DOI: https://doi.org/10.30546/19023.978-9952-8553-5-7.2025.6087.
ISBN : 978-9952-8553-5–7

HOHENBUEHELIA PETALOIDES (BULL.) SCHULZER TÜRÜNÜN METANOLİK EKSTRAKTININ DNA KESME ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Kulthoom Abbas Jassam[1*], Prof. Dr. Mehmet Gökhan HALICI[1], Arş. Gör. Dr. Mithat GÜLLÜ[1],

[1]Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kayseri, TÜRKİYE
ORCID Kodu:
0009-0005-1552-7555 (Kulthoom Abbas Jassam)
0000-0001-2345-6789 (Mehmet Gökhan HALICI)
0000-0001-7100-9609 (Mithat GÜLLÜ)

Özet

Makromantarlar, doğada geniş bir yayılıma sahip olan ve çeşitli biyoteknolojik, tıbbi ve ekolojik öneme sahip organizmalardır. Türkiye, makromantar çeşitliliği açısından zengin bir floraya sahiptir ve son yıllarda bu alandaki araştırmalar artmıştır. Özellikle tıbbi ve endüstriyel açıdan önemli türlerin biyoaktif bileşenleri üzerine yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir.

Bu çalışmada, *Hohenbuehelia petaloides* (Bull.) Schulzer türünden elde edilen metanolik ekstraktın DNA kesme etkisi araştırılmıştır. Mantar ekstraktı ile plazmid DNA arasındaki etkileşim, agaroz jel elektroforezi yöntemiyle belirlenmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan mantar ekstraktlarına 3 µl plazmid DNA (0.5 µg/ml) eklenerek, karışımlar 37°C'de karanlık ortamda 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, örnekler yükleme tamponu ile karıştırılarak %1 agaroz jel üzerinde 60 V'ta 2 saat boyunca elektroforeze tabi tutulmuştur.

Çalışmada, mantar ekstraktının DNA heliksinde oluşturabileceği olası konformasyonel değişiklikler araştırılmıştır. pBR322 DNA üzerindeki kesme etkisini değerlendirmek için, süper sarmallı pBR322 DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılması sağlanmıştır. DNA kesilme ürünleri elektroforez ile ayrıştırıldıktan sonra etidyum bromür boyaması uygulanarak analiz edilmiştir. Süper sarmallı pBR322'nin açık dairesel ve lineer formdaki dönüşümleri gözlemlenerek kesilme kontrolü sağlanmıştır. Elektroforez sırasında, en hızlı hareket eden yapı süper sarmallı form (Form I) olurken, tek iplik kesildiğinde açık dairesel form (Form II) oluşmuş, her iki ipliğin kesildiği durumlarda ise lineer form (Form III) meydana gelmiştir.

Bu araştırma, makromantar türlerinden elde edilen biyoaktif bileşiklerin genetik materyal üzerindeki potansiyel etkilerini anlamak adına önemli bir katkı sağlamaktadır. Türkiye'deki makromantar biyoçeşitliliği göz önüne alındığında, bu tür çalışmaların, tıbbi ve biyoteknolojik uygulamalara yönelik yeni doğal kaynaklar keşfetmede önemli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Hohenbuehelia petaloides,* makromantarlar, DNA kesilme etkisi, agaroz jel elektroforezi, pBR322 DNA.

DOI: https://doi.org/10.30546/19023.978-9952-8553-5-7.2025.6087.
10th International Azerbaijan Congress on Life, Engineering, Mathematical, and Applied Sciences || Congress Proceedings Book
ISBN : 978-9952-8553-5–7

INVESTIGATION OF DNA CLEAVAGE EFFECT OF METHONOLIC EXCTRACT FROM *HOHENBUEHELIA PETALOIDES* (BULL.) SCHULZER

Abstract

Macrofungi are widely distributed organisms that play significant roles in biotechnology, medicine, and ecology. Turkey is rich in macrofungal diversity, and research in this field has increased in recent years. Studies focusing on bioactive compounds of medicinal and industrially significant species have attracted considerable attention.

In this study, the DNA cleavage effect of the methanolic extract derived from *Hohenbuehelia petaloides* (Bull.) Schulzer was investigated. The interaction between the fungal extract and plasmid DNA was determined using agarose gel electrophoresis. Plasmid DNA (3 µl, 0.5 µg/ml) was added to 30 µl of fungal extracts prepared at different concentrations, and the samples were incubated at 37°C in the dark for 24 hours. Gels were stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml) and visualized using an imaging system. The experiments were conducted in triplicate. This study examined the potential conformational changes in the DNA helix induced by the fungal extract. To assess the cleavage function on pBR322 DNA, the supercoiled pBR322 DNA was analyzed using agarose gel electrophoresis. DNA cleavage products were electrophoretically separated and analyzed following ethidium bromide staining. The DNA cleavage process was evaluated by monitoring the transition of supercoiled pBR322 DNA into its open circular and linear forms. During electrophoresis, the supercoiled form (Form I) migrated the fastest, while single-strand cleavage resulted in the open circular form (Form II), which moved more slowly. When both strands were cleaved, the linear form (Form III) appeared, migrating between Form I and Form II.

This research provides valuable insights into the potential genetic effects of bioactive compounds derived from macrofungal species. Considering Turkey's macrofungal biodiversity, such studies are crucial for identifying new natural resources for medical and biotechnological applications.

Keywords: *Hohenbuehelia petaloides,* macrofungi, DNA cleavage effect, agarose gel electrophoresis, pBR322 DNA.

GİRİŞ

Yenilebilir mantarlar, antik çağlardan beri insan beslenmesinin bir parçası olmuştur (Öztürk ve Çopur, 2009). İlk çağlardaki topluluklar, deneme-yanılma yöntemiyle yenilebilir ve zehirli türleri birbirinden ayırt ederek mantarlar hakkında bilgi edinmişlerdir (Smith ve ark., 2002). Mantarlar besin değeri açısından oldukça önemli olup düşük kalori içeriğine sahip olmalarının yanı sıra, temel amino asitler, karbonhidratlar, lif, hayati vitaminler ve mineraller açısından zengindir. Ayrıca, Doğu ülkelerinde mantarlar yüzyıllardır tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır (Öztürk ve Çopur, 2009). Tıbbi mantarların kökeni geleneksel Doğu terapilerine dayanmakta olup, Japonya, Çin, Kore gibi Uzak Doğu ülkeleri ile diğer Asya ülkeleri, kurutulmuş mantar materyallerini modern klinik uygulamalara güvenle dahil etmeye devam etmektedir (Manzi ve ark., 1999). Makrofungusların tıbbi kullanımı Asya bölgelerinde

DOI: https://doi.org/10.30546/19023.978-9952-8553-5-7.2025.6087.
ISBN : 978-9952-8553-5–7

uzun bir geçmişe sahip olmasına karşın, Batı ülkelerinde bu kullanım son 25 yıl içinde önemli ölçüde yaygınlaşmıştır (Kalyoncu ve ark., 2010).

Genellikle tıbbi mantarlar, toz haline getirilerek veya sıcak su ekstraktları hazırlanarak terapötik uygulamalarda kullanılır. Bunun yanı sıra, bu değerli mantarlar sıvı ekstreler veya kurutulmuş ve toz haline getirilmiş kapsüller şeklinde değerlendirilerek sağlık açısından birçok fayda sağlayabilmektedir (Çolak, 2010). Yapılan çalışmalar, mantar kapsüllerinin, ister sıvı konsantre ister kuru toz formunda olsun, sağlıklı bir yaşam tarzını desteklemek amacıyla güvenle beslenme düzenine dahil edilebileceğini göstermektedir (Chang, 1999).

Mantarlar, proteinler, polisakkaritler (örneğin polisakkarit-K, polisakkarit peptid ve lentinan), sekonder metabolitler (örneğin terpenler, alkaloidler ve laktonlar) ve enzimler (örneğin laktaz, glikoz oksidaz ve peroksidaz) gibi terapötik biyoaktif bileşikler açısından oldukça zengin kaynaklardır. Ayrıca, mantarlar fenolik bileşikler, flavonoidler, tokoferoller, askorbik asit, kinonlar, terpenoidler ve fenil propanoid türevleri gibi çeşitli antioksidan bileşikler sentezleme kapasitesine sahiptir. Makrofunguslar özellikle antitümör etkiler sergileyen (örneğin kalvasin, volvotoksin, flammutoksin, lentinan ve porisin bileşikleri) ve antiviral özellikler gösteren temel antioksidan bileşikleri üretme açısından önemli bir değere sahiptir (Smith ve ark., 2002).

Bu araştırma, makromantar türlerinden elde edilen biyoaktif bileşiklerin genetik materyal üzerindeki potansiyel etkilerini anlamak adına önemli bir katkı sağlamaktadır. Türkiye'deki makromantar biyoçeşitliliği göz önüne alındığında, bu tür çalışmaların, tıbbi ve biyoteknolojik uygulamalara yönelik yeni doğal kaynaklar keşfetmede önemli olduğu düşünülmektedir.

MALZEMELER VE YÖNTEMLER

Saha Çalışması ve Örneklerin Toplanması

Öncelikle belirlenen habitatlarda bulunan yenilebilir makrofungus örnekleri, doğal ortamlarında fotoğraflanarak kayıt altına alınmıştır. Aynı zamanda habitatın morfolojik özelliklerine dair gözlemler yapılmış ve bu veriler detaylı bir şekilde not edilmiştir. İncelenen morfolojik kriterler arasında şapka ve sap ölçüleri, renk, şekil, yüzey yapısı, şapkanın üzerinde velum bulunup bulunmadığı, sap üzerinde halka ve volva varlığı, et rengi, lamel rengi, yoğunluk derecesi, sapa bağlanma durumu ve varsa gözenek rengi yer almaktadır. Ayrıca, mantarın büyüklüğü, tadı, kokusu, yerel algıları, habitatın ekolojik özellikleri ve toplama tarihi gibi ek bilgiler de dikkatlice kaydedilmiştir (Şekil 1). Bu kapsamlı veri seti, tür teşhisinin doğru şekilde yapılmasını sağlamıştır (Badshah ve ark., 2012).

DOI: https://doi.org/10.30546/19023.978-9952-8553-5-7.2025.6087.
ISBN : 978-9952-8553-5–7



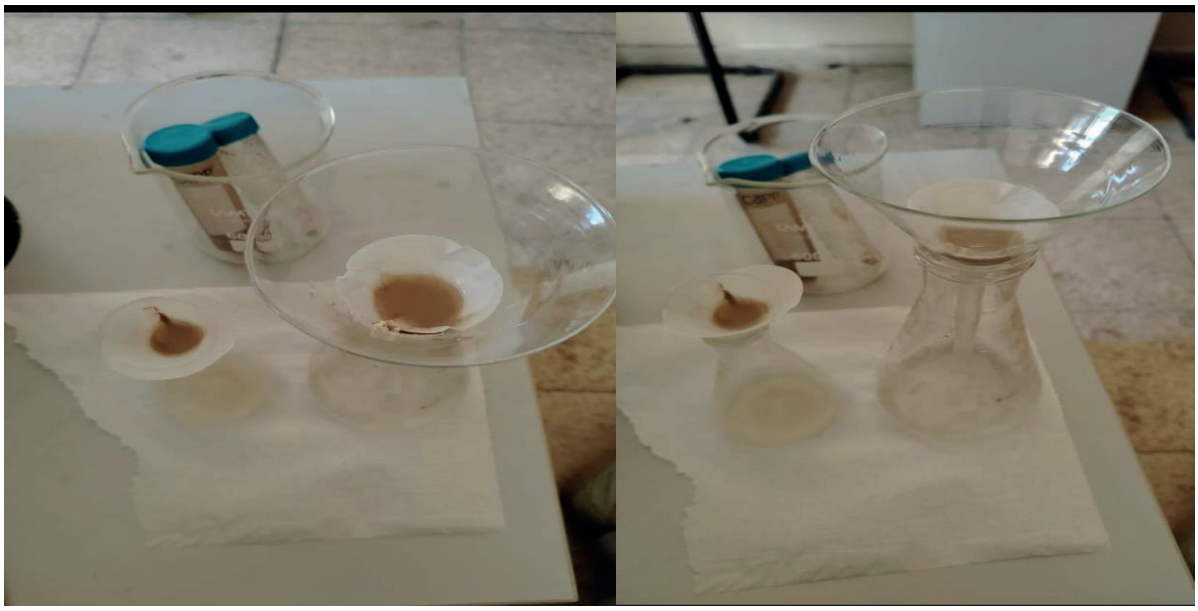
Şekil 1. *Hohenbuehelia petaloides.*

Makrofungus Ekstraktının Hazırlanması

Toplanan makrofungus türünden elde edilen örneklerden 20 g'lık toz halindeki kısım, 500 ml'lik bir şişeye yerleştirilmiştir. Daha sonra, şişeye 200 ml metanol/diklorometan (1/1) çözeltisi eklenmiş ve şişe sıkıca kapatılmıştır. Ekstraksiyon işlemi, 25 °C sıcaklıkta, 150 rpm hızla sürekli çalkalanan bir su banyosunda 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyon süreci, beyaz bantlı filtre kağıdı kullanılarak 2 aşamalı vakum filtrasyonu ile tamamlanmıştır (Şekil 2). Örnek materyalden tam verim elde edebilmek için kalan mantar posası, aynı koşullar altında iki ek ekstraksiyon aşamasına tabi tutulmuştur. Filtrasyon işlemi her 24 saatte bir olmak üzere toplamda üç kez tekrarlanmıştır. Daha sonra, elde edilen filtratlar cam şişelere aktarılmış, şişeler sıkıca kapatılmış ve +4 ºC'de saklanarak filtreleme işleminin tamamlanması sağlanmıştır (Badshah ve ark., 2012).

DOI: https://doi.org/10.30546/19023.978-9952-8553-5-7.2025.6087.
ISBN : 978-9952-8553-5–7



Şekil 2. Filtrasyon yoluyla numune çıkarma aşaması.

İşlemden sonra, elde edilen süzüntü döner buharlaştırıcı yardımıyla çözücüden uzaklaştırıldı. Balon şişede elde edilen ekstrakt miktarı hassas terazinin yardımıyla tartıldı. Elde edilen ekstrakt, +4 °C sıcaklıkta çalışan bir buzdolabında, ışıktan etkilenmeyen koyu renkli bir cam kapta saklandı.

DNA Etkileşim Çalışmaları

Makrofungus ekstraktı ile plazmid DNA arasındaki etkileşim, agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Spesifik olarak, 2 µl plazmid DNA (0.5 µg/ml) farklı konsantrasyonlardaki 20 µl makrofungus ekstraktı ile birleştirilmiştir. Daha sonra, örnekler 37 °C'de karanlık ortamda 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, 10 µl makrofungus ekstraktı-DNA karışımı yükleme tamponu ile karıştırılarak %1 agaroz jeline yüklenmiştir. Elektroforez işlemi, TAE tamponu içinde 90 V'de 1 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrası, jeller etidyum bromür (0.5 µg/ml) ile muamele edilerek görüntüleme sistemi kullanılarak görselleştirilmiştir. Deneyler üç paralel tekrar halinde yürütülmüştür (Badshah ve ark., 2012).

SONUÇLAR

***Hohenbuehelia petaloides* Metanol Ekstraktının pBR322 Plazmid DNA ile Etkileşimi**

Bu çalışma, *Hohenbuehelia petaloides* türüne ait metanol ekstraktının pBR322 plazmid DNA ile olan etkileşimini agaroz jel elektroforezi yöntemiyle araştırmayı amaçlamıştır. Dimetilformamid (DMF) içinde çözünen metanol ekstraktı seyreltilmiş ve farklı konsantrasyonlardaki ekstrakt örnekleri, TE içeren tampon içinde 1 ml plazmid DNA (0.5 mg/ml konsantrasyonunda) ile birleştirilmiştir. Daha sonra, bu karışımlar karanlık ortamda 37 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, ekstrakt-DNA karışımının üst fazından 15 µl alınarak bromofenol mavisi yükleme tamponu ile birlikte %1.5 agaroz jeline yüklenmiştir. Elektroforez işlemi, TAE tamponu (0.05 M Tris bazı, 0.05 M asetik asit, 1 mM EDTA, pH 8.0) kullanılarak 60 V'de 3 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel UV ışık altında bir luminometre kullanılarak görüntülenmiştir.

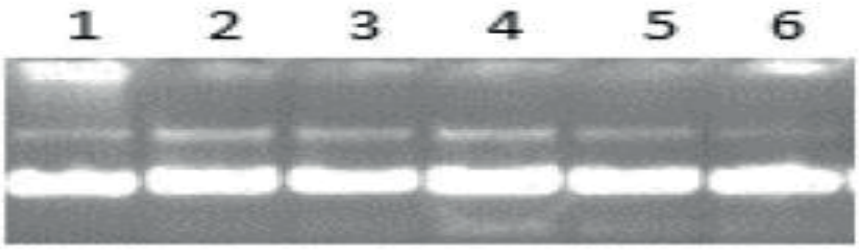
DOI: https://doi.org/10.30546/19023.978-9952-8553-5-7.2025.6087.
ISBN : 978-9952-8553-5–7

pBR322 Plazmid DNA ile Etkileşim

Bu çalışma, fungal ekstraktın DNA heliksinde meydana getirebileceği olası konformasyonel değişiklikleri araştırmıştır. *pBR322* DNA üzerindeki kesme (kırılma) fonksiyonunu değerlendirmek amacıyla, süper sarmallı *pBR322* DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılması gözlemlenmiştir. DNA kesim ürünleri elektroforetik olarak ayrıştırılmış ve etidyum bromür boyaması sonrası analiz edilmiştir.

DNA kesilme işlemi, süper sarmallı dairesel *pBR322* DNA'nın gevşeyerek açık dairesel formu (Form II) ve doğrusal formu (Form III) oluşturması ile kontrol edilmiştir. Elektroforez sırasında, en hızlı hareket eden form süper sarmallı yapı (Form I) olacaktır. Eğer DNA'nın tek zinciri kesilirse, süper sarmallı yapı gevşeyerek daha yavaş hareket eden açık dairesel formu (Form II) oluşturur. Eğer her iki zincir de kesilirse, doğrusal form (Form III) meydana gelir ve bu form, Form I ile Form II arasında bir hareket paterni sergiler.

Şekil 3, farklı konsantrasyonlardaki (5000 mM'den 78 mM'ye kadar) *pBR322* DNA'nın inkübasyonu sonrası agaroz jel elektroforetik ayrımını göstermektedir. Kontrol grubu olarak işlenmemiş *pBR322* DNA kullanılmıştır. Sonuçlar, tüm komplekslerin *pBR322* DNA üzerinde kesme aktivitesi göstermediğini ortaya koymuştur.



Şekil 3. DNA kesim çalışmalarının jel elektroforez görüntüsü. Hat 1: Kontrol (DNA); Hat 2: DNA + 5000 mM ekstrakt; Hat 3: DNA + 2500 mM ekstrakt; Hat 4: DNA + 1250 mM ekstrakt; Hat 5: DNA + 625 mM ekstrakt; Hat 6: DNA + 312.5 mM ekstrakt.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, *Hohenbuehelia petaloides* türüne ait metanolik ekstraktın *pBR322* plazmid DNA üzerindeki olası kesme etkisi agaroz jel elektroforezi yöntemiyle araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, farklı konsantrasyonlardaki ekstraktların DNA üzerinde herhangi bir kesme etkisi göstermediği belirlenmiştir. DNA kesilmesi, süper sarmallı *pBR322* DNA'nın açık dairesel ve doğrusal forma dönüşmesi ile gözlemlenebilirken, bu çalışmada tüm numunelerde süper sarmallı formun korunduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, *Hohenbuehelia petaloides* metanol ekstraktının plazmid DNA'nın yapısında belirgin bir değişime yol açmadığını göstermektedir.

DNA kesme aktivitesinin gözlemlenmemesi, ekstraktın içeriğindeki aktif bileşiklerin doğrudan DNA kesilmesine neden olan enzimatik veya kimyasal özelliklere sahip olmadığını düşündürmektedir. DNA üzerinde kesme etkisi gösteren bileşiklerin çoğunlukla oksidatif stres mekanizmaları veya spesifik endonükleaz aktivitesi ile etki ettiği bilinmektedir. Ancak, bu çalışmada kullanılan *Hohenbuehelia petaloides* ekstraktı, DNA'nın süper sarmallı yapısını değiştirecek bir mekanizma sergilememiştir. Bu durum, ekstraktın DNA kesme aktivitesinin düşük veya etkisiz olduğunu ya da test edilen koşullarda bu etkinin gözlemlenemediğini düşündürmektedir.

Çalışmanın sonuçları, literatürde yer alan bazı fungal ekstraktların DNA kesme potansiyeline sahip olduğuna dair bulgularla karşılaştırıldığında, *Hohenbuehelia petaloides* metanol ekstraktının DNA ile

DOI: https://doi.org/10.30546/19023.978-9952-8553-5-7.2025.6087.
ISBN : 978-9952-8553-5–7

doğrudan etkileşime girme kapasitesinin sınırlı olabileceğini göstermektedir. Ancak, DNA üzerindeki etkileşimler sadece kesme aktivitesi ile sınırlı olmayıp, ekstraktın DNA'ya bağlanma kapasitesi, gen ekspresyonu üzerindeki etkileri veya epigenetik düzenlemelere katkıları gibi farklı mekanizmalarla da değerlendirilmelidir. Bu nedenle, DNA üzerindeki olası etkileri anlamak için ileri spektroskopik ve kromatografik analizler ile daha detaylı moleküler çalışmalar gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada *Hohenbuehelia petaloides* metanolik ekstraktının *pBR322* DNA üzerinde belirgin bir kesme etkisi göstermediği ortaya konmuştur. Ancak, elde edilen sonuçlar yalnızca DNA kesme aktivitesini değerlendirmekte olup, ekstraktın biyolojik etkileri hakkında kapsamlı bilgi sunmamaktadır. Gelecekte, bu ekstraktın olası antimikrobiyal, antioksidan veya diğer biyolojik aktivitelerinin incelenmesi, potansiyel biyoteknolojik ve tıbbi uygulamaları açısından önemli katkılar sağlayabilir.

Sonuç

Bu çalışma, *Hohenbuehelia petaloides* türüne ait metanolik ekstraktın *pBR322* plazmid DNA üzerindeki kesme etkisini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel elektroforezi sonuçları, ekstraktın DNA üzerinde herhangi bir kesme etkisi göstermediğini ortaya koymuştur. Bu bulgu, ekstraktın DNA kesme aktivitesine sahip olmadığını veya test edilen koşullarda bu etkinin gözlemlenemediğini düşündürmektedir.

Elde edilen sonuçlar, *Hohenbuehelia petaloides*'in DNA ile doğrudan etkileşime girme kapasitesinin sınırlı olduğunu göstermektedir. Ancak, ekstraktın farklı biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi ve bileşiklerin karakterizasyonu için ileri kimyasal analizlerin yapılması gerekmektedir. Gelecekte, ekstraktın antimikrobiyal, antioksidan ve potansiyel farmakolojik etkilerinin araştırılması, biyoteknolojik ve tıbbi uygulamalar açısından önemli bilgiler sağlayabilir.

KAYNAKLAR

Badshah H, Qureshi RA, Khan J, Ullah F, Fahad S, Ullah F, Khan AM, Hussain I, Khan N 2012. Pharmacological screening of Morchella esculenta (L) Pers., Calvatia gigantea (Batsch ex Pers.) Lloyd and Astraeus hygrometricus Pers., mushroom collected from South Waziristan (FATA.). Journal of Medicinal Plants Research, 6 (10): 1853-1859.

Chang ST 1999. Global Impact of Edible and Medical Mushrooms on Human Welfare in the 21st Century: Nongreen Revulation. International Journal of Medical Mushrooms, 1(1): 1-7.

Çolak E 2010. Bazı Pleurokarpik Makrofunguslarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Kalyoncu F, Oskay M, Kayalar H 2010. Antioxidant activity of the mycelium of 21 wild mushroom species. Mycology, 1(3): 195-199.

Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V, Pizzoferrato L 1999. Nutrients in Edible Mushrooms: An Inter-species Comparative Study. Food Chemistry, 65: 477-482.

Öztürk A, Çopur ÖU 2009. Mantar bileşenlerinin teröpatik etkileri. Bahçe, 38(1), 19-24.

Öztürk M, Duru ME, Kivrak Ş, Doğan NM, Türkoglu A, Özler MA 2011. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three Agaricus species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. Food and Chemical Toxicology, 49: 1353-1360.

Smith JE, Rowan NJ, Sullivan R 2002. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. Biotechnology Letters, 24, 1839-1845.