Suillus variegatus*, *Piloderma croceum*, *Paxillus involutus*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Thelephora terrestris*, *Lactarius rufus*) misel gelişimi incelenmiştir. Tüm mantarlar amonyumda iyi bir gelişim göstermiştir. Bununla birlikte aynı türün farklı izolatları arasında değişiklik olmasına rağmen nitrat içeren ortamda gelişim genellikle daha düşük bulunmuştur. Bovin serum albümin (BSA) kullanımı türlere göre değişiklik göstermiş, *Laccaria* türleri BSA'dan daha az yararlanmıştır (**Finlay ve ark., 1992**).

Coltricia perennis, *Laccaria bicolor*, *Lactarius hepaticus* ve *Paxillus involutus* ektomikorizal mantar türlerinin katı ortam üzerinde organik (glisin) ve inorganik (amonyum) N ve C (glikoz) kaynağında misel gelişim durumları araştırılmıştır. *L. bicolor* hem amonyum hem de glisin içeren ortamda gelişme göstermiştir. N kaynağı olarak amonyum içeren ortamda *L. hepaticus* ve *P. involutus*'un biyomas üretimi ve gelişim hızı glisin içeren ortama göre daha yüksek bulunmuştur. *Coltricia perennis*'in

amonyum ve glisin içeren ortamlarda benzer gelişim gösterdiği belirlenmiştir (**Baar ve ark., 1997**).

Ohta (1997) yaptığı çalışmada 33 farklı ektomikorizal mantar türünün misellerini nişasta, amiloz ve glikoz içeren ortamlarda geliştirmiştir. Nişasta, amiloz ve glikoz içeren agar ortamı üzerinde geliştirilen mantarların misel ağırlıkları sırasıyla 1.1-94.9 mg, 0.4-93.3 mg ve 2.0-97.5 mg arasında değişiklik göstermiştir. Misel gelişim hızları arpa tane ortamında 0-1.17 mm/gün ve çeltik tane ortamında 0-2.03 mm/gün olarak belirlenmiştir. Çalışmada yer alan ektomikorizal mantarların çoğu amiloz üzerinde iyi bir gelişim göstermiş ve amilozda gelişim hızı arpa üzerindekiinden daha yüksek bulunmuştur. Bir kaç *Lyophyllum*, *Hebeloma*, *Sarcodon* ve *Tricholoma* ırkı hem glikoz hem de nişasta ortamı üzerinde iyi bir gelişim göstermiştir.

De Araújo ve ark. (1998)'nin yaptıkları çalışmada katı ortam üzerinde ektomikorizal mantarların gelişim fizyolojisi araştırılmıştır. Ektomikorizal mantarların katı yüzeyde gelişmesi sırasında besinsel parametrelerden (kültür ortamı kompozisyonu, C ve N kaynakları) nasıl etkilendiğini göstermek amacıyla yapılan çalışmalar hem agar ortamı üzerinde hem de besin solusyonu ilave edilen katı substrat (şeker kamışı artığı, torf/vermikülit) üzerinde yürütülmüştür. Patates Dekstroz Agar (PDA) ortamının *Pisolithus tinctorius*, *Suillus collinitus*, *Lactarius deliciosus* ve *L. sanguifluus* türlerinin misel gelişimi için uygun olduğu sonucuna varılmıştır. SSF (katı safha fermentasyonu)'de kültürlerde iyi bir misel gelişimi gözlenmiştir. SSF'de bu ırkların metabolizması üzerine ışığın etkisi kadar inokulum büyüklüğü ve yaşının da etkili olduğu belirlenmiştir.

Miles (1999) mantarların heterotrofik organizmalar olmaları nedeniyle misel gelişimi için ortamda C ve N kaynağının bulunması gerektiğini bildirmiştir.

Pekşen ve ark. (1999)'nin yaptıkları çalışmada *Tricholoma terreum*, *Lactarius semisanguifluus*, *L. deliciosus*, *Cantharellus cibarius* ve *Polyporus squamosus*'un sporları 10 değişik besin ortamında (buğday agar, buğday maya agar, malt agar, malt maya agar, patates dekstroz agar, patates dekstroz maya agar, Yang ortamı, Lambert ortamı, sentetik ortam ve toprak ekstrakt agar) kültüre alınmıştır. Ancak çoklu spor metodu ile bu ortamların hiçbirisinde doğa mantarlarının misel üretimleri sağlanamamıştır.

Saf kültürde bazı ektomikorizal mantar türlerinin kültürel özelliklerini araştırmak amacıyla yapılan çalışmada 21 adet ektomikorizal mantar türünün taksonomik kriterlere

göre makroskopik ve mikroskopik özellikleri belirlenmiştir. Kültür ortamı olarak MMN ve BAF ortamları kullanılmıştır. Makroskopik olarak misel rengi, havalı misel miktarı ve mikroskopik olarak dalgalı, girintili çıkıntılı ve düzensiz hücrelerin varlığı türler içerisinde en değişken özellikler olarak belirlenmiştir (**Sanchez ve ark., 2000**).

Wang (2000) yaptığı çalışmada yenilebilir mikorizal mantarların *in vitro*'da yetiştirilebilmesi için kullanılabilir bir metot geliştirmiştir. Yetiştiricilik için taze veya genç mantarlardan elde edilen dokunun daha yüksek hayatta kalabilirlik oranına sahip olduğu, fakat olgun mantarlardan alınan veya toplandıktan sonra belli bir zaman geçen mantarlardan alınan dokularda hayatta kalabilirliğin azaldığı belirlenmiştir. Lamellerden alınan dokuların hayatta kalma oranları % 95 olarak bulunmuştur. Yetiştiricilik için kültür ortamı olarak EGA ve modifiye edilmiş EGA en uygun ortamlar olarak belirlenmiştir.

Sanchez ve ark. (2001) 8 farklı ektomikorizal mantar türünün (*Hebeloma edurum*, *Lactarius deliciosus*, *Rhizopogon roseolus*, *Suillus collinitus*, *S. granulatus*, *S. luteus*, *Tricholoma focale* ve *T. striatum*) saf kültürde gelişimleri üzerine farklı sıcaklık, pH ve su potansiyellerinin etkisini araştırmışlardır. Her bir türün biyomas (biyokütle) üretimi ve misel gelişimi belirlenmiş, morfolojik olarak tanımlanmıştır. *H. edurum* ve *L. deliciosus* türleri nötr veya hafif bazik ortamda daha iyi gelişim göstermişlerdir. Mantar türlerinin çoğunda en düşük koloni çapı ve kuru madde üretimi pH 2.5'da elde edilmiştir. Yüksek su stresi seviyelerinde (-13.85 ve -15.45 bar) sadece *H. edurum*, *R. roseolus* ve *S. collinitus* türleri gelişim göstermiştir. İncelenen ektomikorizal mantar türleri içinde yalnızca *R. roseolus* ve *S. collinitus* türleri 30 °C'de gelişirken, diğer türler düşük sıcaklık seviyelerinde gelişim göstermişlerdir. *R. roseolus* türü yüksek pH seviyeleri ve su stresine daha yüksek bir tolerans gösterirken, *L. deliciosus*, *T. focale* ve *T. striatum* en hassas türler olarak belirlenmiştir.

De Araújo ve Roussos (2002) yaptıkları çalışmada agar ortamı üzerinde ektomikorizal mantarlarda misel gelişimini araştırmak için yeni bir teknik geliştirmişlerdir. Bu amaçla bir selofan disk ile örtülü 10 ml kültür ortamı içeren 6 cm çapında petri kapları kullanılmıştır. Fungal biyomas üretimi analizi için ortamın yüzeyi üzerine steril edilen bir selofan örtü yerleştirilmiştir. İnokulasyon selofan örtünün merkezi üzerine bir misel parçasının yerleştirilmesi ile yapılmıştır. Kültürler daha sonra karanlıkta 25 °C'de inkübe edilmiştir. Koloninin ışınal gelişimi ölçülmüş ve misel kuru ağırlığı tespit edilmiştir. *Suillus collinitus*, *Pisolithus arrhizus* ve *Hebeloma*

cylindrosporum türleri PDA veya Pintro ortamı olmak üzere iki farklı kültür ortamında geliştirilmiştir.

Azot kaynaklarının *Cantharellus cibarius*'un misel gelişimine etkisini araştırmak amacıyla farklı kombinasyonlarda amonyum, nitrat ve bovin serum albümin (BSA) içeren sıvı ortamda 3 farklı *C. cibarius* ırkının gelişimi incelenmiştir. En kolay kullanılabilen N kaynağı amonyum olarak belirlenmiş ve BSA kullanımı amonyum içeren ortamla karşılaştırıldığında sınırlı bulunmuştur. Ayrıca nitrat içeren ortamda gelişimin zayıf olduğu tespit edilmiştir (**Rangel-Castro ve ark., 2002**).

Sangtican ve Schmidt (2002) yeni bir kültür tekniği kullanarak farklı N kaynaklarının *Amanita*, *Gymnoboletus*, *Lactarius* ve *Russula* cinslerine ait 8 ektomikorizal mantar türünün misel gelişimine etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla yüzen bir örtü üzerinde hifal gelişimin sağlandığı yeni bir kültür tekniği geliştirilmiştir. Bazı istisnalar hariç bu teknikteki fungal biyomas üretimi katı ortam üzerindeki fungal gelişime benzer bulunmuştur. Ektomikorizal mantarların inorganik (nitrat, amonyum) ve organik (amid, peptit, protein) N kaynaklarını kullanma durumları belirlenmiştir. Tüm *Russula* türleri, *Lactarius* sp. ve *Amanita* sp. amonyum ve glutaminden faydalanmış, fakat diğer N kaynaklarını çok az kullanmışlardır. *Amanita* türlerinin biyomas üretimi amonyum ve glutaminde daha yüksek bulunmasına rağmen, tüm N kaynaklarında gelişim göstermişlerdir. *Gymnoboletus* sp. N kaynağı olarak nitrat ve amonyumda benzer bir gelişim göstermiştir.

González-Ochoa ve ark. (2003)'nın yaptıkları çalışmada kültür ortamı olarak *Suillus* ve *Rhizopogon* türleri için MMN ve *Lactarius* türleri için BAF besin ortamını kullanmışlardır. Miseller önceden steril edilmiş, sıvı ortamın bulunduğu 1 l'lik şişelerde geliştirilmiş ve 3 ay boyunca 23 °C'de inkübe edilmiştir.

Laccaria bicolor'un misel gelişimi patates dekstroza agar (PDA), malt ekstrat agar (MEA), Sabouraud agar (SAB), Ingestad agar (ING), modifiye edilen Melin-Norkrans agar (MMN), Hagem agar (HG) ve biyotin aneurin folik asit agar (BAF) besin ortamlarında araştırılmıştır. En yüksek gelişim hızı ve koloni çapı MEA ve BAF ortamlarında gözlenirken, en yüksek biyomas üretimi BAF ve SAB ortamlarında tespit edilmiştir (**Santiago-Martínez ve ark., 2003**).

Sundari ve Adholeya (2003) yaptıkları çalışmada ektomikorizal mantar izolatlarının optimum gelişim pH'sını belirlemeye çalışmışlardır. İncelenen izolatlardan Agaricales (*Laccaria laccata* hariç) ve Aphyllophorales üyeleri nötr ve nötre yakın

pH'yı tercih ederken, Sclerodermatales takımının üyeleri asidik pH'da daha iyi bir gelişim göstermişlerdir. Yapılan çalışmalar ortam pH'sının yalnızca mantarın gelişim hızını değil, aynı zamanda mantarın ortamda daha fazla yayılmasını da sınırlandırdığını göstermiştir.

Hatakeyama ve Ohmasa (2004) ortamdaki farklı konsantrasyonlardaki C (glikoz, sukroz, selobiyoz, mannoz, gliserol, dekstrin, trehaloz ve çözünebilir nişasta) ve N (amonyum tartarat, arginin, glutamik asit, aspartik asit ve alanin) kaynaklarında farklı *Suillus* ve *Boletinus* ırklarının misel gelişimini araştırmışlardır. Çalışmada besin ortamı olarak Ohta ortamı kullanılmıştır. İncelenen tüm ırklarda glikoz veya trehaloz'un bulunduğu ortamlarda iyi bir gelişim gözlenmiştir. Mannoze ve selobiyoz'un bulunduğu ortamlarda *Suillus*'un bir ırkı hariç, ırklar genellikle iyi bir gelişim göstermişlerdir. Dekstrin ve çözünebilir nişastanın kullanımı her bir ırkta farklılık göstermiştir. Sukroz ve gliserol'de ise tüm ırklarda misel gelişimi çok düşük bulunmuştur. *Suillus* ırklarında 4 farklı aminoasitin (arginin, glutamik asit, aspartik asit ve alanin) misel gelişimine etkisi amonyum tartaratla benzer bulunmuştur. Fakat *Boletinus* ırklarında amino asitlerle misel gelişimi amonyum tartarat ile misel gelişiminden belirgin bir şekilde daha düşük bulunmuştur. Ayrıca çalışmada 9 farklı *Suillus* ve *Boletinus* ırkı için glikoz ve amonyum tartarat konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır. Glikoz konsantrasyonları 1, 3.33, 10, 33.3, 100 ve 200 g/l, amonyum tartarat konsantrasyonları 0.2, 1, 5, 10 ve 20 g/l olarak denenmiştir. 25 g/l'dan daha yüksek bir glikoz konsantrasyonunda altı ırkta maksimum misel gelişimi gözlenirken, bir ırkta en iyi misel gelişimi 70 g/l glikoz konsantrasyonunda gözlenmiştir. Sonuçlar bu mantarların nispeten yüksek C konsantrasyonlarına adapte olduğunu göstermektedir. Genellikle maksimum misel gelişiminde amonyum tartarat konsantrasyonu artarken, glikoz konsantrasyonu azalmış ve daha yüksek glikoz konsantrasyonlarında misel gelişimi hızla azalmıştır.

Amanita caesarea'nın birkaç izolatına *in vitro* kültürde pH (5, 6, 7 ve 7.5), sıcaklık (20, 24 ve 28 °C), C (nişasta, glikoz, fruktoz, mannitol, sukroz ve ksiloz) ve N (albümin bovin, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) kaynaklarının etkisi araştırılmış ve bu izolatlar için kültür koşulları optimize edilmiştir. En iyi misel gelişimi pH 6-7'de sağlanmış ve optimum gelişme sıcaklığı izolata bağlı olarak 24-28 °C olarak belirlenmiştir. İncelenen N kaynakları arasında en yüksek misel koloni çapı albümin bovin ve kalsiyum nitrat'tan elde edilirken, en yüksek misel kuru ağırlığı amonyumdan sağlanmıştır. C kaynakları arasında ise en yüksek misel koloni çapı mannitol, en yüksek

misel kuru ağırlığı ise mannitol ve glikozdan elde edilmiştir. Bununla birlikte ksiloz misel gelişimini engellemiştir. Çalışmanın sonucunda *A. caesarea*'nın en iyi misel gelişimi için C kaynağı olarak mannitol ve glikoz, N kaynağı olarak ise amonyumun kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır (**Daza ve ark., 2006**).

Xu ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus* ve *L. insulsus* ektomikorizal mantar türlerinin saf kültür gelişimleri için optimum koşulları elde etmek amacıyla ortam, pH ve sıcaklığın etkilerini araştırmışlardır. Sonuçlar bu mantar türlerinin vitamin ve maya ekstrakt içeren ortamlarda gelişimlerinin daha iyi olduğunu göstermiştir. Ayrıca pH'nın bu mantar türlerinin gelişimi üzerinde çok az bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada optimum pH değerlerinin *L. deliciosus* için 6.0 ve *B. edulis* için 5.0 olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte *L. insulsus* türünün geniş bir pH aralığına sahip olduğu, nötr veya hafif alkali ortamlarda daha iyi bir gelişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bu mantar türlerinin gelişimi için optimum sıcaklıklar 25-28 °C olarak belirlenmiş ve özellikle yüksek sıcaklıklar misellerin ölümüne neden olmuştur.

2.3. Ektomikorizal İnokulum Üretimi, İnokulasyon Yöntemleri ve Ektomikorizal Oluşum İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Ektomikoriza ile ilgili araştırmalarda kullanılan fungal inokulum kaynakları doğal plantasyonlardan alınan toprak, mikorizal fidanlar ve kökler, sclerotia, sporlar ve ektomikorizal mantarların saf misel veya vejetatif inokulumudur (**Harris ve Jurgensen, 1977; Molina, 1979; Fries, 1987**).

Ektomikorizalı bitkiden alınan toprak inokulumu en yaygın olarak kullanılan doğal inokulum kaynağıdır (**Marx ve Kenny, 1982**). Spor, bitki kökleri ve hiflerden oluşan toprak inokulumu fidanları inokule edebilmektedir. Toprak inokulumunun toplanması ve uygulanması, diğer inokulum tiplerine göre daha kolaydır (**Helm ve Carling, 1990**). Dezavantajları ise toprak içerisinde bulunan diğer mantar türlerinin kontrol edilememesidir. Toprağın istenen mantar türlerini içermesinin hiçbir garantisi yoktur. Fazla miktarlarda toprağın taşınması zor ve pahalıdır. Ayrıca toprak inokulumu ektomikorizal mantarlara ilaveten zararlı mikroorganizmaları ve yabancı otları da içerebilmektedir (**Marx ve Kenny, 1982**).

Fidanları inokule etmek için kullanılan mikorizal kök parçaları, spordan daha hızlı kolonize olmakta ve uzun süre soğukta muhafaza edilebilmektedir. Dezavantajı ise

patojen potansiyelinin fazla olmasıdır. Uygun bir yüzey sterilizasyonu yapılırsa patojenler azaltılabilmektedir (**Biermann ve Linderman, 1983**).

İnokulum kaynağı olarak ektomikorizal mantar sporlarının kullanılması 18. yüzyıla kadar dayanmaktadır. Spor inokulumu kullanılmasının en önemli avantajı sporların bir mevsimden diğerine kadar hayatta kalma yeteneğinin sürmesi ve uzun süre muhafaza edilebilmesidir (**Marx ve Kenny, 1982**). Spor inokulumunun en büyük dezavantajlarından bir tanesi ise sporların canlılığını tespit etmek için standart laboratuvar testlerinin olmayışıdır. Diğer bir dezavantajı ise fidanlıkları aşlamak için gereken çok sayıda mantarın yeterli miktarda sporokarpı her yıl mevcut olmayabilir. Ektomikorizal mantarların sporları küçüktü olup, kök bölgesinde yıkanabilir. Basidiosporlar ile ektomikoriza oluşumu genellikle aynı mantarın vejetatif inokulumundan 3-4 hafta kadar daha uzun bir zaman almaktadır. Spor inokulumunun kullanılmasında belki de en önemli problem genetik tanımlamanın olmayışıdır (**Norland, 1993**).

Ektomikorizal mantarların saf misel veya vejetatif inokulumu, fungal saf kültürlerden elde edilmektedir. İnokulasyon için de en fazla tavsiye edilen inokulum tipidir (**Marx ve Kenny, 1982; Brundrett ve ark., 1996; Lakhanpal, 2000**). Biyolojik olarak en güvenilir inokulum tipi vejetatif inokulumdur (**Marx ve Kenny, 1982**). Küçük kaplarda, saksılarda, parsellerde ve hatta küçük fidanlık arazilerinde yürütülen çalışmalar için yeterli miktarda vejetatif inokulum üretmek kolaydır. Bununla birlikte geniş ölçekli bir fidanlık inokulasyonu için yeterli miktarda, pratik ve ekonomik olarak vejetatif inokulum üretmek zordur (**Marx ve ark., 1992**).

Fidanların ektomikorizal inokulum ile a) tohumlar ekilmeden önce, b) tohumlar ekilirken ve c) tohumlar ekildikten sonra olmak üzere üç aşılama zamanı vardır. Bunlar arasında en etkili olanı tohumlar ekilmeden önce ve tohumların ekilmesi sırasında yapılan aşılamaştır.

Ektomikorizal mantarların inokulasyonunda değişik yöntemler kullanılabilmektedir:

a) Serpme inokulasyon: Ektomikorizal mantarların inokulasyonunda yaygın olarak kullanılan serpme inokulasyon belirli bir miktar inokulumun toprak yüzeyinde belirli bir alana serpilmesi ve daha sonra inokulumun tohum ekiminden önce toprağın 10-20 cm derinliğine karıştırılması şeklinde yapılmaktadır (**Riffle ve Maronek, 1982**). Fazla miktarda inokulum gerektirmesi bu yöntemin dezavantajını oluşturmaktadır.

Mikorizalı kök parçaları, toprak, spor ve vejetatif inokulum bu amaçla kullanılabilir (Norland, 1993).

b) Bant halinde inokulasyon: İnokulumun toprağın altına bant veya tabaka halinde uygulanmasıdır. Böylece inokulum gelişmekte olan köklere yakın olarak yoğun bir şekilde gelişir. Tüplü fidanlar kullanıldığı zaman bant halinde inokulasyon serpmeye inokulasyon tekniğinden daha etkilidir ve daha az inokulum gereksinimi duyulur. Bant halinde inokulasyon diğer tekniklerle karşılaştırıldığında işgücü ve zaman bakımından kazanç sağlamakta, ancak makine kullanımını gerektirmektedir. Çoğu inokulum tipi bant halinde inokulasyon yöntemiyle uygulanabilmektedir (Riffle ve Maronek, 1982).

c) Süspansiyon halinde inokulasyon: Fidanların dikimden önce mikorizal inokulumun suyla karıştırılarak hazırlandığı süspansiyona daldırılması ya da bu süspansiyonun toprağa dökülmesi şeklinde yapılmaktadır (Norland, 1993). Süspansiyon halinde inokulasyon spor inokulumunun kullanılması ile başarılı olunan bir inokulasyon tekniğidir (Marx ve Kenny, 1982).

d) Basidiospor inokulasyonu: Sporlar toprağa karıştırılmadan önce kum, kil, kaolin veya vermikülit gibi bir taşıyıcıyla karıştırılarak, süspansiyon haline getirilerek, serpilerek veya püskürtülerek, küçük topraklar haline getirilip tohum gibi saçılarak ve tohumlar üzerine kaplanarak kullanılabilir (Marx ve Bell, 1985; Castellano ve Molina, 1989; Marx ve ark., 1989).

e) Tohum kaplama yöntemi: Tohum kaplama, tohumların sporlar veya toprak inokulumu ile kaplanması şeklinde yapılmaktadır (Norland, 1993).

f) Ektomikorizal fidanların dikimi: Önceki uygulamaların başarılı sonuç vermediği durumlarda mikorizalı fidanlar, fidanlığa 1-2 m aralıklarla dikilerek diğer bitkilerin köklerine misel bulaşması sağlanabilir. Fidanlıktan bitkiler sökülürken bazıları orada bırakılarak inokulum görevi yapmaları sağlanır. Mikorizalı köklerin fidanlıklardaki tohum yataklarına karıştırılması da olumlu sonuç verebilir (Riffle ve Maronek, 1982).

Ektomikorizal ilişkiler konukçu bitkilerin fidanlarının ektomikorizal mantar inokulumuna maruz bırakılması ile sentezlenebilmektedir. Ektomikorizal ilişkilerin sentezi çoğunlukla çevresel koşulların kontrolünü sağlamak ve hava kökenli sporlar tarafından bulaşma riskini azaltmak için *in vitro*'da, serada veya büyüme odasında incelenmektedir. Aksenik kültür prosedürleri tohumların yüzey sterilizasyonunu, daha sonra da besin agar ortamı üzerinde onların çimlendirilmelerini ve steril koşullarda

ektomikorizal mantar inokulumu ile inokulasyonunu gerektirmektedir. Tohumların yüzeyini steril etmek için değişik kimyasal maddeler (sodyum hipoklorit, hidrojen peroksit) başarılı bir şekilde kullanılabilir. Ektomikoriza oluşumu, mantar ve konukçunun büyüme hızlarına bağlı olarak inokulasyondan 3-6 ay sonra tamamlanmaktadır (**Brundrett ve ark., 1996**).

Dünyanın değişik kısımlarındaki birçok araştırmacı farklı vejetatif inokulum hazırlama yöntemleri geliştirmişlerdir. **Moser (1958)** tarafından ektomikorizal mantarların vejetatif inokulum üretimi amacıyla yürütülen çalışma, bu konuda yapılan ilk önemli adımdır. Bu çalışmada *Suillus placides*, *S. grevillei*, *S. aeruginascens*, *Paxillus involutus*, *Phlegmacium glaucopus*, *Amanita muscaria* ve *Lactarius porninsis*'in vejetatif inokulumlarını üretmek için yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde erlenlerdeki besin solüsyonlarında geliştirilen misel, daha sonra steril edilen turba yosunu ve sıvı besin solüsyonu içeren 5 lt'lik şişelere transfer edilmiştir. 2-4 aylık bir inkübasyonun sonunda miselin turba yosunu ortamını sardığı belirlenmiştir. Ayrıca değişik organik materyallerin de denendiği çalışmada orman süprüntüsü ve talaşın turba yosunu kadar etkili olmadığı sonucuna varılmıştır.

Moser'in tekniği değiştirilerek buğday veya darı gibi pişirilen ve steril edilen hububat taneleri misel aşılama için kullanılmıştır. Bu ortama bazı mantarların büyümesini geliştirmek için kalsiyum sülfat (0.4-0.5 g/100 g hububat tanesi) ilave edilmiştir. 20-22 °C'de 4 hafta sonra hububat taneleri mantar miselleri ile tamamen sarılmıştır. Daha sonra inokulum C ve N kaynakları (amonyum tartarat, asparajin, soya fasulyesi unu, kan unu, malt ekstrat, glikoz) ile zenginleştirilen steril turba yosununa hububat kültürlerinin ilave edilmesiyle üretilmiştir. 20-22 °C'deki inkübasyondan 3-6 hafta sonra inokulum hazır hale gelmiştir (**Göbl, 1975**).

Marx ve ark. (1976) tarafından *Pisolithus tinctorius*'un vejetatif ve spor inokulumunun çam fidanlarının gelişimine etkisini araştırmak amacıyla yapılan çalışmada vejetatif inokulumun spor uygulamalarından daha fazla ektomikoriza oluşturduğu ve fidan gelişimini teşvik ettiği belirlenmiştir. *Pisolithus*'un vejetatif inokulumu *Pinus taeda*, *P. virginiana* ve *P. strobus* türlerinde sırasıyla % 97, 94 ve 77 oranında ektomikoriza meydana getirmiştir. En etkili spor uygulaması ise sporların tohumlara uygulanmasından elde edilmiştir.

Molina (1980) 5 farklı konifer türüne (*Larix occidentalis*, *Pinus contorta*, *P. ponderosa*, *Pseudotsuga menziesii* ve *Tsuga heterophylla*), 15 farklı ektomikorizal

mantar türü aşılansmış, bunlardan sadece *Laccaria laccata* ve *Cenococcum geophilum* tüm konifer türlerinde devamlı olarak ektomikoriza oluşturmuştur. *L. laccata* türünde köklerin % 86-94.5'i mikoriza ile enfekte olmuş ve çoğu konifer türünde *C. geophilum*'dan daha fazla ektomikorizal kolonizasyon meydana getirmiştir.

Yapılan bir çalışmada *Pinus banksiana* fidanları ektomikorizal mantarların katı misel inokulumu ile inokule edilen torf-vermikülit ortamında 20 hafta boyunca yetiştirilmiştir. Fidanlar *Thelephora terrestris*, *Laccaria proxima* ve *Hebeloma* sp. ile inokule edildiği zaman kısa köklerin % 90'ından daha fazlası enfekte olmuştur. *Cenococcum geophilum*, *Pisolithus tinctorius* ve *Astraeus hygrometricus* türleri kullanıldığında kısa köklerin yaklaşık yarısı enfekte olmuştur. Kısa köklerin % 32'si *Lactarius paradoxus* ile ve % 17'si *Sphaerospora brunnea* ile enfekte olmuştur. Bununla birlikte *Amphinema byssoides*, *Hydnum imbricatum* ve *Tricholoma flavovirens* ile inokulasyonda hiç bir kök enfekte olmamıştır (Danielson ve ark., 1984).

Rietveld ve ark. (1989) yaptıkları çalışmada *Larix decidua* fidanlarını 8 farklı ektomikorizal mantar türünün misel kültürleri ile inokule etmişlerdir. Çalışmada her bir izolat için aseptik olarak vejetatif misel inokulumu geliştirilmiş, inokulum hazırlamak için steril turba yosunu: vermikülit: perlit karışımı (2:1:1) kullanılmıştır. Sadece *Hebeloma crustuliniforme* ve *Laccaria laccata* ile inokule edilen fidanlar önemli derecede ektomikoriza geliştirmiştir.

Yapılan bir çalışmada *Pisolithus tinctorius* basidiosporlarının steril toprağa bulaştırılmasında 5 farklı yöntem denenmiştir. Bu yöntemlerde sırasıyla sporlar sulu malça karıştırılıp ekimden sonra uygulanmış, ekimden sonra sporlar toprağa toz halinde karıştırılmış, ekimden önce sporlar toprağa enjekte edilmiş, ekimden 6 hafta sonra sporlar fidanların dibine toz halinde uygulanmış ve yine ekimden 6 hafta sonra sporlar süspansiyon halinde fidanların dibine verilmiştir. Çalışmanın sonucunda ilk iki yöntem en etkili bulunmuş ve fidanlarda birinci yöntemde % 75, ikincisinde % 33 oranında ektomikoriza oluştuğu belirlenmiştir (Riffle ve Maronek, 1991).

Cantharellus cibarius türünün ektomikoriza oluşumu ve gelişiminin araştırıldığı bir çalışmada inokulasyondan 8 hafta sonra mikoriza gözlenmiştir. Bununla birlikte, güçlü bir kolonizasyon ancak 10-12 hafta sonra meydana gelmiştir (Danell, 1994).

Parlade ve ark. (1995) yaptıkları çalışmada saf kültür sentezinde 27 ektomikorizal mantar türüne ait 36 izolatın *Pseudotsuga menziesii* ile ektomikoriza oluşturabilme yeteneğini araştırmışlardır. 18 farklı fungal türe ait 23 izolatın *P.*

menziesii ile ektomikoriza oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca *Lactarius deliciosus*, *Suillus luteus* ve *Rhizopogon* türlerinin en fazla konukçu özgülüğü gösteren türler olduğu tespit edilmiştir.

Guerin-Laguet ve ark. (1998) tarafından yapılan çalışmada laboratuvar koşullarında *Lactarius deliciosus* izolatlarının ekolojik yetenekleri ve rekabetçilikleri araştırılmıştır. *Pinus sylvestris* ile ortak yaşayan *L. deliciosus* ırklarının ekolojik yeteneklerini değerlendirmek için steril edilen ve steril edilmeyen doğal toprak örneklerinde birkaç biyolojik çalışma yapılmıştır. İnokulasyondan 5 ay sonra toprak uygulaması her ne olursa olsun D45 ırkı ile fidanların mikorizal enfeksiyon derecesinin % 40-80 arasında değiştiği belirlenmiştir. Ayrıca inokule edilen fidanların gelişmesinin steril edilmeyen topraklarda bile kontrol uygulamalarından daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

Lu ve ark. (1998) değişik ektomikorizal mantar türlerinin sporları ile inokule edilen *Eucalyptus globulus* fidanlarının gelişimi ve ektomikoriza oluşumunu araştırmışlardır. Bu amaçla 7 günlük *E. globulus* fidanları içerisinde 25 mg hava kuru spor bulunan bir su süspansiyonu ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan 65 ve 110 gün sonra ektomikorizal gelişim değerlendirilmiş, 65. günde uygulamaların yaklaşık % 50'sinin ektomikoriza oluşturduğu ve 110. günde ise fidanların hemen hemen hepsinin ektomikorizal olduğu belirlenmiştir. *Laccaria*, *Hydnangium*, *Descolea*, *Descomyces*, *Scleroderma* ve *Pisolithus* türleri diğer mantar türlerinden daha fazla ektomikoriza oluşturmuştur. *Russula*, *Boletus*, *Lactarius* ve *Hysterangium* türlerinin ise ektomikoriza oluşturmadığı tespit edilmiştir. Araştırmanın sonucunda okaliptüs için fidanlık inokulasyon programlarında *Laccaria*, *Descolea*, *Scleroderma* ve *Pisolithus* mantar türlerinin uygun olduğu belirlenmiştir.

Arazi koşullarında kestane fidanları *Amanita caesarea* ve *Boletus edulis*'in misel kültürleri ile aşılanmış ve ektomikorizal gelişim incelenmiştir. Ektomikorizanın gelişimi periyodik olarak kök uçlarından alınan örneklerin incelenmesiyle araştırılmıştır. Araziye dikimden 6 yıl sonra *A. caesarea* ile inokule edilen bitkilerin % 88'inde ve *B. edulis* ile inokule edilen bitkilerin % 82'sinde ektomikorizanın bulunduğu saptanmıştır. Bununla birlikte *A. caesarea* ve *B. edulis* basidiokarpları gözlenmemiştir (**Meotto ve ark., 1998**).

Nezzar-Hocine ve ark. (1998)'nın *Cedrus atlantica* ile *Tricholoma tridentinum* arasındaki ektomikorizal ilişkiyi araştırdıkları çalışmada 2 farklı inokulum tipi

kullanılmıştır. Katı inokulumu hazırlamak amacıyla Pachlewski Oddoux (PO) sıvı ortamı ile nemlendirilen 400 ml perlit, torf:vermikülit (1:9, v:v) veya torf:perlit (1:4, v:v) karışımı 1 saat boyunca 120 °C’de steril edilmiştir. Daha sonra şişeler PO ortamında 2 ay boyunca geliştirilen 1 cm²’lik agarlı misel parçası ile inokule edilmiştir. İnokulum karanlıkta 20 °C’de 9 haftalık bir gelişmeden sonra kullanılmıştır. Alginat tane inokulumu ise 175 ml’lik şişelerde PO sıvı ortamında 8 hafta boyunca geliştirilen misellerin kalsiyum alginat jele yapıştırılması ile hazırlanmıştır. İnokulasyonlar 8 haftalık tüplü fidanlarda bulunan fidanların kök sistemleri üzerine katı inokulumun yerleştirilmesi veya alginat tane inokulumunun dikim sırasında fidan substratına karıştırılması (25 ml/l) ile yapılmıştır. Mikorizal ilişki *C. atlantica* orman toprağında gnotoksenik koşullarda geliştirilen fidanların köklerinde ve katı inokulum kullanıldığında sağlanmıştır. Bitkiler yapay substratta geliştirildiğinde ve alginat tane inokulumu kullanıldığında mikorizal gelişim sağlanamamıştır.

Rincón ve ark. (1999)’nın *P. pinea* türüne ait fidanlık inokulasyon programlarında kullanılacak ektomikorizal mantar türlerinin seçimi amacıyla yaptıkları çalışmada 60 farklı fungal izolat kullanılmış, bu izolatlara ait vejetatif misel inokulumu hazırlanarak sera koşullarında tüplü fidanlarda ektomikoriza sentezi incelenmiştir. Vejetatif inokulum hazırlamak için her bir fungal izolat MMN sıvı ortamında (25 °C, 7-15 gün) geliştirilmiştir. Daha sonra 350 ml MMN sıvı ortamı (2.5 g/l glikoz) ile nemlendirilmiş ve otoklav edilmiş torf:vermikülit karışımı (50:550 ml) içeren 1 lt’lik şişeler her bir izolata ait 40-50 ml misel süspansiyonu ile inokule edilmiştir. İnokule edilen şişeler karanlıkta 25 °C’de 1 ay boyunca inkübe edilmiştir. Elde edilen torf:vermikülit inokulumu steril edilmiş substrat (torf:vermikülit, 1:1, v:v) ile 1:4 oranında (inokulum:substrat, v:v) karıştırılmıştır. Steril koşullarda çimlendirilen *P. pinea* fidanları inokule edilmiş substratla doldurulan 175 ml hacmindeki kaplara şaşırtılmış ve fidanlar 4 ay boyunca serada kontrollü koşullarda (20-25 °C, > % 40 nem) yetiştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda 8 cinse (*Amanita*, *Hebeloma*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Scleroderma* ve *Suillus*) ait 17 farklı izolatın *P. pinea* fidanları ile ektomikoriza oluşturduğu belirlenmiştir.

T. matsutake izolatlarının *in vitro*’da *Pinus densiflora* fidanları ile mikoriza oluşturabilme yeteneğinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada dezenfekte edilen *P. densiflora* tohumları MNC (Modifiye Edilen Norkrans C) besin ortamında aseptik olarak çimlendirilmiştir. Ektomikorizal sentez açık ve kapalı sistemde yürütülmüştür.

Açık sistemde geniş ağızlı polimetilpenten şişeler (150 ml) glikozun bulunmadığı sıvı MNC ortamı ile nemlendirilmiş (35 ml ortam/100 ml substrat) ve otoklav edilmiş vermikülit:sfagnum yosunu (80:1, w/w) substratı ile doldurulmuştur. Açık sistemle aynı tipteki 600 veya 300 ml’lik şişelerin kullanıldığı kapalı sistemde ise şişeler sırasıyla 300 ml veya 150 ml vermikülit:sfagnum yosunu (80:1 w/w) substratı ile doldurulmuştur. Bu sistemde substrat ya azaltılmış glikozun kullanıldığı MNC ortamı (2 g/l) ile ya da Ohta sıvı ortamı ile nemlendirilmiştir. Şişeler otoklav edildikten sonra sıvı ortamda geliştirilen *T. matsutake* izolatlarına ait misel inokulumu ile inokule edilmiştir. Aynı zamanda aseptik olarak çimlendirilen 2 fide substrata transfer edilmiştir. Kapalı sistemde şişelerin ağzı 3 kat halinde polivinilklorid film ile örtülmüş ve fidanın hava alabilmesi için 6 mm çapında 2 delik bırakılmıştır. Hem açık hem de kapalı sistem hazırlandıktan sonra şişeler bir büyüme odasına (20 °C, ışık yoğunluğu: 6000 lux, 24 saat sürekli ışık) yerleştirilmiş ve 6 ay boyunca inkübe edilmiştir. İnokulasyondan 3 ay sonra fungus çam fidanının yan kökleri üzerinde fungal bir kılıf ve Hartig net oluşturmuştur. Araştırmanın sonucunda kültüre alınan *T. matsutake* miselinin *in vitro*’da *P. densiflora* fidanları ile ektomikoriza oluşturabildiği belirlenmiştir (Yamada ve ark., 1999).

Guerin-Laguet ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada deneysel koşullarda *Pinus sylvestris* ve iki yenilebilir *Lactarius* türü arasındaki mikorizal ilişkiyi incelemişlerdir. *L. deliciosus* ve *L. sanguifluus*’un misel gelişimi *in vitro*’da glikoz, aminoasitler ve vitaminleri içeren bir besin ortamında sağlanmıştır. Aseptik olmayan koşullarda düşük bir besin miktarı ile dışarıdan bir glikoz ilavesi olmaksızın mikorizal kolonizasyon hızlı ve kuvvetli olarak belirlenmiştir. *P. sylvestris*’in gelişimi üzerine mikorizal kolonizasyonun pozitif bir etkisinin olduğu gözlenmiştir. Akselik koşullarda ve yüksek bir besin maddesi miktarı ile 10 g/L glikozda mikoriza oluşumu teşvik edilmiştir. Yüksek fosfor seviyesinde (1 mM) ve 0.1, 1.0 veya 10 g/l glikozda *P. sylvestris*’in gelişimi inokulasyonla azalmıştır. Araştırmanın sonucunda 2 yıldan daha fazla süren bir yetiştirme periyodunda çam fidanlarının kök sistemlerinin yoğun bir biçimde *L. deliciosus* ile kolonize olduğu belirlenmiştir.

Rincón ve ark. (2001)’nın yaptıkları çalışmada 7 farklı ektomikorizal mantar türü ile inokule edilen tüplü *Pinus pinea* fidanlarının ektomikoriza oluşturma etkinlikleri belirlenmiştir. Çalışmada *Melanogaster ambiguus*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon luteolus*, *Rhizopogon roseolus* ve *Scleroderma verrucosum* türleri spor inokulumu

olarak *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria laccata* ve *Pisolithus tinctorius* türleri ise vejetatif inokulum olarak uygulanmıştır. Vejetatif inokulum olarak denenen mantarlar arasında en yüksek ektomikoriza oluşum yüzdesi *H. crustuliniforme*'den elde edilmiştir. *L. laccata* tarafından oluşturulan ektomikoriza, uygulanan inokulum miktarına bağlı olarak % 11-40 arasında değişiklik göstermiştir. Uygulanan *P. tinctorius*'un spor inokulumu, etkili inokulum miktarlarında yaklaşık % 50 oranında ektomikoriza oluşturmuştur.

Wang ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada *Pinus radiata*, *P. densiflora* ve *Picea abies* fidanları *L. deliciosus* izolatları ile iyi bir ektomikoriza oluşturmuştur. Gençken portakal renkli olan mikoriza yaşlanmayla birlikte koyu yeşil renk almıştır.

Yamada ve ark. (2001a)'nın yaptıkları çalışmada *in vitro*'da *Lyophyllum*, *Tricholoma*, *Leucopaxillus*, *Suillus*, *Rhizopogon*, *Lactarius* ve *Morchella* cinsine ait yenilebilir mantarların *Pinus densiflora* ile ektomikoriza oluşumu incelenmiştir. Akselik olarak çimlendirilen *P. densiflora* fideleri glikozun bulunmadığı MNC sıvı ortamı ile nemlendirilen vermikülit:sfagnum yosunu karışımı ile doldurulan geniş ağızlı polimetilpenten plastik şişelerde (120 ml hacminde) bulunan farklı fungal izolatlar ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonra bitkiler 20 °C sıcaklık ve 5000-7000 lux sürekli ışık alan bir büyüme odasında inkübe edilmiştir. *Lyophyllum*, *Tricholoma*, *Suillus*, *Rhizopogon* ve *Lactarius* cinsine ait test edilen mantarların çoğu fungal inokulasyondan 2-4 ay sonra ektomikoriza oluşturmuştur. Daha sonra mikorizal fidanlar büyüme odası koşullarında açık saksı toprağına transfer edilmiştir. Hemen hemen tüm mikorizal fidanlar açık saksı toprağına dikimden 8-9 ay sonra yeni mikoriza geliştirmiş ve onların konukçularını güçlendirmiştir.

González-Ochoa ve ark. (2003)'nin iki Akdeniz çam türü (*Pinus halepensis* ve *P. pinaster*) ve 7 ektomikorizal mantar türü (*Pisolithus tinctorius*, *Lactarius deliciosus*, *L. sanguifluus*, *Suillus mediterraneensis*, *S. collinitus*, *S. bellinii* ve *Rhizopogon roseolus*) ile yaptıkları bir ektomikoriza çalışmasında spor süspansiyonu ve misel inokulumu olmak üzere 2 farklı inokulum tipi kullanılmıştır. *Lactarius*, *Rhizopogon* ve *Suillus* türleri için fidan başına 10 ml misel inokulumu uygulanmıştır. İki farklı substratın (kompost haline getirilmiş çam ağaç kabuğı ve gübrelenen torf:vermikülit karışımı) bitki boyu ve mikoriza oluşum hızına etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada sonuçlar iki substrat arasında önemli derecede farklılıklar olduğunu göstermiştir. Hem ektomikoriza oluşum hızı hem de fidan yüksekliği mantar türüne ve kullanılan

inokulum tipine göre değişmekle birlikte, genellikle en iyi sonuçlar gübrelenen torf:vermikülit karışımından elde edilmiştir.

Laccaria bicolor'un *Pinus montezumae* ile *in vitro*'daki ektomikoriza oluşumu vermikülit, torf ve BAF sıvı ortamı karışımı (300 ml vermikülit, 30 ml torf, 200 ml BAF) içeren 1 litrelik şişelerde incelenmiştir. Substrat otoklav edildikten sonra BAF sıvı ortamında geliştirilen *L. bicolor* ile inokule edilmiş ve şişelere *P. montezumae* tohum ekimi yapılmıştır. İnokulasyondan 15 ay sonra ektomikoriza oluşumu sağlanmıştır (**Santiago-Martínez ve ark., 2003**).

Pinus densiflora'nın gelişimi üzerine *Tricholoma matsutake* inokulasyonunun etkileri araştırılmıştır. İnokulasyondan 75 gün sonra hifler kısa kökler üzerinde gelişmiş ve Hartig net gözlenmiştir (**Guerin-Laguette ve ark., 2004**).

Sera koşullarında yenilebilir *Lactarius* türleri ile *Pinus pinaster* ve *P. sylvestris* fidanlarını aşılama da farklı metotlar (misel süspansiyonu, vejetatif inokulum ve alginat misel) denenmiştir. İnokulum üretimi için mantar inokulasyonları hem *in vitro* saf kültür sentezinde hem de farklı teknikler kullanılarak doğrudan doğruya serada yapılmıştır. *L. deliciosus* ile *in vitro* inokulasyonlar ile tamamen kolonize olmuş fidanlar elde edilmiştir. Bununla birlikte, serada 4 aylık bir gelişmenin sonrasında şaşırtılan fidanların mikorizal kolonizasyonunda kuvvetli bir azalma tespit edilmiştir. *L. deliciosus*'un 178 nolu ırkının vejetatif inokulumu ile yapılan inokulasyonlar, mikorizal fidanların üretiminde en etkili yöntem olarak belirlenmiştir. Bu ırk ile inokule edilen tüm fidanlar, kolonizasyon hızları nispeten düşük olmasına rağmen kolonize olmuşlardır (**Parlade ve ark., 2004**).

Uygulanan farklı fosfor seviyelerinde *Eucalyptus dunnii* fidanlarının gelişimi üzerine ektomikorizal izolatların etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada *Paxillus involutus* (INRA-Cou), *Hysterangium gardneri* (UFSC-Hg93), *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt116) ve *Chondrogaster angustisporus* (UFSC-Ch163) izolatları kullanılmıştır. Ektomikorizal inokulum sıvı besin ortamı ilave edilen torf:vermikülit karışımında aseptik olarak üretilmiştir (**Souza ve ark., 2004**).

Flores ve ark. (2005) 5 farklı çam türü ile *Lactarius indigo*'nun mikorizal ilişkilerini araştırmışlardır. Çalışma torf:vermikülit substratı ve misel inokulumu kullanılarak kontrollü bir büyüme odasında yürütülmüştür. İnokulasyondan 25 gün sonra ektomikoriza oluşumu sağlanmıştır.

2.4. Ektomikoriza Teşhisi ve Tanımlanması İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Fidanlarda ektomikoriza oluşumu sağlandıktan sonra kökler topraktan çıkarılmakta ve zarar verilmeden ince bir elek üzerinde yıkanmaktadır. Kökler yıkandıktan sonra 2-4 cm uzunluğunda parçalara ayrılmakta, karıştırılmakta ve tesadüfi olarak örnekler seçilmektedir. Teşhis için öncelikle ince kökler tercih edilmektedir. Kök örnekleri yıkanıp temizlendikten sonra teşhis edilinceye kadar ağzı sıkıca kapatılmış şişelerde % 50'lik etanolde aylarca, hatta yıllarca muhafaza edilebilmektedir **(Brundrett ve ark., 1996)**.

ECM kökler çoğunlukla stereomikroskopta teşhis edilebilmesine rağmen, bu ilişkinin iç ayrıntıları kök hücreleri ve hifal örtüdeki pigmentlerin uzaklaştırılması ile gözlenebilmektedir. Bitki dokularındaki iç özelliklerin görüntülenebilmesi amacıyla kimyasal maddelerin kullanıldığı temizleme yöntemleri uygulanmaktadır. Köklerin temizlenmesi için genellikle otoklavda kökleri 15-20 dakika % 10'luk KOH (w/v) solüsyonunda bekletmek yeterlidir. Bitki dokularındaki fungal yapılar ise boyaların kullanımı ile gözlenebilmektedir. KOH'ta ısıtılarak temizlenen köklerdeki mikorizal yapıların boyanmasında genellikle laktoglisierolde (1:1:1 laktik asit:gliserol:su) Trypan mavisi (% 0.05, w/v) veya Chlorazol Black E (CBE) (% 0.03 w/v) kullanılmaktadır. Kökler boyandıktan sonra % 50 gliserolde muhafaza edilebilmektedir. Boyanmayan ECM kökler genellikle rengi, kalınlığı, yapısı ve dallanma şeklindeki farklılıklar ile stereomikroskopta mikorizal olmayan köklerden ayırt edilebilmektedir. Bununla birlikte, Hartig net'i gözleyebilmek için temizleme, boyama, kesit alma ve ışık mikroskobunda inceleme gereklidir. Ektomikorizal köklerin teşhisinde kök kalınlaşması, kök dallanma şekli ve yoğunluğu, external hiflerin bulunuşu ve yapısı, sclerotia, fungal örtünün kalınlığı, rengi ve yapısı, kimyasallara reaksiyon, Hartig netin bulunuşu, kalınlığı ve yapısı gibi özellikler göz önünde bulundurulmaktadır **(Brundrett ve ark., 1996)**.

Cedrus atlantica fidanlarının *Tricholoma tridentinum* ile inokulasyonundan 2 ay sonra mikorizal değerlendirme için bitkiler sökülüş ve mikorizanın morfolojik özellikleri bir stereomikroskop altında incelenmiştir. Seçilmiş kök parçaları % 70 formaldehit:etanol:asetik asit (5:90:5, v:v:v) karışımında sabitlenmiştir. Mikroskopik olarak anatomik özellikleri incelemek için elle veya bir jilet yardımıyla kesit alınmıştır. Alınan kesitler laktofenol ortamında cotton blue (pamuk mavisi) kullanılarak boyanmış

ve Amman's solüsyonu ile lam üzerine yerleştirilmiştir. Daha sonra ışık mikroskopunda incelenmiştir (**Nezzar-Hocine ve ark., 1998**).

Vaario ve ark. (1999) *in vitro*'da yavaş gelişen bir tür olan *Abies firma* ve *Pisolithus tinctorius* arasındaki ektomikoriza sentezini araştırmışlardır. Çalışmada inokulasyondan 2-3 ay sonra ektomikoriza oluşumu sağlanmıştır. Kökler temizlendikten sonra mikrotomla 4-6 µm kalınlığında kesit alınmıştır. Alınan kesitler 45 dakika boyunca % 1'lik hidrojen peroksit ile muamele edilmiş ve yıkandıktan sonra % 1'lik sodyum tetraboratda % 0.05'lik toluidin mavisi ile boyanmıştır. Örnekler daha sonra ışık mikroskopunda incelenerek fungal örtü ve Hartig net gözlenmiştir.

Yamada ve ark. (1999)'nın *Tricholoma matsutake* izolatlarının *in vitro*'da *Pinus densiflora* fidanları ile mikoriza oluşturabilme yeteneğinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada çam köklerinin fungal kolonizasyonu stereomikroskopta incelenmiştir. Fungal kolonizasyon doğrulandıktan sonra kök uçları bütün olarak veya kesit alınarak lam üzerindeki laktofenol veya laktogliserol üzerine konulmuştur. Daha kapsamlı mikroskopik inceleme kuru olarak (40 X) veya immersion yağı (100 X) kullanılarak ışık mikroskopunda yapılmıştır.

Pinus densiflora ile ortak yaşayan yenilebilir mantarlarda (*Lyophyllum*, *Tricholoma*, *Suillus*, *Rhizopogon* ve *Lactarius*) ektomikorizanın morfolojisi ve anatomisi tanımlanmıştır. *In vitro*'da ve açık saksı toprağında elde edilen mikorizanın dış morfolojisi bir stereomikroskop altında incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Işık mikroskobu kullanılarak daha ileri mikroskopik incelemeler yapılmıştır. Ektomikoriza oluşumunu doğrulamak için her bir fungal türün enine kesitleri hazırlanmış ve mikroskopik olarak incelenmiştir. *In vitro* ve açık saksı kültürü koşullarında mikorizal anatomi hemen hemen aynı olmasına rağmen, rizomorflar ve hidrofonik havalı hiflerin gelişimi gibi dış morfolojik yapı aynı fungal türde iki koşul arasında farklılık göstermiştir. Çalışma sonucunda farklı fungal türlerin tamamen gelişmiş, olgun mikorizası ektomikorizal morfotip olarak ayırt edilebilmiştir (**Yamada ve ark., 2001b**).

In vitro'da *Laccaria bicolor* ile *Pinus montezumae* arasında gelişen mikoriza FAA (formalin:asetik asit:alkol)'da sabitlenmiştir. Mikorizanın anatomisini gözlemek için mikorizal köklerden elle kesit alınmıştır. Daha sonra fungal örtü (mantle) ve Hartig net ışık mikroskopunda incelenmiştir (**Santiago-Martínez ve ark., 2003**).

Flores ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada 5 farklı çam türü ile *Lactarius indigo* arasındaki mikorizal oluşumu incelemişlerdir. Mikoriza stereomikroskopta teşhis

edilmiş ve fotoğrafı çekilmiştir. Daha sonra mikoriza FAA'da sabitlenmiş, mikrotomla 1 µm'lik kesitler alınmış ve alınan kesitler % 1'lik asetik asitte % 1'lik toluidin mavisi ile boyanmıştır. Daha sonra örnekler ışık mikroskopunda incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Fungal örtü ile Hartig net'in yapısı, görünüşü ve morfolojisi belirlenmiştir. Mikorizanın turuncu-yeşilimsi renkte, lateksin turuncu renkte olduğu gözlenmiştir.

Günay (2005) tarafından okaliptüs ve fıstık çamı ormanlarındaki ektomikorizal fungusların teşhisi amacıyla yapılan çalışmada emici kökler, incelemenden bir gece önce suda ıslanmış ve sonra çeşme suyunda dikkatli bir şekilde yıkanmıştır. Makroskopik özelliklerin belirlenmesi amacıyla emici kökler yıkandıktan sonra bir petri kabında su ile kaplanmış ve stereomikroskop altında (X5-X50 büyütmede) incelenmiştir. Mikorizal emici kökler burada renk, form, büyüklük ve mevcut olan hifler yönünden gruplandırılmıştır. Mikroskopik özelliklerin belirlenmesi amacıyla ektomikoriza yaklaşık 10-15 saniye laktofenol pamuk mavisi veya toludin mavisinde tutularak lam üzerinde preparat yapılmıştır. Bunun için % 0.1 (w/v) pamuk mavisi (cotton blue) içeren % 10'luk (v/v) laktofenol kullanılmıştır. Bu boya ile mikorizanın içerdiği hifler ve fungal dokular maviye boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir. Mikroskopik incelemede fungusa ait iplikçikler, bir araya gelmiş hifler, sklerotlar, fungal örtü ve Hartig net oluşumu araştırılmıştır.

Tüfekçi (2007)'nin doğal populasyonlardaki Toros sediri (*Cedrus libani*) mikorizasının izole edilmesi amacıyla yaptığı çalışmada sedir fidanları sökölüp kökler bol musluk suyu ile yıkanarak toprakları temizlenmiş ve saf sudan geçirilmiştir. Mikorizal kolonizasyon yoğunluğunun belirlenmesinde grid aralıkları (*gridline intersect*) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde 1 cm²'lik karelere bölünmüş 9 cm'lik bir petri kabına 1 cm uzunluğunda kesilmiş kökler rastgele dağıtılmıştır. Stereomikroskop kullanılarak 40 kat büyütme ile grid hatları üzerine denk gelen kökler dikey ve yatay boyutta sayılmıştır. Grid hatlarından geçen bütün köklerin mikorizalı veya mikorizasız oldukları kaydedilmiştir. Bir örneğin mikoriza yüzdesi ise % Mikoriza = mikorizalı kök sayısı x 100 / toplam kök sayısı formülüne göre hesaplanmıştır. Kökün anatomik yapısının incelenmesi amacıyla kökler bir petri kabı içerisine alınarak 1 cm uzunluğunda kesilmiştir. Daha sonra % 10'luk KOH çözeltisi köklerin içinde bulunduğu tüplere boşaltılarak, 65 °C'lik kurutma fırınında 1 saat tutulmuştur. Tüplerdeki KOH boşaltılıp, yerine 2N HCl konulmuş ve tüpler yeniden 65 °C'lik kurutma fırınında 1 saat bekletilmiştir. Tüplerdeki HCl döküldükten sonra içine % 0.01'lik Trypan blue çözeltisi

eklenmiş ve 10-15 dk kurutma fırınına konularak, köklerin boyama işlemi tamamlanmıştır. Kökler boyandıktan sonra ışık mikroskobunda incelenmiştir.

2.5. Ektomikorizanın Bitki Gelişimine Olan Etkisi İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Günümüzde ağaçlandırma çalışmalarında fidanlık, sera ve arazide ektomikorizal mantarların kullanımı yoğun bir şekilde araştırılmaktadır.

Yapılan bir çalışmada ektomikorizal fidanların ektomikorizal olmayan fidanlara göre yaklaşık 5 kat daha fazla hayatta kalma şansına sahip oldukları ve büyümelerinin de iki kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Göbl, 1975).

Ektomikorizal mantar türü *Boletus suillus* ile aşıl原因 *Acacia auriculiformis*, *Albizia lebbek*, *Gliricidia sepium* ve *Leucaena leucocephala* fidanlarında ektomikoriza bitki gelişimini teşvik etmiş, P ve N alımını artırmıştır (Osonubi ve ark., 1991).

Paxillus involutus ektomikorizasının *Picea abies* fidanlarında büyüme ve mineral besin elementi alımına etkileri incelenmiş, ektomikorizanın bitki gelişimini ve bitkideki N, P, Ca ve Zn konsantrasyonlarını artırdığı ve ektomikorizalı bitkilerdeki kök gelişiminin gövde gelişiminden daha fazla arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca 8 aylık fidanlarda bitki kuru madde ağırlıkları bakımından ektomikorizalı olanlar önemli oranda yüksek bulunmuştur (Eltrop, 1993).

Yapılan bir çalışmada bazı ektomikorizal mantar türlerinin sporları (*Laccaria*, *Scleroderma*, *Pisolithus*) *Eucalyptus globulus* fidanlarına aşılandığında fidanların kök sistemini geliştirerek, daha hızlı gelişmesini sağladıkları ve fidanların hayatta kalmasını teşvik ettikleri belirlenmiştir Ektomikorizal mantarlarla inokule edilen fidanlarının kuru ağırlıkları inokule edilmeyen fidanların kuru ağırlığının % 90-225'i arasında değişmiştir (Lu ve ark., 1998).

Yoğun gübrelemenin uygun mikorizal gelişmeyi sınırlayabileceğini savunan Quoreshi ve Timmer (1998)'in yapmış oldukları çalışmada tüplü *Picea mariana* fidanları iki ektomikorizal mantar türü (*Hebeloma crustuliniforme* ve *Laccaria bicolor*) ile aşılanmıştır. Ektomikorizal aşılama fidan biyomasını etkilememiş, fakat N (% 6-17), P (% 5-20) ve K (% 4-18) alımını artırmıştır.

İnokule edilmeyen kontrol fidanları ile karşılaştırıldığında *L. hatsudake* ile inokule edilen *Pinus densiflora* fidanlarında toplam kuru ağırlıkta (% 150), kök

uzunluğunda (% 150) ve lateral köklerin sayısında (% 160) önemli bir artış sağlanmıştır (Akitsu ve ark., 2000).

Hattori ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada *in vitro*'da *Lactarius hatsudake* ile *Pinus densiflora* fidanlarının simbiyotik yetiştiriciliğini araştırmışlardır. İnokule edilmeyen kontrol fidanları ile karşılaştırıldığında *L. hatsudake* ile inokule edilen fidanlarda toplam kuru ağırlık, kök ve sürgün uzunluğunda artış saptanmıştır.

Eucalyptus dunnii'nin gelişimine ektomikorizal inokulumun etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada *Pisolithus* sp. inokulumu vermikülit+besin solüsyonunda üretilmiş, daha sonra % 0, 1, 3, 5 ve 10 (v/v) oranında torf:vermikülit (30:70, v/v) ortamına aktarılmıştır. İnokulasyon, inokulum konsantrasyonuna bağlı olarak kök kolonizasyonunu, bitki gelişimini ve fosfor alımını teşvik etmiştir. % 1'lik inokulumda bitki kuru maddesi, kontrol bitkilerinin kuru madde içeriğinden farklılık göstermemiştir. % 3 ve % 5'lik inokulum seviyelerinde bitkilerin kontrole göre daha fazla kuru madde içeriğine sahip oldukları belirlenmiştir. % 10 inokulumda ise sürgün kuru ağırlığı, kontrole göre % 70 ve fosfor içeriği de % 130 daha yüksek bulunmuştur. Kök kuru ağırlığında da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca bitki yüksekliği ve bitki çapı da inokulasyondan pozitif olarak etkilenmiştir. Kök:sürgün oranları ise inokulasyondan etkilenmemiştir. Çalışma sonucunda en etkili dozlar % 3 ve daha yüksek inokulum seviyeleri olarak belirlenmiştir (Alves ve ark., 2001).

Hebeloma crustuliniforme ve *Laccaria bicolor* ile inokule edilen *Picea abies* fidanları serada 6 ay boyunca vermikülit:torf karışımlarında ve değişik N'lu gübre koşullarında yetiştirilmiştir. N'lu gübreleme ile toplam biyomas artmasına rağmen, kök:sürgün oranı, kısa köklerin sayısı ve mikoriza oluşumu azalmıştır. Kontrol uygulaması ile karşılaştırıldığında *H. crustuliniforme* veya *L. bicolor* ile yapılan fungal inokulasyonda sürgün ve toplam biyomas önemli oranda artmış, fakat kök:sürgün oranı azalmıştır. Mikoriza oluşumu ayrıca bitkideki N ve P içeriğini önemli oranda artırmış, fakat Mn içeriğini azaltmıştır (Brunner ve Brodbeck, 2001).

Cripps (2001) yaptığı bir çalışmada *Populus tremuloides* fidanlarının gelişimini artırmak için *in vitro*'da, 9 farklı ektomikorizal mantar izolatını denemiştir. İnokulasyonla fidanların boyu, çapı ve mikorizalı kök sayısı artmıştır. *Inocybe lacera* ile aşılı fidanlar kontrol ile farklılık oluşturmamış, ancak diğer izolatlar kontrole göre 2-4 kat daha fazla biyomas üretimi sağlamışlardır. *P. tremuloides* fidanlarının gelişiminde

Paxillus vernalis, *Tricholoma scalpturatum*, *Hebeloma mesophaem*, *Thelephora terrestris* ve *Laccaria* türleri ümit verici olarak belirlenmiştir.

Shresta (2002) saf kültürünü elde ettiği dört ektomikorizal mantar türünü *Pinus roxburghii* fidanlarına aşılamış ve aşıl原因an fidanlarda aşıl原因mayanlara göre daha yüksek boy, daha fazla gövde ve kök ağırlıkları elde etmiştir. Araştırmacı aşılı fidanların arazide daha yüksek tutma başarısı gösterdiğini de tespit etmiştir.

Ektomikorizal mantar türü *Lactarius deliciosus* ile aşıl原因an *Pinus sylvestris* fidanlarında ektomikoriza bitki büyümesini artırmıştır. Steril edilen topraklarda dikimden 5 ay sonra *L. deliciosus* ile inokule edilen fidanların sürgün uzunluğu inokule edilmeyen fidanlara göre % 46-132 daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca inokule edilen fidanların kuru ağırlığının da kontrol fidanlarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (**Guerin-Laguet ve ark., 2003**).

Tricholoma matsutake ile inokule edilen *Pinus densiflora* fidanlarının toplam kuru ağırlıklarının kontrole göre % 98 oranında artırdığı belirlenmiştir (**Guerin-Laguet ve ark., 2004**).

Niemi ve ark. (2004) iğne yapraklı ağaç türlerinin vejetatif çoğaltımında ektomikorizal mantarların kullanıldığını, bu mantarlar ile aşıl原因ma ile *in vitro* ve *in vivo* kültürlerde kök oluşumu ve sonraki kök dallanmasının arttığını bildirmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada *Pisolithus microcarpus* ve *Chondrogaster angustisporus* izolatlarının *Eucalyptus dunnii* fidanlarının gelişimini, fosfor alımını, bitki boyunu ve kuru maddeyi teşvik ettiği belirlenmiştir (**Souza ve ark., 2004**).

Eucalyptus urophylla'nın ektomikorizal *Scleroderma* sporları ile inokulasyonu ile elde edilen fidanlar inokule edilmeyen kontrol fidanları ile karşılaştırıldığında sürgün boyunun % 19-55 ve toplam biyomasın % 25-41 oranında arttığı tespit edilmiştir (**Chen ve ark., 2006**).

Turjaman ve ark. (2006) *Shorea seminis* fidanlarını ektomikorizal mantar türleri ile aşıl原因manın fidanların boy ve biyoması yanında, N ve P alımlarını da arttırdığını bildirmişlerdir.

Repac (2007) ektomikorizal mantarlar ile inokule edilen *Picea abies* fidanlarının gelişimini ve ektomikoriza oluşumunu araştırmıştır. Çalışmada torf, kayın ağaç kabuğu kompostu, torf:perlit (1:1) ve kompost:perlit (1:1) substratları *Hebeloma crustuliniforme*, *Hygrophorus agathosmus* ve *Paxillus involutus*'un vejetatif inokulumu ile aşıl原因mıştır. Birinci gelişme mevsiminden sonra serada yetiştirilen fidanların

mikoriza oluşum oranı ve gelişimleri değerlendirilmiştir. Torf içeren substratlarda yetiştirilen fidanlar daha büyük toprak üstü aksamına ve toplam kuru ağırlığa sahip iken, mikoriza oluşum oranı kompost içeren substratlarda yetiştirilen fidanlardan daha düşük bulunmuştur. Fungal uygulamalar arasında hem mikoriza oluşum oranı hem de fidan gelişimi bakımından önemli farklılıklar bulunmamıştır. En yüksek kök kuru ağırlık değerleri torf ortamında yetiştirilen ve *Hebeloma* ile inokule edilen fidanlardan elde edilmiştir. Araştırmada gelişim parametrelerinin mikoriza oluşum derecesi ile negatif ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Sedir fidanlarının (*Cedrus libani*) büyüme, gelişme ve besin elementleri alımına ektomikorizal aşılamanın etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada sera koşullarında steril edilmiş ve edilmemiş üç değişik yetiştirme ortamında, üç farklı ektomikorizal mantar türünün (*Lactarius delicious*, *Hebeloma crustuliniforme* ve *Tricholoma ustale*) iki değişik aşılamanın (tohum ekimi aşamasında ve fide dikimi aşamasında) etkileri incelenmiştir. Vejetasyon süresi sonunda fidanların gelişme parametreleri ölçülmüş, toprak üstü aksamındaki besin maddesi içerikleri ile kökteki ektomikoriza enfeksiyon oranları belirlenmiştir. Özellikle *H. crustuliniforme* türü ile fide şaşırtması aşamasında yapılan aşılamanın, diğer mikoriza türlerine özellikle de tohum ekimi sırasında yapılan aşılamaya göre sedir fidanlarının gelişimi üzerine etkisi daha etkili bulunmuştur. Steril edilmemiş ortam ile kıyaslandığında, steril edilmiş ortamlarda *H. crustuliniforme* ve *L. delicious* ektomikoriza türleri ile her iki aşılama aşamasında yapılan uygulamalar sedir fidanlarının gelişimine ve besin elementleri alımına olumlu katkılar sağlamıştır. Araştırma bulguları ile düşük düzeyde bitki kök enfeksiyonu gerçekleşmesine karşın, mikoriza aşılamanın sedir fidanı gelişimine ve besin elementleri alımına önemli katkılar sağladığı belirlenmiştir (Tüfekçi, 2007).

2.6. Ektomikorizal Mantar Yetiştiriciliği İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Yenilebilir mikorizal mantarların çok azı başarılı bir şekilde yetiştirilebilmektedir. Günümüzde birçok ektomikorizal mantar türünün yetiştiriciliği konusunda metotlar geliştirilmekle birlikte, kontrollü koşullarda yalnızca birkaç *Tuber* türü başarılı bir şekilde ve ticari olarak yetiştirilebilmektedir (Wang ve Hall, 2004). *Tuber magnatum*, *Tricholoma matsutake*, *Boletus edulis* ve *Lactarius delicious* gibi ticari açıdan önemli ve dünyanın en pahalı ektomikorizal mantar türlerinin çoğu ve diğer birçok

ektomikorizal mantarın yetiştiriciliği için yapılan çalışmalar başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Hall ve ark., 1998; Wang ve Hall, 2004).

Yapılan bir çalışmada *Hebeloma vinosophyllum*'un konukçu bir bitki olmadan gelişme ortamında primordium ve mantar oluşturduğu belirlenmiştir (Suzuki, 1979).

Lactarius türleri, *Laccaria laccata*, *Tricholoma terreum* ve *Cantharellus cibarius* ektomikorizal mantarlarının kültüre alınmalarıyla ilgili olarak yapılan bir çalışmada bu mantarların mikorizal ortakları olan bitki kökleriyle birlikte geliştiği bildirilmiştir. *Boletus granulatus* ve *Lactarius deliciosus* türleri sera koşullarında çam köklerine inokule edilmiş ve inokulasyondan 3-4 yıl sonra bu bitkiler doğal ortama şaşırtılmak suretiyle mantar elde edilmiştir (Poitou ve ark., 1984).

Ektomikorizal mantar *Hebeloma cylindrosporum* aksenik koşullarda sentetik bir ortam üzerinde konukçu bitkisi *Pinus pinaster* ile yetiştirildiğinde sporlu mantarlar elde edilmiştir. Konukçu bitki olmadığında *H. cylindrosporum* yalnızca primordium ve olgunlaşmamış mantarlar oluşturmuştur. Toplam 9.5 aylık süre sonunda 144 mantar elde edilmiştir. *H. cylindrosporum*'un miseli ile 1 aylık *P. pinaster* bitkilerinin inokulasyonundan yaklaşık 15-30 gün sonra 1 l'lik şişelerde mantar oluşumu başlamıştır. 18 °C'de her bir şişede gelişen ortalama mantar sayısı yaklaşık 3.5 olarak belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen mantarların sporlarının çimlenme yeteneğine sahip olduğu da tespit edilmiştir (Debaud ve Gay, 1987).

Ohta (1994a) tarafından yapılan çalışmada saf kültürde *Lyophyllum shimeji* yetiştiriciliği araştırılmıştır. En hızlı misel gelişimi sentetik sıvı ortam içeren arpa danelerinde sağlanmıştır. İnkübasyon sıcaklığı 23 °C'den 15 °C'ye düşürüldükten sonra primordium oluşumu sağlanmıştır. Çam fidanlarının bulunuşunun primordium oluşumu üzerinde hiçbir destekleyici etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Mantar oluşumu 500 ml'lik cam şişelerde arpa, kayın talaşı ve sentetik sıvı ortamdan oluşan bir karışımda elde edilmiştir. Olgun mantarlardan elde edilen basidiosporlar agar ortamında çimlendirilmiş ve misel gelişimi sağlanmıştır. Böylece konukçu bir bitki olmadan saf kültürde *L. shimeji*'nin hayat döngüsü tamamlanmıştır.

Debaud ve ark. (1995) bazı *Hebeloma* türlerinin konukçu bitki varlığında aksenik veya aksenik olmayan koşullar altında mantar oluşturabildiğini, bununla birlikte konukçu bitki olmadan yalnızca primordium veya olgunlaşmamış anormal sporokarplar oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Saf kültürde iki ektomikorizal mantar türünün (*Hebeloma radicosum* ve *Hebeloma* sp.) üretiminin araştırıldığı çalışmada ilk olarak arpa daneleri ve talaş içeren ortama ilave edildiklerinde mantarların misel gelişimini teşvik eden besin maddeleri belirlenmiştir. Daha sonra her bir mantar türü için seçilen ilave besin maddelerini içeren daha geniş çaplı bir ortamda, 17 °C’de 21-32 gün süren bir inkübasyonu takip eden 22 °C’de 35-42 günlük bir inkübasyondan sonra basidiosporları taşıyan olgun mantarlar elde edilmiştir (Ohta, 1998).

Guerin-Laguet ve ark. (2000)’nın kontrollü topraksız koşullarda *Lactarius* türünün mantar oluşumunu araştırdıkları çalışmada *Pinus sylvestris* fidanları *L. deliciosus* ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonraki birinci yılda *L. deliciosus* primordiumları görülmüş ve bundan 6 ay sonra da 2 olgun mantar elde edilmiştir.

Pinus densiflora fidanlarının *Lyophyllum*, *Tricholoma*, *Leucopaxillus*, *Suillus*, *Rhizopogon*, *Lactarius* ve *Morchella* cinsine ait yenilebilir mantarların miselleri ile inokule edildiği çalışma sonucunda incelenen türlerin yarısından fazlası açık saksı toprağında primordium oluşturmuş ve *Tricholoma portentosum*, *T. saponaceum* ve *Lactarius akahatsu* gibi türler açık saksı toprağına dikimden 6-9 ay sonra genç konukçu bitkilerle basidiokarp oluşturmuşlardır. Bununla birlikte *in vitro* koşullarda primordium ve basidiokarp oluşumu sağlanmamıştır (Yamada ve ark., 2001a).

Birkaç *T. matsutake* izolatu konukçu bir bitki olmadan besin ortamında primordium benzeri yapılar oluşturmuştur (Ogawa ve Hamada, 1975; Kawai ve Ogawa, 1976). Bununla birlikte, bu türde saf kültürde olgun basidiokarpların geliştiği bildirilmemiştir (Wang ve ark., 1997).

Yapılan çalışmalarda serada saksılarda ektomikorizal mantar türleriyle inokule edilmiş fidanlar yetiştirilerek *Cantharellus cibarius*, *Lactarius deliciosus*, *Lactarius akahatsu* ve *Lyophyllum shimeji* türlerinde mantar oluşumu sağlanmıştır (Ohta, 1994a; Guerin-Laguet ve ark., 2000; Danell, 2002; Yamada ve ark., 2002). Bununla birlikte *Lactarius sanguifluus* ve *Tricholoma matsutake* türlerinde mantar üretimi amacıyla yapılan çalışmalarda başarı sağlanamamıştır (Eto, 1990; Hu, 1994; Wang, 1995; Wang ve ark., 1997; Yamada ve ark., 2002; González-Ochoa ve ark., 2003).

Lactarius deliciosus üretimi amacıyla kurulan ilk *Pinus radiata* plantasyonunda dikimden 2.5 yıl sonra hektardan 50 kg mantar elde edilmiştir (Wang ve ark., 2003).

Yamada ve ark. (2007)’nin yaptığı çalışmada *Pinus densiflora* fidanları ile ektomikoriza oluşturan 3 yenilebilir ektomikorizal mantar (*Tricholoma portentosum*, *T.*

saponaceum ve *T. terreum*) türü 3 yıl boyunca laboratuvar koşullarında açık saksı kültüründe yetiştirilmiştir. *T. portentosum* ve *T. saponaceum* türlerinden yetiştirme periyodu boyunca birkaç kez mantar elde edilmiştir. *T. terreum* türünde ise 3. yılda sadece 1 mantar gözlenmiştir. *T. terreum* türü için kontrollü çevresel koşullarda mantar oluşumunun sağlandığı bu durum ilk kayıt olarak belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar bu 3 yenilebilir *Tricholoma* türünün yetiştiriciliğinin mümkün olduğunu göstermektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışma üç aşamalı olarak planlanmış ve yürütülmüştür. İlk aşamada çalışmada ele alınan ektomikorizal mantar türleri (*Lactarius controversus*, *Lactarius pyrogalus* ve *Tricholoma terreum*) toplanmış, saf kültürler elde edilmiş ve misel gelişimi için en uygun besin ortamı, pH, sıcaklık, karbon (C) ve azot (N) kaynakları belirlenmiştir. İkinci aşamada 3 ektomikorizal mantar türünde de vejetatif inokulum elde edilmesi ile ilgili çalışmalar yürütülmüştür. Üçüncü aşamada ise fındık (*Corylus avellana*) ile ektomikorizal ilişkisi bulunan *L. pyrogalus* türüne ait değişik inokulumların farklı yöntemlerle fındık fidanlarına inokulasyonu yapılmış, ektomikoriza oluşumu, teşhisi ve tanımlanması ile ektomikorizanın fidan gelişimi üzerine etkisi belirlenmiştir.

3.1. Materyal

Araştırma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait misel üretim laboratuvarında 2005 (Mayıs)-2008 (Kasım) yılları arasında yürütülmüştür. Araştırmada *Lactarius controversus* (Pers.:Fr.) Fr., *Lactarius pyrogalus* (Bull.:Fr.) Fr. ve *Tricholoma terreum* (Schaeff.:Fr.) Kumm. türlerinin Samsun ve Ordu makromantar florasından toplanan mantar örnekleri kullanılmıştır. Misel gelişimi için gerekli besin ortamlarının hazırlanmasında ve ektomikorizal fungusun teşhisi için kullanılan kimyasal maddeler ile vejetatif inokulum materyali olarak kullanılan torf ve vermikülit piyasadan temin edilmiştir. Ayrıca bitkiye inokulasyon, ektomikoriza sentezi ve vejetatif inokulum hazırlanmasında kullanılan kavanoz ve şişeler de piyasadan temin edilmiştir. Bitkiye inokulasyon çalışmasında kullanılan fındık tohumları (Palaz) ise Ordu ilinden temin edilmiştir.

3.1.1. Çalışmada Ele Alınan Ektomikorizal Mantar Türlerinin Tanıtımı ve Sistematikteki Yeri

Çalışmada ele alınan *L. controversus*, *L. pyrogalus* ve *T. terreum* mantar türlerinin sistematikteki yerleri **Çizelge 3.1**'de, makroskopik, mikroskopik özellikleri ve habitatları ile ilgili bilgiler ise aşağıda verilmiştir.

Çizelge 3.1. *Lactarius controversus*, *Lactarius pyrogalus* ve *Tricholoma terreum*'un sistematikteki yeri

	<i>L. controversus</i>	<i>L. pyrogalus</i>	<i>T. terreum</i>
Üst alem	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota
Alem	Fungi	Fungi	Fungi
Bölüm	Basidiomycota	Basidiomycota	Basidiomycota
Sınıf	Basidiomycetes	Basidiomycetes	Basidiomycetes
Alt sınıf	Agaricomycetidae	Agaricomycetidae	Agaricomycetidae
Takım	Russulales	Russulales	Agaricales
Familya	Russulaceae	Russulaceae	Tricholomataceae
Cins	<i>Lactarius</i>	<i>Lactarius</i>	<i>Tricholoma</i>
Tür	<i>Lactarius controversus</i>	<i>Lactarius pyrogalus</i>	<i>Tricholoma terreum</i>

***Lactarius controversus* (Pers.) Pers.**

Şapka 8-15 cm, sarımsı beyaz ya da ortası pembemsi, kirli beyazdır. Şapka ortası çukur, kenarları dışa kıvrık, yüzeyi ıslaksı ve kaygandır. Sap 2-6 x 2-4 cm olup, şapka ile aynı renktedir. Et kalınca, beyazdır. Lameller sık, pembemsi beyaz ve sapa doğru uzanmaktadır. Süt beyaz ve yakıcıdır (**Şekil 3.1**).

Spor izi pembemsi krem, sporlar oval, üstü ağ şeklinde ve 6-7 x 5-6 µ'dur.

Söğüt veya kavak ağaçları altında, yaz sonları veya sonbaharda oluşmaktadır. “Söğüt mantarı” veya “Acı mantar” olarak bilinen *L. controversus* türü halk pazarlarında satılan yaygın bir türdür. Taze ya da salamurası yapılarak değerlendirilmektedir (**Pekşen ve Karaca, 2000b ve 2003; Özçelik ve ark., 2004**).



Şekil 3.1. *Lactarius controversus* türünün genel görünümü

***Lactarius pyrogalus* (Bull.) Fr.**

Şapka 4-11 cm, grimsi kahverengiden devetüyümsü veya yeşilimsi kahverengiye kadar değişen renklerde ve iç içe halkalar halinde çizgili bir görünümündedir. Nemliyken hafif yapışkanımsıdır. Sap 1.5-6 x 0.5-1.5 cm, şapka ile aynı renkte veya daha açıktır. Et beyazdır. Lameller saptan başlar, sarımsı beyazdan pembemsi kahverengiye kadar değişebilir. Sütü beyazdır, kuruyunca pıhtılaşır ve grimsi renk alır (**Şekil 3.2**). Sütüne KOH damlatıldığında portakal rengine dönüşür.

Spor izi açık pembemsi sarıdır. Sporlar 7-8 x 5.5-6.5 μ , genişçe elips ve yüzeyi oluklu, sporu boydan boya kat eden çıkıntılara sahiptir.

Fındık altında, bahar aylarında görülen bir türdür. Taze ya da salamurası yapılarak değerlendirilmektedir. “Fındık mantarı” veya “Tirmit” olarak bilinen *L. pyrogalus*, Samsun ve Ordu halkı tarafından çok sevilerek tüketilen bir türdür. Ancak son yıllarda bu türün doğadan toplanan miktarlarında önemli azalmalar olduğu gözlenmiştir (**Pekşen ve Karaca, 2000b ve 2003; Özçelik ve ark., 2004**).



Şekil 3.2. *Lactarius pyrogalus* türünün genel görünümü

***Tricholoma terreum* (Schaeff.) Quel.**

Şapka 4-7 cm, vizon rengine, şapka üzeri ipliksi yapıdadır. Başlangıçta konveks olup, sonradan düzleşir. Şapkanın ortasında küt bir çıkıntı bulunabilir. Olgunların kenarı yarıktır. Sap 3-9 x 1-4 cm boyutlarında ve beyaz renktedir. Silindir şeklinde olan sapın içi yaşlandıkça boşalır. Eti gri beyazımsı, tadı hoş, kokusu belirgin değildir. Kırılgan yapılı bir mantardır. Lameller seyrek, grimsi beyaz renktedir (**Şekil 3.3**).

Spor izi beyaz, sporları badem ve 6-7 x 3.5-4 μ 'dur.

İğne yapraklı orman altında, genellikle sonbaharda bulunur. Halk tarafından sevilerek tüketilen *T. terreum* “Karaoğlan”, “Karakız” ve “Karaca” olarak bilinmektedir. Kalitesi yüksek olan bu mantarın özellikle çorbalara lezzet kattığı bilinmektedir. Diğer doğa mantarlarının azaldığı dönemlerde bulunması da önemli bir avantajdır. Ancak küçük yapılı ve gevrek boyutlu olması nedeniyle taşınması sorun olmaktadır (Pekşen ve Karaca, 2000b ve 2003; Özçelik ve ark., 2004).



Şekil 3.3. *Tricholoma terreum* türünün genel görünümü

3.2. Yöntem

3.2.1. Mantar Örneklerinin Toplanması

T. terreum türüne ait mantar örnekleri ilkbahar ve sonbahar döneminde yapılan surveylerle Ondokuz Mayıs Üniversitesi Kampüs alanından, *L. pyragalus* (Bull.: Fr.) Fr. ve *L. controversus* (Pers.:Fr.) Fr. türlerine ait mantar örnekleri ise Samsun ve Ordu illerinin bazı ilçe ve köylerinden toplanmıştır. Mantarların habitat, makroskopik ve mikroskopik özellikleri saptanmış ve fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3). Teşhisleri Phillips (1994) ve Heilmann-Clausen ve ark. (2000)'na göre yapılmıştır.

3.2.2. Saf Kültürlerin Elde Edilmesi

Çalışmada yer alan mantar türlerinin saf kültürlerinin elde edilmesi amacıyla besin ortamı olarak ektomikorizal mantarların saf kültür ve misel gelişimleri için yaygın olarak kullanıldığı bildirilen MMN (Modifiye Edilen Melin-Norkrans) ve M40 ortamları kullanılmıştır (Boyle ve ark., 1984; Kumar ve Satyanarayana, 2002). MMN

ve M40 besin ortamlarının içerikleri **Çizelge 3.2**'de verilmiştir. Besin ortamları otoklavda 121 °C'de 30 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası soğutulan besin ortamları steril kabin içerisinde 9 cm çapındaki steril petrilere yaklaşık 20 ml olacak şekilde konulmuştur. Araziden toplanan mantar örnekleri laboratuara getirildikten sonra alkol ile steril hale getirilmiştir. Daha sonra laminar hava akışlı steril bir kabinde pens ve bistüri kullanılarak mantar örneğinin yüzeyi sıyrılmıştır. Steril bir bisturi yardımıyla doğrudan taze mantar örneklerinden alınan yaklaşık 0.5 cm²'lik doku parçaları (sap ve şapka arasındaki doku, lamellerin üst kısmındaki doku parçaları) steril bir transfer iğnesi yardımıyla petri kaplarında bulunan besin ortamlarına aşılanmıştır. Aşılamadan sonra petriler parafilmle sarılmış ve kültürler karanlıkta 20-25 °C'de gelişmeye bırakılmıştır.

Saf kültürler elde edildikten sonra kullanılıncaya kadar buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilmiştir (**Palmer, 1971**). İleriki çalışmalarda kullanmak amacıyla kültürler 3-4 ayda rutin olarak besin ortamlarına aktarılmıştır (**Molina ve Palmer, 1982; Brundrett ve ark., 1996**).

Çizelge 3.2. Saf kültür ve misel geliştirme çalışmalarında kullanılan besin ortamları ve içerikleri

BAF	30.0 g glikoz, 2.0 g pepton, 0.2 g maya ekstrat, 0.5 g KH ₂ PO ₄ , 0.5 g MgSO ₄ .7 H ₂ O, 10.0 mg FeCl ₃ .6 H ₂ O, 1.0 mg ZnSO ₄ .7 H ₂ O, 5.0 mg MnSO ₄ , 100.0 mg CaCl ₂ .2 H ₂ O, 50.0 µg tiamin HCl, 1.0 µg biyotin, 100.0 µg folik asit, 50.0 µg inositol, 15.0 g agar, 1 l destile su
ME	20 g malt ekstrat, 15 g agar, 1 l destile su
MMN	0.025 g NaCl, 0.5 g KH ₂ PO ₄ , 0.25 g (NH ₄) ₂ HPO ₄ , 0.05 g CaCl ₂ , 0.15 g MgSO ₄ .7 H ₂ O, 0.012 g FeCl ₃ . 6 H ₂ O, 0.003 g tiamin, 10 g glikoz, 3 g malt ekstrat, 15 g agar, 1 l destile su
M40	66.8 mg CaCl ₂ . 2 H ₂ O, 500 mg KH ₂ PO ₄ , 25 mg NaCl, 250 mg (NH ₄) ₂ HPO ₄ , 150 mg MgSO ₄ .7 H ₂ O, 10 mg tiamin, 10 g glikoz, 5 g malt ekstrat, 0.5 ml %1'lik FeCl, 15.0 g agar, 1 l destile su
PDA	200 g patates, 20 g dekstroze, 20 g agar, 1 l destile su

3.2.3. Misel Gelişimi İçin En Uygun Besin Ortamı, pH, Sıcaklık, Karbon (C) ve Azot (N) Kaynaklarının Belirlenmesi

Çalışmada ele alınan türlerin misel gelişimi için en uygun besin ortamlarının belirlenmesi amacıyla Biyotin-Aneurin-Folik Asit Agar (BAF), Malt Ekstrat Agar (ME), Modifiye Edilen Melin-Norkrans Ortamı (MMN), M40 ve Patates Dekstroze Agar (PDA) besin ortamları kullanılmıştır (**Çizelge 3.2**). Besin ortamları hazırlandıktan sonra pH'ları belirlenmiş ve otoklavda 121 °C'de 30 dakika steril edilmiştir. Steril edilen

besin ortamları steril kabinde petrilere dökülmüştür. Denemede *L. controversus* ve *L. pyrogalus* türleri için 6 cm çapında plastik petrilere, *T. terreum* türü için ise 9 cm çapında cam petrilere kullanılmıştır. Steril kabinde, farklı besin ortamları içeren petrilere merkez kısmına 1 adet 0.5 cm çapında saf kültürden kesilen miselli agar parçası (misel diski) aktarılmıştır. Aşılardan sonra kültürler 25 °C’de inkübe edilmiştir. Misel gelişim durumlarının belirlenmesi amacıyla misel koloni (gelişim) yarıçapı, misel gelişim hızı, misel gelişim süresi ve misel gelişim (koloni) alanı belirlenmiştir. *L. controversus*, *L. pyrogalus* ve *T. terreum* türlerinde en uygun besin ortamını belirlemek amacıyla kurulan denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre 6 tekrarlamalı olarak yürütülmüştür.

Farklı sıcaklık ve pH’nın *L. controversus*, *L. pyrogalus* ve *T. terreum* türlerinin misel gelişimine etkisinin belirlenmesi amacıyla yürütülen denemeler ise tesadüf parselleri deneme desenine göre 5 tekrarlamalı olarak kurulmuştur. Bu çalışmada besin ortamı olarak *L. controversus* ve *L. pyrogalus* türleri için BAF ve PDA ortamları, *T. terreum* türü için ise PDA ortamı kullanılmıştır. Denemede 5 farklı pH seviyesi (4.0, 4.5, 5.0, 5.5 ve 6.0) ve 4 farklı inkübasyon sıcaklığı (15, 20, 25 ve 30 °C) ele alınmıştır. Hazırlanan besin ortamları steril edilmeden önce ortamların pH değerleri NaOH veya HCl kullanılarak ayarlanmıştır. Hazırlanan besin ortamları otoklavda 121 °C’de 30 dakika steril edilmiştir. Steril edilen besin ortamları steril kabinde 9 cm çapındaki cam petrilere 20 ml olacak şekilde dökülmüştür. Steril kabinde petrilere merkez kısmına 1 adet 0.5 cm çapında saf kültürden kesilen miselli agar parçası (misel diski) aktarılmıştır. Aşılardan sonra kültürler 4 farklı inkübasyon sıcaklığında (15, 20, 25 ve 30 °C) inkübe edilmiştir. Misel gelişim durumlarının belirlenmesi amacıyla aşılardan sonra misel koloni yarıçapı, misel gelişim hızı, misel gelişim süresi ve misel gelişim alanı tespit edilmiştir. *T. terreum* türünde 30 °C’de misel gelişimi olmadığı için istatistiksel analizlerde karekök transformasyonu uygulanmıştır.

L. controversus, *L. pyrogalus* ve *T. terreum* türlerinde farklı karbon (C) ve azot (N) kaynaklarının misel gelişimine etkisini belirlemek amacıyla kurulan denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre 8 tekrarlamalı olarak yürütülmüştür. Denemede besin ortamı olarak MMN ortamı kullanılmıştır. C kaynağı olarak ksiloz, laktoz, sukroz, maltoz, mannitol, glikoz ve dekstroz; N kaynağı olarak ise malt ekstrat, maya ekstrat, pepton, (NH₄)₂HPO₄ (amonyum fosfat), NH₄NO₃ (amonyum nitrat) ve Ca(NO₃)₂ (kalsiyum nitrat) incelenmiştir. Denemede MMN ortamının içeriğinde bulunan glikoz

yerine farklı C kaynakları (10 g/l) ilave edilmiş, hiç bir C kaynağının kullanılmadığı ortam ise kontrol (C) olarak ele alınmıştır. MMN ortamında bulunan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ve malt ekstrat N kaynağı yerine ise ele alınan N kaynakları (3.25 g/l) kullanılmış ve hiçbir N kaynağının kullanılmadığı ortam kontrol (N) olarak ele alınmıştır (**Daza ve ark., 2006**). Ortamlar hazırlandıktan sonra otoklavda 121 °C’de 30 dakika steril edilmiştir. Denemede 9 cm çapında cam petriler kullanılmıştır. Steril kabinde petrilerin merkez kısmına 1 adet 0.5 cm çapında saf kültürden kesilen miselli agar parçası (misel diski) aktarılmıştır. Aşılardan sonra kültürler 23 °C’de inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Misel gelişim hızı, misel gelişim alanı ve misel yapısı belirlenmiştir.

Misel Çalışmalarında Kullanılan Ölçümler:

Misel Koloni (Gelişim) Yarıçapı (mm): Petrilerdeki miselli agar parçasının (misel diskinin) 4 farklı noktasından günlük olarak dijital kumpasla yapılan ölçümlerle uygulamaların misel koloni (gelişim) yarıçapları belirlenmiştir.

Misel Gelişim Hızı (mm/gün): Misel gelişimindeki doğrusal büyümenin gerçekleştiği zaman aralığındaki (T2-T1) misel gelişimindeki artış (R2-R1) değerleri dikkate alınarak hesaplanmıştır.

Misel Gelişim (Koloni) Alanı (cm²): Aşılardan sonra en iyi gelişen uygulama esas alınarak, misellerin kapladığı alan çizilmiş ve planimetre ile ölçülerek belirlenmiştir.

Misel Gelişim Süresi (gün): Aşılardan itibaren miselin petriyi tamamen sardığı döneme kadar geçen gün sayısı olarak tespit edilmiştir.

3.2.4. Anastomoz Durumlarının Belirlenmesi

L. pyrogalus (Fındık Tirmiti) türünde Terme ve Ünye izolatları arasında uyumsuzluk olup olmadığı ve anastomoz durumları belirlenmiştir. Bu amaçla farklı besin ortamlarının (BAF, MMN, PDA ve ME) bulunduğu her bir petriye Terme ve Ünye izolatından 0.5 cm²’lik birer miselli agar parçası (disk) aşılanmıştır. Aşılardan sonra kültürler 23 °C’de inkübe edilmiştir. Gelişim tamamlandıktan sonra kesişme şekilleri mikroskopta incelenmiş, anastomoz gruplarının sınıflandırılması **Akın (2001)**’e göre yapılmıştır. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 10 tekrarlamalı olarak kurulmuştur.

3.2.5. Ektomikorizal Mantar Türlerinin Yetiştigi Alanlardaki Toprak Özelliklerinin Saptanması

Mantar örneklerinin toplanması sırasında ektomikorizal mantar türlerinin yetiştigi alanlardaki toprak özelliklerinin saptanması amacıyla yeterli miktarda toprak örneği alınmıştır. Daha sonra toprakların pH, nem, satürasyon, organik madde, C ve tuzluluk gibi özellikleri belirlenmiştir. Toprak özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan laboratuvar analizleri 2 tekrarlamalı olarak yapılmıştır.

pH: 20 g toprak örneği tartılıp, üzerine 50 ml saf su ilave edilmiş, 5-6 saat bekletildikten sonra karışımın suyu süzölmüş ve pH metre ile ölçölerek belirlenmiştir (Jackson, 1962).

Nem (%): Alınan örneklerin yaş ağırlıkları belirlenmiş, daha sonra 105 °C'ye ayarlı etüvde sabit ağırlığa ulaşınca kadar kurutulmuştur. Kuru ağırlıkları belirlenerek bulunan değlererin 100'den çıkarılmasıyla ortamların nem içerikleri belirlenmiştir (Kacar, 1994).

Satürasyon (%): Demiralay (1993)'e göre belirlenmiştir.

Organik Karbon (%): Walkley-Black yöntemine göre potasyum kromat ile muamele edilerek ve H₂SO₄ ile yaş yakılarak belirlenmiştir (Kacar, 1994).

Organik Madde (%): Walkley Black yöntemine göre belirlenen organik karbonun 1.724 ile çarpılması (OM=OCx1.724) ile tespit edilmiştir (Kacar, 1994).

EC içeriği: Toprak-su 1:2.5 (w:v) oranında hazırlanıp, bir gece bekletildikten sonra EC metre ile ölçölerek belirlenmiştir (Rowell, 1996).

3.2.6. Vejetatif İnokulum Elde Edilmesine Yönelik Çalışmalar

L. controversus, *L. pyrogalus* ve *T. terreum* mantar türlerinde vejetatif inokulum hazırlamak amacıyla torf ve torf:vermikölit (1:4, 1:6, 1:8 ve 1:10, v:v) karışımlarından hazırlanan 5 ortam kullanılmıştır. Torf:vermikölitten (T:V) hazırlanan karışımlar homojen olarak karıştırılmıştır. Her bir ortam 250 ml'lik cam şişelere 230 ml olacak şekilde doldurulmuştur. Şişelerin ağızları pamuk tıkaçla ve alüminyum folyo ile kapatıldıktan sonra otoklavda 121 °C'de 1.5 saat steril edilmiştir. 24 saat sonra şişelere 80 ml BAF sıvı ortamından ilave edilmiş ve tekrar 121 °C'de 30 dakika steril edilmiştir. Bir gün sonra steril şartlarda her şişeye 3 adet saf misel kültüründen kesilen 0.5 cm²'lik parçalar aşılmiştir. Aşılamadan sonra şişeler karanlıkta 20±2 °C'de inkübasyona alınmıştır. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 5 tekrarlamalı olarak

yürütülmüştür. Ortamlarda % nem ile sterilizasyon öncesi ve sonrası pH'lar belirlenmiştir. *L. controversus* ve *L. pyrogalus* türleri için bu ortamlarda misel gelişim hızı (cm/gün) ve misel gelişim süresi (gün) belirlenmiştir. Bununla birlikte *T. terreum* türünde misel gelişimi zayıf ve seyrek olması nedeniyle günlük olarak misel gelişim hızı ölçülememiş ve sadece misel gelişim süresi belirlenmiştir.

Nem (%): Kacar (1994)'e göre yapılmıştır.

Sterilizasyon Öncesi ve Sonrası pH: Jackson (1962)'ye göre belirlenmiştir.

Misel Gelişim Hızı (cm/gün): Şişelerin 2 farklı noktasından günlük olarak yapılan ölçümlerle uygulamaların misel gelişimleri belirlenmiştir. Misel gelişim hızı misel gelişimindeki doğrusal büyümenin gerçekleştiği zaman aralığındaki (T2-T1) misel gelişimindeki artış (R2-R1) değerleri dikkate alınarak hesaplanmıştır.

Misel Gelişim Süresi (gün): Aşılamadan itibaren şişelerdeki misel gelişimi tamamlanana kadar geçen gün sayısı olarak belirlenmiştir.

3.2.7. Farklı İnokulasyon Uygulamaları

Bitkiye inokulasyon, ektomikoriza oluşumu, ektomikorizanın bitki gelişimine etkisi ve ektomikorizal ilişkinin teşhisi çalışmaları sadece fındık (*Corylus avellana*) ile ektomikorizal ilişkisi bulunan *L. pyrogalus* türünde yürütülmüştür. *L. pyrogalus* türü, bölgede halk tarafından sevilerek tüketilmesi ve popülasyonunun azalma tehlikesi altında olması nedeniyle tercih edilmiştir.

Palaz fındık çeşidine ait fındık tohumlarının soğuklama gereksinimlerini karşılamak, engelleyici etmenleri gidermek, tohum kabuklarını yumuşatmak, embriyonun su ve oksijen alımını kolaylaştırarak çimlenme güçlerini artırmak ve çabuklaştırmak amacıyla nemlendirilmiş torf:vermikülit ortamında buzdolabında katlama yapılmıştır. Katlama öncesinde tohumlar % 30'luk H₂O₂'de 30 dk tutulup, steril suda iyice çalkalandıktan sonra tohumların yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Katlamada torf:vermikülit (1:10) ve vejetatif inokulumlu torf:vermikülit (1:10) ortamı olmak üzere 2 farklı katlama ortamı kullanılmıştır. Her bir ortamda 150'şer tohum olmak üzere katlama yapılmıştır. Katlamaya tohumlarda kökçük oluşumu gözlenene kadar yaklaşık 3.5 ay boyunca devam edilmiştir.

İnokulasyon çalışmalarında 1 tanesi kontrol olmak üzere toplam 15 farklı uygulama denenmiştir. Her bir uygulama için 5 adet fidan yetiştirilmiştir. Çalışmada yer

alan uygulamalar aşağıdaki şekilde hazırlanmış olup, özellikleri **Çizelge 3.3'**de özetlenmiştir.

A- Substrat 80 ml BAF sıvı besin ortamı (20 g glikoz) ile nemlendirilmiştir. Steril şartlarda her bir kavanoz 4 adet misel diski (0.5 cm^2) ile aşılansmış ve tohum ekimi yapılmıştır. Tohum ekiminde inokulumlu ortamda katlanan tohumlar kullanılmıştır **(Yamada ve ark., 1999; Santiago-Martinez ve ark., 2003)**.

B- Substrat (A) uygulaması ile aynı şekilde hazırlanmış olup, inokulumsuz ortamda katlanan tohumlar kullanılarak dikim yapılmıştır.

C- Substrat 80 ml BAF sıvı besin ortamı (20 g glikoz) ile nemlendirilmiştir. Steril şartlarda her bir kavanoz 4 adet miselli agar parçası (0.5 cm^2) ile aşılandıktan sonra kavanozların kapakları kapatılmıştır. Ortam tamamen miselle sarıldıktan sonra tohum ekimi yapılmıştır. İnokulumsuz ortamda katlanan tohumlar kullanılarak dikim yapılmıştır.

D- Substrat (A) uygulaması ile aynı şekilde hazırlanmış, fakat aşılama da Terme (2 adet misel diski) ve Ünye (2 adet misel diski) izolatu birlikte kullanılmıştır. İnokulumsuz ortamda katlanan tohumlar kullanılarak dikim yapılmıştır.

E- Substrat (A) uygulaması ile aynı şekilde hazırlanmış, fakat burada Terme izolatu yerine Ünye izolatu kullanılmıştır. İnokulumsuz ortamda katlanan tohumlar kullanılarak dikim yapılmıştır.

F- Substrat 40 ml MMN sıvı besin ortamı ile nemlendirilmiştir. Sterilizasyondan sonra substrat 1:8 (inokulum:substrat) oranında vejetatif inokulum ile karıştırılmış ve tohum ekimi yapılmıştır. İnokulumsuz ortamda katlanan tohumlar kullanılarak dikim yapılmıştır.

G- Substrat 40 ml MMN sıvı besin ortamı ile nemlendirilmiştir. Sterilizasyondan sonra substrat 1:2 (inokulum:substrat) oranında vejetatif inokulum ile karıştırılmış ve tohum ekimi yapılmıştır. İnokulumsuz ortamda katlanan tohumlar kullanılarak dikim yapılmıştır.

H- Substrat 40 ml MMN sıvı besin ortamı ile nemlendirilmiştir. Sterilizasyondan sonra substrat daha önce bahsedilen şekilde hazırlanan vejetatif inokulum ile 1:4 (inokulum:substrat) oranında karıştırılmış ve tohum ekimi yapılmıştır. İnokulumsuz ortamda katlanan tohumlar kullanılarak dikim yapılmıştır **(Rincón ve ark., 1999)**.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan inokulasyon uygulamaları ve özellikleri

Uygulama	Kullanılan kap ve hacmi (ml)	Substrat hacmi (ml)	Mikorizal sistem	İzolat	Besin ortamı	Kullanılan inokulum	İnokulum miktarı
A*	Cam kavanoz – 370	250	Açık	Terme	BAF-20	Saf misel kültürü	4 adet misel diski
B	Cam kavanoz – 370	250	Açık	Terme	BAF-20	Saf misel kültürü	4 adet misel diski
C	Cam kavanoz – 370	250	Açık	Terme	BAF-20	Saf misel kültürü	4 adet misel diski
D	Cam kavanoz – 370	250	Açık	Terme+Ünye	BAF-20	Saf misel kültürü	4 adet misel diski
E	Cam kavanoz – 370	250	Açık	Ünye	BAF-20	Saf misel kültürü	4 adet misel diski
F	Cam kavanoz – 370	250	Açık	Terme	MMN	Vejetatif inokulum	27.8 ml
G	Cam kavanoz – 370	250	Açık	Terme	MMN	Vejetatif inokulum	83.3 ml
H	Cam kavanoz – 370	250	Açık	Terme	MMN	Vejetatif inokulum	50 ml
I	Cam kavanoz – 370	250	Açık	Terme	n-MMN	Vejetatif inokulum	50 ml
K	Cam kavanoz – 370	250	Açık	Terme	Destile su	Vejetatif inokulum	50 ml
L	Cam kavanoz – 370	250	Açık	Terme	MMN	Sıvı inokulum	50 ml
M	Cam kavanoz – 370	250	Açık	Terme	MMN	Sıvı inokulum	100 ml
N	Cam kavanoz – 370	250	Açık	Terme	n-MMN	Sıvı inokulum	100 ml
O	Cam şişe - 1000	250	Kapalı	Terme	BAF	Saf misel kültürü	4 adet misel diski
Kontrol	Cam kavanoz – 370	250	Açık	Terme	n-MMN	-	-

*: İnokulumlu ortamda katlanan tohum kullanılmıştır. Diğer uygulamalarda inokulumsuz ortamda katlanan tohumlar kullanılmıştır.
BAF-20: azaltılmış glikozun (20 g) kullanıldığı BAF ortamı, n-MMN: şekerli MMN ortamı

I- Substrat C kaynağının mikoriza oluşumuna etkisini belirlemek için 80 ml şekersiz MMN ile nemlendirilmiş ve inokulasyonda 1:4 inokulum:substrat karışımı kullanılmıştır. İnokulumsuz ortamda katlanan tohumlar kullanılarak dikim yapılmıştır.

K- Substrat sıvı besin ortamı yerine 80 ml destile su ile nemlendirilmiş ve inokulasyonda 1:4 inokulum:substrat karışımı kullanılmıştır. İnokulumsuz ortamda katlanan tohumlar kullanılarak dikim yapılmıştır.

L- Substrat 80 ml MMN sıvı besin ortamı ile nemlendirilmiş ve tohum ekimi yapılmıştır. Kotiledonlar çıktıktan sonra MMN sıvı ortamında geliştirilen 50 ml sıvı inokulum kök bölgesine uygulanmıştır. İnokulumsuz ortamda katlanan tohumlar kullanılarak dikim yapılmıştır.

M- Substrat 80 ml MMN sıvı besin ortamı ile nemlendirilmiş ve tohum ekimi yapılmıştır. Kotiledonlar çıktıktan sonra fidanlara MMN sıvı ortamında geliştirilen 100 ml sıvı inokulum uygulanmıştır. İnokulumsuz ortamda katlanan tohumlar kullanılarak dikim yapılmıştır.

N- Substrat 80 ml şekersiz MMN (n-MMN) sıvı besin ortamı ile nemlendirilmiş ve tohum ekimi yapılmıştır. Kotiledonlar çıktıktan sonra BAF sıvı ortamında geliştirilen 100 ml sıvı inokulum kök bölgesine uygulanmıştır. İnokulumsuz ortamda katlanan tohumlar kullanılarak dikim yapılmıştır.

O- Kapalı sistem olarak adlandırılan bu yöntemde 1 lt'lik şişeler 250 ml substrat ile doldurulmuş ve 80 ml BAF sıvı ortamı ile nemlendirilmiştir. Steril şartlarda her bir şişe 4 adet miselli agar parçası (0.5 cm²) ile aşılınmış ve tohum ekimi yapılmıştır. İnokulumsuz ortamda katlanan tohumlar kullanılarak dikim yapılmıştır. Tohum ekiminden sonra şişelerin ağzı 2 kat parafilmle kapatılmış ve fidanların hava alabilmesi için iğneyle 2 adet delik açılmıştır (**Yamada ve ark., 1999**).

Kontrol- Substrat 80 ml şekersiz MMN (n-MMN) besin ortamı ile nemlendirilmiştir. Hiçbir inokulasyon yöntemi uygulanmamış ve inokulumsuz ortamda katlanan tohumlar kullanılarak dikim yapılmıştır.

O uygulaması dışındaki tüm uygulamalarda yetiştirme periyodu boyunca kavanoz ve şişelerin ağzı açık iken, O uygulamasında şişelerin ağzı parafilmle kapatılmıştır. Bu nedenle O uygulaması kapalı mikorizal sistem olarak, diğer uygulamalar ise açık mikorizal sistem olarak adlandırılmıştır (**Yamada ve ark., 1999**). Çalışmada kapalı mikorizal sistem için 1 lt'lik cam şişeler, açık mikorizal sistem için de 370 ml'lik cam kavanozlar kullanılmıştır. Bu kaplara 250 ml bitki gelişim substratı (torf:vermikülit,

1:1) doldurulmuştur (**Şekil 3.4**). Daha sonra şişe ve kavanozlar ağızları kapatılarak 1.5 saat boyunca otoklavda 121 °C’de steril edilmiştir. Kavanoz ve şişelere 24 saat sonra sıvı besin ortamları ilave edilerek, tekrar 121 °C’de 30 dakika steril edilmiştir. Uygulamalara ait sterilizasyondan sonraki ortam pH değerleri belirlenmiştir.



A



B



C



D

Şekil 3.4. A) Açık mikorizal sistemde, B) Kapalı mikorizal sistemde bitki gelişim substratı ile doldurulmuş kavanoz ve şişelerin görünümü, C) Soğukta katlama sonucunda kökçük oluşumu gerçekleşmiş dikime hazır fındık tohumu, D) Tohum ekimi yapılmış açık mikorizal sistemdeki kavanozların genel görünüşü

Steril edildikten sonra *L. pyragalus* türünün farklı inokulum kaynakları (saf misel kültürü, vejetatif inokulum ve sıvı inokulum) ile inokule edilerek tohum ekimleri yapılmıştır. Kontrol uygulamasında inokulasyon yapılmamıştır. D uygulamasında *L. pyragalus* türünün Terme ve Ünye izolatu birlikte, E uygulamasında ise Ünye izolatu kullanılmıştır. D ve E uygulamaları dışındaki tüm uygulamalarda Terme izolatu kullanılarak inokulasyon yapılmıştır.

Tohum ekimi kökçük yaklaşık olarak 1-2 cm uzunluğa ulaştığında ve kotiledonlar hala tohum kabuğu içerisindeyken yapılmıştır. Tohum ekiminden sonra kotiledonlar çıkana kadar kavanozların üzeri nem kaybını önlemek ve bulaşmayı azaltmak için kapakları ile kapatılmıştır (**Şekil 3.4**).

3.2.8. Farklı İnokulasyon Uygulamalarının Bitki Gelişimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi ve Mikorizal Aşılama Etkinliği

Fidanlara gelişim periyodu boyunca dışarıdan hiçbir besin ilavesi yapılmamıştır. Fidanlar haftada bir kez eşit miktarda (20-30 ml) destile su ile sulanmış ve laboratuarda 12 saat ışık 12 saat karanlık koşullarda, 18-23 °C'de 3 ay boyunca laboratuarda yetiştirilmiştir. Yetiştirme periyodunun sonunda bitki gelişimi değerlendirilmiştir. Bu amaçla bitki boyu, gövde çapı, kök uzunluğu, kök ve sürgün yaş ağırlığı, kök ve sürgün kuru ağırlığı (biyomas), toplam bitki kuru ağırlığı (toplam biyomas), kök:sürgün oranı, kök ve sürgün kuru madde miktarları ile mikorizal aşılama etkinliği belirlenmiştir.

Bitki Boyu (cm): Fidanın toprak seviyesinden itibaren terminal tomurcuk ucuna kadarki kısmın cetvelle ölçülmesi ile tespit edilmiştir.

Gövde Çapı (mm): Fidanın toprak seviyesinden itibaren 1 cm yukarıdan gövde kısmının kumpasla ölçülmesi ile belirlenmiştir.

Kök Uzunluğu (cm): Kök boğazından itibaren kök ucuna kadarki kısmın cetvelle ölçülmesi ile tespit edilmiştir.

Kök Yaş Ağırlığı (g): Fidanın toprak altı kök bölgesi dikkatli bir şekilde yıkanmış, yıkanan kökler emici kağıtlarla hafifçe kurutulduktan sonra ± 0.001 g duyarlılıktaki hassas terazide tartılması ile belirlenmiştir.

Sürgün Yaş Ağırlığı (g): Kök boğazından kesilmiş fidanın toprak üstü kısmının ± 0.001 g duyarlılıktaki hassas terazide tartılması ile tespit edilmiştir.

Kök ve Sürgün Kuru Ağırlığı (Biyomas) (g): Sürgün ve köklerin yaş ağırlıkları belirlendikten sonra ayrı ayrı kese kâğıdına konulmuş ve etüvde 60 °C'de 3 gün boyunca kurutulmuştur. Etüvden çıkartılan örnekler desikatörde soğuduktan sonra ± 0.001 g duyarlılıktaki hassas terazide tartılarak kuru ağırlıkları belirlenmiştir (**Brunner ve Brodbeck, 2001**).

Toplam Bitki Kuru Ağırlığı (Biyomas) (g): Sürgün ve kök kuru ağırlığının toplanmasıyla elde edilmiştir (**Brunner ve Brodbeck, 2001**).

Kök:Sürgün Oranı: Kök kuru ağırlığının sürgün kuru ağırlığına bölünmesiyle elde edilmiştir (**Brunner ve Brodbeck, 2001**).

Kök ve Sürgün Kuru Madde İçeriği (%): Taze kök ve sürgün örnekleri ± 0.001 g duyarlılıktaki hassas terazide tartılmış, etüvde 105 °C'de sabit ağırlığa ulaşınca kadar kurutulmuş ve etüvden çıkartılan örnekler desikatörde soğuduktan sonra tekrar tartılarak tespit edilmiştir (**Kacar, 1994**).

Mikorizal Aşılama Etkinliği (%): Bagyaraj ve ark. (1998)'nin geliştirdikleri formül kullanılmıştır.

$$\%MAE = \frac{\text{Aşılanmış Bitkinin Kuru Madde Ağ. (g)} - \text{Aşılanmayan Bitkinin Kuru Madde Ağ. (g)}}{\text{Aşılanmış Bitkinin Kuru Madde Ağırlığı (g)}} \times 100$$

3.2.9. Ektomikoriza Oluşumu, Teşhisi ve Tanımlanması

Yetiştirme periyodunun sonunda fidanlar kavanoz ve şişelerden dikkatlice çıkartılmış, kılcal köklere zarar vermeden hafifçe yıkanmıştır. Mikroskopik inceleme için her bir uygulamaya ait fidan köklerinden örnek alınmıştır.

Kökler 1-2 cm uzunluğunda kesilerek içi su dolu bir petri kabına yerleştirilmiş, streomikroskopta incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Mikroskopik incelemede Nikon SMZ 800 streomikroskop kullanılmıştır (**Şekil 3.5**).



Şekil 3.5. Ektomikoriza teşhisinde kullanılan stereomikroskop

Farklı inokulasyon uygulamalarına ait mikorizal kısa köklerin yoğunluğunu belirlemek için **Vicente ve ark. (2001)** tarafından kullanılan 0-3 skalası modifiye edilerek uygulanmıştır.

Bunun için her uygulamaya ait 1-2 cm uzunluğunda kesilmiş belirli bir miktar kök örneği içi su dolu 6 cm çapında bir petri kabına yerleştirilmiş ve stereomikroskopta mikorizal kısa köklerin yoğunluğuna göre aşağıda belirtilen skala değerleri belirlenmiştir.

- 0: Yok
- 1: Az (petride 1-20 mikorizal kısa kök)
- 2: Orta (petride 21-50 mikorizal kısa kök)
- 3: Çok (petride >50 mikorizal kısa kök)

Ayrıca değişik kimyasallara (% 15 KOH, % 70 etanol, % 15 FeSO₄ ve laktik asit) olan reaksiyonlarına bakılmıştır. Her bir uygulamaya ait mikorizal kök örneği lam üzerine yerleştirildikten sonra örnek üzerine 3-4 damla kimyasal uygulanmıştır. Örnek 2-3 dakika sonra stereomikroskopta incelenerek renk değişimleri kaydedilmiştir.

3.2.10. Verilerin Değerlendirilmesi

Misel gelişim hızı, misel gelişim süresi, misel gelişim alanı ve bitki gelişimi ile ilgili istatistiksel değerlendirmelerde SPSS paket programı kullanılmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda farklılık gösteren uygulamalar arasındaki gerçek önemli farklılıkları tespit etmek ve farklı olanları derecesine göre gruplandırabilmek için “Duncan Multiple Range” testinden yararlanılmıştır. *T. terreum* türünde pH ve sıcaklık denemelerinde 30 °C sıcaklıkta misel gelişimi olmamıştır. Bu nedenle 0 olan değerlere karekök transformasyonu uygulanmıştır. Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde farklar arasındaki önemlilik % 5 (önemli) ve % 1 (çok önemli) olarak ifadelendirilmiştir. Misel koloni (gelişim) yarıçapı, misel gelişim hızı, misel gelişim süresi ve misel gelişim alanlarına ait grafiklerle farklı inokulasyon uygulamalarının bitki gelişimi üzerine etkilerine ait grafikler Excel bilgisayar programında yapılmıştır. Grafiklerdeki hata çubukları, hesaplanan standart hatalar kullanılarak yerleştirilmiştir. Mikorizal kısa köklerin yoğunluğunu belirlemek için 0-3 skalası uygulanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Mantar Örneklerinin Toplanması

Çalışmada ele alınan ektomikorizal türlere ait mantar örnekleri ilkbahar ve sonbahar döneminde yapılan surveylerle toplanmıştır (**Çizelge 4.1**). Örnekleme yapılırken olgunlaşmamış genç mantarların seçilmesine özellikle dikkat edilmiştir. Ektomikorizal mantar örnekleri araziden **Brundrett ve ark. (1996)**'nın tarif ettiği şekilde alınmıştır. Mantarların üzerlerindeki toprak ve ölü örtü artıkları temizlenmiş ve mumlu kağıtlara sarılıp ayrı ayrı poşetlere konularak en kısa sürede laboratuara taşınmıştır.

Çizelge 4.1. Çalışmada ele alınan ektomikorizal mantar türlerinin toplandığı yerler

Tür	Toplandığı Yer
<i>Lactarius controversus</i>	<u>Samsun</u> ; Ayvacık, Çarşamba, Merkez, Ondokuz Mayıs, Terme
<i>Lactarius pyrogalus</i>	<u>Samsun</u> ; Çarşamba, Merkez, Salı Pazarı, Tekkeköy, Terme <u>Ordu</u> ; Merkez, Perşembe, Ünye
<i>Tricholoma terreum</i>	<u>Samsun</u> ; O.M.Ü. Kampüsü

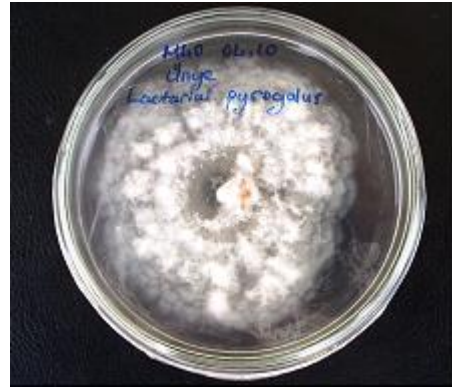
4.2. Saf Kültürlerin Elde Edilmesi

Saf kültür elde etme çalışmaları sonucunda M40 ve MMN besin ortamında farklı yerlerden toplanan *L. controversus* türünden 1 izolat (Çarşamba), *L. pyrogalus* türünden 2 izolat (Terme ve Ünye) ve *T. terreum* türünden de 1 izolat (O.M.Ü. Kampüsü) elde edilmiştir. Elde edilen izolatların saf kültürlerine ait misel gelişimleri **Şekil 4.1**'de verilmiştir. *L. pyragalus* türünde misel gelişim koşullarının (besin ortamı, pH, sıcaklık, C ve N kaynakları) belirlenmesi ve vejetatif inokulum çalışmalarında Terme izolatı kullanılmıştır.

Yenilebilir ektomikorizal mantarın yetiştiriciliğinde başlangıç noktası saf kültürlerinin elde edilmesidir. Bazı türler kolayca izole edilip kültürde iyi bir gelişme gösterirken, bazıları genellikle çok yavaş gelişmekte ve çoğunlukla birkaç ay sonunda ölmektedirler (**Marx ve Kenny, 1982; Isaac, 1992**). Çoğu ektomikorizal mantarın C kaynağı olarak yalnızca monosakkaritleri kullanması ve misellerinin saf kültürde yavaş gelişmesi nedeniyle saf kültürde yeterli miktarda bunların miselini üretmek çok zordur. Ayrıca çoğu ektomikorizal mantar türü izole edilememekte ve saf kültürde geliştirilememektedir. **Brundrett (1991)** tarafından *Lactarius* ve *Tricholoma*'nın bazı türlerinin zor kültüre alınan türler olduğu ve kültürde yavaş geliştiği bildirilmiştir.



Lactarius pyrogalus (1. izolat)



Lactarius pyrogalus (2. izolat)



Lactarius controversus



Tricholoma terreum

Şekil 4.1. Saf kültürleri elde edilen *L. controversus*, *L. pyrogalus* ve *T. terreum* ektomikorizal mantar türlerine ait izolatların misel gelişimleri

Çalışmada ele alınan *L. controversus*, *L. pyrogalus* ve *T. terreum* türlerinin saf kültürlerinin elde edilmesi konusunda daha önce yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte *Lactarius* ve *Tricholoma* cinslerine ait çok sayıda türde saf kültürlerin elde edilmesi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

Bu çalışmada saf kültürlerin elde edilmesinde kullanılan MMN ve M40 ortamlarının ektomikorizal mantar türlerinin saf kültürlerinin elde edilmesinde yaygın olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Boyle ve ark., 1984; Kumar ve Satyanarayana, 2002; Pekşen ve Kibar, 2007).

Rincón ve ark. (1999) *Amanita*, *Hebeloma*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Scleroderma* ve *Suillus* cinslerine ait toplam 60 izolatın saf kültürlerini MMN besin ortamında geliştirmişlerdir. Guerin-Laguette ve ark. (2000)'nın yaptıkları çalışmada *Lactarius deliciosus* ve *L. sanguifluus*'un saf kültürleri MMN ve BAF besin

ortamlarında elde edilmiştir. **González-Ochoa ve ark. (2003)** yaptıkları çalışmada *Suillus* ve *Rhizopogon* türlerinin saf kültürlerini elde etmek için MMN ve *Lactarius* türleri için BAF besin ortamını kullanmışlardır. *Laccaria proxima*, *Inocybe lacera*, *Leccinum auranticum*, *Paxillus vernalis*, *Pisolithus tinctorius*, *Scleroderma citrinum*, *Tricholoma flavovirens*, *T. scalpturatum* ve *Hebeloma insigne* türlerinin saf kültürleri MMN besin ortamında geliştirilmiştir (**Mahony, 2005**). **Sanchez ve ark. (2000)** 21 ektomikorizal mantar türünün saf kültürlerinin elde edilmesi amacıyla yaptıkları çalışmada besin ortamı olarak MMN ve BAF ortamlarını kullanmışlardır. Yapılan diğer çalışmalarda *Amanita caesarea*'nın (**Daza ve ark., 2006**), *Pisolithus tinctorius*'un (**Vaario ve ark., 1999**), *L. delicious*, *Hebeloma crustuliniforme* ve *Tricholoma ustale* (**Tüfekçi, 2007**) türlerinin saf kültürleri MMN besin ortamında elde edilmiştir. **Xu ve ark. (2008)** *L. deliciosus*, *L. insulsus* ve *Boletus edulis* ektomikorizal mantar türlerinin saf kültür gelişimlerinin vitamin ve maya ekstat içeren ortamlarda daha iyi olduğunu belirlemişlerdir.

4.3. En Uygun Besin Ortamları, C ve N Kaynaklarının Belirlenmesine Yönelik Çalışmalarda Kullanılan Ortamların Başlangıç pH Değerleri

L. controversus, *L. pyrogalus* ve *T. terreum* türlerinde en uygun besin ortamları, C ve N kaynaklarının belirlenmesine yönelik çalışmalarda kullanılan ortamların başlangıç pH değerleri sırasıyla **Çizelge 4.2** ve **Çizelge 4.3**'de verilmiştir.

Çalışmada misel gelişimi için kullanılan besin ortamlarının pH değeri 5.5-6.0 arasında değişiklik göstermiştir (**Çizelge 4.2**). Farklı C ve N kaynaklarından hazırlanan besin ortamlarının pH değerleri ise 4.92-7.50 arasında bulunmuştur (**Çizelge 4.3**). **Stanbury ve ark. (1995)** genellikle ektomikorizal mantarların hafif asit koşullarda (pH 4-6) daha iyi gelişme gösterdiğini bildirmişlerdir. Saf kültür ve misel gelişimi için optimum pH değeri türe göre büyük değişiklik göstermekte olup, çalışmada kullanılan besin ortamlarına ait pH değerleri ektomikorizal mantar türlerinin gelişimi için literatürde belirtilen sınırlar arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Saf kültürlerin elde edilmesi ve misel gelişimi için kullanılan besin ortamlarının pH değerleri

Besin ortamları	Başlangıç pH değerleri
BAF	5.9
M40	5.5
ME	5.8
MMN	5.6
PDA	6.0

Çizelge 4.3. Farklı C ve N kaynaklarından hazırlanan MMN besin ortamının pH değerleri

C ve N Kaynakları		Başlangıç pH değerleri
C Kaynakları	Ksiloz	6.53
	Laktoz	6.46
	Sukroz	6.47
	Maltoz	6.57
	Mannitol	6.55
	Glikoz	6.40
	Dekstroz	6.49
	Kontrol (C)	6.52
N Kaynakları	(NH ₄) ₂ HPO ₄	7.50
	NH ₄ NO ₃	5.57
	Ca(NO ₃) ₂	4.92
	Malt Ekstrat	5.67
	Maya Ekstrat	5.96
	Pepton	6.04
	Kontrol (N)	5.82

4.4. Misel Gelişimi İçin En Uygun Besin Ortamı, pH, Sıcaklık, C ve N Kaynaklarının Belirlenmesi

L. controversus, *L. pyrogalus* ve *T. terreum* türlerinde misel gelişimi için en uygun besin ortamı, pH, sıcaklık, C ve N kaynaklarının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmaların sonuçları her bir tür için ayrı başlıklar halinde verilmiştir.

4.4.1. *Lactarius controversus*

4.4.1.1. Misel Gelişimi İçin Uygun Besin Ortamlarının Belirlenmesi

L. controversus türünün misel gelişimi üzerine farklı besin ortamlarının (BAF, M40, ME, MMN ve PDA) etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada misel gelişim hızı, misel gelişim süresi ve 6. gündeki misel gelişim alanı tespit edilmiştir (**Çizelge 4.4**). Farklı besin ortamlarında *L. controversus* türüne ait misel koloni yarıçapının

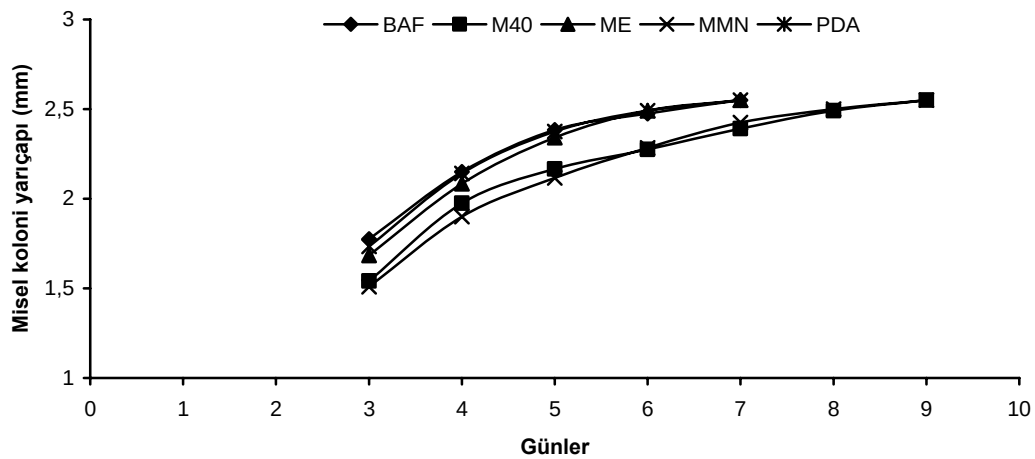
günlere göre değişimi **Şekil 4.2**'de, misel gelişimlerine ait fotoğraflar **Şekil 4.3**'de verilmiştir.

Misel gelişim hızı, gelişim süresi ve 6. gündeki misel gelişim alanı bakımından besin ortamları arasındaki farklılık istatistiksel olarak çok önemli ($P<0.01$) bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı ME ortamında (2.69 mm/gün) tespit edilmiş, bunu aralarında istatistiksel fark bulunmayan PDA ve BAF besin ortamları (sırasıyla 2.53 ve 2.33 mm/gün) izlemiştir. Misel gelişim hızına paralel olarak en kısa misel gelişim süresi de 7 gün ile ME, PDA ve BAF besin ortamlarında belirlenmiştir. MMN ve M40 besin ortamlarında ise gelişim daha yavaş olup, misel gelişimi de diğer ele alınan besin ortamlarına göre daha uzun sürmüştür. Misel gelişim alanları incelendiğinde ME, PDA ve BAF ortamları arasında istatistiksel fark bulunmadığı tespit edilmiştir (**Çizelge 4.4**).

Çizelge 4.4. Farklı besin ortamlarının *L. controversus* türünün misel gelişim hızı, misel gelişim süresi ve misel gelişim alanı üzerine etkisi

Besin ortamı	Misel gelişim hızı (mm/gün)	Misel gelişim süresi (gün)	Misel gelişim alanı (6. günde) (cm ²)
ME	2.69a**	7.0b**	19.50a**
M40	1.90c	9.0a	16.27b
MMN	2.17bc	8.7a	16.39b
PDA	2.53ab	7.0b	19.50a
BAF	2.33abc	7.0b	19.24a

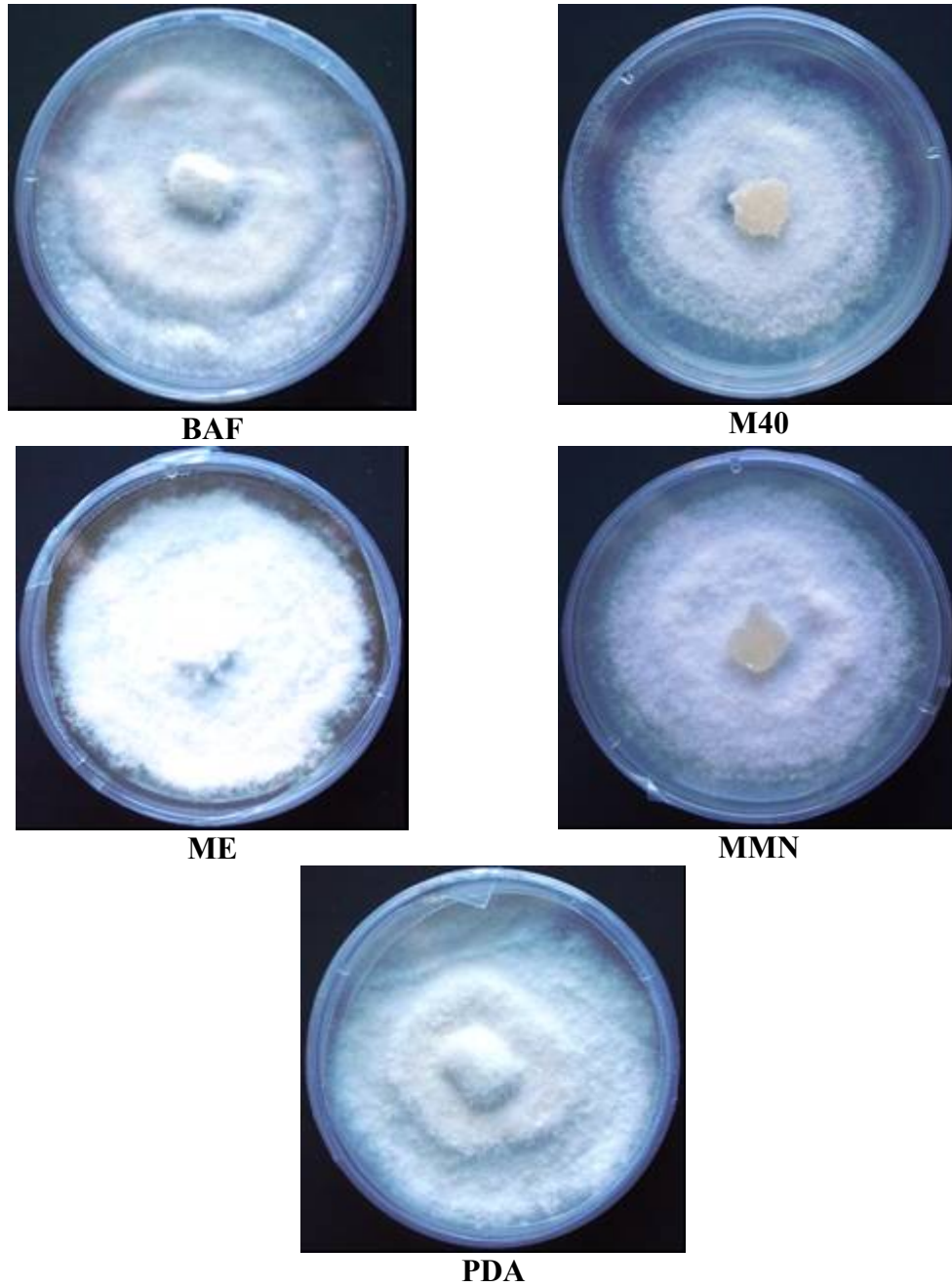
** : $P<0.01$ düzeyinde çok önemli



Şekil 4.2. Farklı besin ortamlarında *L. controversus* türüne ait kümülatif misel koloni yarıçapları

L. controversus türünde ME, PDA ve BAF besin ortamlarının misel gelişimi için uygun oldukları tespit edilmiştir. **Şekil 4.3**'de de görüldüğü gibi *L. controversus* misellerinin özellikle PDA ve BAF ortamlarında yoğun ve pamuksu olduğu belirlenmiştir.

De Araujo ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada patates dekstroza agar (PDA) ortamının ektomikorizal *Pisolithus tinctorius*, *Suillus collinitus*, *L. deliciosus* ve *L. sanguifluus* türlerinin misel gelişimi için uygun olduğunu belirlemişlerdir.



Şekil 4.3. Farklı besin ortamlarında *L. controversus* türüne ait misel gelişimleri

Suillus collinitus, *Pisosithus arrhizus* ve *Hebeloma cylindrosporum*'un miselleri PDA ve Pintro'nun ortamı olmak üzere iki farklı kültür ortamında geliştirilmiştir (De Araujo ve Roussos, 2002). Yenilebilir ektomikorizal mantar türü *Laccaria bicolor*'un misel gelişimi PDA, ME, Sabouraud's agar (SAB), Ingestad's agar (ING), modifiye edilen Melin-Norkrans agar (MMN), Hagem's agar (HG) ve BAF besin ortamlarında araştırılmıştır. En yüksek gelişim hızı ME ve BAF ortamında elde edilirken, en düşük gelişim hızı MMN, ING ve HG ortamlarından sağlanmıştır. Ayrıca çalışmada en yüksek biyomas değerleri BAF ve SAB ortamlarından, en düşük biyomas değerleri ise MMN ve HG ortamlarından elde edilmiştir (Santiago-Martínez ve ark., 2003). Elde edilen araştırma bulgularının bu araştırmacıların bulguları ile benzer olduğu görülmektedir.

Misel gelişim süresi türe ve besin ortamına göre değişiklik göstermektedir. *Lactarius deliciosus* ve *L. sanguifluus*'un kültürde yavaş bir gelişim hızına sahip olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Torres ve Honrubia, 1994; Hartley ve ark., 1997). Guerin-Laguette ve ark. (2000) *L. sanguifluus*'un misel gelişiminin mikro besin solüsyonu ilave edilen BAF ortamında 46 gün sürdüğünü bildirmişlerdir.

4.4.1.2. Misel Gelişimi İçin Uygun pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

L. controversus türünde misel gelişimi üzerine pH ve sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 4 farklı inkübasyon sıcaklığı (15, 20, 25 ve 30 °C) ve 5 pH değeri (4.0, 4.5, 5.0, 5.5 ve 6.0) incelenmiştir. Farklı besin ortamlarının incelendiği çalışma sonucunda misel gelişimleri bakımından ME, PDA ve BAF ortamları arasında fark bulunmamıştır (Çizelge 4.4). Sıcaklık ve pH'nın misel gelişimine etkisinin incelendiği bu çalışmada ucuz olması ve kolay hazırlanması nedeniyle PDA ve içerdiği farklı mineral maddeler nedeniyle de BAF besin ortamı ele alınmıştır. *L. controversus* türünün farklı besin ortamı, sıcaklık ve pH derecelerindeki misel gelişim süresi, misel gelişim hızı ve misel gelişim alanları Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da, misel gelişimlerine ait fotoğraflar ise Şekil 4.4'de verilmiştir.

Misel gelişim süreleri bakımından besin ortamları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak çok önemli ($P<0.01$) bulunurken, misel gelişim hızı bakımından önemli ($P<0.05$) bulunmuştur. PDA ortamında misel gelişim süresi (21.08 gün) BAF ortamına (22.64 gün) göre daha kısa bulunmuştur. Misel gelişim hızı ise PDA ortamında (2.56 mm/gün) BAF ortamına göre (2.50 mm/gün) daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Ancak her iki ortamdaki misel gelişim alanı bakımından önemli fark

bulunmamıştır (**Çizelge 4.5**). *L. controversus* türünde besin ortamını belirlemeye yönelik yaptığımız çalışma sonuçlarında da misel gelişim alanı bakımından PDA ve BAF besin ortamları arasında fark belirlenmemiştir (**Çizelge 4.4**).

Misel gelişim süresi bakımından ortam x pH, ortam x sıcaklık ve ortam x pH x sıcaklık interaksyonları da çok önemli bulunmuştur. En kısa misel gelişim süresi PDA ortamında 25 °C sıcaklıkta ve 4.5 pH değerinde (9.40 gün) elde edilmiştir. Bununla birlikte PDA ve BAF ortamlarında 25 °C’de tüm pH seviyelerinde misel gelişimlerinin daha kısa sürdüğü belirlenmiştir. En uzun misel gelişim süreleri ise sırasıyla BAF ve PDA ortamlarında tüm pH seviyelerinde 30 °C sıcaklıkta tespit edilmiştir (**Çizelge 4.5**).

Misel gelişim hızı yönünden ortam x pH interaksyonu önemli, ortam x sıcaklık ve ortam x pH x sıcaklık interaksyonları ise çok önemli bulunmuştur. En hızlı misel gelişimi PDA ortamında 25 °C sıcaklıkta aralarında istatistiksel fark bulunmayan 4.5, 5.0 ve 5.5 pH değerinde belirlenirken, en yavaş misel gelişimi her iki besin ortamında da (PDA ve BAF) aralarında istatistiksel fark olmayan 30 °C sıcaklıkta incelenen tüm pH seviyelerinde tespit edilmiştir (**Çizelge 4.5**).

Misel gelişim alanı bakımından ortam x sıcaklık ve ortam x pH x sıcaklık interaksyonları çok önemli bulunmuştur. Misel gelişim alanları incelendiğinde de misel gelişim hızına benzer sonuçlar elde edilmiştir (**Çizelge 4.5**).

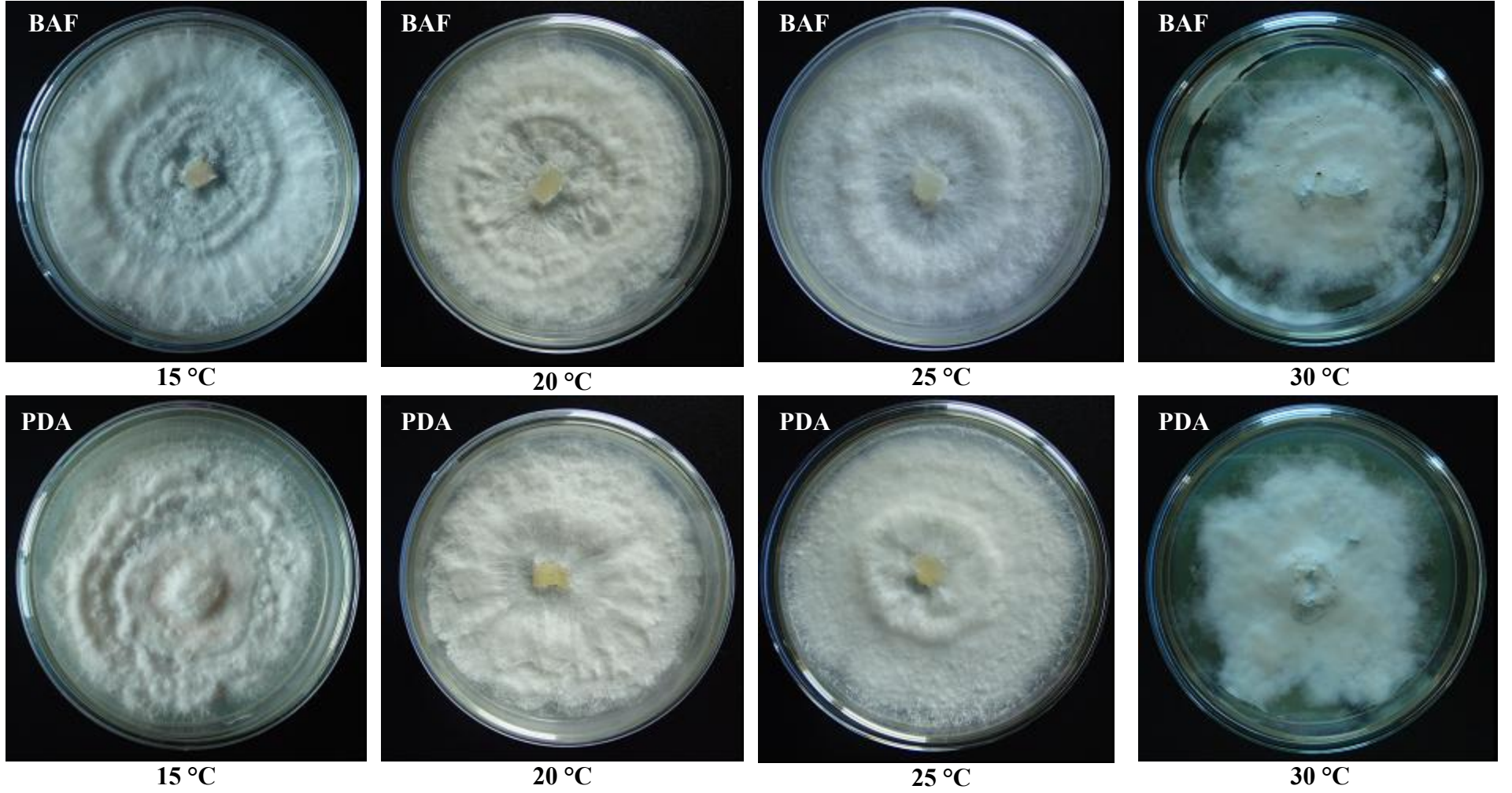
Sıcaklıklar arasında misel gelişim süresi, gelişim hızı ve gelişim alanı bakımından istatistiksel olarak çok önemli fark bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı ve alanı (sırasıyla 3.93 mm/gün ve 44.44 cm²) 25 °C’de elde edilmiş, bunu sırasıyla 20 ve 15 °C izlemiştir. En düşük misel gelişim hızı ve alanı ise (sırasıyla 0.79 mm/gün ve 2.57 cm²) 30 °C’de tespit edilmiştir. En kısa misel gelişim süresi 25 °C’de belirlenirken (10.34 gün), en uzun misel gelişim süresi (46.54 gün) 30 °C’de tespit edilmiştir (**Çizelge 4.6**). 30 °C’de misel gelişimi yavaş ve uzun sürmüş, buna bağlı olarak da petrilere hastalık oranı artmıştır.

Misel gelişim süresi ve gelişim alanı bakımından pH seviyeleri arasındaki farklılıklar çok önemli, misel gelişim hızı bakımından ise önemli bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı aralarında istatistiksel fark olmayan 4.5, 5.0, 5.5 ve 6.0 pH seviyelerinde (sırasıyla 2.53, 2.60, 2.54 ve 2.54 mm/gün), en düşük misel gelişim hızı (2.44 mm/gün) ise pH 4’te belirlenmiştir. Tüm pH seviyelerinde misel gelişimleri birbirine yakın sürelerde tamamlanmasına rağmen, 4.0, 4.5 ve 5.5 pH seviyelerinde daha kısa sürdüğü tespit edilmiştir (**Çizelge 4.6**).

Çizelge 4.5. *L. controversus* türünün farklı besin ortamı, sıcaklık ve pH derecelerindeki misel gelişim süresi, misel gelişim hızı ve misel gelişim alanlarına ait ortalamalar

	pH	PDA					BAF				
		15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	OxpH	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	OxpH
Misel gelişim süresi (gün)	4.0	18.00f**	13.40gh	10.40kl	42.60d	21.10c**	17.60f	13.40gh	10.80jk	45.60c	21.85b
	4.5	18.00f	13.20gh	9.40l	39.20e	19.95d	18.00f	13.60g	10.80jk	49.60a	23.00a
	5.0	17.80f	12.20hı	9.60kl	47.80b	21.85b	17.00f	12.80ghı	10.60jkl	50.80a	22.80a
	5.5	17.00f	13.20ghı	10.40kl	42.60d	20.80c	18.00f	12.20hı	10.40kl	50.20a	22.70a
	6.0	18.00f	11.80ij	10.20kl	46.80b	21.70b	18.00f	12.40ghı	10.80jk	50.20a	22.85a
	OxS	17.76c**	12.76d	10.00f	43.80b		17.72c	12.88d	10.68e	49.28a	
	Ortam (O)					21.08b**					22.64a
Misel gelişim hızı (mm/gün)	4.0	1.99g**	3.00de	3.84b	0.90h	2.43bc*	2.27fg	2.97de	3.76b	0.77h	2.44bc
	4.5	2.31fg	3.02de	4.33a	0.96h	2.66a	2.08g	2.99de	3.82b	0.71h	2.40c
	5.0	2.28fg	3.40c	4.10ab	0.80h	2.64a	2.59f	3.11cde	3.82b	0.68h	2.55ab
	5.5	2.25fg	2.95e	4.06ab	0.90h	2.54ab	2.22g	3.40c	3.88b	0.68h	2.54ab
	6.0	2.13g	3.42c	3.84b	0.80h	2.55ab	2.21g	3.33cd	3.88b	0.74h	2.54ab
	OxS	2.19d**	3.16c	4.03a	0.87e		2.27d	3.16c	3.83	0.72f	
	Ortam (O)					2.56a*					2.50b
Misel gelişim alanı (9 günde) (cm ²)	4.0	17.64lm**	29.24k	42.87bcd	0.56o	22.58	19.80lm	31.10jk	40.78cde	3.74no	23.85
	4.5	20.83l	32.63ijk	47.94a	1.86o	25.82	16.73m	32.87ij	40.19de	4.03no	23.46
	5.0	17.60lm	37.87efg	47.13a	1.64o	26.06	19.03lm	36.21f-i	45.78ab	2.77no	25.95
	5.5	17.65lm	33.56hij	47.24a	1.86o	25.08	19.69lm	36.55fgh	44.30abc	5.86n	26.60
	6.0	16.15m	39.29def	45.44ab	1.39o	25.57	19.82lm	35.16ghi	42.72bcd	2.01o	24.92
	OxS	17.98d**	34.52c	46.13a	1.46f		19.01d	34.38c	42.75b	3.68e	
	Ortam (O)					25.02					24.96

*: P<0.05 düzeyinde önemli, **: P<0.01 düzeyinde çok önemli. O: besin ortamı, S: sıcaklık



Şekil 4.4. *L. controversus* türünün BAF ve PDA besin ortamlarında farklı sıcaklıklardaki misel gelişimleri

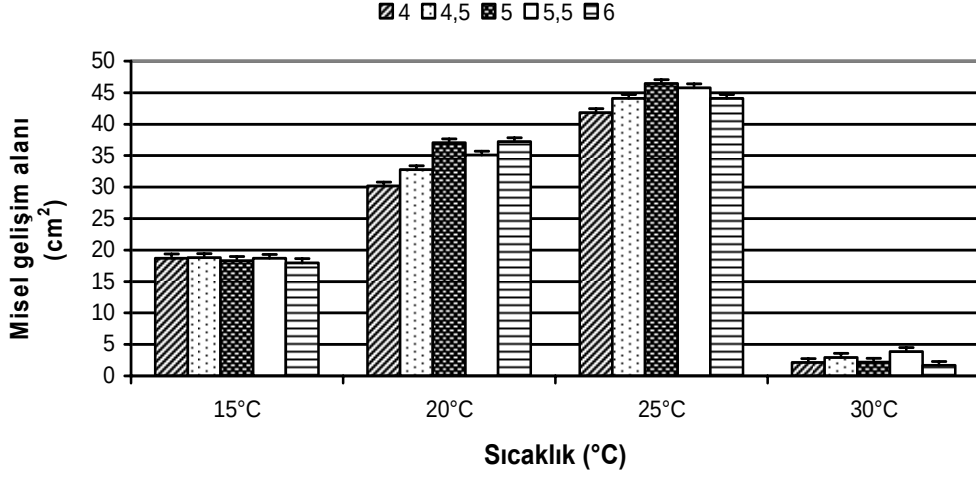
Misel gelişim süresi bakımından pH x sıcaklık interaksiyon ortalamaları 10.10-49.30 gün arasında değişmiş ve interaksiyon çok önemli bulunmuştur. Misel gelişim hızı ve misel gelişim alanı bakımından da pH x sıcaklık interaksiyonu çok önemli olarak belirlenmiştir. En yüksek misel gelişim hızı 25 °C sıcaklıkta ve pH 4.5'ta (4.07 mm/gün) elde edilmiş, ortam sıcaklığı 30 °C olduğunda tüm pH değerlerinde misel gelişim hızı bakımından en düşük değerler tespit edilmiştir (**Çizelge 4.6**). *L. controversus* türünde farklı pH ve sıcaklık derecelerinin misel gelişim alanı üzerine etkisi **Şekil 4.5**'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. *L. controversus* türünün misel gelişim süresi, misel gelişim hızı ve misel gelişim alanına ait pH x sıcaklık interaksiyon ortalamaları

Özellikler	pH	Sıcaklık (°C)				Ortalama
		15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	
Misel gelişim süresi (gün)	4.0	17.80d**	13.40e	10.60g	44.10c	21.48b**
	4.5	18.00d	13.40e	10.10g	44.40c	21.48b
	5.0	17.40d	12.50f	10.10g	49.30a	22.33a
	5.5	17.50d	12.70ef	10.40g	46.40b	21.75b
	6.0	18.00d	12.10f	10.50g	48.50a	22.28a
	Ortalama	17.74b**	12.82c	10.34d	46.54a	
Misel gelişim hızı (mm/gün)	4.0	2.10f**	2.99d	3.80b	0.84g	2.44b*
	4.5	2.20f	3.01d	4.07a	0.84g	2.53a
	5.0	2.44e	3.25c	3.96ab	0.74g	2.60a
	5.5	2.24ef	3.18cd	3.97ab	0.79g	2.54a
	6.0	2.17f	3.38c	3.86ab	0.77g	2.54a
	Ortalama	2.23c**	3.16b	3.93a	0.79d	
Misel gelişim alanı (9.günde) (cm ²)	4.0	18.72f**	30.17e	41.83b	2.15g	23.22c**
	4.5	18.78f	32.75de	44.06ab	2.95g	24.64b
	5.0	18.32f	37.04c	46.46a	2.21g	26.01a
	5.5	18.67f	35.05cd	45.77a	3.86g	25.84ab
	6.0	17.99f	37.22c	44.08ab	1.70g	25.25ab
	Ortalama	18.49c**	34.45b	44.44a	2.57d	

*: P<0.05 düzeyinde önemli, **: P<0.01 düzeyinde çok önemli

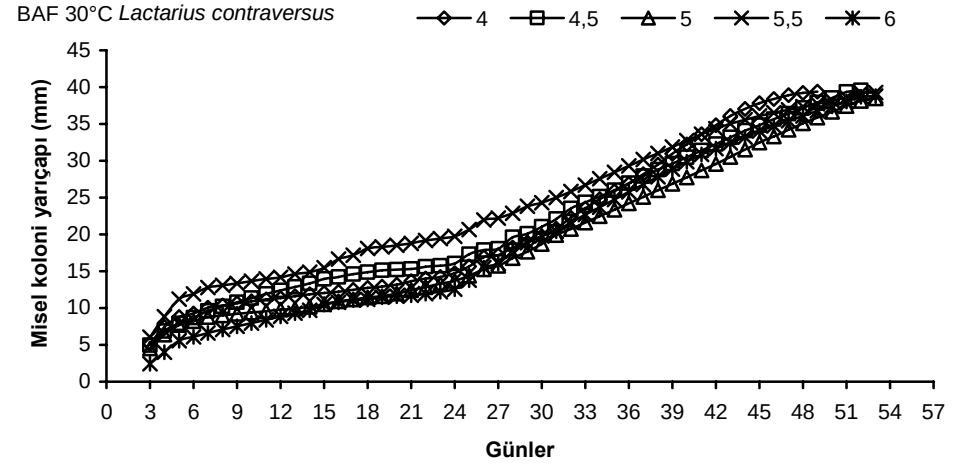
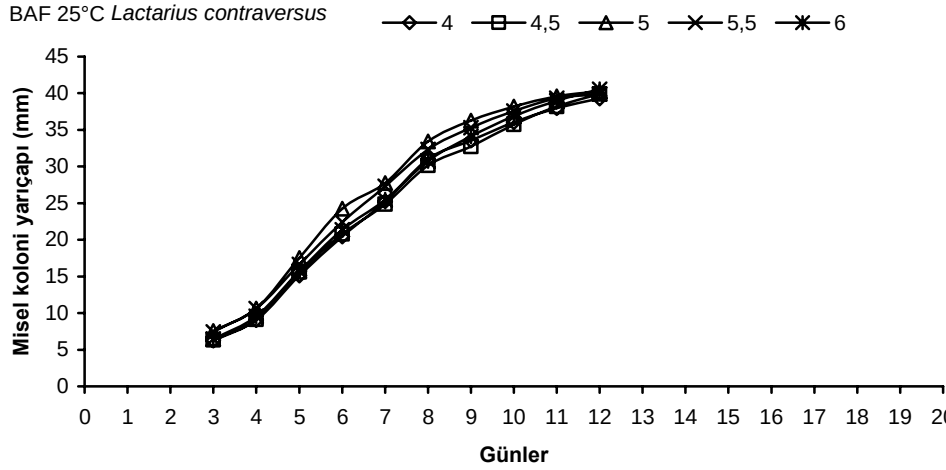
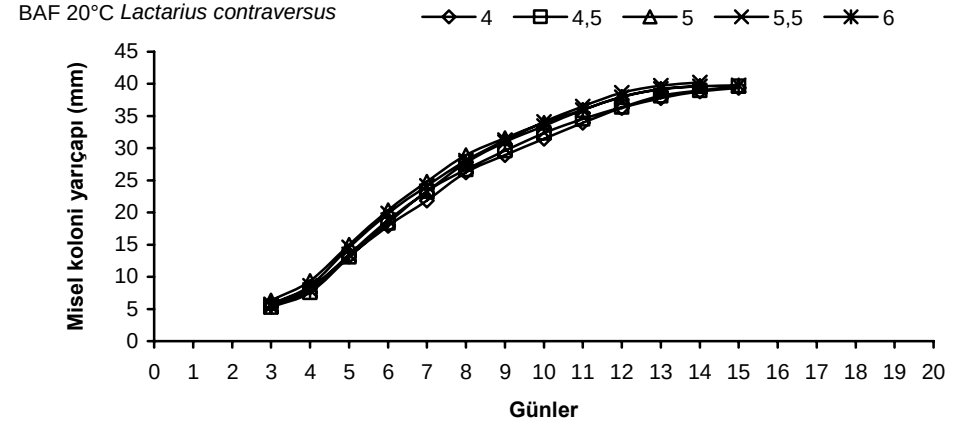
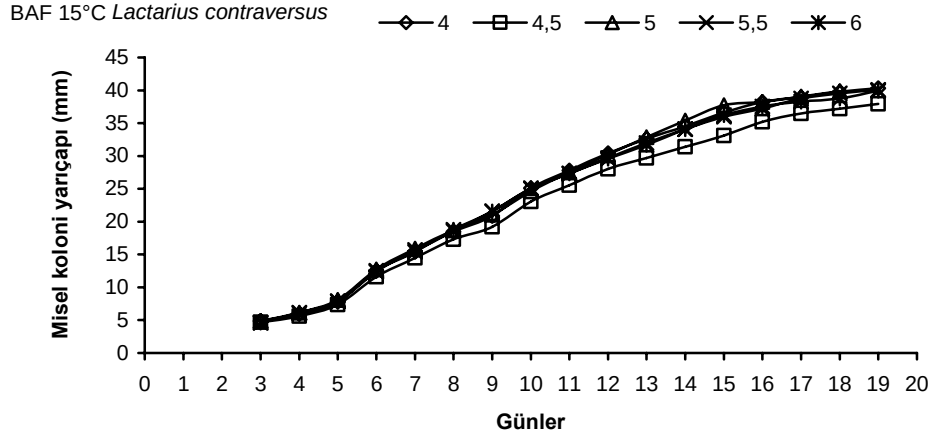
Yapılan bazı çalışmalarda ektomikorizal mantarların gelişimi üzerine pH (**Hung ve Trappe, 1983; Sundari ve Adholeya, 2003**) ve sıcaklığın (**HacsKaylo ve ark., 1965; Sánchez ve ark., 2001; Xu ve ark., 2008**) etkisi araştırılmıştır. Çoğu araştırmacı farklı pH değerlerinde meydana gelen farklı misel morfolojisinin biyomas üretimi ve metabolit oluşumu için önemli bir faktör olduğunu bildirmişlerdir. Ortam pH'sı hücre morfolojisini, yapısını, değişik besin maddelerinin alımını ve biyosentez üretimini etkileyebilmektedir (**Shu ve Lung, 2004**).



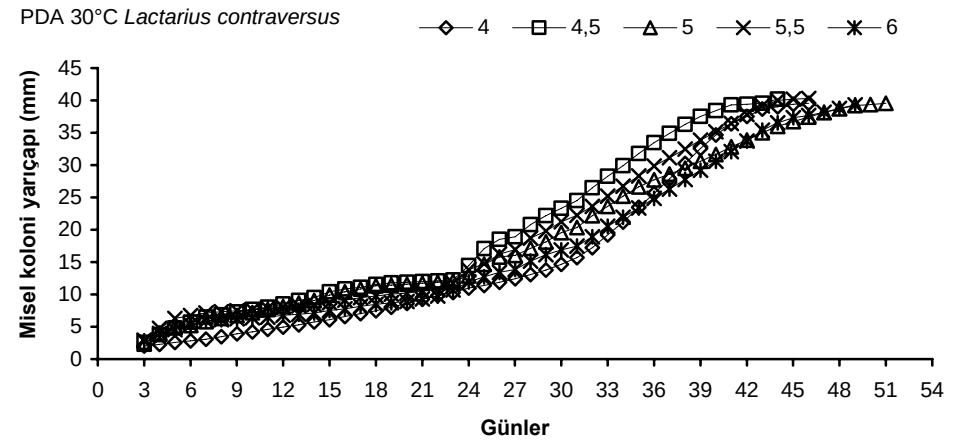
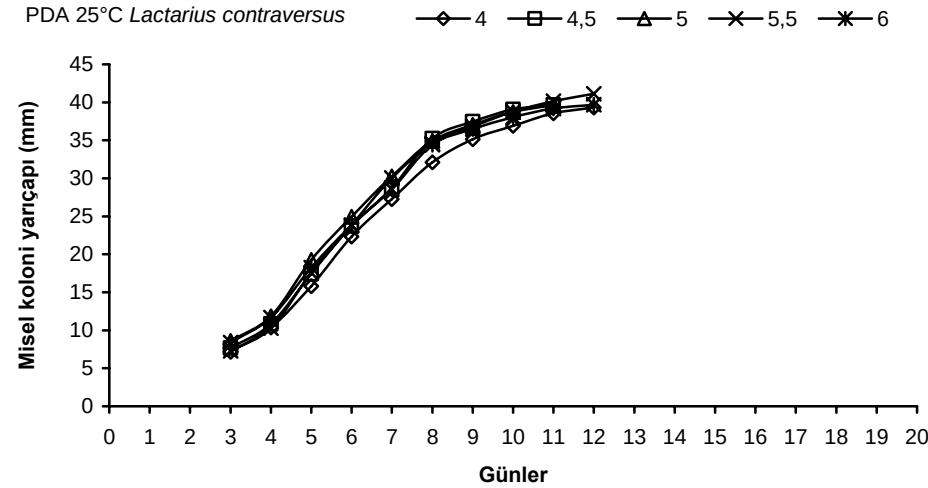
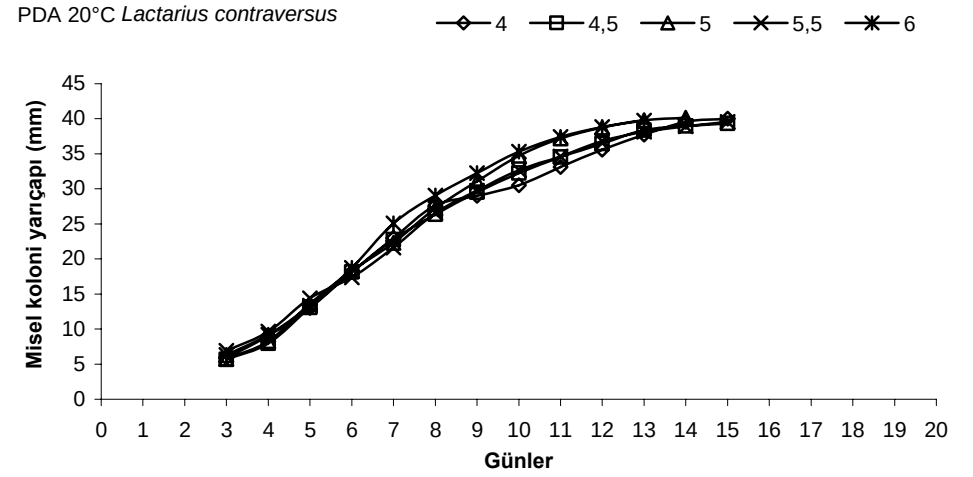
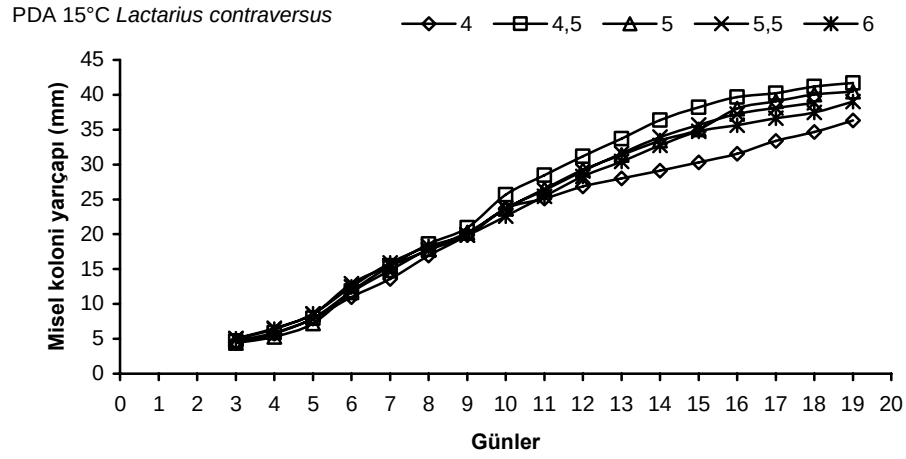
Şekil 4.5. *L. controversus* türünde farklı pH ve sıcaklık derecelerinin misel gelişim alanı üzerine etkisi (İki besin ortamının ortalaması üzerinden elde edilen pHxS interaksiyonu değerleri kullanılmıştır)

Flores (2003) yaptığı çalışmada *Lactarius indigo*'nun farklı ırklarının misel biyomas üretimi için optimum pH değerlerinin 4.5-5.5 olduğunu belirlemiştir. *Lactarius* cinsinin pH'daki değişimlerden az etkilendiği bildirilmiştir (**Espigol, 1999**). **Xu ve ark. (2008)** *L. deliciosus*, *L. insulsus* ve *Boletus edulis* ektomikorizal mantar türlerinin misel gelişimleri üzerine pH'nın çok az bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada mantar türlerinin gelişimi için optimum sıcaklıklar 25-28 °C olarak belirlenmiş ve özellikle yüksek sıcaklıkların misellerin ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. Araştırma bulgularının bu çalışma sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir.

L. controversus türünün BAF ve PDA besin ortamlarında farklı sıcaklıklardaki misel koloni yarıçaplarının günlere göre değişimi **Şekil 4.6** ve **4.7**'de verilmiştir. Her iki besin ortamında da 30 °C'deki günlere göre misel koloni yarıçaplarındaki artışın diğer sıcaklık değerlerine göre düşük olduğu ve misel gelişiminin uzun sürdüğü tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. *L. controversus* türünün BAF ortamında farklı sıcaklıklardaki kümülatif misel koloni yarıçapları



Şekil 4.7. *L. controversus* türünün PDA ortamında farklı sıcaklıklardaki kümülatif misel koloni yarıçapları

Çalışma sonucunda *L. controversus* türünün misel gelişimi için en uygun sıcaklık değerinin 25 °C olduğu, ortam pH değerinin de 4.5 ve 5.0 olabileceği belirlenmiştir.

4.4.1.3. Misel Gelişimi İçin Uygun C ve N Kaynaklarının Belirlenmesi

L. controversus türünde misel gelişim hızı ve gelişim alanı bakımından C kaynakları arasındaki farklılık istatistiksel olarak çok önemli ($P<0.01$) bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı mannitolden (3.03 mm/gün) elde edilmiş, bunu hiçbir C kaynağının kullanılmadığı kontrol ve laktoz kaynakları (sırasıyla 2.97 mm/gün ve 2.96 mm/gün) izlemiştir. En düşük misel gelişim hızı ise 2.49 mm/gün ile ksilozdan elde edilmiştir. Misel gelişim hızı ile paralel olarak en yüksek misel gelişim alanı mannitolde (58.84 cm²), en düşük misel gelişim alanı ise ksilozda (40.29 cm²) tespit edilmiştir (**Çizelge 4.7, Şekil 4.8 ve 4.9**).

Griffin (1994) mannitol ve fruktozun glikozdan sonra en yaygın kullanılan C kaynakları olduğunu belirtmiştir. *L. controversus* türünde elde ettiğimiz bulgular, *Amanita caesarea*'nın birkaç izolatına farklı C (nişasta, glikoz, fruktoz, mannitol, sukroz ve ksiloz) ve N (albümin bovin, Ca(NO₃)₂ ve (NH₄)₂HPO₄) kaynaklarının etkisini araştıran **Daza ve ark. (2006)**'nın bulgularıyla benzerlik göstermektedir. **Daza ve ark. (2006)** incelenen C kaynakları arasında en yüksek misel koloni çapının mannitolden, en yüksek misel kuru ağırlığının ise mannitol ve glikozdan elde edildiğini, buna karşılık ksilozun misel gelişimini engellediği ve hiç misel gelişiminin olmadığını bildirmişlerdir.

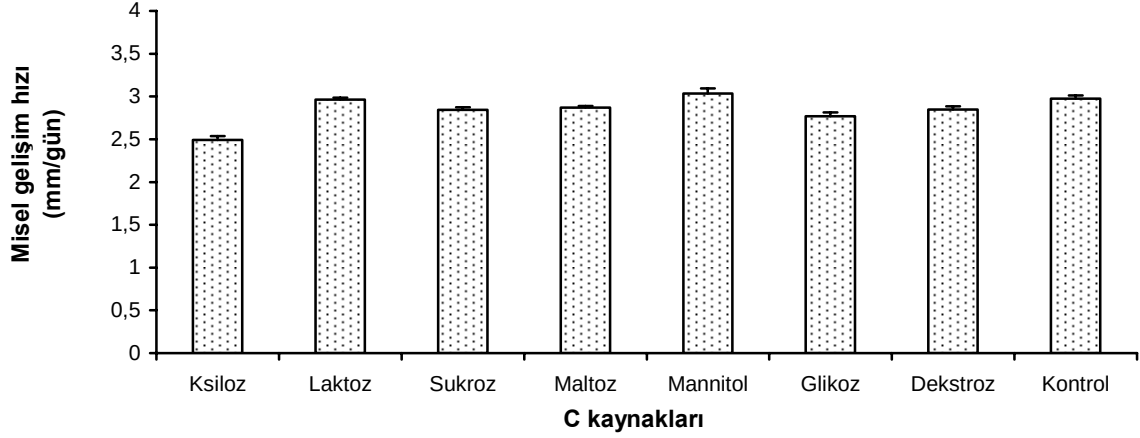
Çizelge 4.7. *L. controversus* türünde C kaynaklarının misel gelişim hızı, misel gelişim alanı ve misel yapısı üzerine etkileri

C Kaynakları	Misel gelişim hızı (mm/gün)	Misel gelişim alanı (cm ²) ¹	Misel yapısı ²
Ksiloz	2.49d**	40.29c**	P, Y
Laktoz	2.96ab	52.78b	P, Y
Sukroz	2.84bc	49.86b	P, Y
Maltoz	2.87bc	50.21b	P, Y
Mannitol	3.03a	58.84a	P, Y
Glikoz	2.77c	52.68b	P, Y
Dekstroz	2.85bc	53.00b	P, Y
Kontrol C	2.97ab	52.60b	P, Y

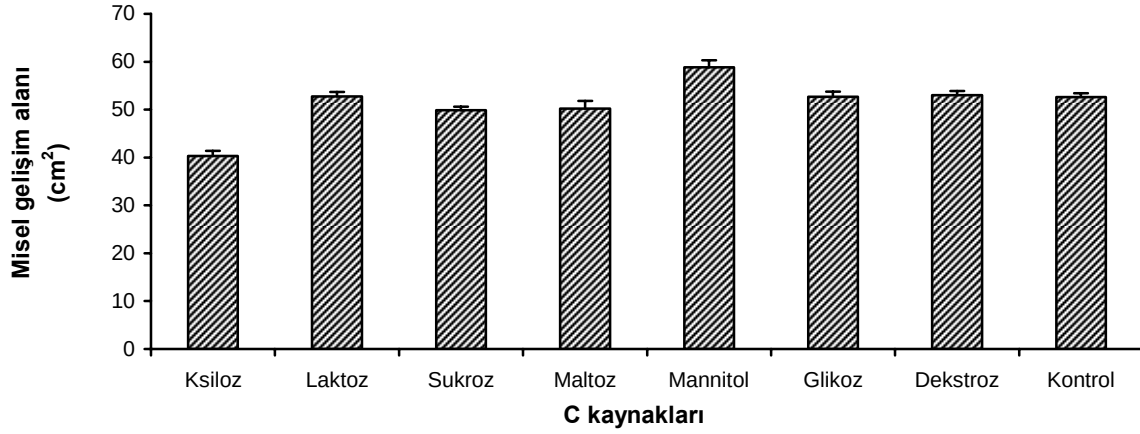
** : $P<0.01$ düzeyinde çok önemli

¹Misel gelişim alanları misel aşılmasından sonra 13. günde ölçülmüştür. En iyi gelişim gösteren ortamlarda miselin petriyi tamamen kapladığı dönem ölçüm zamanı olarak alınmıştır.

²P: pamuksu, Y: yoğun

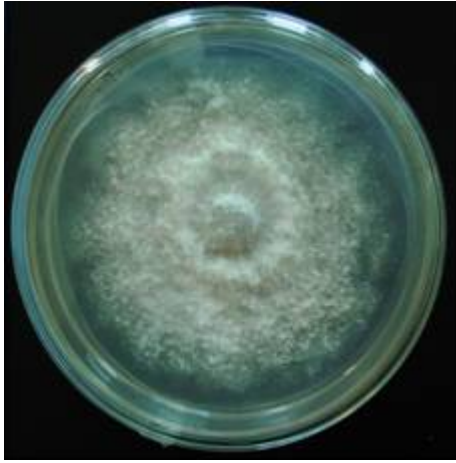


Şekil 4.8. *L. controversus* türünde farklı C kaynaklarının misel gelişim hızı üzerine etkisi

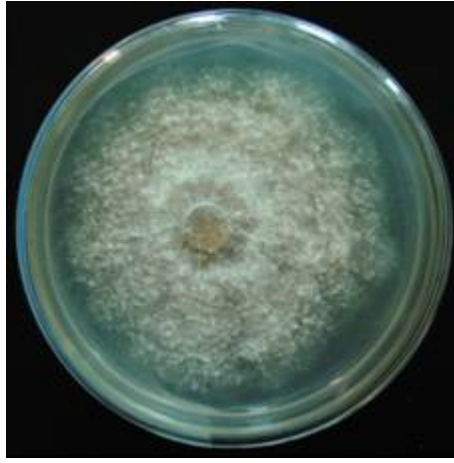


Şekil 4.9. *L. controversus* türünde farklı C kaynaklarının misel gelişim alanı üzerine etkisi

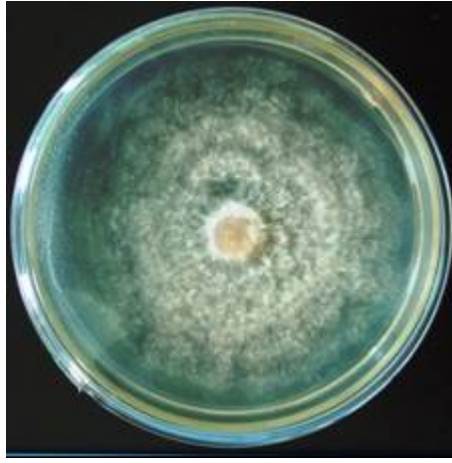
L. controversus türünün farklı C kaynaklarındaki misel gelişimlerine ait görüntüler Şekil 4.10'da verilmiştir. Ksiloz'da misel gelişimi diğer C kaynaklarına göre daha yavaş olmakla birlikte, misel yapıları birbirine benzerlik göstermektedir.



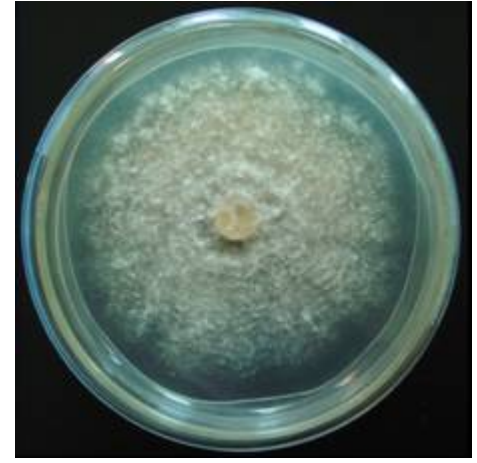
Dekstroz



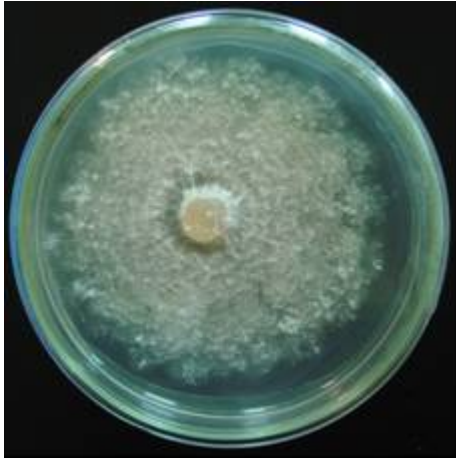
Glikoz



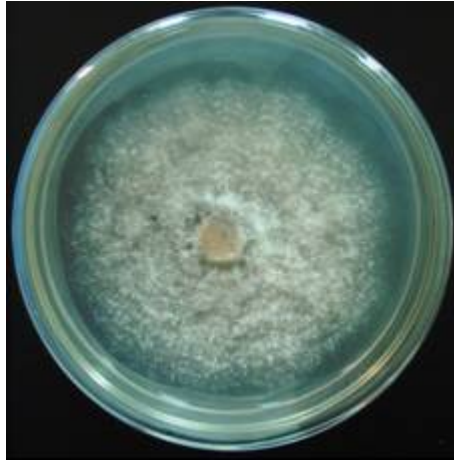
Laktoz



Maltoz



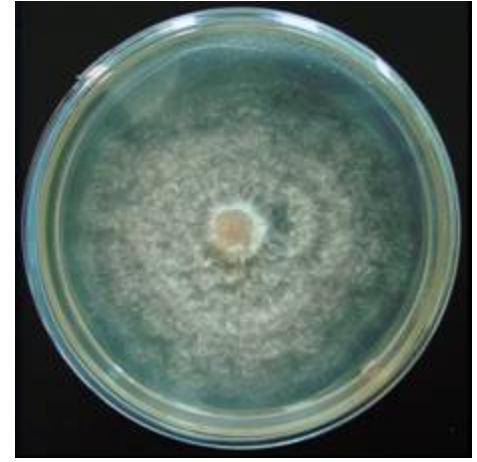
Mannitol



Sukroz



Ksiloz



Kontrol C

Şekil 4.10. *L. controversus* türünün farklı C kaynaklarındaki misel gelişimleri

Farklı N kaynaklarından hazırlanan besin ortamında *L. controversus* türünün misel gelişim hızı ve misel gelişim alanı **Çizelge 4.8'**de verilmiştir.

Misel gelişim hızı ve gelişim alanı bakımından N kaynakları arasındaki farklılık istatistiksel olarak çok önemli ($P<0.01$) bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı ve gelişim alanı (sırasıyla 4.14 mm/gün ve 60.60 cm²) malt ekstrattan elde edilmiş, bunu aynı grupta yer alan kontrol ve pepton izlemiştir. En düşük misel gelişim hızı ve misel gelişim alanı ise amonyum nitratta (sırasıyla 1.55 mm/gün ve 16.48 cm²) saptanmıştır (**Çizelge 4.8, Şekil 4.11 ve 4.12**).

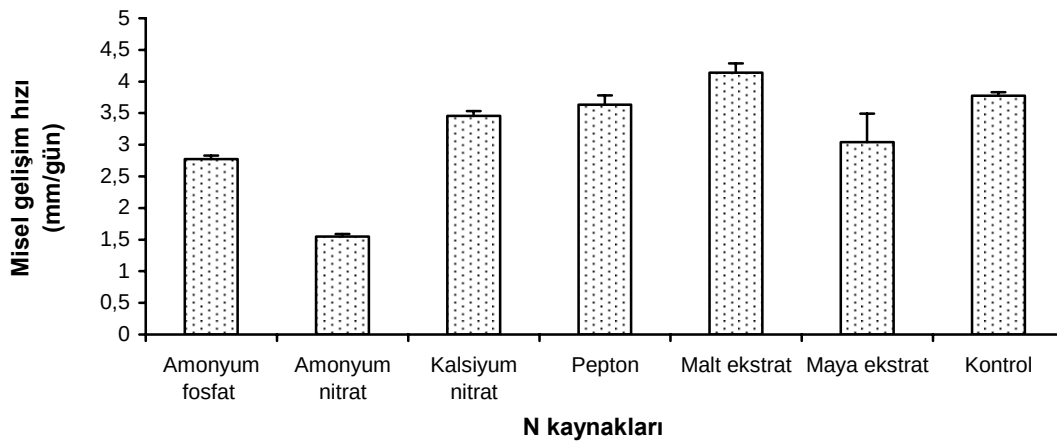
Çizelge 4.8. *L. controversus* türünde N kaynaklarının misel gelişim hızı, misel gelişim alanı ve misel yapısı üzerine etkileri

N Kaynakları	Misel gelişim hızı (mm/gün)	Misel gelişim alanı (cm ²) ¹	Misel yapısı ²
Amonyum fosfat	2.78c**	33.14d**	P, Y
Amonyum nitrat	1.55d	16.48e	P, Y
Kalsiyum nitrat	3.46abc	46.00bc	P, Y
Malt ekstrat	4.14a	60.60a	P, D, Y
Maya ekstrat	3.04bc	43.40cd	P, D, Y
Pepton	3.63ab	52.58abc	P, Y
Kontrol	3.77ab	56.53ab	Z

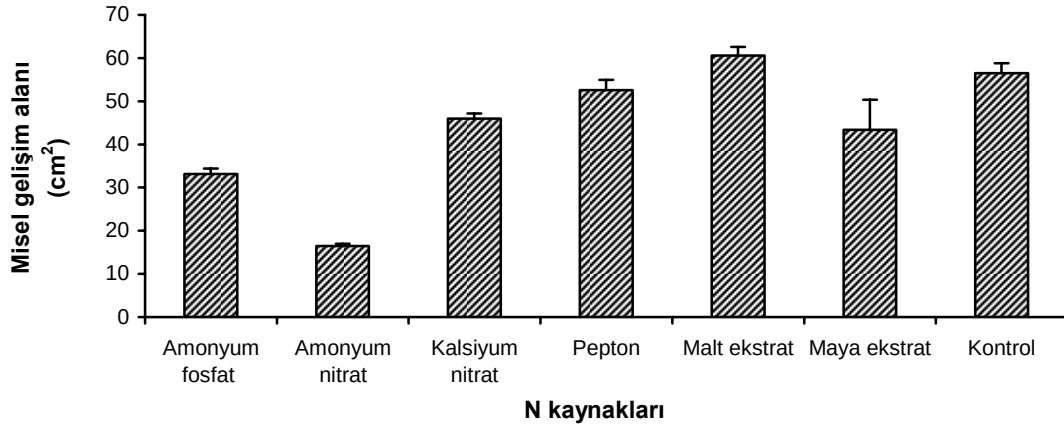
** $P<0.01$ düzeyinde çok önemli

¹Misel gelişim alanları misel aşılmasından sonra 10. günde ölçülmüştür. En iyi gelişim gösteren ortamlarda miselin petriyi tamamen kapladığı dönem ölçüm zamanı olarak alınmıştır.

²P: pamuksu, D: düzensiz, Y: yoğun, Z: zayıf ve seyrek



Şekil 4.11. *L. controversus* türünde farklı N kaynaklarının misel gelişim hızı üzerine etkisi



Şekil 4.12. *L. controversus* türünde farklı N kaynaklarının misel gelişim alanı üzerine etkisi

Şekil 4.13'de de görüldüğü gibi *L. controversus* türünde misel yapıları üzerine N kaynaklarının etkileri oldukça farklı olmuştur. N kaynağının hiç kullanılmadığı kontrol uygulamasında miseller zayıf ve seyrek gelişmiştir. Amonyum nitrat ve amonyum fosfatta ise diğer N kaynaklarına göre gelişimin yavaş olduğu görülmektedir. Malt ekstrat ve maya ekstratta ise misel gelişim hızının yüksek olmasına rağmen, misel gelişimlerinde düzensiz yoğunlaşmalar olduğu belirlenmiştir. Gelişim hızı ve misel yapısı dikkate alındığında pepton uygulamasının diğer uygulamalara göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan çok sayıda çalışmada ektomikorizal mantarların misel gelişimi üzerine C ve N kaynaklarının etkisi araştırılmıştır (Melin ve Norkrans, 1948; Norkrans, 1953; Ferry ve Das, 1968; Palmer ve Hacskeylo, 1970; Lamb, 1974; Finlay ve ark., 1992; Keller, 1996; Baar ve ark., 1997; Chalot ve Brun, 1998; Dickie ve ark., 1998; Sarjala, 1999; Rangel-Castro ve ark., 2002; Sangtican ve Schmidt, 2002; Hatakeyama ve Ohmasa, 2004). C ve N kaynaklarının ektomikorizal mantarların gelişimini ve ektomikorizanın kurulumunu etkilediği bildirilmektedir (France ve Reid, 1983; Lilleskov ve ark., 2002). Ektomikorizal mantarlar C gereksinimlerinin çoğunu ektomikoriza yoluyla konukçularından sağlamaktadırlar. Miles (1999) mantarların heterotrofik organizmalar olmaları nedeniyle misel gelişimi için C kaynağı ile desteklenmesi gerektiğini, C kaynakları kullanılırken genellikle yaklaşık % 2 civarında basit şekerlerden glikozun tercih edilmesinin yerinde olacağını belirtmiştir. Aynı zamanda araştırmacı azotun mantar gelişimi için kullanılan ortamda istenen element olduğunu ve mantar proteinleri, purinleri, primidlerinin sentezi için esas olup, kitinin üretimi için gerektiğini de bildirmiştir. Ayrıca mantar ortamındaki yaygın kullanılan N kaynaklarının, nitrat ve amonyum tuzları ile organik N bileşimleri olduğunu belirtmiştir.



Amonyum Fosfat



Amonyum Nitrat



Kalsiyum Nitrat



Malt Ekstrat



Maya Ekstrat



Pepton



Kontrol N

Şekil 4.13. *L. controversus* türünün farklı N kaynaklarında misel gelişimleri

Hatakeyama ve Ohmasa (2004) C (glikoz, sukroz, selobiyoz, mannoz, gliserol, dekstrin, trehaloz ve çözünebilir nişasta) ve N (amonyum tartarat, arginin, glutamik asit, aspartik asit ve alanin) kaynaklarının farklı *Suillus* ve *Boletinus* ırklarının misel gelişimine etkisini araştırdıkları çalışmada incelenen tüm ırklarda glikoz veya trehaloz'un bulunduğu ortamlarda iyi bir misel gelişimi olduğunu bildirmişlerdir.

Amonyum çoğu ektomikorizal mantar türü için genellikle en kolay kullanılan N kaynağıdır (**Smith ve Read, 1997**). **Straatsma ve Griensven (1986)** *Cantharellus cibarius* için en uygun N kaynağının amonyum olduğunu bildirmişlerdir. Organik ve inorganik N kaynaklarını içeren sıvı ortamda 6 farklı ektomikorizal mantar türünün (*Suillus variegatus*, *Piloderma croceum*, *Paxillus involutus*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Thelephora terrestris*, *Lactarius rufus*) misel gelişimini inceleyen **Finlay ve ark. (1992)** bütün türlerin amonyumda iyi bir gelişim gösterdiğini belirlemişlerdir. **Daza ve ark. (2006)** yaptıkları çalışmada N kaynakları arasında en yüksek misel koloni çapını albümin bovin ve nitratta, en yüksek misel kuru ağırlıklarını ise amonyumda tespit etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda *A. caesarea*'nın en iyi misel gelişimi için C kaynağı olarak mannitol ve glikoz, N kaynağı olarak ise amonyumun kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Fakat elde ettiğimiz bulgular *L. controversus* türünün amonyumun kullanıldığı ortamlarda (amonyum fosfat ve amonyum nitrat) misel gelişiminin iyi olmadığını göstermektedir.

Finlay ve ark. (1992) nitrat içeren ortamda misel gelişiminin genellikle daha yavaş olduğunu bulmuşlardır. Bazı çalışmalarda nitratin hem toprakta hem de *in vitro*'da bazı ektomikorizal mantarların gelişimi üzerinde negatif etkilere sahip olduğunu bildirilmiştir (**Richards, 1965; Harley ve Smith, 1983**). Bu sonuçlar elde ettiğimiz bulgularla uyum göstermektedir.

4.4.2. *Lactarius pyrogalus*

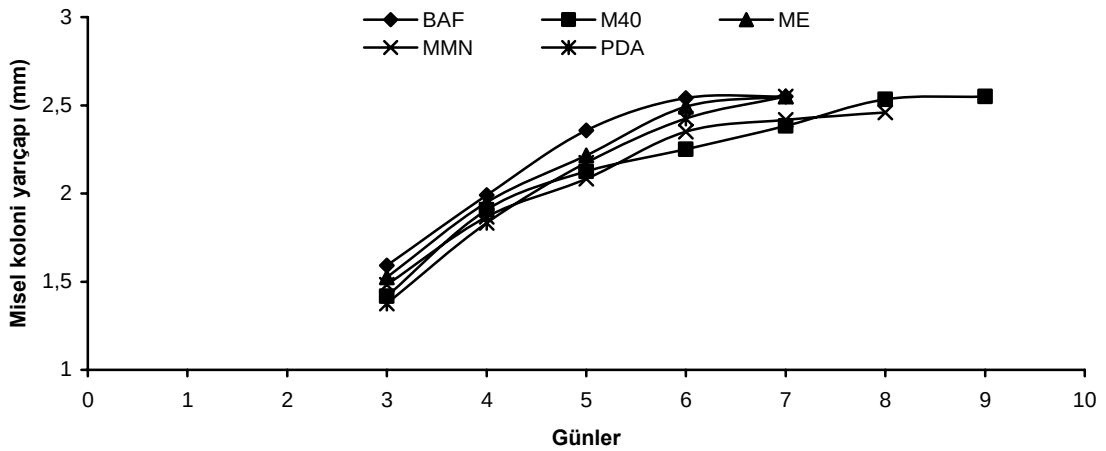
4.4.2.1. Misel Gelişimi İçin Uygun Besin Ortamlarının Belirlenmesi

Farklı besin ortamlarının *L. pyrogalus* türünün misel gelişimi üzerine etkisini incelediğimizde misel gelişim hızı, misel gelişim süresi ve gelişim alanı bakımından besin ortamları arasındaki farklılık istatistiksel olarak çok önemli ($P<0.01$) bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı, aralarında istatistiksel fark bulunmayan PDA, ME ve BAF ortamından (sırasıyla 3.27, 3.22 ve 3.17 mm/gün) elde edilmiştir. En düşük misel gelişim hızı ise M40 ortamında (2.23 mm/gün) belirlenmiştir. En kısa misel gelişim süresi 7.0 gün ile BAF ve ME ortamlarında, en uzun misel gelişim süresi ise 9.0 gün ile M40 ortamında tespit edilmiştir (**Çizelge 4.9** ve **Şekil 4.14**). Misel gelişim alanları incelendiğinde ise *L. controversus* türünde olduğu gibi M40 ve MMN ortamlarının misel gelişim alanları diğer ele alınan besin ortamlarına göre daha düşük bulunmuştur (**Çizelge 4.9**). **Şekil 4.15**'de görüldüğü gibi tüm besin ortamlarında *L. pyrogalus* türünün misellerinin yoğun ve pamuksu olduğu belirlenmiştir.

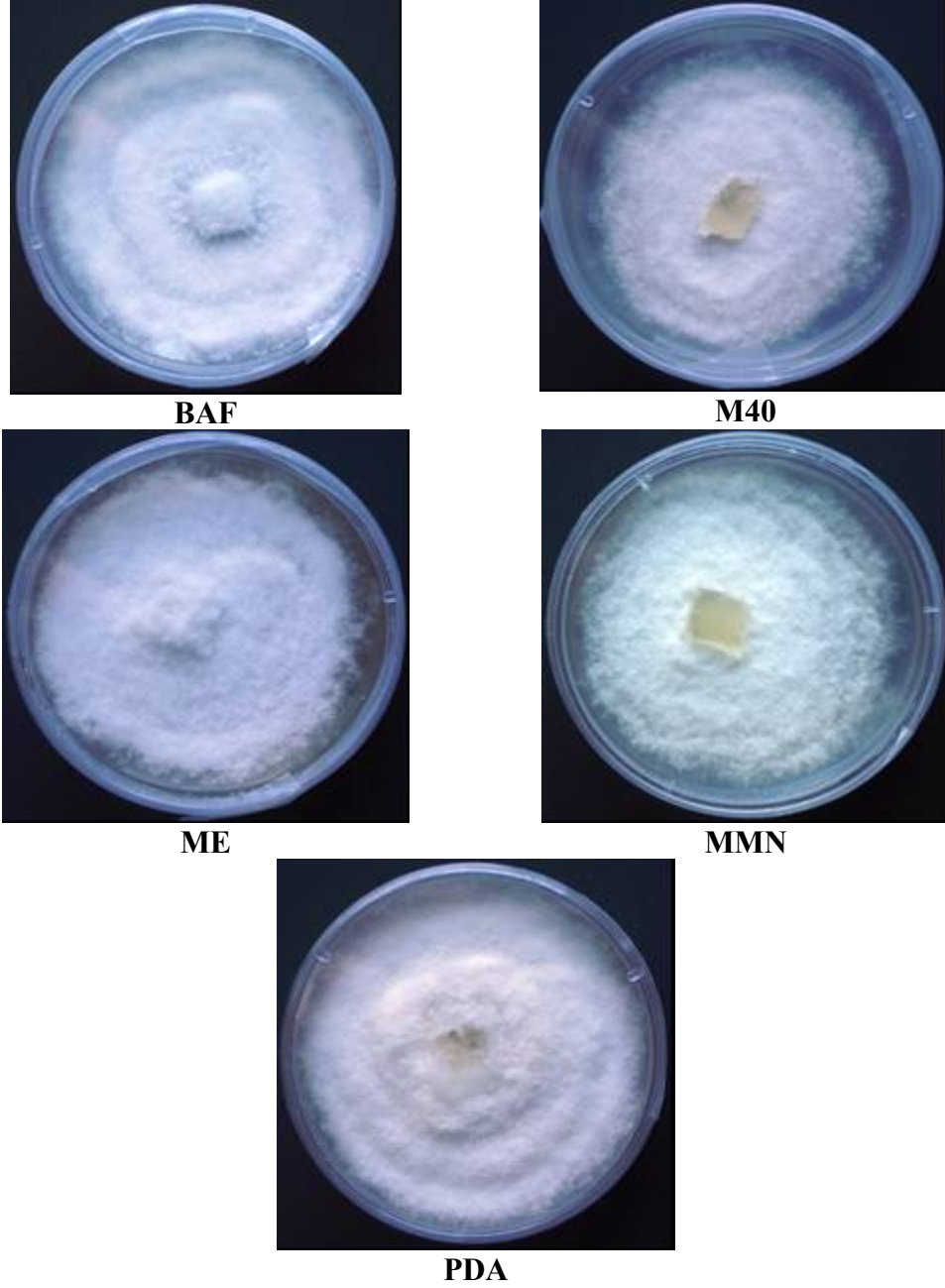
Çizelge 4.9. Farklı besin ortamlarının *L. pyrogalus* türünün misel gelişim hızı, misel gelişim süresi ve misel gelişim alanı üzerine etkisi

Besin ortamı	Misel gelişim hızı (mm/gün)	Misel gelişim süresi (gün)	Misel gelişim alanı (6. günde) (cm ²)
ME	3.22a**	7.0c**	19.50a**
M40	2.23b	9.0a	15.91c
MMN	2.61ab	8.0b	17.37bc
PDA	3.27a	7.3bc	18.48ab
BAF	3.17a	7.0c	20.29a

** : $P<0.01$ düzeyinde çok önemli



Şekil 4.14. Farklı besin ortamlarında *L. pyrogalus* türüne ait kümülatif misel koloni yarıçapları



Şekil 4.15. Farklı besin ortamlarında *L. pyrogalus* türüne ait misel gelişimleri

BAF, ME ve PDA besin ortamlarının misel gelişimi için uygun oldukları tespit edilmiştir. Elde edilen araştırma bulgularının yenilebilir ektomikorizal mantar türü *Laccaria bicolor*'un en iyi misel gelişimini ME ve BAF ortamından elde edildiğini belirleyen **Santiago-Martínez ve ark. (2003)**'ün bulguları ile benzer olduğu görülmektedir.

4.4.2.2. Misel Gelişimi İçin Uygun pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

L. controversus türünde olduğu gibi *L. pyrogalus* türünde de BAF ve PDA besin ortamlarında farklı sıcaklık (15, 20, 25 ve 30 °C) ve pH seviyelerinde (4.0, 4.5, 5.0, 5.5 ve 6.0) misel gelişim hızı, gelişim süreleri ve misel gelişim alanları tespit edilmiştir (**Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11**). Petrideki misel gelişimlerine ait fotoğraflar **Şekil 4.16**'da verilmiştir. Misel gelişim süreleri bakımından besin ortamları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$), misel gelişim hızı ve gelişim alanı bakımından çok önemli ($P<0.01$) bulunmuştur. *L. pyrogalus* türünde de PDA ortamında misel gelişim süresinin BAF ortamına göre daha kısa, misel gelişim hızı ve misel gelişim alanının ise daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (**Çizelge 4.10**).

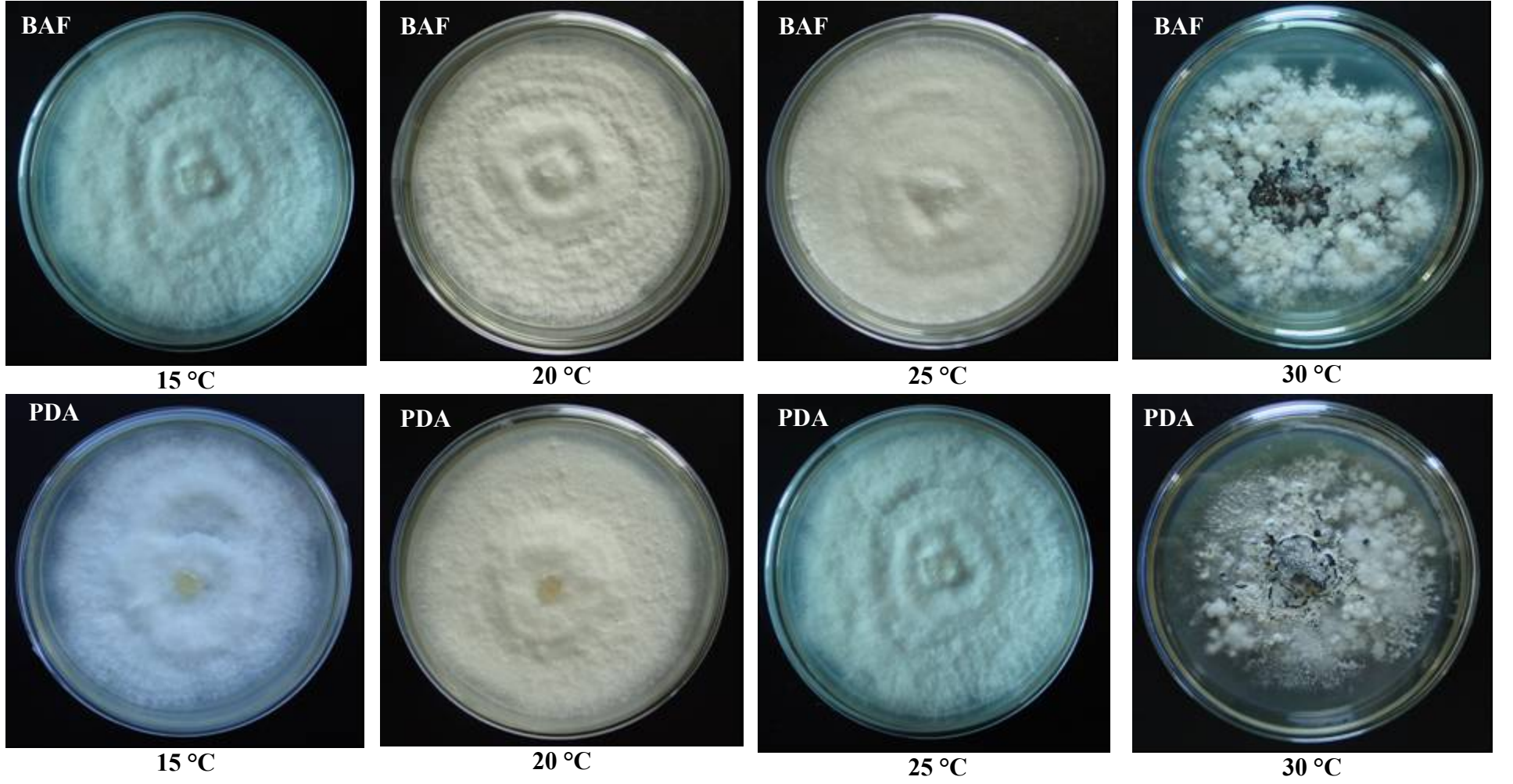
Misel gelişim süresi bakımından ortam x pH, ortam x sıcaklık ve ortam x pH x sıcaklık interaksyonları çok önemli bulunmuştur. En kısa misel gelişim süresi (8.00 gün) PDA ortamında 25 °C sıcaklıkta ve 4.0, 4.5 ve 5.5 pH değerinde, en uzun misel gelişim süresi ise (50.60 gün) PDA ortamında 30 °C sıcaklıkta, 4.0 ve 5.0 pH değerinde elde edilmiştir. Misel gelişim hızı yönünden ortam x pH interaksyonu önemli, ortam x sıcaklık ve ortam x pH x sıcaklık interaksyonları ise çok önemli bulunmuştur. PDA ortamında 25 °C sıcaklıkta ve 4.0 pH değerinde en yüksek misel gelişim hızı (5.03 mm/gün) belirlenmiştir. En düşük misel gelişim hızı ise aralarında istatistiksel fark olmayan 30 °C sıcaklıkta PDA ve BAF ortamlarında incelenen tüm pH seviyelerinde bulunmuştur. Misel gelişim alanı bakımından ortam x sıcaklık ve ortam x pH x sıcaklık interaksyonları çok önemli bulunmuştur. Misel gelişim hızına benzer sonuçlar elde edilmiştir (**Çizelge 4.10**).

Sıcaklıklar arasında misel gelişim süresi, gelişim hızı ve gelişim alanı bakımından istatistiksel olarak çok önemli fark bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı 25 °C'den (4.59 mm/gün) elde edilirken, en düşük misel gelişim hızı 30 °C'de (0.75 mm/gün) belirlenmiştir. En kısa misel gelişim süresi 25 °C'de (8.52 gün) tespit edilmiş, bunu sırasıyla 20 ve 15 °C izlemiştir. En uzun misel gelişim süresi ise 48.28 gün ile 30 °C'de belirlenmiştir (**Çizelge 4.11**). En yüksek misel gelişim alanı 25 °C'de incelenen tüm pH seviyelerinde belirlenmiştir (**Şekil 4.17**). *L. controversus* türünde olduğu gibi *L. pyrogalus* türünde de 30 °C'de misel gelişimi yavaşlamış ve petrilere hastalık oranı artmıştır. Aynı zamanda 30 °C'de misel yapıları da parçalı ve düzensiz yoğunlaşmalar şeklinde meydana gelmiştir (**Şekil 4.16**).

Çizelge 4.10. *L. pyrogalus* türünün farklı besin ortamı, sıcaklık ve pH derecelerindeki misel gelişim süresi, misel gelişim hızı ve misel gelişim alanlarına ait ortalamalar

	pH	PDA					BAF				
		15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	OxpH	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	OxpH
Misel gelişim süresi (gün)	4.0	15.00h ^{**}	10.20jkl	8.00n	50.60a	20.95bc ^{**}	18.00f	10.80j	9.00k-n	49.00bc	21.70a
	4.5	16.00gh ₁	9.20k-n	8.00n	47.40d	20.15de	15.40gh ₁	9.80j-m	8.80lmn	43.40e	19.35f
	5.0	16.00gh ₁	10.40jk	8.40mn	50.60a	21.35ab	16.80fg	9.40j-n	8.40mn	49.40abc	21.00abc
	5.5	14.60 ₁	9.20k-n	8.00n	50.00ab	20.45cd	15.40gh ₁	9.40j-n	8.80lmn	48.20cd	20.45cd
	6.0	16.20gh	9.80j-m	8.60mn	43.80e	19.60ef	15.20h ₁	10.20jkl	9.20k-n	50.40ab	21.25ab
	OXS	15.56c ^{**}	9.76d	8.20f	48.48a		16.16b	9.92d	8.84e	48.08a	
	Ortam (O)					20.50b [*]					20.75a
Misel gelişim hızı (mm/gün)	4.0	2.66cde ^{**}	3.94abc	5.03a	0.76f	3.10ab [*]	2.28e	3.50b-e	3.91abc	0.77f	2.61b
	4.5	2.55de	4.52ab	4.80ab	0.74f	3.15a	2.60cde	4.24ab	4.30ab	0.83f	2.99ab
	5.0	2.62cde	3.77a-d	4.73ab	0.68f	2.95ab	2.54de	4.63ab	4.91a	0.72f	3.20a
	5.5	2.75cde	4.20ab	4.75ab	0.68f	3.09ab	2.70cde	4.32ab	4.51ab	0.77f	3.07ab
	6.0	2.62cde	4.14ab	4.79ab	0.85f	3.10ab	2.80cde	4.22ab	4.15ab	0.68f	2.96ab
	OXS	2.64c ^{**}	4.11b	4.82a	0.74d		2.58c	4.18b	4.36ab	0.75d	
	Ortam (O)					3.08a ^{**}					2.97b
Misel gelişim alanı (8.günde) (cm ²)	4.0	26.30i ^{**}	41.35def	53.47a	2.10no	30.81	15.35m	32.41h	45.14cd	4.53no	24.36
	4.5	22.97ijk	37.99fg	50.95ab	4.40no	29.08	21.18jkl	38.26fg	49.52ab	1.57o	27.63
	5.0	18.21lm	39.01efg	49.05bc	4.84no	27.78	17.09lm	47.18bc	50.80ab	3.37no	29.61
	5.5	25.23ij	39.48efg	50.76ab	6.14n	30.40	18.96klm	39.16efg	48.64bc	2.78no	27.38
	6.0	20.72kl	35.79gh	51.39ab	3.19no	27.77	21.21jkl	42.98de	48.21bc	5.42no	29.46
	OXS	22.69d ^{**}	38.73c	51.13a	4.14f		18.76e	40.00c	48.46b	3.53f	
	Ortam (O)					29.17a ^{**}					27.69b

*: P<0.05 düzeyinde önemli, **: P<0.01 düzeyinde çok önemli. O: besin ortamı, S: sıcaklık

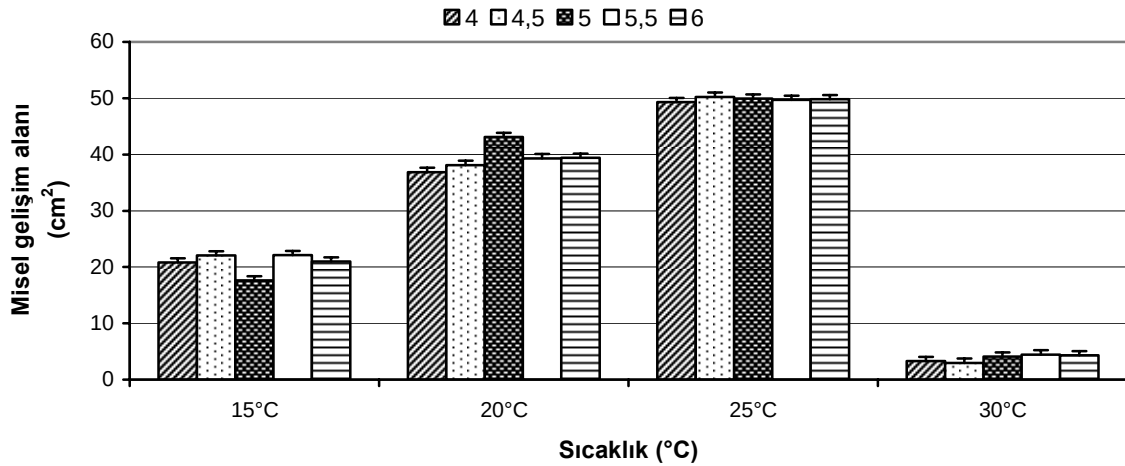


Şekil 4.16. *L. pyrogalus* türünün BAF ve PDA besin ortamlarında farklı sıcaklıklardaki misel gelişimleri

Çizelge 4.11. *L. pyrogalus* türünün misel gelişim süresi, misel gelişim hızı ve misel gelişim alanına ait pH x sıcaklık interaksiyon ortalamaları

Özellikler	Sıcaklık (°C)					Ortalama
	pH	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	
Misel gelişim süresi (gün)	4.0	16.50d**	10.50f	8.50ı	49.80a	21.33a**
	4.5	15.70de	9.50gh	8.40ı	45.40c	19.75c
	5.0	16.40d	9.90fg	8.40ı	50.00a	21.18a
	5.5	15.00e	9.30ghı	8.40ı	49.10a	20.45b
	6.0	15.70de	10.00fg	8.90hı	47.10b	20.43b
	Ortalama	15.86b**	9.84c	8.52d	48.28a	
Misel gelişim hızı (mm/gün)	4.0	2.47c**	3.72b	4.47ab	0.76d	2.86b**
	4.5	2.58c	4.38ab	4.55ab	0.79d	3.07a
	5.0	2.58c	4.20ab	4.82a	0.70d	3.07a
	5.5	2.72c	4.26ab	4.63ab	0.72d	3.08a
	6.0	2.71c	4.18ab	4.47ab	0.76d	3.03a
	Ortalama	2.61c**	4.15b	4.59a	0.75d	
Misel gelişim alanı (cm ²)	4.0	20.83de**	36.88c	49.31a	3.32f	27.58
	4.5	22.07d	38.13c	50.24a	2.98f	28.36
	5.0	17.65e	43.09b	49.92a	4.11f	28.69
	5.5	22.10d	39.32bc	49.70a	4.46f	28.89
	6.0	20.97de	39.39bc	49.80a	4.30f	28.62
	Ortalama	20.72c**	39.36b	49.80a	3.83d	

*: P<0.05 düzeyinde önemli, **: P<0.01 düzeyinde çok önemli



Şekil 4.17. *L. pyrogalus* türünde farklı pH ve sıcaklık derecelerinin misel gelişim alanı üzerine etkisi (İki besin ortamının ortalaması üzerinden elde edilen pHxS interaksiyonu değerleri kullanılmıştır)

Misel gelişim süresi ve gelişim hızı bakımından farklı pH seviyeleri arasındaki farklılıklar da çok önemli bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı aralarında istatistiksel

fark olmayan 4.5, 5.0, 5.5 ve 6.0 pH seviyelerinde (sırasıyla 3.07, 3.07, 3.08 ve 3.03 mm/gün) belirlenmiştir. En düşük misel gelişim hızı ise pH 4'te (2.86 mm/gün) belirlenmiştir. En kısa misel gelişim süresi (19.75 gün) pH 4.5'ta tespit edilmiştir (**Çizelge 4.11**).

Misel gelişim süresi bakımından pH x sıcaklık interaksyonu çok önemli bulunmuş ve pH x sıcaklık interaksyon ortalamaları 8.40-50.00 gün arasında değişmiştir. Misel gelişim hızı ve misel gelişim alanı bakımından da pH x sıcaklık interaksyonu çok önemli bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı ve misel gelişim alanı değerleri 25 °C sıcaklıkta ve ele alınan tüm pH seviyelerinde elde edilmiş, en düşük değerler ise 30 °C sıcaklıkta incelenen tüm pH seviyelerinde tespit edilmiştir (**Çizelge 4.11**).

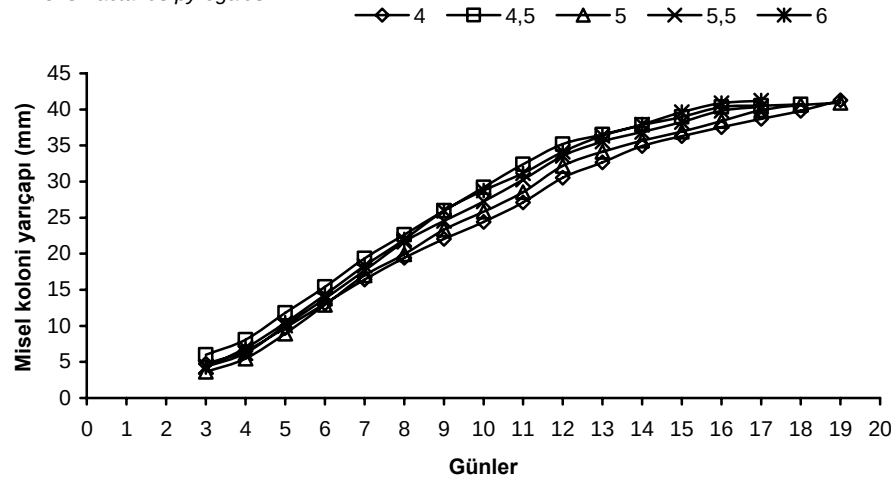
Çalışmada incelenen pH değerlerinin etkileri arasında pH 4.0 hariç, çok belirgin farklılık bulunmamıştır. Elde edilen bu bulgular *Lactarius* cinsinin pH'daki değişimlerden az oranda etkilendiğini bildirilen **Espigol (1999)**'nun bulguları ile uyum göstermektedir.

Amanita caesarea'nın birkaç izolatının gelişmesi üzerine pH (5.0, 6.0, 7.0 ve 7.5) ve sıcaklığın (20, 24 ve 28 °C) etkisi araştırılmıştır. En iyi misel gelişimi pH 6.0-7.0'de sağlanmış ve optimum gelişme sıcaklığı izolata bağlı olarak 24-28 °C olarak belirlenmiştir. Ayrıca pH 5.0 ve 7.5'ta tüm izolatlarda gelişim olmuştur (**Daza ve ark., 2006**). Yapılan bir çalışmada optimum pH aralığı *L. deliciosus* için 5.5-6.0 ve *L. sanguifluus* için 5.5-6.5 olarak belirlenmiştir (**Guerin-Laguet ve ark., 2000**). Ektomikorizal mantar izolatlarının optimum gelişim pH'sını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada Agaricales (*Laccaria laccata* hariç) ve Aphyllophorales üyelerinin nötr ve nötre yakın pH'yı tercih ettikleri, Sclerodermatales takımının üyelerinin ise asidik pH'da daha iyi bir gelişim gösterdiği tespit edilmiştir **Sundari ve Adholeya (2003)**.

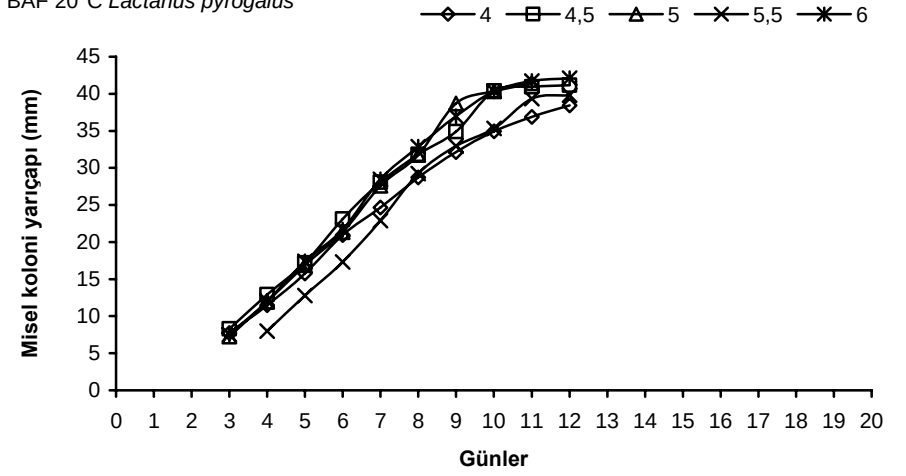
L. pyrogalus türünün BAF ve PDA besin ortamlarında farklı sıcaklıklardaki misel koloni yarıçapının günlere göre değişimi **Şekil 4.18** ve **4.19**'da verilmiştir. 20 ve 25 °C'de gelişim periyodunun sonuna doğru misel gelişimi yavaşlamıştır. Bu türde de *L. controversus* türünde olduğu gibi 30 °C'de misel gelişiminin son derece yavaş olduğu görülmektedir. Ancak hem BAF hem de PDA besin ortamlarında 30 °C'de misel gelişiminin 27. günden sonra hızlandığı görülmektedir.

Misel gelişim hızı, gelişim süresi ve gelişim alanı incelendiğinde *L. pyrogalus* türünde de misel gelişimi için PDA besin ortamı, 25 °C sıcaklık ve 4.5 pH değerinin önerilebileceği tespit edilmiştir.

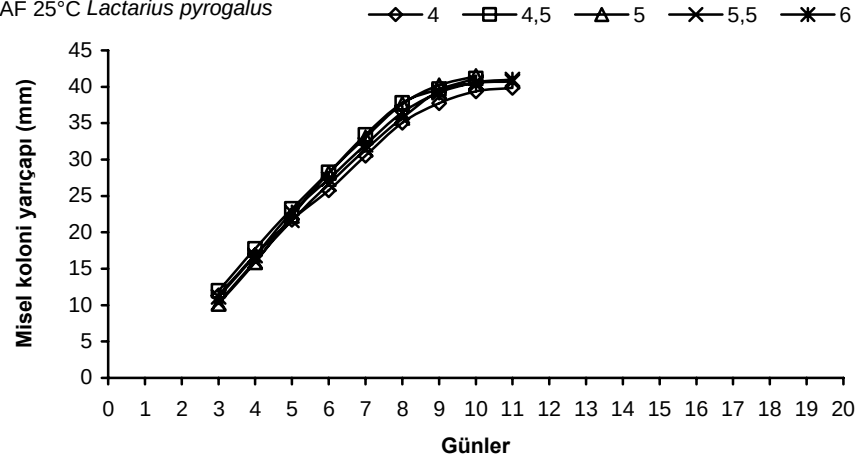
BAF 15°C *Lactarius pyrogalus*



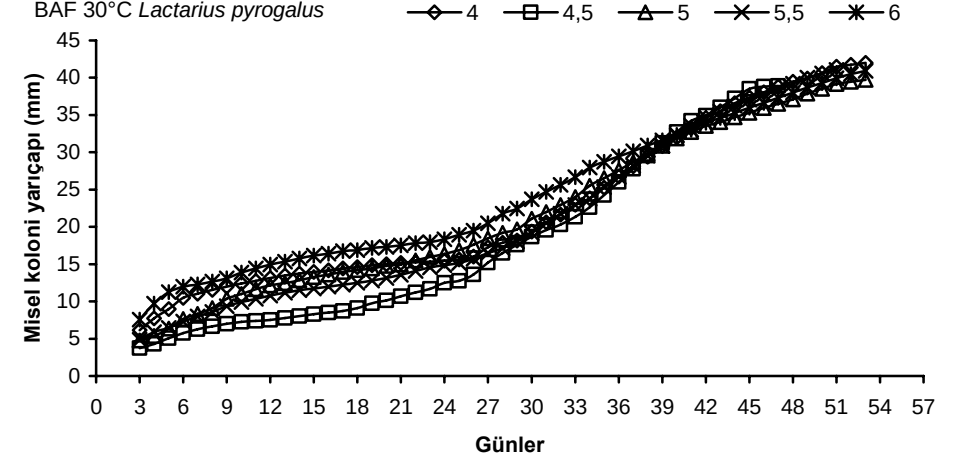
BAF 20°C *Lactarius pyrogalus*



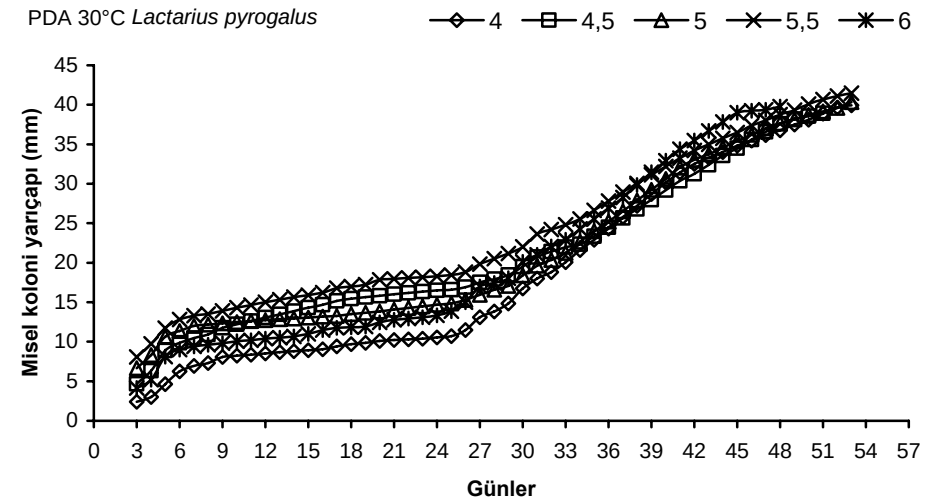
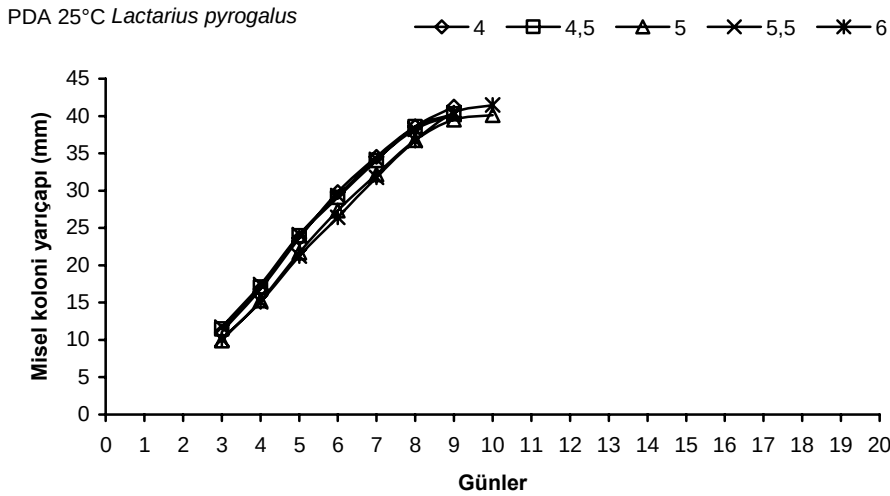
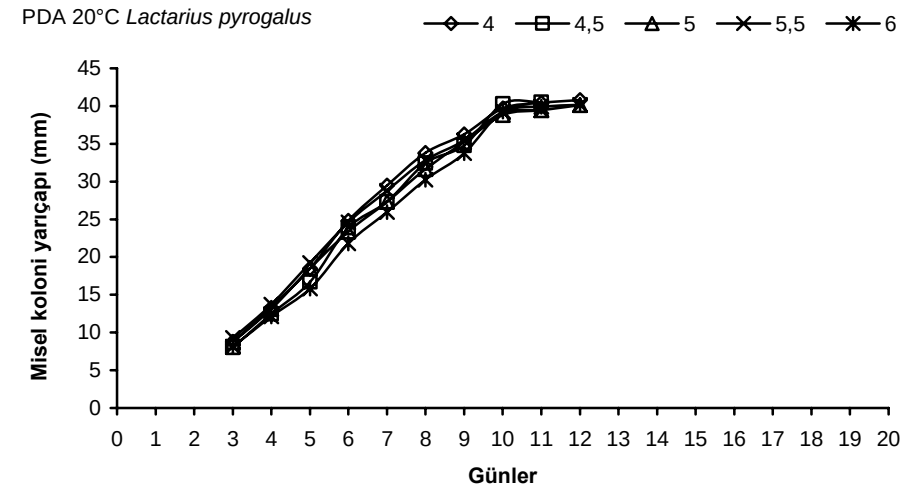
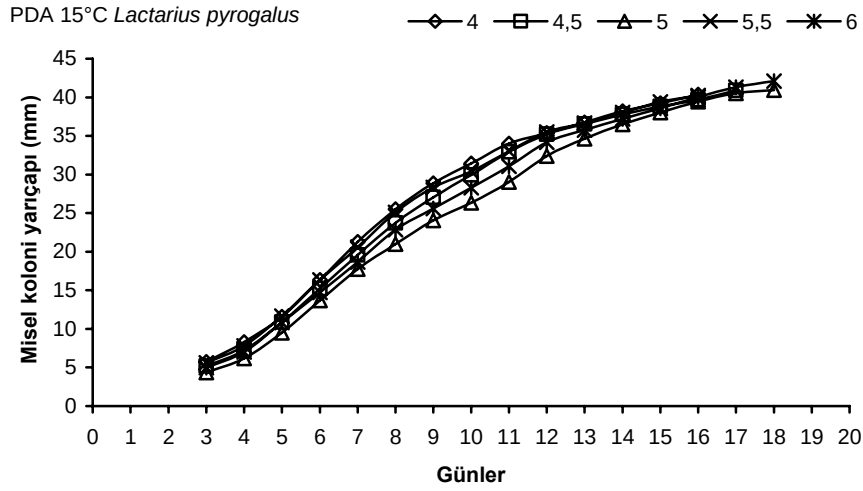
BAF 25°C *Lactarius pyrogalus*



BAF 30°C *Lactarius pyrogalus*



Şekil 4.18. *L. pyrogalus* türünün BAF ortamında farklı sıcaklıklardaki kümülatif misel koloni yarıçapları



Şekil 4.19. *L. pyrogalus* türünün PDA ortamında farklı sıcaklıklardaki kümülatif misel koloni yarıçapları

4.4.2.3. Misel Gelişimi İçin Uygun C ve N Kaynaklarının Belirlenmesi

Farklı C kaynaklarından hazırlanan besin ortamında *L. pyragalus* türünün misel gelişim hızı ve misel gelişim alanı belirlenmiştir (Çizelge 4.12, Şekil 4.20 ve 4.21). *L. pyragalus* türünde misel gelişim hızı ve gelişim alanı bakımından C kaynakları arasındaki farklılık istatistiksel olarak çok önemli ($P<0.01$) bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı aralarında istatistiksel fark olmayan mannitol, glikoz, kontrol, dekstro ve maltozdan (sırasıyla 2.95, 2.92, 2.85, 2.83 ve 2.82 mm/gün) elde edilmiştir. En düşük misel gelişim hızı ise 2.51 mm/gün ile ksilozda belirlenmiştir. Misel gelişim hızı ile paralel olarak en düşük misel gelişim alanı da yine ksilozdan (41.25 cm^2) elde edilmiştir. Misel gelişim alanı bakımından ksiloz dışında kalan diğer C kaynakları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

Çizelge 4.12. *L. pyragalus* türünde C kaynaklarının misel gelişim hızı, misel gelişim alanı ve misel yapısı üzerine etkileri

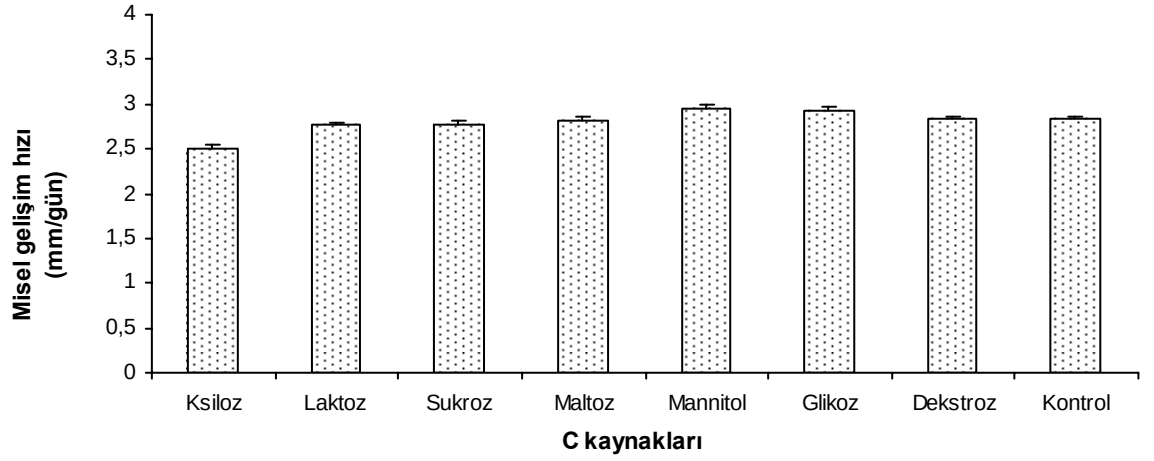
C Kaynakları	Misel gelişim hızı (mm/gün)	Misel gelişim alanı (cm^2) ¹	Misel yapısı ²
Ksiloz	2.51c**	41.25b**	P, Y
Laktoz	2.77b	50.73a	P, Y
Sukroz	2.78b	50.35a	P, Y
Maltoz	2.82ab	51.29a	P, Y
Mannitol	2.95a	52.01a	P, Y
Glikoz	2.92a	52.14a	P, Y
Dekstro	2.83ab	53.83a	P, Y
Kontrol	2.85ab	50.08a	P, Y

** $P<0.01$ düzeyinde çok önemli

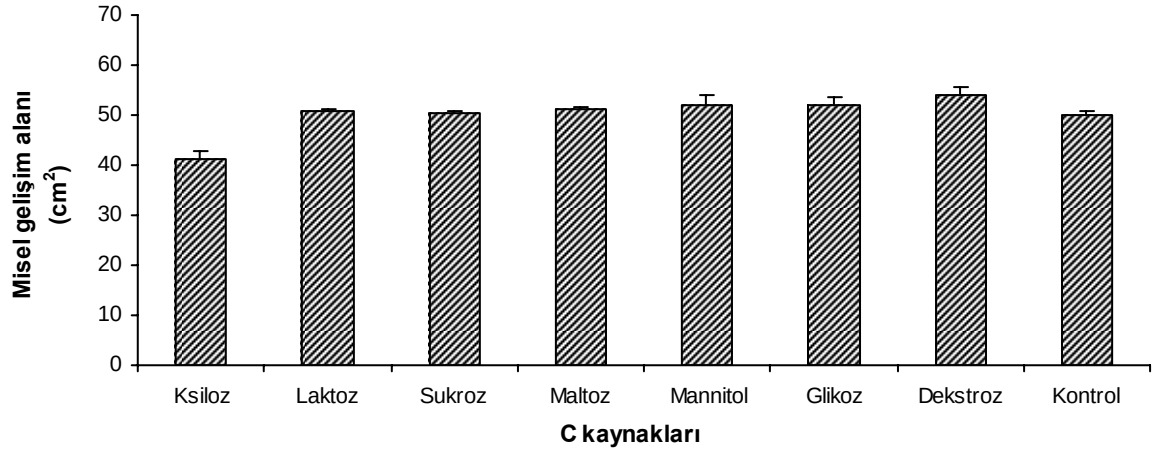
¹Misel gelişim alanları misel aşılmasından sonra 13. günde ölçülmüştür. En iyi gelişim gösteren ortamlarda miselin petriyi tamamen kapladığı dönem ölçüm zamanı olarak alınmıştır.

²P: pamuksu, Y: yoğun

Baar ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada *Coltricia perennis*, *Laccaria bicolor*, *Lactarius hepaticus* ve *Paxillus involutus* ektomikorizal mantar türlerinin organik (glisin) ve inorganik (amonyum) N ve C (glikoz) kaynağında misel gelişimini incelemiştir. *L. bicolor* hem amonyum hem de glisin içeren ortamda iyi bir gelişim göstermiştir. *L. hepaticus* ve *P. involutus* türlerinin biyomas üretimi ve gelişim hızı N kaynağı olarak amonyum içeren ortamda glisin içeren ortama göre daha yüksek bulunmuştur. *C. perennis*'in amonyum ve glisin içeren ortamlarda benzer gelişim gösterdiği belirlenmiştir.

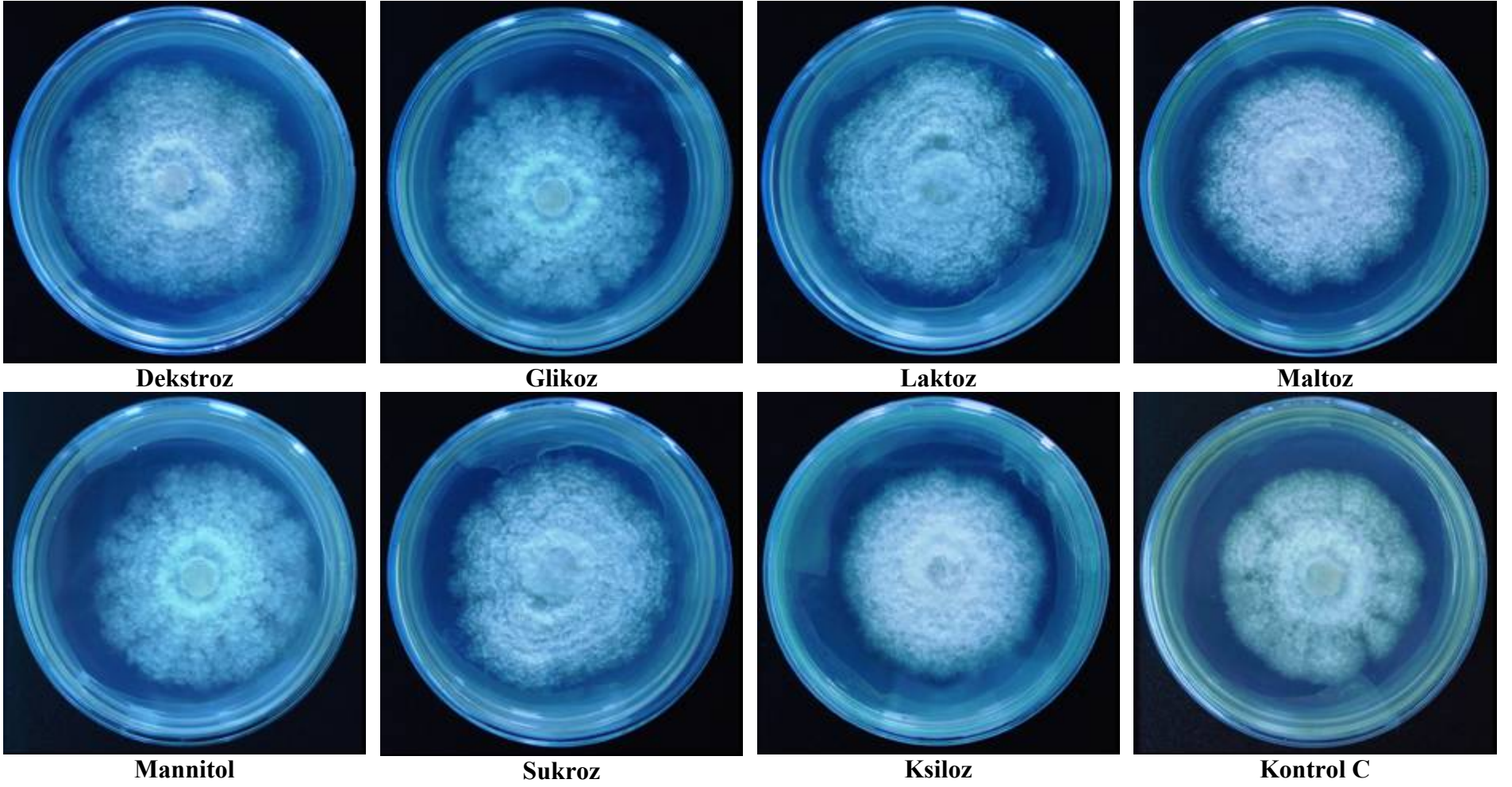


Şekil 4.20. *L. pyragalus* türünde farklı C kaynaklarının misel gelişim hızı üzerine etkisi



Şekil 4.21. *L. pyragalus* türünde farklı C kaynaklarının misel gelişim alanı üzerine etkisi

L. pyragalus türünün farklı C kaynaklarındaki misel yapılarının birbirine benzediği Şekil 4.22’de de görülmektedir.



Şekil 4.22. *L. pyraealis* türünün farklı C kaynaklarındaki misel gelişimi

Misel gelişim hızı ve gelişim alanı bakımından N kaynakları arasındaki farklılık istatistiksel olarak çok önemli ($P<0.01$) bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı aralarında istatistiksel fark bulunmayan pepton, malt ekstrat, maya ekstrat ve kalsiyum nitrattan (sırasıyla 3.86, 3.68, 3.63 ve 3.58 mm/gün) elde edilmiştir. En düşük misel gelişim hızı ise amonyum nitratta (1.83 mm/gün) saptanmıştır. En yüksek misel gelişim alanı misel gelişim hızında olduğu gibi aralarında istatistiksel fark bulunmayan pepton, malt ekstrat, maya ekstrat ve kalsiyum nitrattan elde edilmiştir. En düşük misel gelişim alanı amonyum nitratta belirlenmiştir (Çizelge 4.13, Şekil 4.23 ve 4.24).

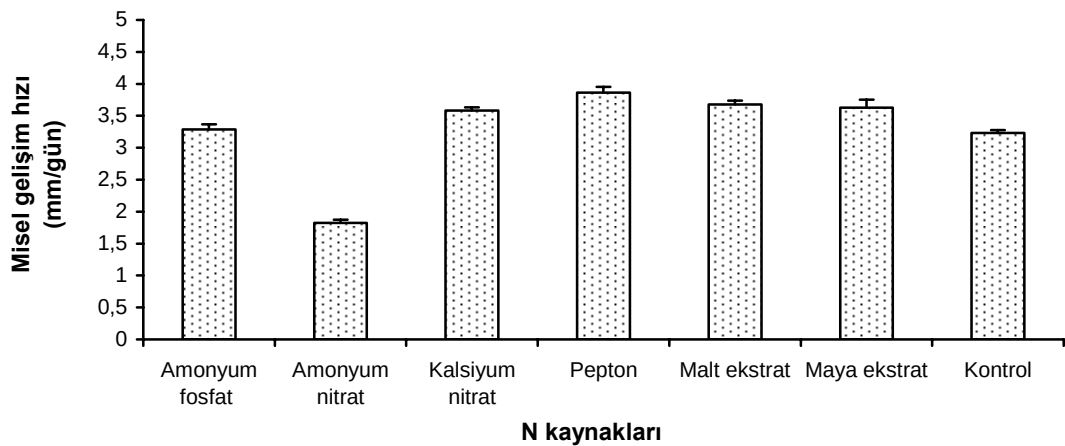
Çizelge 4.13. *L. pyragalus* türünde N kaynaklarının misel gelişim hızı, misel gelişim alanı ve misel yapısı üzerine etkileri

N Kaynakları	Misel gelişim hızı (mm/gün)	Misel gelişim alanı (cm ²) ¹	Misel yapısı ²
Amonyum fosfat	3.29b**	42.06b**	P, Y
Amonyum nitrat	1.83c	20.13c	P, Y
Kalsiyum nitrat	3.58a	47.38ab	P, Y
Malt ekstrat	3.68a	54.53a	P
Maya ekstrat	3.63a	53.33a	P, Y
Pepton	3.86a	54.46a	P, Y
Kontrol	3.23b	43.04b	Z

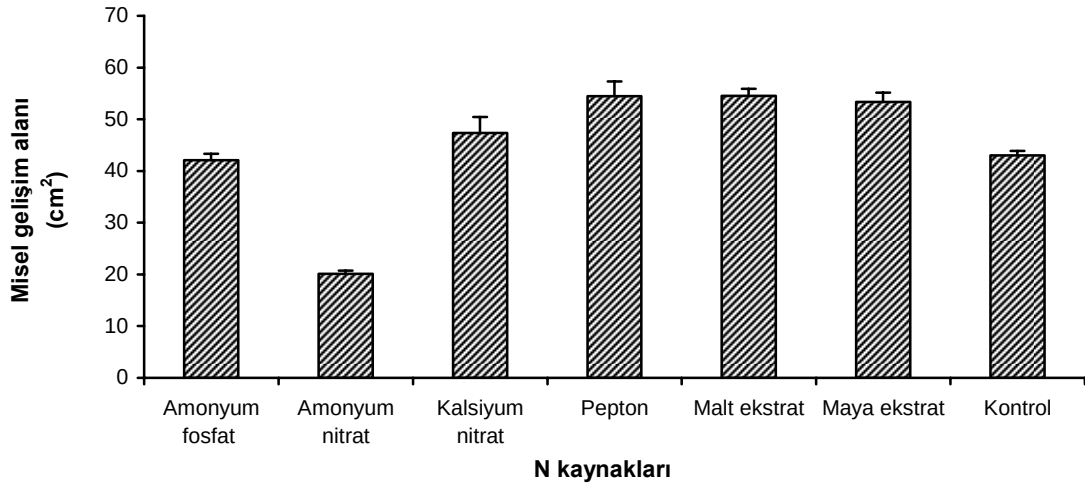
** $P<0.01$ düzeyinde çok önemli

¹Misel gelişim alanları misel aşılmasından sonra 10. günde ölçülmüştür. En iyi gelişim gösteren ortamlarda miselin petriyi tamamen kapladığı dönem ölçüm zamanı olarak alınmıştır.

²P: pamuksu, Y: yoğun, Z: zayıf ve seyrekleşmiş



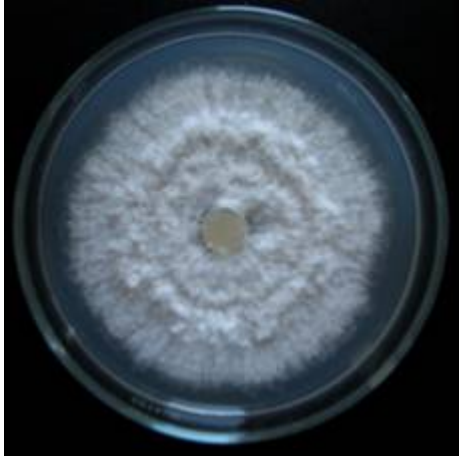
Şekil 4.23. *L. pyragalus* türünde farklı N kaynaklarının misel gelişim hızı üzerine etkisi



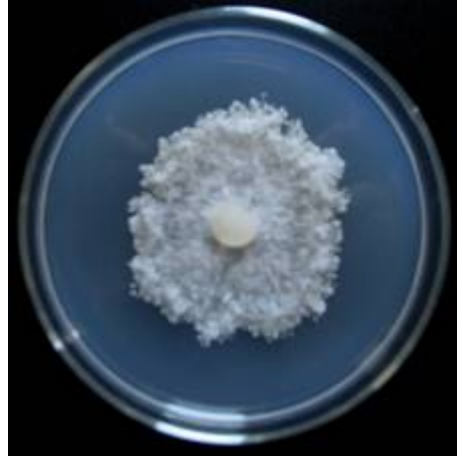
Şekil 4.24. *L. pyrogalus* türünde farklı N kaynaklarının misel gelişim alanı üzerine etkisi

L. pyrogalus türünde misel yapıları üzerine N kaynaklarının etkileri oldukça farklı olmuştur. N kaynağının hiç kullanılmadığı kontrol uygulamasında *L. controversus*'da olduğu gibi miseller zayıf ve seyrek gelişmiştir. Amonyum nitrat, amonyum fosfat, kontrol ve kısmen kalsiyum nitratta diğer N kaynaklarına göre gelişimin yavaş olduğu görülmektedir. Pepton, malt ekstrat ve maya ekstrat kaynaklarında misellerin petrileri sarma hızı yüksek ve misel yapılarının oldukça iyi olduğu tespit edilmiştir (**Şekil 4.25**).

Farklı ektomikorizal mantar türlerinde amonyumun misel gelişimi için uygun olduğunu bildiren araştırmacıların (**Straatsma ve Griensven, 1986; Smith ve Read, 1997; Finlay ve ark., 1992; Daza ve ark., 2006**) aksine *L. controversus* türünde olduğu gibi *L. pyrogalus* türünde de amonyum içeren N kaynaklarında iyi bir misel gelişimi elde edilememiştir. Nitratın bazı basidiomisetlerin gelişimi üzerinde engelleyici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (**Griffin, 1994**).



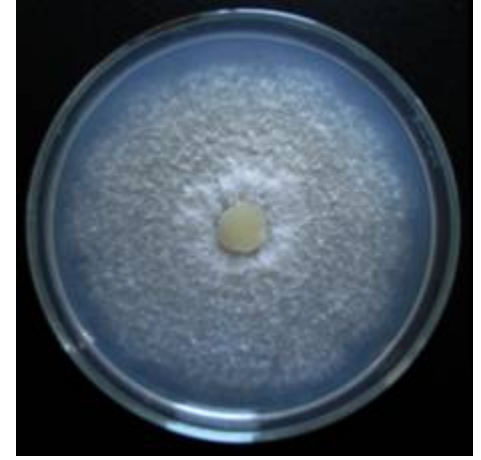
Amonyum Fosfat



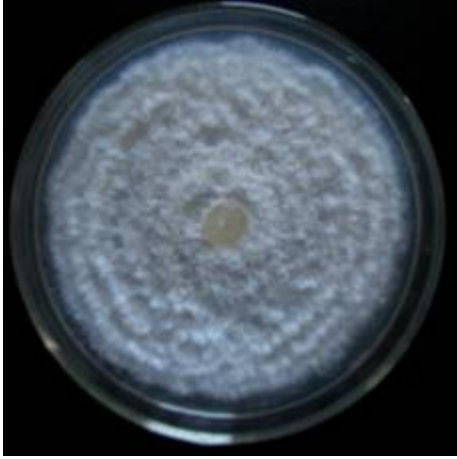
Amonyum Nitrat



Kalsiyum Nitrat



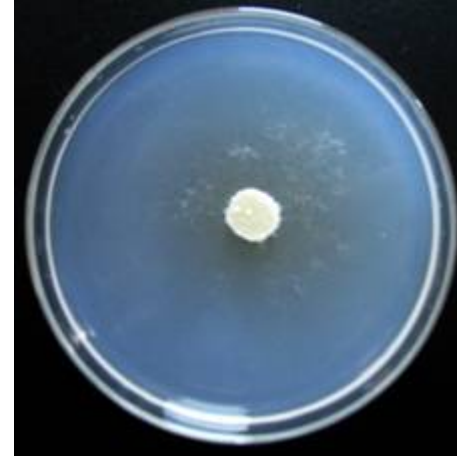
Malt Ekstrat



Maya Ekstrat



Pepton



Kontrol

Şekil 4.25. *L. pyragalus* türünün farklı N kaynaklarındaki misel gelişimi

4.4.3. *Tricholoma terreum*

4.4.3.1. Misel Gelişimi İçin Uygun Besin Ortamlarının Belirlenmesi

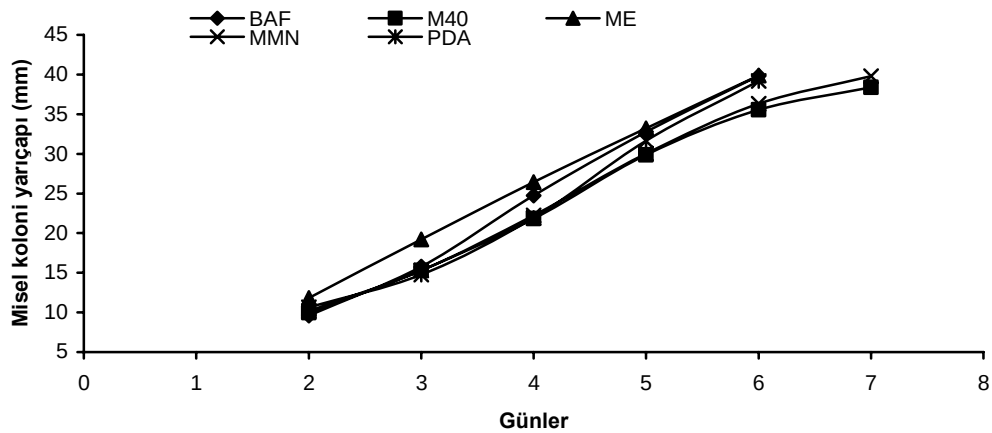
Farklı besin ortamlarında (BAF, M40, ME, MMN ve PDA) *T. terreum* türüne ait misel gelişim hızı, gelişim süresi ve gelişim alanları **Çizelge 4.14**'de, misel koloni yarıçapının günlere göre değişimi **Şekil 4.26**'da ve petrideki misel gelişimleri ise **Şekil 4.27**'de verilmiştir.

Misel gelişim süresi bakımından besin ortamları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli ($P < 0.05$) bulunurken, misel gelişim hızı ve gelişim alanları bakımından önemsiz bulunmuştur. En uzun misel gelişimi M40 ve MMN ortamlarında 7 gün olarak tespit edilmiştir. Diğer ortamlar ise misel gelişimlerini 6. günde tamamlamışlardır. Çalışmada ele alınan besin ortamlarının tümü *T. terreum* türünün misel gelişimi için önerilebilir (**Çizelge 4.14**). Bununla birlikte besin ortamları arasında ucuz olması nedeniyle PDA öncelikle tercih edilebilir.

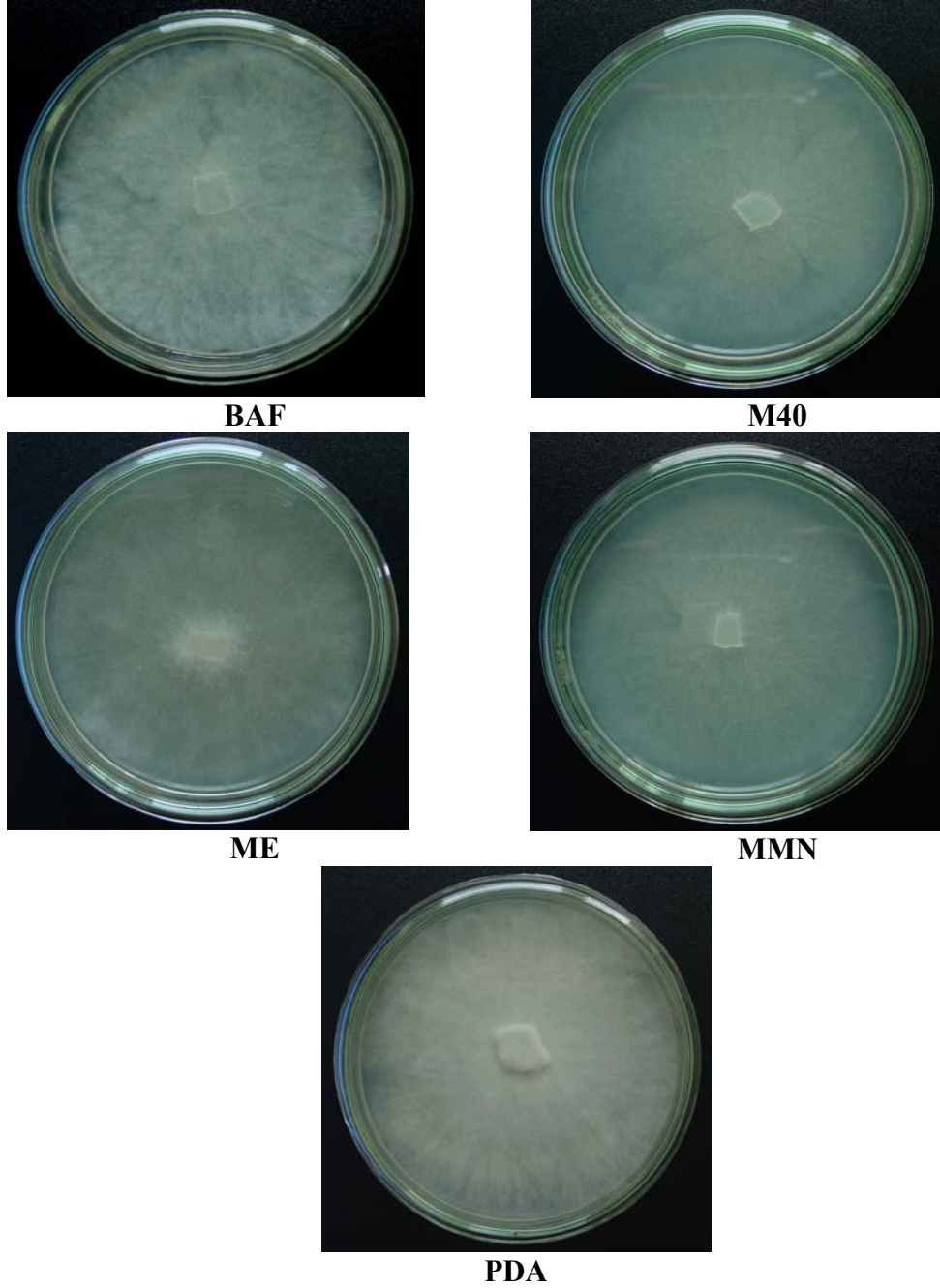
Çizelge 4.14. Farklı besin ortamlarının *T. terreum* türünün misel gelişim hızı, misel gelişim süresi ve misel gelişim alanı üzerine etkisi

Besin ortamı	Misel gelişim hızı (mm/gün)	Misel gelişim süresi (gün)	Misel gelişim alanı (6. günde) (cm ²)
ME	7.01	6.00c*	49.95
M40	6.22	7.00a	40.44
MMN	6.47	6.80ab	41.64
PDA	7.10	6.20bc	48.39
BAF	7.56	6.00c	49.83

*: $P < 0.05$ düzeyinde önemli



Şekil 4.26. Farklı besin ortamlarında *T. terreum* türüne ait kümülatif misel koloni yarıçapları



Şekil 4.27. Farklı besin ortamlarında *T. terreum* türüne ait misel gelişimleri

T. terreum mantar türünde misel gelişiminin diğer *L. controversus* ve *L. pyrogalus*'a göre daha kısa olduğu saptanmıştır. *T. terreum* türü 9 cm çapındaki petrilerde misel gelişimlerini 6-7 günde tamamlarken, *L. controversus* ve *L. pyrogalus* türleri 6 cm çapındaki petrilerde misel gelişimlerini 7-9 günde tamamlamışlardır. *T. terreum* türüne ait misel yapısının, *L. controversus* ve *L. pyrogalus*'a göre daha seyrek ve ışınsal olduğu belirlenmiştir. *T. terreum* türünün denemede ele alınan farklı besin

ortamlarındaki misel yapıları karşılaştırıldığında da BAF ve PDA besin ortamlarında diğer ortamlara göre misel yapısının daha yoğun olduğu saptanmıştır (**Şekil 4.27**).

Cantharellus cibarius'un misel üretiminde 5 mM süksinat veya 25 mM MES katılmış sıvı Fries ortamının en iyi sonucu verdiği bildirilmiştir (**Straatsma ve Griensven, 1986**). **Yamaç ve ark. (2008)** yaptıkları çalışmada *Suillus collitinus* türünün iki izolatını (suşlarını) (M91 ve M137) farklı besin ortamlarında geliştirmişler ve izolatların büyüme özelliklerinin birbirinden farklı olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada *S. collitinus* M91 suşunun oat meal agar, Yang ve malt ekstrat agar besin ortamlarında koloni çapı ve koloni ağırlıklarının diğer ortamlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4.4.3.2. Misel Gelişimi İçin Uygun pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

T. terreum türünün farklı sıcaklık (15, 20, 25 ve 30 °C) ve pH seviyelerinde (4.0, 4.5, 5.0, 5.5 ve 6.0) misel gelişim hızları, misel gelişim süreleri ve 4. gündeki misel gelişim alanları **Çizelge 4.15**'de verilmiştir.

Misel gelişim süreleri bakımından sıcaklıklar, pH değerleri ve pH x sıcaklık interaksyonu arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak çok önemli ($P<0.01$) bulunmuştur. En kısa misel gelişim süresi 25 °C'de (5.40 gün), en uzun misel gelişim süresi ise 15 °C'de (11.48 gün) belirlenmiştir. pH değerleri karşılaştırıldığında en kısa misel gelişim süresi (5.95 gün) pH 6.0'da, en uzun ise 4.0 (7.15 gün) ve 4.5 (7.05 gün) pH değerlerine sahip ortamlarda tespit edilmiş, bunu 6.55 ve 6.50 gün ile aralarında fark olmayan 5.0 ve 5.5 pH değerleri izlemiştir. Misel gelişim süresi bakımından pH x sıcaklık interaksyonu incelendiğinde en kısa misel gelişim süreleri 25 °C'de pH 4.0 hariç diğer ele alınan tüm pH değerlerinde belirlenmiştir (**Çizelge 4.15** ve **Şekil 4.28**).

Misel gelişim hızı bakımından incelendiğinde sıcaklıklar arasındaki fark istatistiksel olarak çok önemli ($P<0.01$), pH seviyeleri arasındaki fark önemli ($P<0.05$) ve pH x sıcaklık interaksyonu ise çok önemli ($P<0.01$) olarak bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı 25 °C'de (12.36 mm/gün) saptanmış, bunu aralarında istatistiksel fark bulunmayan 20 ve 15 °C sıcaklık değerleri izlemiştir. 30 °C'de misel gelişimi olmamıştır (**Şekil 4.28** ve **4.29**). Bu durum fungal metabolik süreci katalizleyen önemli enzimlerin bozulmasından kaynaklanabilir (**Jonathan ve ark., 2004**). Sıcaklık düştükçe misel gelişiminin azalması ise düşük sıcaklıklarda mantar türünün gelişimi için ihtiyaç

duyulan önemli besin maddelerinin absorpsiyonunun azalmasının bir sonucu olabilir (Garraway ve Evans, 1984).

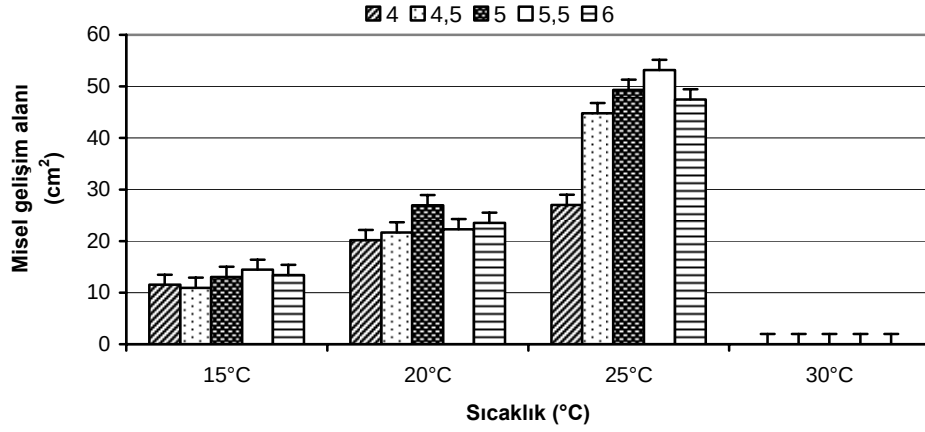
Ele aldığımız pH değerleri arasında en düşük misel gelişim hızı 4.0 (5.23 mm/gün) ve 4.5 (5.06 mm/gün) pH'da belirlenmiştir. pH x sıcaklık interaksyon ortalamaları ise 3.37-13.19 mm/gün arasında değişmiştir. pH x sıcaklık interaksyonu incelendiğinde en yüksek misel gelişim hızı 25 °C'de ele alınan tüm pH değerlerinde elde edilmiştir (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.28).

Çizelge 4.15. *T. terreum* türünün farklı sıcaklık ve pH derecelerindeki misel gelişim süresi, misel gelişim hızı ve misel gelişim alanına ait ortalamalar

Özellikler		Sıcaklık (°C)				
	pH	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	Ortalama
Misel gelişim süresi (gün)	4.0	13.00a**	8.80c	6.80d	0.00f	7.15a**
	4.5	13.40a	9.80bc	5.00e	0.00f	7.05a
	5.0	11.40ab	9.60bc	5.00e	0.00f	6.50ab
	5.5	10.40bc	10.80bc	5.00e	0.00f	6.55ab
	6.0	9.20c	9.40bc	5.20e	0.00f	5.95b
	Ortalama	11.48a**	9.68b	5.40c	0.00d	
Misel gelişim hızı (mm/gün)	4.0	3.63d**	6.25b	11.04a	0.00e	5.23b*
	4.5	3.37d	4.80bcd	12.06a	0.00e	5.06b
	5.0	4.62bcd	4.52bcd	13.07a	0.00e	5.55ab
	5.5	4.96bcd	4.21cd	13.19a	0.00e	5.59ab
	6.0	5.85b	5.49bc	12.41a	0.00e	5.94a
	Ortalama	4.49b**	5.05b	12.36a	0.00c	
Misel gelişim alanı (4.günde) (cm ²)	4.0	11.54d**	20.20bc	27.02b	0.00e	14.69b**
	4.5	10.96d	21.70b	44.80a	0.00e	19.37a
	5.0	13.04d	26.98b	49.34a	0.00e	22.34a
	5.5	14.46cd	22.30b	53.16a	0.00e	22.48a
	6.0	13.42d	23.56b	47.46a	0.00e	21.11a
	Ortalama	12.68c**	22.95b	44.36a	0.00d	

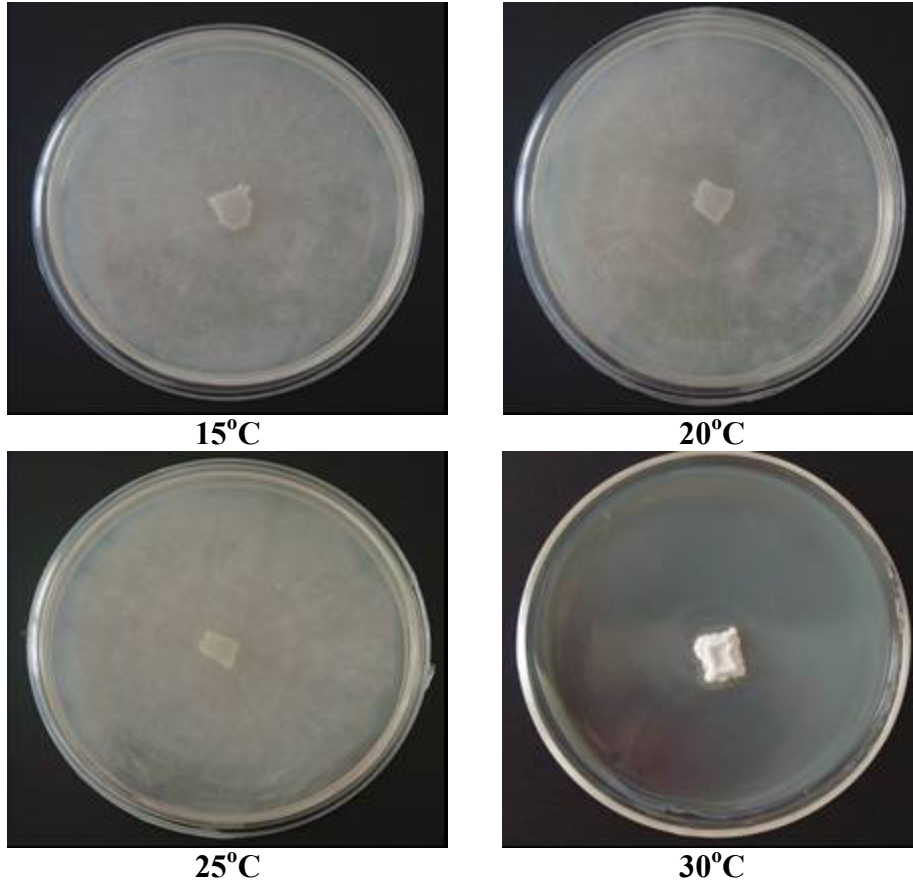
*: P<0.05 düzeyinde önemli. **: P<0.01 düzeyinde çok önemli

Misel gelişim alanı yönünden de sıcaklıklar, pH değerleri ve pH x sıcaklık interaksyonu arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak çok önemli (P<0.01) bulunmuştur. Misel gelişim süresi ve misel gelişim hızıyla ilişkili olarak en yüksek misel gelişim alanı 44.36 cm² ile 25 °C'den elde edilmiş, 30 °C'de misel gelişimi olmadığından en düşük misel gelişim alanı 12.68 cm² ile 15 °C'de belirlenmiştir. Misel gelişim alanı bakımından pH 4.0, diğer ele alınan tüm pH değerlerinden çok önemli derecede düşük bulunmuştur (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.28).



Şekil 4.28. *T. terreum* türünde farklı pH ve sıcaklık derecelerinin misel gelişim alanı üzerine etkisi

pH değerleri arasında misel yapısı bakımından farklılık olmadığından, sadece farklı sıcaklıklardaki misel yapılarına ait görüntüler **Şekil 4.29'**da verilmiştir. *T. terreum* türünün misel yapıları diğer ele aldığımız *L. controversus* ve *L. pyrogalus* ile karşılaştırıldığında daha ışınal, zayıf ve seyrek, buna karşılık misel gelişimleri daha hızlı olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.29. *T. terreum* türünün farklı sıcaklık derecelerindeki misel gelişimi (pH 5.5)

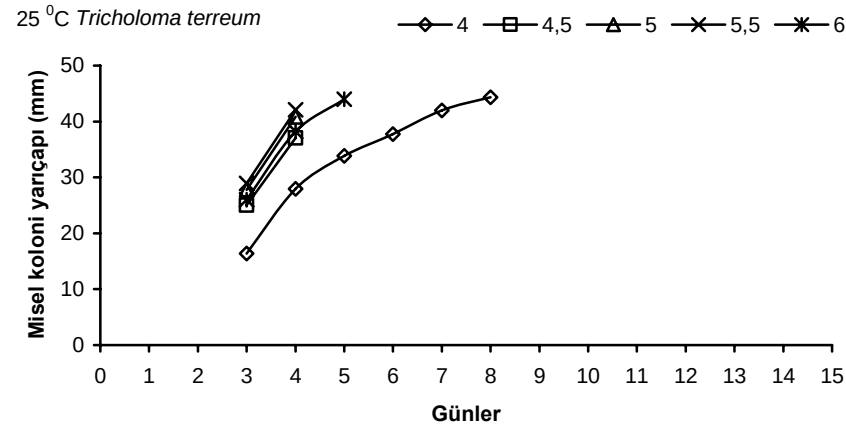
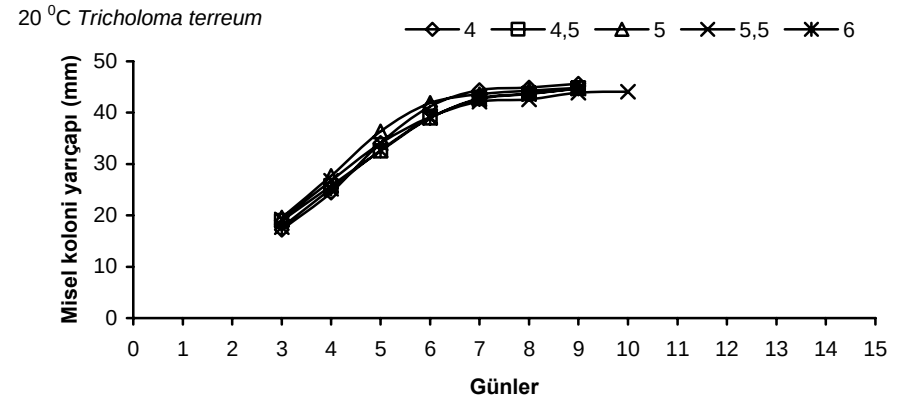
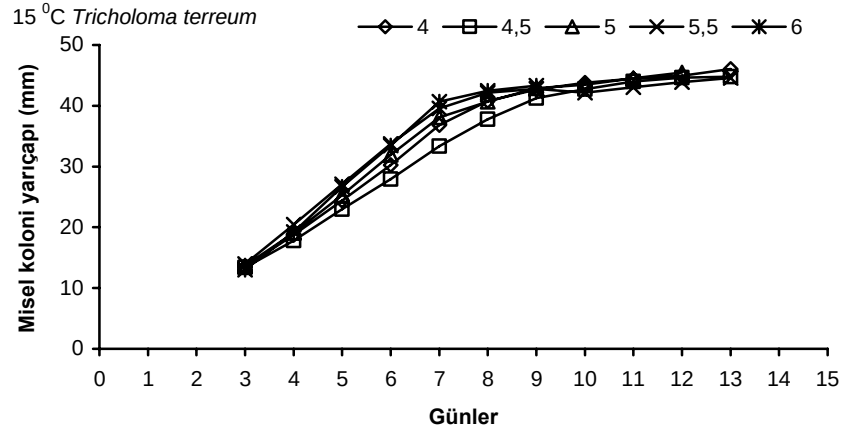
T. terreum türüne ait farklı sıcaklıklardaki misel koloni yarıçapının günlere göre değişimi **Şekil 4.30**'da verilmiştir. *T. terreum* türünde 15 °C ve 20 °C'de başlangıçta daha hızlı bir misel gelişimi olurken, gelişim periyodunun sonuna doğru daha yavaş bir misel gelişimi gözlenmiştir. 25 °C'de 4 pH değerindeki gelişim hızı, diğer pH seviyelerine göre daha yavaş olup, gelişim daha uzun sürmüştür.

T. terreum türünde misel gelişimi ile ilgili parametreler incelendiğinde misel gelişimi için en uygun sıcaklığın 25 °C olduğu, sıcaklığın yükselmesi ve azalması durumunda misel gelişiminin olumsuz etkilendiği sonucuna varılmıştır. Çalışmada pH değerleri incelendiğinde ise pH değerlerinin 4.5 ve altında olması durumunda misel gelişiminin olumsuz etkilendiği belirlenmiştir. Ancak çalışmada en yüksek pH değeri 6.0 olarak ele alınmıştır. Daha sonraki çalışmalarda pH değerinin yükselmesi durumunda misel gelişiminin nasıl etkileneceği konusu araştırılmalıdır.

Elde edilen bulgular **Xu ve ark. (2008)**'nın sonuçları ile benzerlik göstermektedir. **Xu ve ark. (2008)** yaptıkları çalışma sonucunda *L. deliciosus*, *B. edulis* ve *L. insulsus* ektomikorizal mantar türlerinin misel gelişimi için optimum sıcaklıkların 25-28 °C olduğunu, özellikle yüksek sıcaklıkların misellerin ölümüne yol açtığını tespit etmişlerdir.

Sanchez ve ark. (2001) *Hebeloma edurum*, *Lactarius deliciosus*, *Rhizopogon roseolus*, *Suillus collinitus*, *S. granulatus*, *S. luteus*, *Tricholoma focale*, *T. striatum* ektomikorizal mantar türleri içinde sadece *R. roseolus* ve *S. collinitus* türlerinin 30 °C'de geliştiğini, buna karşılık diğer türlerin daha düşük sıcaklık seviyelerinde gelişim gösterdiğini bildirmişlerdir. pH 2.5'da misel gelişimlerinin düşük olduğu belirtilmiştir.

Çalışmada ele aldığımız tüm türler için en iyi misel gelişim sıcaklığının 25 °C olduğu tespit edilmiştir. Misel gelişimi için pH önemli bir faktör (**Shu ve Lung, 2004**) olmasına rağmen, 3 ektomikorizal mantar türünün misel gelişimlerinin pH 4.0 dışında incelenen pH değerlerindeki değişimden az oranda etkilendiği belirlenmiştir.



Şekil 4.30. *T. terreum* türünün farklı sıcaklıklardaki kümülatif misel koloni yarıçapları

4.4.3.3. Misel Gelişimi İçin Uygun C ve N Kaynaklarının Belirlenmesi

T. terreum türünde misel gelişim hızı bakımından C kaynakları arasındaki farklılık istatistiksel olarak çok önemli ($P<0.01$), misel gelişim alanı bakımından ise önemli ($P<0.05$) bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı aralarında istatistiksel fark olmayan dekstroze, ksiloz ve maltozdan (sırasıyla 9.79, 9.77 ve 9.65 mm/gün) elde edilmiştir. C kaynakları arasında hem misel gelişim hızı hem de misel gelişim alanı bakımından önemli farklılık oluşturan C kaynağı sukroz olarak bulunmuştur. En düşük misel gelişim hızı ve gelişim alanı (sırasıyla 9.30 mm/gün ve 62.89 cm²) sukrozdan elde edilmiştir. Misel gelişim alanı bakımından diğer C kaynakları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (Çizelge 4.16, Şekil 4.31 ve 4.32).

Çizelge 4.16. *T. terreum* türünde C kaynaklarının misel gelişim hızı, misel gelişim alanı ve misel yapısı üzerine etkileri

C Kaynakları	Misel gelişim hızı (mm/gün)	Misel gelişim alanı (cm ²) ¹	Misel yapısı ²
Ksiloz	9.77a**	63.60a*	I
Laktoz	9.52ab	63.60a	I
Sukroz	9.30b	62.89b	I
Maltoz	9.65a	63.60a	I
Mannitol	9.46ab	63.60a	I
Glikoz	9.51ab	63.60a	I
Dekstroze	9.79a	63.60a	I
Kontrol	9.48ab	63.60a	I

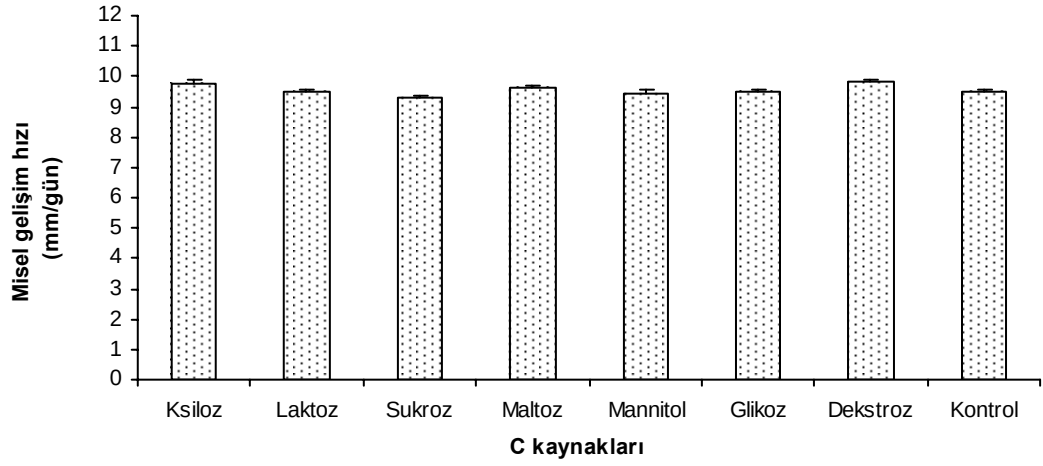
*: $P<0.05$ düzeyinde önemli. **: $P<0.01$ düzeyinde çok önemli

¹Misel gelişim alanları misel aşılamaından sonra 5. günde ölçülmüştür. En iyi gelişim gösteren ortamlarda miselin petriyi tamamen kapladığı dönem ölçüm zamanı olarak alınmıştır.

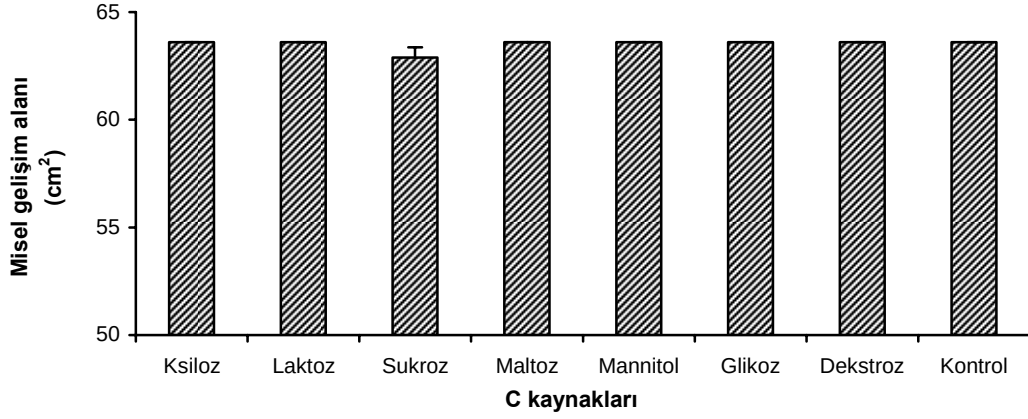
²I: ışınal

Suillus ve *Boletus* ırkları için sukroz kullanımı konusunda farklı sonuçlar elde edilmiştir (Palmer ve Hacskeylo, 1970; Lamb, 1974; Murata, 1993). Bununla birlikte Hatakeyama ve Ohmasa (2004) tarafından yapılan çalışmada farklı *Suillus* ve *Boletinus* ırklarında sukroz kullanımı düşük bulunmuştur.

Norkrans (1950) başlangıçta ortama az miktarda glikoz ilave edildiği zaman bir kaç *Tricholoma* türünün nişasta ve inulin üzerinde gelişebildiğini bildirmiştir. Kawai ve Abe (1976) *Tricholoma matsutake* ve *T. ponderosurn*'un nişasta üzerinde yavaş gelişim gösterdiğini belirtmişlerdir.

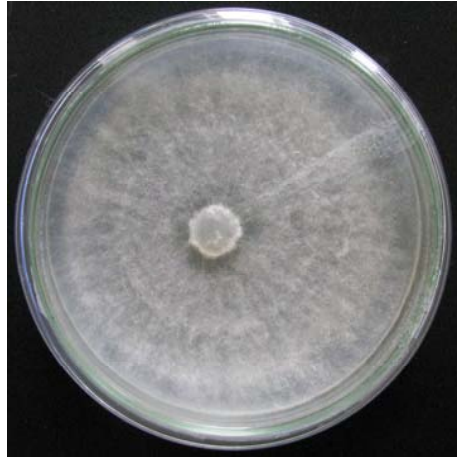


Şekil 4.31. *T. terreum* türünde farklı C kaynaklarının misel gelişim hızı üzerine etkisi

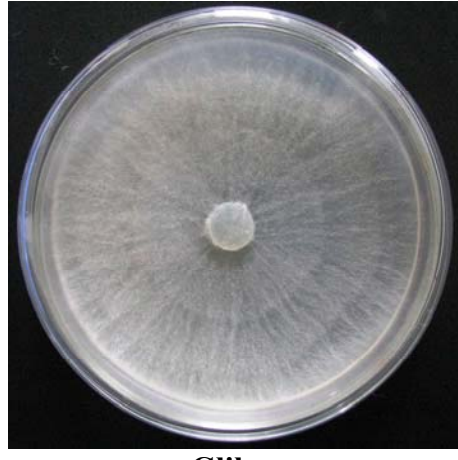


Şekil 4.32. *T. terreum* türünde farklı C kaynaklarının misel gelişim alanı üzerine etkisi

Petrideki misel gelişimlerine ait fotoğraflar incelendiğinde misel yapılarının benzerlik gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.33).



Dekstroz



Glikoz



Laktoz



Maltoz



Mannitol



Sukroz



Ksiloz



Kontrol C

Şekil 4.33. *T. terreum* türünün farklı C kaynaklarında misel gelişimi

Farklı N kaynaklarından hazırlanan besin ortamında *T. terreum* türünün misel gelişim hızı ve misel gelişim alanı **Çizelge 4.17**'de verilmiştir.

Misel gelişim hızı ve gelişim alanı bakımından N kaynakları arasındaki farklılık istatistiksel olarak çok önemli ($P < 0.01$) bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı malt ekstrattan (10.98 mm/gün) elde edilmiştir. En düşük misel gelişim hızı ise aralarında istatistiksel fark olmayan amonyum nitrat ve amonyum fosfatta (sırasıyla 2.42 ve 3.02 mm/gün) saptanmıştır. En yüksek misel gelişim alanı (63.60 cm²) aralarında istatistiksel fark bulunmayan pepton, malt ekstrat, maya ekstrat ve kontrolden elde edilmiş, bu uygulamalarda 5. günde misel petriyi tamamen sarmıştır. En düşük misel gelişim alanı amonyum nitrat ve amonyum fosfatta (sırasıyla 8.03 ve 10.99 cm²) belirlenmiştir (**Çizelge 4.17**).

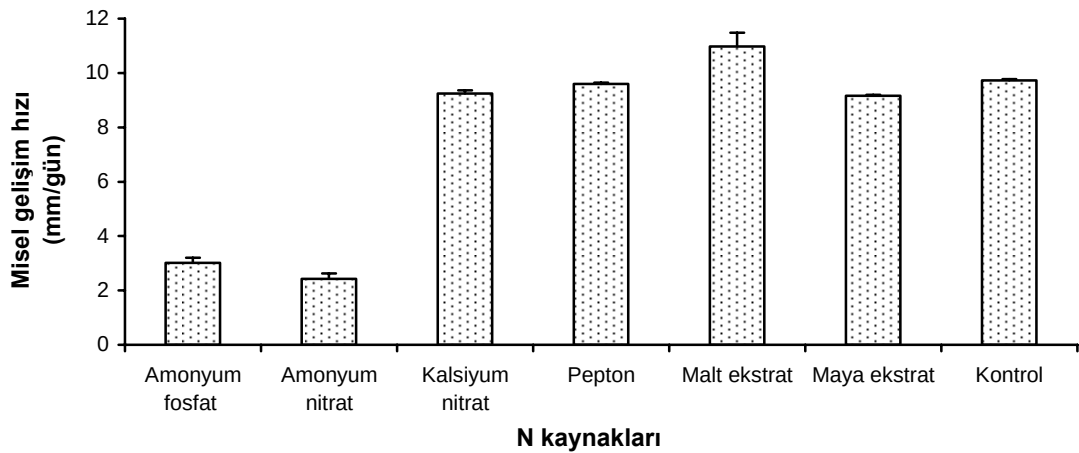
Çizelge 4.17. *T. terreum* türünde N kaynaklarının misel gelişim hızı, misel gelişim alanı ve misel yapısı üzerine etkileri

N Kaynakları	Misel gelişim hızı (mm/gün)	Misel gelişim alanı (cm ²) ¹	Misel yapısı ²
Amonyum fosfat	3.02c**	10.99c**	P
Amonyum nitrat	2.42c	8.03c	P
Kalsiyum nitrat	9.25b	55.53b	I
Malt ekstrat	10.98a	63.60a	I
Maya ekstrat	9.16b	63.60a	I
Pepton	9.60b	63.60a	I
Kontrol	9.72b	63.60a	Z

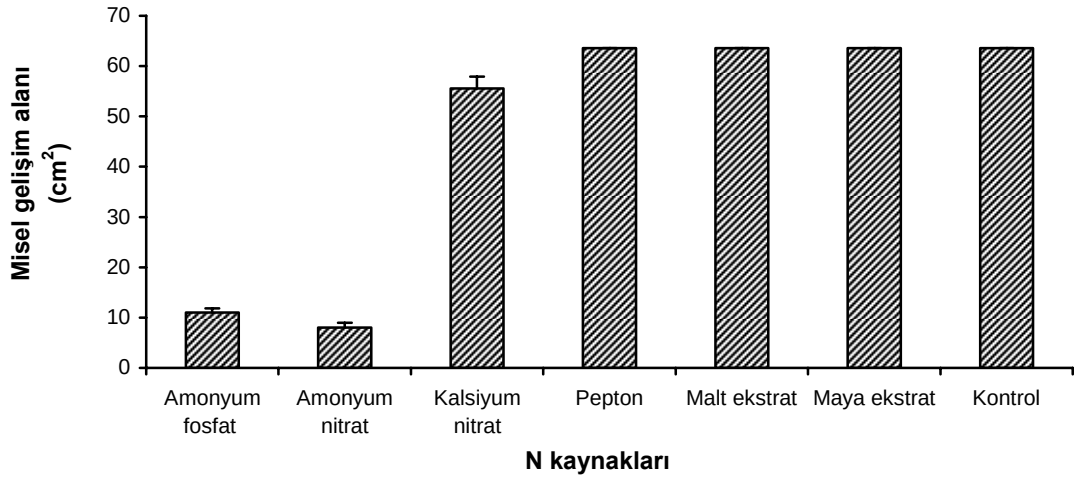
** $P < 0.01$ düzeyinde çok önemli

¹Misel gelişim alanları misel aşılmasından sonra 5. günde ölçülmüştür. En iyi gelişim gösteren ortamlarda miselin petriyi tamamen kapladığı dönem ölçüm zamanı olarak alınmıştır.

²P: pamuksu, I: ışınsal, Z: Zayıf ve seyrek



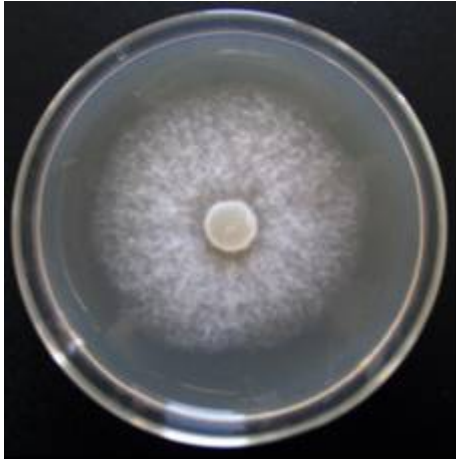
Şekil 4.34. *T. terreum* türünde farklı N kaynaklarının misel gelişim hızı üzerine etkisi



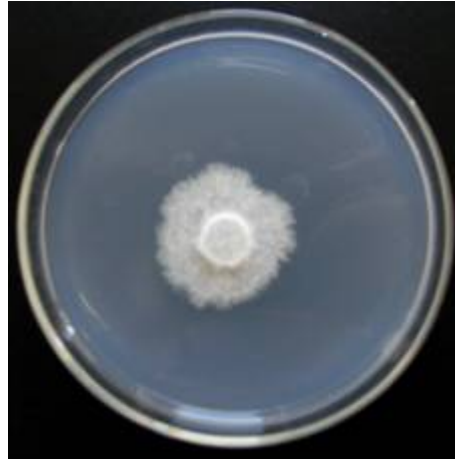
Şekil 4.35. *T. terreum* türünde farklı N kaynaklarının misel gelişim alanı üzerine etkisi

Misel gelişim hızı ve gelişim alanı incelendiğinde *T. terreum* türünde misel gelişimi için malt ekstrat, pepton, maya ekstrat ve kontrolün daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte kontrolde misel gelişiminin hızlı olmasına rağmen misel yapısının çok zayıf ve seyrek olduğu belirlenmiştir (**Şekil 4.36**). Bu nedenle ortamda amonyum ve nitrat dışında, bir N kaynağın bulunması gerektiği sonucuna varılmıştır.

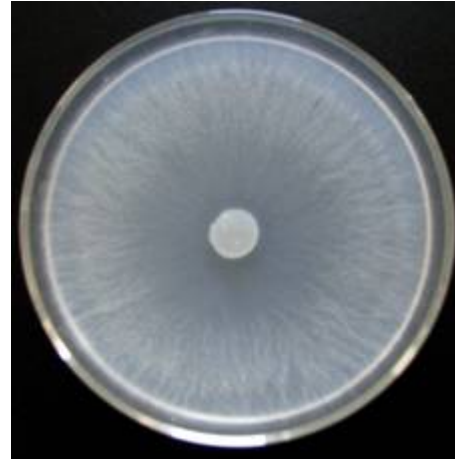
Ektomikorizal mantarların misel gelişimi üzerine inorganik N kaynaklarının etkisini araştıran **France ve Reid (1984)** *Pisolithus tinctorius*, *Cenococcum geophilum* ve *Thelephora terrestris* türlerinin N kaynağı olarak amonyum içeren ortamda, *Suillus granulatus* türünün ise nitrat içeren ortamda daha iyi bir misel gelişimi gösterdiğini belirlemişlerdir. **Rangel-Castro ve ark. (2002)** farklı N kaynaklarının (amonyum, nitrat ve bovin serum albümin) *Cantharellus cibarius*'un misel gelişimine etkisini araştırmışlardır. En kolay kullanılabilen N kaynağı amonyum olarak belirlenmiş ve nitrat içeren ortamda gelişimin zayıf olduğu tespit edilmiştir. *Amanita*, *Gymnoboletus*, *Lactarius* ve *Russula* cinslerine ait 8 ektomikorizal mantar türünün inorganik (nitrat, amonyum) ve organik (amid, peptit, protein) N kaynaklarını kullanma durumlarının incelendiği çalışmada da bu mantar türlerinin amonyum ve glutamin kaynaklarından daha fazla faydalandığı tespit edilmiştir (**Sangtjean ve Schmidt, 2002**). Ancak çalışma bulgularımız bu araştırmacıların bulgularının tersine olup, *T. terreum* türünde amonyum fosfat ve amonyum nitrat kaynaklarında gelişim çok yavaş olarak bulunmuştur.



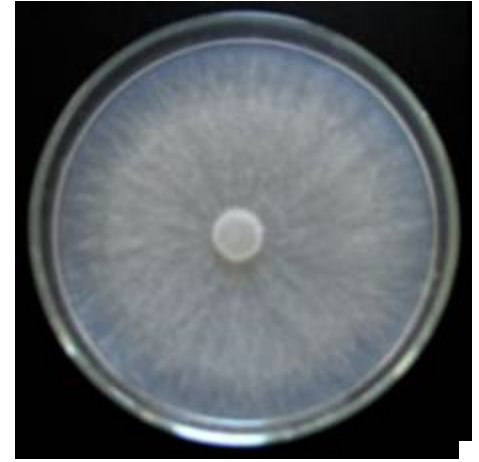
Amonyum Fosfat



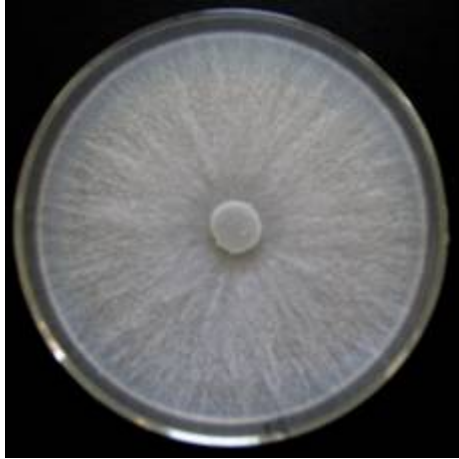
Amonyum Nitrat



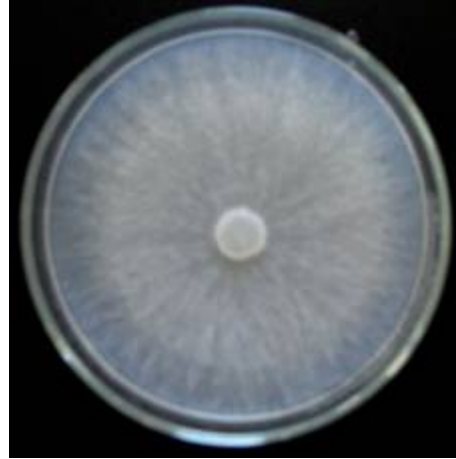
Kalsiyum Nitrat



Malt Ekstrat



Maya Ekstrat



Pepton



Kontrol

Şekil 4.36. *T. terreum* türünün farklı N kaynaklarındaki misel gelişimi

Ele aldığımız 3 ektomikorizal türde (*T. terreum*, *L. controversus* ve *L. pyrogalus*) farklı C ve N kaynaklarının misel gelişimleri üzerine etkisinin değiştiği tespit edilmiştir. Bu durum türler arasındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmaların çoğu da farklı C ve N kaynaklarının farklı mantar ırklarının misel gelişimi üzerine farklı etkilere sahip olduğunu göstermektedir (Kim ve ark., 2005; Wang ve ark., 2005).

4.5. Anastomoz Durumlarının Belirlenmesi

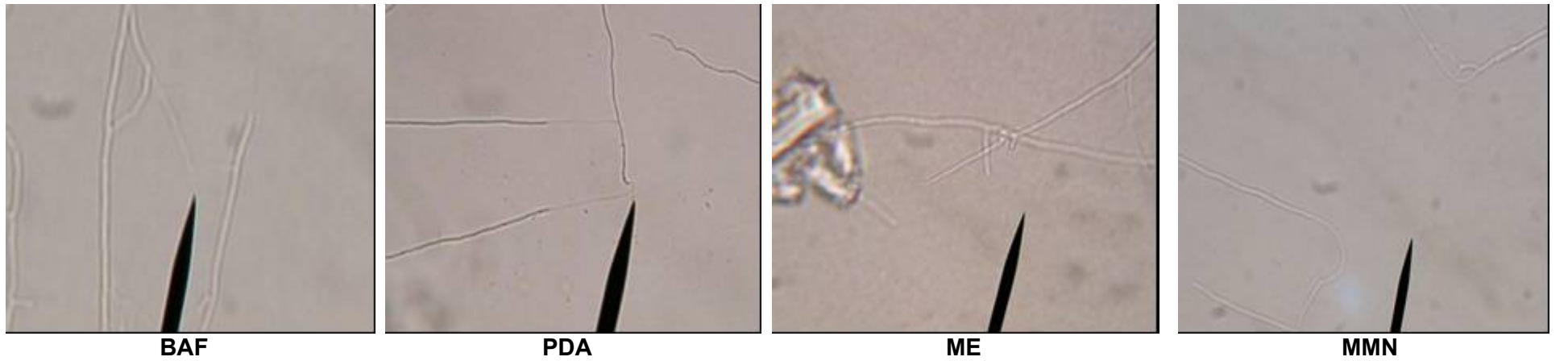
L. pyrogalus türünün Terme ve Ünye'den temin edilen mantar örneklerinden geliştirilen izolatlar, farklı besin ortamlarının (BAF, MMN, PDA ve MEA) bulunduğu petrilere aşılanmış ve gelişim tamamlandıktan sonra birleşme şekilleri mikroskopta incelenerek görüntülenmiştir (Şekil 4.37).

L. pyrogalus türünün farklı izolatlarının birleşme şekilleri besin ortamlarına göre farklılık göstermiştir. PDA, BAF ve MMN besin ortamlarında C₂ anastomoz kategorisi belirlenmiştir. C₂ anastomoz kategorisinin özellikleri şu şekilde tanımlanmaktadır: Aynı türün farklı yerlerden temin edilen mantar örneklerinden geliştirilen izolatlar arasında etkileşim bulunmaktadır. Ancak aralarında kalıtsal materyal transferi gerçekleşmemektedir. Duvar bağlantısı belirgin, membran teması belirsiz, anastomoz yapan ve bitişik olan hücrelerde daima ölüm gerçekleşmektedir (Akın, 2001). Bununla birlikte, ME besin ortamında C₀ anastomoz kategorisi belirlenmiştir. ME besin ortamında hifler birbirine teğet geçmiştir ve izolatlar arasında etkileşim olmadığı tespit edilmiştir (Akın, 2001). Şekil 4.37'de MMN besin ortamında hem alt hem de üst kısımda çift anastomoz görülmektedir.

a)



b)



Şekil 4.37. *L. pyrogalus* türünün Terme ve Ünye'den elde edilen mantar örneklerinden geliştirilen izolatların (a) aynı petride misel gelişimleri ve (b) mikroskopta birleşme şekilleri

4.6. Ektomikorizal Mantar Türlerinin Yetiştği Alanlardaki Toprak Özelliklerinin Saptanması

Çalışmada yer alan ektomikorizal mantar türlerinin yetiştği alanlardaki toprak özelliklerinin saptanması amacıyla toprak örnekleri alınmış, toprak örneklerinde pH, nem, satürasyon, organik madde, organik karbon ve EC (tuzluluk) belirlenmiştir (**Çizelge 4.18**).

L. pyrogalus türünün yetiştği alandaki toprak hafif asidik özellikte bulunmuş, buna karşılık *L. contraversus* ve *T. terreum* türlerinde bazik karakterde olduğu belirlenmiştir. Bu farklılık alınan toprağın nemlerinin farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. *L. contraversus* ve *T. terreum* türlerinde toprağın organik madde (% 6.47) ve organik karbon (% 3.75) içeriği *L. pyrogalus* türünün topraklarına göre çok yüksek bulunmuştur. Ayrıca bu mantar türlerinin yetiştği toprakların tuzlu olmadığı belirlenmiştir.

Farklı ekolojik ve fizyolojik faktörler doğadaki mikorizal mantarların gelişimini, mikoriza sentezini ve fonksiyonunu etkilemektedir. Toprakların fiziksel özellikleri ve besin maddelerince durumu özellikle de C ve N kaynakları büyük ölçüde arazide ve laboratuarda kontrollü koşullarda ektomikorizal mantarların gelişimini ve ektomikorizanın kurulumunu etkilemektedir (**France ve Reid, 1983; Lilleskov ve ark., 2002**).

Çizelge 4.18. Çalışmada yer alan ektomikorizal mantar türlerinin yetiştği alanlardaki toprak örneklerinin özellikleri

Toprak örneği	pH	Nem (%)	Satürasyon (%)	Organik Madde (%)	Organik Karbon (%)	EC (dS/m)
<i>L. contraversus</i>	7.6	5.4	184.36	6.47	3.75	0.41
<i>L. pyrogalus</i>	5.5	4.1	72.31	2.91	1.69	0.57
<i>T. terreum</i>	7.6	5.4	184.36	6.47	3.75	0.41

4.7. Vejetatif İnokulum Elde Edilmesi

L. pyrogalus, *L. contraversus* ve *T. terreum* mantar türlerinde vejetatif inokulum hazırlamak amacıyla torf ve torf:vermikülit (T:V) karışımlarından hazırlanan ortamlarda % nem ile sterilizasyon öncesi ve sonrası pH'lar belirlenmiştir (**Çizelge 4.19.**).

Çizelge 4.19. Vejetatif inokulum olarak hazırlanan ortamların pH ve nem değerleri

Ortamlar	Nem (%)	Sterilizasyon öncesi pH	Sterilizasyon sonrası pH
Torf	51.8	5.72	5.25
Torf:Vermikülit (1:4)	48.2	6.35	5.65
Torf:Vermikülit (1:6)	47.5	6.65	5.80
Torf:Vermikülit (1:8)	47.1	6.98	5.95
Torf:Vermikülit (1:10)	42.9	6.85	6.00

Ortamların nem değerleri % 42.9-51.8 arasında değişiklik göstermiştir. Ortamdaki torf miktarının artmasına bağlı olarak nem içeriği de artmıştır. Tüm ortamlarda sterilizasyon sonrasında pH’da düşüş olmuştur. Ortamların sterilizasyon sonrası pH değerleri 5.25-6.00 arasında bulunmuştur. Ortamdaki torf miktarının artmasına bağlı olarak pH değerleri azalmıştır. Ancak bu pH değerleri daha önce yapılan misel çalışma sonuçlarındaki pH aralığında olduğundan herhangi bir müdahale yapılmamıştır.

L. pyrogalus, *L. contraversus* ve *T. terreum* mantar türlerinin torf ve torf:vermikülit karışımlarından hazırlanan ortamlardaki misel gelişim hızı ve gelişim süreleri **Çizelge 4.20**’de, *L. contraversus* ve *L. pyrogalus* türlerinin misel gelişimlerinin günlere göre değişimi **Şekil 4.38** ve **4.39**’da verilmiştir.

L. contraversus türünde misel gelişim hızı ve gelişim süresi bakımından ortamlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak çok önemli ($P<0.01$) bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı torf ortamında (0.56 cm/gün) saptanırken, en düşük misel gelişim hızı aralarında istatistiksel fark olmayan T:V (1:4, 1:6, 1:8 ve 1:10) karışımlarında belirlenmiştir. Misel gelişim hızı ile doğru orantılı olarak en kısa misel gelişim süresi torf ortamında (19.60 gün) belirlenmiştir (**Çizelge 4.20** ve **Şekil 4.40**).

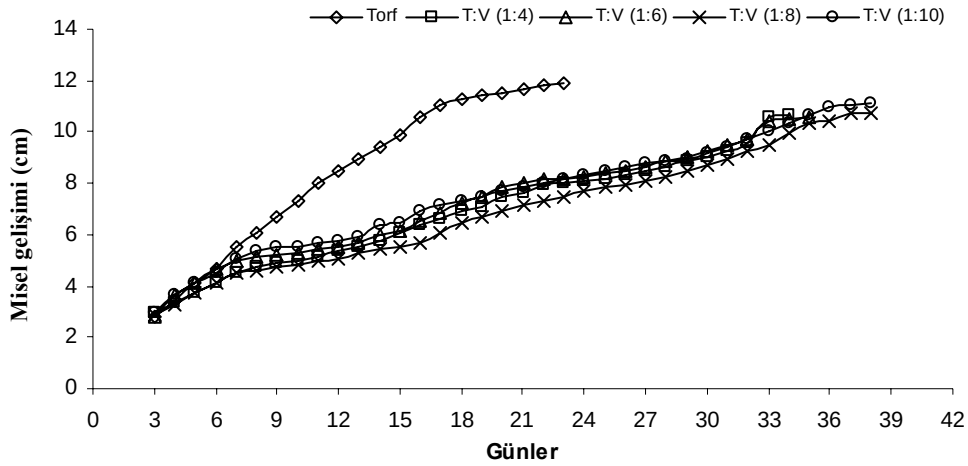
L. pyrogalus türünde misel gelişim hızı bakımından ortamlar arasındaki farklılık önemli ($P<0.05$), misel gelişim süresi bakımından ise çok önemli ($P<0.01$) bulunmuştur. En yüksek misel gelişim hızı aralarında istatistiksel fark bulunmayan T:V (1:4, 1:6 ve 1:10) ortamlarından (sırasıyla 0.76, 0.72 ve 0.72 cm/gün) elde edilmiştir. En düşük misel gelişim hızı ise torf ortamında (0.64 cm/gün) belirlenmiştir. Misel gelişim hızına paralel olarak misel gelişim süresi en kısa T:V (1:4) (13.40 gün) ortamında, en uzun ise torf ortamında (17 gün) tespit edilmiştir (**Çizelge 4.20** ve **Şekil 4.41**).

Çizelge 4.20. *L. pyrogalus*, *L. contraversus* ve *T. terreum* mantar türlerinde torf ve torf:vermikülit karışımlarından hazırlanan ortamlarda misel gelişim hızı ve misel gelişim süreleri

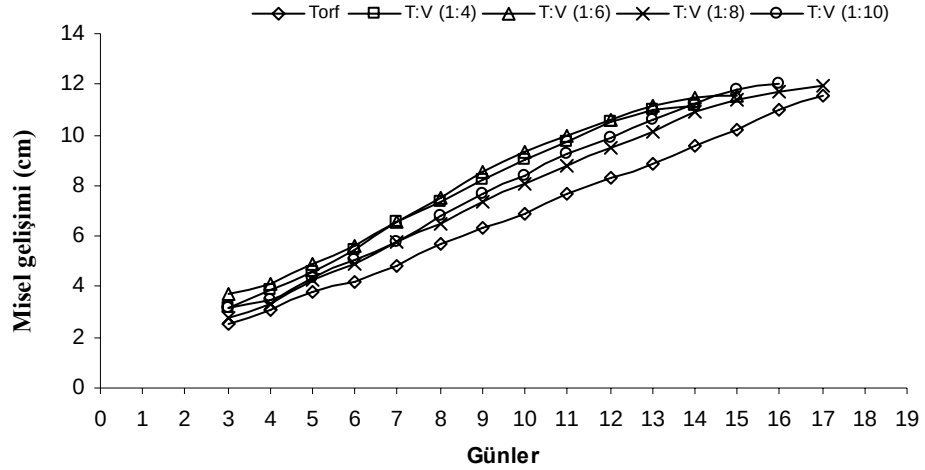
Türler	Ortam	Misel gelişim hızı (cm/gün)	Misel gelişim süresi (gün)
<i>Lactarius contraversus</i>	Torf	0.56a**	19.60c**
	T:V (1:4)	0.27b	33.20b
	T:V (1:6)	0.25b	33.40b
	T:V (1:8)	0.24b	36.60a
	T:V (1:10)	0.24b	37.40a
<i>Lactarius pyrogalus</i>	Torf	0.64b*	17.00a**
	T:V (1:4)	0.76a	13.40d
	T:V (1:6)	0.72a	14.00cd
	T:V (1:8)	0.70ab	16.00ab
	T:V (1:10)	0.72a	15.40bc
<i>Tricholoma terreum</i>	Torf	-	11.20a**
	T:V (1:4)	-	8.60b
	T:V (1:6)	-	9.20b
	T:V (1:8)	-	10.40a
	T:V (1:10)	-	11.20a

*: P<0.05 düzeyinde önemli, **: P<0.01 düzeyinde çok önemli

-: *Tricholoma terreum* mantar türünün misel gelişimi zayıf ve seyrek olması nedeniyle günlük olarak ölçülemediği.



Şekil 4.38. *L. contraversus* türünün torf ve torf:vermikülit karışımlarından hazırlanan ortamlardaki kümülatif misel gelişimi



Şekil 4.39. *L. pyrogalus* türünün torf ve torf:vermikülit karışımlarından hazırlanan ortamlardaki kümülatif misel gelişimi

T. terreum mantar türünün misel gelişimi zayıf ve seyrek olması nedeniyle günlük olarak ölçülemediği (Şekil 4.42). Bu türde de misel gelişim süresi bakımından ortamlar arasındaki farklılık çok önemli ($P < 0.01$) bulunmuştur. En hızlı misel gelişimi aralarında istatistiksel fark olmayan T:V (1:4) ortamında (8.60 gün) ve T:V (1:6) ortamında (9.20 gün) belirlenmiştir (Çizelge 4.20).

Denemede ele aldığımız ektomikorizal mantarların misel gelişimleri incelendiğinde *L. controversus* türünde torf ortamının, *L. pyrogalus* ve *T. terreum* mantar türlerinde ise T:V (1:4) ortamının vejetatif inokulum için en uygun ortamlar oldukları sonucuna varılmıştır. *T. terreum* türünde vejetatif inokulumdaki misel gelişiminin *L. controversus* ve *L. pyragalus* türlerinden daha kısa olduğu saptanmıştır (Şekil 4.43). Bu türün misel çalışmaları sırasındaki misel gelişimleri de diğer iki türden daha kısa bulunmuştur.

Moser (1958) farklı ektomikorizal türlerde vejetatif inokulum üretmek amacıyla yaptığı çalışmada sıvı besin solüsyonu içeren turba yosununun en iyi sonucu verdiğini bildirmiştir. Daha sonraki yıllarda değişik araştırmacılar, vejetatif inokulum hazırlamada farklı sıvı besin ortamları ile nemlendirilmiş torf, vermikülit, sfagnum yosunu ve perlit karışımlarının uygun olduğu ve bu ortamlardan hazırlanan inokulumların ektomikoriza oluşturduğunu ifade etmişlerdir (Nezzar-Hocine ve ark., 1998; Rincón ve ark., 1999; Yamada ve ark., 1999; Yamada ve ark., 2001a; Santiago-Martínez ve ark., 2003; Parlade ve ark., 2004; Flores ve ark., 2005).



Torf : Vermikülit (1:4)



Torf : Vermikülit (1:6)



Torf : Vermikülit (1:8)



Torf : Vermikülit (1:10)



Torf

Şekil 4.40. *L. contraversus* türünün torf ve torf:vermikülit karışımlarından hazırlanan ortamlarda misel gelişimi



Torf : Vermikülit (1:4)



Torf : Vermikülit (1:6)



Torf : Vermikülit (1:8)



Torf : Vermikülit (1:10)



Torf

Şekil 4.41. *L. pyrogalus* türünün torf ve torf:vermikülit karışımlarından hazırlanan ortamlarda misel gelişimi



Torf : Vermikülit (1:4)



Torf : Vermikülit (1:6)



Torf : Vermikülit (1:8)

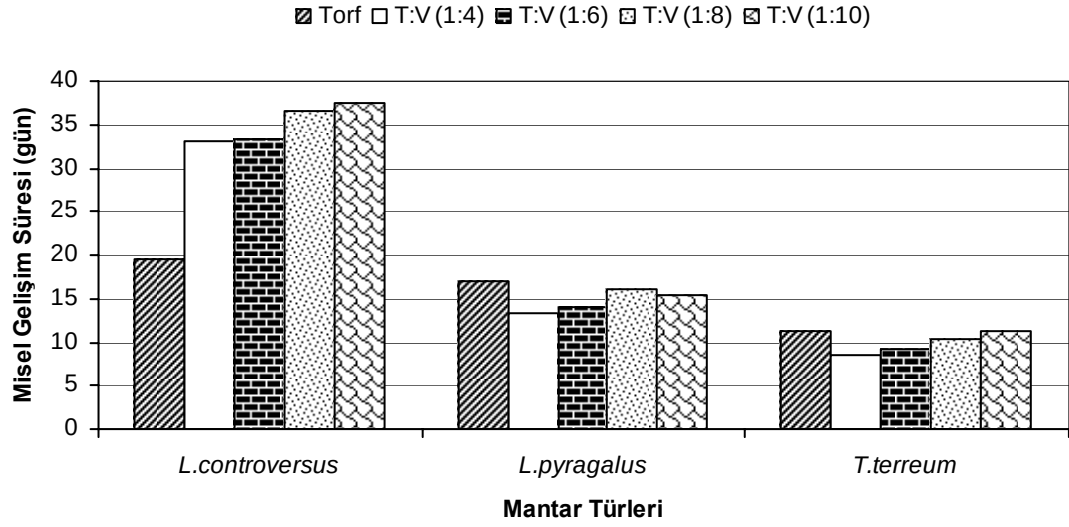


Torf : Vermikülit (1:10)



Torf

Şekil 4.42. *T. terreum* türünün torf ve torf:vermikülit karışımlarından hazırlanan ortamlarda misel gelişimi



Şekil 4.43. *L. contraversus*, *L. pyrogalus* ve *T. terreum* mantar türlerinin torf ve torf:vermikülit karışımlarından hazırlanan ortamlarda misel gelişim süreleri

4.8. Farklı İnokulasyon Uygulamalarının Ektomikoriza Oluşumu ve Bitki Gelişimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

4.8.1. Farklı İnokulasyon Uygulamalarının Ektomikoriza Oluşumu Üzerine Etkisi

İnokulasyon ve ektomikorizal ilişkinin belirlenmesi çalışmalarında 1 tanesi kontrol olmak üzere 15 farklı uygulama denenmiştir. Çalışmada farklı inokulasyon uygulamalarına ait sterilizasyondan sonraki ortam pH değerleri, incelenen fidan sayısı ve ektomikoriza oluşumu **Çizelge 4.21**'de verilmiştir.

Çizelge 4.21. Farklı inokulasyon uygulamalarının sterilizasyondan sonraki pH değerleri, her uygulama için incelenen fidan sayısı ve ektomikoriza oluşumu

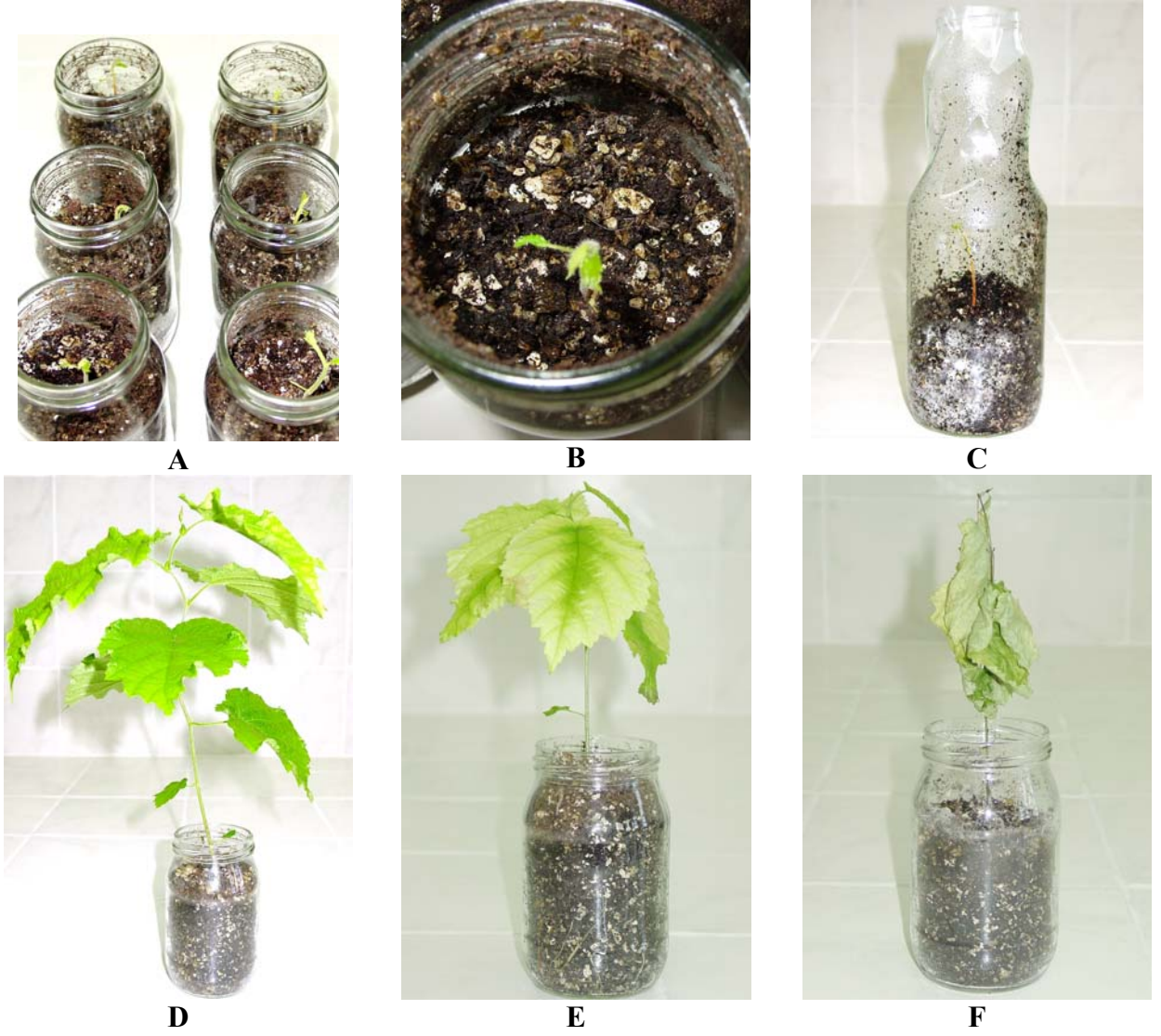
Uygulama	Ortamların sterilizasyon sonrası pH değerleri	İncelenen fidan sayısı	Ektomikoriza oluşumu
A	5.87	4	+
B	5.89	3	+
C	6.01	4	+
D	5.89	3	+
E	5.87	5	+
F	5.80	4	+
G	5.80	4	+
H	5.82	3	+
I	6.46	5	+
K	6.48	4	+
L	5.85	4	+
M	5.90	3	+
N	5.89	5	+
O	5.80	4	+
Kontrol	5.99	4	-

+: Ektomikoriza oluşumu var,

-: Ektomikoriza oluşumu yok

Farklı inokulasyon uygulamalarına ait ortamların sterilizasyon sonrası pH değerlerinin 5.80-6.48 arasında değiştiği belirlenmiştir. Tüm uygulamalarda pH değerlerinin birbirine oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir. Ektomikorizal mantarların asit nitelikli organik topraklarda alkali topraklardan daha fazla bulunduğu ve düşük nitrat düzeyli, nötre yakın pH'larda daha iyi mikoriza oluşumunun sağlandığı bildirilmektedir. Ayrıca yüksek nitrat ve kireç düzeylerinin mikoriza oluşumunu engellediği de belirtilmektedir (**Harley, 1969; Haktanır ve Arcak, 1997**). Nitekim agar ortamında yapılan çalışmalarda ektomikorizal mantarların misel gelişiminin türe bağlı olarak 5.5-7.0 arasındaki pH'larda daha iyi olduğu bildirilmiştir (**Sundari ve Adholeya, 2003; Daza ve ark., 2006**).

Ortamlar steril edildikten sonra *L. pyrogalus* türünün inokulumu (saf misel kültürleri, vejetatif ve sıvı inokulum) ile aşılanmış ve tohum ekimi yapılmıştır. Fidanlar 3 ay boyunca laboratuvar koşullarında yetiştirilmiştir. Yetiştirme periyodu boyunca bazı fidanlarda potasyum (K) noksanlığından kaynaklanan ve bazı fidanlarda ise dikimden hemen sonra nedeni belirlenemeyen ölümler meydana gelmiştir (**Şekil 4.44**).



Şekil 4.44. A) ve B) Açık sistemde bitki çıkışları, C) Kapalı sistemde bitki çıkışları, D) Sağlıklı gelişim gösteren bir fidan, E) Potasyum noksanlığı gösteren bir fidan, F) Kurumuş bir fidan

Farklı inokulasyon uygulamalarındaki fidanların çıkışları ve bitki gelişimlerine ait genel görünimleri **Şekil 4.45'**de verilmiştir.



Şekil. 4.45. Fidanların çıkış ve genel görünümü

Açık sistemde fındık fidanları kuvvetli bir şekilde gelişmesine rağmen, kapalı sistemde (O uygulaması) yetiştirme kabının hacminden ve sistemin kapalı olmasından dolayı bitki gelişimi zayıf olmuştur. Diğer taraftan, kapalı sistemde *L. pyrogalus* miselleri kuvvetli bir gelişim göstermiştir. İnokulasyondan 1-2 hafta sonra beyaz miseller besin ortamı ile nemlendirilen substratın her tarafına yayılmıştır (**Şekil 4.44**).

L. pyrogalus türünün fındık fidanları ile inokulasyonundan 3 ay sonra alınan kök örnekleri incelenmiş ve mikorizal kısa köklerin varlığı tespit edilmiştir. Buna göre ektomikorizal oluşum belirlenmiştir. İnkübasyon periyodunun sonunda kontrol uygulaması dışındaki tüm uygulamalarda inokule edilen fidanların hepsi ektomikoriza oluşturmuştur (**Çizelge 4.21**).

In vitro mikorizal sentez yöntemi, ektomikorizanın değişik fizyolojik, biyokimyasal ve besinsel çalışmalarında kullanılmaktadır (**Varma, 1998**). **Zak (1969)** *L. sanguifluus*'un *in vitro* kültürde çam ile birlikte çok zor ve zayıf bir şekilde ektomikoriza oluşturduğunu belirlemiştir. **Nezzar-Hocine ve ark. (1998)** yaptıkları çalışma sonucunda *Tricholoma* cinsinde *in vitro* ektomikorizal sentezin nispeten zor olduğunu bildirmişlerdir. **Parlade ve ark. (1995)** yaptıkları çalışmada *in vitro*'da 18 farklı fungal türe ait 23 izolatın *Pseudotsuga menziesii* ile ektomikoriza oluşturduğunu belirlemişlerdir. Serada kontrollü koşullarda *Amanita*, *Hebeloma*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Scleroderma* ve *Suillus* cinslerine ait 17 farklı izolatın *P. pinea* fidanları ile ektomikoriza oluşturduğu belirlenmiştir (**Rincón ve ark., 1999**). *T. matsutake*'nin *in vitro*'da kapalı ektomikorizal sistemde *Pinus densiflora* fidanları ile ektomikoriza oluşturabildiği tespit edilmiştir (**Yamada ve ark., 1999**). **Yamada ve ark. (2001a)**'nın yaptıkları başka bir çalışmada *in vitro*'da açık sistemde *Pinus densiflora* ile *Lyophyllum semitale*, *L. shimeji*, *Tricholoma flavovirens*, *T. portentosum*, *T. saponaceum*, *Suillus granulatus*, *S. Luteus*, *S. Bovinus*, *Rhizopogon rubescens*, *Lactarius hatsudake* ve *L. akahatsu* türleri arasında ektomikoriza oluşumu sağlanmıştır. *In vitro*'da *P. densiflora* ile *T. matsutake* arasındaki ektomikoriza oluşumunu inceleyen **Guerin-Laguet ve ark. (2004)** inokulasyondan 2 hafta sonra misel hiflerinin kabın dış kısmından gözlenebildiğini ve 75 gün sonra hiflerin kısa köklerin üzerini kapladığını bildirmişlerdir.

Ektomikorizal mantar türleri ile konukçu bitkiler arasındaki ektomikorizal ilişkiler konusunda birçok çalışma yapılmış, bu çalışmalarda da ektomikoriza oluşumu bildirilmiştir (**Lamb ve Richards, 1971; Chu-Chou, 1979; Molina ve Trappe, 1982,**

1994; Malajczuk ve ark., 1982; Danielson, 1984; Ingestad ve ark., 1986; Danell, 1994; Yamada ve Katsuya, 1995; Parladé ve ark., 1996; Kawai, 1997; Hall ve Wang, 1998a; Vaario ve ark., 1999; Guerin-Laguette ve ark., 2000; Santiago-Martínez ve ark., 2003; Parlade ve ark., 2004; Flores ve ark., 2005).

4.8.2. Farklı İnokulasyon Uygulamalarının Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi

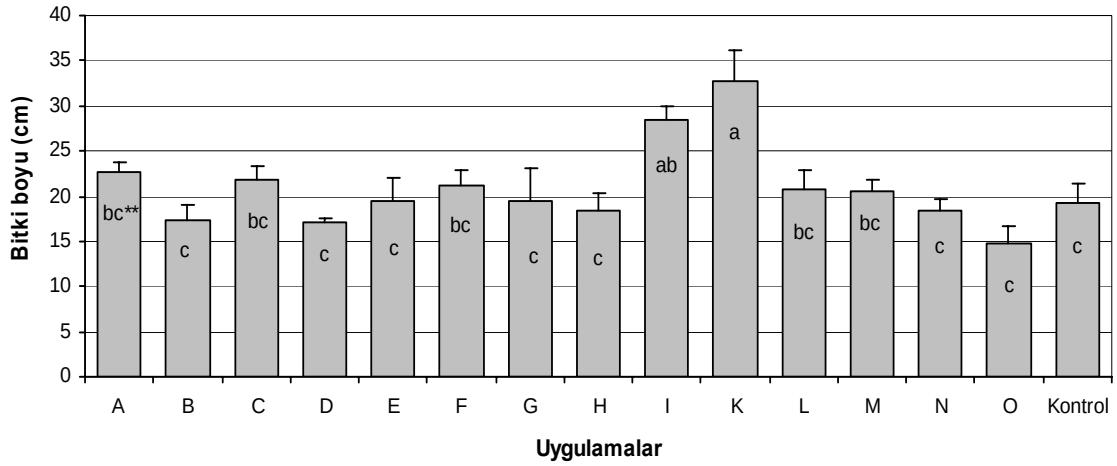
Laboratuarda 3 aylık bir inkübasyon periyodunun sonunda farklı inokulasyon uygulamalarında yetiştirilen fındık fidanlarının bitki boyu, gövde çapı, kök uzunluğu, kök ve sürgün yaş ağırlığı, kök ve sürgün kuru ağırlığı (kök ve sürgün biyoması), toplam bitki kuru ağırlığı (toplam biyomas), kök:sürgün oranı, kök ve sürgün kuru madde içerikleri tespit edilmiştir. Kök yaş ağırlığı, kök kuru ağırlığı ve sürgün kuru madde içeriği bakımından farklı inokulasyon uygulamaları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$), diğer tüm özellikler bakımından çok önemli ($P<0.01$) bulunmuştur (**Çizelge 4.22**).

En yüksek bitki boyu açık mikorizal sistemde destile su ile nemlendirilen 50 ml vejetatif inokulumla hazırlanan K uygulamasında inokule edilen fidanlarda (32.70 cm) elde edilmiştir. Bunu istatistiksel olarak aynı grupta yer alan şekersiz MMN (n-MMN) ortamıyla nemlendirilen 50 ml vejetatif inokulumla hazırlanan I uygulaması (28.38 cm) izlemiştir. Kontrol uygulaması (19.20 cm), en düşük bitki boyunun elde edildiği B, D, E, G, H, N ve O uygulamaları ile istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. A, C, F, I, K, L ve M inokulasyon uygulamalarından kontrole göre daha yüksek bitki boyu elde edilmiştir (**Çizelge 4.22** ve **Şekil 4.46**). Kapalı sistem uygulamasında (O) en düşük bitki boyunun elde edilmesi ise muhtemelen kullanılan kap hacminden ve sistemden kaynaklanmaktadır. Nitekim kapalı sistemde fidanlarda birinci ay itibarıyla hem sürgün büyümesi hem de yaprak gelişimi yavaşlamıştır.

Çizelge 4.22. Farklı inokulasyon uygulamalarının bitki gelişimi üzerine etkisi

Uygulama	Bitki boyu (cm)	Gövde çapı (mm)	Kök uzunluğu (cm)	Kök yaş ağırlığı (g)	Sürgün yaş ağırlığı (g)	Kök kuru ağırlığı (g)	Sürgün kuru ağırlığı (g)	Toplam bitki kuru ağırlığı (g)	Kök:sür-gün oranı	Kök kuru madde miktarı (%)	Sürgün kuru madde miktarı (%)
A	22.63bc**	2.78a-d**	37.38a**	1.61abc*	3.15ab**	0.46ab*	1.09abc**	1.55abc**	0.41bc**	15.03ab**	26.43ab*
B	17.27c	2.12ef	16.50bcd	1.44bc	1.44bcd	0.38a-d	0.67def	1.05def	0.62abc	18.01a	23.41b
C	21.90bc	2.51b-f	22.93bcd	1.65abc	2.69a-d	0.40a-d	0.91b-e	1.31b-e	0.45bc	13.13ab	24.00ab
D	17.20c	2.19def	24.10bcd	1.97ab	1.64bcd	0.44abc	0.67def	1.11c-f	0.68abc	13.44ab	24.38ab
E	19.55c	2.69a-e	23.28bcd	1.36bc	3.03ab	0.35bcd	0.96a-d	1.31b-e	0.36c	16.79ab	22.25bc
F	21.20bc	2.44b-f	30.08ab	1.71abc	2.79abc	0.41a-d	0.90b-e	1.31b-e	0.47bc	12.86ab	23.27b
G	19.55c	2.08f	24.83a-d	1.16c	1.14cd	0.34cd	0.54ef	0.88ef	0.76ab	16.97ab	28.46ab
H	18.33c	2.35c-f	26.35abc	1.50bc	2.06bcd	0.31d	0.70c-f	1.01def	0.45bc	12.01b	24.43ab
I	28.38ab	3.05ab	27.04abc	1.66abc	4.28a	0.47a	1.32a	1.79a	0.35c	17.91a	23.62b
K	32.70a	2.94abc	28.23abc	1.34c	4.09a	0.40a-d	1.26ab	1.66ab	0.32c	16.24ab	23.05b
L	20.73bc	3.14a	21.83bcd	2.16a	2.53a-d	0.48a	0.92b-e	1.40a-d	0.56abc	13.15ab	26.06ab
M	20.47bc	2.89abc	15.77cd	1.52bc	2.31bcd	0.38a-d	0.98a-d	1.36a-d	0.40c	16.93ab	30.37a
N	18.40c	2.57a-f	12.50d	1.49bc	2.13bcd	0.39a-d	0.79c-f	1.18c-f	0.52bc	17.13ab	24.29ab
O	14.73c	2.91abc	26.20abc	1.67abc	0.90d	0.34cd	0.39f	0.73f	0.89a	12.46ab	16.87c
Kontrol	19.20c	2.33c-f	16.40cd	1.32c	1.85bcd	0.38a-d	0.74c-f	1.11c-f	0.57abc	15.19ab	24.19ab

*: P<0.05 düzeyinde önemli **: P<0.01 düzeyinde çok önemli



Şekil 4.46. Farklı inokulasyon uygulamalarının bitki boyuna etkisi (**:P<0.01 düzeyinde çok önemli)

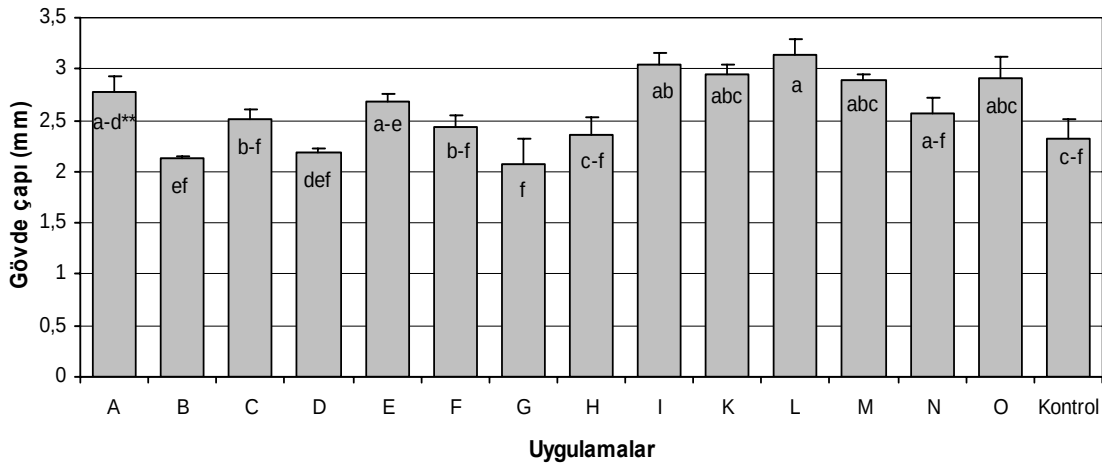
Farklı besin koşullarında *T. matsutake* miselleri ile inokule edilen bitkilerin sürgün gelişimi karşılaştırılmış ve glikozun kullanılmadığı MNC (Modifiye Edilen Norkrans C) ortamı ile nemlendirilen bitkilerin sürgün gelişiminin MNC ve Ohta ortamı ile nemlendirilenlerden daha iyi olduğu belirlenmiştir (Yamada ve ark., 1999). Bu çalışmada da en yüksek bitki boyunun elde edildiği K uygulamasında substrat sıvı besin ortamı yerine destile su ile nemlendirilmiştir. Aynı şekilde yüksek bitki boyunun elde edildiği I uygulamasında da substrat şekersiz sıvı besin ortamı ile nemlendirilmiştir.

Çalışmada K uygulamasındaki fidanların boyu kontrole göre % 70 daha yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde, *Lactarius deliciosus* ile aşıl原因 *Pinus sylvestris* fidanlarında sürgün uzunluğu, inokule edilmeyen fidanlara göre % 46-132 daha yüksek bulunmuştur (Guerin-Laguette ve ark., 2003). *Eucalyptus urophylla*'nın ektomikorizal *Scleroderma* türleri ile inokulasyonundan elde edilen fidanların sürgün boylarının inokule edilmeyen kontrol fidanlarına göre % 19-55 oranında daha uzun olduğu belirlenmiştir (Chen ve ark., 2006). Yapılan diğer çalışmalarda da ektomikorizal mantar türleriyle aşıl原因 fidanların bitki boylarının kontrole göre önemli derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Lee ve Koo, 1983; Castellano, 1994; Begonia ve ark., 1996; Reddy ve Natarajan, 1997; De La Cruz, 1998; Nezzar-Hocine ve ark., 1998; Pera ve ark., 1999; Hattori ve ark., 2000; Alves ve ark., 2001; Cripps, 2001; Shresta, 2002; Souza ve ark., 2004; Nunez ve ark., 2006; Turjaman ve ark., 2006; Tüfekçi, 2007). Araştırma bulgularının bu çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Bununla birlikte **Stenström ve Unesmat (1985)** ektomikorizal mantar türleriyle aşılamanın bitki boyu üzerinde negatif bir etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. **Rietveld ve ark. (1989)**'nın yaptıkları çalışmada 8 farklı ektomikorizal mantar türü ile inokule edilen *Larix decidua* fidanlarının genellikle inokule edilmeyen fidanlardan daha küçük olduğu belirlenmiştir.

En yüksek gövde çapı değeri 3.14 mm ile Terme izolatinin kullanıldığı MMN besin ortamı ile nemlendirilen 50 ml sıvı inokulumla hazırlanan L uygulamasında inokule edilen fidanlarda belirlenmiştir. En düşük gövde çapı ise 2.08 mm ile G uygulamasında inokule edilen fidanlarda tespit edilmiştir. Kontrol uygulamasında gövde çapı değeri ise 2.33 mm olarak belirlenmiştir. Gövde çapı bakımından A, C, E, F, H, I, K, L, M, N ve O inokulasyon uygulamalarından kontrole göre daha yüksek değerler elde edilmiştir (**Çizelge 4.22.** ve **Şekil 4.47**). Çalışmamızda L uygulamasındaki fidanların gövde çapı kontrole göre % 35 daha yüksek bulunmuştur.

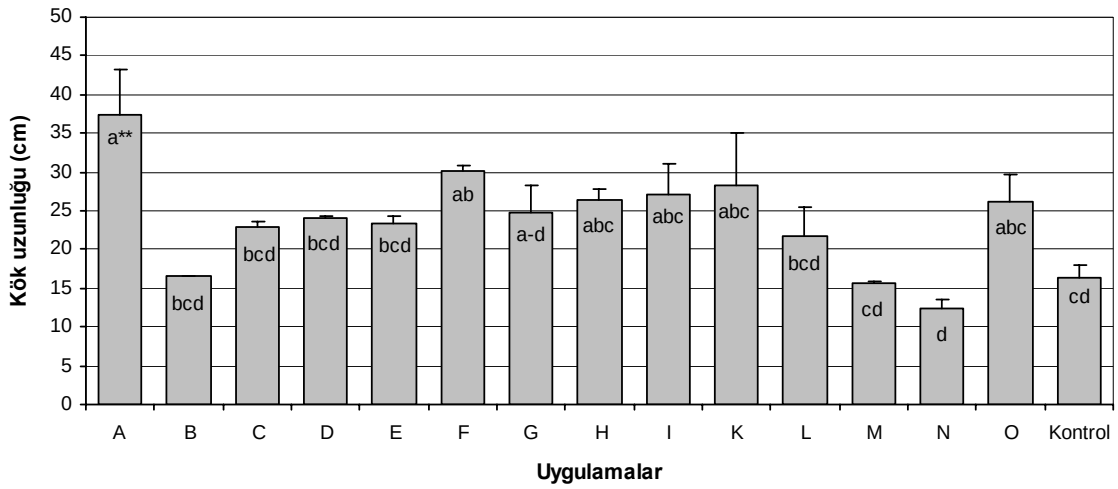
Bitki boyunda olduğu gibi ektomikorizal mantar türleriyle aşılanan fidanların gövde çaplarının da kontrole göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (**Castellano, 1994; Begonia ve ark., 1996; De La Cruz, 1998; Pera ve ark., 1999; Alves ve ark., 2001; Cripps, 2001; Nunez ve ark., 2006; Tüfekçi, 2007**).



Şekil 4.47. Farklı inokulasyon uygulamalarının gövde çapına etkisi (**:P<0.01 düzeyinde çok önemli)

En yüksek kök uzunluğu 37.38 cm ile BAF-20 sıvı besin ortamı ile nemlendirilen saf misel kültürlerinin kullanıldığı inokulumlu tohum ekimi yapılarak hazırlanan A uygulamasında inokule edilen fidanlarda, en düşük kök uzunluğu ise 12.50 cm ile

şekersiz MMN ile nemlendirilen 100 ml sıvı inokulumun kullanıldığı N uygulamasında inokule edilen fidanlarda elde edilmiştir. Kontrol uygulamasında ise kök uzunluğu 6.40 cm olarak belirlenmiştir. Uygulamalar arasında sadece M ve N uygulamalarından kontrole göre daha düşük kök uzunluğu elde edilmiş, diğer tüm uygulamalarda kontrolden daha yüksek kök uzunluğu tespit edilmiştir. Çalışmada A uygulamasından kontrole göre % 128, F uygulamasından % 83 daha yüksek kök uzunluğu değerleri elde edilmiştir (**Çizelge 4.22** ve **Şekil 4.48**).



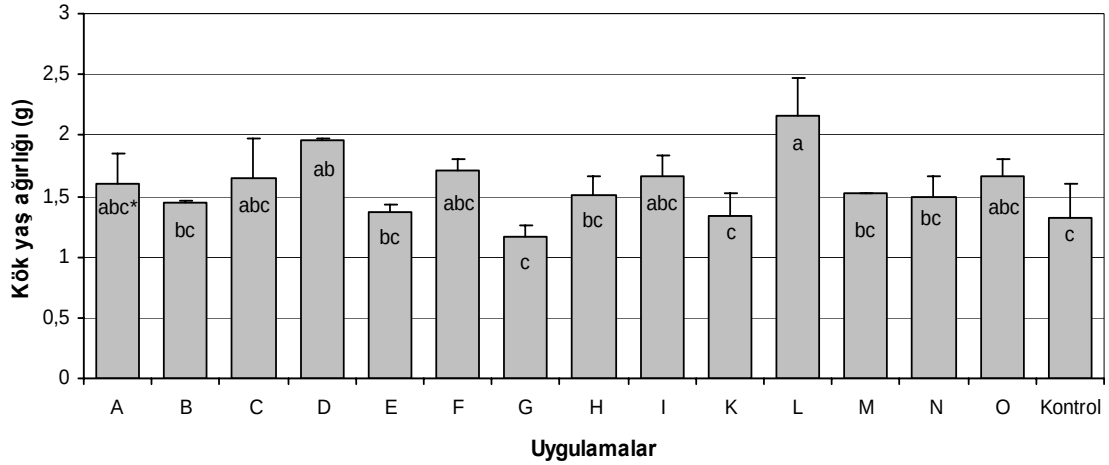
Şekil 4.48. Farklı inokulasyon uygulamalarının kök uzunluğuna etkisi (**:P<0.01 düzeyinde çok önemli)

İnokule edilmeyen kontrol fidanları ile karşılaştırıldığında *Lactarius hatsudake* ile inokule edilen *Pinus densiflora* fidanlarında kök uzunluğunda % 150 oranında bir artış sağlanmıştır (**Akitsu ve ark., 2000**). Yine **Hattori ve ark. (2000)** *L. hatsudake* ile inokule edilen *P. densiflora* fidanlarının kök uzunluğunda kontrole göre artış olduğunu bildirmişlerdir.

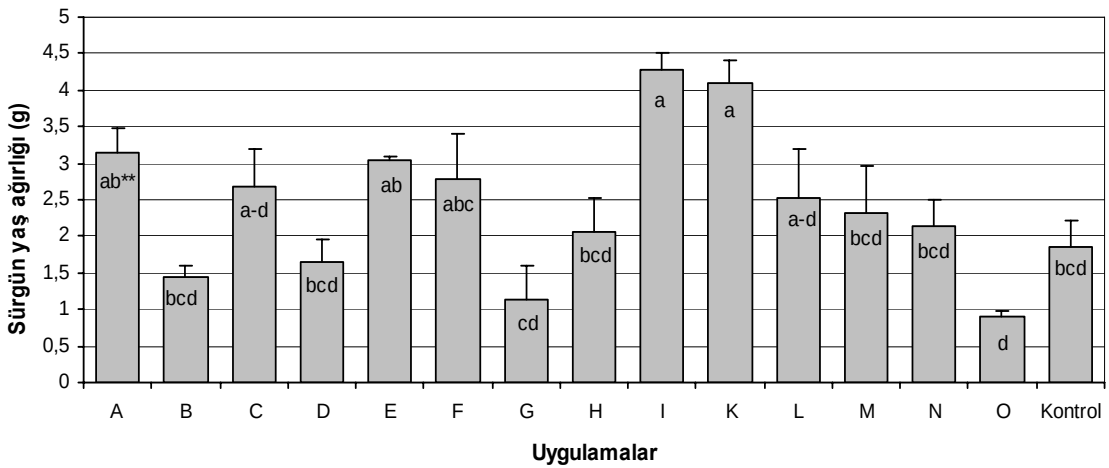
Kök yaş ağırlığı bakımından L uygulaması (2.16 g) ilk sırada yer alırken, aralarında istatistiksel fark olmayan G, K ve aşılanmanın yapılmadığı kontrol uygulaması son sırada yer almışlardır (**Çizelge 4.22** ve **Şekil 4.49**). Çalışmada L uygulamasındaki fidanların kök yaş ağırlığı kontrole göre % 64 daha yüksek bulunmuştur.

Sürgün yaş ağırlıkları bakımından en yüksek değerler aralarında istatistiksel fark bulunmayan I ve K uygulamalarından (sırasıyla 4.28 ve 4.09 g) elde edilmiştir. O uygulamasında gelişen fidanlar ise en düşük sürgün yaş ağırlığına (0.90 g) sahip oldukları belirlenmiştir. Kontrol uygulamasında sürgün yaş ağırlığı 1.85 g olarak tespit

edilmiştir (**Çizelge 4.22** ve **Şekil 4.50**). Fidanların sürgün yaş ağırlıklarının şekeriz MMN ortamıyla nemlendirilen 50 ml vejetatif inokulumla hazırlanan I uygulamasında kontrole göre % 131, destile su ile nemlendirilen 50 ml vejetatif inokulumla hazırlanan K uygulamasında % 121 oranında artış gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.49. Farklı inokulasyon uygulamalarının kök yaş ağırlığına etkisi (*:P<0.05 düzeyinde önemli)

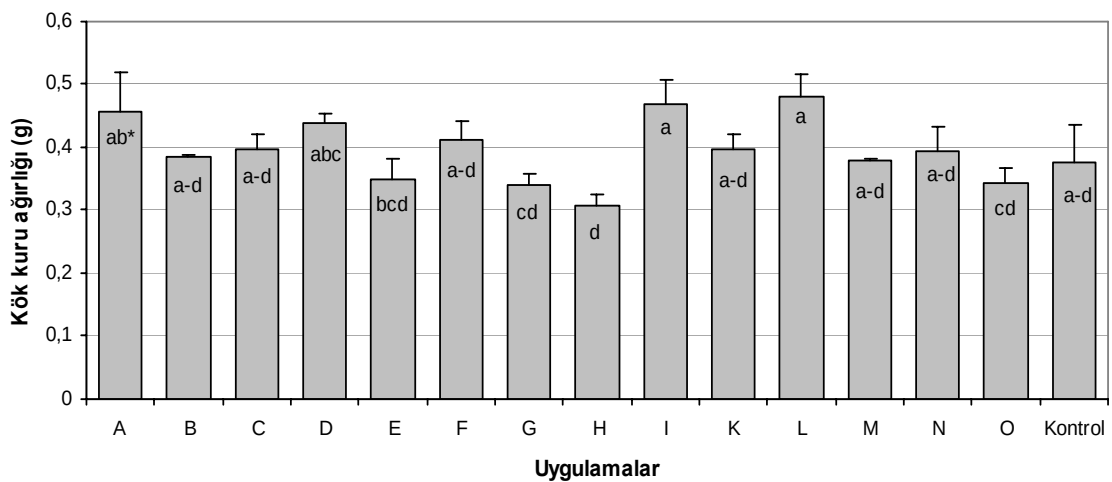


Şekil 4.50. Farklı inokulasyon uygulamalarının sürgün yaş ağırlığına etkisi (**:P<0.01 düzeyinde çok önemli)

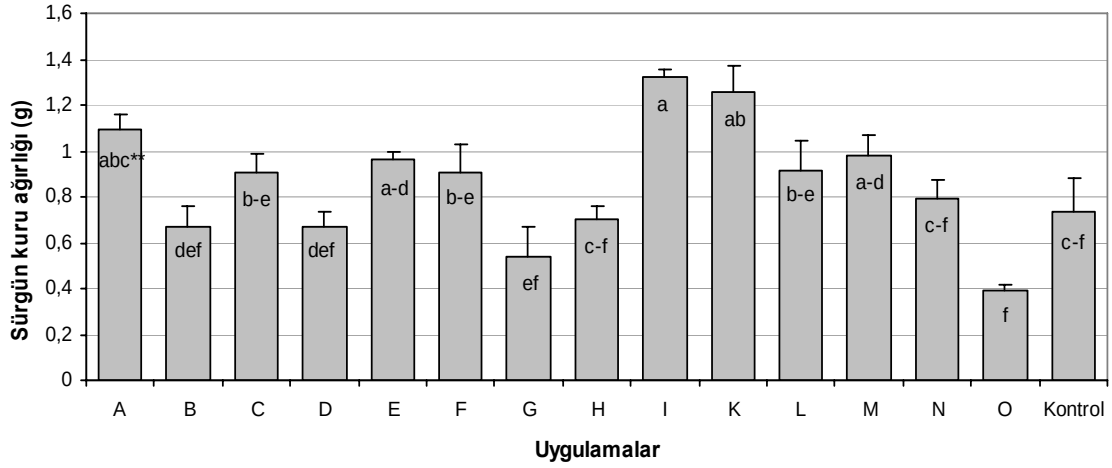
Gelişmekte olan misellerin solunumunun, şişedeki CO₂ konsantrasyonunu ve dolayısıyla da konukçu bitkinin fotosentezini artırarak bitki gelişimini teşvik edebildiği belirtilmektedir (**Fortin ve ark., 1983; Jumpponen ve Trappe, 1998**). Yapılan çalışmalarda ektomikorizal fidanlarda kök ve sürgün yaş ağırlığının kontrole göre daha

yüksek olduğu belirlenmiştir (Marx ve Artman, 1978; Marx, 1979a; 1979b; Tüfekçi, 2007).

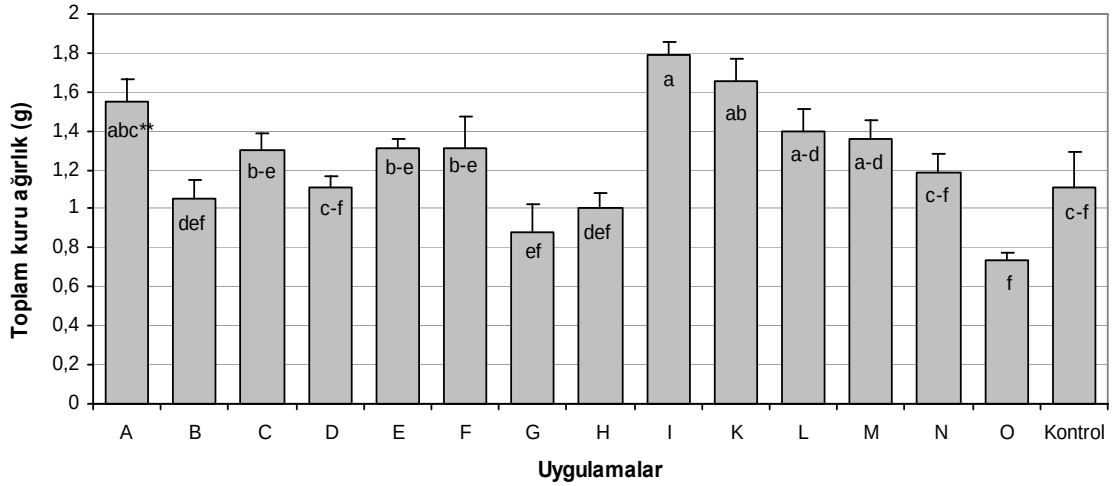
En yüksek kök kuru ağırlığı (kök biyoması) L (0.48 g) ve I (0.47 g) uygulamalarında, en düşük kök kuru ağırlığı ise H (0.31 g) uygulamasında gelişen fidanlardan elde edilmiştir. Sürgün kuru ağırlığı (sürgün biyoması) bakımından da en yüksek değerler I uygulamasında (1.32 g) tespit edilmiştir. En düşük sürgün kuru ağırlığı kapalı mikorizal sistem olan O uygulamasında (0.39 g) belirlenmiştir. Kök ve sürgün kuru ağırlıklarında olduğu gibi en yüksek toplam bitki kuru ağırlığı (toplam biyomas) değeri (1.79 g) I uygulamasında inokule edilen fidanlarda, en düşük değer ise kapalı mikorizal sistem olan O uygulamasında (0.73 g) inokule edilen fidanlarda tespit edilmiştir. Kontrol uygulamasında toplam bitki kuru ağırlığı 1.11 g olarak belirlenmiştir. Çalışmada toplam bitki kuru ağırlığı bakımından B, D, G, H ve O dışındaki tüm inokulasyon uygulamalarından kontrole göre daha yüksek değerler elde edilmiştir (Çizelge 4.22, Şekil 4.51, 4.52 ve 4.53). I uygulamasında inokule edilen fidanların kontrole (inokule edilmeyen fidanlara) göre sürgün kuru ağırlıkları % 78, toplam bitki kuru ağırlıkları % 61 oranında artmıştır. Kapalı sistem (O) uygulamasında inokule edilen fidanların sürgün kuru ağırlıklarının, dolayısıyla toplam bitki kuru ağırlıklarının düşük olması daha önce de belirtildiği gibi ortam koşulları nedeniyle bitki gelişiminin diğer uygulamalara göre daha zayıf olmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.51. Farklı inokulasyon uygulamalarının kök kuru ağırlığına etkisi (*:P<0.05 düzeyinde önemli)



Şekil 4.52. Farklı inokulasyon uygulamalarının sürgün kuru ağırlığına etkisi (**:P<0.01 düzeyinde çok önemli)



Şekil 4.53. Farklı inokulasyon uygulamalarının toplam bitki kuru ağırlığına etkisi (**:P<0.01 düzeyinde çok önemli)

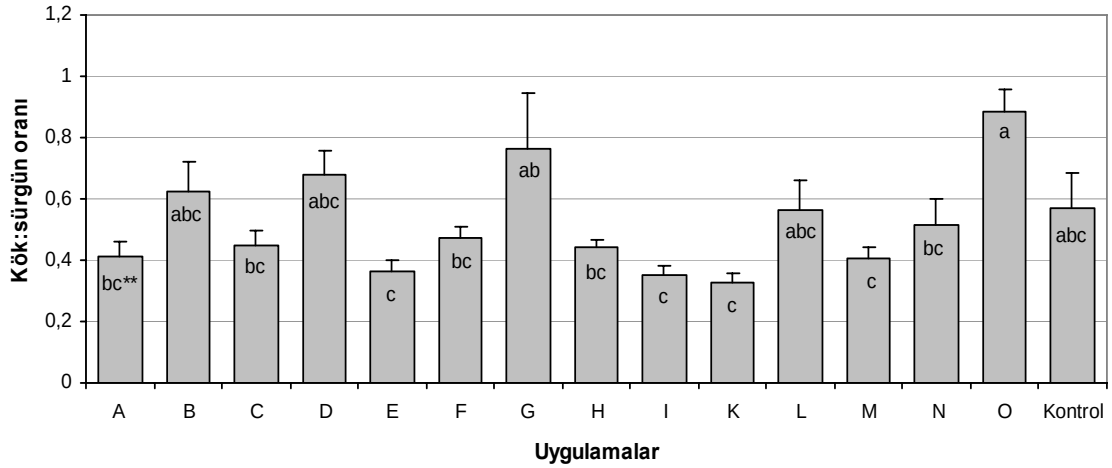
Thomson ve ark. (1994) ektomikorizal mantar türleriyle aşıllı *Eucalyptus globulus* fidanlarının kuru ağırlıklarının, aşılanmayanlara göre % 50-350 arasında değişen oranlarda arttığını belirlemişlerdir. Ektomikorizal mantarlarla (*Laccaria*, *Scleroderma*, *Pisolithus*) inokule edilen *E. globulus* fidanlarının kuru ağırlıkları, inokule edilmeyen fidanların kuru ağırlığının % 90-225'i arasında değişmiştir (**Lu ve ark., 1998**). *Tricholoma matsutake* ile inokule edilen *Pinus densiflora* fidanlarının toplam kuru ağırlığı ise kontrole göre % 98 oranında artmıştır (**Guerin-Laguette ve ark., 2004**). **Chen ve ark. (2006)**'nın yaptığı çalışmada ektomikorizal mantar türleri ile

inokule edilen *Eucalyptus urophyll* fidanlarında toplam kuru ağırlığın kontrole göre % 25-41 oranında arttığı belirlenmiştir. Araştırma bulgularının bu çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Ektomikorizal mantar türleriyle aşıl原因an fidanlarda aşıl原因mayanlara göre daha fazla kök ve sürgün kuru ağırlığı elde edildiği bildirilmiştir (**Eltrop, 1993; Akitsu ve ark., 2000; Hattori ve ark., 2000; Alves ve ark., 2001; Brunner ve Brodbeck, 2001; Cripps, 2001; Shresta, 2002; Guerin-Laguette ve ark., 2003; Nara, 2005; Turjaman ve ark., 2006; Ramanankierana ve ark., 2007; Tüfekçi, 2007**). Bununla birlikte **Quoreshi ve Timmer (1998)** ise *Hebeloma crustuliniforme* ve *Laccaria bicolor* ile aşıl原因an *Picea mariana* fidanlarında ektomikorizal aşıl原因manın fidan kuru ağırlığını etkilemediğini belirlemişlerdir.

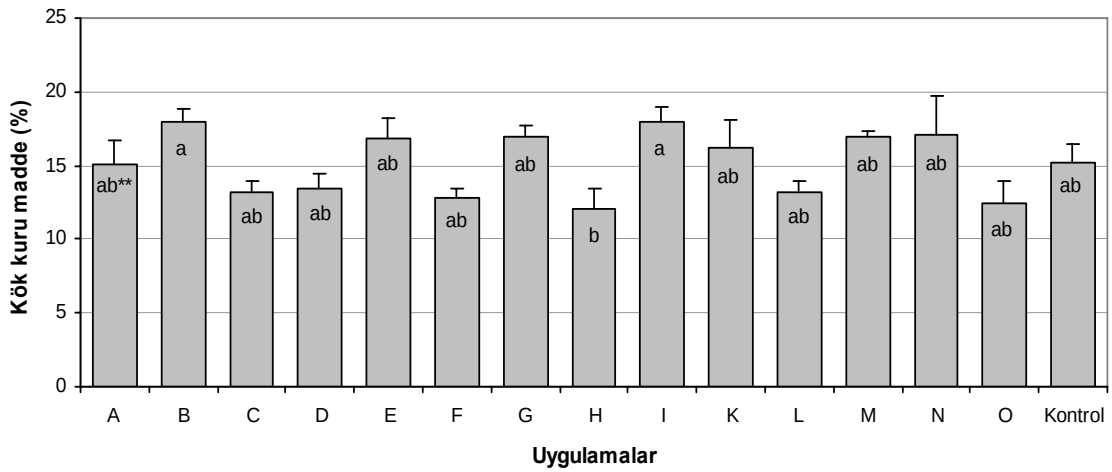
Çalışmada en yüksek kök:sürgün oranı O uygulamasında inokule edilen fidanlardan (0.89) elde edilmiştir. Bu durum kapalı mikorizal sistem olan O uygulamasında inokule edilen fidanların kök gelişimlerinin iyi, buna karşılık sürgün gelişimlerinin zayıf olmasından kaynaklanmaktadır. En düşük kök:sürgün oranı aralarında istatistiksel fark olmayan E, I, K ve M uygulamalarından elde edilmiştir (**Çizelge 4.22 ve Şekil 4.54**). Bu uygulamalarda gelişen fidanların kök:sürgün oranının düşük olması ise O uygulamasının aksine, toprak üstü aksamalarının oldukça iyi gelişmesinden kaynaklanmaktadır.

Brunner ve Brodbeck (2001) tarafından yapılan bir çalışmada *Hebeloma crustuliniforme* ve *Laccaria bicolor* ile inokule edilen *Picea abies* fidanları kontrol uygulaması ile karşılaştırıldığında kök:sürgün oranı azalmıştır. Benzer şekilde **Wallander ve Nylund (1991)** ile **Brunner (2004)**'de fungal inokulasyonun kök:sürgün oranını önemli derecede azalttığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da inokulasyon uygulamalarında kök:sürgün oranının genel olarak kontrole göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte **Eltrop (1993)** ile **Eltrop ve Marschner (1996)** ektomikorizal inokulasyonla kök:sürgün oranının arttığını ifade etmişlerdir. Diğer taraftan **Alves ve ark. (2001)** ise kök:sürgün oranlarının inokulasyondan etkilenmediğini ifade etmişlerdir.

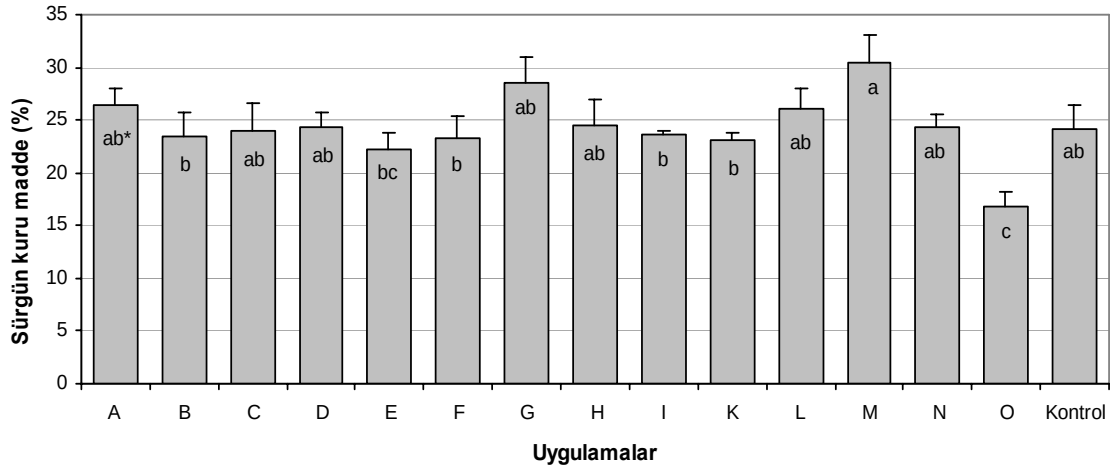


Şekil 4.54. Farklı inokulasyon uygulamalarının kök:sürgün oranına etkisi (**:P<0.01 düzeyinde çok önemli)

B ve I uygulamasında inokule edilen fidanların kök kuru madde içerikleri (sırasıyla % 18.01 ve 17.91) ilk sırada yer almıştır. H uygulamasında inokule edilen fidanların kök kuru madde içerikleri (% 12.01), diğer tüm inokulasyon uygulamalarından çok önemli derecede düşük bulunmuştur. En yüksek sürgün kuru madde içeriği M uygulamasında inokule edilen fidanlarda (% 30.37) tespit edilmiştir. En düşük sürgün kuru madde içeriği ise O uygulamasında inokule edilen fidanlarda (% 16.87) elde edilmiştir (**Çizelge 4.22, Şekil 5.55 ve 4.56**). Çalışmada M uygulamasındaki fidanların sürgün kuru madde içeriği kontrole göre % 26 daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.55. Farklı inokulasyon uygulamalarının kök kuru madde miktarına etkisi (**:P<0.01 düzeyinde çok önemli)



Şekil 4.56. Farklı inokulasyon uygulamalarının sürgün kuru madde miktarına etkisi (*:P<0.05 düzeyinde önemli)

Yapılan çalışmalarda ektomikorizal mantar türleriyle aşılanan fidanların kuru madde miktarlarının kontrole göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Lee ve Koo, 1983; Bougher ve ark., 1990; Eltrop, 1993; Hatch ve Doak, 1993; Reddy ve Natarajan, 1997; Alves ve ark., 2001; Souza ve ark., 2004).

Farklı inokulasyon uygulamalarında gelişen fındık fidanlarının genel görünüşleri Şekil 4.57’de, kontrol ve bitki gelişiminin en iyi olduğu düşünülen inokulasyon uygulamalarında gelişen fidanların sürgün ve kök gelişimi bakımından karşılaştırılması ise Şekil 4.58’de verilmiştir.

Ektomikorizanın bitki besin maddesi alımını artırıcı ve bitki gelişimini teşvik edici etkisi yapılan bir çok çalışmada gösterilmiştir (Göbl, 1975; Marx, 1979a; Walker, 1984; Castellano, 1990; Osonubi ve ark., 1991; Eltrop, 1993; Lu ve ark., 1998; Kropp ve Mueller, 1999; Alves ve ark., 2001; Brunner ve Brodbeck, 2001; Cripps, 2001; Guerin-Laguette ve ark., 2003; Souza ve ark., 2004; Tüfekçi, 2007).

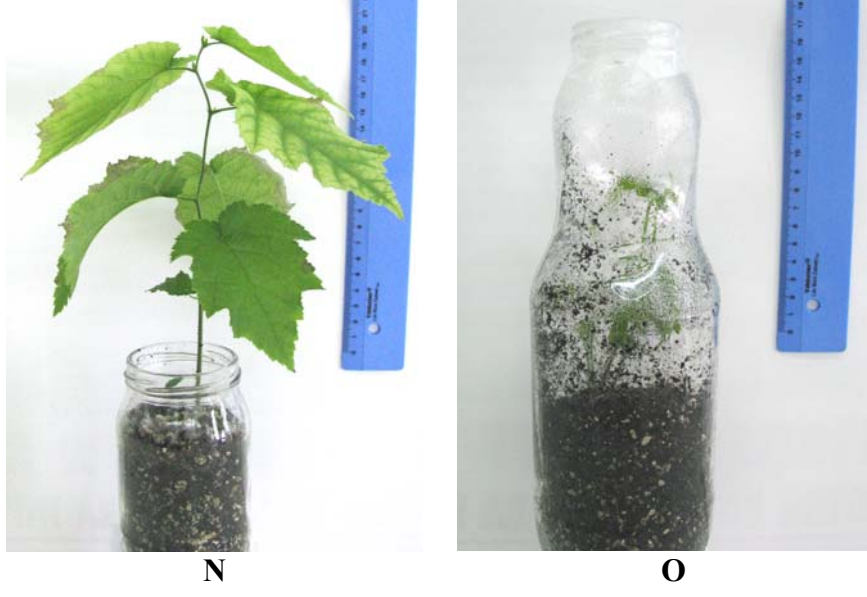
Bunun aksine Gagnon ve ark. (1995), Quoreshi ve Timmer (1998), Eltrop ve Marschner (1996) ile Repac (1996 ve 2007) ektomikorizal mantar aşılmasının bitki gelişimini artırıcı herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

**A****B****C****D****E****F**

Şekil. 4.57. Farklı inokulasyon uygulamalarında gelişen fındık fidanlarının görünümü

**G****H****I****K****L****M**

Şekil 4.57. Devamı



Şekil 4.57. Devamı



Şekil 4.58. Kontrol ve bazı inokulasyon uygulamalarının sürgün ve kök gelişimi bakımından karşılaştırılması

Bitki üzerinde ektomikorizal mantar aşılamaının faydalı etkisinin gözlenip gözlenmeyeceği ektomikorizal mantar türüne, kullanılan inokulumun yaşına ve tipine, inokulumun uygulanma şekline, inokulasyon zamanına, inokulum yoğunluğuna, iklime, ekosisteme, büyüme ortamına ve konukçu ile mantar arasındaki bazı interaksiyonlara bağlıdır (**Abbott ve Robson, 1981; Torres, 1992**). Çalışmada C kaynağının daha az veya hiç olmadığı (MMN ve n-MMN) besin ortamının kullanıldığı uygulamalardan, daha fazla C kaynağının kullanıldığı (BAF-20 ve BAF) uygulamalara göre bitki gelişimi ile ilgili daha iyi sonuçlar alınmıştır. Nitekim şekersiz besin ortamı ile nemlendirilen I uygulamasından bitki gelişimi açısından oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir. Benzer şekilde *Suillus granulatus*, *Russula nigricans*, *R. rnariae*, *Laccaria bicolor*, *Lactarius chrysorrheus*, *Scleroderma areolatum*, ve *Cenococcum geophilum* gibi türler *in vitro*'da açık sentez sisteminde *P. densiflora* ile ektomikoriza oluşturmak için glikoza gereksinim duymamışlardır (**Yamada ve Katsuya, 1995**). Çalışmada elde edilen sonuçlar **Yamada ve ark. (1999)**'nın sonuçları ile de benzerlik göstermektedir. **Duddridge (1986a ve 1986b)** mikoriza elde etmek için kullanılan kültür ortamında glikozun yüksek konsantrasyonlarının konukçuda bir savunma tepkisine sebep olabileceğini belirtmiştir. Bu durumun, sırasıyla fenollerin üretimini artıracağını ve köklerin odunlaşmasına yol açacağını bildirmiştir. Ayrıca aşırı glikozun fungal örtü ve Hartig nette anormalliklere sebep olabileceğini de belirtmiştir. **Hutchison ve Piché (1995)** *Lactarius* gibi geç dönem ektomikorizal mantar türleri için glikozun varlığında mikoriza oluşumunun olumsuz etkilendiğini belirlemişlerdir. Bu etkinin nedenini de bitkilerdeki toksik sekonder metabolitlerin serbest kalması olarak bildirmişlerdir. Bununla birlikte **Guerin-Laguet ve ark. (2000)** torbalarda *L. deliciosus* ile *Pinus sylvestris* arasındaki mikoriza oluşumunu teşvik etmek için karbonhidratların gerekli olmadığını, fakat tüplerde mikoriza oluşumu üzerine glikozun belirgin pozitif bir etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. *Amanita muscaria*, *L. pubescens* ve *T. fulvum* türlerinde de glikozun mikoriza oluşumu üzerine pozitif etkisi gözlenmiştir (**Gibson ve Deacon, 1990**). Ayrıca *in vitro*'da ektomikoriza oluşumunu sağlamak için *T. matsutake* ve *C. cibarius* gibi türlerde glikozun gerekli olduğu bildirilmiştir (**Danell, 1994; Yamada ve ark., 1999**).

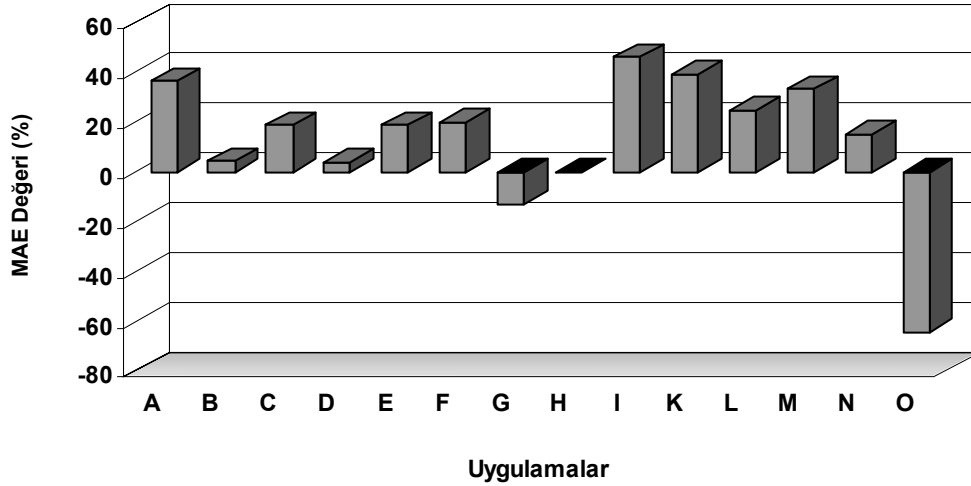
Çalışmada inokulum kaynağı olarak saf misel kültürleri, vejetatif ve sıvı inokulum kullanılmıştır. Uygulanan inokulum tiplerinde ve inokulasyon yöntemlerinde ektomikoriza oluşumu bakımından bir fark gözlenmemiştir. Bununla birlikte, bitki

gelişimi açısından vejetatif inokulum ve sıvı inokulumun, saf misel kültürlerine göre daha iyi sonuçlar verdiği söylenebilir.

Cedrus atlantica ve *Tricholoma tridentinum* arasındaki ektomikorizal ilişkinin araştırıldığı çalışmada 2 farklı inokulum tipi (vejetatif inokulum ve alginat tane inokulumu) kullanılmıştır. Mikorizal gelişim yalnızca vejetatif inokulum ile sağlanmıştır (Nezzar-Hocine ve ark., 1998). Parlade ve ark. (2004)'nın yaptıkları çalışmada sera koşullarında yenilebilir *Lactarius* türleri ile *Pinus pinaster* ve *P. sylvestris* fidanlarının inokulasyonu için farklı yöntemler (sıvı inokulum, vejetatif inokulum ve alginat misel) denenmiştir. *L. deliciosus*'un vejetatif inokulumu ile yapılan inokulasyonlar, mikorizal fidanların üretiminde en etkili yöntem olarak belirlenmiştir. Yamada ve ark. (1999) ve González-Ochoa ve ark. (2003) ise yaptıkları çalışmalarda mikorizal gelişim için sıvı misel inokulumunun iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

4.8.3. Mikorizal Aşılama Etkinliği

Çalışmada ayrıca farklı inokulasyon uygulamalarının Mikorizal Aşılama Etkinlik (MAE) değerleri de hesaplanmıştır (Şekil 4.59).



Şekil 4.59. Farklı inokulasyon uygulamalarının mikorizal aşılama etkinliği

Kontrol uygulamasına göre mikorizal aşılama etkinliği incelendiğinde en yüksek MAE değeri I uygulamasından (% 46.43) elde edilmiş, bunu K, A ve M uygulamaları

(sırasıyla % 39.46, 36.49 ve 33.60) izlemiştir. En düşük MAE değeri ise O uygulaması (% -64.24) ve G uygulamasında (% -12.98) tespit edilmiştir. Kapalı mikorizal sistemde BAF sıvı besin ortamı ile nemlendirilen saf misel kültürlerinin kullanıldığı O inokulasyon uygulaması ve açık mikorizal sistemde MMN sıvı besin ortamı ile nemlendirilen 83.3 ml vejetatif inokulumun kullanıldığı G inokulasyon uygulamasında aşılınmış bitkilerin kuru ağırlığı, aşılınmayan bitkilerin kuru ağırlığından daha düşük bulunmuştur. Bunun sonucu olarak MAE kontrolden daha düşük olmuştur.

Bu sonuçlara göre I, K, A, M, L, C, E, F ve N inokulasyon uygulamalarının yapıldığı bitkilerin MAE değeri istenilen düzeyde pozitif etki oluştururken, O ve G uygulamalarının yapıldığı fidanlarda ise negatif ilişki gerçekleşmiştir. Dolayısıyla O ve G uygulamalarının fidanlar üzerinde olumlu bir etki yaratmadığı anlaşılmaktadır. Bu bulgular bitkinin ölçülen diğer morfolojik değerleri ile de paralellik göstermektedir.

Tüfekçi (2007) tarafından yapılan çalışmada tohum ekimi aşamasında sterilize edilmiş ortamlara *H. crustuliforme* türünün aşılmasının sedir fidanlarına en yüksek MAE değeri (% 12.8-23.3) kazandırdığı tespit edilmiştir. *L. delicious* türünün sterilize edilmiş ortamlara aşılması ile ortalama % 8.1-16.2 arasında MAE değeri elde edilmiştir. Bununla birlikte *T. ustale* türü ile aşılana fidanlarda MAE değeri en düşük bulunmuş ve hatta sterilize edilmemiş ortamlarda *T. ustale* ile aşılama, aşılınmayanların değerinden de düşük çıkmıştır. Tüm uygulamalarda sterilize edilmiş ortamlara yapılan aşılama ise sterilize edilmemiş ortamlara oranla daha yüksek MAE değeri vermiştir. Çalışmada *H. crustuliforme* ve *L. delicious* ile aşılana bitkilerin MAE değerinin istenilen düzeyde pozitif etki oluşturduğu, bununla birlikte sterilize edilmemiş ortamlarda aşılama yapmanın ve aşılama *T. ustale* türünü kullanmanın fidanlar üzerinde olumlu bir etki yaratmadığı sonucuna varılmıştır.

4.9. Ektomikoriza Teşhisi ve Tanımlanması

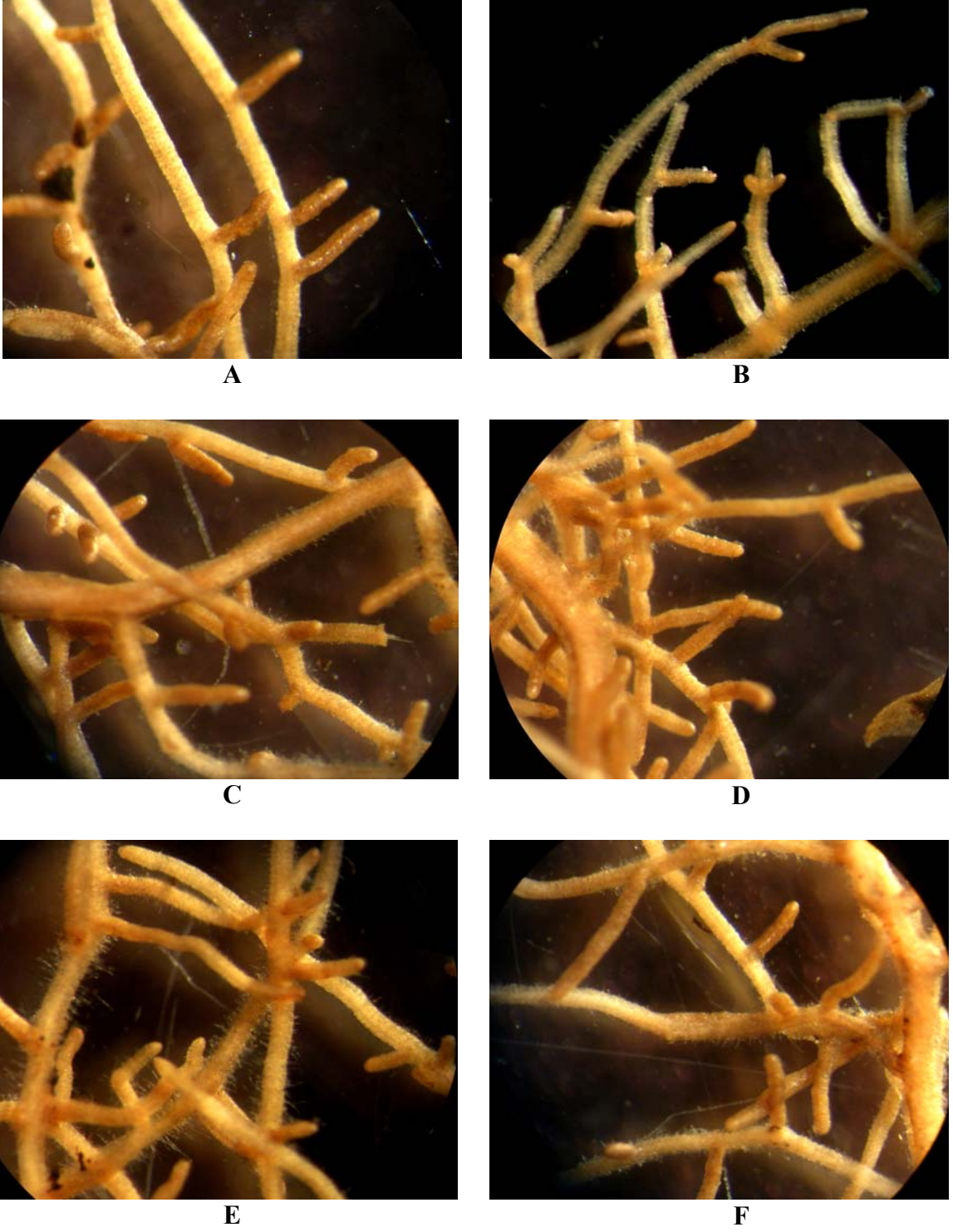
L. pyrogalus türünün fındık fidanları ile inokulasyonundan 3 ay sonra alınan kök örnekleri incelenerek, kontrol uygulaması dışındaki tüm uygulamalarda inokule edilen fidanların hepsinin ektomikoriza oluşturduğu belirlenmiştir (**Çizelge 4.21**). Bununla birlikte çalışmada ele alınan inokulasyon uygulamalarında geliştirilen fındık fidanlarının köklerindeki mikorizal kısa köklerin yoğunluğunun farklı olduğu görülmüştür. Mikorizal kısa köklerin yoğunluğunu belirlemek için 0-3 skalası uygulanmıştır (**Vicente ve ark., 2001**).

Mikroskopik inceleme sonucunda farklı uygulamalara ait mikorizal kısa köklerin yoğunluğu ile ilgili skala değerleri **Çizelge 4.23**'de verilmiştir. Farklı inokulasyon uygulamalarına ait mikorizal kısa köklerin streomikroskopta çekilen fotoğrafları ise **Şekil 4.60**'da verilmiştir.

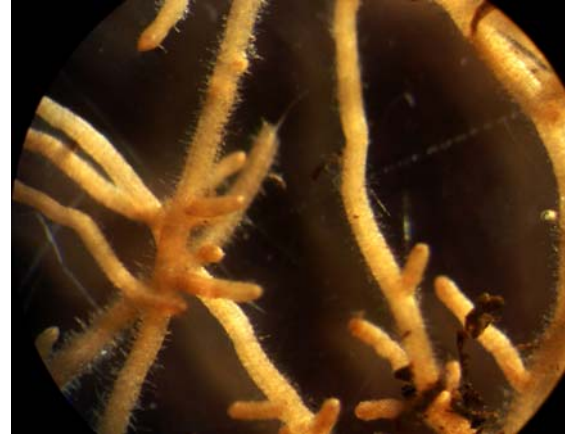
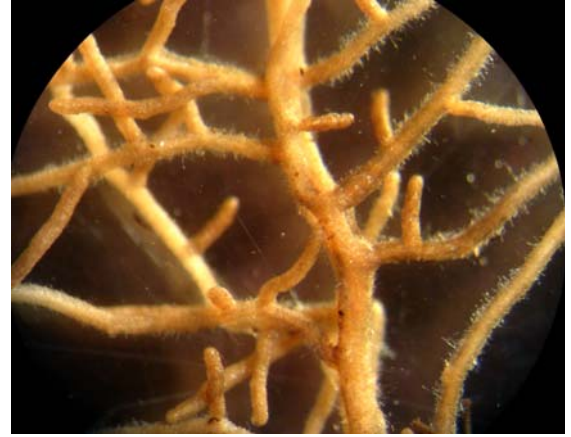
Çizelge 4.23. Farklı inokulasyon uygulamalarına ait mikorizal kısa köklerin yoğunluğu

Uygulama	Skala Değerleri
A	1
B	1
C	2
D	3
E	2
F	2
G	2
H	2
I	3
K	2
L	3
M	3
N	3
O	2
Kontrol	0

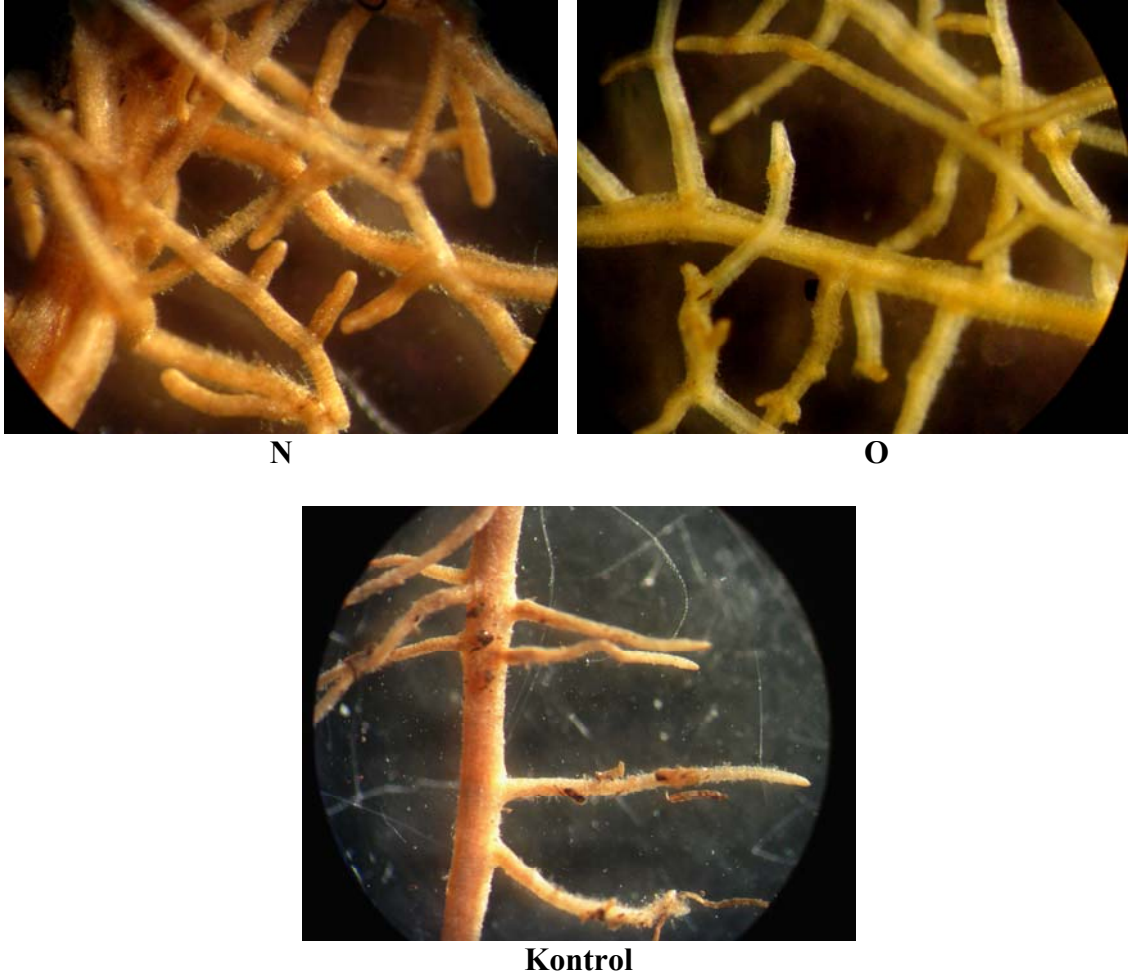
D, I, L, M ve N inokulasyon uygulamalarında mikorizal kısa köklerin yoğunluğu diğer uygulamalardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte A ve B uygulamalarının mikorizal kısa kök yoğunluğu, diğer uygulamalardan daha düşük bulunmuştur (**Çizelge 4.23**).



Şekil 4.60. Farklı inokulasyon uygulamalarına ait mikorizal kısa köklerin stereomikroskopta görünümü (6X)

**G****H****I****K****L****M**

Şekil 4.60. Devamı



Şekil 4.60. Devamı

L. pyrogalus mikorizasının tanımlanması ile ilgili daha önce yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda *L. pyrogalus* mikorizasının turuncu renkli, basit dallanmış ve tipik *Lactarius* mikorizasına benzediği (Agerer, 1987-1998) belirlenmiştir. Mikorizal köklerin kısa, kalın, fungal örtü ile kaplı, yüzeyinin düz, parlak ve kök uçlarının küt olduğu tespit edilmiştir. Rizomorflar gözlenmemiştir (Şekil 4.60).

Mikorizanın morfolojik olarak tanımlanması hem yenilebilir ektomikorizal mantarların yetiştiricilik çalışmaları için hem de taksonomik çalışmalar için gereklidir. Ektomikorizanın geniş kapsamlı morfolojik tanımlaması daha çok arazi koşullarında doğal olarak meydana gelen mikorizalar için yapılmıştır (Agerer 1987-1998; Ingleby ve ark., 1990; Goodman ve ark., 1996-1998; Agerer ve ark., 1996-1998). Bununla birlikte bazı mantar türlerinde *in vitro*'da sentezlenen mikorizanın da morfolojik olarak tanımlaması yapılmıştır (Guerin-Laguette ve ark., 2000; Santiago-Martínez ve ark., 2003; Flores ve ark., 2005).

Lactarius mikorizasında fungal örtü ve basidiocarp arasındaki renk benzerliği belirgin bir özelliktir (Pillukat, 1996). *L. akahatsu* mikorizasının açık turuncu renkte, yüzeyin düz, mat veya bazen parlak, fungal kılıf kesildiği zaman renginin yeşile döndüğü belirlenmiştir (Yamada ve ark., 2001b). Parlade ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada *L. deliciosus* mikorizasını tanımlamışlar ve mikorizanın açık turuncu renkli olduğunu, yaşlanmayla birlikte renkte koyulaşmanın meydana geldiğini, ikiye dallanmış ve yüzeyin düz olduğunu belirlemişlerdir.

Çalışmamızda *in vitro*'da elde edilen mikoriza morfolojik olarak arazide doğal olarak meydana gelen mikorizaya benzer bulunmuştur (Şekil 4.61). Bununla birlikte aradaki farklılıklar muhtemelen çevresel faktörlerden ve bitkinin yaşından kaynaklanmaktadır.

Bir tür veya izolat içerisindeki mikorizal morfolojinin substrat ve çevresel koşullara göre değişebileceğini bildiren Yamada ve ark. (2001b) *Pinus densiflora* ile ortak yaşayan yenilebilir mantarlarda (*Lyophyllum*, *Tricholoma*, *Suillus*, *Rhizopogon* ve *Lactarius*) ektomikorizanın morfolojisini ve anatomisini tanımlamışlardır. *In vitro* ve açık saksı kültürü koşullarında elde edilen mikorizal anatomisinin hemen hemen aynı olmasına rağmen, aynı fungal türde iki koşul arasında dış morfolojinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.61. Doğal ortamından izole edilen *L. pyrogalus* mikorizası

Çalışmada ayrıca farklı inokulasyon uygulamalarına ait mikorizal köklerin kimyasallara (% 15 KOH, % 70 etanol, % 15 FeSO₄ ve laktik asit) reaksiyonu stereomikroskopta incelenerek, renk değişimleri belirlenmiştir (Çizelge 4.24). Doğal ortamdan izole edilen mikorizal kök örnekleri de aynı kimyasallarla muamele edilmiş

ve karşılaştırma yapılmıştır. % 15'lik KOH ile muamele edilen inokulasyon uygulamalarına ait mikorizal köklerde renkte kuvvetli koyulaşma (koyu turuncu) tespit edilmiştir. Doğal ortamdan izole edilen mikorizada renkte koyulaşmaya ilave olarak hafif kırmızımsılaşma da gözlenmiştir. % 70'lik etanol kullanıldığında tüm uygulamalarda ve doğal ortamdan izole edilen mikorizada da herhangi bir renk değişimi gözlenmemiştir. % 15'lik FeSO₄ ise tüm uygulamalarda renkte açılmaya ve kök uçlarında siyahlaşmaya neden olmuştur. Laktik asit kullanıldığında renkte hafif koyulaşma gözlenmiştir. Kontrol uygulamasında kullanılan kimyasallara karşı bir renk değişimi olmamıştır.

Boletinus ve *Chroogomphus* cinslerinde mikorizaya FeCl₂ uygulandığında pozitif bir reaksiyonda renk değişiminin siyah veya yeşilimsi mavi olduğu bildirilmiştir (**Singer, 1986**). Ektomikorizada %15 KOH'un negatif reaksiyonunda renkte açılma ve sararma gözlemlendiği belirtilmektedir (**Anonymous, 2009d**). **Becerra ve ark. (2002)**'nin yaptıkları çalışmada *Naucoria escharoides* ektomikorizasına % 15 KOH uygulandığında renkte hafif kırmızımsılaşma, % 70 etanolde kahverengileşme, laktik asitte ise herhangi bir renk değişimi olmadığı tespit edilmiştir. *Cortinarius tucumanensis* ektomikorizasına % 15 KOH uygulandığında renkte koyulaşma, laktik asit uygulandığında turunculaşma olduğu, % 70'lik etanolde ise hiçbir renk değişiminin olmadığı bildirilmiştir (**Becerra ve ark., 2005**).

Çizelge. 4.24. Farklı inokulasyon uygulamalarına ait ve doğal ortamdan izole edilen mikorizal köklerin kimyasallara reaksiyonu

Uygulama	% 15 KOH	% 70 etanol	% 15 FeSO ₄	Laktik asit
A	Renkte kuvvetli koyulaşma	Renk değişimi yok	Renkte açılma, hafif yeşilimsi renk, kök uçlarında siyahlaşma	Hafif koyulaşma
B	Renkte kuvvetli koyulaşma	Renk değişimi yok	Renkte açılma, hafif yeşilimsi renk, kök uçlarında siyahlaşma	Hafif koyulaşma
C	Renkte kuvvetli koyulaşma	Renk değişimi yok	Renkte açılma, hafif yeşilimsi renk, kök uçlarında siyahlaşma	Hafif koyulaşma
D	Renkte kuvvetli koyulaşma	Renk değişimi yok	Renkte açılma, hafif yeşilimsi renk, kök uçlarında siyahlaşma	Hafif koyulaşma
E	Renkte kuvvetli koyulaşma	Renk değişimi yok	Renkte açılma, hafif yeşilimsi renk, kök uçlarında siyahlaşma	Hafif koyulaşma
F	Renkte kuvvetli koyulaşma	Renk değişimi yok	Renkte açılma, hafif yeşilimsi renk, kök uçlarında siyahlaşma	Hafif koyulaşma
G	Renkte kuvvetli koyulaşma	Renk değişimi yok	Renkte açılma, hafif yeşilimsi renk, kök uçlarında siyahlaşma	Hafif koyulaşma
H	Renkte kuvvetli koyulaşma	Renk değişimi yok	Renkte açılma, hafif yeşilimsi renk, kök uçlarında siyahlaşma	Hafif koyulaşma
I	Renkte kuvvetli koyulaşma	Renk değişimi yok	Renkte açılma, hafif yeşilimsi renk, kök uçlarında siyahlaşma	Hafif koyulaşma
K	Renkte kuvvetli koyulaşma	Renk değişimi yok	Renkte açılma, hafif yeşilimsi renk, kök uçlarında siyahlaşma	Hafif koyulaşma
L	Renkte kuvvetli koyulaşma	Renk değişimi yok	Renkte açılma, hafif yeşilimsi renk, kök uçlarında siyahlaşma	Hafif koyulaşma
M	Renkte kuvvetli koyulaşma	Renk değişimi yok	Renkte açılma, hafif yeşilimsi renk, kök uçlarında siyahlaşma	Hafif koyulaşma
N	Renkte kuvvetli koyulaşma	Renk değişimi yok	Renkte açılma, hafif yeşilimsi renk, kök uçlarında siyahlaşma	Hafif koyulaşma
O	Renkte kuvvetli koyulaşma	Renk değişimi yok	Renkte açılma, hafif yeşilimsi renk, kök uçlarında siyahlaşma	Hafif koyulaşma
Kontrol	Renk değişimi yok	Renk değişimi yok	Renk değişimi yok	Renk değişimi yok
1	Renkte kuvvetli koyulaşma, hafif kırmızımsılaşma	Renk değişimi yok	Renkte açılma, hafif yeşilimsi renk, kök uçlarında siyahlaşma	Hafif koyulaşma

1: Doğal ortamdan izole edilen mikoriza

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Dünyanın en pahalı ve en aranan yiyecekleri arasında yer alan bazı yenilebilir ektomikorizal mantar türleri, değeri milyar dolarları bulan geniş bir pazara sahiptir. Bununla birlikte, son yüzyılda dünyanın birçok yerinde yenilebilir ektomikorizal mantar türlerinin doğadan toplanan miktarlarında önemli azalmalar meydana gelmiştir. Bu nedenle, ektomikorizal mantar türlerinin kültüre alınması ve yetiştiriciliği ile ilgili yöntemlerin geliştirilmesi üzerinde önemle durulmaktadır. Ancak günümüzde sadece birkaç tür başarıyla yetiştirilebilmekte olup, talebi karşılamaktan son derece uzaktır. Sonuç olarak ekonomik açıdan önem taşıyan çoğu yenilebilir ektomikorizal mantar türünün mevcut üretimi günümüzde hala doğadan hasat edilebilenlerle sınırlı kalmaktadır.

Ülkemizde doğadan toplanıp, sevilerek tüketilen, değerli birçok ektomikorizal mantar türü bulunmaktadır. Gerek besin değeri gerekse taşıdığı tıbbi özellikler bakımından insan sağlığı açısından ve ticari olarak önemli olan bu ektomikorizal mantarların kültüre alınması ve yetiştiriciliği konusunda birçok çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Bununla birlikte ülkemizde bu konuda yapılan çalışmaya rastlanmamıştır. Ektomikorizal mantar türlerini kültüre alabilmek için ilk olarak mantarı izole etmek, onu saf kültürde geliştirmek, yeterli miktarda inokulum üretmek ve konukçu bitkilerle ektomikorizal ilişki oluşturup oluşturmadığını belirlemek gerekmektedir.

Bu çalışmada tüketicilerin beğenisini kazanan ve ekonomik önem taşıyan *Lactarius controversus*, *Lactarius pyrogalus* ve *Tricholoma terreum* ektomikorizal mantar türlerinin misel gelişimi için en uygun besin ortamı, pH, sıcaklık, C ve N kaynakları belirlenmiştir. *L. controversus*, *L. pyrogalus* ektomikorizal mantar türlerinin misel gelişimi için ME, BAF ve PDA, *T. terreum* türünde ise ele alınan tüm besin ortamlarının uygun olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre daha ucuz olması ve kolay hazırlanması nedeniyle PDA ortamı bu üç tür için de önerilebilir. Çalışmada ele alınan tüm türlerde misel gelişimi için 25 °C sıcaklığın en iyi sonucu verdiği ve 20 °C sıcaklık uygulamasından da buna çok yakın sonuçlar elde edildiği saptanmıştır. Bununla birlikte 30 °C sıcaklık uygulaması misel gelişimi için her üç tür için de uygun bulunmamıştır. *T. terreum* türünde 30 °C’de misel gelişimi hiç olmamıştır. Çalışmada ele alınan pH 4.0 değeri dışındaki, tüm pH değerlerinde misel gelişimi bakımından birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Misel gelişimi için besin ortamında C kaynağı olarak *L. controversus* türü için mannitol, *L. pyrogalus* türü için mannitol ve glikoz, *T. terreum* için ise dekstroz, ksiloz ve maltozun kullanımı en iyi sonucu vermiştir. Çalışmada ele alınan mantar türlerinin misel gelişimi için N kaynağı olarak ise malt ekstrat, pepton ve maya ekstratın kullanılmasının uygun olduğu belirlenmiştir.

L. controversus türünde torf ortamının, *L. pyrogalus* ve *T. terreum* mantar türlerinde ise torf:vermikülit (1:4) ortamının vejetatif inokulum için en uygun ortamlar oldukları tespit edilmiştir.

Çalışmada fındık (*Corylus avellana*) ile ektomikorizal ilişkisi bulunan *L. pyrogalus* türünün farklı inokulumlarının fındık fidanlarına değişik yöntemler ile inokule edilerek ektomikoriza oluşumu ve fidan gelişimine etkisi belirlenmiştir. Bitki inokulasyonu çalışmalarında 15 farklı uygulama denenmiş, 3 aylık inkübasyon döneminin sonunda yapılan inceleme sonucunda mikorizal gelişim tespit edilmiştir. İnokulasyon uygulamalarının bitki gelişimine etkisi bakımından farklılıklar tespit edilmiştir.

Kapalı mikorizal sistemde BAF sıvı besin ortamı ile nemlendirilen saf misel kültürlerinin kullanıldığı O ve açık mikorizal sistemde MMN sıvı besin ortamı ile nemlendirilen 83.3 ml vejetatif inokulumun kullanıldığı G inokulasyon uygulaması dışındaki, diğer inokulasyon uygulamalarında ektomikorizanın fidan gelişimi üzerinde olumlu yönde etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Bitki gelişimi için açık mikorizal sistemde Terme izolatının ve 50 ml vejetatif inokulumun kullanıldığı, şekersiz MMN besin ortamı ile nemlendirilen I ve destile su ile nemlendirilen K inokulasyon uygulamalarının en iyi sonucu verdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada fındık (*Corylus avellana*) ile ektomikorizal ilişkisi bulunan *L. pyrogalus* türünün mikorizal durumu laboratuvar koşullarında deneysel olarak ilk kez araştırılmıştır. *L. pyrogalus* mikorizasının turuncu renkli ve basit dallanmış olduğu, ayrıca mikorizal köklerin kısa, kalın, yüzeyinin düz, parlak ve fungal örtü ile kaplı olduğu ve tipik *Lactarius* mikorizasına benzediği belirlenmiştir.

Mikorizal köklerin kimyasallara (% 15 KOH, % 70 etanol, % 15 FeSO₄ ve laktik asit) reaksiyonu incelenmiş ve renk değişimleri belirlenmiştir. Doğal ortamdan izole edilen ve *in vitro*'da sentezlenen *L. pyrogalus* mikorizasında % 70'lik etanol kullanıldığında köklerde renk değişimi olmazken, % 15'lik KOH'ta kuvvetli

koyulaşma, laktik asitte hafif koyulaşma ve % 15'lik FeSO_4 'te ise renkte açılma ve kök uçlarında siyahlaşma meydana gelmiştir.

Çalıştığımız ektomikorizal türlerde ve farklı türlerde ektomikoriza oluşumu ve inokulasyon çalışmalarının daha detaylı olarak yapılması gerekmektedir. Elde edilen mikorizal fidanların dış ortam koşullarında da ektomikoriza oluşumunu sağlamak ve mikorizal oluşumunu geliştirmek, değişen çevresel koşulların mikorizal gelişime etkisini belirlemek, diğer toprak altı organizmalarıyla ve rekabetçi türlerle onların ilişkilerini izlemek, mantarın istediği optimum iklim ve toprak koşullarını tespit etmek, ektomikorizal fidanlardan oluşan plantasyonları kurmak ve mantar oluşumunu başlatmak için gerekli faktörleri tespit etmek amacıyla bu alanda önemli çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Yenilebilir ektomikorizal mantarlar sadece lezzetli besinler değil, aynı zamanda doğadan onları toplayan ve yetiştiriciliğini yapan kişiler için de önemli bir gelir kaynağıdır. Bu mantar türlerinin kültüre alınması özellikle orman alanlarının yeniden ağaçlandırılma çalışmalarına ve yatırım gücü olmayan küçük aile işletmeleri ile orman köylüsüne yeni iş imkânları yaratarak, ülke ekonomisine önemli katkılar sağlayacaktır. Bunun yanı sıra ele aldığımız türler arasında özellikle fındık ile ektomikorizal ilişkisi olan *L. pyrogalus* türü son yıllarda oldukça azalmıştır. Bu durum büyük oranda aşırı toplama ve fındık bahçelerindeki azotlu gübreleme gibi tarımsal uygulamaların etkisinden kaynaklanmaktadır. Adı geçen türler üzerindeki aşırı toplama baskısının azaltılması, gerekli koruma tedbirlerinin alınması ve bunların çoğaltılması ile tür çeşitliliğimizin korunması büyük önem taşımaktadır. Bu araştırma ülkemizde ektomikorizal mantarların kültüre alınması konusunda yapılmış başlangıç niteliğinde bir çalışmadır. Bu çalışma ülkemizde gelecekte değişik yenilebilir ektomikorizal mantar türlerinin ticari anlamda yetiştiriciliği konusunda yapılacak çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

Ekolojik açıdan doğal dengenin korunmasında önemli bir role ve bitki gelişimi üzerinde olumlu etkilere sahip olan ektomikorizal mantarların topraklarımızdaki potansiyelinin belirlenmesi, ektomikorizal mantarların bitki yararına kullanılmasına yönelik bilimsel çalışmaların yapılması, elde edilen sonuçların uygulamaya aktarılması ülkemiz tarımı ve ormancılığı açısından önemli katkılar sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Abbott, L.K., Robson, A.D., 1981. Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: effect of inoculum type. *Australian J. Agric. Res.*, 32, 631-639.
- Agerer R., 1987-1998. *Color Atlas of Ectomycorrhizae*. 1st-11th edn. Einhorn, Schwäbisch Gmünd. Munich.
- Agerer, R., Danielson, R.M., Egil, S., Ingleby, K., Luoma, D., Treu, R., 1996-1998. *Description of Ectomycorrhizae*. 1st-3rd edn. Einhorn, Schwäbisch Gmünd.
- Akın, V., 2001. Samsun İli Bafra, Ondokuz Mayıs ve Tekkeköy İlçelerindeki Tarım Alanlarından İzole Edilen Patojen *Rhizoctonia* İzolatları Üzerine Patojen Olmayan *Rhizoctonia* İzolatların Biyokontrol Etkisi. Yüksek Lisans Tezi (Basılmamış), Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 60s. Samsun.
- Akitsu, N., Hattori, T., Seo, G.S., Ohta, A., Shimada, M., 2000. A possible role of oxalate produced in the symbiotic culture system with a host plant *Pinus densiflora* and a mycorrhizal fungus *Lactarius hatsudake*. *Wood Res.*, 87, 13-14.
- Alves, J.R., Souza, O., Podlech, P.A.S., Giachini, A.J., Oliveira, V.L., 2001. Effect of ectomycorrhizal inoculum produced by solid state fermentation on growth of *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36(2), 307-313.
- Anonymous, 2009a. <http://www.agromantar.com/zehirlimantarlar.html> (Ulaşım tarihi: 10.01.2009).
- Anonymous, 2009b. The Microbial World: Mycorrhizas. (Produced by J. Deacon). <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/mycorrh.htm> (Ulaşım tarihi: 10.01.2009).
- Anonymous, 2009c. Ectomycorrhizal Fungi. <http://www.nifg.org.uk/ecto.htm>. (Ulaşım tarihi: 10.01.2009).
- Anonymous, 2009d. Chemical Reactions. http://pfc.cfs.nrcan.gc.ca/biodiversity/ecto/glossary/chemical_e.html. (Ulaşım tarihi: 10.01.2009).
- Arnold, E., 1991. Decline of ectomycorrhizal fungi in Europe. *Agric. Ecosyst. & Environ.*, 35, 209-244.
- Baar, J., Comini, B., Elferink, M.O., Kuyper, T.W., 1997. Performance of four ectomycorrhizal fungi on organic and inorganic nitrogen sources. *Mycol. Res.*, 101, 523-529.
- Baar, J., Horton, T.R., Kretzer, A.M., Bruns, T.D., 1999. Mycorrhizal colonization of *Pinus muricata* from resistant propagules after a stand-replacing wildfire. *New Phytologist*, 143(2), 409-418.
- Bagyaraj, D.J., Manjunath, A., Govida, V.S., 1998. Mycorrhizal inoculation effect on marigold, egg plant and citrus in an Indian soil. *J. Soil Biol. Ecol.*, 8, 98-103.
- Becerra, A., Daniele, G., Domínguez, L. Nouhra, E., Horton, T., 2002. Ectomycorrhizae between *Alnus acuminata* H.B.K. and *Naucoria escharoides* (Fr.:Fr.) Kummer from Argentina. *Mycorrhiza*, 12, 61-66.
- Becerra, A., Benken, L., Pritsch, K., Daniele, G., Schlöter, M., Agerer, R., 2005. Anatomical and molecular characterization of *Lactarius* aff. *omphaliformis*, *Russula alnijorullensis* and *Cortinarius tucumanensis* ectomycorrhizae on *Alnus acuminata*. *Mycologia*, 97(5), 1047-1057.

- Begonia, G.B., Begonia, M.F.T., Robinson, A., 1996. Effects of boron and an ectomycorrhizal fungus on growth and carbon partitioning in shortleaf pine. *J. Miss. Acad. Sci.*, 41(3), 131-135.
- Bencivenga, M., Donnini, D., Tanfulli, M., Guiducci, M., 1995. Tecnica di campionamento delle radici e degli radicali per valutazione delle piante micorrizate. *Mic. Ital.*, 2, 35-47.
- Bencivenga, M., 1998. Ecology and cultivation of *Tuber magnatum* Pico. In *Proceedings of the First International Meeting on Ecology, Physiology and Cultivation of Edible Mycorrhizal Mushrooms*, 3-4 July 1998, Uppsala, Sweden,
- Berman, J.T., Bledsoe, C.S., 1998. Soil transfers from valley oak (*Quercus lobata* Nee) stans increase ectomycorrhizal diversity and alter root and shoot growth on valley oak seedlings. *Mycorrhiza*, 7, 223-235.
- Biermann, B., Linderman, R.G., 1983. Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist*, 95(1), 97-105.
- Boa, E., 2002. How do local people make use of wild edible fungi? Personal narratives from Malawi. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. In *Proceedings of the 2nd International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, Christchurch, New Zealand, 3-6 July 2001.
- Borchers, J.G., Perry, D.A., 1992. The influence of soil texture and aggregation on carbon and nitrogen dynamics in southwest Oregon forests and clearcuts. *Can. J. Forest Res.*, 22, 298-305.
- Bougher, N.L., Grove, T.S., Malajczuk, N., 1990. Growth and phosphorus acquisition of karri (*Eucalyptus diversicolor* F. Muell) seedling inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. *New Phytologist*, 114, 237-244.
- Boyle, C.D., Gunn, K.L., Robertson, W.J., 1984. Development of methods for the production of mycelial slurry inoculum. *Proceedings of the 6th North American Conference on Mycorrhizae*, Oregon, pp. 225.
- Branzanti, M.B., Rocca, E., Pisi, A., 1999. Effect of ectomycorrhizal fungi on chestnut ink disease. *Mycorrhiza*, 9(2), 103-109.
- Brundrett, M.C., 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. In: Macfayden A., M. Begon, A.H. Fitter (eds.) *Advances in Ecological Research*, vol 21. Academic Press, London, pp. 171-313.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., Malajczuk, N., 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. *Australian Center for International Agricultural Research*, pp. 374.
- Brunner, I., Brodbeck, S., 2001. Response of mycorrhizal Norway spruce seedlings to various nitrogen loads and sources. *Environmental Pollution*, 114, 223-233.
- Brunner, I., 2004. Fungi in Forest Ecosystems Systematics, Diversity and Ecology In: Cripps C.L. (ed.), *The New York Botanical Garden*, USA, pp. 235-242.
- Cairney, J.W.G., Chambers, S.M., 1999. *Ectomycorrhizal fungi: key genera in profile*. Springer, Berlin.

- Cairney, J.W.G., 2000. Evolution of mycorrhiza systems. *Naturwissenschaften*, 87, 467-475.
- Castellano, M.A., Molina, R., 1989. Mycorrhizae. In: Landis, T.D., R.W. Tinus, S.E. McDonald, J.P. Barnett (eds.). *The Biological Components: Nursery Pests and Mycorrhizae*. In: ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. The container tree nursery manual. pp. 101-171, Washington.
- Castellano, M.A., 1990. Outplanting Performance of Mycorrhizal Inoculated Seedlings: a Review. In: *Proceedings of the Eighth North American Conference on Mycorrhizae*, pp. 49.
- Castellano, M.A., 1994. Current status of outplanting studies using ectomycorrhiza-inoculated forest trees. In: Pflieger F.L., R.G. Linderman (eds) *Mycorrhizae and Plant Health*. AP, St. Paul, Minn, pp. 261-281.
- Castellano, M.A., 1996. Outplanting performance of mycorrhizal inoculated seedlings. Invited chapter In: Mukerji K.G. (ed.). *Concepts in Mycorrhizal Research*. Kluwer Academic Publishers B.V., The Netherlands, pp. 223-301.
- Chalot, M., Brun, A., 1998. Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiol Rev.*, 22, 21-44.
- Chang, S.T., 1993. Mushroom biology: the impact on mushroom production and mushroom products. In: S.T. Chang et al. (eds.) *Proceedings of the First International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products 23-26 August 1993*. The Chinese University Press, Chinese University of Hong Kong. pp. 3-20.
- Chen, Y.L., Kang, L.H., Dell, B., 2006. Inoculation of *Eucalyptus urophylla* with spores of *Scleroderma* in a nursery in south China: Comparison of field soil and potting mix. *Forest Ecology and Management*, 222(1-3), 439-449.
- Cherfas, J., 1991. Disappearing mushrooms: another mass extinction? *Science*, 254, 1458.
- Chevalier, G., Dupre, C., 1990. Recherche et experimentation sur la truffe et la trufficulture en France. In *Atti del Secondo Congresso Internazionale sul Tartufo* In: Bencivenga M., B. Granetti (eds.), 157-166, Comunita Montana dei Monti Martani del Serano, Spoleto, Italy.
- Chevalier, G., Frochot, H., 1997. La ma_trise de la culture de la truffe. *Rev. For. Fr.* XLIX:201-213.
- Chevalier, G., 1998. The truffle cultivation in France: assessment of the situation after 25 years of intensive use of mycorrhizal seedlings. In *Proceedings of the First International Meeting on Ecology, Physiology and Cultivation of Edible Mycorrhizal Mushrooms*, Uppsala, Sweden, 3-4 July 1998.
- Chevalier, G., 2002. The cultivation of the Burgundy truffle. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. In *Proceedings of the 2nd International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, Christchurch, New Zealand, 3-6 July 2001.
- Chu-Chou, M., 1979. Mycorrhizal fungi of *Pinus radiata* in New Zealand. *Soil Biol. Biochem.*, 11, 557-562.

- Cripps C.L., 2001. Mycorrhizal Fungi of Aspen Forests: Natural Occurrence and Potential Applications. In: Shepperd W., D. Binkley, D.L. Bartos, T.J. Stohlgren, L.G. Eskew (eds.) Sustaining Aspen in Western Landscapes. USDA For. Serv. Proc. RMRS-P-18 pp. 285-298.
- Danell, E., 1994. Formation and growth of the ectomycorrhiza of *Cantharellus cibarius*. Mycorrhiza, 5, 89-97.
- Danell, E., 1997. Les progrès dans la maîtrise de la culture de la chanterelle, *Cantharellus cibarius*. Rev For Fr XLIX: 214-221.
- Danell, E., Camacho, F.J., 1997. Successful cultivation of the golden chanterelle. Nature, 385, 303.
- Danell, E., 1999. *Cantharellus*. Ectomycorrhizal Fungi, Key Genera in Profile. In: Cairney J.W.G., S.M. Chambers (eds.), Chapter 10, pp. 253-267.
- Danell, E., 2002. Current research on chanterelle cultivation in Sweden. In: Hall I., Y. Wang, E. Danell, A. Zambonelli (eds.) Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Crop & Food Research, Christchurch, pp. 1-4.
- Danielson, R.M., 1984. Ectomycorrhizal associations in Jack Pine stand in Northeastern Alberta. Can. J. Bot., 62, 932-939.
- Danielson, R.M., Visser, S., Parkinson, D., 1984. Production of ectomycorrhizae on container-grown jack pine seedlings. Can. J. For. Res., 14(1), 33-36.
- Daza, A., Manjon, J.L., Camacho, M., Romero de la Osa, L., Aguilar, A., Santamaria, C., 2006. Effect of carbon and nitrogen sources, pH and temperature on *in vitro* culture of several isolates of *Amanita caesarea* (Scop.:Fr.) Pers. Mycorrhiza, 16(2), 133-136.
- Deacon, J.W., Fleming, L.V., 1992. Interactions of ectomycorrhizal fungi. In: Allen M.J. (ed) Mycorrhizal functioning. An integrative plant-fungal process. Chapman & Hall, New York, pp 249-300.
- De Araújo, A.A., Hannibal, L., Plassard, C., Mousain, D., Roussos, S., 1998. Growth physiology of ectomycorrhizal fungi on solid media. "Ecology, Physiology and Cultivation of Edible Mycorrhizal Mushrooms" SLU (Swedish University of Agricultural Sciences), July 3-4, Uppsala, Sweden.
- De Araújo, A.A., Roussos, S., 2002. A technique for mycelial development of ectomycorrhizal fungi on agar media. Applied Biochemistry and Biotechnology, 98(1-3), 311-318.
- De La Cruz, R.E., 1998. The Potentials of Mycorrhizal Technology In Mitigating Climate Change, International Conference on Tropical Forests and Climate Change, Malesia.
- Debaud, J.C., Gay, G., 1987. *In vitro* fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. New Phytologist, 105(3), 429-435.
- Debaud, J.C., Marmeisse, R.M., Gay, G., 1995. Intraspecific genetic variation in ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza, pp. 79-113.
- Demiralay, İ., 1993. Toprak Fiziksel Analizleri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 143, 13-19, Erzurum.

- Dickie, I.A., Koide, R.T., Stevens, C.M., 1998. Tissue density and growth response of ectomycorrhizal fungi to nitrogen source and concentration. *Mycorrhiza*, 8, 145-148.
- Duddridge, J.A., 1986a. The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. III. Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevillei* (Klotzsch) Sing. and 11 species of ectomycorrhizal hosts *in vitro* in the absence of exogenous carbohydrates. *New Phytol.*, 103, 457-464.
- Duddridge, J.A., 1986b. The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. IV. Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevillei* (Klotzsch) Sing. and a number of ectomycorrhizal hosts *in vitro* in the presence of exogenous carbohydrate. *New Phytol.*, 103, 465-471.
- Eltrop, L., 1993. Role of Ectomycorrhiza in the Mineral Nutrition of Norway Spruce Seedlings (*Picea abies* (L.) Karst.), Verlag Ulrich E. Grauger, Wendlingen, pp. 167.
- Eltrop, L., Marschner, H., 1996. Growth and mineral nutrition of non-mycorrhizal and mycorrhizal Norway spruce (*Picea abies*) seedlings grown in semi-hydroponic sand culture. I. Growth and mineral nutrient uptake in plants supplied with different forms of nitrogen. *New Phytol.*, 133, 469-478.
- Espigol, R., 1999. Estado actual del cultivo de *Lactarius deliciosus*. In: Colinas C., C. Fischer (eds.), Cultivo de hongos comestibles micorrízicos, Publicaciones Universidad de Lleida, pp. 125-130.
- Eto, S., 1990. Cultivation of the pine seedlings infected with *Tricholoma matsutake* by use of *in vitro* mycorrhizal synthesis. *Bull. Hiroshima Pre. For. Exp. Sta.* 24, 1-6. (In Japanese with English Summary).
- Fassi, B., Fontana, A., 1969. Sintesi micorrizica tra *Pinus strobus* e *Tuber maculatum*. II. Sviluppo dei semenzali trapiantati e produzione di ascocarpi. *Allionia*, 15, 115-120.
- Ferry, B.W., Das, N., 1968. Carbon nutrition of some mycorrhizal *Boletus* species. *Trans Br Mycol. Soc.*, 51, 795-798.
- Finlay, R.D., Frostegard, A., Sonnerfeldt, A.M., 1992. Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl. ex Loud. *New Phytologist*, 120(1), 105-115.
- Fleming, L.V., Deacon, J.W., Last, F.T., 1986. Ectomycorrhizal succession in a Scottish birch wood. In: Gianinazzi-Pearson V., S. Gianinazzi (eds.) Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. INRA, Paris, pp. 259-263.
- Flores, R., 2003. *Lactarius* Sección Dapetes y *Boletus* Grupo *edulis*. Micorrización y estudio filogenético. Doctoral Thesis. Ined. University of Murcia, Spain.
- Flores, R., Díaz, G., Honrubia, M., 2005. Mycorrhizal synthesis of *Lactarius indigo* (Schw.) Fr. with five Neotropical pine species. *Mycorrhiza*, 15, 563-570.
- Fortin, J.A., Pichd, Y., Godbout, C., 1983. Methods for synthesizing ectomycorrhizas and their effects on mycorrhizal development. *Plant Soil*, 71, 275-284.

- France, R.C., Reid, C.P.P., 1983. Interactions of nitrogen and carbon in the physiology of ectomycorrhizae. *Can. J. Bot.*, 61, 964-984.
- France, R.C., Reid, C.P.P., 1984. Pure culture growth of ectomycorrhizal fungi on inorganic nitrogen sources. *Microbial Ecology*, 10(3), 187-195.
- Fries, N., 1979. Germination of spores of *Cantharellus cibarius*. *Mycologia*, 71, 216-219.
- Fries, N., 1987. The third benefactors' lecture: ecological and evolutionary aspects of spore germination in the higher basidiomycetes. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 88, 1-7.
- Fujita, H., Fujita, T., Ito, T., 1990. Study on cultivation technique of *Lyophyllum shimeji* using infected tree seedling. Annual Report of the Forestry Experimental Station, Kyoto prefecture, pp. 35.
- Gagnon, J., Langlois, C.G., Bouchard, D., Le Tacon, F., 1995. Growth and ectomycorrhizal formation of container-grown Dou-glas-fir seedlings inoculated with *Laccaria bicolor* under four levels of nitrogen fertilization. *Can. J. For. Res.*, 21, 966-973.
- Garraway, O. M., Evans, C.R., 1984. Fungal nutrition, and physiology. New York. Toronto. Singapore: John Wiley.
- Gibson, F., Deacon, J.W., 1990. Establishment of ectomycorrhizas in aseptic culture: effects of glucose, nitrogen and phosphorus in relation to successions. *Mycol. Res.*, 94, 166-172.
- Godbout, C., Fortin, J.A., 1990. Cultural control of basidiome formation in *Laccaria bicolor* with container-grown white pine seedlings. *Mycol. Res.*, 94, 1051-1058.
- Goodman, D.M, Dural, D.M, Trofymow, J.A., Berch, S., 1996-1998. Concise Descriptions of North American Ectomycorrhizae, 1st-4th edn. Mycologue, Sydney, Canada.
- González-Ochoaa, A.I., Herasa, J., Torresb, P., Sánchez-Gómez, E., 2003. Mycorrhization of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Aiton seedlings in two commercial nurseries. *Ann. For. Sci.*, 60, 43-48.
- Göbl, F., 1975. Erfahrungen bei der Anzucht von Mykorrhiza-Impfmaterial. *Cbl. Gesamte Forstwesen*, 92, 227-237.
- Griffin, D.H. 1994. Fungal Physiology (2nd ed). New York: Wiley Liss.
- Guerin-Laguette, A., Mousain, D., Conventi, S., Ruiz, G., 1998. Ecological competence and competitiveness of *Lactarius deliciosus* isolates assessed in laboratory conditions. 2nd International Conference on Mycorrhiza, Uppsala, Sweden, 5-10 July 1998.
- Guerin-Laguette, A., Plassard, C., Mousain, D., 2000. Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the Saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Can. J. Microbiol.*, 46(9), 790-799.
- Guerin-Laguette, A., Conventi, S., Ruiz, G., Plassard, C., Mousain, D., 2003. The ectomycorrhizal symbiosis between *Lactarius deliciosus* and *Pinus sylvestris* in forest soil samples: symbiotic efficiency and development on roots of a rDNA

- internal transcribed spacer-selected isolate of *L. deliciosus*. *Mycorrhiza*, 13(1), 17-25.
- Guerin-Laguette, A., Shindo, K., Matsushita, N., Suzuki, K., Lapeyrie, F., 2004. The mycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake* stimulates *Pinus densiflora* seedling growth *in vitro*. *Mycorrhiza*, 14, 397-400.
- Günay, İ., 2005. Tarsus Karabucak Ormanlarındaki Okaliptüs ve Fıstıkçamların Kölerinde Mutualistik Olarak Yaşayan Ektomikorizal Fungusların Belirlenmesi. Doktora Tezi. (Basılmamış), Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 50 s. Adana.
- Gür, K., Uyanöz, R., Akın, N., Özkan, V.K., 1993. Vesiküler-arbüsküler mikorizanın Konya yöresi topraklarındaki dağılımı üzerine bir araştırma. 8. Kükem Kong. (20-22 Eylül 1993), Ankara.
- HacsKaylo, E., Palmer, J.G., Bozo, J.A., 1965. Effect of temperature on growth and respiration of ectotrophic mycorrhizal fungi. *Mycologia*, 57, 748-756.
- Hagerberg, D., Thelin, G., Wallander, H., 2003. The production of ectomycorrhizal mycelium in forests: Relation between forest nutrient status and local mineral sources. *Plant and Soil*, 252(2), 279-290.
- Haktanır, K., Arcaç, S., 1997. Toprak Biyolojisi Ders Kitabı. A.Ü. Ziraat Fak. Yay. No: 447, Ankara.
- Hall, I.R., Lyon, A.J.E., Wang, Y., Sinclair, L., 1998. Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies. 2. *Boletus edulis*. *Econ. Bot.*, 52, 44-56.
- Hall, I.R., Wang, Y., 1998a. Methods for cultivating edible ectomycorrhizal mushrooms. In: Varma A. (ed.) *Mycorrhiza manual*. Springer, Berlin Heidelberg, New York, 99-114.
- Hall, I.R., Wang, Y., 1998b. Commercial production of *Tuber melanosporum* in New Zealand. Abstracts of the Second International Conference on Mycorrhiza. Uppsala, Sweden, 5-10 July, pp. 77-78.
- Hall, I.R., Wang, Y., 2002. Truffles and other edible mycorrhizal mushrooms - some new crops for the Southern Hemisphere. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. In *Proceedings of the 2nd International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, Christchurch, New Zealand, 3-6 July 2001.
- Hall, I.R., Wang, Y., Danell, E., Zambonelli, A., 2002. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. *Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, CD-ROM, New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited.
- Hall, I.R., Stephenson, S., Buchanan, P., Wang, Y., Cole, A.L.J., 2003a. Edible and poisonous mushrooms of the world. Timber Press, Portland, Oreg.
- Hall, I.R., Yun, W., Amicucci, A., 2003b. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends In Biotechnology*, 21(10), 433-438.
- Harris, M., Jurgensen, M., 1977. Development of *Salix* and *Populus* mycorrhizae in metallic mine tailings. *Plant Soil*, 47, 509-517.
- Harley, J.C., 1969. *The Biology of Mycorrhizae*, Leonard Hill, 2nd edition, London.

- Harley, J.L., Smith, S.E., 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London, pp. 483.
- Hartley, J., Cairney, J.W.G., Sanders, F.E., Meharg, A.A., 1997. Toxic interactions of metal ions (Cd^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} and Sb^{-3}) on *in vitro* biomass production of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 137, 551-562.
- Harvey, L.M., 1991. Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi. *Biotechnol Adv.*, 9(1), 13-29.
- Hatakeyama, T., Ohmasa, M., 2004. Mycelial growth of strains of the genera *Suillus* and *Boletinus* in media with a wide range of concentrations of carbon and nitrogen sources. *Mycoscience*, 45, 169-176.
- Hatat, G., Bozoğlu, H., Pekşen, A., 1999. Mikorizanın bitkisel üretim açısından önemi. Karadeniz Bölgesi Tarım Sempozyumu. Bildiriler, Cilt 2, O.M.Ü. Ziraat Fakültesi Araştırma Seri No: 5, 657-666.
- Hatch, A.B., Doak, K.D., 1993. Pure Culture Inoculation of *Pinus strobus*. *J. Arnold Arbor*, 14, 85-99.
- Hattori, T., Akitsu, N., Seo, G.S., Ohta, A., Shimada, M., 2000. Mechanisms for Ectomycorrhizae Synthesis. (Part I). The Production of Organic Acids during the Symbiotic Cultivation of *Pinus densiflora* Associated with *Lactarius hatsudake*. Annual Report of Interdisciplinary Research Institute of Environmental Sciences, 18, 121-127.
- Helm, D., Carling, D., 1990. Use of on-site mycorrhizal inoculum for plant establishment on abandoned mined lands. Bureau of Mines contract report. Palmer, Alaska.
- Heilmann-Clausen, J., Verbeken, A., Vesterholt, J., 2000. The Genus *Lactarius*. Fungi of Northern Europe. In: Laessle J.H. Petersen, S.A. Elborne (eds.), Vol. 2, Denmark.
- Honrubia, M., Gutierrez, A., Morte, A., 2002. Desert truffle plantation from south-east Spain. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. In Proceedings of the 2nd International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Christchurch, New Zealand, 3-6 July 2001.
- Högberg, M.N., Högberg, P., 2002. Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the extractable dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist*, 154, 791-796.
- Hu, H.T., 1994. Study on the relationship between *Pinus taiwanensis* and *Tricholoma matsutake*. (I) Semi-aseptic mycorrhizal synthesis of *Tricholoma matsutake* and *Pinus taiwanensis*. *Q. J. Exp. For. Natl. Taiwan Univ.*, 8, 47-54.
- Hung, L., Trappe, J.M., 1983. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH *in vitro*. *Mycologia*, 75, 234-241.
- Hutchison, L.J., 1999. *Lactarius*. In: Cairney J.W.G., S.M. Chamber (eds.), Ectomycorrhizal Fungi Key Genera In Profile. Chapter 11, 269-285.

- Hutchison, L.J., Piche, Y., 1995. Effects of exogenous glucose on mycorrhizal colonization *in vitro* by early-stage and late-stage ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.*, 73, 898-904.
- Ingleby, K., Mason, P.A., Last, F.T., Fleming, L.V., 1990. Identification of Ectomycorrhizas, HMSO, London.
- Ingestad, T., Arveby, A.S., Jahr, M., 1986. The influence of ectomycorrhiza on nitrogen nutrition and growth of *Pinus sylvestris* seedlings. *Physiol. Plant*, 68, 575-582.
- Isaac, S., 1992. Fungal Plant Interactions. Chapman and Hall, London, UK, pp. 418.
- Iwase, K., 1997. Cultivation of mycorrhizal mushrooms. *Food Rev. Int.*, 13, 431-442.
- Jackson, M.L., 1962. Soil Chemical Analysis. Prentice Hall. Inc., New York.
- Jonathan, S.G., Fasidi, I.O., Ajayi, E.J., 2004. Physico-Chemical studies on *Volvariella esculenta* (Mass) Singer, a Nigerian edible fungus. *Food Chemistry*, 85, 339-342.
- Jumpponen, A., Trappe, J.M., 1998. Performance of *Pinus contorta* inoculated with two strains of root endophytic fungus *Phialocephala fortinii*: effects of resynthesis system and glucose concentration. *Can. J. Bot.*, 76, 1205-1213.
- Kacar, B., 1994. Bitki ve Toprağın Kimyasal Analizleri. Ankara Üni. Zir. Fak. Eğitim, Araş. ve Gel. Vak. Yay. No: 3.
- Kagan-Zur, V., 2002. *Tuber melanosporum* research in Israel. In Edible Mycorrhizal Mushrooms and Their Cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, CD-ROM. In: Hall I.R. et al. (eds.), New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited.
- Kawai, M., Abe, S., 1976. Studies on the artificial reproduction of *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. I. Effects of carbon and nitrogen sources in media on the vegetative growth of *T. matsutake*. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 17, 159-167.
- Kawai, M., Ogawa, M., 1976. Studies on the artificial reproduction of *Tricholoma matsutake* (S. Ito. et Imai) Sing. IV. Studies on a seed culture and a trial for the cultivation on solid media. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 17, 499-505.
- Kawai, M., 1997. Artificial ectomycorrhizal formation on roots of air-layered *Pinus densiflora* saplings by inoculation with *Lyophyllum shimeji*. *Mycologia*, 89, 228-232.
- Keller, G., 1996. Utilization of inorganic and organic nitrogen sources by high-subalpine ectomycorrhizal fungi of *Pinus cembra* in pure culture. *Mycol. Res.*, 100, 989-998.
- Kibar, B., Pekşen, A., 2007. Ektomikorizanın tarım ve ormancılık bakımından önemi OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 22(2), 232-238.
- Kim, H.O., Lim, J.M., Joo, J.H., Kim, S.W., Hwang, H.J., Choi, J.W., Yun, J.W., 2005. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresour. Technol.*, 96, 1175-1182.
- Kropp, B.R., Mueller, G.M., 1999. *Laccaria*. In: Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profile. In: Cairney J.W.G., S.M. Chambers (eds.). Springer, 65-88, New York.

- Kumar, S., Satyanarayana, T., 2002. Production of Inoculum of Ectomycorrhizal Fungi. Techniques in Mycorrhizal Studies. In: Mukerji K.G., C. Manoharacahary, B.P. Chamola, J. Singh (eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 143-166.
- Lakhanpal, T.N., 2000. Ectomycorrhiza-An Overview. Mycorrhizal Biology. In: Mukerji K.G., B.P. Chamola, J. Singh (eds.), Kluwer Academic, 101-118.
- Lamb, R.J., Richards, B.N., 1971. Some mycorrhizal fungi of *Pinus radiata* and *P. elliottii* var. *elliottii* in Australia. Trans Br Mycol. Soc., 54, 371-378.
- Lamb, R.J., 1974. Effects of D-glucose on utilization of single carbon sources by ectomycorrhizal fungi. Trans. Br. Mycol. Soc., 63, 295-306.
- Landeweert, R., Hoffland, E., Roger, D., Finlay, R.D., Kuyper, T.W., Bremen, N., 2001. Linking plants to rocks, ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(5), 248-254.
- Lee, K.J., Koo, C.D., 1983. Inoculation of Pines in a Nursery with *Pisolithus tinctorius* and *Thelephora terrestris* in Korea. Plant and Soil, 71, 325-329.
- Lefevre, C., Hall, I.R., 2001. In the global status of truffle cultivation. Proceedings of the Fifth International Congress on Hazelnut (556). In: Mehlenbacher S.A. (ed.), Acta Hortic., pp. 513-520.
- Le Page, B.A., Currah, R.S., Stockey, R.A., Rothwell, G.W., 1997. Fossil ectomycorrhizae from the Middle Eocene. Am. J. Bot., 84, 410-412.
- Lilleskov, E.A., Fahey, T.J., Horton, T.R., Lovett, G.M., 2002. Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. Ecology, 83, 104-115.
- Lu, X., Malajczuk, N., Dell, B., 1998. Mycorrhiza formation and growth of *Eucalyptus globulus* seedlings inoculated with spores of various ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza, 8(2), 81-86.
- Mahony, C.P., 2005. Effects of native ectomycorrhizal fungi on aspen seedlings in greenhouse studies: inoculation methods, fertilizer regimes, and plant uptake of selected elements in smelter-impacted soils. Master of Science. Montana State University Bozeman, Montana State University, pp. 259.
- Malajczuk, N., Molina, R., Trappe, J.M., 1982. Ectomycorrhizal formation in *Eucalyptus*. I. Pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with *Pinus radiata*. New Phytol., 91, 467-482.
- Marmeisse, R., Gryta, H., Jargeat, P., Fraissinet-Tachet, L., Gay, G., Debaud, J.C., 1999. *Hebeloma*. In: Cairney J.W.G., S.M. Chamber (eds.) Ectomycorrhizal fungi: Key genera and profile. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 89-128.
- Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of High Plants. Second Edition. Academic Press London.
- Marx, D.H., Bryan, W.C., Cordell, C.E., 1976. Growth and ectomycorrhizal development of pine seedlings in nursery soils infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. Forest Science, 22(1), 91-100.
- Marx, D.H., Artman, J.D., 1978. Growth and Ectomycorrhizal Development of Loblolly pine Seedlings in Nursery Soil Infested with *Pisholithus tinctorius* and

- Thelephora terrestris* in Virginia. USDA Forest Service Research Note, SE-256, pp. 4.
- Marx, D.H., 1979a. Synthesis of *Pisholithus* Ectomycorrhizae on Pecan Seedlings in Fumigated Soil. USDA Forest Service Research Note, SE-283, pp. 4.
- Marx, D.H., 1979b. Synthesis of *Pisolithus* Ectomycorrhizae on White Oak Seedlings in Fumigated Soil. USDA Forest Service Research Note, SE-280, pp. 4.
- Marx, D.H., Kenny, D., 1982. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. Ch. in methods and principles of mycorrhizal research. The American Phytopathological Society, St Paul, Minn., pp. 131-146.
- Marx, D.H., Bell, W., 1985. Formation of *Pisolithus* ectomycorrhizae on loblolly pine seedlings with spore pellet inoculum applied at different times. U.S.D.A For. Serv. Res. Pap. SE-249.
- Marx, D.H., Cordell, C.E., Maul, S.B., Ruehle, J.L., 1989. Ectomycorrhizal development on pine by *Pisolithus tinctorius* in bare-root and container seedling nurseries. *New Forests*, 3(1), 57-66.
- Marx, D.H., Maul, S.B., Cordell, C.E., 1992. Application of specific ectomycorrhizal fungi in world forestry. In: Leatham G.F. (ed.) *Frontiers in Industrial Mycology*. Chapman and Hall, New York, pp. 78-98.
- McLaughlin, D.J., 1970. Environmental control of fruit body development in *Boletus rubinellus* in axenic culture. *Mycologia*, 62, 307-331.
- Melin, E., Norkrans, B., 1948. Amino acids and the growth of *Lactarius deliciosus* (L.) *Fr. Physiol. Plant*, 1, 176-184.
- Meotto, F., Pellegrino, S., Bounous, G., 1998. Evolution of *Amanita caesarea* (scop.: fr.) Pers. and *Boletus edulis* Bull.: Fr. synthetic ectomycorrhizae on European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) seedlings under field conditions. *II International Symposium on Chestnut*, 19-23 Oct 1998, Bordeaux, France.
- Miles, P.G., 1999. Biological Background for Mushroom Breeding, In: Genetics and Breeding of Edible Mushrooms. In: Chang S.T., J.A. Buswell, P.G. Miles (eds.), Gordon and Breach Science Publishers, 37-64.
- Molina, R., 1979. Ectomycorrhizal inoculation of containerized Douglas-fir and lodgepole pine seedlings with six isolates of *Pisolithus tinctorius*. *Forest Sci.*, 25, 585-590.
- Molina, R., 1980. Ectomycorrhizal inoculation of containerized western conifer seedlings. U.S.D.A., For. Serv., Res. Note PNW-357.
- Molina, R., Palmer, J.G., 1982. Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: Schenck N.C. (ed) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. American Phytopathology Society, St. Paul, Minn, pp. 115-119.
- Molina, R., Trappe, J.M., 1982. Pattern of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific northwest conifers and fungi. *Forest Sci.*, 28, 423-458.
- Molina, R., Trappe, J.M., 1994. Biology of the ectomycorrhizal genus *Rhizopogon*. I. Host associations, host-specificity and pure culture synthesis. *New Phytol.*, 126, 653-675.

- Morte, A., Lovisolo, C., Schubert, A., 2000. Effect of drought stress on growth and water relations of the mycorrhizal association *Helianthemum almeriense*-*Terfezia clavaryi*. *Mycorrhiza*, 10, 115-119.
- Moser, M., 1958. Die künstliche Mykorrhizaimpfung an Forstpflanzen. I. Erfahrungen bei der Reinkultur von Mykorrhizapilzen. *Forstw. Cbl.*, 77, 32-40.
- Murata, Y., 1993. Cultural characteristics of *Suillus grevillei* and *S. laricinus*. *Bull Hokkaido For Res. Inst.* 30, 74-87.
- Nara, K., 2005. Ectomycorrhizal Networks and Seedling Establishment During Early Primary Succession. *New Phytologist*, 169, 169-178.
- Nezzar-Hocine, H., Perin, R., Hallihargas, R., Chevalier, G., 1998. Ectomycorrhizal associations with *Cedrus atlantica* (Endl) Manetti ex Carriere. I. Mycorrhizal synthesis with *Tricholoma tridentinum* Singer var. *cedretorum* Bon. *Mycorrhiza*, 8(1), 47-51.
- Niemi, K., Scagel, C., Haggman, H., 2004. Application of ectomycorrhizal fungi in vegetative propagation of conifers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 78(1), 83-91.
- Norkrans, B., 1950. Studies in growth and cellulolytic enzymes of *Tricholoma*. *Symb. Bot. Upsal.*, 11, 1-126.
- Norkrans, B., 1953. The effect of glutamic acid, aspartic acid, and related compounds on the growth of certain *Tricholoma* species. *Physiol. Plant*, 6, 584-593.
- Norland, M., 1993. Soil factors affecting mycorrhizal use in surface mine reclamation. Bureau of mines information circular. United States Department of the Interior.
- Nunez, J.A.D., Serrano, J.S., Barreal, H.A.R., Gonzales, J.A.S.O., 2006. Ectomycorrhizal status of norway spruce seedlings from bare-root forest nurseries. *Forest Ecology and Management*, 231, 226-233.
- Ogawa, M., Hamada, M., 1975. Primordia formation of *Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing. in pure culture. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 16, 406-415.
- Ohta, A., 1994a. Production of fruit-bodies of a mycorrhizal fungus, *Lyophyllum shimeji*, in pure culture. *Mycoscience*, 35, 147-151.
- Ohta, A., 1994b. Some cultural characteristics of mycelia of a mycorrhizal fungus, *Lyophyllum shimeji*. *Mycoscience*, 35, 83-87.
- Ohta, A., 1997. Ability of ectomycorrhizal fungi to utilize starch and related substrates. *Mycoscience*, 38, 403-408.
- Ohta, A., 1998. Fruit-body production of two ectomycorrhizal fungi in the genus *Hebeloma* in pure culture. *Mycoscience*, 39, 15-19.
- Olivier, J.M., Guinberteau, J., Rondet, J., Mamoun, M., 1997. Vers l'inoculation contrôle des champignons et bolets comestibles?. *Rev. For Fr* XLIX:222-234.
- Olivier, J.M., 2000. Progress in the cultivation of truffles. In *Mushroom Science XV: Science and Cultivation of Edible Fungi* (Vol. 2) Balkema, 937-942.
- Osonubi, O., Mulongoy, K., Awotoye, O.O., Atayese, M.O., Okali, D.U.U., 1991. Effects of ectomycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on drought tolerance of four leguminous woody seedlings. *Plant and Soil*, 136(1), 131-143.

- Özçelik, E., G. Şahin, A. Pekşen, 2004. Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinin bazı yenen ve tıbbi mantar türleri. Türkiye VII. Yemeklik Mantar Kongresi (22-25 Eylül 2004), 128-139, Korkuteli, Antalya.
- Pacioni, G., Comandini, O., 2000. *Tuber*. In Ectomycorrhizal Fungi: Key Genera in Profile. In: Cairney J.W.G., S.M. Chambers (eds.). Springer Verlag, pp. 63-186.
- Palmer, J.G., Hacskeylo, E., 1970. Ectomycorrhizal fungi in pure culture. I. Growth on single carbon sources. *Physiol. Plant*, 23, 1187-1197.
- Palmer, J.G., 1971. Techniques and procedures for culturing ectomycorrhizal fungi. Pages 162-144. In: Hacskeylo E. (ed.). *Mycorrhiza*. USDA Misc. Publ. 1189. pp. 255.
- Parlade, J., Alvarez, I.F., Pera, J., 1995. Ability of native ectomycorrhizal fungi from northern Spain to colonize Douglas-fir and other introduced conifers. *Mycorrhiza*, 6(1), 51-55.
- Parlade, J., Alvarez, I.F., Pera, J., 1996. Ability of native ectomycorrhizal fungi from northern Spain to colonize Douglas-fir and other introduced conifers. *Mycorrhiza*, 3, 93-96.
- Parlade, J., Pera, J., Luque, J., 2004. Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P. sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions. *Mycorrhiza*, 14(3), 171-176.
- Pekşen, A.U., Hatat, G., Erper, İ., 1999. Bazı doğa mantarları ve *Pleurotus sajor-caju* (Lev.) Sing.'nın misel gelişimine farklı ortam ve uygulamaların etkisi. O.M.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 14(3), 44-53.
- Pekşen, A., Karaca, G.H., 2000a. Hacıosman ormanı (Samsun) makromantarları. *Ot Sistematik Botanik Dergisi*, 7(1), 211-218.
- Pekşen, A., Karaca, G.H., 2000b. Samsun ili ve çevresinde saptanan yenilebilir mantar türleri ve bunların tüketim potansiyeli. Türkiye VI. Yemeklik Mantar Kongresi (20-22 Eylül 2000), 100-111, Bergama, İzmir.
- Pekşen, A., Karaca, G., 2003. Macrofungi of Samsun province. *Turk. J. Bot.*, 27(3), 173-184.
- Pekşen, A., Kibar, B., 2007. Yenilebilir ektomikorizal mantarların yetiştiriciliği ve bu konuda yapılan çalışmalar. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 22(2), 239-247.
- Pekşen, A., Kibar, B., Yakupoğlu, G., 2007. Yenilebilir bazı *Lactarius* türlerinin morfolojik özelliklerinin, protein ve mineral içeriklerinin belirlenmesi. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 22(3), 301-305.
- Pera, J., Alvarez, I.F., Rincon, A., Parlade, J., 1999. Field performance in northern Spain of Douglas-fir seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 9(2), 77-84.
- Peterson, R.L., Massicotte, H.B., Melville, L.H., 2004. *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. NRC Research Press, CABI Publishing, Ottawa, pp. 173.
- Phillips, R., 1994. *Mushrooms and Other Fungi of Great Britain & Europe*. New Interlitho S. P. A., Milan, pp. 288.
- Pillukat, A., 1996. *Lactarius salmonicolor* R. Heim & Leclair+*Abies alba* Mill. Descr. *Ectomycorrhiza*, 1, 59-64.

- Pilz, D., Norvell, L., Danell, E., Molina, R., 2003. Ecology and management of commercially harvested chanterelle mushrooms. USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-567.
- Poitou, N., Mamoun, M., Ducamp, M., Delmas, J., 1984. After *Boletus granulatus*, *Lactarius deliciosus* fructification is obtained in the field from inoculated plants. PHM Revue Horticole, 244, 65-68.
- Quoreshi, A.M., Timmer, V.R., 1998. Exponential fertilization increases nutrient uptake and ectomycorrhizal development of black spruce seedlings. Can. J. For. Res.-Rev. Can. Rech. For., 28(5), 674-682.
- Ramanankierana, N., Ducousso, M., Rakotoarimanga, N., Prin, Y., Thioulouse, J., Randrianjohany, E., Ramaroson, L., Kisa, M., Galiana, A., Duponnois, R., 2007. Arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas of *Uapaca bojeri* L. (Euhorbiaceae): Sporophore diversity, patterns of root colonization, and effects on seedling growth and soil microbial catabolic diversity. Mycorrhiza, 17, 195-208.
- Rangel-Castro, J.I., Danell, E., Taylor, A.F.S., 2002. Use of different nitrogen sources by the edible ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. Mycorrhiza, 12, 131-137.
- Reddy, M.S., Natarajan, K., 1997. Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. Mycorrhiza, 7(3), 133-138.
- Redecker, D., Kodner, R., Graham, L.E., 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. Science, 289, 1920-1921.
- Repac, I., 1996. Inoculation of *Picea abies* (L.) Karst. seedlings with vegetative inocula of ectomycorrhizal fungi *Suillus bovinus* (L.:Fr.) Kuntze and *Znocybe lacer-u* (Fr.) Kumm. New Forests, 12, 41-54.
- Repac, I., 2007. Ectomycorrhiza formation and growth of *Picea abies* seedlings inoculated with alginate-bead fungal inoculum in peat and bark compost substrates. Forestry, 80(5), 517-530.
- Reyna, S., Rodriguez Barreal, J.A., Folch, L., Pérez-Badía, R., Domínguez, A., Saiz-De-Omecana, J.A., Zazo, J., 2002. Techniques for inoculating mature trees with *Tuber melanosporum* Vitt. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. In Proceedings of the 2nd International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Christchurch, New Zealand, 3-6 July 2001.
- Richards, F.A., 1965. Chemical observations in some anoxic, sulfide-bearing basins and fjords In Proceedings of the Second International Water Pollution Research Conference.
- Rietveld, W.J., Sharp, R.A., Kienzler, M.F., Dixon, R.K., 1989. Development of ectomycorrhizae on container-grown. European larch. Tree Planters' Notes, 40(2), 12-17.
- Riffle, J., Maronek, D., 1982. Ectomycorrhizal inoculation procedures for greenhouse and nursery studies. Ch. in methods and principles of mycorrhizal research. The American Phytopathological Society. pp. 147-156.
- Riffle, J.W., Maronek, D.M., 1991. Ectomycorrhizal inoculation procedures for greenhouse and nursery studies. In: Methods and Principles of Mycorrhizal Research. In: Schenck N.C. (ed.), APS Press, St. Paul, Minnesota.

- Rincón, A., Álvarez, I.F., Pera, J., 1999. Ectomycorrhizal fungi of *Pinus pinea* L. in northeastern Spain. *Mycorrhiza*, 8, 271-276.
- Rincón, A., Álvarez, I.F., Pera, J., 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 11(6), 265-271.
- Rowell, D.L., 1996. *Soil Science Methods and Applications*. Wesley Longman Limited, Harlow. ISBN 0 582 087848.
- Sanchez, D.M., 1994. Survival of arbuscular mycorrhizal plants in drying soil. In: Azcon-Aguilar C., J.M. Barea (eds.), *Mycorrhizas in Integrated Systems From Genes to Plant development* Proceedings of the Fourth European Symposium on Mycorrhizas, 11-14 July, Granada, pp. 407-412.
- Sanchez, F., Honrubia, M., Torres, P., 2000. Cultural characteristics of some ectomycorrhizal fungi in pure culture. *Rev Iberoam Micol.*, 17(4), 127-134.
- Sanchez, F., Honrubia, M., Torres, P., 2001. Effects of pH, water stress and temperature on *in vitro* cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. *Mycologie*, 22(4), 243-258.
- Sangtiewan, T., Schmidt, S., 2002. Growth of subtropical ECM fungi with different nitrogen sources using a new floating culture technique. *Mycological Research*, 106(1), 74-85.
- Santiago-Martínez, G., Estrada-Torres, A., Varela, L., Herrera, T., 2003. Growth on seven nutritive media and *in vitro* synthesis of one strain of *Laccaria bicolor*. *Agrociencia*, 37(6), 575-584.
- Sarjala, T., 1999. Effect of organic and inorganic nitrogen sources on endogenous polyamines and growth of ectomycorrhizal fungi in pure culture. *Mycorrhiza*, 8, 277-281.
- Shaw, P.J.A., Lankey, K., Jourdan, A., 1996. Factors affecting yield of *Tuber melanosporum* in a *Quercus ilex* plantation in southern France. *Micol. Res.*, 100, 1176-1178.
- Shresta, G., 2002. Performance of *Pinus roxburghii* inoculated with Pure Culture of Four Indigenous Ectomycorrhizal Fungi. 7th International Mycological Congress, Oslo.
- Shu, C.H., Lung, M.Y., 2004. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. *Process Biochem.*, 39(8), 931-937.
- Sieverding, E., 1991. *Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems*. Technical Cooperation- Federal Republic of Germany.
- Singer, R., 1986. *The Agaricales in modern taxonomy*. (981 pp.) Koeltz Scientific Books, Koenigstein, Germany.
- Sisti, D., Giomaro, G., Rossi, I., Ceccaroli, P., Citterio, B., Stocchi, V., Zambonelli, A., Benedetti, P.A., 1998. *In vitro* mycorrhizal synthesis of micropropagated *Tilia platyphyllos* Scop. plantlets with *Tuber borchii* Vittad. mycelium in pure culture. *Acta Hort.*, 457, 379-387.
- Smith, S.E., Read, D.J., 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Second Edition, Academic Press., London, UK.

- Souza, L.A.B., Filho, G.N.S., Oliveira, V.L., 2004. Efficiency of ectomycorrhizal fungi on phosphorus uptake and eucalypt growth promotion. *Pesq. Agropec. Bras.*, 39(4), 349-355.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S., 1995. Principles of fermentation technology, Butterworth Heinemann, Oxford, UK.
- Stenström E., Unesmat, T., 1985. Survival and growth of container-grown and bare-root shortleaf pine seedlings with *Pisolithus tinctorius* and *Thelephora terrestris* ectomycorrhizas. *South. J. Appl.*, 5, 20-24.
- Straatsma, G., Konings, R.N.H., Griensven, L.J.L.D. van, 1985. A strain collection of the mycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius* obtained by germination of spores and culture of fruit body tissue. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 85(4), 689-697.
- Straatsma, G., Griensven, L.J.L.D. van, 1986. Growth requirements of mycelial cultures of the mycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 87(1), 135-141.
- Sundari, K.S., Adholeya, A., 2003. Growth profile of ectomycorrhizal fungal mycelium: emphasis on substrate pH influence. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83(3), 209-214.
- Suzuki, A., 1979. General review on environmental factors affecting primordium formation in Homobasidiaceae. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 20, 253-265.
- Sylvia, D.M., Hammond, L.C., Bennett, J.M., Haas, J.H., Linda, S.B., 1993. Field response of maize to VAM fungus and water management. *Agron. J.*, 85, 193-198.
- Thomson, B.D., Grove, T.S., Malajczuk, N., Hardy, G.E.S.J., 1994. The effectiveness of ectomycorrhizal fungi in increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labill in relation to root colonization and hyphal development in soil. *New Phytologist*, 126(3), 517-524.
- Torres, P., 1992. Estudio de las micorrizas de pino carrasco (*Pinus halepensis* Miller), Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, Murcia.
- Torres, P., Honrubia, M., 1994. Ectomycorrhizal associations proven for *Pinus alepensis*. *Isr. J. Plant Sci.*, 42, 51-58.
- Treseder, K.K., Masiello, C.A., Lansing, J.L., Allen, M.F., 2004. Species-specific measurements of ectomycorrhizal turnover under N-fertilization: combining isotopic and genetic approaches. *Oecologia*, 138(3), 419-425.
- Trudell, S., 2002. Fall mushrooms, fungus robbers, and a definition revisited. *Mycorrhizas, Part 5. Mushrooms: the Journal of Wild Mushroom Collecting*, 20, 11-16.
- Turjaman, M., Tamai, Y., Segah, H., Limin, S.H., Osaki, M., Tawaray, K., 2006. Increase in early growth and nutrient uptake of *Shorea seminis* seedlings inoculated with two ectomycorrhizal fungi. *J. Trop. Forest Sci.*, 18(4), 243-249.
- Tüfekçi, S., 2007. Doğal Populasyonlardaki Toros Sediri (*Cedrus libani* A. Rich.) Mikorizasının İzole Edilmesi ve Çoğaltılıp Fidan Üretiminde Kullanılması. Doktora Tezi (Basılmamış), Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 179s, Adana.

- Xu, M.L., Zhu, J.J., Kang, H.Z., Xu, A.H., Zhang, J.X., Li, F.Q., 2008. Optimum conditions for pure culture of major ectomycorrhizal fungi obtained from *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantations in southeastern Keerqin sandy lands, China. *J. Forestry Res.*, 19(2), 113-118.
- Vaario, L.M., Tanaka, M., Gill, Y.I.W., Suzuki, K., 1999. *In vitro* ectomycorrhiza formation between *Abies firma* and *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza*, 9, 177-183.
- Varma, A., 1998. *Mycorrhiza manual*. Springer, Berlin Heidelberg New York. pp. 542.
- Vicente, J.G., Conway, J., Roberts, S.J., Taylor, J.D., 2001. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. *Phytopathology*, 91, 492-499.
- Walker, C., 1984. Mycorrhizal Growth Enhancement In Sitka Spruce Seedlings Differs in Nonsterile Compared to Sterilized Soil, *Proceedings of 6th North American Conference on Mycorrhizae*, June 25-29, 1984, Oregon, pp. 213.
- Wallander, H., Nylund, J.E., 1991. Effects of excess nitrogen on carbohydrate concentration and mycorrhizal development of *Pinus sylvestris* L. seedlings. *New Phytol.*, 119, 405-411.
- Wang, Y., 1995. *Tricholoma matsutake*. PhD thesis, University of Otago, Dunedin, New Zealand.
- Wang, Y., Hall, I.R., Evans, L.A., 1997. Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies 1. *Tricholoma matsutake* and related fungi. *Econ. Bot.*, 51, 311-327.
- Wang, Y., Zambonelli, A., Hall, I.R., 1998. *Boletus edulis* in New Zealand. 2nd International Conference on Mycorrhizae, Uppsala, Sweden, 5-10 July 1998.
- Wang, B., 2000. A study on the cultivation of edible mycorrhizal fungi *in vitro*. Development and Research Centre of Edible Fungi, Sichuan Academy of Agricultural Sciences. Chengdu 610066, Sichuan, China.
- Wang, Y., Hall, I.R., Dixon, C., Stephen, M., 2001. Potential for the cultivation of *Lactarius deliciosus* (L.:Fr.) S.F. Gray in New Zealand. Third International Conference on Mycorrhizas 8-13th July (inclusive) 2001, Adelaide Convention Centre, Adelaide, Australia.
- Wang, Y., Hall, I.R., 2002. The cultivation of *Lactarius deliciosus* and *Rhizopogon rubescens* (shoro) in New Zealand. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. In *Proceedings of the 2nd International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, Christchurch, New Zealand, 3-6 July 2001.
- Wang, Y., Bunchanan, P., Hall, I.R., 2002a. A list of edible ectomycorrhizal mushrooms. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. In *Proceedings of the 2nd International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, Christchurch, New Zealand, 3-6 July 2001.
- Wang, Y., Hall, R.I., Dixon, C., 2002b. The cultivation of *Lactarius deliciosus* (saffron milk cap) and *Rhizopogon rubescens* (shoro) in New Zealand. In *Edible Mycorrhizal Mushrooms and their Cultivation*, *Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, CD-ROM. In: Hall I.R. et al. (eds.), New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited.

- Wang, Y., Hall, I.R., Dixon, C., Hance-Holloy, M., Strong, G., Barclay, C., 2003. Potential of cultivation of *Lactarius deliciosus* (saffron milk cap) in NZ. In Proceedings of the 3rd International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Victoria, British Columbia, Canada, 3-6 August 2003.
- Wang, Y., Hall, R., 2004. Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Can. J. Bot.*, 82(8), 1063-1073.
- Wang, J.C., Hu, S.H., Liang Z.C., Yeh, C.J., 2005. Optimization for the production of water soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 759-766.
- Yamaç M., Özbulut, N., Koban, A., 2008. Farklı Besi Ortamlarının Yenebilir Makrofungus İzolatlarının Misel Gelişimi Üzerine Etkisi. Türkiye VIII. Yemeklik Mantar Kongresi (15-17 Ekim 2008), Kocaeli.
- Yamada. A., Katsuya, K., 1995. Mycorrhizal association of isolates from sporocarps and ectomycorrhizas with *Pinus densiflora* seedlings. *Mycoscience*, 36, 315-323.
- Yamada, A., Maeda, K., Ohmasa, M., 1999. Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* isolates on seedlings of *Pinus densiflora* *in vitro*. *Mycoscience*, 40, 455-463.
- Yamada, A., Ogura, T., Ohmasa, M., 2001a. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by *in vitro* mycorrhizal synthesis I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. *Mycorrhiza*, 11(2), 59-66.
- Yamada, A., Ogura, T., Ohmasa, M., 2001b. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by *in vitro* mycorrhizal synthesis II. Morphology of mycorrhizas in open-pot soil. *Mycorrhiza*, 11, 67-81.
- Yamada, A., Ogura, T., Ohmasa, M., 2002. Cultivation of some Japanese edible ectomycorrhizal mushrooms. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. In Proceedings of the 2nd International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Christchurch, New Zealand, 3-6 July 2001.
- Yamada, A., Kobayashi, H., Ogura, T., Fukada, M., 2007. Sustainable fruit-body formation of edible mycorrhizal *Tricholoma* species for 3 years in open pot culture with pine seedling hosts. *Mycoscience*, 48, 104-108.
- Zak, B., 1969. Characterization and classification of douglas-fir mycorrhizae. Proceedings of the First North American Conference on Mycorrhizae, April 1969, USDA For Serv. Misc. Publ., 1189, 38-53.
- Zambonelli, A., Lotti, M., Giomaro, G., Hall, I.R., Stocchi, V., 2002. *Tuber borchii* cultivation: an interesting perspective. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. In Proceedings of the 2nd International Conference on Edible mycorrhizal Mushrooms, Christchurch, New Zealand, 3-6 July 2001.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Beyhan KİBAR

Doğum Yeri : KASTAMONU

Doğum Tarihi : 09.08.1978

Medeni Hali : Evli

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : İhsangazi Lisesi, 1995

Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi-1999

Yüksek Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü-2003

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Araş. Gör: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/ 2000-2003

Ziraat Yük. Müh.: Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü/ 2003-

İletişim Bilgileri : Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

Gelemen/SAMSUN