

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN BAZI *Lecidea* LİKEN TÜRLERİNİN  
rDNA ITS BÖLGELERİNİN DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI

Esin BAŞARAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA  
2010

Her hakkı saklıdır.

## TEZ ONAYI

Esin BAŞARAN tarafından hazırlanan '**Türkiye'de Yayılış Gösteren Bazı *Lecidea* liken türlerinin rDNA ITS Bölgelerinin Dizi Analizi Yöntemi İle Tanımlanması**' adlı tez çalışması 08.02.2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Doç. Dr. E. Sümer ARAS

### **Jüri Üyeleri:**

**Başkan:** Doç. Dr. Ali ERGÜL

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü

**Üye:** Doç. Dr. İrfan KANDEMİR

Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye:** Doç. Dr. E. Sümer ARAS

Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**

**Prof. Dr. Orhan ATAKOL**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TÜRKİYE’DE YAYILIŞ GÖSTEREN BAZI *Lecidea* LİKEN TÜRLERİNİN rDNA ITS BÖLGELERİNİN DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI

Esin BAŞARAN

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. E. Sümer ARAS

Bu çalışma; ülkemizde yayılış gösteren *Lecidea* ve ilişkili liken cinslerinden olan *Lecidella*, *Porpidia* ve *Rhizocarpon* cinslerine ait bazı türlerin, rDNA (ITS) bölgelerinin, ITS 1F ileri ve ITS 4 geri primerleri kullanılarak PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yardımıyla çoğaltılması, ilgili bölgenin dizi analizi ile incelenmesi ve incelenen türler arasındaki benzerlik ve farklılıkların ortaya çıkartılması amacıyla yapılmıştır. Çalışılan türler ve Gen Bankasından dizileri alınan *Lecidea*, *Lecidella* ve *Rhizocarpon* cinslerine ait örnekler arasındaki genetik yakınlığı bulmak için oluşturulan dört farklı metot ile (UPGMA, NJ, ME, MP) filogenetik analizler yapılmıştır. Tüm filogenetik analizler sonucu elde edilen genetik ilişkiler, birbirine benzer şekilde ortaya çıkmıştır. Neighbor-Joining dendrogramı incelendiğinde, türlerin başlangıçta iki ana kola ayrıldığı, grup dışı olarak alınan tür bir kolu oluştururken, diğer türlerin ikinci kolda toplandığı gözlenmiştir. İkinci kol kendi içinde ikili dallanmalar göstermektedir. Genel olarak, aynı cinse ait türler, köke doğru tek bir dal üzerinde birleşmektedir.

**Şubat 2010, 66 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *Lecidea*, liken, moleküler taksonomi, ITS, rDNA, polimorfizm

## ABSTRACT

Master Thesis

IDENTIFICATION OF SOME *Lecidea* LICHEN SPECIES DISRIBUTED IN  
TURKEY by SEQUENCE ANALYSIS OF rDNA ITS REGION

Esin BAŞARAN

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. E. Sümer ARAS

The aim of this study is to amplify the rDNA (ITS) regions of *Lecidea* species and related genus called *Lecidella*, *Porpidia* and *Rhizocarpon*, which are widely spreaded in our country, by using ITS 1F forward and ITS 4 reverse primers with the help of PCR. The results are used to investigate the related regions by sequence analysis and to reveal the similarities and differences between the mentioned species. Some of the samples belong to *Lecidea*, *Lecidella* and *Rhizocarpon* genus were also taken from the gene bank. The phylogenetic analysis are performed with the investigated samples and also with the samples obtained from Genbank. The analysis are conducted by the help of four different methods (NJ, ME, MP, UPGMA) in order to reveal the genetic similarities between these samples and our studied samples. Genetic relationships, which are obtained according to the phylogenetic analysis, are revealed similar to each other. When we examine the Neighbor-Joining dendrogram, it is observed that species are seperated into two main branches. The species which is considered out group forms one of the branches, while the other species are collected on the other branch. Second branch divided into two branchings in itself. Generally the species which are belonged to the same genus, combined in one branch towards to the origin.

**February 2010, 66 pages**

**Key Words:** *Lecidea*, lichen, molecular taxonomy, ITS, rDNA, polymorphism

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her aşamada bana yol gösteren, bilgilerini paylaşan, her türlü destek, yardım ve ilgisini esirgemeyen, değerli hocam Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Doç. Dr. E. Sümer ARAS'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda, filogenetik analizler aşamasında benden bilgi ve desteğini esirgemeyen Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Doç. Dr. İrfan KANDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince, benden bilgisini, yardımlarını ve arkadaşlığını esirgemeyen Dr. Demet CANSARAN DUMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Kullanılan liken örneklerinin temin edilmesindeki yardımlarından dolayı Erciyes Üniversitesi Öğretim Görevlisi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Gökhan HALICI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Dostluğu, her konudaki desteğiyle, varlığını her an yanımda hissettirerek bana güç veren sevgili arkadaşım Çiğdem VARDAR'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında, benden dostluklarını ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Esra GÖKÇE ve Çiğdem DÖNMEZ'e teşekkür ederim.

Yaşantıma renk katan, varlıklarıyla bana güç veren çok sevgili arkadaşlarım Uzm. Ecz. Fatma GÜRTUNA, Canan ÇETİN, Fidan KILINÇARSLAN ve Bio. Tülay KELEŞ'e teşekkür ederim.

Ve benim gizli kahramanlarım; sevgili annem Gülcihan BAŞARAN, sevgili babam Yüksel BAŞARAN, sevgili ablam Emine BAŞARAN ERDOĞAN ve sevgili abim Uğur ERDOĞAN'a gösterdikleri karşılıksız özveri için sonsuz teşekkürler...

Esin BAŞARAN

Ankara, 2010

## İÇİNDEKİLER

|   |      |
|---|------|
| ÖZET .....  | i    |
| ABSTRACT .....  | ii   |
| TEŞEKKÜR .....  | iii  |
| SİMGELER DİZİNİ .....   | vi   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....   | vii  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....   | viii |
| 1. GİRİŞ .....  | 1    |
| 1.1 Likenlerin Sınıflandırılması .....  | 2    |
| 1.1.1 Morfolojik yapılarına göre likenler .....   | 2    |
| 1.1.1.1 Yapraksı likenler .....   | 2    |
| 1.1.1.2 Dalsı likenler .....  | 3    |
| 1.1.1.3 Kabuksu likenler .....  | 4    |
| 1.1.2 Substrat tiplerine göre likenler .....  | 4    |
| 1.1.2.1 Epifitik veya kortikol likenler .....   | 5    |
| 1.1.2.2 Saksikol likenler .....   | 5    |
| 1.1.2.3 Terrikol likenler .....   | 5    |
| 1.2 Likenlerin Üremesi .....  | 6    |
| 1.3 Likenlerin Önemi .....  | 7    |
| 1.4 <i>Lecidea</i> Cinsi .....  | 9    |
| 2. KURAMSAL TEMELLER .....  | 11   |
| 2.1 Moleküler Belirteçler .....   | 11   |
| 2.1.1 Hibridizasyona dayalı DNA belirteçleri .....  | 12   |
| 2.1.1.1 RFLP: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (Restriction<br>Fragment Length Polymorphism) ..... | 12   |
| 2.1.2 Polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı DNA belirteçleri .....   | 13   |
| 2.1.2.1 RAPD: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (Randomly<br>amplified polymorphic DNA) .....           | 13   |
| 2.1.2.2 AFLP: Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (Amplified<br>Fragment Length Polymorphism) .....    | 14   |
| 2.1.2.3 SSR: Basit dizi tekrarları (Simple Sequence Repeat) .....   | 15   |

|  |    |
|--|----|
| 2.1.2.4 ISSR: Basit dizi tekrarları arası polimorfizm (Inter Simple Sequence Repeats) .....  | 15 |
| 2.1.3 ESTs : İşaretli ifade edilen diziler (Expressed Sequence Tags) .....                   | 16 |
| 2.2 ITS: Transkribe Edilen İnternal Ara Bölgeler (Internal Transcribed Spacer) ve rDNA ..... | 16 |
| 2.2.1 ITS kullanılarak likenlerde yapılan çalışmalar .....                                   | 18 |
| 2.3 DNA Dizi Analizi .....   | 21 |
| 2.3.1 Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi .....  | 22 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM .....  | 26 |
| 3.1 Liken Materyali .....  | 26 |
| 3.2 Yöntem .....   | 27 |
| 3.2.1 DNA izolasyonu .....   | 27 |
| 3.2.2 PCR analizleri .....   | 28 |
| 3.2.3 Agaroz jel elektroforezi .....   | 29 |
| 3.2.4 DNA dizi analizi .....   | 30 |
| 4. BULGULAR .....  | 31 |
| 4.1 DNA İzolasyonu .....   | 31 |
| 4.2 PZR Analizleri .....   | 34 |
| 4.3 DNA Dizi Analizi .....   | 40 |
| 5.TARTIŞMA VE SONUÇ .....  | 55 |
| KAYNAKLAR .....  | 60 |
| ÖZGEÇMİŞ .....   | 66 |

## SİMGELER DİZİNİ

|       |  |
|-------|--|
| AFLP  | Çoğaltılan Parça Uzunluğu Farklılığı (Amplified Fragment Length Polymorphism)        |
| bç    | Baz çifti  |
| CTAB  | Setil Trimetil Amonyum Bromid  |
| dNTP  | Deoksinükleotit trifosfat  |
| dk    | Dakika   |
| EDTA  | Etilen Diamin Tetraasetik Asit   |
| ESTs  | İşaretili İfade Edilen Diziler (Expressed Sequence Tags)                             |
| ITS   | Transkribe Edilen Internal Ara Bölgeler (Internal Transcribed Spacer)                |
| ISSR  | Basit Dizi Tekrarları Arası Polimorfizm (Inter-Simple Sequence Repeats)              |
| MEGA  | Moleküler Evrim Genetik Analizi (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)           |
| ml    | Mikrolitre   |
| ml    | Mililitre  |
| mM    | Milimolar  |
| nm    | Nanometre  |
| OD    | Optik Dansite  |
| PCR   | Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)                              |
| ppb   | Milyarda bir   |
| PVPP  | Polivinil Poliprolidon   |
| RAPD  | Rastgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı (Randomly Amplified Polymorphic DNA)             |
| RE    | Restriksiyon Enzimi  |
| RFLP  | Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism) |
| rpm   | Dakikadaki döngü sayısı  |
| sn    | Saniye   |
| SSR   | Basit Dizi Tekrarları (Simple Sequence Repeats)                                      |
| TBE   | Tris-Borikasit- EDTA   |
| UPGMA | Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average                                   |
| UV    | Ultra Viyole   |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| Şekil 1.1 Yapraksı likenin ( <i>Parmelia sulcata</i> ) görüntüsü .....   | 3  |
| Şekil 1.2 Dalsı likenin ( <i>Ramalina farinacea</i> ) görüntüsü .....  | 3  |
| Şekil 1.3 Kabuksu likenin ( <i>Lecidea fuscoatra</i> ) görüntüsü .....   | 4  |
| Şekil 2.1 Funguslarda rDNA bölgesi .....   | 17 |
| Şekil 2.2 Deoksitimidin trifosfat (dTTP) ve dideoksitimidin trifosfat (ddTTP)<br>molekülleri .....   | 23 |
| Şekil 2.4 Sanger-Coulson'un zincir sonlandırma yöntemi .....   | 24 |
| Şekil 2.5 Çalışılan 22 numaralı örneğe ait DNA dizi analizi sonucu .....   | 25 |
| Şekil 4.1 Çalışılan örneklerden DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA<br>bantlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü .....                      | 31 |
| Şekil 4.2 Çalışılan türlerin, 52 °C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen PZR<br>sonucunda elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü ..... | 35 |
| Şekil 4.3 54 °C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen PZR sonucunda elde edilen DNA<br>bantlarının elektroforez görüntüsü .....                     | 37 |
| Şekil 4.4 Örneklere ait Neighbor- Joining dendrogramı .....  | 50 |
| Şekil 4.5 Örneklerin Minimum Evolution dendrogramı .....   | 51 |
| Şekil 4.6 Örneklerin Maximum Parsimony dendrogramı .....   | 52 |
| Şekil 4.7 Örneklerin UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average)<br>dendrogramı .....   | 53 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Çizelge 3.1 Örneklerinin adları ve lokaliteleri .....   | 26 |
| Çizelge 3.2 PZR karışımı .....  | 29 |
| Çizelge 3.3 PZR döngü şartları .....  | 29 |
| Çizelge 4.1 Çalışılan örneklerin DNA izolasyon sonucu .....                                       | 32 |
| Çizelge 4.2 DNA konsantrasyonları ve oranları .....   | 33 |
| Çizelge 4.3 Çalışılan türlerinin 52 °C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen PZR sonuçları ..... | 35 |
| Çizelge 4.4 54 °C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen PZR sonuçları .....                      | 38 |
| Çizelge 4.5 Çalışmada kullanılan örneklerin ITS bölgelerinin sıralanmış DNA sekansı.....          | 39 |
| Çizelge 4.6 Gen Bankasından alınan örnekler .....   | 49 |
| Çizelge 4.7 Karşılaştırılan örneklerin içerdikleri baz çiftleri ve sayıları .....                 | 54 |
| Çizelge 4.8 Kullanılan örneklere ait uzaklık indeksi .....  | 54 |

## 1. GİRİŞ

Bazı alglerin ve mantarların karşılıklı fayda ilişkisi doğrultusunda bir araya gelerek, yardımlaşma (mutualizm) olarak adlandırılan yaşam şeklini tercih etmeleriyle oluşturdukları ekolojik birlikteliğe liken denir. Bu birliktelik sonucunda likenler, alglere ve mantarlara hiç benzemeyen, yepyeni morfolojik, anatomik ve fizyolojik özellikler gösterirler. Böylece likenleri oluşturan algler ve mantarlar, kısıtlı yaşam koşullarında var olmalarına neden olan karakterlerini kaybedip, üstün özelliklerini ön plana çıkarma şansı bulurlar.

Likeni oluşturan bu karşılıklı birlikteliğe, üretici (ototrof) canlı olan alg besin temin ederken, mantar havadan su buharı ve kendi üzerinde birikmiş mineralleri kazandırmaktadır. Her ne kadar iki canlı grubu karşılıklı kazanç elde ediyormuş gibi görünse de, asıl faydayı algten besin temin eden mantar sağlamaktadır. Bu nedenle, alg-mantar birlikteliğinde baskın canlı mantar olup, likenler Fungi alemi içerisinde sınıflandırılmakta ve liken oluşturan mantarlar olarak isimlendirilmektedir (Nash 1996, Cavalier-Smith 1998). Ancak mantarın koruyucu özelliği nedeniyle alge daha geniş alanlarda, daha uzun süre yaşama imkanı tanınması, mantar-alg ilişkisinde kontrollü bir parazitlik durumunun bulunduğu göstermektedir (Nash 1996).

Çeşitli kaynaklara göre farklılık göstermekle birlikte, dünyadaki liken türü sayısı yaklaşık olarak 25.000 civarında değişmektedir. Liken ortaklarından olan algler bir hücreli veya iplikli olabilirler. Bunlar *Cyanophyta* (Mavi-yeşil algler) diviziyosundan *Chroococcus*, *Nostoc* vs. ve *Chlorophyta* (Yeşil algler) diviziyosundan *Protococcus*, *Trentepohlia* vs. cinslerinin bazı türleridir. Birliğe iştirak eden mantarlar ise çoğunlukla *Ascomycetes* sınıfının *Discomycetales* ve *Pyrenomycetales* ordolarına, genellikle tropikal bölgelerdeki likenlerin bir kısmı ise *Basidiomycetes* sınıfının *Hymenomycetales* ordosuna dahildir (Yıldız ve Yurdakulol 2002).

Likenlerin yaşama alanları ve substratları (üzerinde geliştikleri materyal) çok geniş ve değişkendir. Dünyanın hemen her bölgesine yayılmış olarak çeşitli yetişme ortamlarında yaşarlar. Kutuplardan-Ekvatora, deniz kıyısından, ovalardan, dağların yüksek yerlerine kadar hemen her yerde, diğer organizmaların yaşayamayacağı yetişme ortamlarında yetişebilirler. Likenler çok ekstrem yetişme ortamlarına uyum gösterir, kızgın güneş altında sığağa, çok düşük dereceli soğuga, haftalarca süren kuraklığa dayanabilirler (Cansaran 2000). Aylarca susuz kaldıkları halde uyku halinde (dormansi) yaşayabilirler. Bu devrede havadan aldıkları çok az miktardaki su buharıyla yaşamlarını devam ettirebilirler.

Likenler genellikle çok az büyürler ve büyümeleri çok yavaştır. Yıllık 0,5 mm den 5 cm ye kadar büyüyen likenler vardır. Likenlerin büyümesine etki eden faktörler sırasıyla sıcaklık, nem, ışık, temiz bir atmosfer ve rüzgârdır (Brodo vd. 2001).

## **1.1 Likenlerin Sınıflandırılması**

Likenler, farklı özellikleri göz önüne alınarak örneğin morfolojik şekillerine, tercih ettikleri substrat tipine, apotesyum şekline, yapısına katılan alg türüne göre birkaç şekilde gruplandırılabilir. Bu gruplandırmalar içinde en çok kullanılanları morfolojik şekil ve substrat tipine göre olan sınıflandırmalardır (Öztürk 1995).

### **1.1.1 Morfolojik yapılarına göre likenler**

#### **1.1.1.1 Yapraksı likenler**

Dorsa-ventral olarak yassılaştırmış lop ve yapraklardan oluşan tallus tipidir. Rizin veya umbilikus ile substrata tutunan likenlerdir. Çoğu yapraksı likenin kenarları yuvarlak veya biraz açıldır. Loplarn şekilleri, uzunluk ve genişlikleri ve konfigürasyonları (mesela yukarı kıvrık veya aşağı kıvrık, konkav veya konveks, şişkin veya yassı

olabilir) bir likeni diğerdinden ayıran önemli karakteristiklerdir. Örneğin *Parmelia sp.*, *Umbilicaria sp.*, *Xanthoria sp.* (Brodo vd. 2001).



**Şekil 1.1** Yapraksı likenin (*Parmelia sulcata*) görüntüsü  
(<http://images.google.com.tr>, 2009)

#### 1.1.1.2 Dalsı likenler

Dik ya da asılı olarak büyüyen, talluslarında, yassılaştırmış olsalar bile, açık bir şekilde alt ve üst olarak ayırt edilebilen yüzeylere sahip olmayan likenlere dalsı likenler denir. Bu gelişim şekli çok fazla dallanmış çalimsı likenleri ve dallanmamış saplar veya iplikler halindeki likenleri kapsar. Örneğin, *Evernia sp.*, *Pseudevernia sp.*, *Ramalina sp.* (Brodo vd. 2001).



**Şekil 1.2** Dalsı likenin (*Ramalina farinacea*) görüntüsü  
(<http://images.google.com.tr>, 2009)

### 1.1.1.3 Kabuksu likenler

Tallusları substrat olmaksızın toplanamayan, tamamen substrata yapışık olan likenlerdir. Liken tamamen ağaç kabuğuna veya kayalara tutunmuş olup, kabuk şeklinde, yassı ve sıkı bir örtü meydana getirirler. Bazen kayaların yüzeylerini eritip derinlere girerler. Örneğin; *Aspicilia sp.*, *Lecanora sp.*, *Lecidea sp.*, *Rhizocarpon sp.* (Brodo vd. 2001).



Şekil 1.3 Kabuksu likenin (*Lecidea fuscoatra*) görüntüsü  
(<http://images.google.com.tr>, 2009)

Bu sınıflandırmada primer tallus yapraksı, sekonder tallus ise az veya çok dallanmış podesyum şeklinde olan *Cladonia* genusu, üyeleri yapraksı ve dalsı likenler arasında ara form durumundadır (Öztürk 1995).

### 1.1.2 Substrat tiplerine göre likenler

Likenler üzerinde geliştikleri substratlara göre, ara formları olmakla beraber, temel olarak üç grupta incelenebilirler (Öztürk 1995).

### **1.1.2.1 Epifitik veya kortikol likenler**

Doğadaki diğer bitki formlarını (ağaç, çalı, karayosunu vb.) substrat olarak seçen likenlerdir. Bu bitkiler substrata kısmen veya tamamen gömülü durumda (örneğin *Lecidea* ve *Lecanora* ) ya da yüzeyde (örneğin *Buellia*, *Caloplaca* ) gelişim gösterirler (Brodo vd. 2001).

### **1.1.2.2 Saksikol likenler**

Çeşitli taş veya kaya üzerinde gelişen likenlerdir. Bunlarda kaya yüzeyinde gelişen likenler yani epilithik likenler (örneğin *Rhizocarpon sp.*) ve kayaya kısmen gömülü olan endolithik (örneğin *Verrucaria sp.*) likenler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Genellikle kalkerli substratlar üzerinde gelişenler az çok endolithik, silisli substratlarda gelişenler ise epilithik türlerdir (Brodo vd. 2001).

### **1.1.2.3 Terrikol likenler**

Kalkerli, silisli, humuslu topraklar üzerinde yalnız veya karayosunları üzerinde gelişen likenlerdir. Örnek *Cladonia* ve *Squammarina* cinslerine ait türler verilebilir (Brodo vd. 2001).

Bu üç grup dışında likenler, antik eserler, eski evlerin kiremitleri ve duvarları, mezar taşları, kemik, deri, yün, kereste gibi çeşitli materyaller üzerinde gelişebilirler (Öztürk 1995).

## 1.2 Likenlerin Üremesi

Likenlerde üreme eşeyli ve eşeysiz olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Eşeyli üreme birimleri mantar tarafından meydana getirilir. *Ascomycetes* sınıfına ait mantarlar apotesyum ve peritesyum denen üreme organları oluşturur ki apotesyumlar tallus üzerinde küçük çanak şeklinde, bazen tallusa gömülü, siyah, kahverengi, turuncu, sarı gibi değişik renklerde noktalar olarak ya da çizgi şeklindeki üreme birimleri, peritesyumlar ise tallus yüzeyinde sadece ostiol denilen açıklığı ayırt edilebilen nokta şeklinde tallusa gömülü üreme organlarıdır. Apotesyum ve peritesyumlar, ilkbahar ve sonbahar olmak üzere yılda iki kez spor üretirler (Öztürk 1995).

Liken sınıflandırılmasında bu üreme organlarının tipleri, şekilleri, askuslarında taşıdıkları spor sayısı sporlara ait özellikler önemli ayırt edici karakterlerdir.

Likenlerde apotesyum şeklindeki üreme organları daha yaygın görülür ve üç grupta incelenir. Lecanorine (tallus kenar içeren), Lecideine (özel bir dokudan oluşan apotesyum kenarı içeren), Biatorine (kenar içermeyen) (Öztürk 1995).

Bir görüşe göre; eşey organı oluşturmayan likenler (steril likenler) nesillerinin devamı için eşeysiz üreme gösterirler. Bu amaçla liken tallusu yüzeyinde izid ve sored adı verilen yapılar meydana gelir. İzid, birkaç alg hücresi ve mantar hiflerinin bir araya gelerek üzerinin korteks ile kaplanmasıyla oluşan tallus üzerindeki parmak ya da siğil şeklindeki yapılardır. Bu yapılar tallus yüzeyinin, dolaylı olarak da fotosentez yüzeyinin artmasını sağlarlar. Soredler ise, izidin korteks ile kaplanmamış halidir. Tallus, üzerinde birkaç alg hücresi ve bunları çevreleyen mantar hiflerinden oluşan toz partikülleri şeklindedir. Soredler tallus üzerinde belirli bir bölgede yoğunlaşmış ve korteks ile sınırlanmış ise soral adını alır. Eşeyli üreme organları gibi eşeysiz üreme organları olan izid ve sored, liken sistematğinde önemli ayırt edici karakterlerdir (Öztürk 1995).

### 1.3 Likenlerin Önemi

Likenler toprak oluşumuna yaptıkları katkıdan dolayı ekolojik süksesyonda önemli rol üstlenirler. Likenler, çıplak kayalık alanları ilk olarak örten bitkiler arasındadırlar. Saldıkları asitlerle kayaları eriterek toprak oluşturdukları gibi ölen talluslarından da organik madde biriktirirler. Bu işlemler çok yavaş olur fakat bir süre sonra yeter miktarda toprak ve organik madde birikince bu sahada yosunlar ve eğreltiler yerleşebilir (Cansaran 2000).

Likenler atmosfer kirliliğine ve özellikle kükürt dioksitine karşı çok duyarlıdırlar. Bu özelliklerine dayanarak insanlar hava kirliliğini kontrol etmek için likenleri kullanırlar. SO<sub>2</sub> yoğunluğu 35 ppb'ye ulaştığında likenler tamamen yok olurlar. Halbuki büyük şehirlerde SO<sub>2</sub> miktarı ortalama olarak 100 ppb'ye kadar çıkabilir. Skye (1968) yaptığı çalışmalarda, likenleri kirlenme derecelerine göre 5 farklı bölgeye ayırmış ve en kirli olan birinci bölgede likenlerin tamamen kaybolduğunu göstermiştir.

Likenler radyoaktif kirliliğin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Ağır metallerde olduğu gibi alınmanın bütün yüzeyle yapılması ve köklerin bulunmaması bu konuda avantaj sağlamaktadır. Önceleri kuzey enlemlerde Liken-Ren Geyiği-İnsan besin zincirinde çeşitli radyoaktif maddelerin taşındığı ispatlanmış, Chernobyl'deki kazadan sonra konu ülkemizde de gündeme gelmiştir. Radyoaktif kirlilik analizlerinde özellikle geniş yüzeye sahip olan çalimsı türler tercih edilmektedir. Bu amaçla Ren Geyikleri tarafından yaygın olarak tüketilen *Cladonia* türleri kullanılmıştır (Öztürk vd. 1987).

Polonya'da Chernobyl kazasından önce ve sonra *Umbilicaria* türlerinde yapılan çalışmalarda <sup>134</sup>Cs ve <sup>137</sup>Cs seviyelerinde belirgin artışlar gözlenmiştir. Bu cins, düz ve geniş yüzeye sahip oluşu ve substrata çok küçük bir noktadan tutunması nedeni ile seçilmiştir. Araştırmacılar, biriktirebilme kapasitesinin aynı cinsin türleri arasında bile farklı olduğunu vurgulamaktadırlar (Seaward vd. 1988).

Likenler doğada pek çok küçük hayvandan başlayarak insanlara kadar çeşitli grupların gıdasını oluşturmaktadır. Akarlardan misk öküzlerine kadar birçok hayvan türü likenleri ya besin ya da barınak olarak kullanır. Güve, örümcek, salyangoz, kelebek larvaları gibi böcekler ve birçok kemirgen hayvan likenleri besin olarak kullanmaktadır (Brodo vd. 2001).

Böcekler likenleri sadece gıda olarak kullanmazlar aynı zamanda kendilerini likenlere benzeterak diğer canlılardan korumuş olurlar. Örneğin güve ve kene larvaları likenlere benzemek yoluyla (kamuflej) düşmanlarından korunurlar (Brodo vd. 2001).

Likenler insanlar tarafından da yiyecek maddesi olarak kullanılmaktadır, ancak likenlerin insanoğlu açısından besin değerleri oldukça kısıtlıdır. Çünkü geviş getiren hayvanların aksine insanlarda mide ve barsaklar içerisinde bulunan ve karmaşık liken karbonhidratlarını emilebilen ve küçük moleküllere parçalayan bakteri florası mevcut değildir (Brodo vd. 2001).

Likenlerin çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğunu gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların bir bölümü likenlerin antitümöral, diğer bölümü antiinflamatuar ve antiülserojenik etkilere sahip olduklarını göstermektedir. Diğer pek çok araştırmada likenlerin “soğuk algınlığı, kuduz hastalığı, barsak kurtlarının düşürülmesi, alerji, ateşli hastalıklar, sarılık, cilt hastalıkları, humma nöbetleri, boğmaca, öksürük ve solunum yolu hastalıkları ve kemik kırıklarının tedavi edilmesinde kullanıldığı kayıtlıdır (Vartia 1973, Aslan ve Öztürk 1998, Brodo vd. 2001).

Bazı likenlerin içerdiği asit özellikteki maddelerin birçoğu vücuda alındığında tahriş edici özellikte olduğundan zehirlidirler. Bu özelliği en iyi bilinen türler *Letharia vulpina* ve *Vulpicida pinastri*'dir. Bu türler Avrupa'nın bazı ülkelerinde ve İskandinav ülkelerinde kışları hayvan sürülerine zarar veren kurtları ve tilkileri öldürmede kullanılır (Karamanoğlu 1971, Aslan ve Öztürk 1998).

Likenler, boyama amacıyla, parfümeri ve kozmetikte, hava kirliliğinin indikatörü olarak, bir bölgedeki kirlilik ve metal miktarının belirlenmesi amacı ile de kullanılmaktadır. Mezar taşlarının yaşı, anıtların yaşı, en son heyelan ve deprem tarihlerinin belirlenmesinde de likenler kullanılmaktadır (Brodo vd. 2001).

#### 1.4 *Lecidea* Cinsi

|                 |               |
|-----------------|---------------|
| Kingdom(Alem)   | : Fungi       |
| Division (Şube) | : Ascomycota  |
| Classis (Sınıf) | : Ascomycetes |
| Order (Takım)   | : Lecanorales |
| Family (Aile)   | : Lecideaceae |
| Genus (Cins)    | : Lecidea     |

Eric Acharius'un 1803 yılında *Lecidea* cinsini ilk tanımlamasından sonra geçen 150 yıllık periyot boyunca bu cins, genellikle yeşil alg fotobiyontuna sahip, apotesyum kenarlarında alg bulundurmayan ve renksiz, basit askosporlara sahip kabuksu liken taksonları için bir "çöp kutusu" haline gelmiştir. Bu genus yaklaşık 1600 tür içerecek kadar büyümüştür (Hertel, 1975). Sadece bu yüzyılın ikinci yarısında, özellikle Hertel (1967, 1977, 1995) tarafından bu cinsi, morfolojik, kimyasal, ekolojik ve biyocoğrafik bilgiler temelinde revize etme çabaları başlamıştır. Bu çalışmaların sonucunda daha homojen gruplar oluşturulmuştur. Bu genuslar: *Adelocia*, *Amygdalaria*, *Biatora*, *Carbonea*, *Claurouxia*, *Clauzadea*, *Clauzadeana*, *Farnoldia*, *Fuscidea*, *Herteliana*, *Hypocenomyce*, *Lecanora*, *Lecidella*, *Melanolecia*, *Micarea*, *Miriquidica*, *Nesolechia*, *Porpidia*, *Psilolechia*, *Psora*, *Pyrrhospora*, *Rimularia*, *Schaereria*, *Tephromela*, *Trapelia*, *Trapeliopsis* ve *Tylothallia*'dır. Apotesyum yapıları, eksipul ve askusların yapıları bu grupları yapılandırırken oldukça önemli rol oynamıştır. Bu cins şu an yaklaşık 100 tür ile temsil edilmektedir (Hertel 1995).

*Lecidea* cinsinde epihimenyum genellikle pigmentli, yeşilimsi veya kahverengi-siyah veya yeşil-siyah tonlarındadır. Himenyum genellikle I (iyot) ile mavi renk verir.

Hipotesyum renksiz, kahverengi veya siyahtır. Askuslar uzunlamasına klavat olup, *Lecidea* tipindedir, dış kısım I ile mavi renk verir, uç kısmı kalınlaşmıştır. Bu cinste sınıflandırılan likenlerin teşhislerinde mikroskobik özelliklere, özellikle de kesitlerdeki renklere ve reaksiyonlara oldukça dikkat etmek gereklidir (Hertel 1995).

Özellikle son 20 yılda ülkemizde hızlanan liken çalışmaları sonucunda (John 1992, 1995); 14 *Lecidea* taksonu teşhis edilmiştir. Bu taksonlar şunlardır: *Lecidea atrobrunnea* (Lam. & DC.) Schaer., *Lecidea auriculata* Th. Fr., *Lecidea auriculata* Th. Fr. subsp. *brachyspora* Th.Fr., *Lecidea confluens* (Weber) Ach., *Lecidea exigua* Chaub., *Lecidea fuscoatra* (L.) Ach., *Lecidea lapicida* (Ach.) Ach., *Lecidea lapicida* (Ach.) Ach. var. *pantherina* Ach., *Lecidea plana* (J.Lahm) Nyl., *Lecidea promiscens* Nyl., *Lecidea tabacina* (Ram.) Schaer., *Lecidea tessellata* Flörke, *Lecidea umbonata* (Hepp) Mudd.

Bu çalışmada, ülkemizde yayılış gösteren *Lecidea* ve ilişkili liken cinslerinde sınıflandırılan belirli türlerin ve bu türlere benzerlikleri ile bilinen *Lecidella*, *Porpidio*, *Rhizocarpon* cinslerinin bazı taksonlarına ait rDNA (ITS) bölgeleri PZR yardımıyla çoğaltılıp dizi analizi yapılmıştır. Böylece liken sistematikindeki konumları yeniden incelenmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 Moleküler Belirteçler

Moleküler belirteç, kalıtımı takip edebilen bir gen veya belirlenebilir bir DNA parçasıdır. Bu belirteçler DNA'nın aktif bölgelerinden (genler) veya herhangi bir genetik kodlama fonksiyonuna sahip olmayan DNA dizinlerinden geliştirilebilirler ve farklı genotiplere ait DNA nükleik asit diziliş farklılığını çeşitli şekillerde ortaya koyarlar. DNA belirteçleri sabittir, tüm dokulardan elde edilebilir, ekolojik koşullardan etkilenmez (Williams vd. 1990). Teorik olarak genomun her noktasını temsil etme yeteneğine sahiptirler ve sonsuz sayıdadırlar.

Her biri ökaryotik DNA'daki özelliklere dayalı olarak tasarlanan ve kalıtsal olarak izlenebilen moleküler belirteçler, günümüzde bitki moleküler biyolojisi alanında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Moleküler belirteçlerin bitki moleküler biyolojisinde kullanıldığı alanlara örnek olarak bitki genom haritalanması, belirteçler yardımıyla ıslah (marker-assisted breeding), gen klonlama, tohum saflığı testleri ve saflık tayini verilebilir (Röder vd.1995, Brown vd. 1996, Ayres vd. 1997).

DNA belirteçleri kullanılarak genetik çeşitlilik araştırılabilir. Örneğin birbirine çok yakın olan kültür çeşitleri ayrılabilir ve tanımlanabilir. Türlerin taksonomik tanımlanması yapılabilir ve filogenetik akrabalıkları bulunabilir (Lowe vd. 1996).

Moleküler belirteçler, hibridizasyona dayalı DNA belirteçleri ve polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı DNA belirteçleri olmak üzere iki grup altında incelenirler.

## **2.1.1 Hibridizasyona dayalı DNA belirteçleri**

DNA hibridizasyon belirteçleri çeşitli şekillerde işaretlenmiş bir DNA parçasının (prob DNA) araştırılan bir DNA örneğindeki benzer veya aynı dizilimdeki DNA'ya melezlenebilmesini baz almaktadır.

### **2.1.1.1 RFLP: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

RFLP analizi, dokulardan izole edilen genomik DNA'nın, kesim enzimlerince spesifik olarak kesilmesi ve prob DNA'nın melezlendiği DNA etrafındaki farklı kesim yapılarının saptanması esasına dayanır (Yıldırım ve Kandemir 2001).

RFLP belirteçleri; doğal varyasyonu tespit edebilmesi, az miktarda DNA'ya gereksinim duyması, bitkinin herhangi bir gelişme döneminde işlem yapılabilmesi, çevre faktöründen etkilenmemesi gibi avantajlara sahiptir (Budak 1995). RFLP belirteçlerinin kodominant özellikte olması diğer bir avantajdır. Böylece heterozigot bireylerin de karakterize edilmesi mümkün olmaktadır. Polimorfizm oranları ise orta düzeydedir.

RFLP belirteçlerinin dezavantajları; analizlerin pahalı olması, fazlaca zaman ve işgücü gerektirmesi, yaygın olarak radyoaktif işaretleme yapılması, fazla miktarda ve yüksek kalitede DNA'ya ihtiyaç duymasıdır (Walton 1993).

RFLP analizi, suçluların araştırılması, babalık tayini ve populasyon genetiği çalışmalarında kullanılır. İnsan ve hayvan evriminin incelenmesi ve kalıtsal hastalıklara neden olan genlerin kromozom üzerindeki yerleşimini saptamada da değer taşır (Beckmann vd. 1986, Hallerman vd. 1987, Karl vd. 1993, Gonang 1999).

### 2.1.2 Polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı DNA belirteçleri

PZR, spesifik bir DNA veya RNA olan genetik materyallerin spesifik kısa zincirli oligonükleotid primerler yardımıyla enzimatik olarak sayısal çoğalmasını içeren in vitro bir tekniktir (Mullis ve Faloona 1987).

PZR; genetik haritalama, türler arası polimorfizm tespiti, evrim çalışmaları, tohum saflığının belirlenmesi, analık-babalık tayini, adli tıpta kimlik belirleme, kanser araştırmaları, mutant genlerin populasyondaki devamlılığının izlenmesi, transgenik organizmaların belirlenmesi, toprak, su ve gıda maddelerindeki mikroorganizmaların belirlenmesi gibi konularda geniş kullanım alanı bulmaktadır.

PZR reaksiyonuna dayanan belirteç teknikleri;

- RAPD (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)
- AFLP (Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi)
- SSR (Basit dizi tekrarları)
- ISSR (Basit dizi tekrarları arası polimorfizm)

#### 2.1.2.1 RAPD: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

RAPD tekniğinde, 6-10 nükleotid uzunluğundaki başlatıcı DNA'lar kullanılarak genom üzerinde rasgele bölgelerin amplifikasyonu gerçekleştirilir. Reaksiyon şartlarının spesifik olmaması rasgele çoğaltıma izin verir. Yaygın olarak diğer PCR uygulamalarının aksine iki değil bir primer kullanılır. Ancak bu primer her iki yöndeki DNA üretimi için de kullanılır. Dolayısıyla kullanılan primerin DNA üzerinde birbirine yakın iki bölgeye bağlanabildiği genom bölgelerinin amplifikasyonu yapılır. Üretimi yapılan DNA parçaları bir agaroz jel üzerinde elektroforeze tabi tutulduğunda bazı parçaların bazı genotiplerde üretilip bazılarında üretilmediği gözlenir.

RAPD tekniğinin avantajları; çabuk sonuç vermesi, diğer tekniklere göre ucuz olması, az iş gücü gerektirmesi, az miktarda ve düşük kalitede DNA'ya ihtiyaç duyması, polimorfizm oranının yüksek olması ve otomasyona uygun olmasıdır. Tekniğin dezavantajlarından en önemlisi, güvenilirliğinin çok sınırlı olmasıdır. Farklı laboratuarlarda, farklı araştırmacıların elinde ve hatta bir ısı döngü cihazından diğerine farklı sonuçlar elde edilebilmektedir (Yıldırım ve Kandemir 2001).

RAPD belirteç sistemi avantajları nedeniyle prokaryotik ve ökaryotik türler gibi pek çok farklı yapının genotipinin belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, çeşitli taksonomik çalışmalar, populasyon biyolojisi, kültür ve ırk belirlenmesi, genetik varyasyonun belirlenmesi, bağlantı haritalarının oluşturulması, özgün bir gen lokusunun belirlenmesi, adli tıp ve ekoloji alanlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Aydın 2004).

#### **2.1.2.2 AFLP: Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)**

AFLP tekniği RAPD tekniği ile RFLP tekniğinin birleştirilmiş formu olup RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir. Bu tekniğin uygulanmasında DNA iki kesim enzimi tarafından kesilir, kesilen her bir parçanın ucuna nükleotid dizilimi sentetik olan adaptör DNA'lar eklenir. Böylece nispeten spesifik DNA çoğaltımı yapılır. AFLP tekniğinde, restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA fragmentlerinin adaptör DNA ile birleştirilmesinden sonra arka arkaya yapılan iki PCR reaksiyonu ve bu reaksiyonlarda seçici primer kullanılmasıyla yürütülür (Zabeau ve Vos 1993). Elde edilen ürünler poliakrilamid jelde yürütülerek gümüş boyama ya da radyoaktivite ile gözlemlenebilir hale getirilir.

AFLP tekniği RAPD gibi tüm genomu analiz eder fakat RAPD'den farklı olarak daha spesifik PCR şartlarını kullanır ve sonuçların tekrar edilebilirliği daha yüksektir. AFLP tekniğinin avantajları polimorfizm oranının yüksek olması, RFLP tekniğine göre daha hızlı olması olarak sıralanabilir. Ayrıca parmak izi analizleri için uygundur. Çoğunlukla

dominant belirteçler vermesi ve farklı genetik haritalar arasında transferlerin güç olması ise dezavantajlarıdır (Walton 1993).

### **2.1.2.3 SSR: Basit dizi tekrarları (Simple Sequence Repeat)**

Basit dizi tekrarları, ökaryotlarda çok sayıda bulunan kısa ardışık dizi tekrarlarıdır. Mikrosatelitler olarak da bilinen basit DNA tekrarları birbiri ardına gelen 2-5 nükleotid ünitesi tekrarları olup tüm genomda dağılmış olarak bulunurlar. Bu tekrarlanan nükleotid dizilerinin fonksiyonu hakkında kesin bir bilgi yoktur, ancak düzenleyici olabilecekleri düşünülmektedir. Akrabalık ve populasyon genetiği çalışmalarında genetik belirteç olarak çok sık kullanılırlar. Bu belirteçler özellikle tekrar sayısı fazla olduğunda, yüksek derecede polimorfizm belirlenebilmesine olanak sağlarlar. SSR analizleri mikrosatellitleri sınırlandıran primerler kullanılarak, bu dizilerin PCR işlemiyle çoğaltılıp polimorfik veri elde edilmesi temelinde gerçekleştirilir (Queller vd. 1993).

Mikrosatelitler, kodominant kalıtım özelliği göstermeleri, lokusa özgü olmaları, yüksek bilgi içeriğine sahip olmaları ve PCR ile kolayca tespit edilebilmeleri gibi birçok özellikleri ile tercih edilen bir moleküler belirteç grubunu oluşturmaktadır. Mikrosatelitler ile ilgili en belirgin dezavantaj ise bir türe ait yeni mikrosatelitlerin elde edilmesidir. Bu işlem çoğunlukla zaman alıcı olup fazla miktarda emek gerektirir. Çünkü genomdaki mikrosatelitleri PCR ile çoğaltmak için tekrar ünitelerinin her iki yanında bulunan belirli DNA dizilimlerine bağlanabilen primerlere gereksinim duyulur. Mikrosatelitlere ait primerlerin tasarlanması ise her mikrosatelit için DNA dizilim bilgisini gerektirir (Akkaya vd. 1992, Senior ve Heun, 1993, Röder vd. 1995).

### **2.1.2.4 ISSR: Basit dizi tekrarları arası polimorfizm (Inter Simple Sequence Repeats)**

Bu teknik, birbirine ters yönlü ve yakın olan mikrosatellit bölgelerin (100-3000 bp) amplifikasyonunu dayanır. Primerler 5' veya 3' ucunda rastgele genellikle 1- 4 bazdan

oluşan seçici baz dizilimlerine sahiptirler. Ancak seçici baz içermeyen primerler de kullanılabilir. Primerler SSR' lar arasında kalan bölgeyi amplifiye ederler.

Bu tekniğin avantajı genellikle bir tek PCR reaksiyonu ile birçok polimorfik bant üretilmesi, RAPD ve RFLP gibi tekniklere nazaran belirteç başına maliyetin düşük olmasıdır. ISSR belirteçleri genellikle dominant belirteçlerdir ve bu yüzden bireylerin heterozigot olup olmadığını tespit etmek güçtür (Gülsen ve Roose 2001).

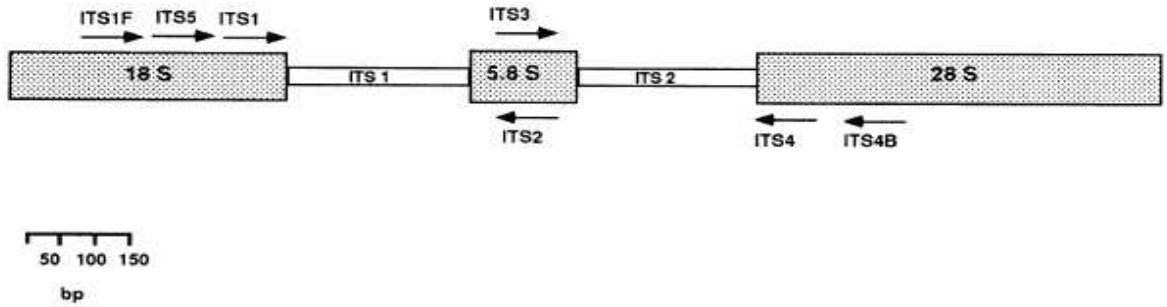
### **2.1.3 ESTs : İşaretli ifade edilen diziler (Expressed Sequence Tags)**

EST genellikle 300-500 baz çiftlik kısa dizilerdir. EST'ler genomik diziyi açıklamayı ve spesifik dokulardaki veya büyüme koşullarıyla ilişkili gen ekspresyonunu analiz etmeyi sağlar. İnsanda genlerin ekspresyonunun tanımlanması kodlanmayan gen içi bölgelerin (intronların) olmasından dolayı zordur. Bu nedenle mRNA izolasyonu ile ifadesi olan genleri tespit etmek mümkündür. Ancak mRNA hücre dışında stabil değildir. Bu nedenle mRNA'dan cDNA (komplementer DNA) sentezlenir. cDNA ifade edilen sekansı içerir ve daha sonra molekülün iki ucundan EST oluşturmak üzere birkaç yüz nükleotid sekanslanır (Adams vd. 1991).

### **2.2 ITS: Transkribe Edilen İnternal Ara Bölgeler (Internal Transcribed Spacer) ve rDNA**

rDNA ökaryotlarda çekirdekte yer alan, kopyaları peş peşe dizili, çoklu bir gen ailesidir. Tekrarlanan her bir bölge 18S, 5.8S ve 28S rRNA genlerini içermektedir. Bu genler ITS1 ve ITS2 (Internal Transcribed Spacer), ETS (External Transcribed Spacer) ve IGS (Intergenic Spacer) isimli bölgelerle birbirinden ayrılmıştır. Yüksek frekanslı mutasyonlar gösteren ITS bölgesi cinsler içindeki türler arasında ya da populasyonlar arasında farklılıklar göstermektedir (White vd. 1990).

Kodlanmayan iki değişken bölgeden meydana gelen ITS bölgesi, oldukça korunmuş küçük alt birim (SSU) ile 5.8S alt birimi arasında (ITS1 bölgesi) ve de büyük alt birim (LSU) rRNA genleri ile 5.8S alt birimi arasındaki bölgede (ITS2) yer almaktadır. IGS bölgesi ardışık iki tekrar bölgesini birbirinden ayırır. ETS ise bu tekrar bölgelerinin en dışında kalan bölgelerdir.



Şekil 2.1 Funguslarda rDNA bölgesi (Boysen et al. 1996)

ITS1F primeri mantarlar için özgü bir primerdir ve rDNA'nın SSU geninin 3' ucunda bulunur. ITS4 primeri ise evrensel bir primer olarak tanımlanmıştır ve LSU geninin 5' ucuna tamamlayıcıdır (White vd. 1990, Gardes ve Bruns 1993).

18S rDNA nispeten yavaş evrim geçirir ve uzak akraba organizmaların karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. Kodlama yapmayan (ITS ve IGS) bölgeleri daha hızlı evrim geçirir ve bir cinse ait türlerin veya bir türdeki suşların karşılaştırılması için kullanılmaktadır. 28S rDNA'nın bazı bölgeleri türler arasında farklılık göstermektedir (Edel 1998).

ITS gibi DNA dizileri diğer tüm türler içerisinde tek bir türün saptanması için uygundur. Örnek olarak; ITS dizilerindeki farklılık mantarın izolasyonuna gerek kalmadan konak bitkideki çoğu fitopatolojik mantar türünün saptanmasını sağlamıştır. rDNA'nın diğer dizileri örneğin 18S rDNA, 28S rDNA ve mitokondriyel rDNA dizileri de spesifik primerler geliştirmek için kullanılmaktadır (Gardes ve Bruns 1993).

ITS bölgesi 4 temel nedenle mantarlarda moleküler karakterizasyon çalışmaları için özellikle kullanışlıdır:

1. ITS bölgesi nisbeten küçüktür (500-800 bp) ve evrensel tek bir primer çifti (rRNA alt birimleri içindeki korunmuş bölgelerin komplementeri) kullanılarak PCR ile kolaylıkla çoğaltılabilir.

2. rDNA birimlerinin çok sayıda tekrarlarının olması nedeniyle, seyreltik ya da oldukça parçalanmış DNA örneklerinden de ITS bölgesi kolaylıkla çoğaltılabilir.

3. Morfolojik açıdan farklı türler arasında ITS bölgesi yeterince değişken olabilir ve bundan dolayı ITS RFLP restriksiyon verileri genetik uzaklığı tahmin etmek için kullanılabilir, böylece filogenetik ve sistematik analizler için karakterler sağlayabilir.

4. ITS türe özgü problemleri, bir kromozomal kütüphane oluşturmaya gerek kalmaksızın hızlı bir şekilde PCR ile üretilebilir. Birçok araştırmacı dizilerin tekrarlayan birimler şeklinde olması ve türler arasında değişken, tür içinde benzer olma eğiliminde olmasından dolayı, türe özgü problemleri geliştirmek için dizileri ITS bölgesinden seçmektedir (White vd. 1990, Bruns vd. 1991, Lee ve Taylor 1992).

### **2.2.1 ITS kullanılarak likenlerde yapılan çalışmalar**

Likenlerden saf DNA izolasyonu bazı zorluklar sergilemektedir. Grube vd. (1995) ve Crespo vd. (1997) yayınladıkları makalelerde bu zorlukların nedenleri olarak, polisakkarid ve fenolik bileşikler gibi inhibitörlerin bulunması ayrıca iki biyot'un ayrılmasındaki güçlükleri ifade etmişlerdir. Buna karşın bu zorluklar PCR'da selektif primerlerin kullanılmasıyla bir ölçüye kadar aşılabildiği gibi DNA'nın saf bir şekilde izole edilmesi ile ilgili değişik yöntemler de farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Aras ve Cansaran 2006).

Mikoloji alanında ilk PCR uygulaması 1990 yılında White vd. tarafından fungusların taksonomik ve filogenetik akrabalıklarını göstermek için rRNA' nın direkt dizi analizi ve amplifikasyonu ile yapılmıştır. rRNA dizileri yaşayan tüm hücrelerde bulunduğu ve aynı görevi üstlendiğinden taksonomik ve filogenetik çalışmalar için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu dizilerin evriminin tüm genomun evrimini yansıttığı söylenebildiği gibi aynı zamanda farklılık gösteren ve korunmuş bölgeler de içermektedirler. Bu sayede farklı taksonomik gruplarda bulunan organizmaların karşılaştırma ve ayırımlarında kullanılmaktadır.

Casares vd. (1996) çalışmalarında *Lecidea* cinsinin İspanya'nın jips topraklarının liken florasında bulunan iki türünü: *L. gypsicola* Llimona and *L. circinarioides* Casares and Hafellner sp. nov. tanımlamışlardır.

Goffinet ve Bayer (1997) askuslu mantarlara özgü bir primer kullanarak, *Peltigera malacea*, *Peltigera aphthosa*, *Peltigera britannica* ve *Peltigera leucophlebia* fotomorfları, *Nephroma expallidum* ve *Nephroma arcticum* fotomorflarının rDNA ITS bölgelerini çoğaltmışlar ve 5.8 S dizilerinin karşılaştırılmasıyla, toplam liken DNA'sından mantar DNA'sının çoğaltılması için askomisese özgü primerlerinin yeterli olduğunu belirtmişlerdir.

Groner ve LaGreca, (1997) *Ramalina panizzei* türünün morfolojik kimyasal analizi dışında diğer *Ramalina* türleri arasındaki genetik benzerlik ve uzaklığı bulmak için rDNA ITS bölgelerinin dizi analizini gerçekleştirmişlerdir.

Arup ve Grube (1998) çalışmalarında, *Lecanora* subgenus *Placodium*'un nuclear ITS ve 5.8S bölgelerinin DNA sekans bilgilerini kullanarak moleküler sistematiğini araştırmışlardır.

Ivanova vd. (1999) yaptıkları çalışmada *Umbilicariaceae* familyasının filogenetik analizinde, ITS 1 ve ITS 2 primerleri ile rDNA'ya ait dizi analizi yapmış ve türler arasındaki farklılıkları ortaya çıkarmışlardır.

Dyer ve Murtagh (2001) Doğu Antartikada, Vestfold tepelerinde bulunan *Buellia frigida* ve *Xantharia elegans* ile yaptıkları çalışmada, genetik varyasyonlarının oldukça düşük olduğunu kaydetmelerine karşın, değişik bölgelerden toplanan *X. elegans*'ın tür içinde dahi oldukça yüksek genetik varyasyon gösterdiğini ITS bölgelerinin incelenmesi ile ortaya çıkarmışlardır.

Krzeminska vd. (2001) *Cetraria* cinsinde moleküler tanımlama anahtarları oluşturmak üzere RFLP (restriksiyon fragment length polymorphism) analizi gerçekleştirmişlerdir. Bu analizde yine ITS bölgeleri PCR'la çoğaltılmış ve restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Sonuçta elde edilen polimorfizimi ifade eden değişik bant desenleri ile moleküler tanımlama anahtarları oluşturulmuştur.

Grube ve Arup (2001) *Physciaceae* ailesinin çeşitli grupları ve *Rinodina* ve *Buellia* cinslerinden seçilmiş bazı türleri ile çeşitli referans dizilerine dayanarak, nükleer ITS dizi bilgisine dayalı bir filogenetik araştırma yapmışlar, *Physcia* ve *Buellia* gruplarının içerdikleri cinsleri belirlemişler.

Murtagh vd. (2002) değişik coğrafik lokalitelerden ve iklim rejimlerinden toplanan *X. elegans* örnekleri ile yaptıkları çalışmada, ITS bölgelerinin incelenmesi yanı sıra RAPD tekniği de uygulamışlardır. Her iki teknik de oldukça yüksek genetik varyasyonun varlığını ortaya koymuşlardır.

Molina vd. (2002) *Diploicia* ve *Diplotomma* liken cinslerine ait rDNA ITS bölgelerinin dizi analizini yaparak, bu cinsleri moleküler filogenetik yönden incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda türler arasındaki genetik benzerlik ve uzaklığı ortaya çıkarmışlardır. Özellikle farklı habitat ve popülasyonlarda varyasyon gösteren örneklerin moleküler filogenisi belirlenerek bu türler arasındaki genetik uzaklığın tespiti yapılmıştır.

rDNA, ITS bölgeleri incelenerek genetik farklılık ve benzerlikleri tanımlanan daha bir çok liken türleri literatürde bulunmaktadır. Högberg vd. (2002) *Letharia vulpina* türünün kıtalar arası populasyonlarını çalışmışlardır. Rios vd. (2002) ise, *Rimularia insularis* türüne ait ITS verilerini çalışmalarında kullanmışlardır. Martin vd. (2003) *Diploschistes* cinsine ait türlerin moleküler filogenisini ITS bölgesine ait dizi analizini yaparak incelemişlerdir.

Buschborm ve Mueller (2004) yaptıkları çalışmada *Porpidia* ve bu cinsle evrimsel olarak yakın ilişkili türleri çalışmışlar ve çalışmanın sonunda bu cinse ait evrimsel yorumda bulunmuşlardır.

Rios vd. (2005) çalışmalarında granit içinde endolitik büyüyen iki *Lecidea* türünü: *Lecidea cancriformis* and *Lecidea sp.* moleküler ve mikroskopi tekniklerini birleştirerek tanımlamışlardır.

Cansaran vd. (2006) *Rhizoplaca* liken cinsinin ITS bölgesinin dizi analizini gerçekleştirerek filogenetik ilişkileri konusunda inceleme yapmışlardır. Çalışmada elde edilen filogenetik ağaca göre, genetik yakınlık hakkında bilgi edinilmiştir.

Aras vd. (2007) *Aspicilia* liken cinsinin ITS bölgelerinin dizi analizini gerçekleştirerek genetik akrabalıklarını ortaya çıkarmışlardır.

### **2.3 DNA Dizi Analizi**

DNA dizi analizi, DNA örneklerindeki baz dizilerinin sırasını ortaya çıkarmak için kullanılan bir genetik şifre çözme yöntemidir. Klonlanmış bir DNA molekülü ya da bir klondan bir genom kadar herhangi bir DNA, ancak nükleotid dizisi bilindiği zaman tam anlamıyla karakterize edilebilmektedir.

DNA dizi analizi gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında birçok bilgi edinmemizi sağlamıştır. 1940'larda DNA baz kompozisyonu saptama yöntemleri bulunmasına karşın DNA'daki nükleotid dizilişlerinin doğrudan kimyasal analizi 1960'larda geliştirilip kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin, 1965'te Robert Holley, 75 nükleotidlik bir tRNA molekülünün dizisini bir yıllık bir çalışma sonucu saptayabilmiştir. 1970'lerde daha etkin ve doğrudan nükleotid dizi analizine yönelik yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Herhangi bir organizmadan çok miktarda saf DNA fragmanları elde edilmesini sağlayan rekombinant DNA tekniklerinin gelişmesine paralel olarak dizi analizi yöntemleri de geliştirilmeye başlanmıştır.

DNA dizi analizi için günümüzde birbirinden farklı iki yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler;

- 1- Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi (Maxam ve Gilbert 1977).
- 2- Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi (Sanger vd. 1977).

Walter Gilbert ve Frederick Sanger DNA dizi analizi üzerine yaptıkları çalışmalardan dolayı 1980 yılında kimya alanında Nobel ödülü kazanmışlardır.

### **2.3.1 Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi**

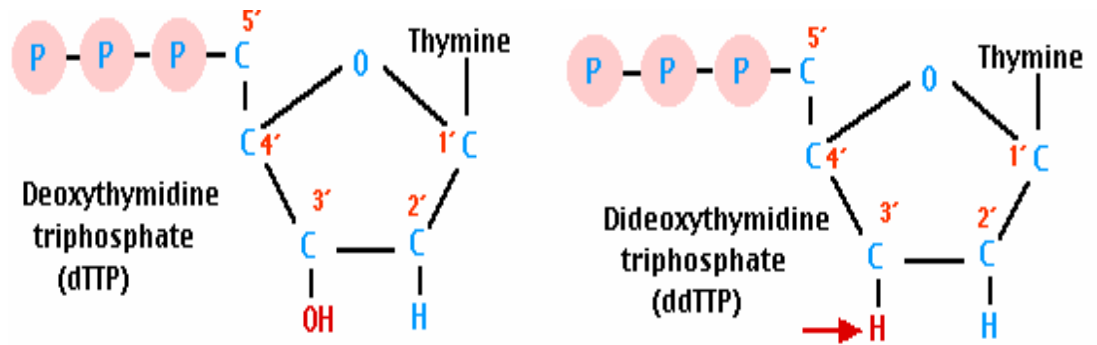
Dideoksi ya da zincir sonlanması reaksiyonları olarak da bilinir. Tehlikeli kimyasallardan uzak ve daha hızlı bir yöntem olduğu için Maxam-Gilbert'in geliştirdiği yöntemden daha fazla kullanım alanı bulmuştur.

Enzimatik DNA sentezine dayanan Sanger'in DNA dizi analizi yönteminde, dizisi saptanacak olan DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır. Sentez reaksiyonu DNA polimeraz 1 ile kataliz edilir. Yöntemde, kimyasal değişikliğe uğratılmış (modifiye) dideoksinükleotid trifosfatlar kullanılarak bir dizi DNA parçacıkları elde edilir.

Reaksiyon sonunda oluşacak ürünlerin rahat görüntülenebilmesi için ortama radyoaktif  $P^{32}$ ,  $S^{35}$  veya  $P^{33}$  eklenir. İşaretleme primerlerle yapılabileceği gibi ortama eklenen dNTP'lerden birinin radyoaktif olması da yeterlidir.

Deneyde dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir reaksiyon karışımı, kalıp DNA zinciri, bir primer, nükleozit trifosfatlar (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ve az miktarda dideoksiribonükleozit trifosfatlardan sadece birini içerir. Zincir sonlanması için dört reaksiyon tüpünde farklı bir dideoksiribonükleozit trifosfat bulunur (Klug ve Cummings 2002).

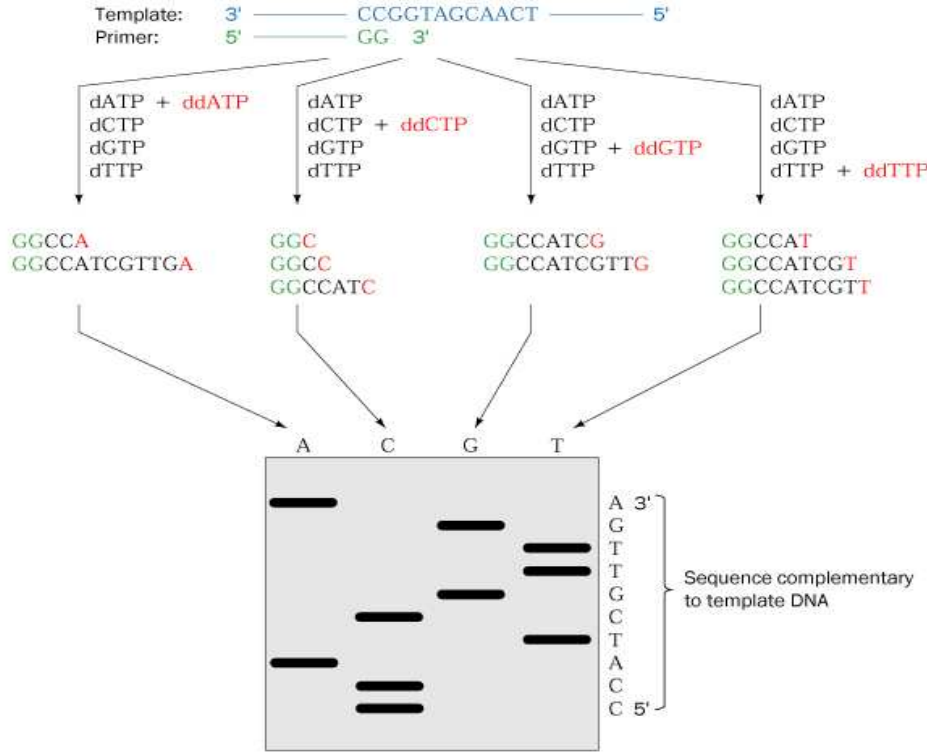
DNA sentezi gerçekleşirken polimeraz, uzayan zincire deoksiribonükleotidlerin yerine ara sıra dideoksinükleotit katar. Dideoksinükleotid yapısında 3'-OH grubu içermediği için bir sonraki nükleotid ile fosfodiester bağı oluşturamaz ve bu nedenle DNA sentezi sonlanır (Şekil 2.3). Örneğin ddATP'nin olduğu tüpte, polimeraz enzimi dATP yerine ddATP'yi zincire katınca zincirin uzaması sonlanır. Reaksiyon ilerledikçe ddATP tüpünde A'nın bulunduğu her konumda sonlanmış olan DNA molekülleri elde edilir. Diğer tüplerde reaksiyonlar sırasıyla G, C ve T'de sonlanır.



Şekil 2.3 Deoksitimidin trifosfat (dTTP) ve dideoksitimidin trifosfat (ddTTP) molekülleri (<http://www.genetiklab.com>)

Her bir reaksiyon tüpündeki DNA parçaları jel elektroforezinde yan yana yüklenerek ayrıştırılır. Sonuçta jelin üstüne konan filmin banyo edilmesiyle bantların merdivene benzer bir görüntüsü ortaya çıkar. Aşağıdan yukarı doğru okunan nükleotid dizisi,

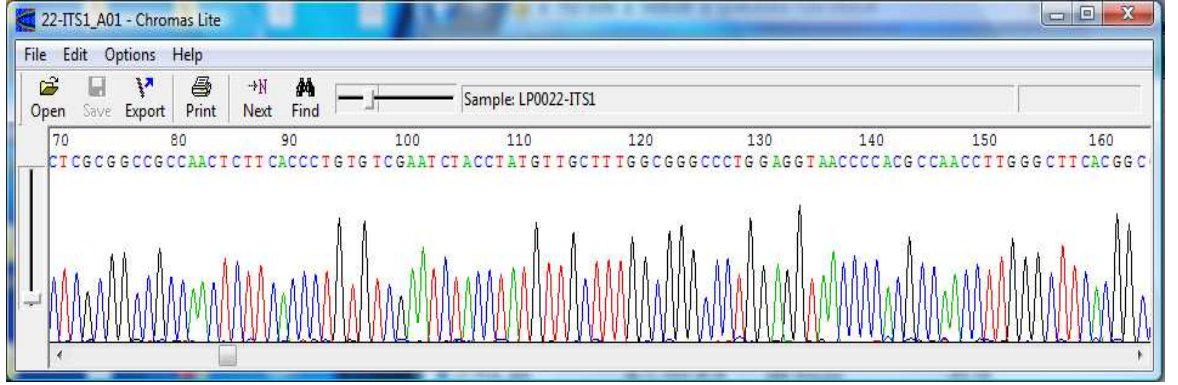
kalıba komplementer olan DNA zincirinin 5'-3' yönündeki dizisine karşılık gelir (Şekil 2.4).



Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Şekil 2.4 Sanger-Coulson'un zincir sonlandırma yöntemi ([www.abgeder.org/Bio1Behnan](http://www.abgeder.org/Bio1Behnan))

Genomların dizi analizi için otomatik DNA dizi analizi cihazları ve radyoaktif izotop yerine floresan boyalar kullanılır. Bu işlemde dört dideoksinükleotid analoglarında her biri farklı floresan boya ile işaretlenmiştir. Örneğin adenozin ile sonlanan zincirler, bir renkte iken, sitozin ile sonlanan zincirler başka bir renktedir ve bu şekilde dört ayrı renk bulunur. Tüm işaretli dideoksinükleotidler tek bir tüpe ilave edilir ve primerler DNA polimerazla uzadıktan sonra, reaksiyon ürünleri jelin tek bir kuyucuğuna yüklenir. Jel lazer ışık kaynağı ile taranarak her bandın farklı renkte ışımaya vermesi sağlanır. Dizi makinesine bağlı bir dedektör her bandın rengini okur ve A, T, C ve G'den hangisinin olduğunu saptar. Cihazın yazıcısından her biri bir nükleotide karşılık gelen renkli pikler elde edilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Çalışılan 22 numaralı örneğe ait DNA dizi analizi sonucu

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Liken Materyali

Çalışmada kullanılan; *Lecidea*, *Lecidella*, *Porpidia* ve *Rhizocarpon* cinslerine ait toplam 29 örnek, Erciyes Üniversitesi Öğretim Üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Mehmet Gökhan HALICI tarafından Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmıştır. Örnek isimleri ve toplandığı lokaliteler Çizelge 3.1'de yer almaktadır.

Çizelge 3.1 Örneklerinin adları ve lokaliteleri

| Örnek No | Tür Adı                                       | Lokalite             |
|----------|---|----------------------|
| 1        | <i>Lecidea fuscoatra</i>                      | Ankara Beynam Ormanı |
| 2        | <i>Lecidella patavina</i>                     | Gürün                |
| 3        | <i>Lecidella stigmatae</i>                    | Aladağlar            |
| 4        | <i>Lecidella patavina</i>                     | Trabzon              |
| 5        | <i>Lecidella carpathica</i>                   | Konya                |
| 6        | <i>Lecidea fuscoatra</i>                      | Konya                |
| 7        | <i>Lecidea tessellata</i>                     | Aladağlar            |
| 8        | <i>Lecidella patavina</i>                     | Aladağlar            |
| 9        | <i>Lecidella elaeochroma</i>                  | Aladağlar            |
| 10       | <i>Lecidella stigmatae</i>                    | Rize                 |
| 11       | <i>Porpidia macrocarpa</i>                    | Rize                 |
| 12       | <i>Lecidella stigmatae</i>                    | Rize                 |
| 13       | <i>Porpidia cinereoatra</i>                   | Trabzon              |
| 14       | <i>Porpidia musiva</i>                        | Trabzon              |
| 15       | <i>Lecidella carpathica</i>                   | Trabzon              |
| 16       | <i>Lecidea fuscoatra</i> var. <i>grisella</i> | Trabzon              |
| 17       | <i>Porpidia macrocarpa</i>                    | Rize                 |
| 18       | <i>Porpidia crustulata</i>                    | Trabzon              |

|      |   |           |
|------|---|-----------|
| 19   | <i>Lecidella elaeochroma</i>                  | Trabzon   |
| 20   | <i>Lecidea fuscoatra</i>                      | Bilecik   |
| 21   | <i>Porpidia crustulata</i>                    | Rize      |
| 22   | <i>Lecidella stigmatae</i>                    | Aladağlar |
| 23   | <i>Lecidella elaeochroma</i>                  | Bakırdağı |
| 24   | <i>Lecidea fuscoatra</i>                      | Konya     |
| 25   | <i>Lecidella carpathica</i>                   | Konya     |
| 26   | <i>Lecidea fuscoatra</i> var. <i>grisella</i> | Trabzon   |
| RP 1 | <i>Rhizocarpon petraeum</i>                   | Trabzon   |
| RP 2 | <i>Rhizocarpon lavatum</i>                    | Rize      |
| RP 3 | <i>Rhizocarpon lavatum</i>                    | Trabzon   |

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için Aras ve Cansaran (2006) tarafından rapor edilmiş olan metot kullanılmıştır. Bu metoda göre:

- İzole edilecek olan bitki yapraklarından 0.1g alınarak sıvı azotta toz haline gelinceye kadar ezilir.
- Örneklere 1ml ekstraksiyon tamponu (50 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM EDTA, 10 ml LiCl (4 M), %1 CTAB, %2 PVPP) eklenir.
- Örnekler 1.5 ml' lik ependorf tüplerine koyulduktan sonra üzerine % 0.2 β-merkaptoetanol eklenir.
- Örnekler 65°C'de 15 dk sıcak su banyosunda inkübe edilir.
- İnkübasyon periyodunu takiben örnekler oda sıcaklığında soğutulup üzerine 0.5 ml kloroform/izoamil alkol (24:1 [v/v]) eklenerek yavaşça karıştırılır.
- Daha sonra örnekler 14,000 rpm'de 2dk santrifüj edilir ve süpernatant temiz bir tüpe transfer edilir.

- Süpernatanta eşit hacimde isopropanol eklenerek birkaç kez ters düz edilerek karıştırılır. DNA ürününün etkinliğini arttırabilmek için örnekler buz üzerinde 15 dk inkübasyona bırakılır.
- Örnekler 14,000 rpm'de 2 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant uzaklaştırılır.
- %70'lik etanol eklenir.
- Örnekler 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir.
- Örnekler %70'lik etanol ile tekrar yıkanır ve etanol uzaklaşana kadar oda koşullarında kurutulur.
- Elde edilen pellet TE (Tris – EDTA) tamponu içinde çözülür (30-60 µl).
- 10 mg/ml RNaz eklenerek 37°C' de 30dk bekletilir ve kullanılabileceği kadar -20 °C'de saklanır.

Elde edilen DNA örneklerinin miktar tayinleri (260 nm) ve saflık dereceleri (260 nm/280 nm) spektrofotometrik (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) ölçümler ile belirlenmiş (Çizelge 4.2), ayrıca DNA kalitesi etidyum bromür varlığında %1'lik agaroz jelde de görüntülenmiştir (Şekil 4.1).

### 3.2.2 PCR analizleri

Mantar DNA'sına ait ITS F1 (CGAAGCCAGTGGCCTAACCC; Gardes ve Bruns 1993) ve evrensel ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC; White vd. 1990) primerleri kullanılarak 50 µl toplam hacim içerisinde, Biometra markalı Thermocycler cihazında aşağıdaki bileşen ve koşullarda PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2 PZR karışımı

| Bileşenler                  | Final Konsantrasyonu | Miktar (µL) |
|-----------------------------|----------------------|-------------|
| PCR Tamponu                 | 10X                  | 5           |
| dNTP karışımı               | 0,1 mM               | 5           |
| MgCl <sub>2</sub>           | 2,5 mM               | 5           |
| ITS 1F                      | 0,8 µM               | 4           |
| ITS 4                       | 0,8 µM               | 4           |
| Taq Polimeraz (Fermentas)   | 0,5 ünite/µL         | 0,5         |
| DNA                         | 200 pg/µL            | 5           |
| ddH <sub>2</sub> O (Steril) | -                    | 21,5        |

Çizelge 3.3 PZR döngü şartları

| Sıcaklık (°C)                 | Zaman      | Döngü Sayısı |
|-------------------------------|------------|--------------|
| 105 (Kapak sıcaklığı)         | ∞          | -            |
| 94 (DNA'nın ön denatürasyonu) | 3 dakika   | 1            |
| 94 (DNA'nın denatürasyonu)    | 30 saniye  |              |
| 52-54 (Bağlanma sıcaklığı)    | 1 dakika   | 35           |
| 72 (Uzama safhası)            | 1.5 dakika |              |
| 72 (Final uzama)              | 8 dakika   | 1            |
| 4 (Bekleme sıcaklığı)         | ∞          | -            |

### 3.2.3 Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünleri ve DNA belirteçleri (DNA Ladder Plus, Fermentas, 100 bp) % 1.6'lık agaroz (AppliChem), 0,5 µl/ml etidyum bromür içeren jellerde, 1xTBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu içerisinde, 100 voltta 2 saat elektroforetik ayrıma tabi tutulmuştur. Jel görüntüleme sisteminde (Gene Genius, Syngene), UV ışığı altında görüntülenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir (GyneSnap Software, Synoptics Ltd.).

### **3.2.4 DNA dizi analizi**

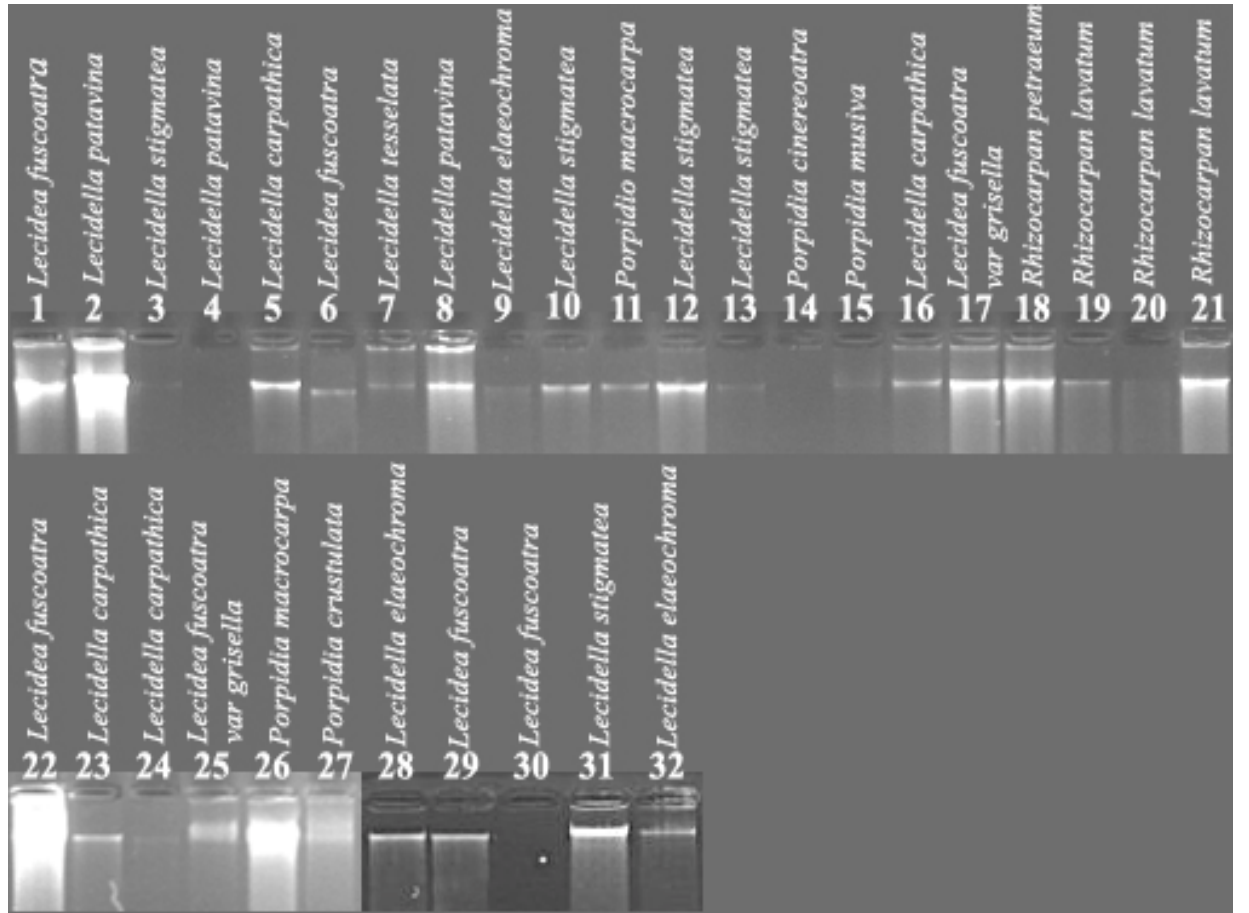
DNA dizi analizi ODTÜ Teknokent'te bulunan Refgen firması tarafından, 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems HITACHI) cihazında gerçekleştirilmiştir.

ITS1F ve ITS 4 primerleri ile küçük alt ünitenin sonu, ITS1, 5.8 geni, ITS2 ve büyük alt ünitenin ucunu içeren bölge çoğaltılıp dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Olası okuma hataları Cluster X programı ile çözülmüştür. Diziler sıralandıktan sonra kararsız kalınan bölgeler çıkartılarak kayıp veri olarak değerlendirilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1 DNA İzolasyonu

Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış, *Lecidea*, *Lecidella*, *Porpidia* ve *Rhizocarpon* cinslerine ait toplam 29 farklı örneğe yapılan DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezinde gözlenebilen bantları Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Çalışılan örneklerden DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA bantlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü

Çizelge 4.1 Çalışılan örneklerin DNA izolasyon sonucu

| Kuyu | Örnek ismi (Lokalite)  |
|------|--|
| 1    | 1. <i>Lecidea fuscoatra</i> (Ankara Beynam Ormanı)*          |
| 2    | 2. <i>Lecidella patavina</i> (Gürün)*                        |
| 3    | 3. <i>Lecidella stigmatea</i> (Aladağlar)                    |
| 4    | 4. <i>Lecidella patavina</i> (Trabzon)                       |
| 5    | 5. <i>Lecidella carpathica</i> (Konya)*                      |
| 6    | 6. <i>Lecidea fuscoatra</i> (Konya)*                         |
| 7    | 7. <i>Lecidea tessellata</i> (Aladağlar)                     |
| 8    | 8. <i>Lecidella patavina</i> (Aladağlar)*                    |
| 9    | 9. <i>Lecidella elaeochroma</i> (Aladağlar)                  |
| 10   | 10. <i>Lecidella stigmatea</i> (Rize)                        |
| 11   | 11. <i>Porpidia macrocarpa</i> (Rize)                        |
| 12   | 12. <i>Lecidella stigmatea</i> (Rize)*                       |
| 13   | 12. <i>Lecidella stigmatea</i> (Rize)*                       |
| 14   | 13. <i>Porpidia cinereoatra</i> (Trabzon)                    |
| 15   | 14. <i>Porpidia musiva</i> (Trabzon)*                        |
| 16   | 15. <i>Lecidella carpathica</i> (Trabzon)                    |
| 17   | 16. <i>Lecidea fuscoatra</i> var. <i>grisella</i> (Trabzon)* |
| 18   | RP1. <i>Rhizocarpon petraeum</i> (Trabzon)*                  |
| 19   | RP2. <i>Rhizocarpon lavatum</i> (Rize)*                      |
| 20   | RP3. <i>Rhizocarpon lavatum</i> (Trabzon)                    |
| 21   | RP3. <i>Rhizocarpon lavatum</i> (Trabzon)*                   |
| 22   | 24. <i>Lecidea fuscoatra</i> (Konya)*                        |
| 23   | 25. <i>Lecidella carpathica</i> (Konya)                      |
| 24   | 25. <i>Lecidella carpathica</i> (Konya)                      |
| 25   | 26. <i>Lecidea fuscoatra</i> var. <i>grisella</i> (Trabzon)* |
| 26   | 17. <i>Porpidia macrocarpa</i> (Rize)*                       |
| 27   | 18 <i>Porpidia crustulata</i> (Trabzon)*                     |
| 28   | 19. <i>Lecidella elaeochroma</i> (Trabzon)*                  |
| 29   | 20. <i>Lecidea fuscoatra</i> (Bilecik)*                      |

|    |   |
|----|---|
| 30 | 21. <i>Porpidia crustulata</i> (Rize)         |
| 31 | 22. <i>Lecidella stigmatea</i> (Aladağlar)*   |
| 32 | 23. <i>Lecidella elaeochroma</i> (Bakırdağı)* |

\* dizi analizinde sonuç veren örnekler

Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1’de gösterildiği üzere DNA izolasyonu sonucunda, her örneğe ait DNA elde edilememiştir. 12, RP3 ve 25 ile numaralandırılmış, sırasıyla *Lecidea stigmatea* (Rize), *Rhizocarpon lavatum* (Trabzon) ve *Lecidella carpathica* (Konya) örnekleri için, iki kez DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

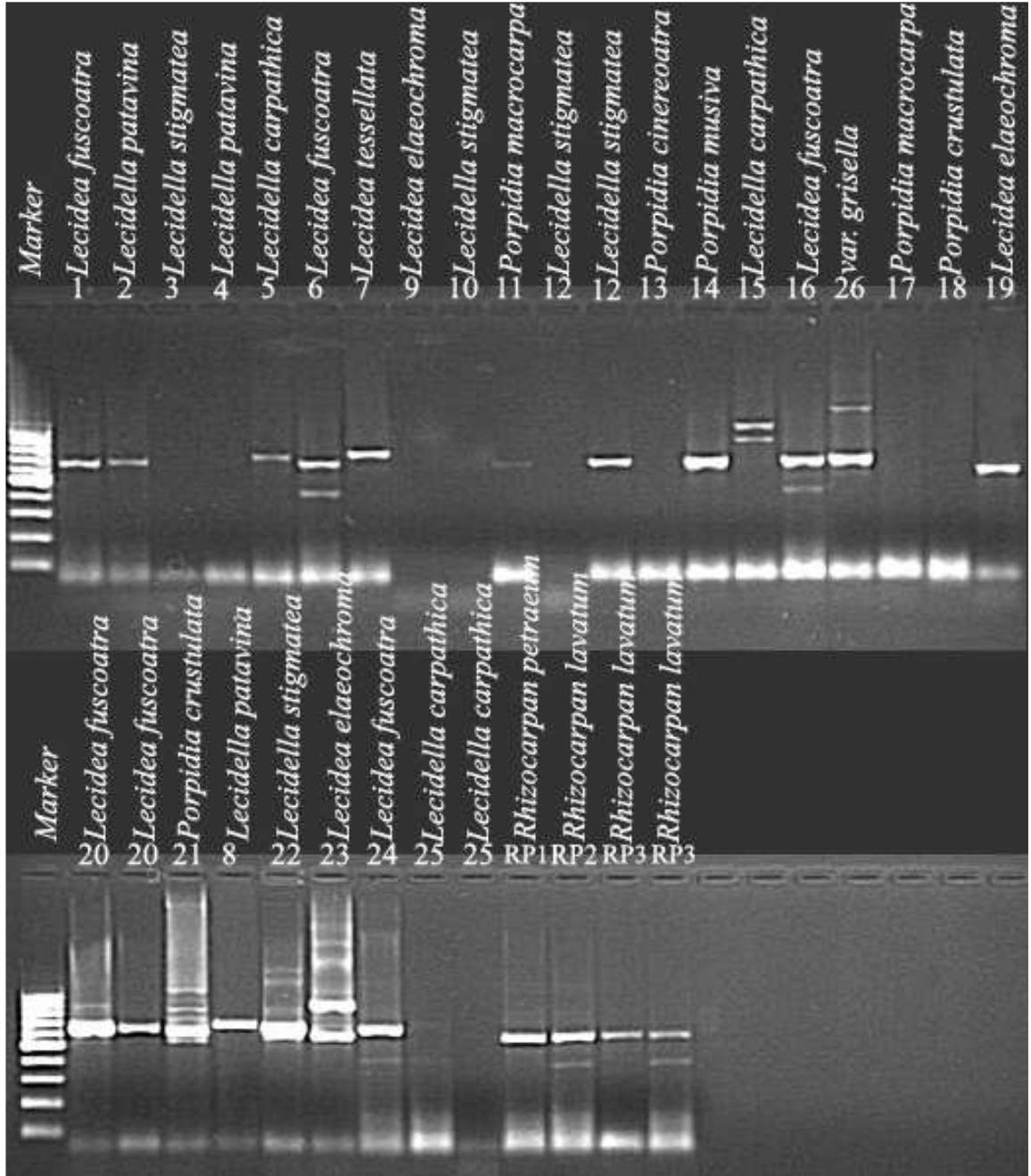
Çizelge 4.2 DNA konsantrasyonları ve oranları

| Sample ID | ng/ul  | A260   | A280   | 260/280 | 260/230 |
|-----------|--------|--------|--------|---------|---------|
| 1         | 522.5  | 10.45  | 6.06   | 1.72    | 0.69    |
| 2         | 557.75 | 11.155 | 7.166  | 1.56    | 0.7     |
| 3         | 69.08  | 1382   | 1589   | 0.87    | 0.1     |
| 4         | 153.84 | 3.077  | 2.644  | 1.16    | 0.24    |
| 5         | 157.68 | 3.154  | 2.694  | 1.17    | 0.25    |
| 6         | 51.72  | 10.34  | 1275   | 0.81    | 0.13    |
| 7         | 171.43 | 3.429  | 2.832  | 1.21    | 0.3     |
| 8         | 251.52 | 5.03   | 3.586  | 1.4     | 0.41    |
| 9         | 174.59 | 3.492  | 2.195  | 1.59    | 0.23    |
| 10        | 219.2  | 4.384  | 3.169  | 1.38    | 0.28    |
| 11        | 168.59 | 3.372  | 2.803  | 1.2     | 0.22    |
| 12        | 196.29 | 3.926  | 2.676  | 1.47    | 0.25    |
| 13        | 34.09  | 0.682  | 1163   | 0.59    | 0.08    |
| 14        | 95.67  | 1.913  | 1922   | 1       | 0.17    |
| 15        | 112.34 | 2.247  | 2.066  | 1.09    | 0.21    |
| 16        | 338.7  | 6.774  | 5.016  | 1.35    | 0.46    |
| 17        | 515.76 | 10.315 | 6.388  | 1.61    | 0.71    |
| 18        | 264.59 | 5.292  | 3.696  | 1.43    | 0.36    |
| 19        | 210.51 | 4.21   | 2.901  | 1.45    | 0.44    |
| 20        | 460.39 | 9.208  | 6.172  | 1.49    | 0.71    |
| 21        | 389.4  | 7.788  | 5.17   | 1.51    | 0.69    |
| 22        | 465.47 | 9.309  | 5.665  | 1.64    | 0.67    |
| 23        | 192.68 | 3.854  | 2.789  | 1.38    | 1.39    |
| 24        | 490.3  | 9.806  | 5.804  | 1.69    | 0.89    |
| 25        | 247.32 | 4.946  | 3.971  | 1.25    | 0.4     |
| 26        | 109.8  | 2.196  | 2.103  | 1.04    | 0.19    |
| RP1       | 360.36 | 7.207  | 4.361  | 1.65    | 0.62    |
| RP2       | 231.19 | 4.624  | 3.348  | 1.38    | 0.38    |
| RP3       | 933.5  | 18.67  | 13.016 | 1.43    | 0.52    |

DNA izolasyonu sonucunda *Porpidia cinereoatra* (Trabzon) örneğinden 34.09 ng/μl ile en az miktarda DNA elde edilirken, *Rhizocarpon lavatum* (Trabzon) örneğinden 933.5 ng/μl ile en fazla miktarda DNA elde edilmiştir. DNA'ların saflığı (A260/280 absorpsiyon oranı), 0.59- 1.72 aralığında değişmektedir (Çizelge 4.2).

#### **4.2 PZR Analizleri**

DNA izolasyonu yapılan örneklerin, ITS bölgelerini çoğaltmak için PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. İlk denemede PZR döngü şartlarındaki, bağlanma sıcaklığı 52 °C olarak denenmiştir. Bu işlem sonucunda çoğaltılan DNA'ların, agaroz jel elektroforezinde gözlenen bantları Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Çalışılan türlerin, 52 °C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen PZR sonucunda elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü

Çizelge 4.3 Çalışılan türlerinin 52 °C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen PZR sonuçları

| Örnek no: | Örnek ismi (Lokalite)                                   |
|-----------|---|
| 1         | <i>Lecidea fuscoatra</i> (Ankara Beynam Ormanı)*        |
| 2         | <i>Lecidella patavina</i> (Gürün)*                      |
| 3         | <i>Lecidella stigmatea</i> (Aladağlar)                  |
| 4         | <i>Lecidella patavina</i> (Trabzon)                     |
| 5         | <i>Lecidella carpathica</i> (Konya)*                    |
| 6         | <i>Lecidea fuscoatra</i> (Konya)                        |
| 7         | <i>Lecidea tessellata</i> (Aladağlar)                   |
| 9         | <i>Lecidella elaeochroma</i> (Aladağlar)                |
| 10        | <i>Lecidella stigmatea</i> (Rize)                       |
| 11        | <i>Porpidia macrocarpa</i> (Rize)                       |
| 12        | <i>Lecidella stigmatea</i> (Rize)                       |
| 12        | <i>Lecidella stigmatea</i> (Rize)*                      |
| 13        | <i>Porpidia cinereoatra</i> (Trabzon)                   |
| 14        | <i>Porpidia musiva</i> (Trabzon)*                       |
| 15        | <i>Lecidella carpathica</i> (Trabzon)                   |
| 16        | <i>Lecidea fuscoatra</i> var. <i>grisella</i> (Trabzon) |
| 26        | <i>Lecidea fuscoatra</i> var. <i>grisella</i> (Trabzon) |
| 17        | <i>Porpidia macrocarpa</i> (Rize)                       |
| 18        | <i>Porpidia crustulata</i> (Trabzon)                    |
| 19        | <i>Lecidella elaeochroma</i> (Trabzon)*                 |
| 20        | <i>Lecidea fuscoatra</i> (Bilecik)                      |
| 20        | <i>Lecidea fuscoatra</i> (Bilecik)*                     |
| 21        | <i>Porpidia crustulata</i> (Rize)                       |
| 8         | <i>Lecidella patavina</i> (Aladağlar)*                  |
| 22        | <i>Lecidella stigmatea</i> (Aladağlar)                  |
| 23        | <i>Lecidella elaeochroma</i> (Bakırdağı)                |
| 24        | <i>Lecidea fuscoatra</i> (Konya)                        |
| 25        | <i>Lecidella carpathica</i> (Konya)                     |

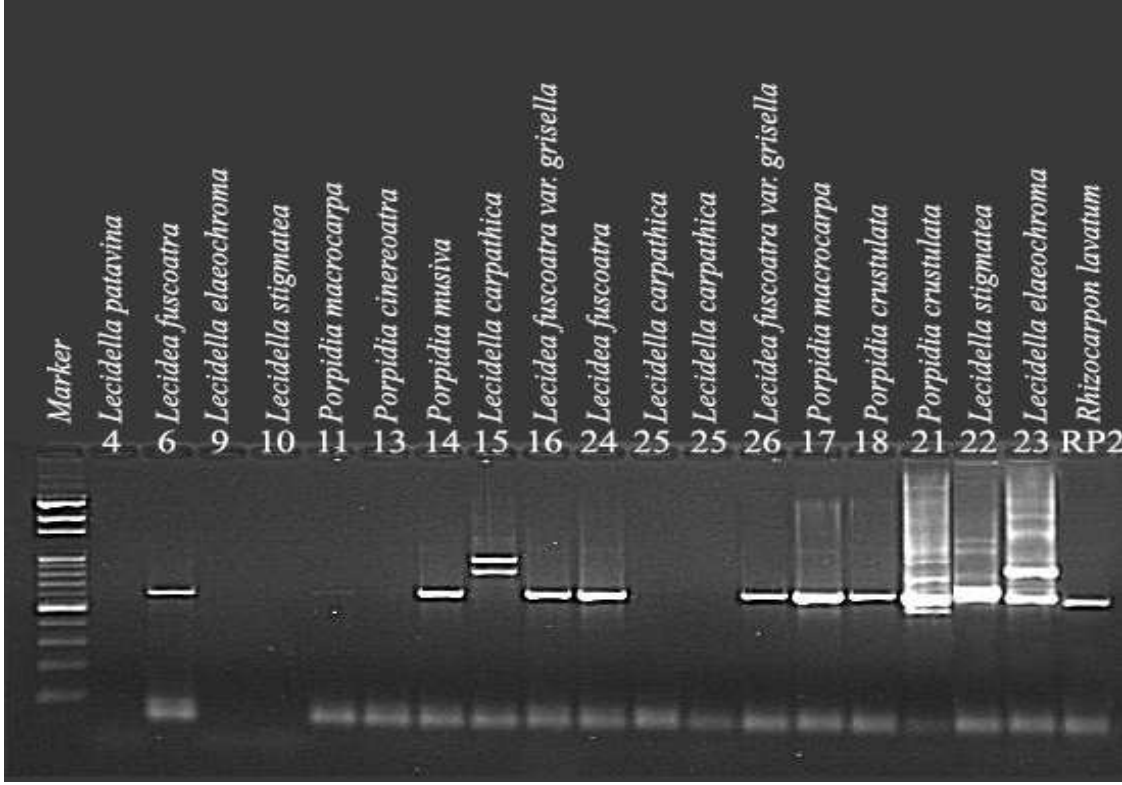
Çizelge 4.3 Çalışılan türlerinin 52 °C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen PZR sonuçları (devamı)

|     |  |
|-----|--|
| 25  | <i>Lecidella carpathica</i> (Konya)    |
| RP1 | <i>Rhizocarpon petraeum</i> (Trabzon)* |
| RP2 | <i>Rhizocarpon lavatum</i> (Rize)      |
| RP3 | <i>Rhizocarpon lavatum</i> (Trabzon)*  |
| RP3 | <i>Rhizocarpon lavatum</i> (Trabzon)   |

\* dizi analizinde sonuç veren örnekler

Bağlanma sıcaklığının 52 °C olarak denendiği PZR koşullarında, 1, 2, 5, 7, 8, 11,12, 14, 19, 20, RP1 ve RP3 olarak numaralandırılan örneklerden tek bant elde edilmiştir (Şekil 4.2, Çizelge 4.3). 11 numaralı *Porpidia macrocarpa* (Rize) örneğinde, elde edilen bandın istenen kalitede olmaması nedeniyle dizi analiz sonucuna ulaşamamıştır. 7 numaralı *Lecidea tessellata* (Aladağlar) örneğinde, dizi analizinin değerlendirilmesi aşamasında pikler iyi ayırt edilemediğinden, örneğin dizisi elde edilememiştir. Diğer örneklerin dizi analiz sonucuna ulaşılmıştır.

PZR sonucunda, bazı örneklerin ITS bölgeleri elde edilemezken, bazı örneklerde de ITS bölgesi dışında istenmeyen, özgül olmayan bantlar gözlenmiştir.



Şekil 4.3 54°C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen PZR sonucunda elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü

Çizelge 4.4 54°C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen PZR sonuçları

| Örnek no | Örnek ismi (Lokalite)                             |
|----------|---|
| 4        | <i>Lecidella patavina</i> (Trabzon)               |
| 6        | <i>Lecidea fuscoatra</i> (Konya)*                 |
| 9        | <i>Lecidella elaeochroma</i> (Aladağlar)          |
| 10       | <i>Lecidella stigmatea</i> (Rize)                 |
| 11       | <i>Porpidia macrocarpa</i> (Rize)                 |
| 13       | <i>Porpidia cinereoatra</i> (Trabzon)             |
| 14       | <i>Porpidia musiva</i> (Trabzon)*                 |
| 15       | <i>Lecidella carpathica</i> (Trabzon)             |
| 16       | <i>Lecidea fuscoatra var. grisella</i> (Trabzon)* |
| 24       | <i>Lecidea fuscoatra</i> (Konya)*                 |
| 25       | <i>Lecidella carpathica</i> (Konya)               |
| 25       | <i>Lecidella carpathica</i> (Konya)               |

Çizelge 4.4 54 °C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen PZR sonuçları (devamı)

|     |  |
|-----|--|
| 26  | <i>Lecidea fuscoatra</i> var. <i>grisella</i> (Trabzon)* |
| 17  | <i>Porpidia macrocarpa</i> (Rize)*                       |
| 18  | <i>Porpidia crustulata</i> (Trabzon)*                    |
| 21  | <i>Porpidia crustulata</i> (Rize)                        |
| 22  | <i>Lecidella stigmatea</i> (Aladağlar)*                  |
| 23  | <i>Lecidella elaeochroma</i> (Bakırdağı)*                |
| RP2 | <i>Rhizocarpon lavatum</i> (Rize)*                       |

\* dizi analizinde sonuç veren örnekler

Bağlanma sıcaklığının 54 °C olarak denendiği PZR koşullarında, 6, 11, 14, 16, 17, 18, 24, 26 ve RP2 olarak numaralandırılan örneklerden tek bant elde edilmiştir. 11 numaralı örnekte elde edilen bant yine istenen kalitede değildir. İlk PZR denemesindeki primerlerin özgül olmayan bölgelere bağlanıp, o bölgeleri çoğaltmaları, 6 numaralı *Lecidea fuscoatra* (Konya), 16 numaralı *Lecidea fuscoatra* var. *grisella* (Trabzon), 24 numaralı *Lecidea fuscoatra* (Konya), 26 numaralı *Lecidea fuscoatra* var. *grisella* (Trabzon) ve RP2 numaralı *Rhizocarpon lavatum* (Rize) örneklerinde engellenmiş, ancak 15 numaralı *Lecidella carpathica* (Trabzon), 21 numaralı *Porpidia crustulata* (Rize), 22 numaralı *Lecidella stigmatea* (Aladağlar) ve 23 numaralı *Lecidella elaeochroma* (Bakırdağı) örneklerinde spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçilememiştir. Bunların arasından 22 ve 23 numaralı örneklere ait istenen DNA bandı, jelden kesilerek saflaştırılmış ve dizilerine ulaşılmıştır. 15 numaralı örnekte jelde istenen bölgede bant elde edilemediğinden, 21 numaralı örnekte ise elde edilen bantların birbirine yakın olması nedeniyle, istenen DNA bölgesinin jelden izolasyonu mümkün olmadığından, bu örneklerin dizilerine ulaşamamıştır.

### 4.3 DNA Dizi Analizi

*Lecidea*, *Lecidella*, *Porpidia* ve *Rhizocarpon* cinslerine ait toplam 19 örnek Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmıştır. Çizelge 4.5'te de gösterildiği gibi 14 tanesi de Gen Bankasından alınmıştır. Çalışılan türlerde ilgili bölgenin DNA dizisinden sıralanabilir 979 nükleotid elde edilmiştir. Bu bölgelerden 233 nükleotidin sabit (C), 666 nükleotidin değişken (V) olduğu bulunmuştur. Değişken bölgelerden 349 nükleotidlik bölgenin ise parsimoni informatif olduğu analizler sonucu ortaya çıkmıştır. Çalışmada kullanılan örneklerin ITS bölgelerinin sıralanmış sekansı Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 Çalışmada kullanılan örneklerin ITS bölgelerinin sıralanmış DNA sekansı

|          |  |
|----------|--|
| 19       | -----  |
| 23       | -----  |
| LD3      | -----  |
| LD5      | -----  |
| 2        | -----  |
| 1        | -----  |
| 20       | -----  |
| 16       | -----  |
| 26       | -----  |
| 6        | -----  |
| 24       | -----  |
| 17       | -----  |
| 18       | -----  |
| 14       | -----  |
| LC2      | -----  |
| LC3      | -----  |
| LC1      | -----  |
| RP1      | -----  |
| RC4      | -----  |
| RC5      | -----  |
| RP3      | -----  |
| RC3      | -----  |
| RP2      | -----  |
| RC1      | -----  |
| RC2      | -----  |
| 8        | -----  |
| LD2      | GAATTCAGTAGTGATTCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA |
| LD4      | -----  |
| 22       | -----  |
| 12       | -----  |
| LD1      | -----  |
| 5        | -----  |
| Dış Grup | -----  |
| 19       | -----  |
| 23       | -----  |
| LD3      | -----  |
| LD5      | -----  |
| 2        | -----  |
| 1        | -----  |
| 20       | -----  |
| 16       | -----  |
| 26       | -----  |

Çizelge 4.5 Çalışmada kullanılan örneklerin ITS bölgelerinin sıralanmış DNA sekansı (devamı)

6 -----  
 24 -----  
 17 -----  
 18 -----  
 14 -----  
 LC2 -----  
 LC3 -----  
 LC1 -----  
 RP1 -----  
 RC4 -----  
 RC5 -----  
 RP3 -----  
 RC3 -----  
 RP2 -----  
 RC1 -----  
 RC2 -----  
 8 -----  
 LD2 GGTGGTTTGCCTGTCGGATCCCCCGCAGCGACTCTAAAGAACTGCGCCAGTCGGGCTCC  
 LD4 -----  
 22 -----  
 12 -----  
 LD1 -----GCATTGAATCTGCCCTTTCTAGGCAGGTGACACTCGTCTGTTGCTGGA  
 5 -----  
 Dış Grup -----

19 -----  
 23 -----  
 LD3 -----  
 LD5 -----  
 2 -----  
 1 -----  
 20 -----  
 16 -----  
 26 -----  
 6 -----  
 24 -----  
 17 -----  
 18 -----  
 14 -----  
 LC2 -----  
 LC3 -----  
 LC1 -----  
 RP1 -----  
 RC4 -----  
 RC5 -----  
 RP3 -----  
 RC3 -----  
 RP2 -----  
 RC1 -----  
 RC2 -----  
 8 -----AGCCCCCTATGTGGGGG-CTAC  
 LD2 CATCTCGAAGCCTGGCGACGCCATCAGTCTGGCTGGGAGCCCCCTACGCGGGGGGCCAC  
 LD4 -----  
 22 -----  
 12 -----  
 LD1 AGTAAGCCTCCTGCTGGAGTTAATCAGCTGCCATCCTCTGGCCCACAGATCAAACACGAG  
 5 -----  
 Dış Grup -----

19 -----  
 23 -----  
 LD3 -----  
 LD5 -----  
 2 -----  
 1 -----  
 20 -----  
 16 -----  
 26 -----  
 6 -----  
 24 -----

Çizelge 4.5 Çalışmada kullanılan örneklerin ITS bölgelerinin sıralanmış DNA sekansı (devamı)

17 -----  
 18 -----  
 14 -----  
 LC2 -----  
 LC3 -----  
 LC1 -----  
 RP1 -----  
 RC4 -----  
 RC5 -----  
 RP3 -----  
 RC3 -----  
 RP2 -----  
 RC1 -----GAATTCAGTAGTATTCTTGG  
 RC2 -----CTTGG  
 8 CAGCAGCTCCTTCCGGAGTCCACAGATCAAACGATGAGCGGCCGCAACACTGCGGTTTCAG  
 LD2 CAGCAGCTCCTTCCGGAGTCCACAGATCAAACGATGAGCGGCCGCTCCACTGCGGTTTCAG  
 LD4 -----  
 22 -----  
 12 -----  
 LD1 TGGCCCGCGGGCACCGCCGATCATTTGATTTCGGTCTGGCTCCCCGGGTTGAGATATGAC  
 5 -----  
 D15 Grup -----

19 -----TAGTTCGTTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA  
 23 -----AACCTGCGGAAGGATCA  
 LD3 -----  
 LD5 -----  
 2 -----GAAGGATCA  
 1 -----GTGAACCTGCGGAAGGATCA  
 20 -----GGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA  
 16 -----AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA  
 26 -----CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA  
 6 -----TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA  
 24 -----GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA  
 17 -----GTGAACCTGCGGAAGGATCA  
 18 -----TGCGGAAGGATCA  
 14 -----GTGAACCTGCGGAAGGATCA  
 LC2 -----CCTGCGGAAGGATCA  
 LC3 -----CCTGCGGAAGGATCA  
 LC1 -----CCTGCGGAAGGATCA  
 RP1 -----AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA  
 RC4 -----  
 RC5 -----  
 RP3 -----TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA  
 RC3 -----  
 RP2 -----TGCGGAAGGATCA  
 RC1 TCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA  
 RC2 TCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA  
 8 ATATGACCGCCCCAGCCTTCATCGGCTGGTGACTTCTTGCGGAACCTGCGGAAGGATCA  
 LD2 ATATGACCGCCCCAGCCTTCATCGGCTGGTGACTTCTTGCGGAACCTGCGGAAGGATCA  
 LD4 -----  
 22 -----AAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA  
 12 -----TGCGGAAGGATCA  
 LD1 CGTAGCAGCCTTGCAAAGGGCTGAAAGACTAGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA  
 5 -----  
 D15 Grup -----TGCGGAAGGATCA

19 TTAATGAGTGAAGGGGCT-CACGCCTCTGGTGGCTTACCGCCGCTGACTCTATACCCT  
 23 TTAATGAATGAAGGGGTTTCGCGCCCCTGGTGGCTTCAATCCCGCCTGACTCTTACCCT  
 LD3 ---ATGAGTGAAGGGGTT-CACGCCCTGGTGGCTTCACTGCCGCTGACTCTTACCCT  
 LD5 ---ATGAGTGA--GGGTT-CACGCCCTGGTGGCTTCACTGCCGCCCCGACTCTTACCCT  
 2 TTAATGAGTGAAGGGGTT-CGCGCCCCTCGTGGTTCGTTGCTGCC-AACTCTATACCCT  
 1 TTAACGAGAGAGAGGGCTT-CGCG-CCTCG-GGGGGCTTCGGCCCCGCC--TCTTACCCT  
 20 TTAACGAGAGAGAGGGCTT-CGCG-CCTCG-GGGGGCTTCGGCCCCGCC--TCTTACCCT  
 16 TTAACGAGAGAGAGGGCTT-CGCG-CCTCG-AGGGGCTTCGGCCCCGCC--TCTTACCCT  
 26 TTAACGAGAGAGAGGGCTT-CGCG-CCTCG-AGGGGCTTCGGCCCCGCC--TCTTACCCT  
 6 TTAACGAGAGAGGGGCT--CGCG-CCCCG--GGGGTTTCGGCCCCGCC--TCTTACCCT  
 24 TTAACGAGAGAGGGGCT--CGCG-CCCCG--GGGGTTTCGGCCCCGCC--TCTTACCCT  
 17 TTACCGAGAGGAGGACTT-CGCGTCCCCG-GGGGGCTTCGGCCCCGC--TCTTACCCT  
 18 TTACCGAGAGGAGGACTT-CGCGTCCCCG-GGGGGCTTCGGCCCCGC--TCTTACCCT

Çizelge 4.5 Çalışmada kullanılan örneklerin ITS bölgelerinin sıralanmış DNA sekansı (devamı)

14 TTAACGAGAGTGGGACCT-CGCGTCCCCC-GGGG-CTTCGGCCCCGAC--TCTTCACCCC  
 LC2 TTAACGAGAGAGGGGCTT-CGCG--CCCC-GGGGGTTTCGGCCCCGCC--TCCTCACCCC  
 LC3 TTAACGAGAGAGGGGCTT-CGCG--CCCC-GGGGGTTTCGGCCCCGCC--TCTTCACCCC  
 LC1 TTAACGAGAGAGGGACTT-CGCG--TCCC-GGGGGTTTCGGCCCCGCC--TCTTCACCCT  
 RP1 TTATTGAGATAGGGG-----CGAAGGCCCCGAA--CCTCCCACCC  
 RC4 ---TCGAGATAGGGG-----CAAACGCCCCGAA--CCTCCCACCC  
 RC5 ---TTGAGATAGGGG-----CTCCGGCCCCGAA--CCTTC-ACCC  
 RP3 TTACCGAGATAGGGG-----CTCCGGCCCCGAA--CCTCCCACCC  
 RC3 ---CCGAGATAGGGG-----CTCCGGCCCCGAA--CCTCCCACCC  
 RP2 TTACCGAGATAGGGG-----CTCCGGCCCCGAA--CCTCCCACCC  
 RC1 TTATCGAGACAAGGGG-----TCCCGGCCCCGAA--CCTCCCACCC  
 RC2 TTATCGAGACAAGGGG-----TCCCGGCCCCGAA--CCTCCCACCC  
 8 TTAATGAGCGAGGGGCTT-CGCGCTCCGG-CGGCTTCGCGGCCGCAA-CTCTTCACCCT  
 LD2 TTAATGAGAGAGGGGCTT-TGCGCTCCGG-CGGCTTCGCGGCCGCAA-CTCTTCACCCT  
 LD4 ---ATGAGAGAGGGGCTTTCGCGCTCCGG-CGGCTTCGCGGCCGCAA-CTCTTCACCCT  
 22 TTAACGAGAGAGGGGCTT-CGCGCCCCGG-CGGCTTCGCGGCCGCAA-CTCTTCACCCT  
 12 TTATTGAGAGCGGGGCTT-CGCGCCCCGGCGGGCTTACCAGCCGCCACCTCTTCACCCT  
 LD1 TTAATGAGTGAAGGGGCT-CACGCCCTGGTGGCTTACCAGCCGCCGACTCTATACCCT  
 5 -----  
 D1ş Grup TTATCGAGTTTT-GACTGGGTTGTAGCTG--GCCTTCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTC

19 GTGCTT-ACATATCTTT-GTTGCTTTGGCGGGCCCTG-AAAGCCCTTTC-ACGCCAGCCC  
 23 GTGTTT-ACATATATTT-GTTGCTTTGGCGGGCCCTG-AAAGCCTTTC-CCGCCA-CCC  
 LD3 GTGCTT-ACATATCTTT-GTTGCTTTGGCGGGCCCTG-GAAGCCTTTC-ACGCCAGCCC  
 LD5 GTGTTT-ACATATCTTT-GTTGCTTTGGCGGGCCCTG-AGGGCTTCTC-ACGCCAGCCT  
 2 GTGCTT-ACGTACCTTT-GTTTCTTTGGCGGGCCACA-GGGTCCATCCCAGCCCGGGCC  
 1 GTGCGT-ACCTAC-TTT-GTTGCTTTGGCGGGCCCTC---GG-TTCCCCGACGTCCGGCC  
 20 GTGCGT-ACCTAC-TTT-GTTGCTTTGGCGGGCCCTC---GG-TTCCCCGACGTCCGGCC  
 16 GTGCGT-ACCTAC-TCA-GTTGCTTTGGCGGGCCCTC---GG-TCCCCCGACGTCCGGCC  
 26 GTGCGT-ACCTAC-TCA-GTTGCTTTGGCGGGCCCTC---GG-TCCCCCGACGTCCGGCC  
 6 GTGCGT-ACCTACCTTT-GTTGCTTCGGCGGGCCCTC---GGTCTCTCCGACGTTGGCCT  
 24 GTGCGT-ACCTACCTTT-GTTGCTTCGGCGGGCCCTC---GGTCTCTCCGACGTTGGCCT  
 17 GTGCGT-ACCCACCTT-GTTGCTTCGGCGCGCGGT---C---CGCGCTGTTGCTCCGG  
 18 GTGCGT-ACCTACCTT-GTTGCTTCGGCGCGCGGT---C---CGCGTACCCGGCCCCGG  
 14 GTGCGT-ACCTACCTT-GTTGCTTCGGCGGGCCCT---CGTTCCGCGCCGCGATGCCCGA  
 LC2 GTGCT-ATCTACCTTT-GTTGCTTTGGCGGGCCCTC---GGTCTCTCCGACGTCCGGCT  
 LC3 GTGCT-ATCTACCTTT-GTTGCTTTGGCGGGCCCTC---GGTCTCTCCGACGTCCGGCT  
 LC1 GTGCGT-ACCTACCTTT-GTTGCTTTGGCGGGCCCTC---GAGTCTCTCGACACCGGCTC  
 RP1 GTGTCA-ACCTAACTTGTGCTTTGGCGGGCCCG---TG---TT-----GGCTGGTCC  
 RC4 GTGTCA-ACCTAACTTGTGCTTTGGCGGGCCCT---GG---CC-----GGCTGGCCC  
 RC5 GTGCTT-ACCCACCTT-GTTGCTTTGGCGGGCCCTG---TG---CGCA---GGCTGCC  
 RP3 GTGTTT-ACCGACCCTT-GTTGCTTTGGCGGGTCCG---TG---CCGACCGGGACCGATC  
 RC3 GTGTTT-ACCGACCCTT-GTTGCTTTGGCGGGTCCG---TG---CCGACCGGGACCGATC  
 RP2 GTGTTT-ACCGACCCTT-GTTGCTTTGGCGGGTCCG---TG---CCGACCGGGACCGATC  
 RC1 GTGTTT-ACCAACCTTTGTTGCTTTGGTGGGCTG---CG---TC-----CGGGTT  
 RC2 GTGTTT-ACCAACCTTTGTTGCTTTGGTGGGCTG---CG---TC-----CGGGTT  
 8 GTGTCTCATCTACCTAT-GTTGCTTTGGCGGGCCCT---GGGGTACCCACGCCAACCT  
 LD2 GTGTCTAACCTACCAT-GTTGCTTTGGCGGGCCCT---GGGGTAACTCAGCCAACCT  
 LD4 GTGTCTAACCTACCTT-GTTGCTTTGGCGGGCCCT---GGGGTAACTCAGCCATCT  
 22 GTGTCTAACCTACCTAT-GTTGCTTTGGCGGGCCCT---GGAGGTAACCCACGCCAACCT  
 12 GTGTCTAACCTACCTT-GTTGCTTTGACGGGCTTAAAGGGGGCAACCCATGCTGTTG  
 LD1 GTGCTT-ACATATCTTT-GTTGCTTTGGCGGGCCCTG---AAACCCCTTTCAGCCAGCCC  
 5 -----ACGGGGCCCTCCCTTCGGGGGGCGA-----TCCTCCATC--TCC  
 D1ş Grup ATCCACTCTACCTGT-GCACTTACTGTGGGTATCAGATCGTGAAGCGTCTCTTTTAC  
 \* \* \*

19 TGAGCCCT--CCGCCTGGGCC-GGCGAGCGCCCGTCAGTAGCCCATAC--AAAACCTT  
 23 TTAACCTT--CCGCTGGGCCCGCAAGCGCCCGTCAGTAGCCCAT--C--AATATCCTT  
 LD3 TGAGCCCT--CCGCCTGGGCC-GGCGAGCGCCCGTCAGTAGCCCATAC--AAAACCTT  
 LD5 TGAGCCCT--TCGCTCGGGCC-GGCGAGTGCAGCCAGCAGCCATC-T--TAAACCTT  
 2 TGAACCTT--CC-CTCAGGAGGGGGCGCCCGTCAAGGGCCCATAC--AA-ATCCTT  
 1 GGGGTTTC-CCCGGGCCGGCCG---CGTGCCCGCCAGAGACCGTACCC---AAACCTG  
 20 GGGGTTTCGCCCCGGCCGGCCG---CGTGCCCGCCAGAGACCGTACCC---AAACCTG  
 16 CGGGAGTC--CCGGCTCGGC---CGTGCCCGCCAGAGACCGTATCG---AAACCTG  
 26 CGGGAGTC--CCGGCTCGGC---CGTGCCCGCCAGAGACCGTATCG---AAACCTG  
 6 GGGGGTTAACCCCGGGCTCGC---CGCGCTCGCCGGAGTCCATTTG---AAACTCTG  
 24 GGGGGTTAACCCCGGGCTCGC---CGCGCTCGCCGGAGTCCATTTG---AAACTCTG  
 17 GGAATCCCCCGGGCTTCGCC-GCGGCCCGCCGGAGGCCTTT--C---AAACCCG  
 18 GGAATCCCCCGGGCTTCGCC-GCGGCCCGCCGGAGGCCTTT--C---AAACCCG  
 14 GGATCATCCCTCAGCCCGC---TGAGCCCGCCGGAGGCCTTT--T---TAACCTG  
 LC2 GGGGGTGA-CCCGGTCGCG---CGCGCCCGCCGAAGGACCTT--C---AAACTCTG  
 LC3 GGGGGCGA-CCCGGTCGCG---CGCGCCCGCCGAAGGACCTT--C---AA-CTCTG

Çizelge 4.5 Çalışmada kullanılan örneklerin ITS bölgelerinin sıralanmış DNA sekansı (devamı)

|          |  |
|----------|--|
| LC1      | GGGGGCGA-CCCCGGGCTCGCG-----CGCGCCCGCCGAAGGACCC---C---AAACTCTG    |
| RP1      | GGCACCCC-CGCT-GCGGGGCG-----CGCCCGCCGAAGGCCTTATCT--AAAACCTTT      |
| RC4      | AGCGCCCC-CGAC-GTGAGGTG-----CGCCCGCCGAAGGCCTC--CC--CACACCTTT      |
| RC5      | GGCACCCC-CCTGAGCGGGGCG-----CGCCCGTCGAGAGCCCCATCA--AAAACCTTT      |
| RP3      | GGTACCCC-CTTAACCGGGGAG-----CGCCCGCCGAAAGCCTGTCCGGTACAAATTCT      |
| RC3      | GGTACCCC-CTTAACCGGGGAG-----CGCCCGCCGAAAGCCTGTCCGGTACAAATTCT      |
| RP2      | GGTACCCC-CTTAACCGGGGAG-----CGCCCGCCGAAAGCCTGTCCGGTACAAATTCT      |
| RC1      | GAAAGCCC-GGCTGCTGCTGCG-----TGCCCGCCAGAAGCCTCCCTG-----AACTCA      |
| RC2      | GAAAGCCC-GGCTGCTGCTGCG-----TGCCCGCCAGAAGCCTCCCTG-----AACTCA      |
| 8        | TGGGCTTC--GCGGCCGGGTGCGTCAGCGCCCGTCGAAGGCCCATCC----AACTCTG       |
| LD2      | TGGGCTTC--GCGGTCCGGTCCGGTCAGCGCCCGTCGAAGGCCCATC-----AACTCTG      |
| LD4      | TGGGCTTC--GCGGCCGGGTGCGTCAGCGCCCGTCGAAGGCCCAT-C----AACTCTG       |
| 22       | TGGGCTTC--ACGGCCGGGTGCGTCAGCGCCCGTCGAAGGCCCAT-C----AATTCTG       |
| 12       | CGGGCTTT--GTTGCCGGGTGCGGCGAGTGCCCGTCAGAGGCCCAATCA----AACTCGT     |
| LD1      | TGAGCCCT---CCGCCTGGGCCGGCAGCGCCCGTCAGTAGCCCATCAC--AAACCCCTT      |
| 5        | CAAACCCCTGTCTATCGACCTCACACACACACTATAGTACACTCAGAGAAGTGCCT         |
| D1ş Grup | CGGAGCTTGTGAAGCGTGTCTGTGCTGCGTTTATCACAACACTATAA-----             |
| 19       | TATATCAGTG-ACGTCCGAGTATCAAAAC---AATTAATAAAAACTTTCAACAACGGAT      |
| 23       | TATATCAGTG-ATGTCCGAGTATCAAAAT---AAATAATAAAAACTTTCAACAACGGAT      |
| LD3      | TATATCAGTG-ATGTCCGAGTATCAATAC---AAATGAATAAAAACTTTCAACAACGGAT     |
| LD5      | CATATCAATG-ACGTCCGAGTATCATATT---CAATAAATAAAAACTTTCAACAACGGAT     |
| 2        | CTTATCAGTG-ACGTCCGAGTATCATATCATAAATGAATAAAAACTTTCAACAACGGAT      |
| 1        | TCCATCAGTGTTTCGTCTGAGTACCAA-GT---AAAT-AACTAAAACCTTTCAACAACGGAT   |
| 20       | TCCATCAGTGTTTCGTCTGAGTACCAA-TG---CAAT-AACTAAAACCTTTCAACAACGGAT   |
| 16       | TTTCATCAGTGTCGTCTGAGTACCAA-TT---CAAT-AACTAAAACCTTTCAACAACGGAT    |
| 26       | TTTCATCAGTGTCGTCTGAGTACCAA-TT---CAAT-AACTAAAACCTTTCAACAACGGAT    |
| 6        | TTTATCCGCGGTAGTCTGAGTACCAA-CA---CAAT-AACTAAAACCTTTCAACAACGGAT    |
| 24       | TTTATCCGCGGTAGTCTGAGTACCAA-CA---CAAT-AACTAAAACCTTTCAACAACGGAT    |
| 17       | T-CATCAGTG-TCGTCTGAGGAGAAA-TC---CAAT-AACTAAAACCTTTCAACAACGGAT    |
| 18       | T-CATCAGTG-TCGTCCGAGGAGAAA-TC---CAAC-AACTAAAACCTTTCAACAACGGAT    |
| 14       | T-CATCCGTG-CCGTCTGAGGAGAAA-TT---CAAC-AACTAAAACCTTTCAACAACGGAT    |
| LC2      | TTTATCAGTG-TAGTCTGAGTGTCAA-TT---TAAT-ATTTAAAACCTTTCAACAACGGAT    |
| LC3      | TTTATCCGTG-TAGTCTGAGCGTCAA-TT---CAAT-ATTTAAAACCTTTCAACAACGGAT    |
| LC1      | TTTCATCAGTG-TAGTCTGAGCGTTAA-TT---CAAT-ATCTAAAACCTTTCAACAACGGAT   |
| RP1      | TTCCACCGGTGACGTCTGAGCGACCACAT---AAAA-TAT-AAAACCTTTCAACAACGGAT    |
| RC4      | TT--ACCGGTGACGTCTGAGCGAAAACAC---AAAA-AATTTAAAACCTTTCAACAACGGAT   |
| RC5      | TT--ATCCGTGACGTCTGAGCGAAAACAC---AAAA-AACTAAAACCTTTCAACAACGGAT    |
| RP3      | TCAGCGCGGTGGAGTCTGAGTGAACATGG---CAAT-AATCAAAAACCTTTCAACAACGGAT   |
| RC3      | TCAACGCGGTGGAGTCTGAGTGAACATAG---CAAT-AATCAAAAACCTTTCAACAACGGAT   |
| RP2      | TCAACGCGGTGGAGTCTGAGTGAACAGGG---CAAT-AATCAAAAACCTTTCAACAACGGAT   |
| RC1      | TTTACCCTGTTAGAGTCTGAGTGAACCG-AA---CAAC-AATCAAAAACCTTTCAACAACGGAT |
| RC2      | TTTACCCTGTTAGAGTCTGAGTGAACCG-AA---CAAC-AATCAAAAACCTTTCAACAACGGAT |
| 8        | TTTATCAGTG-ATGTCCGAGCACAAA-CA---CAAC-AATCAAAAACCTTTCAACAACGGAT   |
| LD2      | TTTATCAGTG-ATGTCCGAGTACAAA-CA---CAAT-AATCAAAAACCTTTCAACAACGGAT   |
| LD4      | TTTATCAGTG-ATGTCCGAGTACAAA-CA---CAAT-AATCAAAAACCTTTCAACAACGGAT   |
| 22       | TTTATCAGTG-ATGTCCGAGTACCAA-CA---CAAT-AATCAAAAACCTTTCAACAACGGAT   |
| 12       | TTTATCAGTG-ACGTCCGAGTAAAAA-TA---TAAT-GATCAAAAATTTTCAACAACGGAT    |
| LD1      | TATATCAGTG-ACGTCCGAGTACAAAAC---AATTAATAAAAACTTTCAACAACGGAT       |
| 5        | CCTAGCGGG--TGCGCACCTTAAATGTACCAA--AAACAAAACCTTTCAACAACGGAT       |
| D1ş Grup | AGTATCAGAATGTGTATTACGATGTAACG---CATCTATATACAACCTTTCAACAACGGAT    |
|          | * * * * *  |
| 19       | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG      |
| 23       | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG      |
| LD3      | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG      |
| LD5      | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG      |
| 2        | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG      |
| 1        | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG      |
| 20       | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG      |
| 16       | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAG      |
| 26       | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAG      |
| 6        | CTCTTGTTCTGGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG      |
| 24       | CTCTTGTTCTGGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG      |
| 17       | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAATTAATGTGAATTGCAG     |
| 18       | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAATTAATGTGAATTGCAG     |
| 14       | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG      |
| LC2      | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG      |
| LC3      | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG      |
| LC1      | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG      |
| RP1      | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG      |
| RC4      | CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG      |

Çizelge 4.5 Çalışmada kullanılan örneklerin ITS bölgelerinin sıralanmış DNA sekansı (devamı)

RC5 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  
 RP3 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  
 RC3 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  
 RP2 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  
 RC1 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  
 RC2 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  
 8 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  
 LD2 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  
 LD4 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  
 22 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  
 12 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  
 LD1 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  
 5 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  
 Dış Grup CTCTTGGTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG  
 \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

19 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 23 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 LD3 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 LD5 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 2 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 1 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 20 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 16 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 26 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 6 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 24 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 17 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 18 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 14 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 LC2 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAAGGGCA  
 LC3 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAAGGGCA  
 LC1 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAAGGGCA  
 RP1 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAAGGGCA  
 RC4 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAAGGGCA  
 RC5 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAAGGGCA  
 RP3 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAAGGGCA  
 RC3 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAAGGGCA  
 RP2 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAAGGGCA  
 RC1 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAAGGGCA  
 RC2 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAAGGGCA  
 8 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 LD2 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 LD4 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 22 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 12 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 LD1 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 5 AATTCAGTGAACCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCA  
 Dış Grup AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCA  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

19 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCACCC--TCAAGCGTA-----GCTTGGTATTGGGCCCT-C  
 23 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCACCC--TCAAGCGTA-----GCTTGGTATTGAGCCCT-C  
 LD3 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCACCC--TCAAGCGTA-----GCTTGGTATTGGGCTTT-C  
 LD5 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCACCC--TCAAGCGTA-----GCTTGGTATTGGGCTCC-C  
 2 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCACCC--TCAAGCGGA-----GCTTGGTATTGGGCCCC-C  
 1 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGTATC-----GCTTGGTATTGGGCTTT-C  
 20 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGCACC-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 16 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGCACC-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 26 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGCACC-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 6 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGCACT-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 24 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGCACT-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 17 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGCACC-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 18 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGCACC-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 14 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGCACC-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 LC2 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGCCTC-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 LC3 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGCCTC-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 LC1 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGCACC-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 RP1 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGCACC-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 RC4 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGCACC-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 RC5 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGCACC-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 RP3 TGCCTGTTGAGCGTCATTGCAACCC--TCAAGCACC-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C

Çizelge 4.5 Çalışmada kullanılan örneklerin ITS bölgelerinin sıralanmış DNA sekansı (devamı)

RC3 TGCCTGTCCGAGCGTCATTACACCC--TCAAGCCCTT----GCTTGGTATTGGGCCGA-C  
 RP2 TGCCTGTCCGAGCGTCATTACACCC--TCAAGCCCTT----GCTTGGTATTGGGCCGA-C  
 RC1 TGCCTGTTCGAGCGTCATTAACCCCTCAGGCCCTTTCAGGCTTGGTCTTGGGCCTT-T  
 RC2 TGCCTGTTCGAGCGTCATTAACCCCTCAGGCCCTTTCAGGCTTGGTCTTGGGCCTT-T  
 8 TGCCTGTTCGAGCGTCATTACACCC-TCAAGCGTA-----GCTTGGTATTGGGCCT-C  
 LD2 TGCCTGTTCGAGCGTCATTACACCC-TCAAGCGTA-----GCTTGGTATTGGGCCT-C  
 LD4 TGCCTGTTCGAGCGTCATTACACCC-TCAAGCGTA-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 22 TGCCTGTTCGAGCGTCATTACACCC-TCAAGCGTA-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 12 TGCCTGTTCGAGCGTCATTACACCC-TCAAGCGTA-----GCTTGGTATTGGGCCTT-C  
 LD1 TGCCTGTTCGAGCGTCATTACACCC-TCAAGCGTA-----GC-----  
 5 TGCCTGTTCGAGCGTCACAAAAAGGCAATCGACCTCCGGTCTAGCGTGTAAACAGCGC  
 Dış Grup TGCCTGTTTGAAGTGCATGAAATCTT-CAACCTATAAGCTTTTGTGGTTTGTAGGCTT-G  
 \*\*\*\*\* \*\*

19 GCC---GCTCCGGCGGGCCCGAAAAGTCAGTGGCGGTCCC-GTGTGACTTCGAGCGTAGT-  
 23 GCC---GCTCCGGCGGGCCCGAAAAGTCAGTGGCGGTCCC-GTGTGACTTCGAGCGTAGT-  
 LD3 GCC---GCTCCGGCGGGCCCGAAAAGTCAGTGGCGGTCCC-GTGTGACTTCGAGCGTAGT-  
 LD5 GCC---GCTCCGGCGGGCCCGAAAAGTCAGTGGCGGTCCC-GTGTGACTTCGAGCGTAGT-  
 2 GCC---GCTCCGGCGGGCCCGAAAAGTCAGTGGCGGTCCC-GTGTGGCTTCGAGCGTAGT-  
 1 GTC---CCTCGGACGTGCCCGAAAAGTTAGTGGCGGTCCA-TTGGGACCTCGAGCGCAGTC  
 20 GTC---CCTCGGACGTGCCCGAAAATTAGTGGCGGTCCA-TTGGGACCTCGAGCGCAGTC  
 16 GTC---CCTCGGACGTGCCCGAAAAGTTAGTGGCGGTCCC-TTGGGACTTCGAGCGCAGTC  
 26 GTC---CCTCGGACGTGCCCGAAAAGTTAGTGGCGGTCCC-TTGGGACTTCGAGCGCAGTC  
 6 GTC---CCCGGACGTGCCCGAAAAGTTAGTGGCGGTCCAGTCGGGACATCAAGCGTAGT-  
 24 GTC---CCCGGACGTGCCCGAAAAGTTAGTGGCGGTCCAGTCGGGACTTCGAGCGTAGT-  
 17 TCC---GCAGGGACGTGCCCGAAAAGACAGTGGCGGCCCGGGGGCCCGGAGCGTAGT-  
 18 TCC---GCAGGGACGTGCCCGAAAAGACAGTGGCGGTCCGGCCGGGACCCCGAGCGCAGT-  
 14 TCC---GCAGGGACGTGCCCGAAAAGTCAGTGGCGGCCAGCCGGGGCCCGGGCGTAGT-  
 LC2 GCC---CCCTGGGCGTGCCCGAAAAGTCAATGGCGGTCCAGCCGGGACTTCAGGCGTAGT-  
 LC3 GCC---CCCTGGGCGTGCCCGAAAAGTTAGTGGCGGTCCAGCCGGGACTTCAGGCGTAGT-  
 LC1 GTC---CCCGGACGTGCCCGAAAAGTTAGTGGCGGCCAGCCGGGACTTCAGGCGTAGT-  
 RP1 ACC-GCCTGAGGTGTGGCCCAAAACCCATCGGCGGCCCG-GTTCGACTTCAGGCGTAGT-  
 RC4 ACC-TCCCGAGGTGCGGCCCAAAACGCATCGGCGGCCCG-GTTCGACTTCAGGCGTAGT-  
 RC5 ACCCTCCGTTGGTGGGGCCCAAAACCCATCGGCGGCCCA-GGTCCGCTCCAGCGTAGT-  
 RP3 ACTCCCTTGGGGGTGGGTCCGAAAAGTCATTGGCCGTCCGCATCGGACTTCAGGCGTAGT-  
 RC3 ACTCCCTTGGGGGTGGGTCCGAAAAGTCATTGGCCGTCCGCATCGGACTTCAGGCGTAGT-  
 RP2 ACTCCCTTGGGGGTGGGTCCGAAAAGTCATTGGCCGTCCGCATCGGACTTCAGGCGTAGT-  
 RC1 TCACC-TCGTGGGTGGGCCCAAAAGTTATTGGCAGCGCA-GTCCGACTTTGAGCGTAGT-  
 RC2 TCACC-TCGTGGGTGGGCCCAAAAGTTATTGGCAGCGCA-GTCCGACTTTGAGCGTAGT-  
 8 GCC---CCCGCGGCGGGCCCGAAAAGTCAGTGGCGGTCCG-GA-----  
 LD2 GCC---CCCGCGGCGGGCCCGAAAAGTCAGTGGCGGTCCG-GAGCGACTTCGAGCGTAGT-  
 LD4 GCC---CCCGCGGCGGGCCCGAAAAGTCAGTGGCGGTCCG-GTCCGACTTCGAGCGTAGT-  
 22 GCC---CCCGCGGCGGGCCCGAAAAGTCAGTGGCGGTCCG-GAGGGACTTCGAGCGTAGT-  
 12 GCC---CCCGTGGCGGGCCCGAAAATCAGTGGCGGTCCG-GCGTACTTCGAGCGTAGT-  
 LD1 -----  
 5 GAACGTCTGGGGGCTCGACGTTGGGCGATTGGACTATCGACTTGATCCCATCGTGGCC  
 Dış Grup GACTTGGAGGCTTGTCCGGCTTGTATCGGTCCGCTCCTCTTAATGCATT--AGCTTGATT

19 AAA-CA--TC----TCCCGTCTGGAGGC--TCACGCGGCGACCGGCCAG--AACGCCCA  
 23 AAA-CAAATC----TCCCGCTTTGGAGGC--TCACGCGGCGACCGGCCAG--AACGCCCA  
 LD3 AAA-CA--TC----TCCCGTCTGGAGGC--TCACGCGGCGACCGGCCAG--AACGCCCA  
 LD5 AAAACA--TC----TCCCGCTTTGGAATC--TCATGTGGCGACCGGCCAG--AACGCCCA  
 2 AAA-CAATC----TCCCGCTTTGGAAGC--CTCTGCTGCGGCCG-----  
 1 GAAATTATCA----TCC-GCTCTAG--G--TTCGCGTTGCGGCCGCGCCAGCCAACCCCA  
 20 GAAATTATCA----TTC-GCTCCAG--GC-TTCCCGTTGCGGCCGCGCCAGCCAACCCCA  
 16 GAAACTATCA----TCC-GCTCAAGAAGT-TTCCCGTTGCGGCCGCGCCAGCCAACCCCTCA  
 26 GAAACTATCA----TCC-GCTCAAGAAGT-TTCCCGTTGCGGCCGCGCCAGCCAACCCCTCA  
 6 -AACTCATCG----TCCCGCTTACGAAAA-GGCCCGCTGTGGCCAGCCAGCCAACCCCA  
 24 -AACTCATCG----TCCCGCTTACGAAGC-GCCCGCTGTGGCCAGCCAGCCAACCCCA  
 17 -AGATTACCT----TTC-GCTCCGGGCGC--TCCCGCGGCGGTGAGCCAGCCAACCCCA  
 18 -AGATTACCT----TTC-GCTCCGGGCGC--TCCCGCGGCGGTGAGCCAGCCAACCCCA  
 14 -AACTATCT----CCC-GC-CCAGGGACGCCCCGCGGTGGCCGCGCCAGCCAACCCCG-  
 LC2 -AATCTATCA----TCCCGCTTACGAAGA-TCCCCCTGCGGCTCGCCAGCCAACCTTCA  
 LC3 -AATCTATCA----TCCCGCTTACGAAGA-TCCCTCCTGCGGCTCGCCAGCCAACCTTCA  
 LC1 -AATATTCA----TCCCGCTTGAAGC-TCCCCCTGCGGTTTGGCAGTTAACCT-CA  
 RP1 -----AGTTT----TTCCGCTTCCGGAGT-ATCGCGCCG-GGCCTGCCGACAACCCCG  
 RC4 -----AGTTT----GTCCGCTCCGGAGT-GCTGCGCCG-GGCCCGCCGACAACCCACTG  
 RC5 -----AGTTT----TTCCGCCCCGGAGC-GCGGCGCTG-AGCTCGCCGACAACCCGCA  
 RP3 -----GGTTT----TCCCGCTTGAAGC-GCCGGCCCG-GGCTGCCAGACAACCCCA  
 RC3 -----GGCTT----TCCCGCTTGAAGC-GCCGGCCCG-GGCTGCCAGACAACCCCA  
 RP2 -----GGTTT----TCCCGCTTGAAGC-GCCGGCCCG-GGCTGCCAGACAACCCCA

Çizelge 4.5 Çalışmada kullanılan örneklerin ITS bölgelerinin sıralanmış DNA sekansı (devamı)

RC1 -----AGTTT-----TCCCCTCTGGAAGC-ATCGGCCTG-GTCTCGCCAGACAACCGCCA  
 RC2 -----AGTTT-----TCCCCTCTGGAAGC-ATCGGCCTG-GTCTCGCCAGACAACCGCCA  
 8 -----  
 LD2 -AAA-TTTTC-----TCCCCTTTGGAAGC-TCGCCCCG-CGGCCGGCCAG--AACGGCCA  
 LD4 -AAA-TTTTC-----TCCCCTTTGGAAGC-TCGCCCCG-CGGCCGGCCAG--AACGGCCA  
 22 -AAAATTTTC-----TCCCCTTTGGAAGT-CCGCCCCG-CGGCCGGCCAG--AACGGCCA  
 12 -AAA-CCTTC-----TCCCCTTTGGAAGC-GCGCGCCGTCGACCTGTCAG--AACGCCG  
 LD1 -----  
 5 CTATTTCTCTATAGTCCCCTTAAATTCGTTGGCAGCGGCACGGAGTCTCGAGCGTACC  
 Dış Grup CCTTGCGGATCGGCTCTCGGTGTGATAATATCTACGCCGCGACCGTGAAGCGTTTGGCGA

19 AC----TTTTCAATGAT-----  
 23 AC----TTTTCAATGATTGACC-----  
 LD3 AC----TTTTTAATGATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT  
 LD5 AC----TTTTCAAT-----  
 2 -----  
 1 AT--TATTTCAA-TGGT-----  
 20 AT--TACTTCAA-TGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA-----  
 16 AT--TATTTCAAATGGTTGACCTCGGATCAGG-----  
 26 AT--TATTTCAAATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT  
 6 AC--TATCTTCAATGGTTGACCTCGGAT-----  
 24 AC--TATCTTCAATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG-----  
 17 C---GAATTTCAATGGTTGACCTCGGATCAGG-----  
 18 CCCCГАТТТCAATGGTTGACCTCGGATCAGG-----  
 14 ---AATCTTCAATGGTTGACCTCGGATCAGG-----  
 LC2 GT--GTC-TTCAATGATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGC----  
 LC3 GT--GTCATTCAATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCA----  
 LC1 GT--TTCTCCAAATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCA----  
 RP1 TC----TTCCATA--ATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA  
 RC4 TC----TTCCAT-----  
 RC5 CC----TCTGAA-----  
 RP3 CA----TTCTTTCGATTGACCTCGGATCAGGTAGGGA-----  
 RC3 CA----TTCTTTCG-----  
 RP2 CA----TTCTTTCGATTGACCTCGGATCA-----  
 RC1 TC----TTGTCTC--ATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT  
 RC2 TC----TTGTCTC--ATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT  
 8 -----  
 LD2 AC-----TTCAATGATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT  
 LD4 AC-----TTCAATGATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT  
 22 AC-----TTCAATGATTGACCTCGGATCAGGTAGG-----  
 12 AC-----TTTTTTAATGAT-----  
 LD1 -----  
 5 AA----GACCGTAAAACAGTCACCGCTTCGTGGGCCACCGTTTGCTCCGTTGTAGCCCCA  
 Dış Grup GC-----TTCTAACCGTCTCACTTGAGAGACAACCTTATGACCTCTGACCTCAAATCAGG

19 -----  
 23 -----  
 LD3 CAATAAG-----  
 LD5 -----  
 2 -----  
 1 -----  
 20 -----  
 16 -----  
 26 CAAT-----  
 6 -----  
 24 -----  
 17 -----  
 18 -----  
 14 -----  
 LC2 -----  
 LC3 -----  
 LC1 -----  
 RP1 -----  
 RC4 -----  
 RC5 -----  
 RP3 -----  
 RC3 -----  
 RP2 -----  
 RC1 CAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCA

Çizelge 4.5 Çalışmada kullanılan örneklerin ITS bölgelerinin sıralanmış DNA sekansı (devamı)

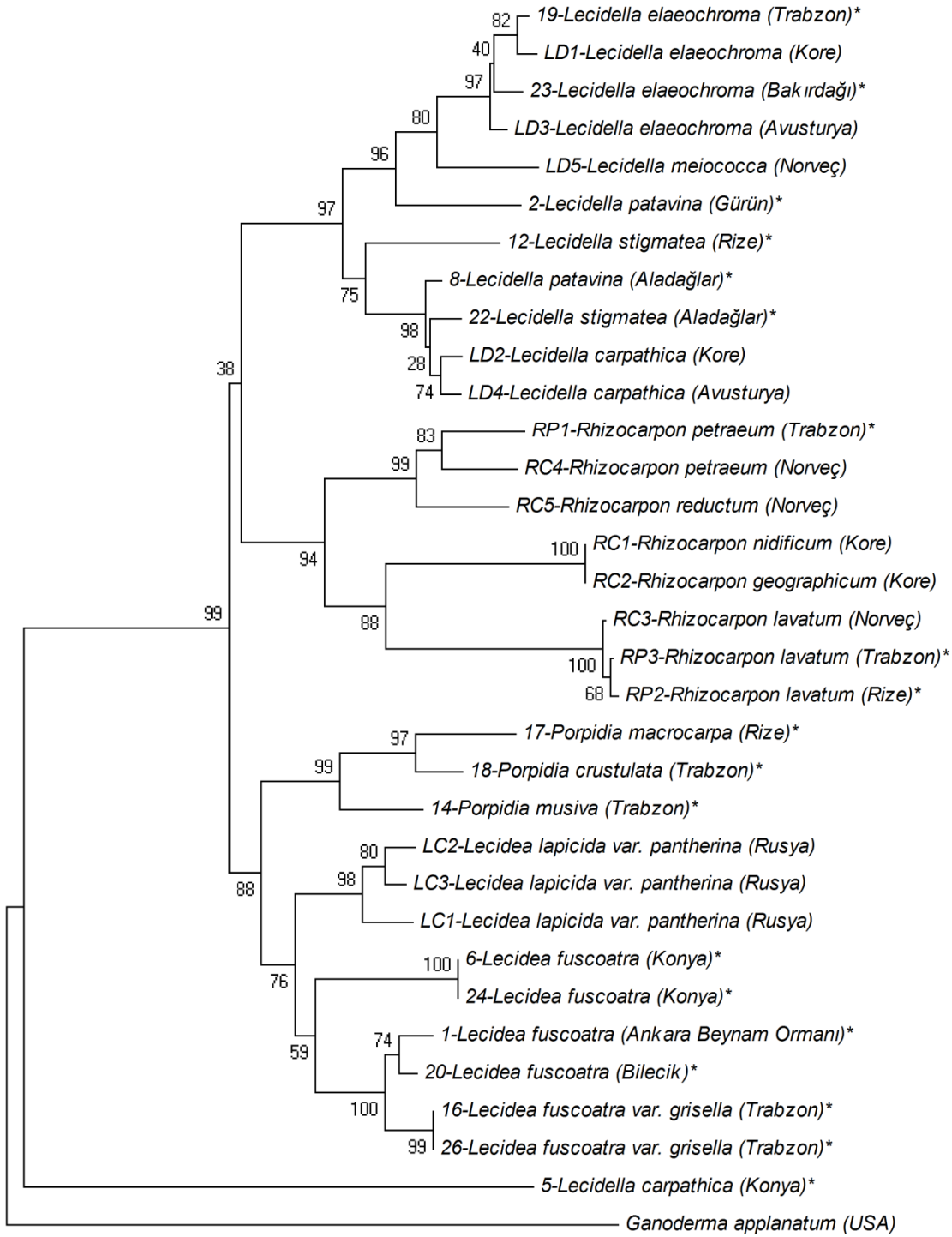
|          |  |
|----------|--|
| RC2      | CAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCA |
| 8        | -----  |
| LD2      | CAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCA |
| LD4      | CAATAAG-----   |
| 22       | -----  |
| 12       | -----  |
| LD1      | -----  |
| 5        | AAATGACCCCTAGAGGCGCCTTCAAAAAGCGCGACAAAATTGACCTCGGATCAG-----  |
| Dış Grup | TAGGACTA-----  |

|          |              |
|----------|--------------|
| 19       | -----        |
| 23       | -----        |
| LD3      | -----        |
| LD5      | -----        |
| 2        | -----        |
| 1        | -----        |
| 20       | -----        |
| 16       | -----        |
| 26       | -----        |
| 6        | -----        |
| 24       | -----        |
| 17       | -----        |
| 18       | -----        |
| 14       | -----        |
| LC2      | -----        |
| LC3      | -----        |
| LC1      | -----        |
| RP1      | -----        |
| RC4      | -----        |
| RC5      | -----        |
| RP3      | -----        |
| RC3      | -----        |
| RP2      | -----        |
| RC1      | ACAGCTCAAATA |
| RC2      | ACAGCTCAAAT- |
| 8        | -----        |
| LD2      | ACAGCTCAAATA |
| LD4      | -----        |
| 22       | -----        |
| 12       | -----        |
| LD1      | -----        |
| 5        | -----        |
| Dış Grup | -----        |

Çizelge 4.5 Gen Bankasından alınan örnekler

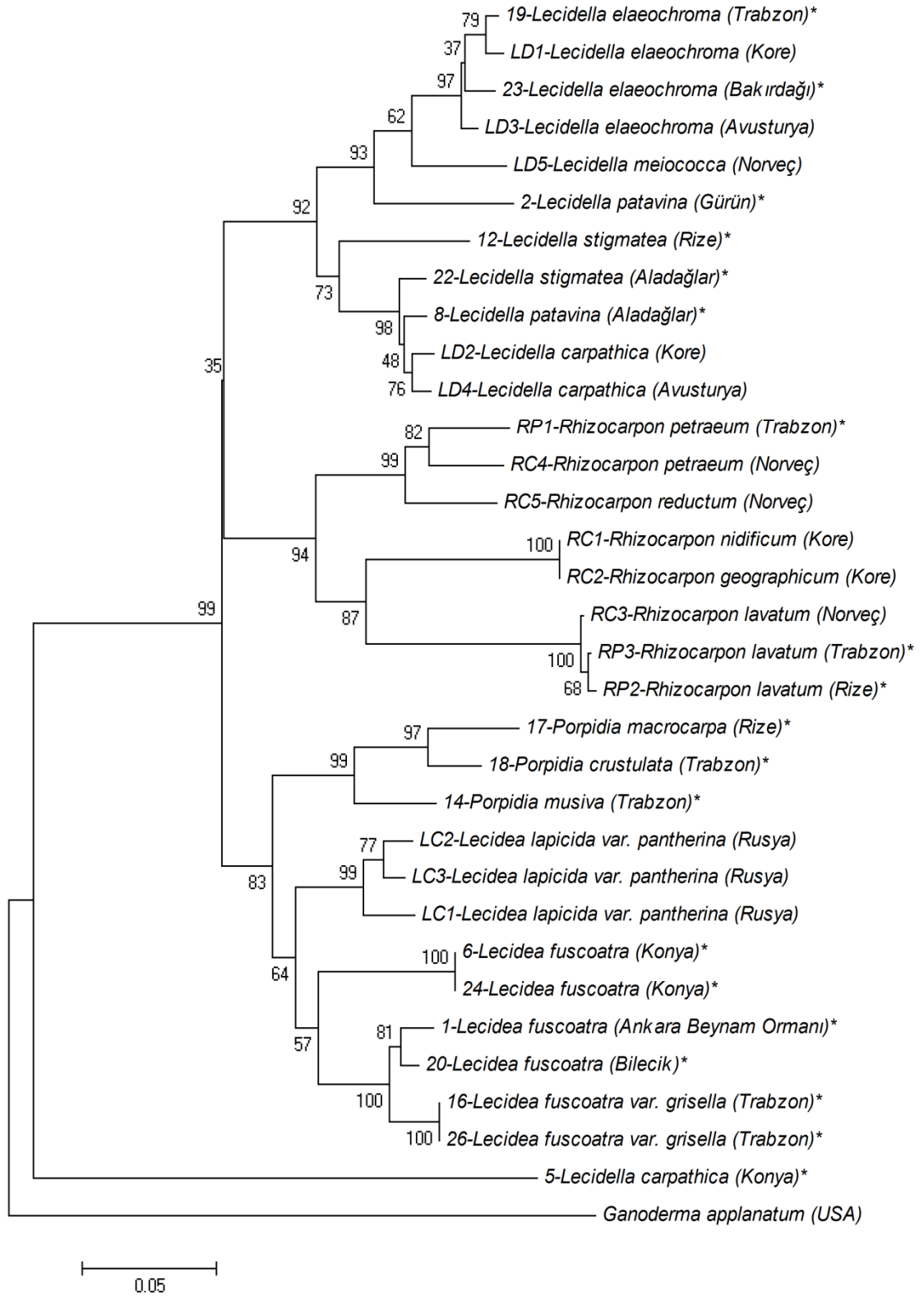
| <b>Tür Adı</b>                                      | <b>Gen Bank No</b> | <b>Orjin</b> |
|---|--------------------|--------------|
| LC1- <i>Lecidea lapicida</i> var. <i>pantherina</i> | AF332120.1         | Rusya        |
| LC2- <i>Lecidea lapicida</i> var. <i>pantherina</i> | AF332119.1         | Rusya        |
| LC3- <i>Lecidea lapicida</i> var. <i>pantherina</i> | AF332118.1         | Rusya        |
| LD1- <i>Lecidella elaeochroma</i>                   | EU266082.1         | Kore         |
| LD2- <i>Lecidella carpathica</i>                    | DQ534471.2         | Kore         |
| LD3- <i>Lecidella elaeochroma</i>                   | AY541275.1         | Avusturya    |
| LD4- <i>Lecidella carpathica</i>                    | AY541274.1         | Avusturya    |
| LD5- <i>Lecidella meiococca</i>                     | AF517929.1         | Norveç       |
| RC1- <i>Rhizocarpon nidificum</i>                   | DQ534483.2         | Kore         |
| RC2- <i>Rhizocarpon geographicum</i>                | DQ534482.1         | Kore         |
| RC3- <i>Rhizocarpon lavatum</i>                     | AF483610.1         | Norveç       |
| RC4- <i>Rhizocarpon petraeum</i>                    | AF483609.1         | Norveç       |
| RC5- <i>Rhizocarpon reductum</i>                    | AF483608.1         | Norveç       |
| <i>Genoderma applanatum</i>                         | GU256764.1         | USA          |

Çalışılan 19 farklı türün ve Gen Bankasından alınan diğer türlerin filogenetik analizi için Mega 4 programına (Tamura et al. 2007) göre 4 farklı analiz yöntemi uygulanmıştır.



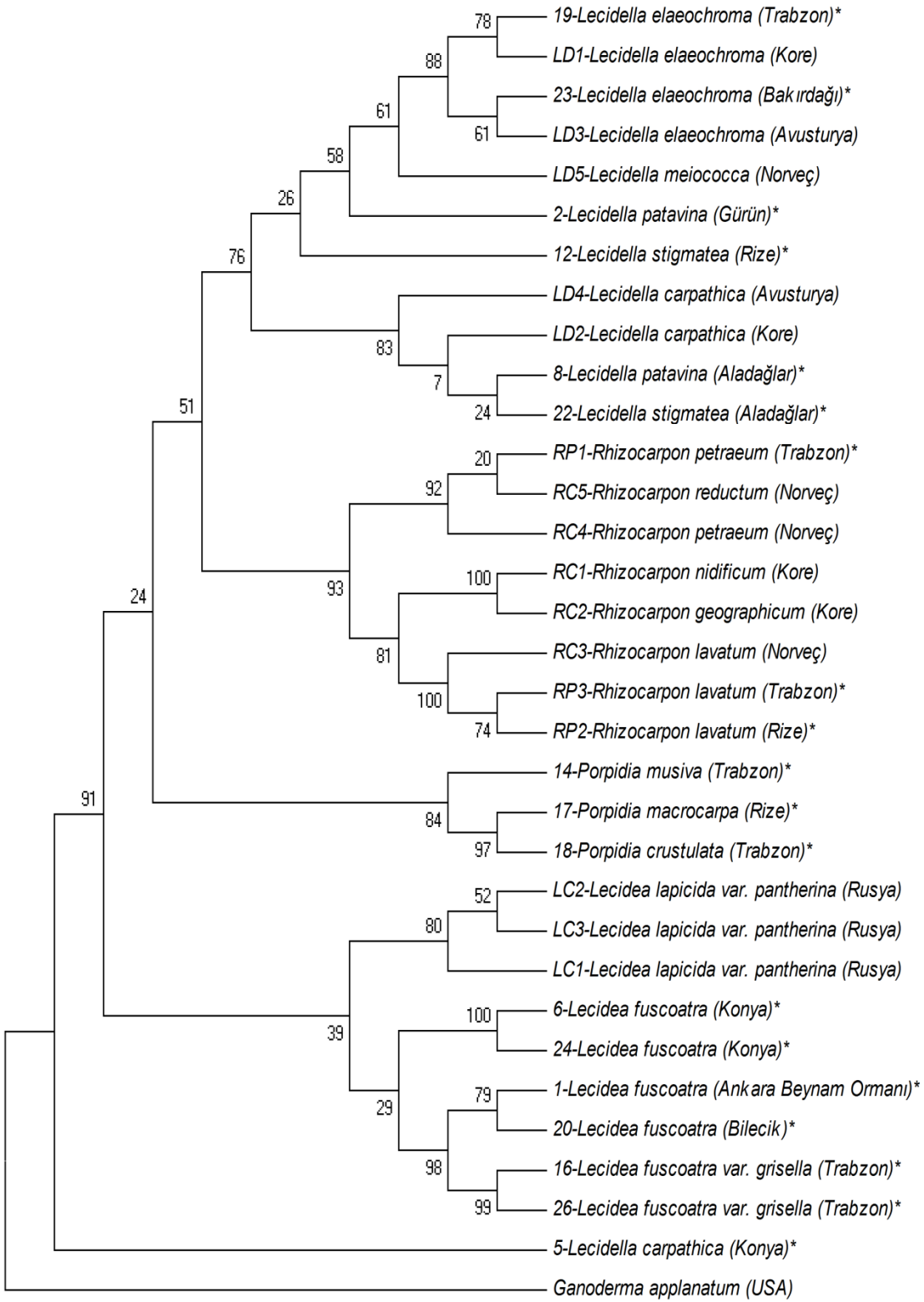
Şekil 4.4 Örneklere ait Neighbor- Joining dendrogramı

\*Çalışmamızdan elde edilen örnekler



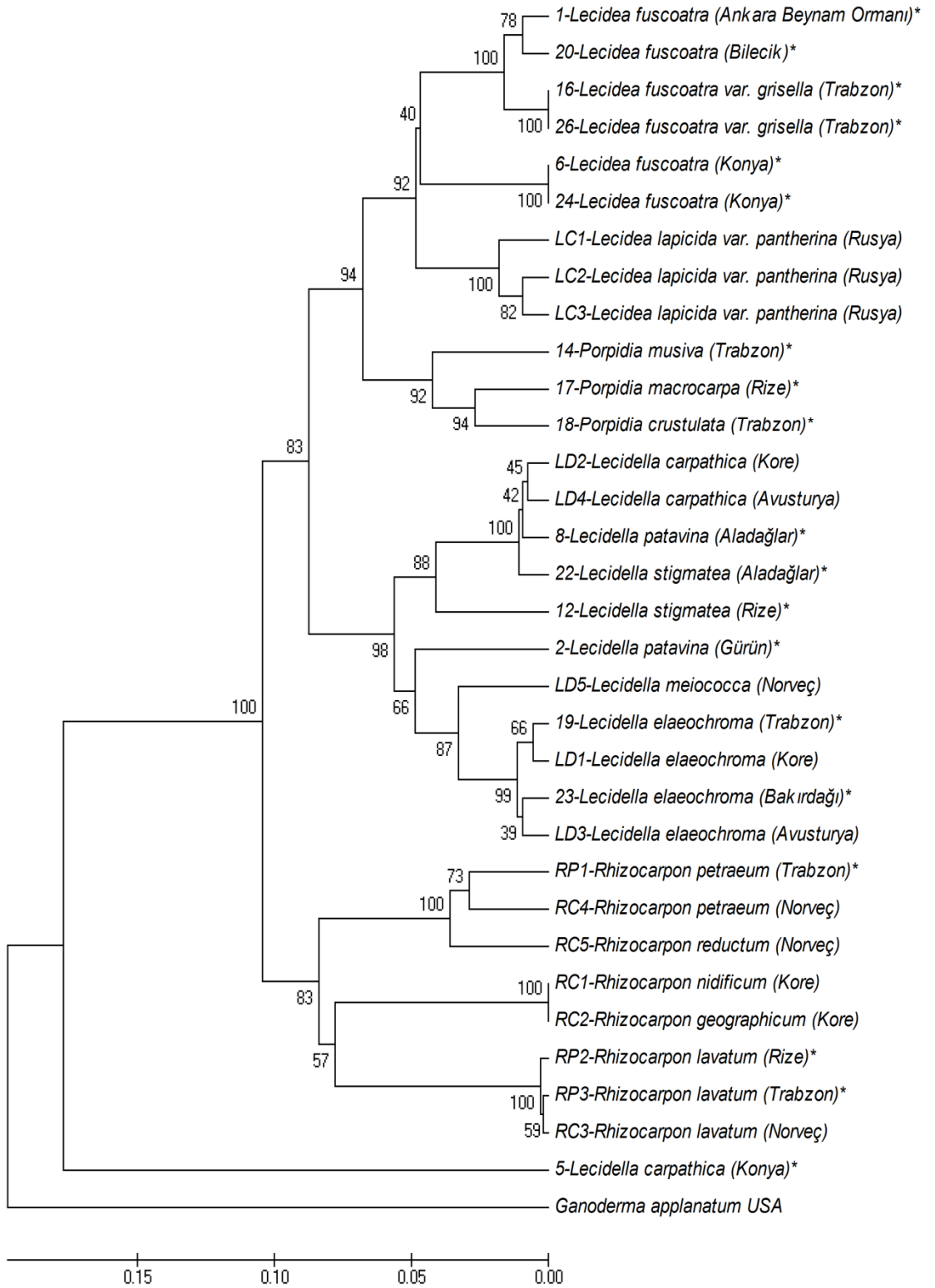
Şekil 4.5 Örneklerin Minimum Evolution dendrogramı

\*Çalışmamızdan elde edilen örnekler



Şekil 4.6 Örneklerin Maximum Parsimony dendrogramı

\*Çalışmamızdan elde edilen örnekler



Şekil 4.7 Örneklerin UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average) dendrogramı

\*Çalışmamızdan elde edilen örnekler

Çizelge 4.6 Karşılaştırılan örneklerin içerdikleri baz çiftleri ve sayıları

| İlgili bölge | ii  | si | sv | R= si/sv | TT | TC | TA | TG  | CT    | CC  | CA | CG |
|--------------|-----|----|----|----------|----|----|----|-----|-------|-----|----|----|
| ITS bölgesi  | 376 | 57 | 65 | 0.9      | 84 | 19 | 5  | 7   | 18    | 107 | 8  | 11 |
|              | AT  | AC | AA | AG       | GT | GC | GA | GG  | TOP.  |     |    |    |
|              | 5   | 9  | 81 | 10       | 8  | 11 | 9  | 104 | 497.5 |     |    |    |

Dizilerin karşılaştırılması sonucu, elde edilen ii = Identical Pairs (Aynı çiftler), si = Transitional Pairs (Transisyon oranları), sv = Transversional Pairs (Transversiyon oranları), R = si/sv oranı değerleri Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 Kullanılan örneklere ait uzaklık indeksi

|                       | 1    | 2    | 3    | 4    | 5 |
|-----------------------|------|------|------|------|---|
| <b>1. Lecidella</b>   |      |      |      |      |   |
| <b>2. Lecidea</b>     | 0.15 |      |      |      |   |
| <b>3. Porpidia</b>    | 0.17 | 0.13 |      |      |   |
| <b>4. Rhizocarpon</b> | 0.18 | 0.17 | 0.17 |      |   |
| <b>5. Dış grup</b>    | 0.30 | 0.30 | 0.33 | 0.33 |   |

## 5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada *Lecidea* ve ilişkili liken cinslerinden olduğu bilinen, *Lecidella*, *Porpidia* ve *Rhizocarpon* cinslerine ait toplam 29 örnek incelenmiştir. Bu çalışmada daha önce Türkiye’de likenler üzerine yeni yapılmaya başlanmış olan moleküler teknikler uygulanmıştır. Morfolojik olarak üç gruptan oluşan likenlerden, sistematik tanımlamada en çok zorlanılan grup crustose (kabuksu) likenlerdir. Bu nedenle tez çalışmasında bu gruplara daha çok ağırlık verilmiştir. Kabuksu likenlerin araziden toplanma işlemi oldukça zor olduğundan, ancak 0.001-0.08 gr aralığında değişen miktarda liken örneği elde edilebilmiştir. Bitki örnekleri ile yapılan çalışmalarda, 500-1000 ng/µl DNA elde edebilmek için 0.1 gr örnek kullanıldığı düşünülürse, bu miktarın oldukça düşük olduğu anlaşılabilir. Tez çalışmasında, bu nedenle DNA izolasyonu sonucunda nanodrop ölçüleriyle 34.09 - 933.5 ng/µl aralığında değişen miktarda DNA elde edilebilmiştir. Bu DNA’ların saflığı (A260/280 absorpsiyon oranı), 0.59-1.72 aralığında değişmektedir.

İzole edilen DNA’ların, rDNA (ITS) bölgelerini PZR yardımıyla çoğaltmak amacıyla iki ayrı PZR denemesi yapılmıştır. İlk PZR denemesi, 52 °C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. PZR sonucunda, 12 örneğin ITS bölgeleri çoğaltılabilmiş, bazı örneklerin ITS bölgelerine ait sonuç elde edilemezken, bazı örneklerde de ITS bölgesi dışında istenmeyen, özgül olmayan bantlar gözlenmiştir. Bu özgül olmayan bantların ortaya çıkmasını engellemek amacıyla, bağlanma sıcaklığının 54 °C’ye çıkartıldığı ikinci PZR denemesi yapılarak, primerlerin özgül olmayan bölgelere bağlanıp, o bölgeleri çoğaltmaları engellenmeye çalışılmıştır. İkinci PCR denemesinde, ilk denemedeki 6 (*Lecidea fuscoatra*, Konya), 16 (*Lecidea fuscoatra* var. *grisella*, Trabzon), 24 (*Lecidea fuscoatra*, Konya), 26 (*Lecidea fuscoatra* var. *grisella*, Trabzon) ve RP2 (*Rhizocarpon lavatum*, Rize) numaralı örneklerdeki spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçilmiş ve rDNA (ITS) bölgeleri çoğaltılabilmıştır. İlk PZR denemesinde 17 (*Porpidia macrocarpa*, Rize) ve 18 (*Porpidia crustulata*, Trabzon) numaralı örneklere ait elektroforez jelinde herhangi bir bant gözlenemezken, ikinci PZR denemesinde ITS bölgeleri çoğaltılarak, tek bant elde edilebilmiştir. PZR

reaksiyonundaki bağlanma sıcaklığı 54 °C'arttırılmasına rağmen, 15 numaralı *Lecidella carpathica* (Trabzon), 21 numaralı *Porpidia crustulata* (Rize), 22 numaralı *Lecidella stigmathea* (Aladağlar) ve 23 numaralı *Lecidella elaeochroma* (Bakırdağı) örneklerinde spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçilememiştir. Bunların arasından 22 ve 23 numaralı örnekler için istenen DNA bandı, jelden kesilerek saflaştırılmış ve bu örneklerin dizilerine ulaşılmıştır. 15 numaralı örnekte jelde istenen bölgede bant elde edilemediğinden, 21 numaralı örnekte ise elde edilen bantların birbirine yakın olması nedeniyle jelden istenen DNA bölgesinin izolasyonu mümkün olmadığından, bu örneklerin dizilerine ulaşılabilmiştir.

rRNA dizileri yaşayan tüm hücrelerde bulunduğu ve aynı görevi üstlendiğinden taksonomik ve filogenetik çalışmalar için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu dizilerin evriminin tüm genomun evrimini yansıttığı söylenebildiği gibi aynı zamanda farklılık gösteren ve korunmuş bölgeler de içermektedirler. Bu sayede farklı taksonomik gruplarda bulunan organizmaların karşılaştırma ve ayırımlarında kullanılmaktadır. Bilindiği gibi genotipleme konusunda PZR teknolojisine dayanan metotlar, sağladığı avantajlar göz önünde bulundurularak, dünyada sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada da günümüz biyoteknolojisinde kullanılan, son derece önemli bir yöntem olan DNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. Genotipleme çalışmalarında RAPD, AFLP gibi farklı yöntemler de kullanılmaktadır; ancak bu teknikler, likenlerin simbiyotik yaşamı sebebiyle problem çıkarmaktadır. ITS dizi analizi ile sadece mantara özgü primerler kullanılarak, bu engeller aşılmıştır.

Bu çalışmada, *Lecidea*, *Lecidella*, *Porpidia* ve *Rhizocarpon* cinslerine ait toplam 19 örneğin, ITS1F ve ITS4 primerleri kullanılarak, rDNA (ITS) bölgeleri, PZR yardımıyla çoğaltılıp, dizi analizi yapılarak türler arasındaki genetik benzerlik ve farklılıklar ortaya çıkarılmıştır. Gen Bankasından alınan *Lecidea*, *Lecidella*, *Rhizocarpon* ve *Genoderma* cinslerine ait toplam 14 örneğin dizileri kıyaslanarak filogenetik analiz yapılmıştır. Gen Bankasından alınan örnekler arasındaki *Genoderma applanatum* türü mantarlar aleminde sınıflandırılmakta, ancak diğer türlerden farklı bir familyada yer almaktadır. Çalışmada kullanılan diğer türlere uzaklığı nedeniyle dış grup olarak adlandırılmaktadır.

Oluşturulan dendrogramların güvenilirliğini test etmek amacıyla çalışmaya dahil edilmiştir.

MEGA 4 programı (Tamura et al. 2007) ile yapılan bu incelemede farklı filogenetik yöntemlere (Neighbour-Joining, Minimum Evolution, Maksimum Parsimony, UPGMA) göre dendrogramlar elde edilmiştir (Şekil 4.4 - 4.7).

Neighbor-Joining analizi ile elde edilen dendrogram (Şekil 4.4) incelendiğinde, türlerin başlangıçta iki ana kola ayrıldığı gözlenmiştir. Kollardan birini dış grup olarak alınan *Genoderma applanatum* türü oluştururken, diğer türler ikinci kolda toplanmıştır.

Konya'dan toplanan *Lecidella carpathica* bir dal oluştururken, *Lecidella*, *Lecidea*, *Porpidia* ve *Rhizocarpon* cinsine ait türler diğer dalda toplanmıştır. *Lecidella carpathica* örneğinin ağaçtaki dal uzunluğu, dolayısıyla genetik uzaklığı fazladır.

Farklı bölgelerden toplanan *Lecidella elaeochroma* türüne ait örnekler bir dalın uzantısında toplanırken, Norveç'ten alınan *Lecidella meiccocca* örneği diğer dalda yer almaktadır.

Norveç'ten alınan *Rhizocarpon petraeum* ve *Rhizocarpon reductum* örnekleri ile Trabzon'dan toplanan *Rhizocarpon petraeum* örneği bir dal oluştururken, *Rhizocarpon* cinsine ait diğer türler ikinci dalı oluşturmuştur.

Rize'den toplanan *Porpidia macrocarpa* ve Trabzon'dan toplanan *Porpidia crustulata* örnekleri % 97'lik bootstrap değeri ile bir grup oluşturmuştur. Bu grup Trabzon'dan toplanan *Porpidia musiva* örneği ile % 97'lik bootstrap değeri ile ikinci bir grup oluşturmuştur.

Rusya'dan alınan *Lecidea lapicida* var. *pantherina* örnekleri bir dalın uzantısında toplanırken, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan ve gen bankasından alınan

*Lecidea fuscoatra* türüne ait örnekler diğer dalın uzantısında toplanmıştır. Bunlar arasında, Konya'nın farklı bölgelerinden toplanan *Lecidea fuscoatra* örnekleri %100'lük boot strap değeri ile bir grup oluştururken, Trabzon'un farklı bölgelerinden toplanan *Lecidea fuscoatra var. grisella* örnekleri % 99'lük boot strap değeri ile bir grup oluşturmuştur.

Genel olarak, aynı cinse ait türlerin köke doğru tek bir dal üzerinde birleşiyor olması, sonucun güvenilirliğini ortaya koymaktadır.

Şekil 4.5'te minimum evolution kullanarak elde ettiğimiz dendrogram, Şekil 4.6'da maximum parsimony analizi kullanarak elde edilen dendrogram, Şekil 4.7'de UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average) kullanılarak yapılan dendrogram görülmektedir. Oluşturulan tüm dendrogramlar genel olarak birbirleri ile uyumludur.

Çizelge 4.7'de DNA dizi analizi yapılmış olan türlerin uzaklık indeksi bulunmaktadır. *Porpidia* cinsine ait türler ile *Lecidea* cinsine ait türler 0.13 uzaklık değeriyle birbirlerine en yakın türlerdir. Dış grup olarak alınan *Genoderma applanatum* türü genel olarak tüm cinslere ait türlerden uzak görülmektedir.

Dünya literatüründe *Lecidella*, *Porpidia*, *Rhizocarpon* cinslerine ait ITS bölgesi ile yapılan çalışmalar mevcutken, *Lecidea* cinsine ait bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu tez çalışması bu konuda yapılmış olan ilk çalışmadır.

Yaptığımız bu araştırmanın sonucunda elde edilen benzemezlik indeksi ve dendrogram verileri çalışılan bireylerdeki genomik benzerlik ve farklılıkları ortaya koymaktadır. Özellikle farklı habitat ve popülasyonlarda varyasyon gösteren örneklerin moleküler filogenisi belirlenerek taksonomik değerleri kesin olarak ortaya konulmuştur. ITS bölgelerinin çoğaltılması sonucu birbirine uzak taksonların akraba ilişkilerinin tanımlanması sağlanmıştır. Böylece çalışılan cinslerin Türkiye'deki popülasyon durumu hakkında geniş bir bilgi elde edilmiştir. Bu tür çalışmalar sonucunda elde edilecek

bilgiler doğrultusunda, moleküler filogeniye dayalı olarak çalışılacak cinslerin taksonomik problemlerinin çözümlenmesi, liken sistematigindeki yerlerini moleküler boyutta ortaya koyması açısından oldukça büyük önem taşımaktadır.

Likenler, Anadolu'da gösterdiği tür zenginliği ile Türkiye'deki biyoçeşitliliğin önemli bir kaynağıdır. Bu çalışma daha fazla tür ve lokalite ile geniş ölçekli olarak devam ettirildiği takdirde türler arasındaki ITS çeşitliliği, *Lecidea*, *Lecidella*, *Porpidia* ve *Rhizocarpon* cinsleri de dahil birçok liken cinsi içerisindeki evrimsel farklılaşmayı aydınlatmaya yardımcı olabilecektir. Bu ve benzeri araştırmalar Türkiye'deki zengin gen potansiyelinin ortaya çıkarılmasına ve korunmasına katkı sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropolous, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, Olde, B., Moreno, R.F., Kerlavage, A.R., McCombie, W.R. and Venter, J.C. 1991. Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252: 1651-1656.
- Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., Cregan, P.B. 1992. Length Polymorphisms of Simple Sequence Repeats DNA in Soybean. *Genetics*, 132:1131-1139
- Anonim. 2009. Web sitesi: <http://images.google.com.tr>. Erişim tarihi: 10.12.2009.
- Anonim. 2009 Web sitesi: <http://www.genetiklab.com>. Erişim tarihi: 12.12.2009.
- Anonim. 2009 Web sitesi: [www.abgeder.org/Bio1Behnan](http://www.abgeder.org/Bio1Behnan). Erişim tarihi: 12.12.2009.
- Aras, S. and Cansaran, D. 2006. Isolation of DNA for sequence analysis from herbarium material of some lichen species. *Turkish Journal of Botany* 30, 449-453.
- Aras, S., Cansaran, D., Özdemir Türk, A., Kandemir, İ. and Candan, M. 2007. Resolving genetic relationships in manna group of lichens from genus *Aspicilia*. *African Journal of Biotechnology*, 6(11); 1154-1160.
- Arup, U. and Grube M. 1998. Molecular systematics of *Lecanora* subgenus *Placodium*. *The Lichenologist*, 30 (4-5), pp.415-425(11).
- Aslan, A. and Öztürk, Ş. 1998. Lichens of Akdamar Island. *Bulletin of Pure and Applied Sciences* 17B (2): 67-70.
- Aydın, S.Ö. 2004. RAPD ( Rastgele arttırılmış polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematiği. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*.
- Ayres, N.M., McClung, A.M., Larkin, P.D., Blight, H.F.J., Jones, C.A. and Park, W.D. 1997. Microsatellite and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 94:773-781.
- Beckmann J.S., Kashi, Y., Hallerman, E.M., Nave, A. and Soller, M. 1986. Restriction fragment length polymorphism among Israeli Holstein-Friesian Dairy Bulls. *Animal Genetics*, 17:25-38.
- Boysen, M., Bojra, M., del Moral, C., Salzar, O. and Rubio, V. 1996. Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG4 isolates by direct sequence of asymmetric PCR Product of the ITS regions. *Current Genetics* 29, 174-181.

- Brodo, I.M., Sharnoff, S.D. and Sharnoff, S. 2001. Lichens of North America. Yale University Press, New Haven. 795 pp.
- Brown, S.M., Hopkins, M.S., Mitchell, S.E., Senior M.L., Beckmann, J.S., and Soller, M. 1996. Restriction fragment length polymorphism and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica*. 35:111-124.
- Bruns, T.D., Vilgays, T.J. and Taylor, J.W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22, 525-564.
- Budak, N. 1995. RFLP ve Bitki Islahı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. Cilt:32, Sayı:1 261-268.
- Buschbom, J. and Mueller, G. 2004. Resolving evolutionary relationships in the lichen-forming genus *Porpidia* and related allies (Porpidiaceae, Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution*.32: 66-82.
- Cansaran, D. 2000. Likenler ve Ağır Metal Birikimi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Semineri.
- Cansaran, D., Aras, S., Kandemir, İ. and Halıcı, M.G. 2006. Phylogenetic relations of *Rhizoplaca* Zopf from Anatolia inferred from ITS sequence data. *Zeitschrift für Naturforschung*, 61c: 405-412.
- Casares, M. P., Hafellner, J. and Gutierrez, L.C. 1996. Species of the genus *Lecidea* (Lecanorales) on gypsum in Spain. *Lichenologist*, 28:37-47.
- Cavalier-Smith, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Systema Naturae*, 73, 203-266.
- Crespo, A., Bridge, P.D. and Hawksworth, D.L. 1997. Amplification of fungal rDNA- ITS regions from non fertile specimens of lichen-forming genus *Parmelia*. *Lichenologist*, 29, 275-282.
- Dyer, P.S. and Murtagh, G.J. 2001. Variation in ribosomal ITS sequence of lichens *Buellia frigida* and *Xanthoria elegans* from vestfold Hills, Eastern Antarctica. *Lichenologist*, 33, 151-159.
- Edel, V. 1998. Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview, 1-20, Bridge PD (ed), CAB International, Wallingford, 357 pages.
- Gardes, M. and Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Goffinet, B. and Bayer, R. 1997. Characterization of mycobionts of photobiont pairs in

the Peltigerineae (lichenized ascomycetes) based on ITS sequences of specifically amplified fungal ribosomal DNA. *Fungal Genetics and Biology*, 21; 228-237.

- Gonang, W.F. 1999. *Tıbbi Fizyoloji*. 19.Baskı,21, Barış Kitabevi, İstanbul.
- Groner, U. and LaGreca, S. 1997. The 'Mediterranean' *Ramalina panizzei* north of the Alps: Morphological, Chemical and rDNA sequence data, *Lichenologist*, 29; 441-454.
- Grube, M., DePriest, P., Gargas, A. and Hafellner, J. 1995. DNA isolation from lichen ascomata. *Mycological Research*, 99; 1321-1324.
- Grube, M. and Arup, U. 2001. Molecular and morphological evolution in the Physciaceae (Lecanorales, lichenized Ascomycotina), with special emphasis on the genus *Rinodina*. *Lichenologist* 33(1); 63-72.
- Gülsen, O. and Roose, M. L. 2001. Limonlarda genetik çeşitlilik, bazı turuncgillerde akrabalık derecelerinin DNA markırlarının kullanılarak belirlenmesi. *Bahçe*, 30 (1-2): 53-63.
- Hallerman, E.M., Nave, A., Kashi, Y., Holzer, Z., Soller, M. and Beckmann, J.S. 1987. RFLP in dairy and beef cattle at the growth hormone and prolactin loci. *Animal Genetics*, 18:213-222.
- Hertel, H. 1967. Revision einiger calciphiler Formenkreise der Flechtengattung *Lecidea*. *Beihefte Nova Hedwigia* (24); 1-174.
- Hertel, H. 1975. Ein vorläufiger Bestimmungsschüssel für die kryptothallinen, schwarzfruchtigen, saxicolen Arten der Sammelgattung *Lecidea* (Lichenes) in der Holarktis. *Decheniana*, 127: 37-78.
- Hertel, H. 1977. Gesteinsbewohnende Arten der Sammelgattung *Lecidea* (Lichenes) aus Zentral-, Ost- und Südasien. *Khumbu Himal.*, 6: 145-378.
- Hertel, H. 1995. Sammelgattung *Lecidea* (Lichenes) aus Zentral-, Ost- und Südasien. *Khumbu Himal.*, 6(3); 145-458.
- Högberg, N., Kroken, S., Thor, G. and Taylor, J.W. 2002. Reproductive mode and genetic variation suggest a North American origin of European *Letharia vulpina*. *Molecular Ecology* 11; 1191-1196.
- Ivanova, N., DePriest P. T., Bobrov V. K. and Troitskys, A. V. 1999. Phylogenetic analysis of the lichen Umbilicariaceae based on nuclear ITS1 and ITS2 rDNA sequences. *Lichenologist*, 31(5); 477-489.

- John, V. 1992. Flechten der Türkei, I. (Türkiye Likenleri I.), Das die Türkei betreffende lichenologische Schrifttum (Türkiye Likenleri ile ilgili Literatur). Pfalzmuseum für Naturkunde (Pollichia-Museum), Bad Dürkheim, p.1-14
- John, V. 1995. Flechten der Türkei IV. (Türkiye Likenleri IV.), Das die Türkei betreffende lichenologische Schrifttum (Türkiye likenleri ile ilgili literatürlere ilaveler), Pfalzmuseum für Naturkunde (Polichia-Museum), Bad Dürkheim, p.1-10.
- Karamanoğlu, K. 1971. Türkiye'nin Önemli Liken Türleri. Ankara Eczacılık Fakakültesi Dergisi. s.1.53.
- Karl, S.A. and Avise J.C. 1993. PCR- based assays of mendelian polymorphisms from anonymous single-copy nuclear DNA: techniques and applicaions for population genetics. *Molecular Biology and Evolution*, 10:2, 342-361.
- Klug, W.S. and Cummings, R. M. 2002. Genetik. Öner, C. (eds.), Palme Yayıncılık, 381-383.
- Krzeminska, B.G., Gorniak M. and Wegrzyn, G. 2001. Molecular determination keys: construction of keys for species identification based on restriction fragment length polymorphism. *Int Arch Biosci* 1057-1067.
- Lee, S.B. and Taylor, J.W. 1992. Phylogeny of five funguslike protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and evolution* 9,636-653.
- Lowe, A.J, Hanotte, O. and Guarino, L. 1996. Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collections: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter*.107:50-54.
- Martin, M.P., LaGreca, S. and Lumbsch, T. 2003. Molecular phylogeny of *Diploschistes* interred from ITS sequence data. *Lichenologist* 35(1): 27-32.
- Maxam, A. and Gilbert, W. 1977. A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 560-4.
- Molina, M., Crespo, A., Blanco, O., Hladun, N. and HawksWorth, D.L. 2002. Molecular phylogeny and status of *Diploicia* and *Diplotomma*, with observations on *Diploicia subcanescens* and *Diplotomma rivas-martinezii*, *Lichenologist*, 34,509-519.
- Mullis, K.B. and Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Methods Enzymol* 155:350–355.

- Murtagh, G.J., Dyer, P.S., Furneaux, P.A. and Crittenden, P.D. 2002. Molecular and physiological diversity in bipolar lichen-forming fungus *Xanthoria elegans*. *Mycological Research*, 106(11); 1277-1286.
- Nash, T.H. 1996. Lichen biology. Cambridge University Press, New York.
- Öztürk, M., Türkan, I. ve Selvi, S. 1987. Bitkiler ve Radyoaktif Kirlenme. *Doğa Turkish Journal of Botany*. 11 (3), 313-315.
- Öztürk, Ş. 1995. Yüzyılların Çevrecisi Likenler, *Bilim ve Teknik*, 328: 74 – 77.
- Queller, D.C., Strassmann, J.E. and Hughes, C.E. 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, 8:285-288.
- Rios, A., Ascaso C. and Grube, M. 2002. An ultrastructural anatomical and molecular study of the lichenicolous lichen *Rimularia insularis*. *Mycological Research*, 106 (8); 946-953.
- Rios, A., Sancho, L., Grube, M., Wierzchos, J. and Ascaso, C. 2005. Endolithic growth of two Lecideia lichens in granite from continental Antarctica detected by molecular and microscopy techniques. *New Phytologist*. 165: 181-190.
- Roder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Border, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D. and Ganai, M.W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular General Genetics*, 246:327-332.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-7.
- Seaward, M.R.D., Heslop, J.A., Green, D. and Bylinska, E.A. 1988. Recent Levels of Radionuclides in Lichens from Southwest Poland with Particular Reference to <sup>134</sup>Cs and <sup>137</sup>Cs, *Journal of Environmental Radioactivity*. 7, 123-129.
- Senior, M.L. and Heun, M. 1993. Mapping Maize Microsatellites and Polymerase Chain Reaction Conformation of the Targeted Repeats Using a CT Primer. *Genome*, 36:884-889.
- Skye, E. 1968. Lichens and air pollution. A study of cryptogamic epiphytes and environment in the Stockholm region. *Acta Phytogeographica Suecica*. 52:1-123.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.
- Vartia, K.O. 1973. Antibiotics in Lichens. Academic Press, 547-561, New York.
- Yıldız, A. ve Yurdakulol, E. 2002. Likenler. *Tabiat ve İnsan*. Yıl:36. Sayı:4. Sayfa:6-11.

- Yıldırım, A. ve Kandemir, N. 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi,Konya, s:334-363.
- Zabeau, M. and Vos, P. 1993. Selective Restriction Fragment Amplification: a general method for DNA fingerprinting. European patent office, publication 0 534 858 A1, bulletin 93/13.
- Walton, M. 1993. Molecular markers: which ones to use? Seed World p.23-29.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA Polimorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucleic Acids Research, 18, 6531-6535.
- White, T. J., Bruns, T. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In PCR protocols: A guide to methods and applications (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J.Sninsky and T.J. White, eds): 315-322. San Diego: Academic Press.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esin BAŞARAN

Doğum Yeri : Bulgaristan

Doğum Tarihi : 01/06/1983

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Gaziçiftliği Yabancı Dil Ağırlıklı Lise (2001)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2006)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji  
Anabilim Dalı (Şubat 2007-Şubat 2010)