

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TÜRKİYE’DE BULUNAN *Hypogymnia* (Nyl.) Nyl. TÜRLERİNDE  
rDNA ITS BÖLGESİ DİZİ ANALİZİ İLE ÇEŞİTLİLİĞİN  
TANIMLANMASI**

**AYBÜKE KABAOĞLU**

**BİYOLOJİ ANABİLİMDALI**

**ANKARA  
2007**

**Her Hakkı Saklıdır**

Doç.Dr. Sümer ARAS danışmanlığında, Aybüke KABAOĞLU tarafından hazırlanan ‘Türkiye’de Bulunan *Hypogymnia* (Nyl.) Nyl. Türlerinde rDNA ITS Bölgesi Dizi Analizi İle Çeşitliliğin Tanımlanması’ adlı tez çalışması 12/01/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Başkan : Prof Dr. Leyla AÇIK**

**Gazi Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı**

**Üye: Doç. Dr. Reyhan ÇOLAK**

**Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı**

**Üye: Doç. Dr. E. Sümer ARAS**

**Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı**

**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**

**Prof. Dr. Ülkü Mehmetoğlu**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TÜRKİYE’DE BULUNAN *Hypogymnia* (Nyl.) Nyl. TÜRLERİNDE rDNA ITS BÖLGESİ DİZİ ANALİZİ İLE ÇEŞİTLİLİĞİN TANIMLANMASI

Aybüke KABAOĞLU

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. E. Sümer ARAS

Bu çalışmada, Türkiye’nin farklı illerinden toplanan *Hypogymnia* cinsine ait *Hypogymnia physodes*, *Hypogymnia tubulosa* türlerinin rDNA ITS bölgeleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yardımıyla çoğaltılmış ve ilgili bölgeleri dizi analiziyle incelenmiştir.

Çalışmanın sonucunda, *Hypogymnia physodes* (Gümüşhane), *Hypogymnia tubulosa* (Antalya) türlerinden elde edilen ITS dizileri, gen bankasından elde edilmiş iki *Hypogymnia* türü (H4phyAF141368 (İsveç), H6phyAF058036 (İsveç) ve bu gruba yakınlığıyla bilinen Türkiye’den toplanmış farklı üç liken (*Neofuscelia pulla* (Bolu, Mengen), *Melanelia septentrionalis* (Karabük), *Parmelina tiliaceae* (Karabük)) türlerinin dizileri referans alınarak incelenmiş ve dendrogram oluşturulmuştur. Oluşan dendrogramda, Gümüşhane ve İsveç kökenli *Hypogymnia physodes* örnekleri bir grup oluştururken *Hypogymnia tubulosa* (Antalya) türü tek başına ayrı bir grup oluşturmuştur. Grup dışı türler de ayrıca bir grupta toplanmışlardır.

**Ocak 2007, 72 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Liken, polimorfizm, rDNA, ITS, dizi analizi

## ABSTRACT

Master Thesis

### IDENTIFICATION OF VARIATION IN *Hypogymnia* (Nyl.) Nyl. SPECIES by rDNA ITS REGION SEQUENCE ANALYSIS

Aybüke KABAOĞLU

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

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

In this study, species *Hypogymnia physodes*, *Hypogymnia tubulosa* that belongs to *Hypogymnia* were collected from different regions of Turkey. rDNA ITS regions of these species were amplified with Polimerase Chain Reaction (PCR) and analysed by sequence analysis

According to results of the study, the sequence data of ITS regions obtained from species *Hypogymnia physodes* (Gümüşhane), *Hypogymnia tubulosa* (Antalya) were compared with *Hypogymnia* (H4phyAF141368 (Sweden), H6phyAF058036 (Sweden)) that were taken from Gen Bank and three different lichens from Turkey (*Neofuscelia pulla* (Bolu, Mengen), *Melanelia septentrionalis* (Karabük), *Parmelina tiliaceae*(Karabük)) that are known with their similarity to this group and dendrograms were generated. In the dendrogram, *Hypogymnia physodes* specimens that were from Gümüşhane and Sweden formed a group while *Hypogymnia tubulosa* (Antalya) formed another group. Outgroup species from Turkey formed another group on the dendrogram.

**January 2007, 72 pages**

**Key Words:** Lichens, polimorphism, rDNA, ITS, sequence analysis

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana her türlü desteği sağlayan, tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Sümer ARAS’a teşekkürlerimi sunarım.

Kullanılan liken örneklerinin temin edilmesindeki yardımlarından dolayı Marmara Üniversitesi Öğretim Görevlisi Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülşah ÇOBANOĞLU’na teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca, laboratuvar çalışmalarım sırasında benden bilgisini, yardımlarını ve arkadaşlığını esirgemeyen Arş. Gör. Demet CANSARAN’a teşekkürlerimi sunarım.

Dostluğu ve güleryüzüyle her konuda yanımda ve yardımcım olan canım arkadaşım Uz. Biyolog Işık PERÇİN’e ve her konuda olduğu gibi yüksek lisans hayatımda da beni desteklediklerini hissettiren AİLEM’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aybüke Kabaoğlu

Ankara, Ocak 2007

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖZET.....                                                                                                  | i   |
| ABSTRACT .....                                                                                             | ii  |
| TEŞEKKÜR .....                                                                                             | iii |
| SİMGELER DİZİNİ .....                                                                                      | vi  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                                      | ix  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                                    | xi  |
| 1.GİRİŞ .....                                                                                              | 1   |
| 1.1 Likenler .....                                                                                         | 1   |
| 1.1.1 Likenlerin Sınıflandırması .....                                                                     | 2   |
| 1.1.1.1 Tallus yapılarına göre likenler .....                                                              | 2   |
| 1.1.1.2 Dış görünüşlerine göre likenler .....                                                              | 3   |
| 1.1.1.2.1 Kabuksu (Crustose) likenler .....                                                                | 3   |
| 1.1.1.2.2 Yapraksı (Foliose) likenler .....                                                                | 4   |
| 1.1.1.2.3 Dalsı (Fructiose) likenler .....                                                                 | 5   |
| 1.1.1.3 Yapısına katılan mantarın cinsine göre likenler .....                                              | 5   |
| 1.1.1.3.1 Ascolichenes (Akslı likenler) .....                                                              | 5   |
| 1.1.1.3.2 Basidiolichenes (Bazidiyumlu likenler) .....                                                     | 6   |
| 1.1.2 Likenlerin Çoğalması.....                                                                            | 6   |
| 1.1.3 Likenlerin önemi .....                                                                               | 7   |
| 1.1.4 <i>Hypogymnia</i> Cinsi.....                                                                         | 9   |
| 2. KURAMSAL TEMELLER.....                                                                                  | 14  |
| 2.1 Moleküler Belirteçler (Markırlar).....                                                                 | 14  |
| 2.1.1 Moleküler belirteçlerin avantajları .....                                                            | 15  |
| 2.1.2 Hibridizasyona dayalı moleküler belirteçler .....                                                    | 15  |
| 2.1.2.1 RFLP : Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi ( Restriction fragment<br>lenght polymorphism)..... | 15  |
| 2.1.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu:PCR .....                                                                | 17  |
| 2.1.4 PCR'a dayalı moleküler belirteçler .....                                                             | 17  |
| 2.1.4.1 RAPD: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (Randomly amplified                                      |     |

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| polymorphic DNA(s)) .....                                                                                                                       | 18 |
| 2.1.4.2 AFLPs: Amplifiye fragment uzunluk polimorfizmi (Amplified fragment length polymorphism) .....                                           | 19 |
| 2.1.4.3 SSR: Basit zincir tekrarları (Simple sequence repeats) / VNTRs: Çeşitli sayıda ardışık tekrarlar (Variable number tandem repeats) ..... | 20 |
| 2.1.4.4 ISSR: Basit iç dizi tekrarları (Inter simple sequence repeats).....                                                                     | 21 |
| 2.1.4.5 SCAR: Belirlenmiş ve çoğaltılmış polimorfik diziler (Sequence characterized amplified regions) .....                                    | 21 |
| 2.1.4.6 CAPS: Kesilip çoğaltılmış polimorfik diziler (Cleaved amplified polymorphic sequence) .....                                             | 22 |
| 2.1.4.7 ESTs: İşaretli ifade edilen diziler (Expressed sequence tags).....                                                                      | 22 |
| 2.2 Ribozom ve Ribozomal DNA (rDNA) .....                                                                                                       | 23 |
| 2.3 ITS: Internal Transcribe Spacer .....                                                                                                       | 26 |
| 2.4 DNA Dizi Analizi .....                                                                                                                      | 30 |
| 2.5 Filogenetik Analiz .....                                                                                                                    | 34 |
| 2.5.1 Dizilerin hizalanması .....                                                                                                               | 36 |
| 2.5.2 Yer değiştirmenin saptanması .....                                                                                                        | 37 |
| 2.5.3 Filogenetik ağacın oluşumu .....                                                                                                          | 37 |
| 2.5.3.1 Farklılıkları en aza indirme (Maximum parsimony) yöntemi.....                                                                           | 37 |
| 2.5.3.2 En yüksek ihtimal (Maximum likelihood) yöntemi .....                                                                                    | 39 |
| 2.5.3.3 Uzaklık (Distance) yöntemi: .....                                                                                                       | 40 |
| 3. MATERYAL ve METOD .....                                                                                                                      | 43 |
| 3.1 Materyal .....                                                                                                                              | 43 |
| 3.2 Yöntem .....                                                                                                                                | 43 |
| 3.2.1 Liken örneklerinin hazırlanması .....                                                                                                     | 43 |
| 3.2.2 DNA İzolasyonu.....                                                                                                                       | 44 |
| 3.2.3 PCR Analizleri.....                                                                                                                       | 46 |
| 3.2.4 Dizi Analizi.....                                                                                                                         | 45 |
| 3.2.5 Filogenetik Analiz .....                                                                                                                  | 47 |
| 4.BULGULAR .....                                                                                                                                | 48 |
| 5.TARTIŞMA SONUÇ .....                                                                                                                          | 62 |
| KAYNAKLAR.....                                                                                                                                  | 68 |

## SİMGELER DİZİNİ

|               |                                                                                 |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| µg            | mikrogram                                                                       |
| µM            | mikromolar                                                                      |
| PCR           | Polimeraz Zincir Reaksiyonu(Polimerase Chain Reaction)                          |
| AFLP          | Amplifiye Parça Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)   |
| AP-PCR        | (Arbitrary Primed-Polimerase Chain Reaction)                                    |
| bp            | Baz Çifti (Base Pair)                                                           |
| CAPS          | Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) |
| cDNA          | Kopya Deoksiribonükleik Asit                                                    |
| CTAB          | Setil Trimetil Amonyum Bromid                                                   |
| dATP          | deoksiadenozintrifosfat                                                         |
| dCTP          | deoksisitozintrifosfat                                                          |
| dGTP          | deoksiguanintrifosfat                                                           |
| dk            | dakika                                                                          |
| DNA           | Deoksiribonükleik Asit                                                          |
| dNTP          | deoksinükleotittrifosfat                                                        |
| dTTP          | deoksitimintrifosfat                                                            |
| EDTA          | Etilen Diiamin Tetra Asetik Asit                                                |
| EMBL          | Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı                                          |
| ESTs:         | İşaretli İfade edilen Diziler (Expressed Sequence Tags)                         |
| FM            | Fitch-Morgoliash                                                                |
| g             | gram                                                                            |
| H4phyAF141368 | <i>Hypogymnia physodes</i> (İsveç)                                              |
| H6phyAF058036 | <i>Hypogymnia physodes</i> (İsveç)                                              |
| Hyp1          | <i>Hypogymnia physodes</i> (Gümüşhane)                                          |
| Hyp3          | <i>Hypogymnia tubulosa</i> (Antalya)                                            |

|                   |                                                                          |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| IGS               | Genarası boşluklar (Intergenic Spacer)                                   |
| ISSR              | Basit İç Dizi Tekrarları (Inter Simple Sequence Repeats)                 |
| ITS               | İnternal Ara Bölgeler (Internal Transcribe Spacer )                      |
| ii                | Aynı çiftler (Identical Pairs )                                          |
| kb                | kilo baz                                                                 |
| LiCl              | Lityum Klorür                                                            |
| LSU               | Büyük Alt Ünite (Large Subunit)                                          |
| M                 | Molar                                                                    |
| mg                | miligram <sup>44</sup>                                                   |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnezyum klorür                                                         |
| ML                | Maksimum Benzerlik                                                       |
| mm                | Milimetre                                                                |
| MP                | Maksimum Parsimoni                                                       |
| mRNA              | Haberci Ribonükleik Asit                                                 |
| n                 | numara                                                                   |
| ng                | nanogram                                                                 |
| NJ                | Neighbour Joining                                                        |
| nm                | nanometre                                                                |
| nrDNA             | Nükleer mesajcı Ribonükleik Asit                                         |
| nrLSU             | Nükleer Ribozom Büyük Alt Birimi                                         |
| Nyl.              | Nylander                                                                 |
| OD                | Optik Dansite                                                            |
| Pa16              | <i>Melanelia septentrionalis</i> (Karabük)                               |
| Pa27              | <i>Parmelina tiliaceae</i> (Karabük)                                     |
| Pa3               | <i>Neofuscelia pulla</i> (Bolu, Mengen)                                  |
| Pdf.              | Portable documant format                                                 |
| pH                | Hidrojen yoğunluğu                                                       |
| PVP               | Poli Vinil Pirolidon                                                     |
| RAPD              | Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA) |
| rDNA              | Ribozomal Deoksiribonükleik Asit                                         |
| RFLP              | Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction                     |

|       |                                                                                          |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------|
|       | Fragment Length Polimorphism)                                                            |
| RNA   | Ribonükleik Asit                                                                         |
| rpm   | Dakikadaki dönüş hız birimi (revolution per minute)                                      |
| rRNA  | Ribozomal Ribonükleik Asit                                                               |
| SCAR  | Belirlenmiş ve çoğaltılmış polimorfik diziler (Sequence Characterized Amplified Regions) |
| si    | Geçiş çiftleri (Transitionsal Pairs)                                                     |
| SSR   | Basit Zincir Tekrarları (Simple Sequence Repeats)                                        |
| SSU   | Küçük Alt Ünite (Small Subunit)3                                                         |
| Sv    | Değişmiş çiftler (Transversional Pairs)                                                  |
| TE    | Tris Edta                                                                                |
| tRNA  | Taşıyıcı Ribonükleik Asit                                                                |
| UPGMA | Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean                                        |
| UV    | Ultra Viyole                                                                             |
| V     | Hacim (Volume)                                                                           |
| VNTRs | Çeşitli sayıda ardışık tekrarlar (Variable number tandem repeats)                        |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1 Heteromerik talluslu likenin yapısı.....                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 3  |
| Şekil 1.2 Kabuksu likenin yapısı ve doğadaki görüntüsü .....                                                                                                                                                                                                                                                                             | 4  |
| Şekil 1.3 Yapraksı likenin yapısı ve doğadaki görüntüsü .....                                                                                                                                                                                                                                                                            | 4  |
| Şekil 1.4 Dalsı likenin yapısı ve doğadaki görüntüsü .....                                                                                                                                                                                                                                                                               | 5  |
| Şekil 1.5 Sorediaların yayılmasıyla likenin çoğalması .....                                                                                                                                                                                                                                                                              | 7  |
| Şekil 1.6 Hypogymnia cinsi liken örnekleri a. <i>Hypogymnia tubulosa</i> b.<br><i>Hypogymnia physodes</i> c. <i>Hypogymnia farinacea</i> .....                                                                                                                                                                                           | 10 |
| Şekil:1.7 Sukroz gradiyetinde çökme davranışlarına göre ayrıştırılan prokaryotik ve<br>ökaryotik ribozomlar, alt birimleri ve rRNA bileşenleri .....                                                                                                                                                                                     | 24 |
| Şekil 1.8 18S-26S nükleer ribozomal DNA (nrDNA)'ın Internal transcribed sequence<br>(ITS) bölgesi ve primer pozisyonları (Coşkun, 2003).....                                                                                                                                                                                             | 27 |
| Şekil 1.9 2'3' dideoksi analogu .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 31 |
| Şekil 1.10 Dideoksi nükleotitler varlığında DNA sentezi.....                                                                                                                                                                                                                                                                             | 32 |
| Şekil 1.11 Sentez sonrası DNA bantlarının otoradyografi görüntüsü .....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 33 |
| Şekil1.12 Dört farklı floresan boyanın kullanılmasıyla oluşan pikler .....                                                                                                                                                                                                                                                               | 33 |
| Şekil 4.1 <i>Hypogymnia</i> türlerinin mini prep yöntemine göre gerçekleştirilen DNA<br>izolasyonu sonucunda elde edilen DNA bantlarının agaroz jel elektroforez<br>görüntüsü .....                                                                                                                                                      | 48 |
| Şekil 4.2 İlk DNA izolasyonunda sonuç alınamayan <i>Hypogymnia</i> türlerinin mini prep<br>yöntemine göre gerçekleştirilen ikinci DNA izolasyonu sonucunda elde<br>edilen DNA bantlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü .....                                                                                                        | 50 |
| Şekil 4.3 <i>Hypogymnia</i> türlerinin PCR sonucunda elde edilen DNA bantlarının<br>elektroforez görüntüsü .....                                                                                                                                                                                                                         | 51 |
| Şekil 4.4 <i>Hypogymnia physodes</i> (Giresun) türünün [MgCl <sub>2</sub> ]=3mM, [MgCl <sub>2</sub> ]=3.5mM,<br>[MgCl <sub>2</sub> ]=4mM, [MgCl <sub>2</sub> ]=4,5mM, [MgCl <sub>2</sub> ]=5mM, [MgCl <sub>2</sub> ]=5.5mM<br>konsantrasyonlarında yapılan PCR'ları sonucunda elde edilen DNA<br>bantlarının elektroforez görüntüsü..... | 52 |
| Şekil 4.5 <i>Hypogymnia</i> türlerinin farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonları kullanılarak yapılan<br>PCR sonucunda elde edilen DNA bantları .....                                                                                                                                                                                   | 53 |

|                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.6 Çift bant gözlenen örneklerin bandı Wizard DNA Saflaştırma sistemi<br>(Promega) ile saflaştırılması sonucunda elde edilen örneklerin elektroforez<br>jel görüntüsü ..... | 55 |
| Şekil 4.7 UPGMA dendrogramı.....                                                                                                                                                   | 60 |
| Şekil 4.8 Neighbor - Joining dendrogramı.....                                                                                                                                      | 60 |
| Şekil 4.9 Maksimum parsinomi dendrogramı.....                                                                                                                                      | 61 |
| Şekil 4.10 Maksimum benzerlik dendrogramı.....                                                                                                                                     | 61 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 4.1 <i>Hypogymnia</i> türlerinin mini prep yöntemine göre gerçekleştirilen DNA izolasyonu sonuçları .....                                        | 49 |
| Çizelge 4.2 İlk izolasyonda sonuç alınamayan <i>Hypogymnia</i> türlerinin mini prep yöntemine göre gerçekleştirilen ikinci DNA izolasyonu sonuçları..... | 50 |
| Çizelge 4.3 <i>Hypogymnia</i> türlerinin PCR sonuçları .....                                                                                             | 51 |
| Çizelge 4.4 <i>Hypogymnia physodes</i> (Giresun) türünün farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında PCR sonuçları.....                                | 52 |
| Çizelge 4.5 <i>Hypogymnia</i> türlerinin farklı MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarında PCR sonuçları                                                     | 54 |
| Çizelge 4.6 Dizisi karşılaştırılan örneklerin numaralandırılması ve Gen bankasındaki isimleri .....                                                      | 59 |
| Çizelge 4.7 Dizisi karşılaştırılan örneklere ait benzerlik indeks.....                                                                                   | 59 |
| Çizelge 4.8 Karşılaştırılan örneklerin dizilerinin içerdiği baz sayıları .....                                                                           | 59 |
| Çizelge 4.9 Karşılaştırılan örneklerin içerdikleri dizi çiftleri ve sayıları.....                                                                        | 60 |

# 1.GİRİŞ

## 1.1 Likenler

Likenler başlıbaşına birer organizma değildirler. Mantarlar ile alglerin birleşerek morfolojik ve fizyolojik bir bütün halinde meydana getirdikleri simbiyotik birliklerdir (Güner 1986).

Likenlere katılan alg ve mantar genellikle serbest yaşayan akrabalarından farklı formda ve tutumdadırlar (<http://www.mdc.mo.gov/conmag/1998/10/20.htm>, 2004). Renksiz bir mantar hifinde oluşan tallusun yapısına algin katılması sonucu ortaya renkli klorofili olan yepyeni ototrof bir bitki çıkar (Güner 1986). Likendeki alg ve mantar kendilerini çoğaltabilecek bir form oluşturmak için bir araya gelirler (<http://www.mdc.mo.gov/conmag/1998/10/20.htm>, 2004). Diğer türlü tutunamadıkları habitatlarda birliktelik oluşturur ve yayılırlar (<http://www.ipcc.ie/infolichens.html>, 2004). Likenler, alg ve mantarların nadir oldukları yerlerde yayılmışlardır (<http://www.mdc.mo.gov/conmag/1998/10/20.htm>, 2004). Mantar hifleri, liken tallusunun ihtiyacı olan su, CO<sub>2</sub> ve mineral maddeleri temin eder. Alg hücreleri ise mantara, klorofili vasıtasıyla sentezlediği organik maddeleri ve oksijeni sağlar (Yurdakulol ve Yıldız 2002). Mantar bu besinleri alg hücrelerinin içerisine kadar uzanan boruları sayesinde emer. Özgül yaşam şekilleri sayesinde likenler ekstrem koşullarda yaşam şansı kazanır (Güner 1986). Alg hücreleri mantar dokularıyla kaplanmıştır, böylece mantar onları şiddetli ışık, kuraklık ve ısıdan korur (<http://www.mdc.mo.gov/conmag/1998/10/20.htm>).

Likenlerin yapısına katılmada en çok rastlanan alg türleri özellikle *Cyanophyceae* (mavi-yeşil algler) veya *Chlorophyceae* (yeşil algler) üyeleridir. Mantarlardan ise çoğunlukla Ascomycetes nadir olarak ise Basidiomycetes cinsleri katılır (Güner 1986).

Likenler mantarların sistematik bir grubu değildir, bir biyolojik gruptur. Liken birlikteliğini yalnızca mantar ile alg veya mantar ile siyanobakteri oluşturmaz. İki

fazla organizmadan oluşmuş likenler de vardır ve bunlar içerdikleri canlı sayısı veya çeşidine göre Hawksworth tarafından farklı gruplara ayrılmışlardır (Hawksworth 1976).

Likenler sistematikçiler tarafından değişik şekillerde sınıflandırılmıştır. Sınıflandırma yapılırken; tallus yapıları, morfolojik yapıları, üzerinde büyüdükleri bitki substratları, likeni oluşturan mantarın sınıfı dikkate alınmıştır.

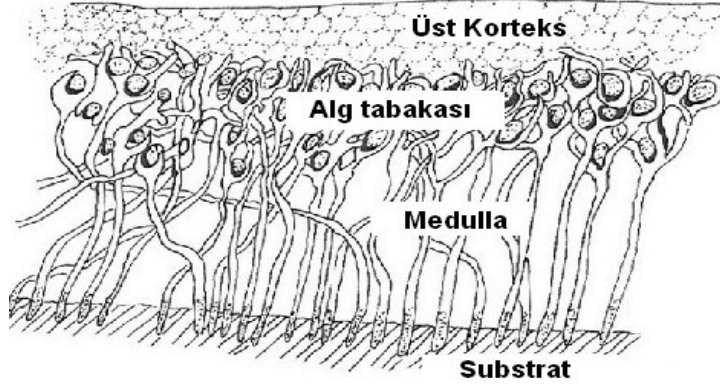
### **1.1.1 Likenlerin sınıflandırılması**

#### **1.1.1.1 Tallus yapılarına göre likenler**

Alg ve mantarın birbiri ile karışımı değişik şekillerde olabilir. Eğer alg ve mantar tallus yapısında homojen bir dağılım gösteriyorsa böyle likenlere ‘Homeomerik’ liken, alg ve mantar türleri arasında farklı dağılım varsa bu tiplere ‘Heteromerik’ liken adı verilir.

Homeomerik tip talluslu likenlerde tallus, jelatini andıran müsilaajımsı yapıdadır. Alg ve mantar türleri ayrı bir tabaka oluşturmaksızın birbirleri ile karışmışlardır (Güner 1986). Mantar miselyumu, algin salgıladığı müsilaaj içerisinde homojen olarak dağılmıştır. Likenin şekli alg tarafından belirlenir (Yurdakulol ve Yıldız 2002).

Heteromerik tipi talluslu likenlerde algler üst kabuk tabakası ile orta kısım arasında bir tabaka oluşturur (Şekil 1.1). Diğer kısımlar sıkı veya gevşek olarak mantar hiflerinden oluşmuş dokular halindedir. Likenlerin çoğu bu tipe dahildir. Üst kabuk tabakasının altında alglerin oluşturduğu ‘gonidiyum’ tabakası bariz olarak ayırt edilebilir (Güner 1986). Bunun altında mantar hiflerinden oluşmuş ‘medulla’ isimli tabaka bulunur. Örnek olarak *Hypogymnia* cinsini verebiliriz. Heteromerik likenlerde, likenin şekli içerisinde alg içeren zonları olan mantar tarafından belirlenir (Yurdakulol ve Yıldız 2002).



Şekil 1.1 Heteromerik talluslu likenin yapısı

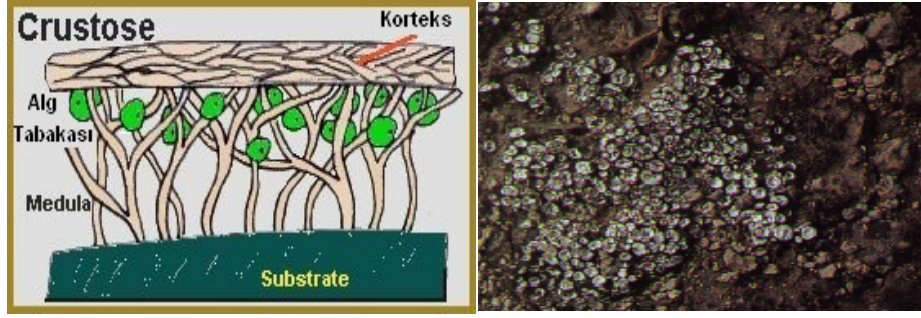
Likenler bulundukları ortama ve beraber yaşadıkları bitkilerin durumlarına göre değişik şekillerde olabilirler. Onlar dış görünüşlerindeki değişikliklere göre de çeşitli tiplere ayrılırlar.

#### 1.1.1.2 Dış görünüşlerine göre likenler

##### 1.1.1.2.1 Kabuksu (Crustose) likenler

Üzeri boyanmış tahta görünümündedirler (<http://www.ipcc.ie/infolichens.html>, 2004). Kayalar üzerinde gelişirler (Güner 1986). Yassı tallusları kabuk şeklindedir ve tüm alt yüzeyi ile ortama sıkı sıkıya bağlanarak yaşadıkları yüzeyde kabuk oluştururlar. Bu kabuk oldukça kalın ya da yüzeyin içine doğru gömülüdür. Substratından kazıyarak ayrılabilir (<http://www.mdc.mo.gov /conmag/1998/10/20.htm>, 2004). Salgıladıkları liken asitleriyle bazen kayaları eriterek içine kadar girerler. Bunlara **endolitik** likenler denir.

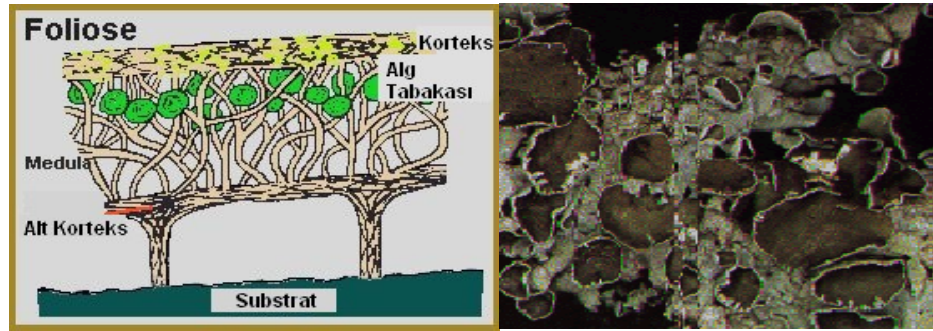
Liken asitleri, değişik karakterdedirler; parlaktırlar hiflerin ve tallusun yüzeyini örterler, kristalimsi yapıları andıran pulcuklar halinde göze çarparlar (Güner 1986). Şekil 1.2’de kabuksu likenin yapısı ve doğadaki görüntüsü gösterilmektedir.



Şekil 1.2 Kabuksu likenin yapısı ve doğadaki görüntüsü  
(<http://www.earthlife.net/lichens/lichen.html>, 2004)

#### 1.1.1.2 Yapraksı (Foliose) likenler

Toprak istekleri çoktur. Çıplak kayaların üzerinde görülmezler. İki koruyucu mantar tabakaları vardır. Tallusları küçük veya büyük loplara ayrılmıştır (Güner 1986). Kök yapıları sayesinde yaşadıkları yüzeyden biraz yüksekte dururlar. Büyüdükleri ortamlara rizoid şeklinde hifler gönderirler (Şekil 1.3). Substratlarına hafifçe bağlıdır (http://www.ipcc.ie/infolichens.html, 2004).



Şekil 1.3 Yapraksı likenin yapısı ve doğadaki görüntüsü  
(<http://www.earthlife.net/lichens/lichen.html>, 2004)

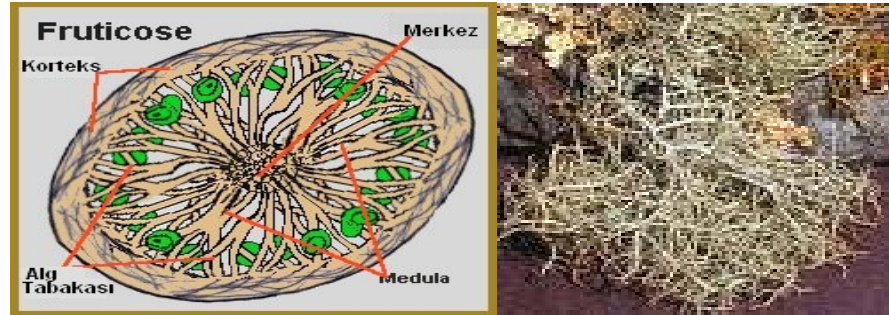
Çoğu foliose tipler yılda 2 veya 5 mm büyürler (Armstrong 2004). *Parmelia*, *Lobaria*, *Hypogymnia* cinsleri yapraksı likenlere örnek olarak verilebilir.

### 1.1.1.2.3 Dalsı (Fruticose) likenler

Tıpkı çalıya benzer, oldukça büyük likenlerdir. Yaşadıkları yüzeylere tek bir noktadan bağlıdırlar. Ağaçlar üzerinde gelişirler. İpliksi veya şeritsi tallusları diktir.

Likenler üzerlerinde büyüdükleri zemine göre de isimlendirilirler. Toprakta büyürse terrikolous, kayalarda büyürse saksikolous, ağaçlarda büyürse lignikolous, ağaç kabuklarında büyürse kortikolous, karayosunları üzerinde büyürlerse musikolous, likenlerin üzerinde yetişirlerse likenikolous likenler olarak isimlendirilirler.

Tallusları çok sık dallanmıştır (Güner 1986). Kolayca substratlarından ayrılırlar (<http://www.ipcc.ie/infolichens.html>, 2004). Usnea cinsi likenler dalsı likenlere örnek olarak verilebilir. Şekil 1.4.'de dalsı likenlerin yapısı ve bir dalsı likenin doğadaki görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 1.4 Dalsı likenin yapısı ve doğadaki görüntüsü  
(<http://www.earthlife.net/lichens/lichen.html>, 2004)

### 1.1.1.3 Yapısına katılan mantarın cinsine göre likenler

Likenler yapısına katılan mantarların sınıfına uygun olarak başlıca iki sınıfa ayrılırlar.

#### 1.1.1.3.1 Ascolichenes (Aksuslu likenler)

Alglerin askuslu mantarlarla birlikte oluşturdukları bir simbiyoz yaşamlı bitkilerdir. Likenlerin çoğu bu gruba dahildir.

#### **1.1.1.3.2 Basidiolichenes (Bazidiyumlu likenler)**

Genellikle tropikal bölgelerde rastlanır.

Likenler, deniz kıyısından en yüksek dağlara, sıcak bölgelerden kutuplara kadar geniş bir yayılım alanına sahiptirler, en kötü şartlar altında dahi gelişebilmektedirler. Tallusları çok yavaş büyür (Güner 1986). Toprakta, kayalarda, taşlarda, ağaçlarda, ağaç kabuklarında dallarda, kemiklerde, deride, yünde, kerestelerde, evlerin duvarlarında, anıtlarda, kiremitlerde, mezar taşlarında, camlarda ve eski demir alet ve eşyalarda büyüüp gelişebilirler (Yurdakulol ve Yıldız 2002). Likenler yağmurdan hatta likenle çok kısa süre temasa geçen çok seyreltik bir akıntıdan bile besin sağlayabilirler, biriktirebilirler.

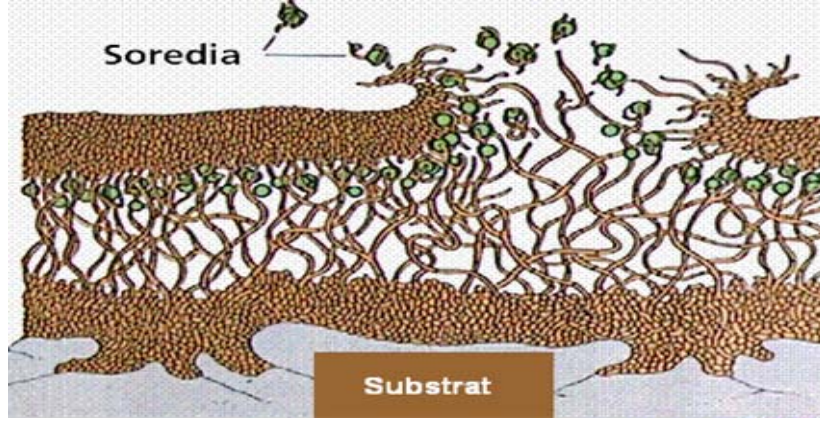
Bazı likenler sadece özgül habitatlarda bulunurlar mesela yalnız bir çeşit ağaç veya kaya üzerinde. Aynı zamanda bir ağaç gövdesinde 30 dan fazla liken çeşidine rastlamak da mümkündür. Dar habitat koşullarında yaşayan likenler habitat şartlarına karşı oldukça hassasdırlar, mesela bazı türler hava kirliliğine hassasdırlar ve hava kalitesinin ölçülmesinde kullanılırlar. Bu hassasiyetlerine karşı çok sert doğa koşullarına karşı dayanıklıdırlar (<http://www.mdc.mo.gov/conmag/1998/10/20.htm>, 2004). Çok yavaş büyürler ancak çok yaşlanabilirler, 6000 yıldır yaşayanları tespit edilmiştir ve büyük ihtimalle dünyada yaşayan en yaşlı organizmadır (Ulrik 1999).

#### **1.1.2 Likenlerin çoğalması**

Likenler iki şekilde çoğalırlar. Mantar kısmı keselerde spor üretir ve bu sporlar likenden salınır. Hafif olan bu sporlar belli bir mesafe taşınabilir ve uygun alg veya bakteri partnerini bulursa yeniden bir liken oluşturabilir. Bulamazsa yaşayamaz, ölür.

İkinci şekil ise daha güvenlidir; çoğu likenin yüzeyinde, ‘soredia’ adı verilen hem alg hem de mantardan materyal taşıyan, kahverengi veya siyah diskler bulunur

(<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/lichen.htm,2004>). Likenin yüzeyinde toz yumağı gibi görünürler, rüzgar, yağmur veya otlayan hayvanlarca taşınan soredialar yayılır ve yeni likenler oluştururlar (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 Sorediaların yayılmasıyla likenin çoğalması

### 1.1.3 Likenlerin önemi

Kayalar üzerinde gelişen kabuksu likenler oluşturdukları liken asitleri yardımı ile kayaları parçalayarak ortamda toprak oluşumuna neden olurlar. Liken asidi kalkerli ve granitik kayaları kademeli olarak parçalar. Zamanla buralarda parçalanma sonucu oluşan ufak taşcıklar üzerinde az toprağa ihtiyaç gösteren yapraklı kara yosunları gelişmeye başlar. Daha sonraları da parçalanmanın ilerlemesi ve karayosunlarının artıklarının birikmesi ile toprak miktarı çoğalmaya ve böyle yerlerde yüksek bitkiler büyümeye yönelir (Güner 1986). Böylece likenler bitki örtüsünün gelişim sürecinde öncü bitkiler olmuş olurlar (Yurdakulol ve Yıldız 2002).

Likenler, genellikle acı kimyasallar içerdiklerinden yaban hayatın ana besin kaynağını oluşturmazlar ancak besin zincirinde önemli yere sahiptirler (<http://www.mdc.mo.gov/conmag/1998/10/20.htm>, 2004). Tırtıllar, solucanlar, sümüklüböcekler, salyangozlar likenlerle beslenirler. Likenle kaplı ağaçlar üzerinde yetişkin güveler mimikri yaparak dinlenirler (<http://www.ipcc.ie/infolichens.html>, 2004). Ağaç kabukları ve rutubetli ortamlardaki kayalar üzerinde gelişen yapraksı ve dalsı likenler

hayvan besini olarak kullanılmaktadır. Bunların başında arktik bölgelerde bol gelişen ve ren geyiklerinin önemli besinlerini oluşturan *Cladonia rangiferina* ve *Cetraria islandica* türleri gelmektedir. Ayrıca bu tip likenlerden alkol de elde edilmektedir (Güner 1986).

Çoğu kuş likenleri yuva yapımında kullanır, Missouri'nin en renkli ötücü kuşu *Parula* yuva yapımında *Usnea* likenini ya da İspanyol yosununu tercih eder.

İnsanlar, yüzyıllardır likenleri boyamada kullanmışlardır, Romanlar mor boyasını likenlerden elde etmişlerdir, İskoçya'daki geleneksel erkek eteklikleri liken ekstratlarıyla boyanmıştır (<http://www.mdc.mo.gov/conmag/1998/10/20.htm>, 2004). Hintliler kilimlerinde liken boyalarını kullanmışlardır. Ressamlar vivid morunu elde edebilmek için likenlerden faydalanmışlardır (<http://www.mdc.mo.gov/conmag/1998/10/20.htm>, 2004).

Likenlerden yapılan çay ve merhemler tüm dünyada geleneksel ilaç olarak kullanılmıştır. Likenler ayrıca modern ilaç, antibiyotik ve kremlerde kullanılmıştır. Parfüm endüstrisinde, fiksatif olarak kullanılırlar, parfümün kokusunun yavaşça dağılmasını sağlarlar (Ulrik 1999).

Liken asitlerinin bazı maddelerle reaksiyon vermeleri, ayrıca bazı boya maddelerini içermeleri ve antibiyotik içeren cinslerinin olması likenlerin önemini arttırmaktadır. *Rocella* türlerinden asit/baz indikatörü olarak kullanılan turnusol elde edilir. Afrika ve Arabistan'da yetişen *Aspicilia esculanta* (Manna likeni)' dan ekmek yapılmaktadır.

Çalimsı yapıda ve sert olan türlerin üretimi yapılarak evlerde ve benzeri yerlerde dekorasyon işlerinde kullanılmak üzere pazarlarda satılmaktadır. İskandinav ülkelerinde bu türler mezarlarda çiçek yerine tabutun başına konmaktadır (Güner 1986).

Bazı liken türleri kumlu topraklarda oldukça yaygındır. Rüzgara karşı toprağa iyi

tespit olarak erozyonu önlerler. Amerika'nın doğusunda kullanılmayan yollarda *Baeomyces roseus* killi topraklara iyi tutunarak su erozyonunu önler (Yurdakulol ve Yıldız 2002).

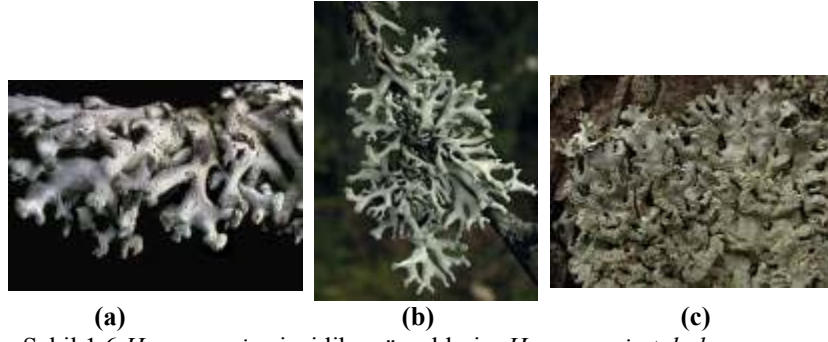
Likenler kirliliğin belli bir seviyesine sülfürdioksitten dolayı hassastırlar, Bu yüzden çevreciler tarafından hava kirliliğinin ölçümünde kullanılırlar. Likenler sünger gibi kirlletici maddeleri emerler, onların kimyasal analiziyle araştırmacılar havada ne olduğunu söyleyebilirler (<http://www.ipcc.ie/infolichens.html>, 2004)

#### **1.1.4 *Hypogymnia* Cinsi**

Bu çalışmada Türkiye'nin değişik yörelerinden toplanmış *Hypogymnia* cinsine ait liken türleriyle çalışılmıştır. Bu çalışmada kullanılan *Hypogymnia* cinsine ait örneklerden bazıları Şekil 1.6'da gösterilmiştir.

*Hypogymnia* 'lar, uzun süre çok fazla benzer özellik taşıdığı Parmeliceae familyasının üyesi olarak kabul edilmiştir. 1960 yılında Nylander tarafından rizoidlerinin bulunmuyışı ile *Parmelia* cinsinden ayrılmış (Nylander 1896) ve Poelt tarafından *Hypogymniaceae* familyası olarak tanımlanmıştır (Poelt 1973). Sonrasında *Hypogymnia* cinsinde tallusun şişkin ve iç kısmını boş olduğu göz önüne alınarak tallusları dolu bireyleri, Goward tarafından *Brodoa* cinsi olarak ayrı bir familya altında toplanmıştır (Zeybek vd. 1993a). Bitter *Hypogymnia* türlerinin sınıflandırmasında soralia morfolojisinin iyi bir karakter olduğunu savunmuştur (Bitter 1901). Modern liken sistematğinde *Hypogymnia* cinsi, *Hypogymniaceae* familyası, *Lecanorales* ordosu altındadır (Zeybek vd. 1993a).

Sonraki dönemlerde bu cins üzerine Krog ve Elix'in çalışmaları olmuştur. Krog Artrik ve Boreal Kuzey Yarımküredeki türlere yoğunlaşırken (Krog 1968), Elix Avusturalya ve Doğu Asya'daki bireyleriyle ilgilenmiştir (Elix 1979).



Şekil 1.6 *Hypogymnia* cinsi liken örnekleri **a.***Hypogymnia tubulosa*  
**b.***Hypogymnia physodes* **c.***Hypogymnia farinacea*

Ülkemizde ise bu cins üzerine çalışan araştırmacılar Ulvi Zeybek ve Volker John'dur. Bu araştırmacılar, Türkiye'deki *Hypogymnia* türleri üzerine yaptıkları taksonomik çalışmada türlerin morfolojik özelliklerine göre ayrımını sağlayan bir tür tayin anahtarı oluşturmuşlar ve Türkiye'deki yayılış alanlarını açıklamışlardır (Zeybek vd. 1993a). Başka bir çalışmalarında ise yalnızca morfolojiyle tanımlamalarının zor olduğunu söyledikleri *Hypogymnia* bireylerinin farklılıklarını kimyasal analizler yaparak ortaya koymuşlardır. Bu çalışmalarında likenlerin ikincil metabolitlerini tanımlamışlardır (Zeybek vd. 1993b).

*Hypogymnia* cinsi, içi boş şişkin loplara sahip birbirine morfolojik ve anatomik olarak oldukça benzeyen türlere sahip bir taksondur. Tallusları iyi gelişmiştir. Rizoidleri yoktur. Lobların kenarları siyah buruşuk, üst kısımları ise beyaz-beyazımsı gridir, bazı türlerinde uçları ince kahverengi veya siyah çerçevelidir. Loplara kenarları içe kıvrık ve iç kısımları bağlantısızdır (hypo:alt, gymnia:çıplak ) (Şekil 1.6.). Türlerle göre başsı, dudaksı, yüzeysel veya yüksük şeklinde soralleri vardır. Apotesiyum bulunan türlerinde sorallerin ender oluşu tipiktir. Tallusun anatomik yapısı heteromeriktir. Apotesiyumda gelişen askosporangiyumlar 8 sporelidir. Sporlar renksiz, uç kısımlarında iyod ile maviye boyanan yüksük bulunur (Zeybek vd .1993a).

Bu cinsin taşıdığı en önemli karakteristik özellikleri; Sorelia lokasyonu, kısa yan loplara varlığı veya yokluğu, lobların renklenmesi, lop çapları ve dallanma şekilleri, şişkin, topuz-boğum tipi loplara varlığı, yassı veya yassı olmayan büyüme şeklidir. Ancak bu özellikler de türlerin birbirinden ayrımında bazen yeterli olamamaktadır

(<http://www.blm.gov/or/plans/surveyandmanage/MR/Lichens/20041022/Lichens-346949.pdf>, 2004).

*Hypogymnia* cinsine ait bireyler, küçük yüzeyler üzerinde büyüyebilme yeteneklerinden dolayı genç dallar ve kökler üzerinde bulunabilmektedirler. Kırlarda nemli koşullarda genellikle çalılıkların köklerinde bulunmaktadır. Yaygın olarak asit habitatlarında yaşarlar. Ağaçlık alanlarda huş gibi düşük pH'lı kabuklu ağaçlar ya da *Picea* gibi korniferler üzerinde yetişmektedirler ([http://www-biol.paisley.ac.uk/bioref/Fungi\\_lichens/Hypogymnia\\_physodes.html](http://www-biol.paisley.ac.uk/bioref/Fungi_lichens/Hypogymnia_physodes.html), 2004).

Asidik koşullara dayanıklılığından dolayı sülfürdioksit kirliliğinin yüksek seviyelerinde yaşayabilirler ve bu özellikleri sayesinde biyoindikatör olarak da kullanılmaktadırlar. Ayrıca Fransa'da, Kuzey Avrupa ve Güney Afrika meşelerinden elde edilen *Hypogymnia* cinsi liken ekstraktları parfüm endüstrisinde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada Türkiye'de bulunan *Hypogymnia* cinsine ait türlerin rDNA ITS bölgesi dizi analizi ile çeşitliliklerinin tanımlanması amaç edinilmiştir. Çalışmaya bu cinse ait dört farklı türün farklı lokalitelerden toplanmış örnekleriyle başlanmıştır. Bu türlerin isimleri ve morfolojik özellikleri aşağıdaki şöyledir.

#### ***Hypogymnia farinacea* Zopf**

Sinonimleri: *Parmelia farinacea* Bitter, *Hypogymnia bitteriana* (Zahlbr.) Krog, *Parmelia bitteriana* Zahlbr.

Tallusları gri renkli, rozet durumudur, 1-3mm eninde dar loplu ve yatıktır. Yukarı kalkık lop uçlarında başsı soralleri sıktır. İbrelili ve iri yapraklı orman ağaçları kabuklarında yoğun birlikler oluşturur. Odun ve taşlar üzerinde seyrek bulunurlar. Ülkemizde İzmir, Muğla, Hatay illerinde yaygındır.

***Hypogymnia laminisorediata*** D. Hawksw. et Poelt

Tallusları gri renkli, parlak değildir. Lopları 2-5 mm eninde geniştir. Uçları çoğunlukla siyah çerçevesiz, ender olarak çerçvelidir. Tallus yüzeyinde siğilimsi isidiyuma benzer çıkıntılar vardır. Apotesiyumları irili ufaklı gruplar halinde ve kalın saplıdır. Ülkemizde İzmir, Manisa illerinde dağılım göstermektedir.

***Hypogymnia physodes*, (L.) Nyl.**

Sinonimi: *Parmelia physodes* (L.) Ach.

Talluslarının morfolojik yapısı ortama göre değişkendir, gri renklidir, parlak değildir. Lop uçları üst tarafa dönük ve uçlarında tipik dudaksı soraller vardır. Lopların alt taraflarında yuvarlak korteks açıklıkları yoktur. Yüksek dağ formlarında soraller ender görülür. Apotesiyumlara ender rastlanır. Akdeniz bölgesinden arktik bölgeye kadar dağlarda ve 3000 metreden fazla yüksekliklerde ağaç kabukları üzerinde, ph sı düşük taşlar üzerinde yetişirler. Toprakta yetişen dağ formlarında çoğunlukla soraller oluşmaz. Ülkemizde Zonguldak, Bolu, Kızılcahamam, Trabzon (Maçka, Uzungöl, Sümela), Artvin, İzmir, Aydın, Hatay illerinde dağılım göstermektedir.

***Hypogymnia tubulosa*** (Schaer) Hav.

Sinonimi: : *Parmelia physodes* (Schaer.) Bitter.

Tallusları gri renklidir, tallusları gri olan *Hypogymnia physodes* türleriyle karıştırılabilir ancak *H. physodes*'de dudaksı olan soraller, *H. tubulosa*'da küçük başlı tiptedir. Avrupa'da Alplerde 2000 metreye kadar yer yer bulunur. Ülkemizde Trabzon, İzmir, Manisa, Çanakkale, Muğla, Hatay illerinde yaygındır (Zeybek vd. 1993a).

Çalışmaya dört farklı türe ait örneklerle başlanmasına rağmen *Hypogymnia farinacea*, *Hypogymnia laminisorediata* türlerine ait örneklerde yaşanan teknik sorunlar nedeniyle çalışmaya iki türle devam edilmiş ve bu türlerin ITS bölgesi dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Çeşitliliğin tanımlanabilmesinde yalnızca iki türe ait dizi bilgisi yeterli olamayacağı için, farklı lokalitelerden yine aynı gruba ait ve bu gruba

yakınlığıyla bilinen bireylerin dizileri çalışmaya dahil edilmiş ve tüm bu örnekler arasındaki filogenetik ilişki incelenmiştir.

## **2. KURAMSAL TEMELLER**

### **2.1 Moleküler Belirteçler (Markırlar)**

Likenlerdeki sistematik çalışmalar, diğer bitki gruplarında da olduğu gibi klasik olarak daha çok morfolojik karakterlere dayalı tanımlamaya göre yapılmaktadır. Morfolojik karakterlerin yanında, kemotaksonomik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu tanımlama çalışmalarının liken veya bitki sistematik kategorilerini tanımlamaya tam olarak yetmiyor olması, son yıllarda taksonomi çalışmalarında daha çok moleküler yöntemlere ağırlık verilmesiyle sonuçlanmıştır. Bu moleküler çalışmalarda da moleküler belirteçler ön plana çıkmışlardır.

Bitki teşhisleri için geleneksel teşhis anahtarları, organizmaların morfolojik, anatomik ve nadiren kimyasal özelliklerine göre çalışırlar. Öncelikle organizmaların kesin belirlenebilmesi için değişik türler arasında morfolojik ve anatomik özelliklerin farklılıkları yeterli olmayabilir. Ayrıca, farklı habitatlarda yaşayınca organizmalar oldukça sık birbirinden farklı değişimler gösterebilirler, böylece aynı türlere ait organizmalar farklı morfolojik ve anatomik özellikler gösterebilirler. Bu nedenle genotip fenotipten daha stabildir. Morfolojik olarak ortaya çıkan çeşitlilik, genetik çeşitliliğin ancak küçük bir yüzdesini oluşturduğu gibi, genetik çeşitliliğin büyük bir kısmı da morfolojiye yansımamaktadır. Morfolojiden elde edilen bilgiler genetik farklılıkları belirlemekte kullanılsa da genotip-çevre etkileşimi, bir karakterin birden fazla lokus tarafından belirlenmesi ve bir genin birden fazla karakteri etkilemesi gibi nedenlerden dolayı her zaman yeterli olmamaktadır. Bu sebeple genotipleme konusunda DNA'ya bağlı olarak gelişmiş olan moleküler teknolojiler ve moleküler belirteçler çözüm oluşturmaktadır.

Moleküler belirteç, DNA'nın bir parçası diğer bir deyişle belirli bir genle beraber kalıtılan bir DNA parçasıdır. Aslında tanımlanan bir gendir ama genomun belirli bir parçasını ifade ettiği için belirteç denmiştir. Canlıların yapısını belirleyen şifre de DNA zincirlerinde olduğundan moleküler belirteçler, canlı populasyonundaki çeşitlilik

veya o populasyon içindeki canlı genotipleri arasındaki ilişkilerin tespitinde %100'e yakın güvenilirlikle değerlendirilirler (Gülşen ve Mutlu 2005).

### **2.1.1 Moleküler belirteçlerin avantajları**

1. Çevre faktörlerinden etkilenmezler.
2. Çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip kloroplast, mitokondri, ribozom gibi farklı organeller ayrı ayrı çalışılabilir.
3. Genetik değişiklikleri daha fazla yansıttıkları için daha az pleiotrofikdir.
4. Her bir ebeveynden gelen farklı karakterler tespit edilebildiği için bitkilerin genetik orjini tespit edilebilir.
5. Sonsuz sayıda moleküler belirteç elde edilebilir.

### **2.1.2 Hibridizasyona dayalı moleküler belirteçler**

#### **2.1.2.1 RFLP : Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi ( Restriction fragment lenght polymorphism )**

DNA belirteçleri içerisinde ilk keşfedilenidir (Saiki *et al.* 1998). Bu yöntemde genomik DNA, 4-6 nükleotid tanıyan restriksiyon endonükleaz enzimlerle kesilir, böylece bir tek enzimin kesebildiği ancak farklı uzunluklarda DNA fragmentleri oluşur (Gülşen ve Mutlu 2005). Bu oluşan DNA fragmentleri elektroforezde büyüklüklerine göre ayrılır. Kesim bölgelerindeki tek bir nükleotidin bile sebep olduğu mutasyonlardan dolayı restriksiyon fragmentlerinin uzunluğundaki varyasyon saptanır (Jones *et al.* 1991). Southern Blot tekniği ile uygun bir membrana aktarılan DNA lar, biyotinilasyonla işaretlenmiş ve radyoaktif olmayan veya radyoaktif problemlerle (genellikle P32 ile işaretlenmiş, 300-3000 bp uzunluğunda kısa DNA zincirleri) hibritleştirilir. Oluşan bu radyoaktif hibritler otoradyografi tekniğiyle gözlenir. Böylece bitki tür ve çeşidine özgü restriksiyon bantları belirlenir. Karşılaştırmada eğer DNA'ların uzunluklarında bir farklılık varsa polimorfizm elde edilir. Likenlerle yapılan bir çalışmada; Armaleo ve Clerc (1991), *Pseudocyphellaria rufovirescens* (kloromorf) ve *Pseudocyphellaria murrayi* (siyanomorf) içindeki

mikobiontların LSU rDNA larında sadece 2 restriksiyon bölgesinde farklılık gösteren, nerdeyse özdeş RFLP patternlerinin olduğunu bulmuşlardır.

Tekniğin en önemli aşaması uygun problemlerin seçimidir. RFLP probu olarak, genellikle 200-2000 baz uzunluğunda DNA parçaları kullanılır. Prob DNA'nın en önemli özelliği genomda az sayıda kopyasının bulunmasıdır (Yıldırım ve Kandemir 2001). Bu amaçla rastgele genomik veya cDNA kütüphanelerinden oluşturulan, homolog ve heterolog problemler kullanılmaktadır (Striem *et al.* 1990). Genler çoğunlukla az kopya olup kendilerine özgü dizilişler taşıdıkları için cDNA'lar da az kopya olurlar. cDNA'lar dışında az kopya oldukları belirlenmiş olan genomik DNA parçaları da RFLP probu olarak kullanılır (Yıldırım ve Kandemir 2001).

RFLP'nin çok önemli iki avantajı vardır. Türler, cinsler ve hatta familyalar arasında transferleri mümkündür, böylece bir türde bir RFLP belirteci bir kez haritalandığında akraba pek çok tür için o haritalama bölgesinde potansiyel bir belirteç belirlenmiş olur.

Diğer önemli avantajı ise güvenilir olmalarıdır, farklı laboratuvarlarda farklı araştırmacılar tamamen aynı sonuçları elde edebilmektedir. Ayrıca RFLP belirteçleri, heterozigot bireylerin de karakterize edilmesine olanak sağlayan eşbaskın (kodominant) özelliktedir. Polimorfizmin belirlenmesi için radyoizotopların kullanılması ve sonuçların alınmasının uzun süre alması RFLP analizlerinin en önemli dezavantajlarıdır. Ayrıca RFLP tekniği için büyük miktarlarda saf DNA gerekmektedir. Laboratuvar ve materyal masrafları RFLP nin kullanımını sınırlandırmaktadır (Yıldırım ve Kandemir 2001).

Tekniğin son bir dezavantajı ise, genomlarda az kopya olan dizilişler belli noktalarda kümelenedikleri için RFLP belirteçleri genom üzerinde rastgele dağılıp göstermezler. Bu belirteçlere dayalı haritalarda yaygın olarak büyük boşluklar görülebilir (Walton 1993)

### 2.1.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu: PCR

PCR tekniği 1985 yılında K. Mullis ve arkadaşları tarafından keşfedilmiş ve moleküler biyolojide bir devrim yaratmıştır. 1988’de termostabil DNA polimerazın keşfiyle beraber PCR’ın araştırmalarda ve laboratuvarlardaki kullanımı çok ilerlemiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), özel DNA dizilerinin, uygun primerlerin kullanımıyla *in vitro* şartlarda enzimatik olarak çoğaltılması tekniğidir (Erlich 1989). DNA üretim işlemi birbirini izleyen bir seri özgül sıcaklık devrelerinde yapılır. Oldukça düşük miktarlarda kalıp DNA kullanılarak bir veya daha fazla DNA fragmentinin milyonlarca kopyası üretilir ve bunlar, otoradyografi veya boyama yapılarak gözlenir (Weissing 1995). Hızlı, hassas ve pahalı olmayan bir tekniktir. PCR tekniği DNA belirteçlerinin oluşumunda temel oluşturmuştur.

Polimorfizmin belirlenmesinde en çok kullanılan teknik olan RFLP’nin uygulamasının çok zaman alması ve oldukça pahalı bir metod olması nedeniyle PCR’ın keşfiyle beraber DNA’nın seçilmiş bölgelerinin çoğaltılmasına dayanan genetik yöntemler gelişmeye başlamıştır (Tingey *et al.* 1992).

### 2.1.4 PCR’a dayalı moleküler belirteçler

PCR belirteç sistemlerinde 10-25 baz çifti uzunluğunda primer olarak adlandırılan oligonükleotidler kullanılır. Bu primerler genomda bağlandıkları yerlerin arasını eğer 3-4 kb nin altında olursa 1-1.5 milyon defa çoğaltırlar. Genomdaki değişik yerlerdeki polimorfizmi bulmak için primerler değişik şekillerde tasarlanabilir. Farklı primer ve primer kombinasyonları kullanılarak farklı belirteçler geliştirilebilir. PCR reaksiyonları sırasında kullanılan şartlar, üretilen bantları ve bantların tekrarlanabilirliğini etkiler. Bunlar DNA ve magnezyum konsantrasyonu ( $MgCl_2$ ), primerlerin DNA dizinine en uygun yapışma sıcaklığı (primerin G+C miktarı belirleyicidir) ile primerlerin uzunluğudur. Yapışma sıcaklığı, 30-40°C gibi düşük sıcaklıklara inildiğinde başlatıcı DNA pek çok yere kolayca yapışacağı için pek çok yere ait özgül olmayan DNA üretimi yapılır. Yapışma sıcaklığının yüksek tutulmasıyla (55-60 °C) ise başlatıcı DNA sadece özgül bölgelere yapışır ve buradan üretim yapar (Yıldırım ve Kandemir 2001).

#### **2.1.4.1 RAPD: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (Randomly amplified polymorphic DNA(s))**

PCR'ın keşfiyle başlangıçta belirli DNA bölgelerinin çoğaltımı için baz dizilimi bilinen bölgelerin primer çiftleri kullanılarak bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardaki ilgili dizilerin belirlenmesinde karşılaşılan güçlükler ve dizisi bilinen bölgelerle çalışmanın getirdiği kısıtlamalar, sonrasında rastgele primerle çalışılan daha kolay ve etkin bir yöntem olan RAPD'in keşfini getirmiştir. Bu teknik birbirinden bağımsız farklı iki bilim adamı grubu (Williams *et al.* 1990 ve Welsh and McClelland 1990) tarafından geliştirilmiştir. Welsh ve McClelland bu tekniğe AP-PCR (Arbitrary Primed-PCR) adını vermişlerdir. İki teknikte prensip olarak aynıdır.

RAPD tekniği, 9-10 baz çifti uzunluğundaki rastgele oligonükleotitlerin (primerlerin), DNA'nın iki iplikçisi üzerinde, birbirine karşıt iki farklı noktada tamamlayıcılarını bulması ve bu ara bölgenin çoğaltılması esasına dayanır (Welsh and McClelland 1990). Diğer PCR uygulamalarının aksine 2 yerine tek bir primer kullanılır (Welsh and McClelland 1990), en az %50 G-C içeriğine sahiptir (Satchwell, 1998). Primer kalıp DNA üzerinde komplementeri olan, birbirine yakın iki bölgeye bağlanarak arada kalan DNA bölgesinin amplifikasyonunu sağlar. Bu şekilde çoğaltılan DNA dizileri elektroforez ile agaroz veya poliakrilamid jel üzerinde ayrılıp etidyum bromür veya gümüş boyama ile boyanır (Staub *et al.* 1996). Sonuçta bazı dizilerin çoğaltıldığı, bazılarının ise çoğaltılmadığı gözlenir (Welsh and McClelland 1990). Primer bağlanma noktalarındaki mutasyon veya dizi değişikliklerinin sonucunda amplifikasyon bantlarının varlığı ya da yokluğuna bakılarak polimorfizm tespit edilir. Genom boyunca rastgele bir şekilde polimorfizmin ortaya çıkarılmasında oldukça duyarlı ve etkili bir tekniktir (Rafalski *et al.* 1993). Primerdeki tek bir nükleotidin yerdeğişimi RAPD'de tamamen farklı bir değişikliğe yol açar. Bu da sistemin duyarlılığının göstergesidir. Bu teknikte başarılı bir sonuç alabilmek için genomik diziye uygun primerin seçimi oldukça önemlidir. RAPD bantlarının varlığı veya yokluğu ile belirlenen bireyler arasındaki polimorfizmleri gösteren bu belirteçler genellikle dominant belirteçlerdir (Staub 1996).

Bu tekniğin temel prensibi, uygun bir PCR optimizasyonu, uygun primer seçimi ve sonuç aşamasında amplifikasyonu iyi olan bantları değerlendirmektir. Sonuç değerlendirirken zayıf bantlar elenir, kuvvetli bantlar seçilir (Waugh and Powell 1992).

RAPD belirteçleri, özellikle hem aynı cinse ait türler arasındaki genetik farklılığı hem de aynı tür içindeki ve alt türleri arasındaki genetik farklılığı ortaya çıkarır. En büyük dezavantajı, belirtecin üretildiği popülasyonun dışında o belirtecin çoğu zaman bulunamamasıdır.

#### **2.1.4.2 AFLP: Amplifiye parça uzunluk polimorfizmi (Amplified fragment length polymorphism)**

Zabeau ve Vos tarafından 1993’de geliştirilen AFLP tekniği, RFLP tekniğinin güvenilirliğine PCR tekniğinin gücünün katılmasıyla oluşturulan oldukça güçlü ve güvenilir bir yöntemdir (Zabeau and Vos 1993). Kullanılan primerler hem rastgele hem de özgüdür. Yöntem, DNA’nın restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve oligonükleotid adaptörlerinin oluşan fragmanlara bağlanması, restriksiyon fragmanlarına adaptörlerin bağlanmasıyla oluşan uygun dizilere primerlerin bağlanması ve restriksiyon fragmanlarının seçici amplifikasyonu basamaklarından oluşur. Restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA fragmanlarına adaptör DNA ların bağlanmasının ardından seçici primerler kullanılan iki PCR reaksiyonu yapılır. İlk aşamada her iki uçdan DNA kesim enzimlerinin tanıdığı diziden sonraki ilk nükleotide göre seçici çoğaltımın yapıldığı ön üretim yapılır. Asıl üretimde ön üretimde elde edilen parçaların kullanımıyla kesim enzimi tanıma yerinden sonraki ikinci ve üçüncü nükleotidler için seçici üretim yapılır. Bütün başlatıcılar sentetik uçların nükleotid dizilişini de taşıdığı için üretim oldukça özgül şartlarda yapılmış olur (Zabeau 1993). Her iki primer çiftinin 3’ucundaki seçici bazlar değiştirilerek veya değişik kombinasyonlar kullanarak her seferinde yeni fragmanlar klonlanır ve bu yolla yeni polimorfizm elde edilir ki bu özellik bu yöntemin en büyük avantajıdır.

Aynı jel üzerinde tesadüfi olarak pek çok belirteç oluşturan bu yöntem genetik haritalama çalışmalarında bol miktarda belirteç vererek haritanın belirteçlerle doyurulmasını sağlar. Bu yöntem kantitatif belirteç üretir. Homozigot belirteçler daha koyu bantlar oluştururken küçük bantlar heterozigot genotipi ifade eder. Çok sayıda test edilen primerle çok sayıda belirteç üretmesi sayesinde son yıllarda çok kullanılan tekniklerdendir (Gülşen ve Mutlu 2005). Tekniğin dezavantajları; saf ve yüksek moleküler ağırlıkta DNA'ya gereksinim duyulması, genellikle dominant belirteçler vermesi ve farklı genetik haritalar arasında transferinin güç olmasıdır (Walton 1993).

#### **2.1.4.3 SSR: Basit dizi tekrarları (Simple sequence repeats) / VNTRs: Çeşitli sayıda ardışık tekrarlar ( Variable number tandem repeats)**

Yüksek organizmalarda henüz görevleri tam olarak bilinmeyen ancak düzenleyici rollere sahip oldukları düşünülen, rastgele olarak ardışık tekrarlanan, 2-6 nükleotid gruplarından oluşan bölgeler bulunmaktadır. Bu tekrarlar içerdikleri nükleotid sayısına göre mikrosatellit veya minisatellit olarak adlandırılırlar. (AT), (GT), (ATT), (CTT) veya (GATA) gibi nükleotitlerinin n sayısında tekrarlarından oluşurlar. Mikrosatellitler aynı zamanda STR (Short Tandem Repeats) veya SSR (Simple Sequence Repeats) olarak da anılır. 11-60 bp uzunluğundaki tekrarlardan oluşan minisatellitlerden (VNTR: Variable Number Tandem Repeats) farklıdır.

Minisatellitler genellikle kromozomların uç kısımlarında telomere yakın yerde bulunurken, mikrosatellitler yüksek organizmalara ait kromozomlarda daha bol ve gelişigüzel dağılım gösterirler (Gülşen ve Mutlu 2005). Mikrosatellitleri çevreleyen DNA dizileri genellikle aynı türün bireyleri arasında korunmuş olduklarından, farklı genotiplerde çakışan SSR'ların PCR primerleri ile çoğaltılarak seçimine izin vermektedir. Ardışık tekrarların sayısındaki farklılık PCR sonucu farklı uzunlukta parça çoğaltımıyla sonuçlanır. Bu tekrarlar çok yakın tür ve çeşitler arasında dahi tekrarlanan ünitelerin sayısında değişikliğe yol açan mutasyonlar nedeni ile oldukça polimorfiktir (Gupta *et al.* 1994) Bu sayede ökaryotik genomda polimorfizmin mükemmel kaynakları olup genetik çalışmalarda oldukça etkili olmuşlardır (Staub *et al.* 1996).

Tekrarlanan DNA'yı çevreleyen korunmuş diziler tekrarlarla özgüdür, yani özgüdür. Bu diziler SSR primerlerini dizayn etmek için kullanılarak belli bir lokus PCR'la klonlanıp çoğaltılır. PCR ürünleri ise jeller üzerinde büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra floresan, gümüş nitrat veya etidyum bromür yöntemlerinin biriyle tespit edilir. Polimorfizmin kaynağı tekrar sayılarıdır (Gülşen ve Mutlu 2005).

SSR'lar yüksek miktarda polimorfik olmaları, kodominant olmaları, PCR yoluyla hızlı çoğaltıma olanak tanınmaları ve bilinen primer dizileri sayesinde öteki belirteç uygulamalarına göre daha kullanışlıdır (Saghai *et al.* 1994). Öte yandan SSR'da primer geliştirme safhası oldukça pahalı, teknik uzmanlık gerektiren, zaman alıcı çalışmalar içerir. DNA klonlarının tekrarlanan olgonükleotid içeren problemlerle melezlenme yoluyla bulunması, nükleotid dizilişlerinin belirlenmesi ve yan yana tekrarlanan yapıların başlangıç ve bitiş yerlerinden özel başlatıcı DNA'lar geliştirilmesi gerekmektedir (Yıldırım ve Kandemir 2001).

#### **2.1.4.4 ISSR: Basit iç dizi tekrarları (Inter simple sequence repeats)**

Teknik 5' ve 3' sonda güçlendirilen kısa, tekrarlanan DNA zincirlerinin primer olarak kullanılmasını, PCR ürünlerinin elektroforez ile büyüklüklerine göre ayrılmasını ve jel üzerinde DNA'ların tespitini içerir. Primer olarak 2-4 farklı veya aynı nükleotidlerle sabitleştirilen, basit olarak tekrarlanan DNA zincirleri kullanılır. Bir reaksiyonda tekrarlanan zincir aynı kalmak kaydıyla, sabitleştirici DNA'ların farklı kombinasyonları primer olarak aynı reaksiyonda kullanılarak bir tek PCR reaksiyonunda güçlendirilen hedef DNA dizilerinin sayıları arttırılır. Böylece bir jel üzerinde yürütülecek bant veya belirteç sayısı arttırılmış olur. Bu diğer DNA belirteçlerinin üretebildiği sayılarla karşılaştırıldığında önemli bir avantaj sağlar (Gülşen ve Mutlu 2005).

#### **2.1.4.5 SCAR: Belirlenmiş ve çoğaltılmış polimorfik diziler (Sequence characterized amplified regions)**

RAPD ve ISSR gibi belirteç spesifitesi düşük olan belirteçlerin gücü, bu yöntemlerle

elde edilen bantların jel üzerinden çıkarılarak 3' sonlarındaki DNA zincirlerinin tespiti ve bunların daha uzun, dolayısıyla da daha özgül primerler olarak PCR reaksiyonlarında kullanılması ile arttırılır. Orjinali olan RAPD ve ISSR belirteçlerine göre daha üstün özelliklere sahiptirler, tekrarlanabilirlikleri yüksektir. Genellikle dominant belirteçler oluşturmalarına rağmen, tek tek bantların restriksiyon enzimleriyle kesilmesiyle kodominant belirteçlere dönüştürülebilir (Gülşen ve Mutlu 2005).

Çok düşük miktarlarda kalıp DNA gerektirmesi, yüksek duyarlılıkta olması ve kolay ve hızlı kullanım sunan SCAR belirteçleri bu avantajlarının yanında primer geliştirmede DNA bilgisini gerektirir.

#### **2.1.4.6 CAPS: Kesilip çoğaltılmış polimorfik diziler (Cleaved amplified polymorphic sequence)**

Bu teknik, PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve elektroforezle büyüklüklerine göre ayrılan bu kesilmiş fragmentlerin tespitini içerir. Primerler cDNA veya genomik DNA klonlarından, klonlanan ve DNA zincirleri tespit edilen RAPD, ISSR bantlarından elde edilir. Çok düşük miktarda kalıp DNA ancak, primer için DNA bilgisi gerektirir.

Hem SCAR hem de CAPS primerleri geliştirebilmek için DNA zincir bilgisine ihtiyaç olduğundan bu iki yöntem de yaygın olarak kullanılmayıp daha çok RAPD, ISSR ve AFLP gibi spesifitesi düşük belirteçlerin spesifitesini arttırmak amacıyla kullanılırlar.

#### **2.1.4.7 ESTs :İşaretili ifade edilen diziler (Expressed sequence tags)**

Basit olarak; 150-400 bp büyüklüğünde olup değişik mRNA'ların tamamına veya belli bir bölümüne karşılık gelen cDNA klonlarının dizi analizi sonucu oluşturulmuş DNA belirteçleridir. Tanımlama ve haritalama çalışmalarında kullanılmaktadır.

## 2.2 Ribozom ve Ribozomal DNA (rDNA)

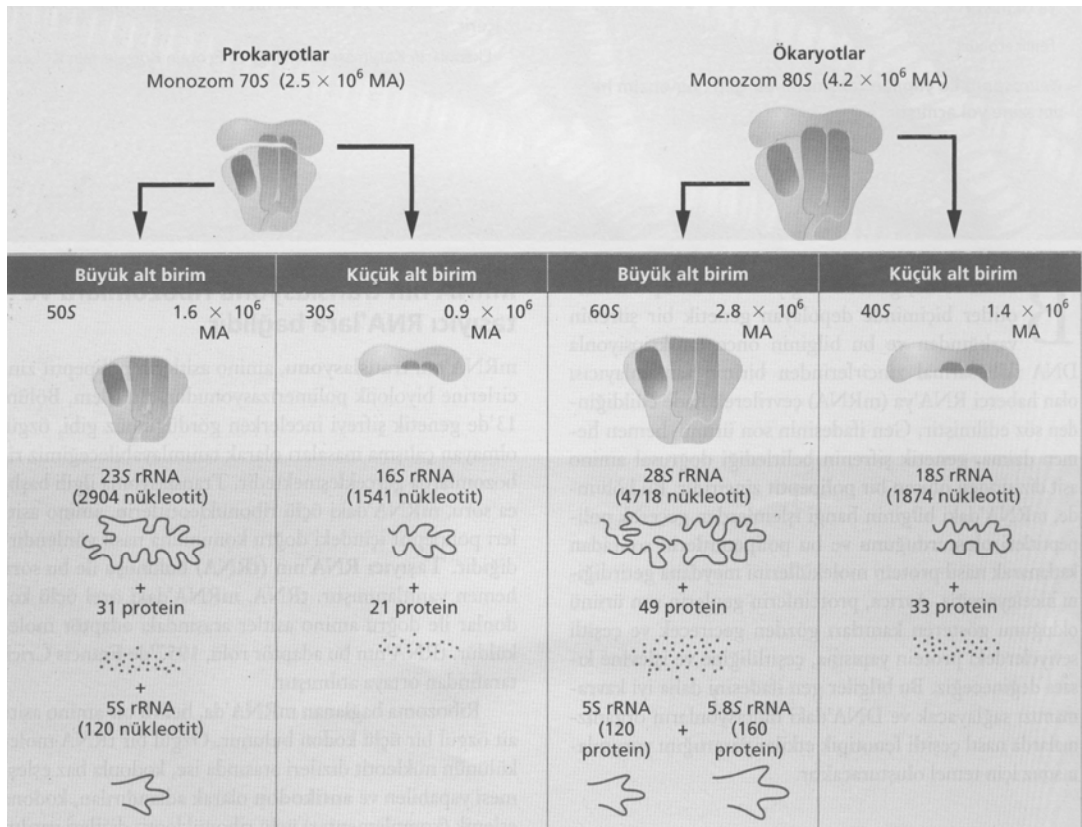
Genetik bilginin ifadesindeki önemli rolünden dolayı, ribozomlar ayrıntılı olarak incelenmiştir. Prokaryot hücrelerde bu yapılardan yaklaşık 10.000 tane bulunur. Ökaryotik bir hücrede ise çok daha fazla sayıda ribozom vardır. Elektron mikroskobu ile bakteri ribozom çapının 250µm olduğu, ve bir büyük bir de küçük olmak üzere iki alt birimden oluştuğu gösterilmiştir. Her iki alt birim de bir ya da daha fazla rRNA ve çeşitli ribozomal proteinler içermektedir. İki alt birimin birleşerek tek bir ribozomu oluşturduğu yapı bazen monozom olarak adlandırılır. Prokaryotlarda monozom 70S'lik bir yapı iken, ökaryotlarda yaklaşık 80S'dir. Farklı büyüklükteki taneciklerin ve moleküllerin değişik hareket hızını yansıtan çökeltme katsayıları birbirinin toplamı değildir. Örneğin prokaryotlardaki 70S monozomu 50S ve 30S alt birimlerinden, ökaryotlardaki 80S monozomu ise 60S ve 40S alt birimlerinden oluşmaktadır (Şekil 1.7).

Prokaryotlarda, ribozomun büyük alt birimi bir 23S rRNA molekülü, bir 5S rRNA molekülü ve 31 farklı ribozomal proteinden oluşmuştur. Ökaryotik ribozomun büyük alt birimlerinde ise bir 28S rRNA molekülü, 5.8S ve 5S rRNA molekülü ve yaklaşık 50 farklı protein bulunur. Küçük prokaryotik alt birimler, bir 16S rRNA bileşeni ve 21 protein içerir. Ökaryotik ribozomun küçük alt biriminde ise bir 18S rRNA bileşeni ve yaklaşık 33 protein bulunmaktadır. Şekil 1.7'de bu bileşenlerin yaklaşık molekül ağırlıkları ve nükleotit sayıları verilmiştir.

Ribozom bileşenleri göz önüne alındığında, RNA moleküllerinin translasyonla ilgili bütün önemli katalitik işlevleri gördüğü artık açıktır. Uzun zaman işlevleri sır olarak kalan bir çok proteinin, translasyonda rol alan çeşitli moleküllerin bağlanmasını sağladıkları ve genelde sentez hızına ince ayar yaptıkları düşünülmektedir. Bu genelleme, “ribozomal proteinden arındırılmış” ribozomlarla yapılan çalışmalarda hala bazı katalitik fonksiyonların devam etmesi yönündeki bulgu ve gözlemlere dayanmaktadır.

Hücre metabolik olarak ne kadar aktif ise, ribozomun bir bileşeni olan ribozomal RNA'ya o kadar çok ihtiyacı vardır. Birçok hücrede rRNA kodlayan genin bir kopyasının bulunması yetersiz olabilir.

Moleküler hibridizasyon çalışmaları, rRNA bileşenlerini kodlayan genlerin kopya sayısının kaç tane olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu yöntemle, özgül RNA dizilerini kodlayan genom yüzdesi tayin edilir. *E.coli* genomu, 23S, 16S ve 5S bileşenlerini şifreleyen tek bir DNA diziliminin yedi kopyasını bulundurur. Bu genlerin ilk transkripsiyon ürünü (transkript) 30S RNA olup, enzimatik olarak parçalanarak bu küçük bileşenlerine ayrılır. Bu üç RNA bileşeninin şifrelenmesi ile ilgili genetik bilgiler bir araya getirildiğinde, birçok transkripsiyonel olayın ardından ribozomal yapı oluşturulurken, üç bileşenin eşit miktarlarda ortamda bulunması sağlanmaktadır.



**Şekil 1.7** Sukroz gradiyetinde çökelme davranışlarına göre ayrıştırılan prokaryotik ve ökaryotik ribozomlar, alt birimleri ve rRNA bileşenleri (Klug and Cummings 2002).

Ökaryotlarda, 28S ve 18S rRNA'larını kodlayan DNA dizisinin çok daha fazla kopya sayısı bulunmaktadır. *Drosophila*'da haploit genom başına 120 kopya bulunur ve ilk transkriptleri 34S RNA molekülüdür. Bu RNA'nın işlem görmesi sonucu, 28S, 18S ve 5.8S rRNA'lar meydana gelir. Bunlar *E.coli*'deki üç RNA bileşeninin homologlarıdır. *X. laevis*'de, genom başına 500'ün üstünde kopya bulunur. Memeli hücrelerinde oluşan ilk transkript 45S RNA'dır (Klug and Cummings 2002).

Bu rRNA'ları kodlayan genler ribozomal DNA (rDNA) üzerinde bulunur. rDNA ılımlı tekrarlanan DNA dizilerinin bir grubudur ve çeşitli kromozom bölgelerinde kümeler halinde bulunur. Ökaryotlarda, her bir gen kümesinde ardışık tekrarlar (tandem repeats) yer alır ve her birim kodlayıcı olmayan aralayıcı DNA (spacer DNA) dizileri ile birbirinden ayrılmıştır.

Ribozomal RNA genlerinin karşılaştırmalı nükleotit dizi çalışmaları taksonomik basamaklardaki filogenetik yakınlıkların incelenmesinde yeni olanaklar sağlamıştır. Nükleer küçük alt ünite (Small Subunit :SSU) rDNA dizileri (16S gibi) oldukça yavaş evrimleşir ve uzaktan ilişkili organizmaların filogeni çalışmalarında kullanılabilirler. Mitokondriyal rRNA genleri ise daha hızlı evrimleşir ve ordo veya familya düzeyinde kullanışlı olabilir. Nükleer rRNA tekrar ünitelerinin internal ara bölgeleri (Internal Transcribed Spacer: ITS) ve intergenik ara bölgeleri (Intergenic Spacer: IGS) çok hızlı evrimleşirler. Aynı cins içerisindeki türler arasında ve hatta populasyon içerisinde çeşitlilik oluştururlar.

Birçok rRNA dizisi, belli klonlanmış genlerin izolasyonu ve dizi analizi ile elde edilmiştir. Direkt rRNA dizi analizi, yüksek miktarlarda RNA gerektirdiği ve yalnızca bir zincir dizisi hatalara yatkın olduğu halde dizi bilgisi elde etmek için de kullanılmıştır. PCR ve direkt dizi analizi, klonlama ve direkt dizi analizinden daha iyi avantajlar sunar. Bu metod DNA'yı kaba haliyle kullanır ve çok az miktarlarda DNA (her amplifikasyon için 0.1-10ng) gerektirir. Her iki zincirin de dizi analizini gerçekleştirerek hata oranını düşürür ve floresan işaretli dizi primerleri veya dioksinükleotit trifosfataz enzimi kullanan otomatik DNA dizi analizi aletleriyle

uyumlu çalışabilir (White *et al.* 1990). Örneğin, Bruns ve arkadaşları (1990), dört farklı herbaryumdan elde ettikleri 1-50 yıla kadar saklanmış, otuzbeş kuru mantar örneklerinin 5-30mg öğütülmüş dokularından DNA izole etmişlerdir. Mitokondriyal rRNA LSU genlerinin özgül bir parçasını çoğaltmışlardır ve 16 örneğin dizi analizini gerçekleştirmişlerdir (Bruns *et al.* 1990).

Belirli döngü parametreleri kullanılarak yapılan kalıp genlerin amplifikasyonunda primerlerin spesifitesi kusursuzdur. Bağlanma sıcaklığını değiştirerek çalışılabilecek organizmaların alanı bazı miktarlarda arttırılabilir veya kısıtlanabilir (Innis *et al.* 1989).

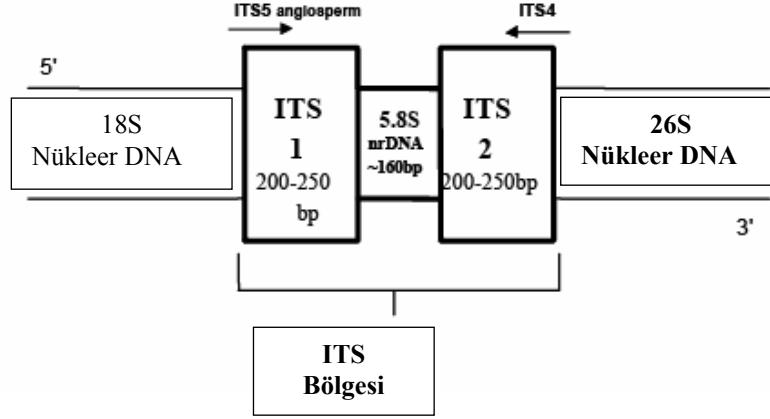
ITS bölgeleri de öncül mRNA da bulunan, olgun mRNA oluşurken splayla uzaklaştırılan bir bölgedir. Bu diziler rDNA tarafından kodlanır. Ribozomal genler ve spacerlar binlerce kopya uzunluğundaki tekrarlanan dizilerde (tendon tekrarlarında) bulunur ([http://en.wikipedia.org/wiki/Internal\\_transcribed\\_spacer](http://en.wikipedia.org/wiki/Internal_transcribed_spacer), 2005).

ITS primerleri ökaryotlarda, 18S, 5.8S, ve 28S rRNA genlerinin korunmuş bölgelerini ve bunlar arasındaki kodlanmayan bölgeleri çoğaltmak için kullanılırlar.

### **2.3 ITS: Internal Transcribed Spacer**

PCR-restriksiyon enzim analizi yönteminde son yıllarda seçilmiş hedef bölgelerin biri de ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgeleridir. Bu bölge, bakterilerde 16S ve 23S rRNAları kodlayan genler arasında bulunan bir diziden oluşmaktadır (Alpaslan 2003). ITS bölgesi mantarlarda en çok dizi analizi yapılan bölgedir. Hem tür hem de alttür seviyesinde tanımlama yapabilmek için ITS bölgelerinin dizi analizinden yararlanılır, bu bölgelerin çeşitliliği rDNA'nın diğer bölgelerinden daha fazladır. Bu dizide her türe özgü farklı nükleotidlerin bulunması nedeniyle yapılan çalışmalarda mikobakterilerin identifikasyonu sağlanabilmiştir (Alpaslan 2003). rDNA'nın SSU ve LSU gibi diğer gen bölgelerine kıyasla, yüksek seviyedeki çeşitliliğinden dolayı rDNA tekrarlarındaki çeşitlilik bazen ITS ve IGS bölgelerinin her ikisinde de gözlemlenebilir.

Ökaryotik organizmalar 2 tane ITS bölgesi içerirler. ITS1 18S-5.8S genleri arasında, ITS2 ise 5.8S-26S genleri arasında bulunur (Şekil 1.8).



Şekil 1.8 18S-26S nükleer ribozomal DNA (nrDNA)'ın Internal Transcribed Sequence (ITS) bölgesi. Primer pozisyonları '→' ile gösterilmiştir. (White *et al.* 1990)

Birçok laboratuvarında kullanılan ITS1 ve ITS4'e ek olarak fungal dizilerin seçici amplifikasyonuna izin veren birçok taksona özgü primerler tanımlanmıştır ([http://en.wikipedia.org/wiki/Internal\\_transcribed\\_spacer](http://en.wikipedia.org/wiki/Internal_transcribed_spacer), 2005). Mantara özgü primerler tüm liken DNA'sından istenilen mantar DNA sınıfının amplifikasyonunu sağlar (Goffinet and Randall 1997). Mantarın nükleer rDNA ITS genlerinin çeşitli segmentlerini çoğaltmak için tasarlanan primer dizileri aşağıdaki gibidir (Innis *et al.* 1989).

ITS1 : TCCGTAGGTGAACCTGCGG (White *et al.* 1990)

ITS4 : TCCTCCGCTTATTGATATGC

ITS1F : CTTGGTCATTTAGAGAAGTAA (Gardes and Bruns 1993)

ITS2 : GCTGCGTTCTTCATCGATGC

ITS3 : GCATCGATGAAGAACGCAGC

ITS5 : GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

Mantara özgü primerler, ilk olarak Gargas ve Taylor tarafından 1992'de tasarlanmıştır. Sonra parazitik ve simbiyotik mantar çalışmak için Gardes ve Bruns 1993' de

sonrasında da ektomikorizal komuniteleri çalışmak için Egger 1995’de aksuslu mantarlara özgü primer dizaynı yapmıştır (Egger, 1995). nrDNA tekrarları ribozomun küçük ve büyük alt ünitelerinin RNA larını kodlayan genleri, ITS bölgesini, 5.8S genini ve ardışık iki tekrar bölgesini ayıran IGS bölgesini içerir (Goffinet and Randall 1997).

ITS1F primeri mantarlar için özgül bir primerdir ve rDNA’nın SSU geninin 3’ucunda bulunur. ITS4 primeri ise universal bir primer olarak tanımlanmıştır ve Büyük Alt Ünite (LSU:Large Subunit:) geninin 5’ ucuyla hibritleşir ( Şekil 1.8).

Mantara özgü primerlerin kullanılması (Gargas and Taylor 1992, Gargas and DePriest 1996), PCR inhibitörlerinin etkisini minimize eden DNA izolasyon teknikleri ve liken tallusundan ayrılmış mantar dokusunun PCR reaksiyonlarında doğrudan kullanılması (Grube *et al.* 1995, Cubera *et al.* 1999, Wolinski *et al.* 1999) gibi DNA tekniklerinin geliştirilmesiyle likenlenmiş mantarlardaki çalışmalarda önceden beri süregelen birçok engelin üstesinden gelinmiştir (Grube and Kroken 2000). Goffinet ve Bayer, askuslu mantarlara özgü bir primer kullanarak, *Peltigera malacea*, *Peltigera aphthosa*, *Peltigera britannica* ve *Peltigera leucophlebia* fotomorfları, *Nephroma expallidum* ve *Nephroma arcticum* fotomorflarının nrDNA ITS bölgelerini çoğaltmışlar ve 5.8 S dizilerinin karşılaştırılmasıyla, toplam liken DNA’sından fungi DNA’sının çoğaltılması için askomisese özgü primerlerinin yeterli olduğunu belirtmişlerdir (Goffinet and Bayer 1997).

ITS ve Küçük Alt Ünite (SSU:Small Subunit) gibi daha hızlı evrimleşen nrDNA bölgeleri daha alt taksonomik basamaklardaki ilişkileri araştırmak için kullanılmaktadır.

ITS, *Rocella* gibi daha az farklı familyalarda filogenik ilişkinin tespiti için önemli veri sağlamıştır (Mattsson and Wedin 1998). *Parmaliaceae* gibi çok geniş bir familyadaki filogenetik ilişkiyi çözmede ITS bilgisi, beraberinde SSU bilgisi kullanılarak dahi başarılı olamamıştır ( Wedin *et al.* 1999).

ITS çeşitliliği türlerin tanımlanmasında da kullanılabilmektedir. ITS dizilerindeki farklılıklar, *Peltigera physlidiosa* (Goffinet and Miadlikowska 1999) gibi yeni türlerin tanımlanmasında veya *Ramalina fastigiata*'dan *Ramalina pannizei* (Groner and La Greca 1997), *Teloschistes villosus*'dan *Teloschistes lacunosus* ( Martin and Llimona 1998), *Xanthoria parietina*'dan *Xanthoria calcicola* (Franc and Karnefelt 1998) gibi çok benzer türlerin ayırımında destek olarak kullanılmıştır. Bu durumların hepsinde ITS dizilerine ait verilere dayanılarak oluşturulan ayrı dallar, bu dallardaki türler arasındaki morfolojik farklılıklarla da doğrulanmıştır.

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

Ayrıca ITS bilgisi 4 farklı tür çiftinin çalışmasında kullanılmıştır. ( *Lecanorales*'deki *Phaeophyscia ciliata* (seksüel) ve *Phaeophyscia orbicularis* (aseksüel) (Lohtander *et al.* 1998b), *Roccellina capensis*'in seksüel ve aseksüel formları (Lohtander *et al.* 1998a), *Dendrographa leucophaea f. leucophaea* (seksüel) ve *Dendrographa leucophaea f. minor* (Lohtander *et al.* 1998c) ve *Arthoniales*'deki *Rocella canariensis* (seksüel) ve *Rocella tuberculata* (aseksüel) (Myllys *et al.* 1999) ITS verilerine göre çalışılmıştır. Bununla beraber, ITS çeşitliliğinin, morfolojik olarak kesin ayrımları yapılmış türleri bile çözemediği durumlar olmuştur ( *Parmeliaceae*'de Thell and Miao 1999, *Umbilicariaceae*'da Ivanova *et al.* 1999).

ITS veya herhangi bir lokus bilgisi bir filogenetik hipotezi desteklemeye yeterli olabilmekte fakat reddetmek için yeterli olmamaktadır. Fenotipik veya biyocoğrafik karakterlere dayalı filogenetik hipotezle, bir gene ait verilerle elde edilmiş soyağacının uyuşması, filogenetik türler arasında ayırım sağlayabilir. Aksine bir gene ait verilere dayalı filogenetik hipotez, biyocoğrafya veya fenotipik karakterlerle desteklenmediğinde tür tanımlamada yetersiz kalmaktadır (Grube and Kroken 2000).

*L. pulmonaria* türünün mantar simbiyontundaki genetik çeşitliliği araştırmak amacıyla İsviçre Alpleri, pre-Alp ve Jura dağlarından 6 popülasyondan toplanan 143 türün tüm nükleer ve mitokondriyal bölge dizileri incelenmiş ve çeşitliliğin yalnızca ITS1’de 3 polimorfik bölgeyle ve nrLSU’da 4 polimorfik bölgeyle sınırlı olduğu açıklanmışlardır. Bu iki bölgenin 81 tür için dizi analizi sonucu 6 farklı genotip saptanmış, bu genotiplerden 2 tanesi genel özellik gösterirken 2 tanesi yalnızca farklılaşmış popülasyonlarda, 2 tanesi ise sadece tek bir popülasyonda gözlenmiştir. En yüksek genetik çeşitliliğin fungal simbiyontların seksüel çoğaldığı popülasyonlarda olduğu gözlenmiştir (Zoller *et al.* 1999).

Crespo ve arkadaşları (2002), araştırmalarında *Parmelia saxatilis*’in 5 kıtadan 35 popülasyonunun ITS rDNA dizilerinin iki monofiletik grubu ortaya çıkardığını belirtmişlerdir.  $\beta$ -tubulin gen dizilerinden elde ettikleri sonuçların da bu kanıyı desteklediğini savunmuşlardır (Crespo *et al.* 2002).

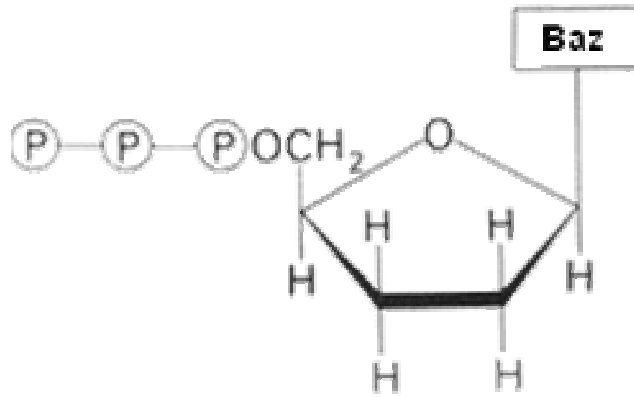
## 2.4 DNA Dizi Analizi

DNA Dizi Analizi ya da Sıralama, DNA’nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. 1940’larda DNA baz kompozisyonunu saptama yöntemleri bulunmasına karşın DNA’daki nükleotit dizilerinin doğrudan kimyasal analizi 1960’larda geliştirilip kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin 1965’de Robert Holley 74 nükleotidlik tRNA molekülünün dizisini bir yıllık bir çalışma sonucunda saptamıştır. 1970’lerde daha etkin ve doğrudan nükleotit dizi analizine yönelik yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Herhangi bir organizmadan çok miktarda saf DNA fragmentleri elde edilmesini sağlayan rekombinant DNA tekniklerinin geliştirilmesine paralel olarak dizi analizi yöntemleri de geliştirilmeye başlanmıştır (Klug and Cummings 2002).

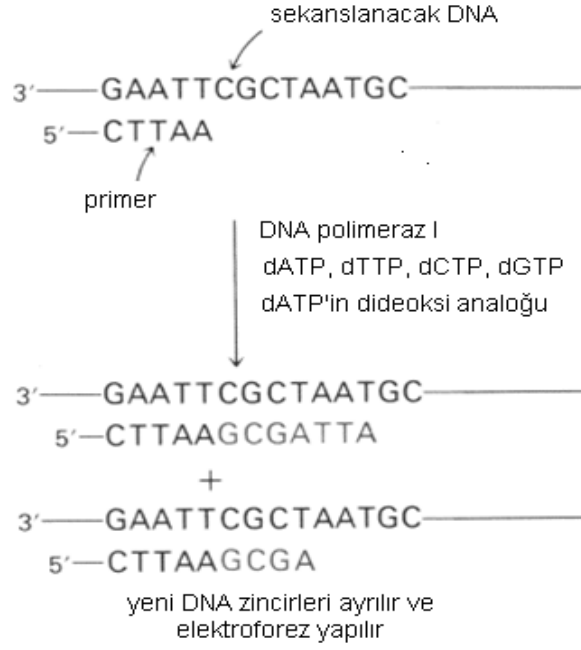
Nükleotid dizilerinin belirlenmesinde iki temel teknik geliştirilmiştir. Bunlar Allan Maxam- Walter Gilbert’in Kimyasal Degradasyon Metodu DNA’nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır. Fred Sanger ve Coulson’un geliştirdiği ‘Zincir Sonlanma Metot’unda ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi

gerçekleştirilmektedir. Her iki yöntemde de dizisi saptanacak DNA'ya dört ayrı reaksiyon uygulanmaktadır (her baz için bir tane). Bu dört reaksiyonun ürünleri, bir nükleotit uzunluğu kadar farklı, bir dizi DNA parçacıklarıdır. Dört reaksiyonun ürünleri bir jelde dört ayrı kuyucukta yan yana elektroforez ile ayrıştırılmaktadır. Jel hattındaki her bir bant belirli bir baza karşılık gelmektedir ve jeldeki bantlardan DNA parçacığının dizisi okunabilmektedir (Klug and Cummings 2002).

Enzimatik DNA sentezine dayanan Sanger'ın dizi analizi yönteminde, dizisi saptanacak olan DNA zinciri yeni sentezlenecek olan DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır. Sentez reaksiyonu DNA polimeraz I ile katalizlenir. Yöntemde, modifiye (kimyasal değişikliğe uğratılmış) dideoksinükleotit trifosfatlar kullanılarak bir dizi DNA parçacıkları elde edilir. Dideoksinükleotit trifosfatlarda 3'-OH grubu bulunmaz (Şekil 1.9). Bu durumda molekül yeni sentezlenen DNA'ya katılır ancak 3'-OH grubu taşımadığı için kendisine nükleotit ilave edilemez ve zincir sentezi sonlanarak bir DNA parçacığı elde edilir.



Şekil 1.9 2'3' dideoksi analogu

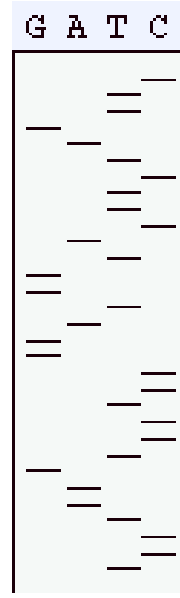


Şekil 1.10 Dideoksi nükleotitler varlığında DNA sentezi

Deneyde dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir reaksiyon karışımı kalıp DNA zinciri, bir primer, radyoaktif nükleozittrifosfatların dördü ve az miktarda dideoksiribonükleozit trifosfatlardan sadece birini içerir. Zincir sonlanması için dört reaksiyon tüpünde farklı bir dideoksiribonükleozit trifosfat bulunur (Klug and Cummings 2002).

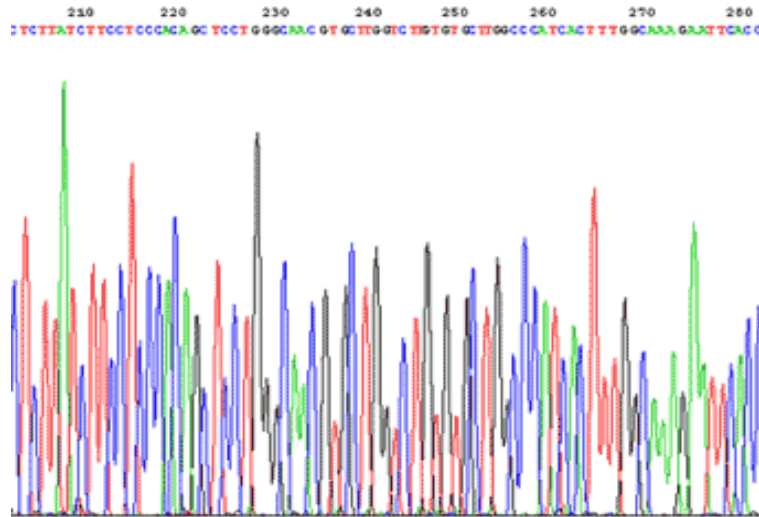
DNA sentezi olurken DNA polimeraz, arada sırada uzayan DNA zincirinin yapısına nükleotitlerin yanısıra dideoksinükleotitleri de sokar. Bu nükleotit analogu 3'-OH grubu içermediği için bir sonraki nükleotid ile fosfodiester bağı oluşturamaz ve bu nedenle DNA sentezi sonlanır (Şekil 1.10). Her bir tüpte uzunlukları birbirinden birer nükleotit farklı olan değişik uzunluklardaki DNA molekülleri birikir.

Sentez sonrası, dört reaksiyondan elde edilen radyoaktif DNA parçacıkları elektroforez jelinde yan yana dört ayrı kuyucukta yürütülür. DNA bantları otoradyografi ile görüntülendiğinde merdivene benzer bantlar serisi ortaya çıkar (Şekil 1.11). Dizi aşağıdan yukarıya doğru okunarak baz dizilimi gerçekleştirilen DNA kalıbının tamamlayıcısının 5' den 3' ne doğru nükleotit dizisi belirlenmiş olur.



Şekil 1.11 Sentez sonrası DNA bantlarının otoradyografi görüntüsü

Genomların dizi analizi için otomatik DNA dizi analizi aletleri ve radyoaktif izotop yerine floresan boyalar kullanılır. Bu sistemde dört farklı renkte boya kullanılır ve sonuçta, dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkteki piklerin oluşturduğu bir model ortaya çıkar (Şekil 1.12).



Şekil 1.12 Dört farklı floresan boyanın kullanılmasıyla oluşan pikler

Gen bölgesi PCR işlemiyle çoğaltılır, çoğaltılan bu bölgeler florokrom maddelerle işaretli bazlarla tekrar PCR reaksiyonuna (Multiplex Flourescent PCR) sokulur. Reaksiyon sonucunda ortaya çıkan hedef bölgelerdeki baz dizisi şifresini oluşturan bazlar genetik analizörler (DNA Sequencer) ile tek tek okunur.

DNA dizi analizi ile birçok organizmanın genlerinin yapısı ve organizasyonu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Virüslerin tüm genomları, *E.coli* ve maya gibi birçok organizmanın genomları aydınlatılmıştır. Genlerin organizasyonu, doğası ve ayrıca gen ürünlerinin değişmesine neden olan mutasyonların sayısı, yeri, çeşidi ile ilgili bilgiler verir. Ayrıca prokaryotik ve ökaryotik genlerde yer alan kontrol bölgelerin organizasyonu ile ilgili çalışmalarda ve proteinlerin aminoasit dizilerinin ortaya çıkarılmasında kullanılır.

Nükleotit dizilerinin bilgisayar analizleri, klonlanmış parçanın bir genin tamamını mı yoksa bir kısmını mı içerdiğinin anlaşılmasını sağlar. Bu ekzon/intron birleşme noktalarının araştırılması ile ve çeşitli verilere göre daha önceden ortaya çıkarılmış genlerin DNA dizileri ve proteinlerin aminoasit dizileri ile karşılaştırılarak yapılır (Klug and Cummings 2002).

Mutant fenotiplere neden olan DNA bozukluklarının tanımlanmasının yanısıra, DNA dizi analizi genlerin organizasyonunu (intron ve ekzonların sayısını ve intron-ekzon sınırlarını) belirlemek, genin ürünü olan proteinin yapısı ve görevi hakkında bilgi edinmek ve diğer organizmalardan elde edilen benzer proteinler arasındaki evrimsel ilişkiyi ortaya çıkarmak amacıyla kullanılır (Klug and Cummings 2002). Bu çalışmada, Türkiye’de bulunan *Hypogymnia* cinsine ait 2 farklı türün (*Hypogymnia physodes*, *Hypogymnia tubulosa* ) rDNA ITS bölgesi dizi analizi ile bu türler arasındaki muhtemel farklılıkların ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

## 2.5 Filogenetik Analiz

Organizmaların evrimsel tarihi filogeni olarak adlandırılır. Filogenetik analiz farklı türler arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilir. Moleküler

filogenetik çalışmalar, DNA ve proteinlerde oluşan değişikliklerin hızını ve karakterini saptamaya ve böylece genler ve organizmaların evrimsel tarihini araştırmaya yöneliktir. Filogenetik incelemelerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermede en uygun yaklaşım elde edilen verilerin çeşitli akış şemaları ve istatistiksel analizlerle filogenetik ağaca dönüştürülmesidir (Saitou and Imanishi 1989).

Bir filogenetik ağaç, dallanma olaylarının modelini ve bazı durumlarda zamanını tanımlar. Türleşme sırasını ve hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını kaydeder. Ağaç, başlıca bir düğüm (node) ve dallardan (branch) oluşur (Şekil 4.3) Dallar, türlerin atasal popülasyonlarının zaman içerisindeki durumlarını gösterir. Düğümler ise bir türün iki veya daha fazla türev popülasyona ayrıldığı noktaya karşılık gelir (Freeman and Herron 1999). Ağaçtaki öncülü olmayan düğüm köktür. Kök ortak bir atayı temsil eder, ağacın herhangi bir yerinde yer alabilir. Köksüz ağaçlarda ise ortak ata gösterilmeden sadece türler arası ilişki ön plana çıkarılır (Mount 2001). Filogenetik ağaçta her bir düğüm evrimsel süreçte ayrılan taksonomik bir gruba karşılık gelir. Ağaçta dış dallar taksonları, iç dallar ve düğümler ise taksonlar arası ilişkiyi yansıtır. Birbiri ile yakın ilişkili türler ağaçta birbirine komşu dallarda yer almaları ile ayırtedilirler. Ağaç dallarının paterni topoloji olarak adlandırılır ve dal uzunluğu genellikle dalda oluşmuş değişikliklerin sayısını belirler (Mount 2001).

Filogenetik analizlerde ilk adım incelenecek dizinin elde edilmesidir. Daha sonra bu diziler istenirse referans dizi denilen daha önce saptanmış ve üzerinde uzlaşılarak doğruluğuna karar verilmiş dizilerle karşılaştırılabilir. Son yıllarda moleküler filogeni alanında kaydedilen gelişmeler neticesinde çeşitli türlerden elde edilen diziler GenBank, EMBL gibi özel veritabanı sistemlerinde toplanarak kullanıcıların hizmetine sunulmuştur (Mount 2001).

Moleküler filogenetik analiz temel olarak dört basamakta gerçekleştirilir. Bu basamaklar:

1. Hizalama
2. Yer deşiştirmenin saptanması
3. Filogenetik ağacın oluşturulması
4. Filogenetik ağacın değerlendirilmesi

### 2.5.1 Dizilerin hizalanması

Nükleotid ya da aminoasit dizilerinin ikili ya da çoklu karşılaştırılabilmesi için bu dizilerin altalta aynı hizada dizilmesi işlemidir. Bunun için çok çeşitli yöntemler vardır, kullanılacak yöntemin seçimi dizilerin sayısına ve uzunluğuna bağlıdır. Hizalama elle veya gözle yapılabilir ancak dizi sayısı ve uzunluğu arttıkça elle yapılan hizalama zaman alıcı ve hatalara açık hale geleceğinden Clustral, TreeAlign gibi bilgisayar programları geliştirilmiştir (Mount 2001). Hizalama dizilerin hangi pozisyonunun korunmuş olduğunu ve hangilerinin ortak diziden farklılaşmış olduğunu gösterir. Evrimsel ilişki gösteren diziler homolog olarak kabul edilir. Genel bir kural olarak iki DNA dizisi arasındaki farklılık ne kadar çoksa bunların ortak atalarından farklılaşma zamanları da o kadar eskiye dayanır (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/cvogel/Tutorials/MolEvol.htm>, 2005).

Hizalama sırasında eşleşen ve eşleşmeyen nükleotidler çeşitli işaretler ile gösterilebilir. Sıklıkla tercih edilen eşleşen nükleotidlerin yıldız (\*) ile eşleşmeyenlerin ise boşluk ile gösterilmesi şeklinededir. (-) ile gösterilen boşluk (gap) evrim süresince bir ya da daha fazla dizi karakterlerinin insersiyon ya da delesyonlarıdır. Bu boşlukların dizideki insersiyonları mı delesyonları mı gösterdiği bilinemeyeceğinden nötral bir terim olan ‘indel’ (insersiyon-delesyon) kullanılmaktadır.

Diziler ve dizi gruplarındaki değişikliklerin saptanmasında en görsel yol ağaç oluşturma’dır (Mount 2001). Burada doğru hizalamanın yapılmış olması başlangıç noktasını oluşturur. Yapılan yanlış bir hizalama filogenetik ağacın yanlış oluşturulmasına neden olur ve bu durum çok uzun dalların varlığı ile kendini gösterir (<http://cmgm.stanford.edu/help/manuel/software/sequence/phylogenetic/>).

### 2.5.2 Yer değiştirmenin saptanması

Yer değiştirmede yer alan yöntemlerden bazıları ve genel özellikleri şöyledir.

1. Jukes-Cantor : Yer değiştirmelerin rastgele ortaya çıktığı ve mutasyon hızının tüm nükleotidler için eşit olasılıkta olduğu varsayılır.
2. Kimura 2-Parameter: Transisyonların, transversiyonlardan daha sık olduğu varsayılır.
3. Tajima- Nei: Jukes-Cantor'a benzer. Transisyon/Transversiyon oranının tüm nükleotidlerde aynı olduğunu varsayar.
4. Jin- Nei Gamma: Belli kurallara göre, nükleotid yer değişim oranının bölgeden bölgeye farklı olduğunu varsayar.
5. Tamura: Sabit bir yer değiştirme oranını varsayar. Transisyon ve transversiyondaki farklılıkları da dikkate alır.

### 2.5.3 Filogenetik ağacın oluşumu

Filogenetik ağaç oluşturulurken genellikle üç yöntem kullanılır. Bu yöntemlerden ikisi karakter temelli yöntemler olarak bir başlık altında toplanabilen Maksimum parsimoni, ve Maksimum Benzerlik yöntemleridir. Diğerisi ise uzaklık yöntemidir.

#### 2.5.3.1 Farklılıkları en aza indirme (Maximum parsimony:MP) yöntemi

İncelenen diziler ya da genetik uzaklıklar ile uyumlu bir ağaç elde etmek için gerekli en az mutasyonların saptanmasına dayanan bir yöntemdir. Maksimum Parsimoni (MP), minimum evrimsel metod (parsimoni = tutumluluk) olarak tanımlanabilir. Evrimsel biyolojide tutumluluk demek, evrimsel süreçte neler olduğuna ilişkin sonuca varılırken, araştırmanın karmaşık yerine basit açıklamaları, başka bir deyişle açığa çıkan evrimsel değişmenin miktarını azaltan veri yorumlarını tercih etmesi demektir. Parsimoniye göre tercih edilen ağaç, açığa çıkmış olan evrimsel değişmenin toplam miktarını en aza indirgeyen ağaçtır (Freeman and Herron, 1999).

MP yöntemi uygulanırken, dizi pozisyonlarının farklı puanlamaları tercih edilebilir. Örneğin; korunmuş bölgede gerçekleşen bazı mutasyonlar, değişken bölgedeki mutasyonlardan daha çok vurgulanmak istenebilir. Ya da transversiyonlar transisyonlardan daha önemli olarak vurgulanabilir. MP analizi ile en iyi sonuçlar dizi çiftleri arasındaki benzerliklerin çok güçlü olduğu ve az sayıda dizinin olduğu durumlarda alınır. MP ile ağaçların oluşturulmasında ‘kesin’ ve ‘tahmini’ yaklaşımlar sözkonusudur. Kesin yaklaşımda olası tüm ağaçlar gözden geçirilir ve kullanılan optimalite ölçütüne en uygun ağaç belirlenir. Çok zaman alıcıdır ve yirmiden fazla örnekleme varlığında uygun değildir. Çok sayıda dizinin bulunduğu durumlarda ‘tahmini’ yaklaşım uygulanmaktadır.

En tutumlu ağaçların güvenilirlik dereceleri istatistiksel olarak da değerlendirilebilir. Bu probleme yönelik yaklaşımlardan biri seç-bağla testi (bootstrapping) olarak adlandırılır. Seç- Bağla testi, belli bir ağaç üzerindeki dallardan hangilerinin diğerlerine göre daha iyi desteklendiklerini değerlendiren bir tekniktir. Seç-Bağla testinde, bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturur. Örneğin, çalışmada 300 baz çiftlik bir dizi bulunuyorsa, bilgisayar bu pozisyonlardan birini rastgele seçmek ve bunu yeni veri setinde ilk öge olarak kullanmakla seç-bağla testine başlar. Daha sonra rastgele seçtiği bir pozisyon, yeni veri setinin ikinci veri noktasını oluşturur (ikinci veri setinin birincisinin aynı olma şansı 1/300’dür). Bilgisayar orjinal verinin rastgele bir örneklemesini temsil eden, 300 baz çifti içeren yeni bir veri seti oluşturuncaya kadar bu işleme devam eder. Sonra, bu yeni veri seti filogeniyi hesaplamak için kullanılır. Bu işlemi tekrarlamak suretiyle araştırmacı, yeniden örneklenmiş veri setinden oluşan ağaçlarda belli bir dalın açığa çıkma yüzdesini %50, %80 ya da %100 şeklinde ortaya koyabilir. Seç-Bağla tahmininde bir dal ne kadar çok kere açığa çıkarsa, bu dalın gerçekte var olduğu konusundaki güvenimiz artmaktadır. Eğer belli bir dal için seç-bağla desteği az ise, %50’nin altında diyelim, araştırmacı genellikle ağacın bu kısmındaki dallanma modelini belirleyemediği sonucuna varacak ve bunun sonucunda da yayınladığı ağaçta bu dalı tek düğümden çok-çatallı (politomi= belirsizlik noktası) olarak verecektir (Freeman and Herron, 1999).

Nükleer ITS rDNA bölgesi dizilerini kullanarak *Diploschistes* cinsinin filogenisinin araştırıldığı bir çalışmada, 22 *Diploschistes* türünün dizileri, *Thelotrema* familyası, *Graphis scripta* ve dış grup olarak *Aspicillia cinerea* türlerinin referans dizileriyle sıralanmışlar ve farklılıkları en aza indirme (MP) yöntemiyle incelenmişlerdir. (Martin and Llimona 1998).

*Pertusaria* cinsinin filogenisini araştırmak için 15 *Pertusaria* cinsi mantarın LSU rDNA gen dizileri, farklı bir grup olan *Agyriales* referans dizileriyle sıralanmış ve farklılıkları en aza indirme yöntemiyle incelenmiştir (Lumbsch and Schmitt 2001).

Farklı aksusları ve pigmentsiz spor duvarlarıyla ayrılan *Coniocybaceae* ve *Chanenotheca* familyalarına ait olarak tanımlanmış *Cybebe gracilentia* ve *Chaenotheca gracillima* türlerinin ITS1-5.8S-ITS2 rDNA dizileri farklılıkları en aza indirme yöntemiyle incelenmiştir (Tibell 2001).

### 2.5.3.2 En yüksek ihtimal (Maximum likelihood:ML) yöntemi

Joseph Felsenstein tarafından 1981 yılında MP'ye alternatif olarak ortaya konulmuş bir yöntemdir (Felsenstein, 1987). Araştırmacıya sunulan bütün bilginin daha etkili kullanmak ve olası birçok ağaç içerisinde en iyi ağacı seçmede istatistiksel testler kullanma olanağı yaratmak için ortaya konmuştur. Bu yöntem, farklı tipdeki nükleotit değişikliğinin açığa çıkma olasılıklarını tanımlayan bir matematiksel formül ve dal uzunlukları bilinen belli bir ağaç verildiğinde, bu belli DNA dizisi setini elde etme olasılığı nedir sorusunu sormaktadır. Bu yöntem için bir bilgisayar programı, her ağaç topolojisinin değerlendirir veya gözlenen verinin oluşturulması olasılığını hesaplar. Eğer ağaç doğruysa her dalın oluşturulma olasılığı toplamı, gözlenen verinin oluşturulması olasılığını temsil eder. Bu olasılık ağaçların olasılığı olarak temsil edilir. Böylece, yarışan ağaç topolojilerinin kabul ya da reddi için kriter en yüksek olasılığı olan ağacı seçmektir, en olası ağaç en iyi ağaçtır. Ancak olasılık metodları, hesaplamada yavaşlar ve bu teknikle çok büyük veri setleri, parsimoni yöntemleriyle olduğu kadar kapsamlı analiz edilemezler.

### 2.5.3.3 Uzaklık (Distance) yöntemi:

Genetik uzaklık yöntemi filogenetik ağacı oluşturmak için dizi grubunda her bir çift arasında değişikliklerin sayısını temel alır. Birbirlerine genetik uzaklığı en az olan türler birleştirilerek bir ağaç oluşturulur. Aralarında az sayıda nükleotid değişikliği olan bu dizi çiftleri komşu (neighbours) olarak adlandırılır. Uzaklık metodları ile hizalanan diziler arasındaki farklılıkların miktarına göre ağaç oluşturulur. Ağacın dalları boyunca ortaya çıkan değişiklik sayısı diziler arasındaki uzaklığı gösterir (Mount, 2001). Tercih edilen ağaç, taksonlar arasındaki mesafeyi enaza indirgeyen ağaçtır (Freeman and Herron 1999).

Bu yöntemler diğerlerinden daha kolay ve hızlı olup, çok sayıda dizi için kullanılabilir. Bunlar içinde en çok kullanılanları şu şekilde sıralanabilir.

- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)
- Neighbour Joining (NJ)
- Fitch-Morgoliash (FM)

Umbrilicariaceae ailesinde *Lasallia* cinsinden 3, *Umbilicaria* cinsinden 17 türünün rDNA ITS1 ve ITS2 dizi analizleri, taksa dışı Eurotiales, Onygenales ve Caliciales referans dizileriyle sıralanarak maksimum parsinomi, en yüksek ihtimal ve neighbour-joining analizleriyle incelenmiş ve *Lasallia*'nın filogenetik olarak ayrı bir grup olduğu ve bunun kimyasal ve morfolojik karakterlerle desteklendiğini belirtilmiştir (Ivanova *et al.* 1999).

Tek bir lokus türleri ayırmakta kesin olarak yeterli olmayabilir. Fenotipik olarak belirlenmiş tür kavramlarını reddetmek için yeterli derecede kanıt sayılamazlar, o yüzden filogenetik tür kavramıyla türleri ayırmada birçok genetik lokus kullanılmalıdır. Bu filogenetik türler fenotipik karakterlerle, biyocoğrafyayla örtüşebilir veya gözlenebilir özellikleri gizli de kalabilir. İsimlendirmede sadece moleküler verilere dayanan resmi değişiklikler ölçülü ve yalnızca yeterli bilgiyi

sağlayan her çeşit çalışmanın eksiksiz incelenmesinden ve grubun taksonomik tarihi incelendikten sonra yapılmalıdır (Grube and Kroken 2000).

Çoğu liken türü, 1800 lerde ve geçtiğimiz yüzyılın ilk yarısında monomorfizmi esas alan fenotipik tür kavramıyla tanımlanmıştır. Morfolojik karakterlerdeki farklılıklar ve belli ölçüde anatomik özellikler türlerin ayrımında kullanılmıştır. Bu farklılıklar genetik olmaktan ziyade çevreseldir. Bu taksonomik çalışmalar birçok sinonim türün birikimiyle sonuçlanmıştır. Sonuç olarak biyocoğrafik orijin büyük bir önem taşımaktadır ve çoğu allopatrik populasyonlar ayrı türler olarak isimlendirilmiştir.

Likenlerde, kimyasal tür kavramına da morfolojik olarak ayırt edilemeyen çok sayıda taksonların tanımlanmasında başvurulmaktadır. Ancak bu durum, öncelikle morfolojik karakterlerin tanımlanmasının gerekli olduğunu düşünen yazarlarca eleştirilmiştir (Hawksworth 1976, Lumbsch 1998).

Bazı tür kompleksleri, farklı çevresel koşullarda, farklı fotosentetik canlılarla, farklı birliktelikler meydana getirirler. Örneğin bir mantar türü, nemli bir yer için bir siyanobakterle simbiyoz yaparken, kuru bir habitat için bir yeşil algile birleşebilir (James and Henssen 1976). Tür kompleksleri, fotobiontlarla birliktelik kurabilen bir dimorfik tür veya bir fotobiontla birleşen 2 tür içerebilir( örneğin; likenler için iki fotobiont ve bir mantar türü veya bir fotobiont ve iki farklı mantar türü) (Grube and Kroken 2000).

Kendilerini özgül ekolojik koşullara adapte etmeleri gerekli olduğu için değişik liken tür kompleksleri yaygındır,. Bu ekotipik tür kompleksleri, genellikle kimyasal olarak çeşitlilik gösterirler. Örneğin; Culberson *et al.* (1997) *Ramalina siliquosa*'ın ekolojik tercihi ile kemotipleri arasında yüksek bir korelasyon olduğunu ortaya çıkarmışlardır, benzer sonuçlar *Xanthoparmelia* (Nash and Zavada 1977, Benedict and Nash 1990) türleri arasında da bulunmaktadır.

Habitat, kimyasal veya genellikle morfolojik özellikler bakımından çeşitlilik gösteren

bu tür kompleksleri, bu farklı özelliklerine göre filogenetik açıdan da ayırım göstermektedirler (Grube and Kroken 2000).

Moleküler karakterlere dayanan filogenetik tür kavramları, tür kompleksleri içerisinde bulunan türleri tanımlamak, ileriki kuşaklardaki fenotipik karakterlerin likenleşmiş mantarda nasıl yavaş yavaş geliştiğini göstermek için kullanılmaktadır. Yeterli bir zaman süresince genetik olarak izole edilmiş, türlerin çalışmasında, tek bir lokus bile türleri sabit fenotipik karakterlerle ilintili olarak ayırabilmektedir. Bununla birlikte, fenotipik karakterler gibi moleküler karakterler, filogenetik türler içinde ve tür komplekslerinin kardeş türleri arasında polimorfik olabilir (Avice and Wollenberg 1997). Tek bir lokusun, fenotipik karakterlerle veya biyocoğrafyayla ilintili olan türleri açık bir biçimde çözemediği durumlarda, türleri doğru bir biçimde tanımlamak için birçok lokus kullanılmalıdır.

Son zamanlardaki çoğu çalışmalar nrDNA dizi bilgisine dayanmaktadır. İlk olarak Vanio tarafından yapılmış olan çalışmalarda, likenleşmiş ve likenleşmemiş mantarı tanımlayan filogenetik ağaç, Gargas ve arkadaşları tarafından nrDNA'ya ait daha yavaş evrimleşen bölgelere (SSU, LSU) ait veriler kullanılarak doğrulanmıştır. (Vanio 1890, Gargas *et al.* 1995).

Cansaran ve arkadaşları, (2006) *Rhizoplaca* liken cinsinin ITS bölgesinin dizi analizini gerçekleştirerek, filogenetik ilişkileri konusunda inceleme yapmışlardır. Oluşturulan filogenetik ağacın incelenmesi ile genetik yakınlık hakkında bilgi edinilmiştir (Cansaran vd. 2006).

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Liken Materyali

Bu çalışmada önceden toplanmış ve korunmaya alınmış *Hypogymnia* cinsine ait 4 farklı yapraksı liken türünden (*Hypogymnia farinacea* (Marmara Üniversitesi Herbaryumu), *Hypogymnia laminisorediata* (Marmara Üniversitesi Herbaryumu), *Hypogymnia physodes* (Tuğrul, Yaylacık, Gümüşhane, Giresun, Marmara Üniversitesi Herbaryumu), *Hypogymnia tubulosa* (Antalya, Ankara, Marmara Üniversitesi Herbaryumu) on örnek çalışılmıştır. Ayrıca laboratuvarımızda, farklı çalışmalar kapsamında elde edilmiş, bu gruba yakınlığıyla bilinen üç farklı liken türünün (*Neofuscelia pulla* (Bolu, Mengen), *Melanelia septentrionalis* (Karabük), *Parmelina tiliaceae*(Karabük)) dizileri kullanılmış ve Gen Bankasından elde edilmiş İsveç kökenli *Hypogymnia* cinsine ait iki türün (H4phyAF141368 H6phyAF058036) dizileri çalışılmıştır.

#### 3.2 Yöntem

##### 3.2.1 Liken örneklerinin hazırlanması

Liken türleri, diğer liken türleriyle veya bitkilerle bir arada gelişebildiği için kullanılacak liken örneğinin farklı diğer organizmalardan ayrıştırılması çok önemlidir. Çalışmamızda kullanacağımız örnekler, mikroskop altında pens yardımıyla farklı bitki veya liken türlerinden ve ayrıca topraktan ayrıştırıldıktan sonra petrilere distile su içerisinde bekletilerek kalan toprak partiküllerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Sonrasında liken örnekleri kuru petrilere alınmış ve tekrar kurumaya bırakılmıştır.

Simbiyoz bir birliktelik olan likenlerdeki moleküler çalışmalar birliktelikteki mantar bileşeninin nükleer rDNA'sına odaklıdır. Çalışmalarda mantarın genetik materyalinin tercihini sağlayan iki yöntem bulunur. Birincisi liken tallusundan mantarın mekanik

olarak izole edilebilmesi, ikincisi ise oligonükleotid primerler ile mantar DNA'sının seçilip çıkartılabilmesidir.

### 3.2.2 DNA izolasyonu

*Hypogymnia* cinsine ait (*Hypogymnia farinacea* (Marmara Üniversitesi Herbaryumu), *Hypogymnia laminisorediata* (Marmara Üniversitesi Herbaryumu), *Hypogymnia physodes* (Tuğrul, Yaylacık, Gümüşhane, Giresun, Marmara Üniversitesi Herbaryumu), *Hypogymnia tubulosa* (Antalya, Beynam, Marmara Üniversitesi Herbaryumu) türlerimizin DNA izolasyonu, Aras ve Cansaran (2006) tarafından likenler için bildirilmiş olan mini prep yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin safhaları aşağıdaki gibidir.

0.1g liken örneği sıvı azot kullanılarak havanda ezilir. 1.5ml lik ependorf tüplere alınan örneklerin üzerine 1ml DNA ekstraksiyon çözeltisi ( 0.04 M Tris pH:8, 0.04 M EDTA pH:8, 0.8 M LiCl, %2 CTAB, %4 PVP) ve 10µl merkaptotanol eklenir. Örnekler 65°C'ye ayarlı su banyosunda ara ara çalkalanarak 15 dk bekletildikten sonra oda koşullarında soğutulur. 0.5 ml kloroform/isoamilalkol (24:1V/V) eklenir ve karıştırılır. Sonrasında 14000 rpm'de 4 dk santrifüj işlemi yapılır. Santrifüj sonrası süpernatant kısım diğer bir ependorf tüpe alınıp üzerine bir hacim (yaklaşık 0.8 ml) isopropanol eklenir. 15 dk süre buzda bekletildikten sonra örnekler 14000 rpm de 10 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası süpernatant kısım atılır ve tüpte kalan DNA %70'lik etanolle yıkanır. Etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra DNA, 50-100µl TE (10 mM Tris-Cl pH:8, 1 mM EDTA pH:8) içerisinde çözülür.

İzole edilen DNA miktarı ve saflığı spektrofotometrik ve elektroforetik yöntemlerle belirlendi. DNA konsantrasyonu 260 nmde 1 ODnin 50 µg/ml çift zincir DNA'nın absorpsiyon değeri olduğu göz önüne alınarak hesaplandı ve ayrıca 260nm/280nm değerine göre DNA'nın saflık derecesi değerlendirildi. DNA'nın varlığı agaroz jelinde elektroforetik olarak da gözlemlendi. Son konsantrasyon 0.5 mg/ml olacak şekilde etidyum bromür boyası eklenmiş, %1'lik agaroz jeline örnekler yüklendikten sonra

100 voltta 30 dk yürütüldü ve UV ışığı altında bantların varlığı tespit edildi. Syngene Gene Snap Version 6.04 jel analiz sisteminde fotoğrafları çekildi.

### 3.2.3 PCR analizleri

PCR reaksiyonları, 200ng DNA, 0.8µM ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGAAGTAA; Gardes ve Bruns 1993) ve 0.8µM ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC; White *et al.* 1990) primerleri, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM dNTP ler, 5µl 10X PCR tamponu, 0.5 U Taq Polimeraz (Promega) içerecek şekilde 50µl toplam hacim içerisinde, aşağıdaki şartlarda Progene-Techne markalı PCR cihazında PCR reaksiyonları başlatılır.

PCR Döngü koşulları:

95°C 2 dk ön denatürasyon

"94°C 30 sn, 52 °C 1 dk, 72°C 1.5 dk" (35 döngü)

72°C 8 dk son uzama

Bu PCR koşullarında çoğaltılan DNA lar yine %1'lik agaroz jel üzerinde etidyum bromür varlığında, 100 voltta 30 dk yürütüldükten sonra Syngene Gene Snap Version 6.04 jel analiz sisteminde, UV ışığı altında gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi.

PCR sonucunda elde edilen jel görüntülerinde PCR ürünlerinin, istenilen saflıkta elde edilemediği gözlemlendiği için reaksiyonlar değişik PCR optimizasyon koşullarında birçok kez tekrarlandı. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları değiştirildi.

### 3.2.4 Dizi analizi:

Dizi analizine alınacak PCR ürünleri Wizard DNA pürifikasyon sistemi (Promega) ile saflaştırılmıştır. Bunu takriben saflaştırılan PCR ürünlerinin miktarının tespiti için ürünlerin bir kısmı 100bp DNA ladder moleküler ağırlık belirteci ile beraber %1.5 lik agaroz jellerinde incelenmiştir.

PCR ürünlerinin boya sonlandırıcı döngü dizi analizi kiti (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, A.B.D.) ile döngü dizi analizi metoduna göre üreticinin protokolüne uygun olarak ‘Open Gene & Automated DNA Sequencing System’ (Visible Genetics Piscataway, A.B.D.) cihazında dizileri çıkartılmıştır.

PCR sonucunda elde edilen ürünlerde çift bant gözlenen örneklerin Wizard DNA pürifikasyon sistemi (Promega) ile jelden purifikasyonu yapılmıştır. PCR sonrası örnekler düşük erime sıcaklıklı jelde (%1’lik nusieve agaroz jel) yürütülmüş ve UV altında gözlenen istenilen DNA bantları, jilet yardımıyla jelden kesilip çıkartılmıştır. Çıkarılan bantlar bir ependorf tübe alınarak 70 °C’de tamamen eriyinceye kadar inkübe edilmiştir. Eriyen agaroz 1ml rezin eklenip, 20 dk boyunca karıştırılmıştır. Her bir örnek için Wizard miniklonu hazırlanmış, hazır şırınga haznesi miniklona takılmıştır. Rezin-DNA karışımı, şırınga içerisine pipetle aktarılmış, vakumla miniklon içerisine ilerletilmiştir. Kolon %80’lik izoprapanol ile yıkanmış ve yine izopropanolu miniklon boyunca ilerletmek için vakum uygulanmıştır. 30 dk boyunca vakum yoluyla rezin kurutulmuş, minikolon bir mikrosantrifüj tüpe konularak 2dk boyunca 10000 rpm’de santrifüje tabi tutulmuştur. Miniklon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 50 µl TE eklenip 1 dk beklenmiştir. Sonrasınca DNA fragmentlerine ayırmak için minikolon 20 dk boyunca 10000rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilmesi beklenen DNA örnekleri agaroz jelde yürütülmüş ancak herhangi bir sonuç alınamamıştır.

ITS1F ve ITS4 primerleri ile küçük alt ünite geninin sonu, ITS1, 5.8.geni ve ITS2 ve büyük alt ünite geninin 5’ ucunu içeren bölge çoğaltılmış ve dizi analizine alınmıştır. Çift zincirden dizi analizi gerçekleştirildiği için okuma hataları sonucu ortaya çıkan kararsız durumlar, tamamlayıcı zincirin Clustral W.1.83 programı ile kıyaslaması sonucunda çözülmüştür. Diziler ayrıca, yine aynı programla sıralanmış ve görsel olarak ayarlanmıştır. Diziler sıralandıktan sonra kararsız kalınan bölgeler çıkartılmış ve kayıp veri olarak değerlendirilmiştir. *Hypogymnia* cinsine ait Anadolu’dan elde edilen iki tür *Hypogymnia tubulosa* (Antalya) ve *Hypogymnia physodes* (Gümüşhane) bu çalışmada dizisi çıkartılan ve yeni veri olarak Gen Bankasına sunulacak olan türlerdir. Yine bu gruba yakın olarak bilinen türlere (*Neofuscelia pulla* (Bolu,

Mengen), *Melanelia septentrionalis* (Karabük), *Parmelina tiliaceae*(Karabük)) ait diziler laboratuvarımızda elde edilmiş verilerdir. Bunlara ilave olarak Gen Bankası verilerinden, *Hypogymnia physodes* türüne ait H4phyAF141368 (İsveç), H6phyAF058036 (İsveç) iki örneğe ait diziler indirilmiş ve filogenetik analizlerde kullanılmıştır.

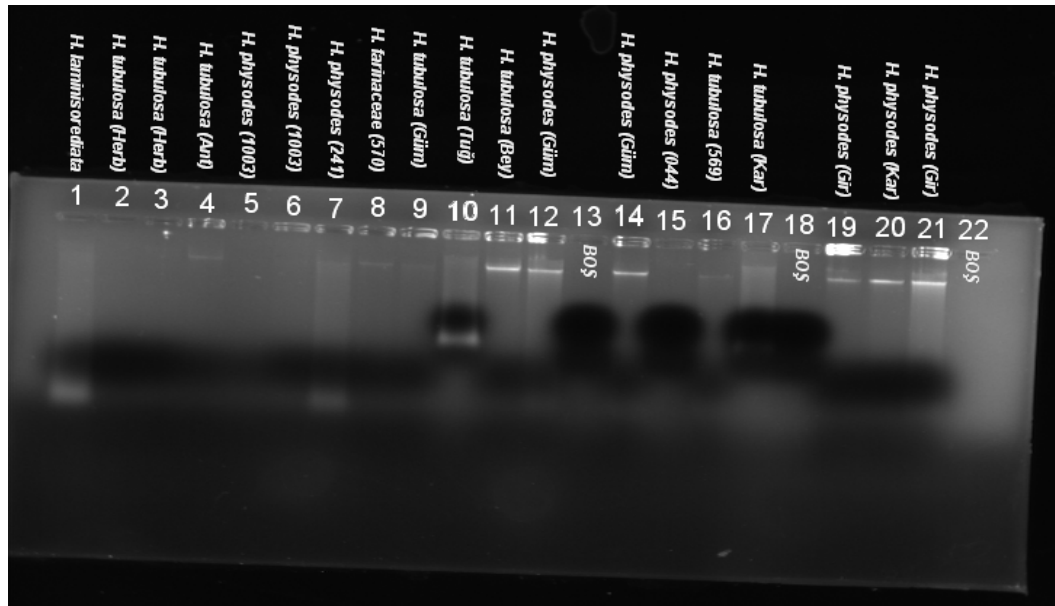
### **3.2.5 Filogenetik analiz:**

Anadolu'dan elde edilen *Hypogymnia tubulosa* (Antalya) *Hypogymnia physodes* (Gümüşhane) türleri ile *Neofuscelia pulla* (Bolu, Mengen), *Melanelia septentrionalis* (Karabük), *Parmelina tiliaceae*(Karabük) türlerine ait diziler ve Gen Bankasından indirilmiş diziler sıralanmış, tüm veriler MEGA3 programı ( Kumar *et al.* 2004 ) ile analiz edilip, dendrogram elde edilmiştir.

#### 4. BULGULAR

Türkiye'nin çeşitli yerlerinden toplanmış *Hypogymnia farinacea*, *Hypogymnia laminisorediata*, *Hypogymnia physodes*, *Hypogymnia tubulosa* türlerinin Miniprep yöntemi ile DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA'larının agaroz jel elektroforezinde gözlenebilen bantları Şekil 4.1'de verilmiştir.

- 1.örnek: *H. laminisorediata* (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 693)
- 2.örnek: *H. tubulosa* (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 262)
- 3.örnek: *H.tubulosa* (Antalya)
- 4.örnek: *H. physodes* (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 1003)
- 5.örnek: *H. physodes* (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 241)
- 6.örnek: *H. farinaceae* (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 570)
- 7.örnek: *H. tubulosa* (Gümüşhane)
- 8.örnek: *H. tubulosa* (Ankara, Tuğrul)
- 9.örnek: *H. tubulosa* (Ankara, Beynam)
- 10.örnek: *H. physodes* (Gümüşhane)
- 11.örnek: *H. physodes* (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 044)
- 12.örnek: *H. tubulosa* (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 569)
- 13.örnek: *H. tubulosa* (Karabük, Yaylacık)
- 14.örnek: *H.physodes* (Giresun)
- 15.örnek: *H.physodes* (Karabük, Yaylacık)



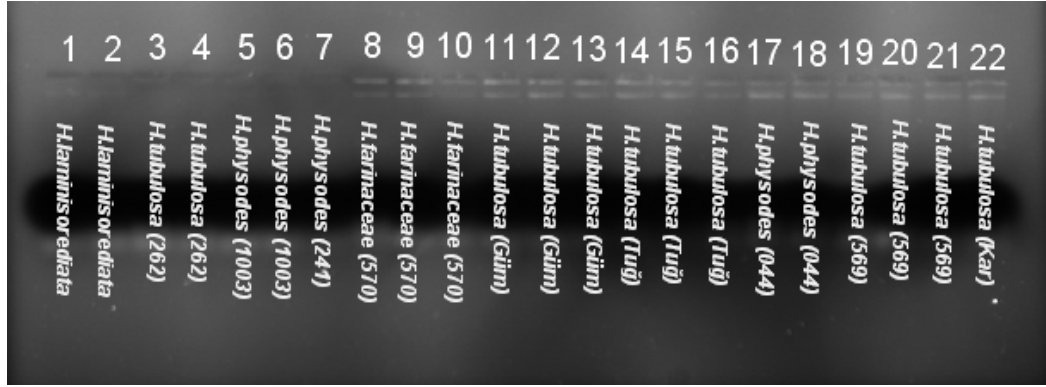
Şekil 4.1 *Hypogymnia* türlerinin mini prep yöntemine göre gerçekleştirilen DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA bantlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü

Çizelge 4.1 *Hypogymnia* türlerinin mini prep yöntemine göre gerçekleştirilen DNA izolasyonu sonuçları

| Kuyu | Örnek ismi (Lokalite)                                         | Sonuç |
|------|---------------------------------------------------------------|-------|
| 1    | 1. <i>H. laminisorediata</i> (Herbaryum)                      | -     |
| 2    | 2 <i>H. tubulosa</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 262)    | -     |
| 3    | 2 <i>H. tubulosa</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 262)    | -     |
| 4    | 3. <i>H. tubulosa</i> (Antalya)                               | +     |
| 5    | 4. <i>H. physodes</i> (Herbaryum 1003 nolu örneği)            | -     |
| 6    | 4. <i>H. physodes</i> (Herbaryum 1003 nolu örneği)            | -     |
| 7    | 5. <i>H. physodes</i> (Herbaryum 241 nolu örneği)             | +     |
| 8    | 6. <i>H. farinaceae</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 570) | +     |
| 9    | 7. <i>H. tubulosa</i> (Gümüşhane)                             | +     |
| 10   | 8. <i>H. tubulosa</i> (Ankara, Tuğrul)                        | +     |
| 11   | 9. <i>H. tubulosa</i> (Ankara, Beynam)                        | ++    |
| 12   | 10. <i>H. physodes</i> (Gümüşhane)                            | ++    |
| 13   | Boş kuyu                                                      | 0     |
| 14   | 10. <i>H. physodes</i> (Gümüşhane)                            | ++    |
| 15   | 11. <i>H. physodes</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 044)  | -     |
| 16   | 12. <i>H. tubulosa</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 569)  | +     |
| 17   | 13. <i>H. tubulosa</i> (Karabük, Yaylacık)                    | +     |
| 18   | Boş kuyu                                                      | 0     |
| 19   | 14. <i>H. physodes</i> (Giresun)                              | ++    |
| 20   | 15. <i>H. physodes</i> (Karabük)                              | ++    |
| 21   | 14. <i>H. physodes</i> (Giresun)                              | ++    |
| 22   | Boş kuyu                                                      | 0     |

- bant yok, + hafif bant var, ++ belirgin bant var, 0 örnek yok

Çizelge 4.1’de gösterildiği üzere DNA izolasyonu sonucunda, her örneğin DNA sı elde edilememiştir. DNA bantları çok net veya hiç gözlenemeyen örneklerin tekrar DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş ve elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



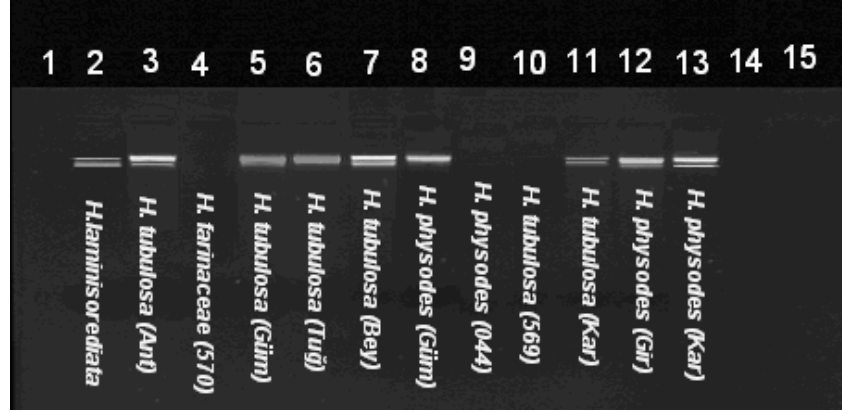
Şekil 4.2 İlk DNA izolasyonunda sonuç alınamayan *Hypogymnia* türlerinin mini prep yöntemine göre gerçekleştirilen ikinci DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA bantları

Çizelge 4.2 İlk izolasyonda sonuç alınamayan *Hypogymnia* türlerinin mini prep yöntemine göre gerçekleştirilen ikinci DNA izolasyonu sonuçları

| Kuyu | Örnek ismi (Lokalite)                                         | Sonuç |
|------|---------------------------------------------------------------|-------|
| 1    | 1. <i>H. laminisorediata</i> (Herbaryum)                      | +     |
| 2    | 1. <i>H. laminisorediata</i> (Herbaryum)                      | +     |
| 3    | 2 <i>H. tubulosa</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 262)    | -     |
| 4    | 2 <i>H. tubulosa</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 262)    | -     |
| 5    | 4. <i>H. physodes</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 1003)  | -     |
| 6    | 4. <i>H. physodes</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 1003)  | -     |
| 7    | 5. <i>H. physodes</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 241)   | -     |
| 8    | 6. <i>H. farinaceae</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 570) | +     |
| 9    | 6. <i>H. farinaceae</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 570) | +     |
| 10   | 6. <i>H. farinaceae</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 570) | +     |
| 11   | 7. <i>H. tubulosa</i> (Gümüşhane)                             | +     |
| 12   | 7. <i>H. tubulosa</i> (Gümüşhane)                             | +     |
| 13   | 7. <i>H. tubulosa</i> (Gümüşhane)                             | +     |
| 14   | 8. <i>H. tubulosa</i> (Ankara, Tuğrul)                        | +     |
| 15   | 8. <i>H. tubulosa</i> (Ankara, Tuğrul)                        | +     |
| 16   | 8. <i>H. tubulosa</i> (Ankara, Tuğrul)                        | +     |
| 17   | 11. <i>H. physodes</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 044)  | +     |
| 18   | 11. <i>H. physodes</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 044)  | +     |
| 19   | 12. <i>H. tubulosa</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 569)  | +     |
| 20   | 12. <i>H. tubulosa</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 569)  | +     |
| 21   | 12. <i>H. tubulosa</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 569)  | +     |
| 22   | 13. <i>H. tubulosa</i> (Karabük, Yaylacık)                    | +     |

- bant yok, + bant var

Çizelge 4.1 ve 4.2’de DNA bantlarının varlığı gösterilen *Hypogymnia* örneklerinin ITS bölgelerini çoğaltmak için PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonucunda çoğaltılan DNA’ların, agaroz jel elektroforezinde gözlenen bantları Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3 *Hypogymnia* türlerinin PCR sonucunda elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü

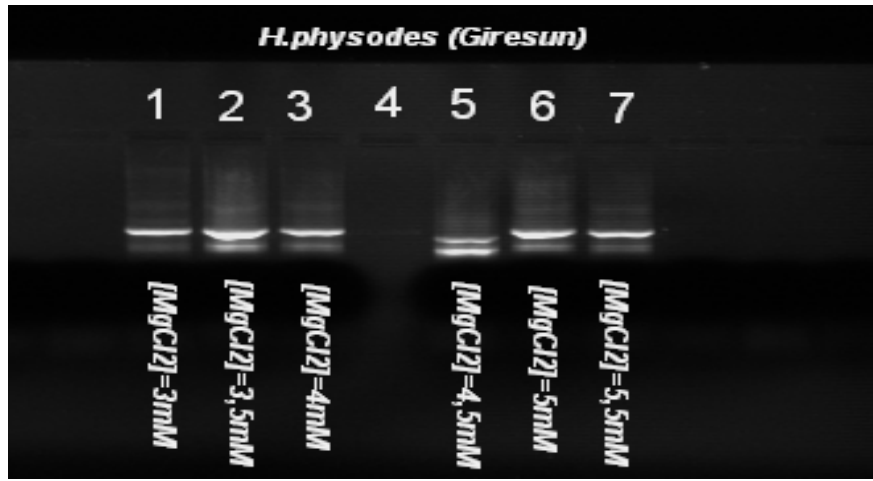
Çizelge 4.3 *Hypogymnia* türlerinin PCR sonuçları

| Kuyu | Örnek ismi (Lokale)                                           | Sonuç |
|------|---------------------------------------------------------------|-------|
| 2    | 1. <i>H. laminisorediata</i> (Herbaryum)                      | +     |
| 3    | 3. <i>H. tubulosa</i> (Antalya)                               | +     |
| 4    | 6. <i>H. farinaceae</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 570) | -     |
| 5    | 7. <i>H. tubulosa</i> (Gümüşhane)                             | +     |
| 6    | 8. <i>H. tubulosa</i> (Ankara, Tuğrul)                        | +     |
| 7    | 9. <i>H. tubulosa</i> (Ankara, Beynam)                        | +     |
| 8    | 10. <i>H. physodes</i> (Gümüşhane)                            | +     |
| 9    | 11. <i>H. physodes</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 044)  | -     |
| 10   | 12. <i>H. tubulosa</i> (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 569)  | -     |
| 11   | 13. <i>H. tubulosa</i> (Karabük, Yaylacık)                    | +     |
| 12   | 14. <i>H. physodes</i> (Giresun)                              | +     |
| 13   | 15. <i>H. physodes</i> (Karabük)                              | +     |

- bant yok, + bant var

PCR sonucunda bazı örneklerden (*H. farinaceae* (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 570), *H. physodes* (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 044), *H. tubulosa* (Marmara Üniversitesi Herbaryumu 569)) PCR’ları sonucunda ITS bölgeleri elde edilemedi, sonuç gözlenen birçok örnekte ise (*H. laminisorediata* (Herbaryum), *H. tubulosa*

(Antalya), *H.tubulosa* (Gümüşhane), *H.tubulosa* (Ankara,Tuğrul), *H. tubulosa* (Ankara,Beynam), *H.tubulosa* (Karabük), *H.physodes* (Giresun), *H.physodes* (Karabük) ITS bölgesi dışında istenmeyen, özgül olmayan bantlar gözlemlendi. Bu özgül olmayan bantların ortaya çıkmasını engellemek için farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında PCR reaksiyonları tekrarlandı ve primerlerin özgül olmayan bölgelere bağlanıp, o bölgeleri çoğaltmaları engellenmeye çalışıldı. Şekil 4.4.'de *Hypogymnia physodes* (Giresun) türünün farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında ITS primerleriyle PCR sonuçları gösterilmektedir.



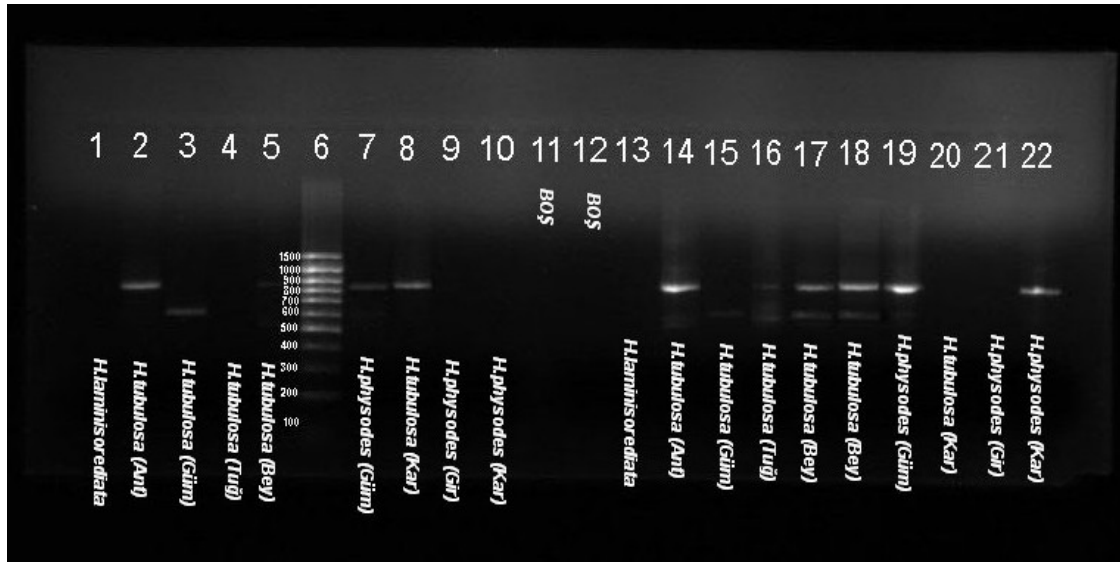
Şekil 4.4 *Hypogymnia physodes* (Giresun) türünün  $[MgCl_2]=3mM$ ,  $[MgCl_2]=3.5mM$ ,  $[MgCl_2]=4mM$ ,  $[MgCl_2]=4.5mM$ ,  $[MgCl_2]=5mM$ ,  $[MgCl_2]=5.5mM$  konsantrasyonlarında yapılan PCR'ları sonucunda elde edilen DNA bantları

Çizelge 4.4 *Hypogymnia physodes* (Giresun) türünün farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında PCR sonuçları

| Kuyu | Örnek ismi (Lokale)                  | $[MgCl_2]$ | Sonuç |
|------|--------------------------------------|------------|-------|
| 1    | <i>Hypogymnia physodes</i> (Giresun) | 3mM        | ++    |
| 2    | <i>Hypogymnia physodes</i> (Giresun) | 3,5mM      | ++    |
| 3    | <i>Hypogymnia physodes</i> (Giresun) | 4mM        | ++    |
| 4    | Örnek yok                            |            | 0     |
| 5    | <i>Hypogymnia physodes</i> (Giresun) | 4,5mM      | ++    |
| 6    | <i>Hypogymnia physodes</i> (Giresun) | 5mM        | ++    |
| 7    | <i>Hypogymnia physodes</i> (Giresun) | 5,5mM      | ++    |

+ hafif bant var, ++ çift bant var, 0 örnek yok

*Hypogymnia physodes* (Giresun) türünün farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında ITS primerleriyle PCR sonuçları dikkate alındığında, Çizelge 4.4’de de belirtildiği gibi bütün  $MgCl_2$  konsantrasyonlarında, *Hypogymnia physodes* (Giresun) türüne ait özgül olmayan bantlar gözlemlenmiştir. Bu bantların içerisinde en az belirgin olan bantlar  $[MgCl_2]=3mM$  ve  $[MgCl_2]=4mM$  koşullarında ortaya çıkmıştır. Bu sonuçtan yola çıkarak diğer DNA örneklerinde  $[MgCl_2]=3mM$  ve  $[MgCl_2]=4mM$  koşullarında PCR’ları gerçekleştirilmiş ve reaksiyonlar sonrası Şekil 4.5’de gösterilen DNA bantları elde edilmiştir.



Şekil 4.5 *Hypogymnia* türlerinin farklı  $MgCl_2$  konsantrasyonları kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen DNA bantlarının elektroforez jel görüntüsü.

Tüm çalışmalar sonucunda elde edilmiş tüm DNA’lar dizi analizine gönderilmiş dizi analizi öncesi istenilen bölgeye özgü DNA’lar Wizard DNA pürifikasyon sisteminin (Promega) PCR ürünlerinden DNA saflaştırılması protokolüne göre saflaştırılmaya çalışılmış ancak yalnızca  $[MgCl_2]=3mM$  PCR koşullarında elde edilmiş *H. physodes* (Gümüşhane) ve *H. tubulosa* (Antalya) örneklerinden ITS bölgesi dizileri elde edilebilmiştir.

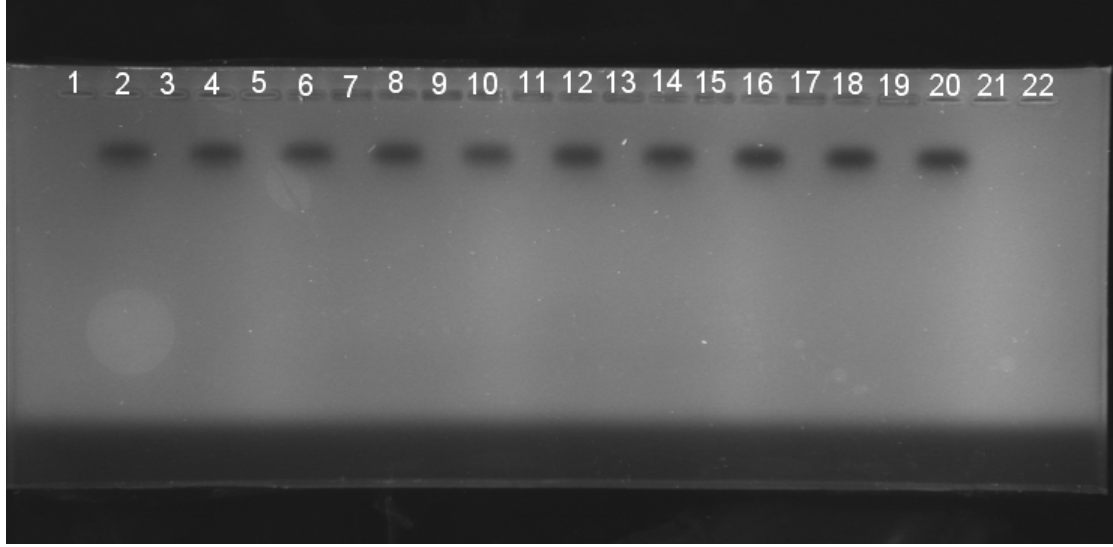
Çizelge 4.5 *Hypogymnia* türlerinin farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında PCR sonuçları

| Kuyu | Örnek ismi (Lokalite)                      | [MgCl <sub>2</sub> ] | Sonuç |
|------|--------------------------------------------|----------------------|-------|
| 1    | <i>H. laminisorediata</i> (Herbaryum)      | 3mM                  | -     |
| 2    | <i>H. tubulosa</i> (Antalya)               | 3mM                  | +     |
| 3    | <i>H. tubulosa</i> (Gümüşhane)             | 3mM                  | -     |
| 4    | <i>H. tubulosa</i> (Ankara, Tuğrul)        | 3mM                  | -     |
| 5    | <i>H. tubulosa</i> (Ankara, Beynam)        | 3mM                  | -     |
| 6    | Belirteç                                   |                      | 0     |
| 7    | <i>H. physodes</i> (Gümüşhane)             | 3mM                  | +     |
| 8    | 13. <i>H. tubulosa</i> (Karabük, Yaylacık) | 3mM                  | ++    |
| 9    | 14. <i>H. physodes</i> (Giresun)           | 3mM                  | -     |
| 10   | 15. <i>H. physodes</i> (Karabük)           | 3mM                  | -     |
| 11   | Boş kuyu                                   |                      | 0     |
| 12   | Boş kuyu                                   |                      | 0     |
| 13   | <i>H. laminisorediata</i> (Herbaryum)      | 4mM                  | -     |
| 14   | <i>H. tubulosa</i> (Antalya)               | 4mM                  | +     |
| 15   | <i>H. tubulosa</i> (Gümüşhane)             | 4mM                  | -     |
| 16   | <i>H. tubulosa</i> (Ankara, Tuğrul)        | 4mM                  | ++    |
| 17   | <i>H. tubulosa</i> (Ankara, Beynam)        | 4mM                  | ++    |
| 18   | <i>H. tubulosa</i> (Ankara, Beynam)        | 4mM                  | ++    |
| 19   | <i>H. physodes</i> (Gümüşhane)             | 4mM                  | +     |
| 20   | 13. <i>H. tubulosa</i> (Karabük, Yaylacık) | 4mM                  | -     |
| 21   | 14. <i>H. physodes</i> (Giresun)           | 4mM                  | -     |
| 22   | 15. <i>H. physodes</i> (Karabük)           | 4mM                  | ++    |

- bant yok, + hafif bant var, ++ çift bant var, 0 örnek yok

Dizi analizi için istenilen saf ITS bölgesi DNA'sına ulaşabilmek için, PCR sonucunda elde edilen tüm DNA'lar bir jelde yürütülmüş ve istenilen DNA bantları jelden kesilip Wizard DNA pürifikasyon sisteminin (Promega) düşük erime sıcaklıklı jelden DNA saflaştırılması protokolüne göre saflaştırılmaya çalışılmıştır. Saflaştırma sonrasında Şekil 4.7'de gösterildiği üzere protokol başarılı sonuç vermemiş ve istenilen DNA'lar saflaştırılamamıştır.

PCR ve saflaştırma işlemleri sonucunda elde edilen bantlardan farklı iki türe ait iki örneğin (Gümüşhane'den toplanmış *Hypogymnia physodes* ve Antalya'dan toplanmış *Hypogymnia tubulosa*) dizi analizleri gerçekleştirilebilmiştir. PCR amplifikasyonu ile elde edilen hedef dizilerin çift yönlü dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen diziler Clustral X programı ile sıralanmıştır.



Şekil 4.6 Çift bant gözlenen örneklerin bandı Wizard DNA pürifikasyon sistemi (Promega) ile saflaştırılması sonucunda elde edilen örneklerin elektroforez jel görüntüsü

Dizi analizi sonucunda *Hypogymnia* örneklerinden sıralanabilir 861 nükleotid elde edilmiştir. Bu bölgelerden 357 nükleotidin sabit (C), 312 nükleotidin değişken (V), olduğu bulunmuştur. Değişken bölgelerden 107 nükleotidlik bölgenin ise parsimoni informatif olduğu analizler sonucu ortaya çıkmıştır. Elde edilen ITS dizileri aşağıdaki gibidir.

#### Hyp1 (*Hypogymnia physodes* (Gümüşhane))

```

TTTCTCACCCCCGCGCGCCATTCCGAAAGACACCCAACCTGAATCGCCCGG
AAAATTTGGTTGCCAGCCCGCGAACCTAGCAAAAGGGTTTTACGGCAACG
AATATTATAGAGGTGGCTTCCCCCTCGGGGTTCGCCCCACCTCTCACCATT
GTTATCTACCTTAGTGCTTGGCGGCTTGGGGTCGCCTCACGCGGACTCGGA
GGGGTGACGGCCCGCAGAGCCCAATAAATCCGTTATGCAGTATATCAGAA
CAAAATTACTATAGTAAAAACTTTCAAACAAACGGAATCTCTGGTTCCAGC
ATCGATGAAAGAACGCAGCGAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCCTCGGTATTCCGGGG
GGCATGCCTGTTCGAGCGTCATACACCCCTCAAGCGTAGCTTGGTATTGGG
TCCTCCCCCCCCGGGGCGTGCCCGAAAAGCAGTGGCGGCTCGGTGTGACTTT
AAGCGTAGTAAATTTTCATCCCGTCTTTGAAAGTTCGCCCCGTGGCTTGCC
AGACAACCCCGATTTTATTTTCAATGATTGACCT

```

Hyp3 (*Hypogymnia tubulosa* (Antalya))

CTCTCCTTGCCCCATAAATGTCACAACAACCTCGACCCAAATTCCCGATAA  
CGAGGGCCCGTGGAAGGTTTGCCAGTTTCCCCCCCAGATTTGGTTTAGGG  
CCAAGGAGTTTTAAAAAAGGGGCCTCCCCTCCGGGTTTCGCCCCAACCTCT  
TACCAATTTATATCTACCTTGTTGTATTGGCAAACATAAGGTCACCTGCGC  
TGACTTCGGGCTAAGAGACGCCTTTCAGAGCCATTCAATTCTGCCTATCCA  
GTTTATCAGGACAAAAACATAATAGTCAAACTTCAAGAACGGATCTCTG  
GGTTCCGAGCATCGATGAGGACGCAGCGAATGCGATAAGTAATGTGAATT  
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAAATCTTTGAACGCACATGCGCCCCCTCGGT  
ATTTCCGAGCGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCCCTCAAAGCGT  
AGCGTAGGTATTGGGTTGCTCGCCCCCGCGGCGTGCCGCGAAAAGCAGTG  
GCGGTCCGGTGTGACTTTAAGCGCAGTAAATCTTCCCCGCTTTGAAAGTTC  
GCCCCGTGGCTTTCCCAGACAACCCCGATTGATTTCAGATGA

Bu örneklerin dizileri, aşağıda dizileri verilen İsveç'ten toplanmış ve dizi analizi yapılmış H4phyAF141368, H6phyAF058036 kodlu *Hypogymnia* cinsi üyeleri ve laboratuvarımızda farklı çalışmalar kapsamında elde edilmiş *Hypogymnia* cinsine yakın özellikleriyle bilinen *Neofuscelia pulla*, Bolu, Mengen (Pa13), *Melanelia septentrionalis*, Karabük (Pa16), *Parmelina tiliaceae*, Karabük (Pa27) türlerinin referans dizileriyle sıralanmıştır. Referans olarak kullanılan bu diziler aşağıdaki gibidir.

H4phyAF141368 (*Hypogymnia physodes* (İsveç))

GTTTCCGTAGGTGAACCGTTTGCCTATCGAAAGCCCTCGCAGCGACTCTAA  
ATAACTGCCCCGAGTCTACCCCTTACCAGGGGCGGGCAACGCTATCAGTCTG  
CGCTGGAAGCTCCTCTCGTCAGAGGGCCAACCAGCAGCTTCAGGGAGCCC  
CTGAAGTCCACAGATCAAACGATAGCGGCCACAATGTGGTTTAGATATGA  
CCGGCCCCAACCGCTAAGCGGATGGATGCGGAAGGATCATTACTGAGAGA  
GGGGCTTCGCGCTCCCGGGGGTTTCGGCCCCCTACCTCTTCACCCATTGTTTA  
TCTACCTTTGTTGCTTTGGCGGGCTTTGGGGTTTCGCCTCACGCCGGACTTCG

GACTTCGGACTGGTGAGCGCCCGCCAGAGGCCCATTAATTCGGTTTATGC  
AGTATTACAGAACAAAATTACTATAGTAAAACTTTCAACAACGACGGAT  
CTCTTNGTTCCAGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG  
TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC  
CTCGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCCCTCAAGC  
GTAGCTTGGTATTGGGTCCTCGCCCCCGGGGCGTGCCCGAAAAGCAGTG  
GCGGCTCGGTGTGACTTTAAGCGTAGTAAATTTTCATCCCGCTTTGAAAGT  
TCGCCCCGTGGCTTGCCAGACAACCCCATTTATTTCATGATTGACCTCGG  
ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGC

H6phyAF058036 (*Hypogymnia physodes* (İsveç))

GCGGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGAGAGGGGCTTCGCGCTCCCGG  
GGGTTTCGGCCCCTACYTCTTCACCCATTGTTTATCTACCTTTGTTGCTTTG  
GCGGGCTTTGGGGTTCGCCTCACGCCGACTTCGGACTGGTGAGCGCCCGC  
CAGAGGCCCATTAATTCGGTTTATGCAGTATTATCAGAACAAAAATTACT  
ATAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCAGCATCGATGAAGAA  
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC  
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTCGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGT  
TCGAGCGTCATTACACCCCTCAAGCGTAGCTTGGTATTGGGTCCTCGCCCC  
CCGGGGCGTGCCCGAAAAGCAGTGGCGGCTCGGTGTGACTTTAAGCGTAG  
TAAATTTTCATCCCGCTTTGAAAGTTCGCCCCGTGGCTTGCCAGACAACCC  
CATTTATTTCATGATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTT  
AAGCATATCAATAAGNGAGGAAA

Pa 13 (*Neofuscelia pulla*, Bolu Mengen )

ACAGGGTTTCGTAGTTGAACCTGCGGGAAGGATCATTATTGAGAGAGGGG  
CCTCGTGCTCCCGGGGGTTTCTGGCCCCCAACTCTTCACCCCTTGCCTACCT  
ACCTTTGTTGCTTTGGCGGACCCGGGAATCCTCTCGCGCTGGCTCTTTAAG  
CCGGTGCGCGTCCGTCAGAGGGCCATTTAATTCTATTTAATCTATGACGTC  
CGAGTCTAAACACAAATGAATAAAAACTTTCAACAACGGGATCTCTTGGTT  
CCAGCATCGATGAAGGAACGCAGCGAAATGCGATAAAGTAATGTGGAATT

GCAGAATTCAGGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGG  
CAATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTGCACCCCTCCTAAAGCG  
CAGACTTGGTACTTGGGCTCTTCGCGCCCCCTGCGGCGTGGGCGGAAAAAGC  
AGTGGCGGTCCGGCGTGACCTCTTTAAGCGTAAGTGAACATCCTCCCCGCG  
CTGTTAGAAGCATCTCGTCTGTGGCCGGCCAGAGAACCTATTTATTTCCAT  
AATGACACTCTGATCAGGTAGAGATA

Pa16 (*Melanelia septentrionalis* (Karabük))

TCATTATTAAAAAAGGGCGTCTTCTTCTCCGGGGTTTCGGCCCCCAACTCTT  
CACCCCTTGCCTACCTACCTTTGTTGCTTTGGCGGACCCGGGAACCCTCTCG  
CCCTGGCTCTTAAGCCGGTGCGCGTCCGTCAGAGGCCCATTTAAATTCTAT  
TTAATCCTTGAAGTCCGAGATCTAAACACAATGAATAAAAACTTTCAACAA  
CGGATCTGCTTGGTTCCAGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA  
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAATCTTTGAACGCACAT  
TGCGCCCCCTCGGGCATTCCGGGGGCATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGC  
GTCATTTGCACCCCTTCAAGCGCAGCTTGGTATTGGGCTCTCGCCCCCTGCG  
GCGTGGCCGAAAAACAGTGGCGGTCCGGCGTGACTTTAAGCGTAGTAACA  
TCTTCCCGTTTAAGCAA

Pa27 (*Parmelina tiliaceae* (Karabük))

CTTCCCCCTCCCGGGGGGCTCCGGGCCCTCAACTCTTCACCCGTTGACGATAT  
ACCTTTGTTGCTTTGGCGGACCTCGGGACCACTCTCGCACAGGCTTATAAA  
TCGGCGAGCGTCCGTCAGAGGCGCCCTTGTAATCGACTTAATTCGTGAAG  
TCCGAGTTTAAAGAGTAATAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTAGGT  
TCCAGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTA  
TCCCGGGGGCCCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCCCTTCAAGCCGCGGC  
TTGGTATTGGGCTCTCGCCCGCGTGGCGTGTCCGAAAAGCAGTGGCGGTCC  
GGTGCGACTTTAAGCGTAGTAAATTCGATCCCGCTTTGAAGTACTCGTCCG  
CGCCCGGCAGACAACCCCATCATTCGTTATTGACCTCGGATCAGGTAGGGG  
TACCCG

Çizelge 4.6 Dizisi karşılaştırılan örneklerin numaralandırılması ve Gen bankasındaki isimleri

| No  | Örneğin ismi lokalitesi                    | Gen bankası adı |
|-----|--------------------------------------------|-----------------|
| [1] | <i>Hypogymnia physodes</i> (İsveç)         | H4pHyAF141368   |
| [2] | <i>Hypogymnia physodes</i> (İsveç)         | H6pHyAF058036   |
| [3] | <i>Hypogymnia physodes</i> (Gümüşhane)     |                 |
| [4] | <i>Neofuscelia pulla</i> (Bolu, Mengen)    |                 |
| [5] | <i>Melanelia septentrionalis</i> (Karabük) |                 |
| [6] | <i>Parmelina tiliaceae</i> (Karabük)       |                 |
| [7] | <i>Hypogymnia tubulosa</i> (Antalya)       |                 |

Çizelge 4.7 Dizisi karşılaştırılan örneklere ait benzerlik indeksi

| [   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6 | 7] |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|---|----|
| [1] |       |       |       |       |       |   |    |
| [2] | 0.000 |       |       |       |       |   |    |
| [3] | 0.061 | 0.061 |       |       |       |   |    |
| [4] | 0.180 | 0.180 | 0.230 |       |       |   |    |
| [5] | 0.217 | 0.217 | 0.251 | 0.069 |       |   |    |
| [6] | 0.216 | 0.216 | 0.248 | 0.192 | 0.159 |   |    |
| [7] | 0.175 | 0.175 | 0.211 | 0.266 | 0.288 |   |    |

Çizelge 4.8 Karşılaştırılan örneklerin dizilerinin içerdiği baz sayıları

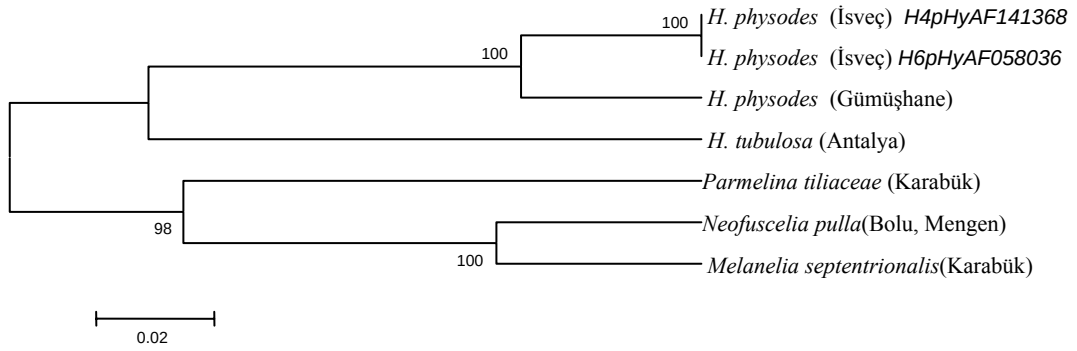
|               | T(U) | C    | A    | G    | Toplam |
|---------------|------|------|------|------|--------|
| H4pHyAF141368 | 23.9 | 27.6 | 22.8 | 25.7 | 790    |
| H6pHyAF058036 | 25.5 | 25.5 | 23.4 | 25.5 | 580    |
| H1pHy         | 24.0 | 27.9 | 24.2 | 24.0 | 592    |
| Pa13          | 24.9 | 26.6 | 22.5 | 25.9 | 586    |
| Pa16          | 25.6 | 27.9 | 22.7 | 23.7 | 476    |
| Pa27          | 24.1 | 28.7 | 22.1 | 25.0 | 515    |
| H3TUB         | 24.5 | 27.6 | 24.8 | 23.1 | 601    |
| Ortalama      | 24.6 | 27.4 | 23.2 | 24.8 | 591.4  |

Dizilerin karşılaştırılması sonucunda, elde edilen ii = Identical Pairs (Aynı çiftler), si = Transitionsal Pairs (Transisyon oranları), sv = Transversional Pairs (Transversiyon oranları), R = si/sv oranı değerleri Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

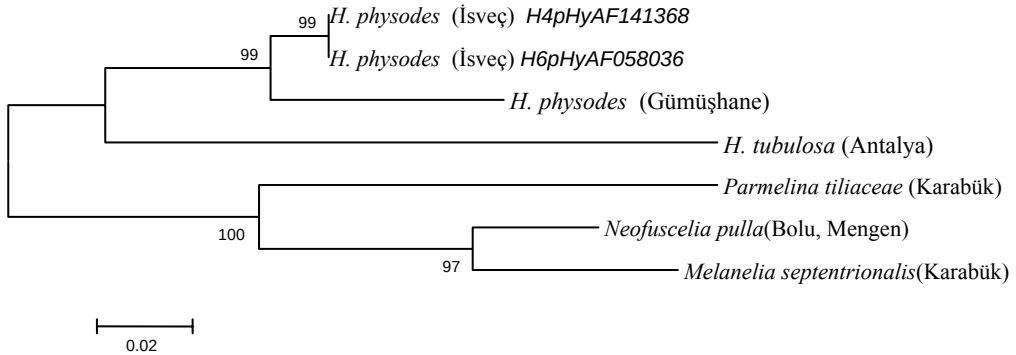
Çizelge 4.9 Karşılaştırılan örneklerin içerdikleri dizi çiftleri ve sayıları

| İlgili bölge | ii  | si | sv | R=<br>si/sv | TT | TC | TA | TG  | CT    | CC  | CA | CG |
|--------------|-----|----|----|-------------|----|----|----|-----|-------|-----|----|----|
| ITS bölgesi  | 401 | 51 | 5  | 1.0         | 99 | 15 | 6  | 5   | 15    | 108 | 7  | 7  |
|              | AT  | AC | AA | AG          | GT | GC | GA | GG  | Top.  |     |    |    |
|              | 8   | 6  | 92 | 11          | 5  | 6  | 9  | 102 | 501.6 |     |    |    |

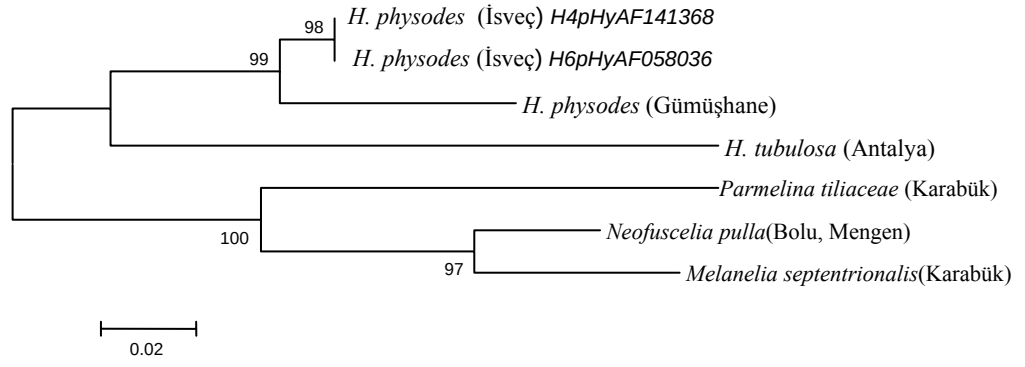
Sıralanan tüm dizilerin MEGA3 programı ile farklı yöntemler (UPGMA, NJ, MP ve ML) kullanılarak analiz edilmesi sonucunda Şekil 4.7 - 4.10'da gösterilen dendrogramlar elde edilmiştir.



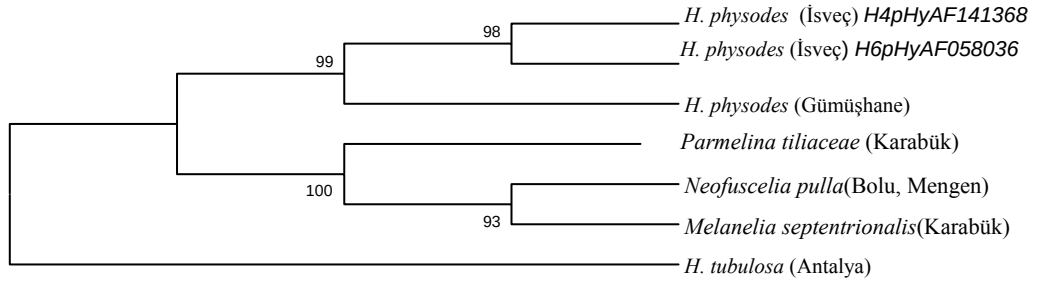
Şekil 4.7 UPGMA ( Unweighted Pair- Group Method of Arithmetic Avarage) dendrogramı



Şekil 4.8 Neighbour - Joining dendrogramı



Şekil 4.9 Maksimum parsinomi dendrogramı



Şekil 4.10 Maksimum benzerlik dendrogramı

## 6.TARTIŞMA ve SONUÇ

Likenlerle yapılan DNA dizi analizleri özellikle son on yıl içerisinde çok önemli bilgilerin birikimini sağlamıştır. Özellikle ITS1 ve ITS2 olarak adlandırılan, ITS bölgeleri, kodlanmayan iki ara (spacer) bölge olmaları bakımından bu çalışmalar için çok uygun olmuşlardır. Bu ara bölgeler rDNA'nın kodlanan bölgelerine kıyasla selektif avantaj sundukları için daha fazla mutasyon biriktirebilmekte ve türlerarası, tür içi ve hatta popülasyon düzeyinde var olan polimorfizmlerin ortaya çıkmasında etkili olabilmektedirler (White *et al.* 1990).

Likenlerle ilgili daha önceki filogenetik araştırmalarda morfolojik ve kemotaksonomik yöntemler kullanılmıştır. Ancak bu tanımlama çalışmaları likenlerin sistematik kategorilerini tam olarak belirlemek için yeterli olamamaktadır. Çok ekstrem koşullarda yaşayabilen likenler, bulundukları ortamla uyum sağlarken morfolojilerinde ve kimyasal içeriklerinde birçok farklılık gösterebilirler. Farklı habitatlarda yaşayan aynı türün bireyleri görünüş itibarıyla çok farklı olabilirler ancak genetik yapıları çok kolay değişiklik göstermez. Bu gibi engeller yüzünden sistematik çalışmalarda son yıllarda moleküler yöntemlerin kullanımı artmıştır. Likenlerin DNA'ya bağlı olarak elde edilen verileri daha stabildir ve gerçeğe en yakın sonuçları sağlar.

Bugüne kadar birçok liken cinsiyle ITS dizi analizi çalışması yapılmış ve geçmişte klasik yöntemlerle elde edilmiş verilerle dizi analizi sonucu elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Dünya literatüründe *Hypogymnia* cinsi ile yapılan farklı dizi analizi çalışmaları olmuştur. Ancak rDNA ITS bölgesi bilgisinin kullanıldığı çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yapılan çalışmalarda genellikle dünya üzerinde oldukça yaygın olan *Hypogymnia physodes* türü kullanılmıştır. 1999 yılında *Parmelicea* ailesine ait filogenetik ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, bu cinse yakın akraba olarak kabul edilen farklı türlerle beraber *Hypogymnia physodes* türünün de ITS ve SSU rDNA bölgesi dizileri incelenmiştir. *Hypogymnia physodes*, ITS ve SSU+ITS bilgilerine göre

oluşturulan iki ağaçta da *Evernia prunastri* türü ile diğer türlerden ayrılarak ikili bir dal oluşturmuştur (Wedin *et al.* 1999).

2001 yılında Crespo ve arkadaşları, SSU rDNA bölgesi dizi analizi ile *Parmelia* likenlerinin filogenisini araştırdıkları çalışmada da *Parmelia* cinsi ile bu cinse yakın olarak kabul edilen diğer birçok cinsle beraber *Hypogymnia* cinsine ait *Hypogymnia physodes* türünün de SSU rDNA dizisi belirlenmiştir. *Hypogymnia physodes*, toplam 31 türün neighbour joining metoduna göre filogenisinin sergilendiği ağaçta *Evernia prunastri*, *Brodoa intestiniformis*, *Arctoparmelia centrifuga*, *Pseudevernia furfuracea* türleriyle monofiletik bir grup oluşturarak diğer 25 türden ayrılmıştır. Bu gruptan ilerleyen zamanlarda sırasıyla *Evernia prunastri*, *Brodoa intestiniformis*, *Arctoparmelia centrifuga* ayrılmış *Hypogymnia physodes* türü *Pseudevernia furfuracea* türü ile ikili bir dal oluşturmuştur (Crespo *et al.* 2001). Bu iki çalışmanın sonuçları, *Hypogymnia physodes* ile *Evernia prunastri*'nin iki çalışmada da aynı atadan geldiği, ancak başka çeşitli türler eklenerek *Hypogymnia physodes*'e *Evernia prunastri*'den daha yakın yine aynı atadan gelen başka türler olabileceği de ortaya çıkarmaktadır.

Başka bir çalışmada *Hypogymnia tubulosa* türlerinin ketoasil sentaz gen bölgesi bilgisi belirlenmiştir, *Hypogymnia* cinsine ait ikinci bir türe ait dizi analizinin yapıldığı bu çalışmada oluşturulan dendrogramda *Hypogymnia tubulosa* daha önce bahsedilmiş olan çalışmada *Hypogymnia physodes*'in de aynı grupta yer aldığı *Evernia prunastri*, *Brodoa intestiniformis*, *Pseudevernia furfuracea* ile grup oluşturmuştur. Bu gruptan sırasıyla yine ilk *Evernia prunastri* sonrasında *Brodoa intestiniformis* ayrılmış ve *Hypogymnia physodes* türü yine *Pseudevernia furfuracea* türü ile ikili bir grup oluşturmuştur (Opanowicz *et al.* 2006). Bu çalışmalarda gerek *Hypogymnia physodes*'in gerekse *Hypogymnia tubulosa* türü hem ITS bilgisi hemde farklı bir gen bölgesi bilgisi ışığında incelendiğinde benzer türlerle benzer ilişkiyi sergilediği görülmektedir. Bu sonuçları *Hypogymnia* cinsi bireylerinin aynı atadan kök aldıkları diğer cins bireyleriyle benzer yakınlıklar gösterdiği bu durumda aynı çalışmada aynı gen bölgeleriyle iki farklı türün incelenmesi sonucunda bu iki türün *Pseudevernia furfuracea* türünden de ayrılarak yeni bir grup oluşturabileceği sonucuna varabiliriz.

Thell, 1999’da yayınladığı bir çalışmasında *Parmeliaceae* familyasından 8 farklı türün grup I intron veya ITS bölgeleri, 4 türün ise ITS bölgesi dizilerini elde etmiştir. Dizi bilgisini kullandığımız *H.physodes* (AF141368) örneği bu çalışmada *Parmeliaceae* familyası üyesi diğer türlerle beraber filogenetik olarak incelendiğinde, ITS bölgesi dizi bilgisine göre diğer tüm türlerden ayrılarak *Cavernuloria lophyrea* adlı türle ayrı bir dal oluşturmuştur. *Cavernuloria* ve *Hypogymnia* cinsleri farklı cinsler olarak tanımlanmış olsada bu gruplaşma, morfoloji, anatomi ve ikincil kimyalarıyla da desteklenmiştir. Grup I intron bölgesi ve iki dizi bilgisinin birleştirilerek oluşturulan ağaçlarda ise bu türlerin grubuna üçüncü bir tür, *Parmelia saxatilis*’i eklenmiştir ve her iki ağaçta da bu türler diğer tüm türlerden ayrı dalda bulunmuşlar ve filogenetik analizde dış grup olarak belirlenmişlerdir (Thell 1999).

*Hypogymnia* cinsine ait ITS dizi analizi gerçekleştirilen ikinci tür Türkiye’de bulunmayan *Hypogymnia hypotrella* türüdür. 2005 de yapılan bu çalışmayla türün ITS dizi analizi bilgisi gen bankasına eklenmiştir (Hur *et al.* 2005). Bu türle ilgili herhangi bir filogenetik çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmaya Türkiye’nin değişik yörelerinden toplanmış *Hypogymnia* cinsine ait dört farklı türle (*Hypogymnia farinacea* (Gümüşhane), *Hypogymnia laminisorediata* (Gümüşhane), *Hypogymnia physodes* (Tuğrul, Yaylacık, Gümüşhane, Giresun), *Hypogymnia tubulosa* (Antalya, Beynam)) başlanmıştır. Ancak materyal ve metot bölümünde belirtilen DNA izolasyonu ve PCR ve jelden DNA saflaştırması aşamalarında yaşanan teknik sorunlar nedeniyle 2 türe ait örneklerle (*Hypogymnia physodes*, *Hypogymnia tubulosa*) çalışmaya devam edilmiştir. Bu örneklerin dizileri, laboratuvarımızda farklı çalışmalar kapsamında elde edilmiş *Hypogymnia* cinsine yakınlığıyla bilinen üç farklı liken türüne (*Neofuscelia pulla* (Bolu, Mengen), *Melanelia septentrionalis* (Karabük), *Parmelina tiliaceae*(Karabük)) ait diziler ve Gen Bankası’ndan indirilen iki *Hypogymnia physodes* dizileri referans alınarak incelenmiştir.

MEGA3 programı ile yapılan bu incelemede farklı filogenetik yöntemlere (Neighbour-Joining, Maksimum Parsinomi, Maksimum Benzerlik, UPGMA) göre dendrogramlar elde edilmiştir ( Şekil 4.3 - 4.6).

Elde edilen bütün dendrogramlarda farklı lokalitelerden elde edilmiş tüm *Hypogymnia physodes* türleri kendi aralarında bir grup, *Hypogymnia* cinsine yakınlığıyla bilinen gruba ait bireyler (*Neofuscelia pulla* (Bolu, Mengen), *Melanelia septentrionalis* (Karabük), *Parmelina tiliaceae*(Karabük)) de yine kendi aralarında bir grup oluşturmuştur. *Hypogymnia tubulosa* (Antalya) örneği ise bütün dendrogramlarda diğer bireylerden farklı bir grupta tek başına yer almıştır. Analiz sonucunda farklı yöntemlere göre ortaya çıkartılan dendrogramların tümünün Boot Strap (Seç dağıt testi)değerleri oldukça yüksektir (96-100 arasında değişmekte). Bu değerler ve her bir yöntemle elde edilen filogenetik ağaçların birbirini destekleyen sonuçlar vermesi elde edilen filogenetik ağacın güvenilirliğini arttırmaktadır.

Neighbour Joining ve Maksimum Parsinomi yöntemleri sonucunda elde edilen dendrogramlar birebir aynıdır. Bu dendrogramlarda, Gümüşhane'den elde edilen bir ve İsveç'ten elde edilen iki *Hypogymnia physodes* türü %99'luk boot strap değeriyle bir grup oluşturmuştur. Bu grup içerisinde birbirlerine olan genetik uzaklıkları Gümüşhane örneğine kıyasla çok daha az olan İsveç örnekleri, ağaçta % 98-99'luk boot strap değeriyle ikili yeni bir dal oluşturmuştur. Bu örneklerden tekli bir dal oluşturarak ayrılan Gümüşhane örneğinin ağaçtaki dal uzunluğu dolayısıyla genetik uzaklığı fazladır. Filogenetik ağaçta, bir grup altında toplanan ancak grup içinde genetik farklılıklar sergileyen farklı lokalitelere ait *H. physodes* türüne ait bireylerinin dağılımı farklı habitatlarda, farklı ekolojik şartlarda yetişen aynı türe ait likenlerin zamanla farklılaşabileceğini işaret etmektedir (Şekil 4.3).

Antalya yöresine ait *Hypogymnia tubulosa* örneği ise filogenetik ağaçta tek başına bir grup oluşturmuştur. Dendrogramda, bu örneğin öncesinde *Hypogymnia physodes* türlerinin oluşturduğu grup ile tek bir dal üzerinde bulunduğu ve zamanla evrimleşerek tek başına farklı bir grup oluşturduğu anlaşılmaktadır. *Hypogymnia* cinsine ait farklı

türlerin dendrogramda köke doğru gidildikçe tek bir dal üzerinde birleşiyor olması, bu örneklerin aynı cinse ait bireyler olması sebebiyle beklenen ve anlamlı bir sonuçtur.

*Hypogymnia* cinsine yakın cinsler olarak kabul edilmiş diğer üç tür, %100'lük boot strap değeriyle bu gruplardan farklı olarak ayrı bir üçlü grup oluşturmuşlardır. Bu üçlü grubun içinde *Neofuscelia pulla*, *Melanelia septentrionalis*'in genetik uzaklıkları *Parmelina tiliaceae* örneğine kıyasla çok daha yakındır bu yüzden bu iki tür grup içinde ayrı ikili bir dal oluşturmuşlardır. Bu dalın boot strap değeri %96-97'dir, bu değer bu iki türün birbirine yakınlığını güvenilir kılmaktadır. *Parmelina tiliaceae* türü ise *Hypogymnia* türlerine göre bu iki türe genetik olarak çok daha yakın olduğu için farklı bir dal üzerinde olsa da bu grupta yer almıştır. Köke doğru gidildikçe dendrogramdaki diğer dört örnekle aynı düğümde farklı iki dallar olarak birleşmektedirler. Bu durum *Hypogymnia* türlerine yakın olarak bilinmesine rağmen farklı cinslere ait bireyler olmaları nedeniyle anlamlıdır. Bu örnekler için *Hypogymnia* cinsine ait bireylerle evrim sürecinin çok daha erken evrelerinde farklılaştıkları düşünülebilir.

Elde edilen veriler ölçüsünde oldukça anlamlı bir filogenetik ağaç oluşmuştur. ITS dizi analizi verileri likenlerdeki genetik benzerlik ve farklılıkları oldukça etkin bir şekilde ifade edebilmektedir. Filogenetik ağaçta gözlenen genetik uzaklıklar *Hypogymnia* türleri arasındaki farklılaşmanın oldukça fazla olduğuna bir işaret sayılabilir.

Bu çalışmada Türkiye'den değişik iki bölgeden toplanmış farklı iki *Hypogymnia* türünün ITS dizileri çıkartılmış ve Gen Bankasında bulunan verilerle kıyaslanmıştır. Bilindiği gibi genotipleme konusunda PCR 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 metodoloji olarak RAPD, AFLP gibi farklı yöntemlerde kullanılmaktadır ancak bu teknikler, likenlerin simbiyotik yaşamı sebebiyle problem çıkarmaktadır. ITS dizi analizi ile sadece mantara özgü primerler kullanılarak, bu engeller aşılmış ve çalışmada izlenilen bu

yöntemin, *Hypogymnia* cinsine ait örneklerdeki genetik farklılıkları ortaya çıkarmada yeterli olduğu gösterilmiştir. Ancak kullanılan birçok liken materyalinden, dizi analizi gerçekleştirilebilecek nitelikte DNA saflaştırılamamıştır.

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, *Hypogymnia* cinsi 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

- Alpaslan A. 2003. Non-tüberküloz mikobakteri infeksiyonlarında laboratuvar tanı ve duyarlılık testleri. 21. yüzyılda tüberküloz sempozyumu ve II. tüberküloz laboratuvar tanı yöntemleri kursu, Samsun.
- Anonymous, 2001, <http://cmgm.stanford.edu/help/manuel/software/sequence/phylogenetic>, 12.02.2004
- Anonymous, 2002, [http://en.wikipedia.org/wiki/Internal\\_transcribed\\_spacer](http://en.wikipedia.org/wiki/Internal_transcribed_spacer), 18.03.2005
- Anonymous, 1999, <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/lichen.htm>, 12.02.2004
- Anonymous, 1995, <http://www.earthlife.net/lichens/lichen.html>, 12.02.2004
- Anonymous, 2001, <http://www.ipcc.ie/infolichens.html>, 12.02.2004
- Anonymous, 1998, <http://www.mdc.mo.gov/conmag/1998/10/20.htm>, 12.02.2004
- Anonymous, 2003, <http://www.blm.gov/or/plans/surveyandmanage/MR/Lichens/20041022/Lichens-346949.pdf>, 12.02.2004
- Anonymous, 1998, <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/cvogel/Tutorials/MolEvol.htm>, 12.02.2004
- Anonymous, 1999, [http://www.biol.paisley.ac.uk/bioref/Fungi\\_lichens/Hypogymnia\\_physodes.html](http://www.biol.paisley.ac.uk/bioref/Fungi_lichens/Hypogymnia_physodes.html), 2004
- Aras. S. and Cansaran. D. 2006. Isolation of DNA for sequence analysis from herbarium material of some lichen specimens. Turkish Journal of Botany. ( In press).
- Armaleo, D. and Clerc, P. 1991. Lichen chimeras, DNA analysis suggests that one fungus forms two morphotypes. Experimental Mycology, 15; 1-10.
- Armstrong, R. 2004. Lichens, lichenometry and global warming. Microbiologist, September; 32-35, <http://www.sfam.org.uk>.
- Avise, J. C. and Wollenberg, K. 1997. Phylogenetics and the origin of species. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 94; 7748-7755.
- Benedict, J. B. and Nash-III, T. H. 1990. Radial growth and habitat selection by morphologically similar chemotypes of *Xanthoparmelia*. Bryologist, 93; 319-327.
- Bitter, G. 1901. Zur morphologie und systematik von *Parmelia*, untergattung *Hypogymnia*. Hedwigia 40, 171-274.
- Bruns, T. D., Fogel, R. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and Sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. Mycologia, 82(2); 175-184.
- 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, Issue 5/6.
- Crespo, A., Blanco, O. and Hawksworth, D. L. 2001. The potential of mitochondrial DNA for stabilising generic concepts in the parmelioid lichens. Taxon, 50.
- Crespo, A., Molina, M. C., Blanco, O., Schroeter B., Sancho L. G. and Hawksworth D. L. 2002. rDNA ITS and  $\beta$ -Tubulin gene sequence analyses reveal two monophyletic groups within the cosmopolitan lichen *Parmelia saxatilis*. Mycol. Res. 106(7): 788-795.
- Cubera, O. F., Crespo, A., Fatehi, J. and Bridge, P. D. 1999. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium stored and lichenized fungi. Plant Systematics and Evolution, 216; 243-249.

- Culberson, W. L., Culberson, C. F. and Johnson, A. 1997. Correlations between secondary-product chemistry and ecogeography in the *Ramalina siliquosa* group (lichens). *Plant Systematics and Evolution*, 11; 77-84.
- Elix, J. A. 1979. A taxonomic revision of the lichen genus *Hypogymnia* in Australasia. *Brunoia* 2, 175-245.
- Egger, K. N. 1995. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Can. J. Bot.* 73; 1415-1422.
- Erlich, H. A. 1989. PCR Technology. Stockton Press. NY.
- Felsenstein, J. 1987. Estimation of hominoid phylogeny from a DNA hybridization data set. *Molecular Evolution*. 26:123-31.
- Franc, N. and Karnefelt, E. I. 1998. Phylogeny of *Xanthoria calcicola* and *X. parietina*, based on ITS sequences. *Graphis Scripta*, 9(2); 49-54.
- Freeman, S. and Herron, J. C. 1999. Evrimsel Analiz. Çıplak, B., Başibüyük. H. H., Karaytuğ. S. ve Gündüz. İ. (eds.), Palme Yayıncılık, 28-29, 438-449
- 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.
- Gargas, A. and Taylor, J. W. 1992. Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing 18S nrDNA from lichenized fungi. *Mycologia*, 84; 589-592.
- Gargas, A., DePriest, P. T., Grube, M. and Tehler, A. 1995. Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU nrDNA phylogeny. *Science*, 268; 1492-1495.
- Gargas, A. and DePriest, P. T. 1996. A nomenclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing SSU nrDNA. *Mycologia* 88; 745-748.
- Goffinet, B. and Bayer, R. 1997. Characterization of mycobionts of phototype pairs in the *Peltigerineae* (lichenized ascomycetes) based on ITS sequences of specifically amplified fungal ribosomal DNA. *Fungal Genetics and Biology*, 21; 228-237.
- Goffinet, B. and Miadlikowska, J. 1999. *Peltigera phyllidiosa* (*Peltigeraceae*, *Ascomycotina*), a new species from the Southern Appalachians corroborated by ITS sequences. *Lichenologist* 31; 247-265.
- Groner, U. and LaGreca, S. 1997. The 'mediterranean' *Ramalina pannizzei* north of the Alps: morphological, chemical and nrDNA sequence data. *Lichenologist*, 29; 441-454.
- Grube, M., Gargas, A., DePriest, P. T. and Hafellner, J. 1995. DNA isolation from lichen ascomata. *Mycological Research*, 99; 1321-1324.
- Grube, M. and Kroken, S. 2000. Molecular Approaches and The concept of species and species complexes in lichenized fungi. *Micol. Res.*, 104 (11); 1284-1294.
- 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.
- Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero, S. J. and Owen. J.L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 998-1006.
- Gülşen, O. and Mutlu, M. 2005. Bitki biliminde kullanılan genetik markerlar ve kullanım alanları. *Alatarım* 4(2); 27-37.
- Güner, H. 1986. Likenlerin biyolojisi ve Ege bölgesinde bulunan bazı türleri. *Ege*

- Üniversitesi Yayınları, 2-18, İzmir.
- Hawksworth, D. L. 1976. Lichen Chemotaxonomy. in lichenology : progress and problems (D. H. Brown, D. L. Hawksworth & R. H. Bailey eds), 139-184. Academic Press, London.
- Hur, J.S., Wang, L.S., Oh, S.O., Kim, G.H., Lim, K.M., Jung, J.S. and Koh, Y.J. 2005. Highland macrolichen flora of Northwestern Yunnan, China. The Journal of Microbiology, June, 228-236.
- Innis, M. A., Gelfand D. H., Sninsky, J. J. and White T. J. 1989. PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, 315p, NY.
- Ivanova, N., DePriest P. T., Bobrovas 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.
- James, P. W. and Henssen, A. 1976. The morphological and taxonomical significance of cephalodia. In Lichenology : progress and problems (D. H. Brown, D. L. Hawksworth & R. H. Bailey, eds), Academic Press, 22-27, London.
- Jones, N., Ougham. H. and Thomas, H., 1991. Markers and mapping; we are all geneticists now, New Phytol, 137: 165-177.
- Klug, W.S. and Cummings, R. M. 2002. Genetik. Öner, C. (eds.), Palme Yayıncılık, 381-383, Ankara
- Krog, H. 1968. The macrolichens of Alaska. Norsk. Polarinst. Skr. (Oslo) 144, 1-180.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 2004. MEGA3. Integrated software for molecular evolutionar genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, 5, 150-163.
- LaGreca, S. 1999. A phylogenetic evaluation of the *Ramalina americana* chemotype complex (lichenized *Ascomycota*, *Ramalinaceae*) based on rDNA ITS sequence data. Bryologist, 102; 602-618.
- Lohtander, K., Kallersjö, M. and Tehler, A. 1998a. Dispersal strategies in *Roccellina capensis* (*Arthoniales*). Lichenologist 30; 341-350.
- Lohtander, K., Kallersjö, M. and Tehler, A. 1998b. Population studies in *Physciaceae*. In progress in molecular studies of lichens (M. Grube & M. Wedin, eds), 17. [Programme and Abstracts.] Karl-Franzens-Universität, Graz.
- Lohtander, K., Myllys, L., Sundin, R., Kallersjö, M. and Tehler, A. 1998c. The species pair concept in the lichen *Dendrographa leucophaea* (*Arthoniales*) based on ITS analyses. Bryologist, 101; 404-411.
- Lumbsch, H. T. 1998. The use of metabolic data in lichenology at the species and subspecific levels. Lichenologist 30; 347-367.
- Lumbsch, H. T. and Schmitt I. 2001. Molecular data suggest that the lichen genus *pertusaria* is not monophyletic. Lichenologist, 33(2); 161-170.
- Martin, M. P. and Llimona, X. 1998. Molecular evidence supports the separation of *Teloschistes lacunosus* from *T. villosus*. In progress in molecular studies of lichens (M. Grude and M. Wedin, eds), 19. [Programme and Abstracts.] Karl-Franzens-Universität, Graz.
- Mattsson, J.-E. and Wedin, M. 1998, Phylogeny of the *Parmeliaceae* – DNA data versus morphological data. Lichenologist, 30; 463-472.
- Mount, DW. 2001 Bioinformatics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York,. Chapter 3. Alignment of pairs of sequences; 52-137.
- Mount, DW. 2001 Bioinformatics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York,. Chapter 7. Phylogenetic prediction; 281-324.

- Myllys, L., Lohtander, K., Kallersjö, M. and Tehler, A. 1999. Sequence insertions and ITS data provide congruent information in *Roccella canariensis* and *R. tuberculata*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12; 295-309.
- Nash-In, T. H. and Zavada, M. 1977. Population studies among Sonoran desert species of *Parmelia* subgen. *Xanthoparmelia* (*Parmeliaceae*). *American Journal of Botany*, 64; 664-669.
- Nylander, W. 1896. Les lichens des environs de Paris. P. Schmidt, Paris
- Opanowicz, M., Blaha, J. and Grube M. 2006. Detection of paralogous polyketide synthase genes in *Parmeliaceae* by specific primers. *Lichenologist*, 38(1); 47-54.
- Poelt, J. 1973. Classification. In the lichens (Ahmadjian, V. And Hale M. E. Ed.) Academic Pres: 599-632.
- Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1993. Genetic diagnostic in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines, *Trends Genet.*, Vol-93 No:8, August 275-280.
- Saghai-Marooof, M.A., Biyashev, R.B., Yang, G.P., Lhang, Q. and Allard, R.W. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley species diversity, chromosomal locations and population dynamics, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:5466-5470.
- Saiki R. K., Gelfand D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Hiquchi, R., Horn, G.T., Mullis K.B., and Erlich, H.A. 1998. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNAPolymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Saitou N. and Imanishi, T. 1989. Relative efficienciens of the Ficth-Margoliash, Maximum Parsinomy, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution and Neighbour-Joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol Biol Evol*; 6: 514-525.
- Satchwell, M F. 1998. DNA fingerprinting hybrid poplar (*Populus spp.*) clones using RAPD-PCR with hot air temperature cycling, State University of N.Y., College of Environmental Science and Forestry, Syracuse, N.Y., USA, May.
- Staub, J.E., Serquen, F.C., and Gupta, M. 1996. Genetics markers, map constructions and their application in plant breeding. *Hort Science* 31(5): 729-741
- Striem, M.J., Spiegel-Roy, P., Ben- Hayyim, G., Beckham, J. and Gidoni, D. 1990. Genomic DNA fingerprinting of *Vitis vinifera* by use of multi-loci probes. *Vitis* 29:223-227.
- Thell, A. and Miao, V. 1999. Phylogenetic analysis of ITS and intron sequences from European and American samples of cetrarioid lichens. *Annales Botanicae Fennici*, 35, 275-286.
- Thell, A. 1999. Gruop I intron versus ITS sequences and in phylogeny of cetrarioid lichens. *Lichenologist*, 31(5): 441-449.
- Tibell, L. 2001. *Cybebe gracilenta* in an ITS/5.8S rDNA Based phylogeny belongs to *Chaenotheca* (*Coniocybaceae*, lichenized Ascomycetes). *The Lichenologist*, 33: 519-525.
- Tingey, S.V., Rafalski, J.A. and Williams, J. G. K. 1992. Genetic analysis with RAPD markers, Joint Plant Breeding Symposia Series, November, Minnesota, Application of RAPD Technology to Plant Breeding, 3-8.
- Ulrik, S. 1999. Lichens of Bhutan: Biodiversity and Use. University of Copenhagen Botanical Institute, Department of Mycology.
- Vanio, E. A. 1890. Etude sur la classification naturella et la morphologie des lichens du Bresil. II. Asca Societatis pro Fauna et Flora Fennica 7: 1-256.

- Waugh, R. and Powell, W. 1992. Using RAPD. Markers for crop improvement, Focus 10, June, 186-191.
- Walton, M. 1993. Molecular markers: which ones to use? Seed World, July, p:23-29.
- Wedin, M, Döring, H. and Mattsson, J. E. 1999. A multi-gene study of the phylogenetic relationships of the *Parmeliaceae*. Mycological Research, 103; 1185-1192.
- Weissing, K. 1995. DNA Fingerprinting Plants and Fungi. CRC Press, USA.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nuc. Acids Res. 18(24):7213-7218.
- 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.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful markers, Nucleic acids research. 18(22), 6531-6535
- Wolinski, H., Grube, M. and Blanz, P. 1999. Direct PCR of symbiotic fungi using microslides. Biotechniques, 26; 10-11.
- Yıldırım, A. ve Kandemir, N. 2001. Genetik markörler ve analiz metodları. Bitki Biyoteknolojisi II, 351-361
- Yurdakulol, E. ve Yıldız, A. 2002. Likenler. Tabiat ve İnsan Dergisi. Yıl: 36 Sayı:4, 6-11.
- 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.
- Zabeau, M. 1993. Amplified fragment length polymorphism (AFLP). European Patent Application 92402629.7.
- Zeybek U., Thorsten, L. H., Benno, F. G., Elix J. A. and John, V. 1993a. Chemosyndromic Variation in Hypogymnia species, mainly from Turkey (lichenized Ascomycotina). Crypt. Bot. 3; 260-263.
- Zeybek, U., John, V. and Lumbsch, H. T. 1993b. A taxonomical investigation in Turkey lichen genus Hypogymnia (Nyl.) Nyl. Doğa – Tr. J. of Botany, 17; 109-116.
- Zoller, S. and Lutzoni, F. S. 1999. Genetic Variation Within and Among Populations of The Threatened Lichen *Lobaria pulmonaria* in Switzerland and Implications for Its Conservation. Molecular Ecology, 8; 2049-2059.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aybüke Kabaog lu  
Doğum Yeri : Ardeşen-Rize  
Doğum Tarihi : 19.03.1981  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise : Rize Anadolu Lisesi 1998  
Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü  
Yüksek Lisans : Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Ortaöğretim Alan  ğretmenliğı 2005  
Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı Biyoteknoloji Bölümü 2007

### Çalıştığı Kurum

GNC Doğal Beslenme  r nleri LTD Şirketi 2004-2006