



**T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ LİKEN
HERBARYUMUNDA BULUNAN BAZI LİKEN
TÜRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNDEN İNCELENMESİ**

DİLARA YÜCELER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Mustafa KOCAKAYA

AĞUSTOS – 2024

YOZGAT

T.C
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ LİKEN
HERBARYUMUNDA BULUNAN BAZI LİKEN
TÜRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNDEN İNCELENMESİ

DİLARA YÜCELER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Mustafa KOCAKAYA

AĞUSTOS – 2024

YOZGAT



YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ONAY FORMU

T.C.

YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Enstitümüzün Biyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans/Doktora Programı öğrencisi Dilara YÜCELER 'in hazırladığı “**Yozgat Bozok Üniversitesi Liken Herbaryumunda Bulunan Bazı Liken Türlerinin Moleküler Yönden İncelenmesi**” başlıklı tezi ile ilgili tez savunma sınavı, Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri gereğince 20/08/2024 Salı günü saat 12:00'da yapılmış, tezin onayına oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ümit BUDAK

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Mustafa KOCAKAYA

(Danışman)

Jüri Üyesi :Dr. Öğr. Üyesi Ahmet CEYLAN

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı Enstitü Yönetim Kurulu Kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Ümit BUDAK

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan eder, aksi bir durumda aleyhine doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Dilara YÜCELER

20/08/2024

ÖN SÖZ

Tez çalışmalarım esnasında her türlü desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini aktaran, gerekli çalışma ortamını sağlayan ve tüm çalışmalarımda yanımda bulunan değerli danışman hocam Doç. Dr. Mustafa KOCAKAYA'ya teşekkür ederim.

Tüm tez çalışmam boyunca her türlü yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli aileme teşekkür ederim.

Dilara YÜCELER

20/08/2024

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ LİKEN HERBARYUMUNDA BULUNAN BAZI LİKEN TÜRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNDEN İNCELENMESİ

DİLARA YÜCELER

YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. MUSTAFA KOCAKAYA

Bu çalışmada Yozgat Bozok Üniversitesi liken herbaryumunda bulunan 9 farklı cinse ait 10 farklı liken taksonu moleküler olarak incelenmiştir. Bu incelemede *Dermatocarpon miniatum* var. *miniatum*, *Dolichousnea longissima*, *Lobaria pulmonaria*, *Parmelina tiliacea*, *Pseudevernia furfuracea*, *Ramalina farinacea*, *Umbilicaria hirsuta*, *Usnea intermedia*, *Xanthoparmelia protomatrae* liken taksonları kullanılmıştır. Moleküler analizler, ITS primerleri kullanılarak PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sekans analizleri sayesinde incelenen bölgeler detaylı olarak analiz edilmiştir. ITS dizileri temel alınarak yapılan filogenetik analizler ve dendrogramlar, hem çalışılan örnekler hem de gen bankasından alınan örnekler ile birlikte değerlendirilmiştir. Bu filogenetik analizler, Neighbor-Joining (NJ) yöntemi ile yürütülmüştür. NJ dendrogramları incelendiğinde, incelenen taksonun ve aynı cinse ait gen bankasından alınan diğer taksonların bir grup oluşturduğu belirlenmiştir. Dış grup olarak seçilen taksonlar ise bu cins grubundan ayrılarak farklı bir klad oluşturmuştur.

2024, xi + 52 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyoçeşitlilik, Filogeni, Liken, Neighbor-Joining.

ABSTRACT

MASTER THESIS

MOLECULAR INVESTIGATION OF SOME LICHEN SPECIES IN YOZGAT BOZOK UNIVERSITY LICHEN HERBARIUM

DİLARA YÜCELER

**YOZGAT BOZOK UNIVERSITY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
DEPARTMENT OF BIOLOGY**

SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. MUSTAFA KOCAKAYA

In this study, 10 different lichen taxa belonging to 9 different genera in the lichen herbarium of Yozgat Bozok University were analysed molecularly. *Dermatocarpon miniatum* var. *miniatum*, *Dolichousnea longissima*, *Lobaria pulmonaria*, *Parmelina tiliacea*, *Pseudevernia furfuracea*, *Ramalina farinacea*, *Umbilicaria hirsuta*, *Usnea intermedia*, *Xanthoparmelia protomatrae* lichen taxa were used in this study. Molecular analyses were performed by PCR method using ITS primers. Thanks to sequence analyses, the regions examined were analysed in detail. Phylogenetic analyses and dendrograms based on ITS sequences were evaluated together with both the studied specimens and the specimens from the gene bank. These phylogenetic analyses were carried out with the Neighbor-Joining (NJ) method. When the NJ dendrograms were analysed, it was determined that the studied taxon and other taxa from the genebank belonging to the same genus formed a group. The taxa selected as outgroups were separated from this genus group and formed a different clade.

2024, xi + 52 Pages

Keywords: Biodiversity, Lichen, Neighbor-Joining, Phylogeny.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ BEYANI.....	iv
ÖN SÖZ.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Likenler	3
2.2. Likenlerin Sınıflandırılması	4
2.3. Likenlerin Moleküler Olarak Sınıflandırılması	5
2.4. Moleküler Belirteçler (Markırlar)	5
2.4.1. ITS ve rDNA	6
2.4.1.1. ITS Bölgesinin Genel Özellikleri:.....	6
2.4.1.2. ITS ile rDNA İlişkisi	6
2.4.1.3. rDNA Bölgeleri	6
2.4.1.3.1. 18S rDNA (Küçük Alt Birim).....	6
2.4.1.3.2. 5.8S rDNA.....	7
2.4.1.3.3. 28S rDNA (Büyük Alt Birim).....	7
2.4.2. DNA Sekans Analizi.....	7
2.4.2.1. Maxam ve Gilbert'in Kimyasal Kırılma Yöntemi	8
2.4.2.2. Sanger Yöntemi.....	8
2.4.2.3. Otomatik DNA Dizi Analizi Yöntemi	9
2.4.3. Filogenetik Analiz.....	9
2.4.4. Filogenetik Ağaç	9
2.4.4.1. Filogenetik Ağaç Oluşturma Yöntemleri	10

2.4.4.1.1. Karakter Temelli Yöntemler	10
2.4.4.1.1.1. Maximum Parsimony (MP).....	10
2.4.4.1.1.2. Maximum Likelihood (ML).....	10
2.4.4.1.1.3. Bayes Metodu.....	10
2.4.4.1.2. Mesafe Temelli Yöntemler	10
2.4.4.1.2.1. UPGMA Metodu	11
2.4.4.1.2.2. Neighbour Joining (NJ).....	11
3. Gereç ve Yöntem.....	12
3.1. Gereç.....	12
3.2. Yöntem.....	12
3.2.1. Likenlerin Toplanması	12
3.2.2. Tayin Yöntemi	13
3.2.3. DNA İzolasyonu	14
4. BULGULAR (ve TARTIŞMA)	17
4.1. Türler ve Sistematik Kategorileri.....	17
4.1.1. <i>Dermatocarpon</i>	18
4.1.2. <i>Dolichousnea</i>	19
4.1.3. <i>Lobaria</i>	20
4.1.4. <i>Parmelina</i>	23
4.1.5. <i>Pseudevernia</i>	25
4.1.6. <i>Ramalina</i>	27
4.1.7. <i>Umbilicaria</i>	29
4.1.8. <i>Usnea</i>	31
4.1.9. <i>Xanthoparmelia</i>	33
5. TARTIŞMA	47
6. Sonuç ve Öneriler.....	49
7. KAYNAKLAR	51

TABLÖLAR LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1. PCR reaksiyon karışımı	15
Tablo 3.2. ITS için PCR döngü şartları	15
Tablo 4.1. Taksonların herbaryum numaraları ve sıralı sekansları.	34
Tablo 4.2. Genbankasından alınan taksonlar, numaraları ve orijinleri	40



ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.1. <i>Dermatocarpon miniatum</i> var. <i>miniatum</i> NJ dendogramı.	17
Şekil 4.2. <i>Dolichousnea longissima</i> NJ dendogramı.	19
Şekil 4.3. <i>Lobaria pulmonaria</i> NJ dendogramı.	21
Şekil 4.4. <i>Parmelina tiliacea</i> NJ dendogramı.	23
Şekil 4.5. <i>Pseudevernia furfuracea</i> NJ dendogramı.	25
Şekil 4.6. <i>Ramalina farinacea</i> NJ dendogramı.	27
Şekil 4.7. <i>Umbilicaria hirsuta</i> NJ dendogramı.	29
Şekil 4.8. <i>Usnea intermedia</i> NJ dendogramı.	31
Şekil 4.9. <i>Xanthoparmelia protomatrae</i> NJ dendogramı.	33

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
-----------------	--------------------

μ	: Mikrometre
-------	--------------

mm	: Milimetre
----	-------------

ml	: Milimetre
----	-------------

Kısaltmalar	Açıklamalar
--------------------	--------------------

DNA	: Deoksiribonükleik asit
-----	--------------------------

ITS	: Internal Transcribed Spacer
-----	-------------------------------

NJ	: Neighbor-Joining
----	--------------------

MgCl ₂	: Magnezyum klorür
-------------------	--------------------

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
-----	-------------------------------

SSU	: Küçük Alt Ünite
-----	-------------------

1. GİRİŞ

Likenler, mantar ve fotosentetik alglerin veya siyanobakterilerin birlikte meydana getirdikleri simbiyotik olarak yaşamlarını sürdüren bir birlikteliktir. Bu yapıda, mikobiyont ortak olarak mantar bulunuyorken ve fotosentetik ortak olarak ise bir ya da birden fazla alg ve/veya siyanobakteri yer alır. Mantar bileşeni (mikobiyont) genellikle Ascomycetes veya Basidiomycetes sınıflarına ait olur, fakat çoğu liken türü Ascomycetes üyelerindendir. Ascomycetes üyelerinin büyük bir kısmı likenleşmiş mantarları temsil ederken, Basidiomycetes ve Deuteromycetes türlerinden de bazı likenleşmiş formlar bulunur. Fotobiyont ortaklar genellikle Chlorophyta bölümünde yer alan yeşil alglerden oluşur, daha nadiren de Cyanobacteria bölümünde yer alan siyanobakterilerden oluşur (Brodo, 2001).

Liken oluşumunda rol oynayan mantar ve algler, birbirleriyle birleşmeden önceki formlarıyla büyük farklılık gösterirler ve uzun ömürlü bir tallus oluştururlar (Hawksworth & Hill, 1984). Bu simbiyotik ilişkide mantar ortağı, birlikteliğe fotosentez için gerekli olan CO₂, H₂O ve bazı mineral maddeler sağlar. Fotosentetik ortaklar ise fotosentez yoluyla ürettikleri karbonlu organik maddeler ve oksijen üretir (Lücking et al., 2017).

Likenler, birliktelikte yer alan mantar ortağına göre Fungi (Mantarlar) aleminde sınıflandırılmaktadır. Şu ana kadar dünya genelinde 25.000'den fazla likenleşmiş mantar taksonu tanımlanmıştır (Hawksworth & Hill, 2021). Bu sayının, yapılan araştırmalar ve çalışmalarla birlikte giderek arttığı gözlemlenmektedir. Likenleşmiş mantarların büyük bir çoğunluğunu (%99) Ascomycota şubesine mensup mantarlar oluştururken, geri kalan kısmını ise Basidiomycota şubesine ait mantarlar oluşturmaktadır (Lumbsch & Leavitt, 2011).

Likenler, tropikal bölgelerden kutuplara kadar geniş bir karasal alanda gelişebilir. Yüksek ışık yoğunluğunun fotobiyontları olumsuz etkilediği durumlarda, mantar ortağı çok yoğun olan ışık miktarını azaltarak fotobiyontların hayatta kalmalarını sağlar. Bu sayede likenler, çok yoğun ışıklı habitatlarda dahi yaşamını sürdürebilir (Nash, 2008). Likenler, mutualistik bir simbiyoz ilişkisi örneği olarak gösterilse de bazı araştırmalar likenlerin kontrollü parazitlik örneği olarak da değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır. Mikobiyont, liken simbiyozunda en fazla faydayı elde eden taraftır. Buna karşın, fotobiyont, serbest yaşadığı duruma kıyasla liken içinde daha yavaş büyüme eğilimindedir (Pell, 1999).

"Liken" ifadesi ilk olarak M.Ö. dördüncü yüzyılda Theophrastus tarafından dile getirilmiştir. Ancak, Theophrastus'un "likeni" olarak ifade ettiği canlılar aslında "ciğer otları"ydı. Daha sonra, liken terimi botanikçiler tarafından yosunlarla karıştırılmıştır. İlk olarak, likenlerin alg ve mantarların birleşimiyle oluştuğunu öne süren kişi Alman botanikçi Simon Schwendener'dir (Schwendener, 1869). İsveçli bilim insanı Linnaeus, tüm likenleri tek bir cins altında toplayarak 80 tür tanımlamıştır (Linnaeus, 1753). Liken biliminin öncüsü olarak kabul edilen botanikçi Erik Acharius ise, Linnaeus'un "Lichen" adını verdiği grubu 41 cinse ayırmış, tallus yüzeyindeki soredler ve askosporları sınıflandırmada kullanmıştır (Acharius, 1803).

Likenler ile ilgili gerçekleştirilen sistematik çalışmalar genellikle morfolojik karakterlere dayanır. Likenlerin talluslarında bulunan liken asitlerinin belirli kimyasal maddelerle verdikleri renk tepkimeleri de tanımlamaya yardımcı olur. Fakat, bu tanımlar, likenlerin sistematik gruplarını kesin olarak belirlemede yetersiz kalmaktadır (Miller, 2001).

Son yıllarda, liken simbiyontlarının genetik farklılıklarının incelenmesi önemli ölçüde ilerleme kaydetmiştir (Myllys ve ark., 2001). Liken oluşturan mantarların genetik çeşitliliği, popülasyon yapısı ve evrimsel süreçleri üzerine yapılan araştırmalar giderek artış göstermektedir (Crespo ve ark., 2007). Bu çalışmada, Türkiye'nin çeşitli yerlerinden toplanmış ve Yozgat Bozok Üniversitesi liken herbaryumunda bulunan kabuksu liken taksonlarının moleküler özelliklerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu süreç, ITS gen bölgesinin PCR yöntemiyle çoğaltılmasını ve DNA sekans analizi ile incelenmesini içerir. Ayrıca, bu türler arasındaki benzerlikler ve farklılıkların belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Likenler

Likenler, mantar ve alglerin birleşerek hem morfolojik hem de fizyolojik olarak bütünleştiği simbiyotik yapılar olarak tanımlanır (Hawksworth, 1996). Hava kirliliğine karşı genellikle hassas olduklarından, hava kirliliğinin olmadığı bölgelerde yaşarlar ve bu nedenle biyolojik indikatörler olarak kullanılırlar. Özellikle kükürt dioksit gibi gaz kirleticilere karşı duyarlılıkları nedeniyle, şehir kirliliği ve emisyon kaynaklarının etrafında indikatör olarak değerlendirilmektedirler (Nash, 2008).

Ekolojik açıdan önemli olan likenler, ekolojik süksesyonda öncülük ederler. Likenler, salgıladıkları liken asitleri sayesinde üzerinde yaşadıkları kayaları aşındırarak ince bir toprak tabakası oluştururlar. Bu süreç, karayosunlarının gelişimine olanak sağlar. Zamanla, liken parçaları ve karayosunları organik madde birikimini artırır, böylece humus oluşur ve otsu bitkiler, çalılar ve yüksek yapılı bitkilerin gelişmesi için uygun bir ortam sağlanır (Ellis, 1991).

Likenler, eşeyli ve eşeysiz üreme ile çoğalabilme yeteneğindedir. Eşeysiz üreme soredler aracılığıyla sağlanır. Soredler, alg hücrelerinin mantar hifleriyle sarılmasıyla oluşan yapılardır ve bu yapılar rüzgar ve diğer etkenlerle taşınarak yeni likenleri oluşturur. Likenlerde, eşeyli üremeyi sadece mantar ortağı sağlar ve alglar eşeyli olarak üreyemezler. Apotesyum ve peritesyum adı verilen eşeyli üreme yapıları vardır. Bu yapıların içerisinde spor keseleri denilen askuslar ve askusların içerisinde de eşeyli üreme sporları olan askosporlar bulunur. Askosporlar olgunlaştıklarında etrafa yayılır ve uygun ortamda çimlenerek yeni likenler oluştururlar (Miller, 2001).

Likenlerde sınıflandırma yapılırken bazı özellikler göz önüne alınmaktadır. Bu yapılar apotesyum ve peritesyumların şekilleri, askusların yapı-şekilleri, sporların yapı-şekilleri ve sayıları gibi karakteristik bazı özellikler ayırt edici olmaktadır (Lücking ve ark., 2020). Eşeyli üreme yapılarından apotesyum adı verilen üreme yapılarına daha sık rastlanmaktadır. 3 farklı tipte apotesyum vardır. Bunlar: lekanorin tip apotesyum, lesidein tip apotesyum ve biatorin tip apotesyumdur (Lücking et al., 2020).

2.2. Likenlerin Sınıflandırılması

Sistematikçiler likenleri çeşitli ölçütlere göre kategorize etmişlerdir. Bu ölçütler arasında tallus yapıları, morfolojik özellikler, substrat türleri ve yaşadıkları ortamlar bulunur.

Alg ve mantar hücrelerinin tallus yapısındaki dağılımına göre likenler, homeomerik ve heteromerik tallusa sahip likenler olarak iki gruba ayrılır.

Homeomerik likenlerin tallus kesitleri alındığında, fotosentetik ortak ile mikobiyont ortak eşit olarak dağılmış bir şekilde görülür (Nash, 2008).

Heteromerik likenlerin tallus kesitleri alındığında ise, fotosentetik ortak ile mikobiyont ortağın ayrı ayrı tabakalar oluşturduğu görülür. Heteromerik bir likenin tallus kesiti incelendiğinde farklı tabakalar görülmektedir. Bu tabakalar üst yüzeyden alt yüzeye doğru: üst korteks tabakası, fotosentetik ortağın bulunduğu fotobiyont tabakası (gonidi), mantar hiflerinin yer aldığı mikobiyont tabakası (medulla) ve alt korteks olarak sıralanır. Örneğin, *Hypogymnia* cinsi heteromerik likenlerdendir (Brodo, 2001).

Likenler morfolojik görünümüne göre 3 temel gruba ayrılır. Bunlardan tallus görünümü kabuk şeklinde olan likenler substrata sıkıca bağlıdırlar. Kayaların yüzeyinde bulunur ve substrat olmadan toplamak zordur. Örnekler: *Aspicilia*, *Caloplaca*, *Lecanora* ve *Rhizocarpon* (Hawksworth, 1996).

Yapraksı liken olarak isimlendirilen grupta ise likenler, dorsal ve ventral farklılıkları mevcut olan, lopları yassı biçimli ve yaprak şeklindedir. Bu likenler, rizin ve umbilikus adı verilen yapılar sayesinde substratlarına bağlıdırlar. Örnekler: *Parmelia*, *Peltigera*, *Umbilicaria* (Nash, 2008).

Dalsı likenler olarak isimlendirilen gruptaki likenlerin tallusları dallanmış iplik şeklindedir. Bu likenler substratlarına tek bir noktadan tutunurlar ve kolaylıkla substratlarından ayrılabilirler. Örnekler: *Usnea*, *Evernia* (Brodo, 2001).

Pulsu likenler adı verilen kabuksu likenlerin alt grubu olan likenlerin tallusları pul şeklinde olup substratlarından ayrılırlar ve kabuksu likenlere benzese de alt kısımları farklıdır. Örnek: *Squammarina cartilaginea* (Ellis, 1991).

Likenler, ayrıca üzerinde yaşadıkları substratlarına göre dört grupta incelenir:

Epifitik likenler, Ağaç ve bitkileri substrat olarak seçerler ve yüzeyde veya kısmen gömük olarak bulunabilirler (Hawksworth, 1996).

Saksikol likenler, kayaları ve taşları substrat olarak seçer ve onların üzerinde gelişirler. Kaya yüzeyinde gelişenlere epilitik, kayaya kısmen gömük olanlara ise endolitik likenler denir (Ellis, 1991).

Terrikol likenler, çeşitli yapıdaki toprakları substrat olarak kullanırlar ve toprak yüzeyinde gelişirler (Nash, 2008).

Muskikol likenler ise, karayosunları üzerinde gelişirler (Brodo, 2001).

2.3. Likenlerin Moleküler Olarak Sınıflandırılması

Geleneksel olarak kullanılan taksonomik sınıflandırma, canlıları dış görünüşlerine ve anatomik yapılarına bakarak sınıflandırma yapar. Ancak bu yöntemler, benzerlik gösteren organizmalar arasındaki farklılıkları belirlemede yetersiz kalabilir. Ayrıca, morfolojik ve anatomik özellikler habitat değişikliklerinden etkilenebilir, bu da aynı türün farklı görünüşler sergilemesine neden olabilir. Bu nedenle genetik özellikler, taksonomide daha güvenilir bir temel sağlar. Moleküler biyoloji teknikleri, türlerin doğru bir şekilde sınıflandırılmasında ve teşhisinde önemli bir rol oynamaktadır.

Likenlerin sistematik çalışmaları genellikle morfolojik ve kimyasal özelliklere dayanırken, moleküler biyolojik teknikler daha kesin sonuçlar sağlayabilir. Genotipin fenotipe oranla daha stabil olması, türlerin doğru bir şekilde sınıflandırılmasında moleküler yöntemlerin kullanılmasını destekler.

2.4. Moleküler Belirteçler (Markırlar)

Moleküler belirteçler, genomda bulunan gen bölgeleri veya DNA parçalarıdır ve popülasyon çeşitliliğini belirlemede yüksek güvenilirlik sunar. Bu belirteçlerin avantajları şunlardır:

- Genoma bağlıdır ve bu nedenle güvenilirlerdir.
- Tekrarlanabilirlikleri yüksek olup, farklı laboratuvarlarda standart sonuçlar verirler.
- Genom üzerinde birden fazla bölgeyi tespit edebilme kapasitesine sahiptirler.
- Çevresel koşullardan etkilenmezler.
- Dominat ve kodominat özellikler gösterebilirler.
- Tüm dokularda tanımlanabilirler.

- Ölümcül etkiye sahip değildir.

2.4.1. ITS ve rDNA

rDNA, ökaryotik canlıların çekirdeklerinde bulunan ve çok sayıda kopyası bulunan bir gen ailesidir. rDNA'nın yapısal olarak 5.8S, 18S ve 28S genleri bulunur. Bunlar, ITS-1 ve ITS-2 gibi iç bölgelerle ayrılmıştır. ITS bölgeleri, türler arasındaki farklılıkları belirlemede kullanılır ve nükleer rDNA'nın cins, tür ve popülasyon seviyelerindeki problemleri çözmede yardımcıdır.

2.4.1.1. ITS Bölgesinin Genel Özellikleri:

Filogenetik analizlerde yeterli bilgi sağlayacak uzunlukta (600–700 bp) ve çok fazla kopya sayısı mevcuttur.

Cins ve tür kategorisinde korunmuş rDNA bölgelerine komşudur.

Genellikle cins ve tür seviyelerinde filogenetik çalışmalarda kullanılır.

Daha hızlı evrim geçirir ve bu nedenle daha dinamik veriler sunar.

2.4.1.2. ITS ile rDNA İlişkisi

Moleküler biyolojideki ilerlemeler, türlere özgü gen bölgelerinin tanımlanmasını mümkün kılmıştır. ITS bölgesi, türlerin teşhisinde ve filogenetik çalışmalarda önemli bir yer tutar. ITS birimleri ile rDNA alt birimleri birlikte yer alıp, bu birimler PCR çalışmaları ile elde edilir. ITS bölgelerinin evrensel primerlerle amplifiye edilmesi, türlerin doğru bir şekilde belirlenmesine olanak tanır.

2.4.1.3. rDNA Bölgeleri

2.4.1.3.1. 18S rDNA (Küçük Alt Birim)

18S rDNA, küçük ribozomal RNA alt birimi olarak bilinir ve oldukça korunan bir bölgedir. Çeşitli taksonomik kategorilerin filogenetik çalışmalarında sıkça kullanılır. Bu bölge, fungal soyların sistematğinde farklı taksonomik seviyelerde filogeniyi yeniden inşa etmek için oldukça yararlıdır (Schneider et al., 2019).

2.4.1.3.2. 5.8S rDNA

5.8S rDNA, nükleotit içeriği bakımından oldukça korunmuş bir bölge olup, büyük alt birimin bir parçasıdır. Ancak, 163-164 bp uzunluğundaki bu bölge tek başına filogenetik analizlerde yeterli uzunlukta olmadığından, genellikle ITS bölgeleriyle birlikte değerlendirilir (Hibbett et al., 2007).

2.4.1.3.3. 28S rDNA (Büyük Alt Birim)

28S rDNA, küçük ribozomal RNA alt biriminden daha uzun olup, baz içeriğinde daha fazla çeşitlilik gösterir. Ancak, rDNA genlerindeki varyasyonlar genellikle yakın akraba türlerin ayırt edilmesinde yeterli olmamaktadır. Bu sebeple, familya ve daha yüksek taksonomik seviyelerde kullanılır (Lücking et al., 2018). ITS ve IGS bölgeleri, cinsler arasında, tür seviyesinde ve popülasyon çalışmaları için daha fazla varyasyon sağlar ve bu nedenle filogenetik çalışmalarda sıklıkla tercih edilir (Schoch ve ark., 2009).

2.4.2. DNA Sekans Analizi

DNA sekans analizi, DNA'da bulunan nükleotidlerin tespit edilmesini ifade eder. DNA'nın baz bileşimini analiz etmeye yönelik teknikler 85 yıl önce geliştirilmiş olsa da bu nükleotitlerin kimyasal yöntemler ile analiz edilmeleri günümüzden 60 yıl öncesinde başlamıştır. DNA'nın nükleotid dizilerinin doğrudan kimyasal analizi 1960'larda yapılmaya başlanmıştır. Bundan 10 yıl sonra ise mükleotit dizilerinin daha etkili ve daha doğru yöntemler ile analiz edilmesi için çeşitli teknikler geliştirilmiştir (Smith & Wilke, 2022).

DNA sekanslama, DNA'da bulunan yapıların belirlenmesi ve nükleotit sırasını belirlemek amacıyla geliştirilmiş ve kullanılmakta olan bir tekniktir. Genlerde meydana gelen mutasyonların belirlenmesi, rekombinant teknikler kullanılarak yapılacak çalışmalar için uygun yapıların tespit edilmesi, genlerin ne zaman ve ne kadar ifade edileceğini belirleyen bölgelerin tanımlanması ve genlerin etkilerinin incelenmesi gibi uygulamalarda yaygın olarak kullanılır (Brown et al., 2023).

Nükleotit sekanslarının tespit edilmesi için farklı 2 yöntem kullanılmaktadır. Bunlar “Maxam-Gilbert” ve “Sanger” Yöntemleridir. Maxam-Gilbert'in yönteminde (kimyasal degradasyon), DNA'nın bazı noktalarındaki belirlenen nükleotitlerden kimyasal olarak ile parçalanmasına dayanır. Sanger-Coulson tarafından gerçekleştirilen yöntemde, DNA sentezlenirken belirlenen bir nükleotitle sonlanması sağlanır. Yöntemlerin ikisinde DNA

hazırlanır, çeşitli reaksiyonlar gerçekleşir ve jel elektroforezi kullanılır. Dizilenecek DNA için ayrı ayrı 4 reaksiyon uygulanır ve sonuçta 4 farklı nükleotit uzunluğunda DNA parçacıkları elde edilir. Bu parçacıklar bir jelde elektroforez ile ayrıştırılır. Jel görüntülmesi yapılarak hangi bant bölgesinin hangi baza denk geldiği belirlenir ve sıralama yapılır (Maxam & Gilbert, 1977; Sanger et al., 1977).

2.4.2.1. Maxam ve Gilbert'in Kimyasal Kırılma Yöntemi

Kimyasal kırılma tekniği, DNA'nın bazlarını belirli kimyasal maddelerle değiştirmeyi ve ardından bu değişiklikleri piperidin gibi reaktiflerle tespit etmeyi içerir. Bu yöntem genellikle hidrazin, dimetil sülfat veya formik asit kullanarak bazıları değiştirmekte ve piperidinle bu modifikasyonların yer aldığı nükleotitleri hedef alarak zinciri kesmektedir (Maxam & Gilbert, 1977). DNA genellikle 5' ucundan ³²P radyoaktif izotop veya floresan boya ile etiketlenir. Etiketleme işlemi, DNA'nın iki iplikçisinin ayrılması ya da uygun bir restriksiyon enzimi ile sadece bir iplikçinin kesilmesi yoluyla yapılır. Daha sonra, DNA dört farklı tüpe ayrılarak her bir tüpte A, C, G ve T nükleotitlerini değiştiren tepkimeler yapılır. Tüplerdeki farklı pozisyonlardan kırılmış DNA parçaları jel elektroforezinde ayrıştırılır ve otoradyografi ile bantlar görüntülenir (Maxam & Gilbert, 1977).

Dimetil sülfat, pürinlerin kırılmasında kullanılır; bu işlemde bazik ortamda guanin kırılır, adenin ise asidik ortamda kırılır. Sitozin ve timin gibi pirimidin bazlarını kırmak için ise hidrazin görev yapar. Bu iki reaksiyon, yüksek tuz derişimi ve bazik ortam kullanılarak ayrılır (Maxam & Gilbert, 1977).

2.4.2.2. Sanger Yöntemi

Sanger yöntemi, DNA dizilerini belirlemek için enzimatik DNA sentezine dayanır ve her bir nükleotidin yerini belirlemek amacıyla dizileme sırasında özel terminatör nükleotitleri kullanır. Maxam-Gilbert yöntemine göre daha hızlı ve daha güvenilirdir (Sanger et al., 1977). Bu yöntemde, tek zincirli kalıp DNA, deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP'ler), dideoksinükleotid trifosfatlar (ddNTP'ler), DNA polimeraz ve serbest 3'-OH grubuna sahip primerler kullanılır. DNA polimeraz, dNTP'lerin yanı sıra, 3'-OH grubunu taşımayan ddNTP'leri de substrat olarak kullanabilir, bu da zincir uzamasını durdurur. ddNTP'lerin eklenmesiyle DNA sentezi sonlanır ve bir DNA parçası elde edilir (Sanger et al., 1977). Elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanır ve jel üzerinde en kısa parçadan başlayarak

bir merdiven benzeri bir görüntü oluşur. Bantlar, kullanılan ddNTP türüne göre tespit edilir ve baz dizilimi belirlenir (Sanger et al., 1977).

2.4.2.3. Otomatik DNA Dizi Analizi Yöntemi

Otomatik dizileme, Sanger'in DNA sentez yöntemi üzerine kurulu olup, radyoaktif izotoplar yerine floresan boyalar kullanır. Bu yaklaşım, floresan etiketlenmiş ddNTP'ler sayesinde, nükleotidlerin her birini farklı renklerle belirleyerek otomatik bir dizileme süreci sağlar. 4 ayrı renk boyası kullanılarak her nükleotit tipi belirlenir ve bir kromatogram elde edilir (Schuster, 2005). Otomatik dizileme cihazları, sabit bilgisayarlarda yüklü programlar ile yönetilen elektroforez sistemlerinden oluşur. Lazer ışık kaynağı ile tarama yapılır ve floresan boya uyarılması ile elde edilen veriler bilgisayar yazılımları ile analiz edilir (Schuster, 2005).

2.4.3. Filogenetik Analiz

Filogeni, organizmaların evrimsel tarihini inceler. Filogenetik, taksonların birbirleri ile evrimsel ve genetik ilişkilerini inceleyen, aynı zamanda da akrabalıklarını araştıran bilim dalıdır. Moleküler filogenetik, DNA ve protein dizilerini kullanarak türler arası ilişkileri analiz eder (Felsenstein, 1981).

Filogenetik analizde bazı varsayımlar yapılır:

Kullanılan moleküler diziler homologdur ve ortak bir kaynaktan türemiştir.

Filogenetik farklılaşma iki kola ayrılarak gerçekleşir.

Diziler arasındaki her pozisyon bağımsız olarak evrimleşmiştir (Felsenstein, 1981).

2.4.4. Filogenetik Ağaç

Filogenetik ağaçlar, taksonların evrimsel ilişkilerini görsel olarak temsil eder. Ağaç, dallanma olaylarını ve türlerin yakınlıklarını gösterir. Ağaç, düğümler ve dallardan oluşur; düğümler, taksonların ikiye ya da ikiden fazla popülasyonlara ayrıştığı noktaları temsil eder (Rokas & Carroll, 2006).

Filogenetik ağaçların kullanıldığı alanlar arasında genler arası etkileşim, ilaç tasarımları, aşı çalışmaları, genetik hastalıkların epidemiyolojisi, yeni genlerin işlevlerinin tespiti ve mikrobiyal ekoloji çalışmaları bulunur (Rokas & Carroll, 2006).

2.4.4.1. Filogenetik Ağaç Oluşturma Yöntemleri

Filogenetik ağaç oluşturma yöntemleri iki kategoride incelenir:

Karakter Temelli Yöntemler

- Bayes Metodu
- Maximum Parsimony Metodu (MP)
- Maximum Likelihood Metodu (ML)

Mesafe Temelli Yöntemler

- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean Metodu (UPGMA)
- Neighbour Joining Metodu (NJ)

2.4.4.1.1. Karakter Temelli Yöntemler

2.4.4.1.1.1. Maximum Parsimony (MP)

Maximum Parsimony (MP), en az mutasyonu içeren ağaçları belirlemeye dayanır. Bu yöntem, evrimsel değişimin miktarını en aza indiren ağaçları tercih eder (Felsenstein, 1981). MP analizi, diziler arasındaki benzerliklerin yüksek olduğu durumlarda daha etkili sonuçlar sunar. Bu analizde iki ana yöntem kullanılır: Kesin yaklaşım, tüm olası ağaçları değerlendirirken; tahmini yaklaşım ise istatistiksel güvenilirlik ölçümlerine dayanır (Kress ve ark., 2002).

2.4.4.1.1.2. Maximum Likelihood (ML)

ML, her ağaç topolojisinin gözlenen veriyi oluşturma olasılığını hesaplar ve en yüksek olasılığa sahip ağaçları seçer (Felsenstein, 1981). ML yöntemi daha geniş veri kümeleri kullanabilir ancak hesaplamada yavaştır.

2.4.4.1.1.3. Bayes Metodu

Bayes Metodu, gözlenmeyen olasılıkları gözlemlerle tahmin eder ve ML yöntemine göre daha hızlıdır. Önceki ve şarta bağlı olasılıkları kullanarak en uygun ağaçları belirler (Yang, 1996).

2.4.4.1.2. Mesafe Temelli Yöntemler

Bu teknik, nükleotitlerin hizalanmaları neticesinde ortaya çıkan mesafelere dayanarak filogenetik ağaç oluşturur (Saitou & Nei, 1987).

2.4.4.1.2.1. UPGMA Metodu

UPGMA metodu, her iki grup arasındaki ortalama mesafeyi kullanarak ağaç oluşturur. Mesafe matrislerini kullanarak grupları birleştirir ve sonuçta hiyerarşik bir ağaç yapısı oluşturur (Saitou & Nei, 1987).

2.4.4.1.2.2. Neighbour Joining (NJ)

NJ, filogenetik ağaçları oluştururken, en küçük mesafeye sahip çiftleri belirler ve bu çiftleri birleştirerek ağacı oluşturur. Bu yöntem, daha hızlı sonuçlar verebilir ve büyük veri kümelerinde etkilidir (Saitou & Nei, 1987).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Likenlerin Temini

Likenler, Türkiye’de bulunan çeşitli bölgelerden daha önceki arazilerde toplanmış olan ve Yozgat Bozok Üniversitesi liken herbaryumunda bulunan örnekler arasından seçilmiştir. Toplama sırasında kullanılan ekipmanlar şunlardır:

Arazi Ekipmanı: Klasik ekipmanların yanı sıra, liken toplama işlemleri için yumuşak kağıt keseler, kayaları kırmak için çekiç ve keski, ve örneklerin önemli yapılarının korunması için yumuşak peçeteler.

Örnekler: Liken örnekleri Yozgat Bozok Üniversitesi liken herbaryumundan temin edilmiştir.

Tayin için Kullanılan Araçlar ve Kimyasallar:

Mikroskoplar

OLYMPUS SZX10 stereomikroskop

OLYMPUS BX53 ışık mikroskobu

Kimyasal Reaktifler

Potasyumhidroksit (KOH)

Kalsiyumhipoklorit (C)

Parafenilen diamin (Pd)

Liken Örneklerinin Toplandığı Lokaliteler

Liken örneklerinin toplandığı yerler Tablo 2.1’de belirtilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Likenlerin Toplanması

Liken materyalleri, substratlarıyla birlikte toplanmış, mümkünse üreme yapılarını içeren talluslar tercih edilmiştir. Toplama sırasında kullanılan yöntemler:

Ağaç Kabuğundan Toplama: Keskin bıçak ve ağaç keski kullanılarak ağaç kabuğundaki örnekler dikkatlice alınmıştır. Likenlerin eksiksiz ve hasarsız olarak alınması ve likenlerin üzerinde yaşadığı ağaçların yaralanmamasına dikkat edilmiştir.

Kaya Üzerinden Toplama: Kaya üzerindeki liken örnekleri, kenar ve merkezi kısımları korunarak bütün bir şekilde toplanmıştır.

Taşıma ve Etiketleme: Toplanan örnekler, yumuşak kâğıt torbalara yerleştirilmiş ve gerekli olan bilgiler not edilmiştir. Bu bilgiler örneklerin toplanma tarihleri, yaşadıkları ortam ve substratlarıdır. Liken materyalleri, sert olmayan peçetelere sarılmış ve yumuşak kâğıt keselerin içinde herbaryuma götürülmüştür.

Kurutma ve Etiketleme: Laboratuvara getirilen materyaller, torbalardan çıkarılarak oda sıcaklığında kurutulmuş ve bu örnekler herbaryum zarflarına konularak etiketlenme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Tayin Yöntemi

Toplanan örneklerin tayin edilmesi için kullanılan yöntemler:

Morfolojik İnceleme: Morfolojik incelemeler stereomikroskop kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Anatomik İnceleme: Likenlerden alınan kesitler ışık mikroskobu altında gözlemlenmiştir.

Kimyasal Reaktifler: Örneklerin teşhis edilmesinde kullanılan reaktifler şu şekildedir:

KOH (Potasyum Hidroksit): %10'luk KOH çözeltisi ağzı kapaklı güneş görmeyen bir cam şişe içerisinde uzunca bir süre muhafaza edilebilir.

C (Kalsiyum Hipoklorit): Marketlerde satılan ve temizlik amacıyla kullanılan çamaşır suyunda bulunan temel bir bileşendir. Çok uzun süre muhafaza edilemez, bir veya iki ayda bir yenilenmesi gereklidir. Kullanmadan önce test edilmelidir.

KC: Potasyumhidroksit örneğe bir damla damlatıldıktan sonra bir müddet beklenir ve bir damla kalsiyum hipoklorit damlatılır.

CK: Kalsiyum hipoklorit örneğe bir damla damlatıldıktan sonra bir müddet beklenir ve potasyumhidroksit bir damla damlatılır.

Pd (Parafenilen diamin): Kararlı bir reaktif değildir. Bir miktar Pd kristalinin alkol içerisinde çözündürülmesiyle kullanılır. Belirteç bazı taksonlar ile test edilmeden kullanılmamalıdır ve reaksiyon gelişmesi bir veya iki dakika sürebilir. Pd'nin karsinojen olduğu düşünülmektedir, bu yüzden dikkatli olunmalıdır.

Bu reaktiflerin liken örneklerine damlatıldıktan sonra verdiği reaksiyon sonuçları bulgular kısmında belirtilmiştir.

3.2.3. DNA İzolasyonu

DNA'yı izole etmek için Qiagen DNeasy Plant Kit kullanılmıştır. İzolasyon yönteminin basamakları aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

Hazırlık: Likenlerden yeterli miktarda alınan yapılar (apotesyum varsa tercih edilmelidir) havanda iyice ezilir.

Buffer Eklenmesi: Eppendorf tüplerine 400 µl AP1 Buffer eklenir. Üzerine 4 µl RNaz eklenir ve vorteks ile karıştırılır.

Isıl İşlem: Tüpler 65°C su banyosunda karıştırılarak 30 dakika bekletilir.

Ek Buffer ve Soğutma: Su banyosundan sonra tüplerin hafif soğuması beklenir. Daha sonra 130µl Buffer P3 konularak ve ters düz edilir. Ardından buzda 5 dakika bekletilir.

Santrifüj: Buz üzerinde bekletilen örnekler 5 dk boyunca 14000 rpm'de santrifüjlenir.

Süpernatantın Alınması: Tüplerin üst kısmındaki süpernatant, mor renkli tüplere (spin column) aktarıldıktan sonra 2 dk boyunca 14,000 rpm'de santrifüj edilir.

AW1 Buffer Ekleme: Tüplerde bulunan sıvı kısım 2 ml'lik temiz eppendorf tüpe konulur. Tüplere içerisindeki sıvının 1.5 katı kadar Buffer AW1 eklendikten sonra pipetle homojenize edilir. Yaklaşık olarak 650 µl hacimde olan karışım spin kolonlara (beyaz kapaklı) aktarılır. Daha sonra bu tüpler santrifüje konularak 1 dk boyunca 14,000 rpm'de muamele edilir. Bu işlem kalan karışım için tekrarlanır.

AW2 Buffer Ekleme: Üst kolon 2 ml'lik yedek boş tüpün üzerine konulur. İçerisine 500µl Buffer AW2 ilave edilir. 1 dk boyunca 14,000 rpm'de santrifüj edilir. Alttaki toplama tüplerinde biriken sıvı kısım dikkatlice uzaklaştırılır.

İkinci Buffer AW2 Ekleme: Yeniden 500 µl BufferAW2 ilave edilip 2 dakika 14,000 rpm'de santrifüj edilir.

Sonuç: Beyaz spin kolon dikkatli bir şekilde alınarak temiz bir eppendorfa konulur. İçerisine 50µl ddH₂O ya da Buffer AE eklenir. Oda sıcaklığında yaklaşık olarak 5 dk beklenir. Süre sonunda santrifüj cihazına yerleştirilen tüpler 1 dk boyunca 14,000 rpm'de santrifüj edilir. Sonrasında 25µl ddH₂O ya da Buffer AE eklenir, 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir ve 1 dk boyunca 14,000 rpm'de santrifüj edilir. Spin kolon çıkarılır. Çözünmüş DNA alttaki tüpte elde edilmiş olur.

3.2.4. PCR Analizi

Likenlerin içerisinde yer alan mantarlar için kullanılan ITS-1F primeri ve ITS-4 primeri kullanılmıştır. PCR tüplerinde toplam 50µl hacimde PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyon karışımı Tablo 3.1’de ve döngü ve sıcaklıklar Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1. PCR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Miktar (µl)
PCR tamponu	5
MgCL ₂	5
dNTP	2
ITS1F	0.5
ITS4	0.5
Taq polimeraz	0.2
DNA (her bir örnek için)	33.8
ddH ₂ O	3
Toplam	50

Tablo 3.2. ITS için PCR döngü şartları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman (saniye)	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	5	1
Denatürasyon	95	45	5
Bağlanma	55	45	
Uzama	72	90	
Denatürasyon	95	45	25
Bağlanma	52	45	
Uzama	72	90	
Son uzama	72	600	1

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR çoğaltma ürünlerinin elektroforez yöntemi ile ayrımı %1'lik agaroz jelinde yapılmıştır. Jel içerisine birkaç damla GelRed kimyasalı damlatılarak jel boyanmıştır. Yükleme işlemi için %40 süktroz ve %0.25 bromofenol mavisi içeren yükleme tamponları kullanılmıştır. Elektroforez işlemi, moleküler markırlarla birlikte 1X TAE tamponunda, 100 volt ve 45 dakika süreyle uygulanmıştır.

3.2.6. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, Bm Labosis isimli özel bir laboratuvar tarafından gerçekleştirilmiştir. ITS-1F ve ITS-4 primerleri kullanılarak hedeflenen bölgenin çoğaltılması sağlanmış ve sekans analizi yapılmıştır. Meydana gelebilecek hatalar ise ClusterX programı yardımıyla düzeltilmiştir.

3.2.7. Filogenetik Analiz

Liken herbaryumundan alınan örneklere ait olan sekanslar ve GenBank'tan indirilen veriler sıralanarak, Mega X programı (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018) ile analiz edilmiştir. Elde edilen dendrogramlar Bulgular kısmında verilmiştir.

4.BULGULAR

2.1.Türler ve Sistematik Kategorileri

Toplam 9 cinse ait 10 farklı taksonun sistematik pozisyonları ve deskripsiyonları aşağıda verilmiştir.

2.1.1. *Dermatocarpon*

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

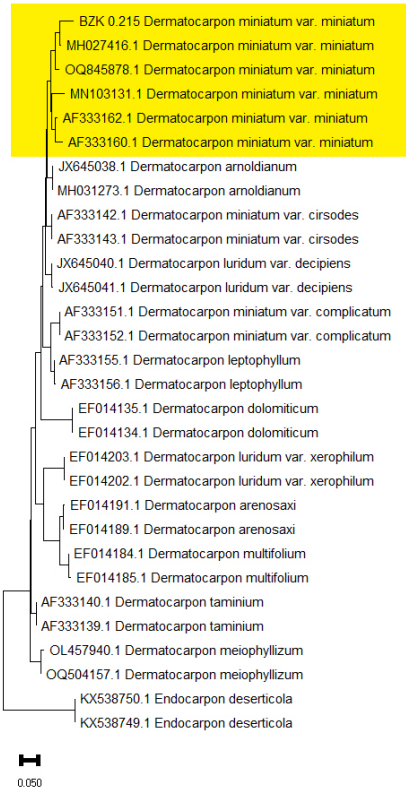
Class: Eurotiomycetes

Order: Verrucariales

Family: Verrucariaceae

Genus: *Dermatocarpon* Eschw.

Dermatocarpon miniatum var. *miniatum* (L.) W. Mann



Şekil 4.1. *Dermatocarpon miniatum* var. *miniatum* NJ dendrogramı.

***Dermatocarpon miniatum var. Miniatum* Deskripsiyon:**

Tallus yapraksı, genellikle merkezi bir tutunma noktasıyla substrata bağılı benzersiz bir lobdan oluşur. 1-3 cm çapında, az çok dairesel, kenarı kesik, bazen geriye kıvrık, üst yüzey pürinoz, kuruyken beyazımsı, soluk gri, nemliyken soluk grimsi yeşil ile soluk grimsi kahverengi, alt yüzey pürüzsüz ila hafif ağısı, soluk kahverengi. Peritesyum çok sayıda, gömük, 0.2-0.3 mm çapında, tallusun her yerine dağılmış olarak görülür. Askosporlar renksiz, basit, elipsoid, 9-13 x 5-6 µm.



2.1.2. *Dolichousnea*

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

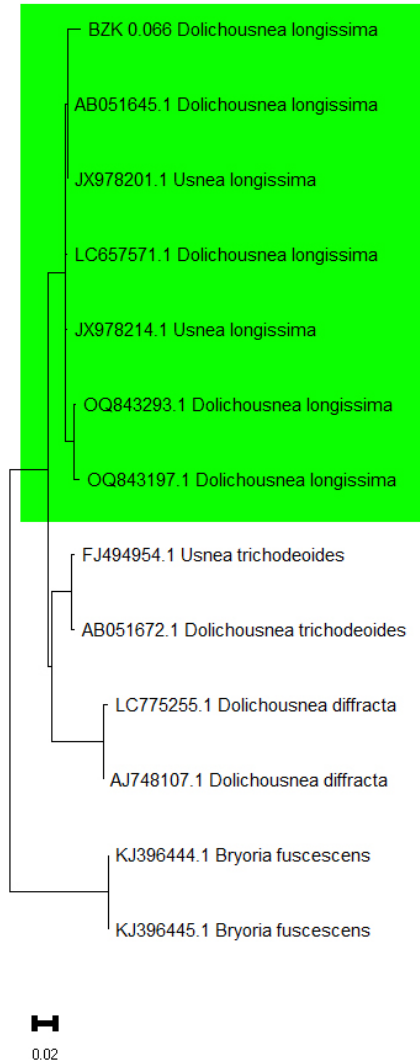
Class: Lecanoromycetes

Order: Lecanorales

Family: Parmeliaceae

Genus: *Dolichousnea* (Y. Ohmura) Articus

Dolichousnea longissima (Ach.) Articus



Şekil 4.2. *Dolichousnea longissima* NJ dendrogramı.

***Dolichousnea Longissima* Deskripsiyon:**

Tallus soluk yeşilimsi, gümüşü-sarımsı yeşil renklerde, dalsı yapıda, sarkık, ana dallar silindirik yapıda, çok sayıda yoğun, kısa ve dik yan dallar var. Korteks pürüzsüzdür. Sored veya izid ara sıra yan dallarda oluşur. Apotesyum son derece nadirdir; mevcut olduklarında disk şeklindedirler, 0.8-3.2 mm çapındadırlar, yan dalların uçlarında terminaldir ve kenarından uzanan çok sayıda fibril vardır.

Kimyasal testler: korteks ve medulla K-, C-, KC- PD-.



2.1.3. *Lobaria*

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

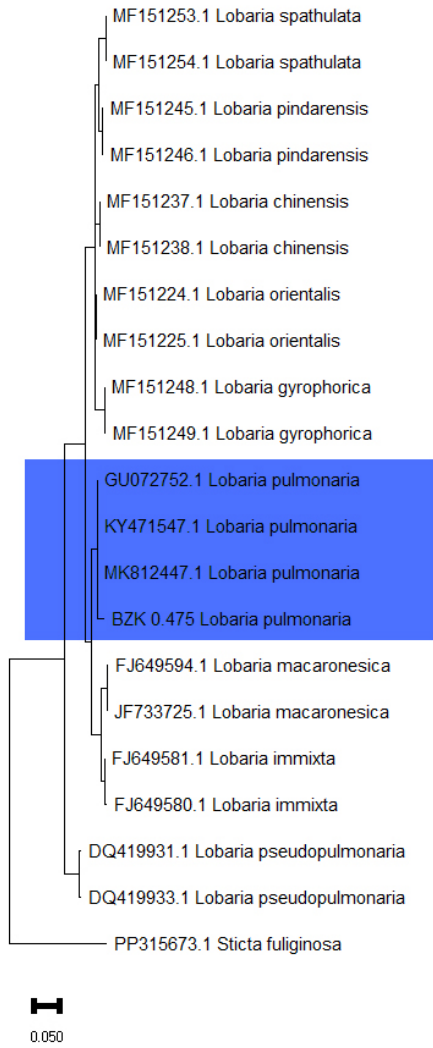
Class: Lecanoromycetes

Order: Peltigerales

Family: Lobariaceae

Genus: *Lobaria* (Schreb.) Hoffm.

Lobaria pulmonaria (L.) Hoffm.



Şekil 4.3. *Lobaria pulmonaria* NJ dendogramı.

***Lobaria Pulmonaria* Deskripsiyon :**

Tallus geniş yayılmıştır, genellikle 1-3 cm genişliğinde loblara sahip, 20-26 cm çapındadır ve bir ucundan gevşekçe tutunmuştur, zaman zaman sarkık ve kayış şeklindedir. Üşt yüzey kuruyken soluk yeşil-kahverengi, ışlakken parlak yeşildir. Alt yüzey ince tüylü ve kahverengidir. Geniş yapraklı ağaçlarda, çalılıklarda, fundalıklarda ve nadiren iğne yapraklı ağaçlarda görölür. Kimyasal testler: medulla Pd⁺ turuncu, K⁺ sarı-turuncu, KC⁺ sarı-turuncu, C⁻.



2.1.4. *Parmelina*

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

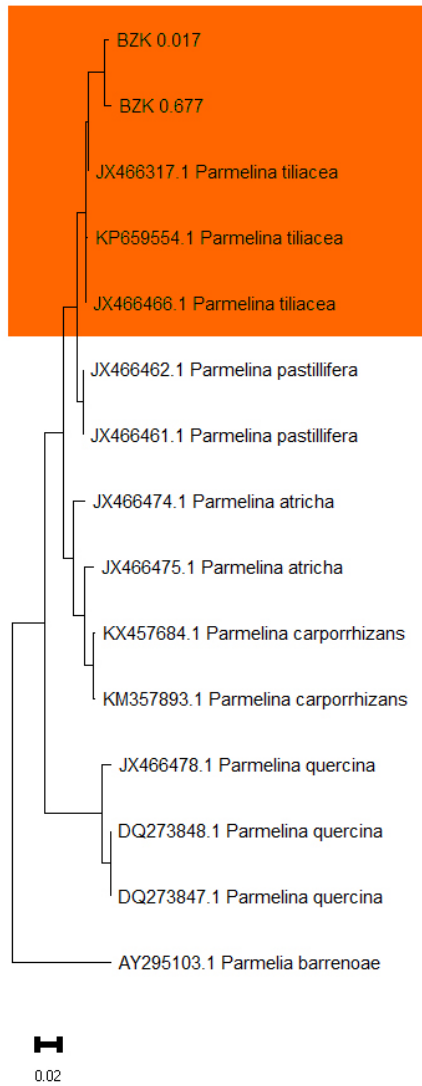
Class: Lecanoromycetes

Order: Lecanorales

Family: Parmeliaceae

Genus: *Parmelina* Hale

Parmelina tiliacea (Hoffm.) Hale



Şekil 4.4. *Parmelina tiliacea* NJ dendogramı.

***Parmelina Tiliacea* Deskripsiyon:**

Tallus yapraksı, heterojen, düzenli olarak 20 cm genişliğe kadar rozetler oluşturur. Loblar soluk gri, mavi-gri renklerde, mat, uçlarda yuvarlak, pürüzsüz, hafif lekeli, 3.5-8 mm genişliğinde, dalgalı veya kesik kenarlı, talusun merkezi kısımları ilk başta küresel, daha sonra oval ile silindirik, genellikle basit, alt kısımda tallus ile aynı renkte, uçlarda kahverengi ile siyah olan yoğun bir isidia örtüsü ile kaplı. Alt yüzey kenarda kahverengi veya siyah, çoğunlukla basit rizinlere sahip. Medulla beyaz. Alt korteks paraplektenkimatik, yuvarlak ve kalın duvarlı hücrelere sahip. Apotesyum çok nadir, lekanorin, disk kahverengi. Epitesyum kahverengimsi. Himenyum ve hipotesyum renksiz. Askus 8-sporlu, Lekanorin tip. Askosporlar tek hücreli, renksiz, kısa elipsoid, 7-10.5 x 5.5-9.5 µm. Piknidyumlar nadir, siyah noktalar olarak görünür. Kimyasal testler: korteks K+ sarı, C-, KC-, Pd-; medulla K-, C+ kırmızı, KC+ kırmızı, P-.

2.1.5. *Pseudevernia*

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

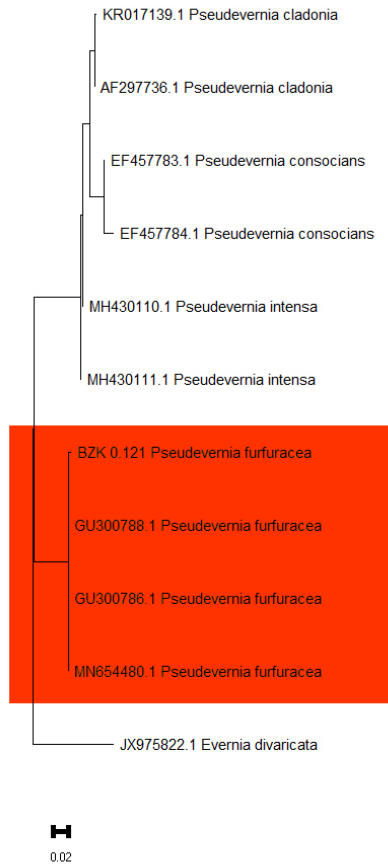
Class: Lecanoromycetes

Order: Lecanorales

Family: Parmeliaceae

Genus: *Pseudevernia* Zopf

Pseudevernia furfuracea (L.) Zopf



Şekil 4.5. *Pseudevernia furfuracea* NJ dendogramı.

***Pseudevernia furfuracea* Deskripsiyon:**

Tallus yapraksı, yassılaşıp, kayış şeklinde 20 mm genişliğine kadar, birkaç cm uzunluğunda. Loplar dikotomik olarak dallanmış. Üst yüzey açıkta kalan yerlerde grimsi kahverengi, mat, silindirik, basit veya dallanmış izidli. Alt yüzey genellikle kanallı, eski kısımlarda siyah, uçlara yakın beyaz, rizinsiz. Korteks paraplektenkimat; medulla beyaz, oldukça gevşek. Apotesyum çok nadir, lekanorin, 15 mm genişliğe kadar, az çok saplı, genellikle düzensiz formda ve bazen ayrık kenarlı, disk kahverengi. Epitesyum kahverengi; himenyum ve hipotesyum renksiz. Askus 8-sporlu, uzun-klavat, çok ince duvarlı, K/I+ mavi. Askosporlar tek hücreli, renksiz, elipsoid, 7-9.5 x 4.5-6 µm. Piknidyumlar nadir, siyah. Kimysal testler: korteks K+ sarı, C-, KC-, Pd-; medulla K-, C-, KC-, Pd-.

2.1.6. *Ramalina*

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

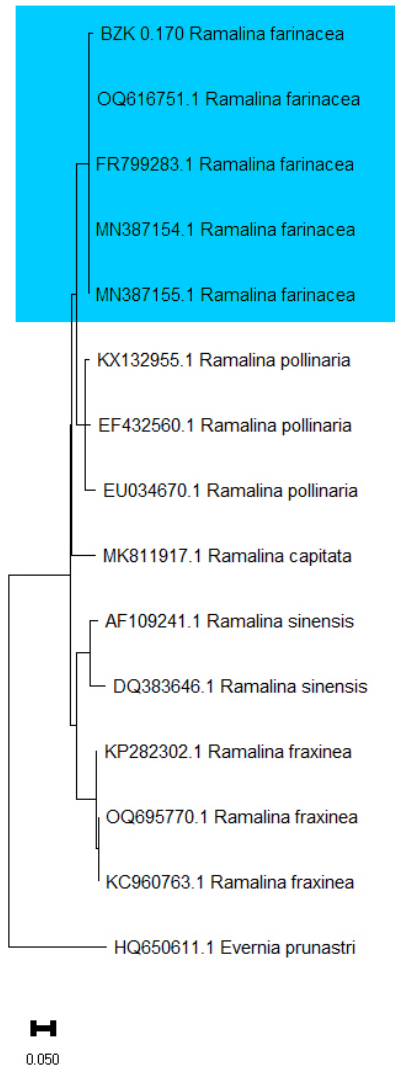
Class: Lecanoromycetes

Order: Lecanorales

Family: Ramalinaceae

Genus: *Ramalina* Ach.

Ramalina farinacea (L.) Ach.



Şekil 4.6. *Ramalina farinacea* NJ dendogramı.

***Ramalina farinacea* Deskripsiyon:**

Tallus dalsı, çalimsı, 12 cm uzunluğa kadar, dar bir tutunma noktasından düzensiz veya dikotomik olarak dallanmıştır. Dallar katı düzensiz kalınlıkta, 1-4 mm genişliğinde. Yüzey yeşilimsi gri ile yeşilimsi sarı, pürüzsüz, parlak. Soredler farinoz, laminal veya marjinal, yuvarlak. Apotesyum nadir çoğunlukla laminal, 6 mm çapına kadar. Disk ince pürinoz kaplı; kenar tallusla aynı renkte, tam. Askus uzun-klavat, 8-sporlu. Askosporlar renksiz, 1 septumlu, geniş fusiform, 12-14 x 4.5-6.5 µm. Kimyasal testler: korteks K-, C-, KC+ sarı, Pd-; medulla K+ sarı, C-, KC-, P+ sarımsı turuncu.



2.1.7. *Umbilicaria*

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

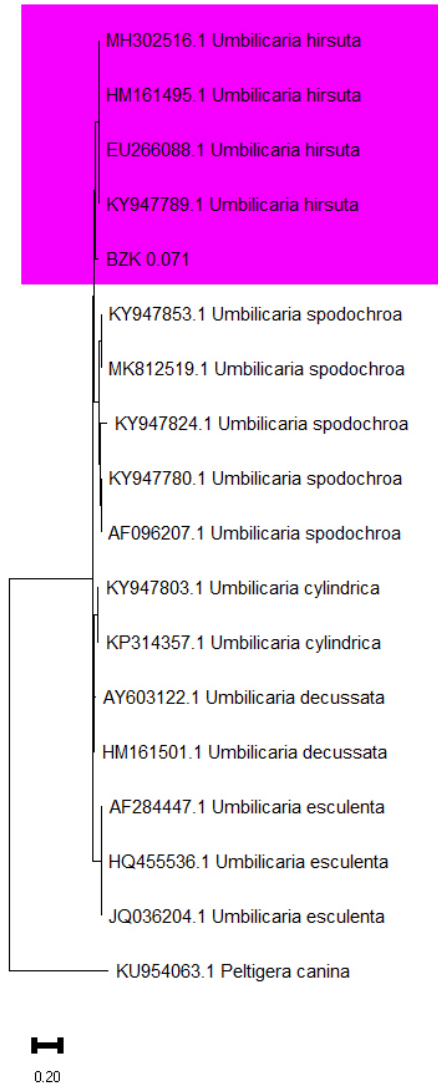
Class: Lecanoromycetes

Order: Umbilicariales

Family: Umbilicariaceae

Genus: *Umbilicaria* Hoffm.

Umbilicaria hirsuta (Sw. ex Westr.) Ach.



Şekil 4.7. *Umbilicaria hirsuta* NJ dendogramı.

***Umbilicaria hirsuta* Deskripsiyon:**

Tallus umbilikus, loblu, yumuşak, ince, sıklıkla yırtık kenarlı, çapı 2-6 cm. Üst yüzey açık gri ile açık yeşil. Medulla beyaz. Alt yüzey: beyaz veya pembe, genellikle merkezi daha koyu, ince, hafif dallanmış rizinlerle kaplı. Apotesyum yaygın değil, siyah, saplı, 2 mm çapına kadar. Askus klavat, 8-sporlu. Askosporlar renksiz, basit, elipsoid, 9-13 x 4-7 µm. Kimyasal testler: medulla K-, C+ kırmızı, KC+ kırmızı, P-.



2.1.8. *Usnea*

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

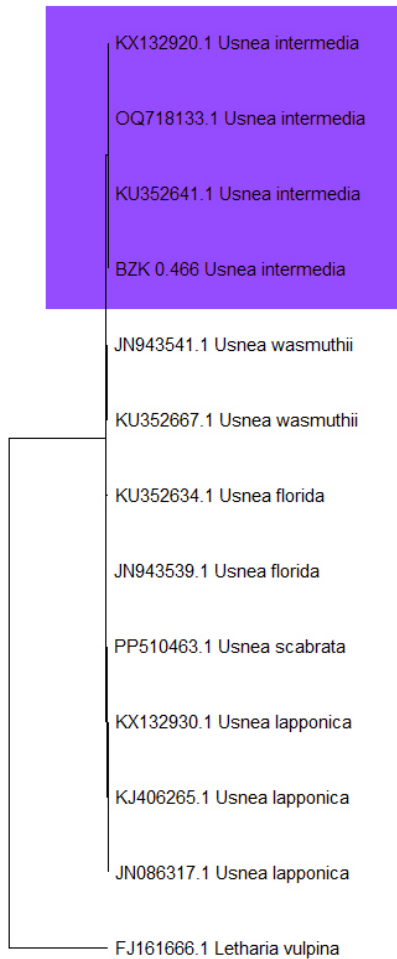
Class: Lecanoromycetes

Order: Lecanorales

Family: Parmeliaceae

Genus: *Usnea* Dill. ex Adans.

Usnea intermedia (A. Massal.) Jatta



Şekil 4.8. *Usnea intermedia* NJ dendrogramı.

***Usnea İntermedia* Deskripsiyon:** Tallus dalsı, yeşilimsi, çalımsı yapıda, 2–12 cm uzunlukta. Ana dallar düzensiz kalınlıkta, 1–1,5 mm kalınlıkta. Soralyum bulunmaz. Korteks boyuna kesitte mat veya çok zayıf parlaklıkta, ince-orta kalınlıkta. Medulla homojen, gevşek, oldukça kalın, beyaz. Apotesyum yaygın, zeorin, terminal veya lateral olarak bulunur, 3–9 mm genişliğinde, disk yeşilimsi. Askus 8–sporlu, lekanorin tip. Askosporlar tek hücreli, renksiz, geniş elipsoit, $6.5-8 \times 5-6 \mu\text{m}$. Kimyasal testler: korteks K–, C–, Pd–; medulla K + sarı, Pd+ sarı.



2.1.9. *Xanthoparmelia*

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

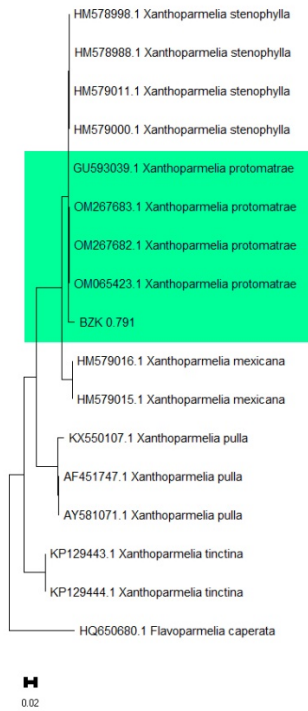
Class: Lecanoromycetes

Order: Lecanorales

Family: Parmeliaceae

Genus: *Xanthoparmelia* (Vain.) Hale

Xanthoparmelia protomatrae (Gyeln.) Hale



Şekil 4.9. *Xanthoparmelia protomatrae* NJ dendogramı.

***Xanthoparmelia Protomatrae* Deskripsiyon:** Tallus yapraksı, heteromerik, dorsiventral farklılaşma mevcut, gevşek bir şekilde substrata tutunur, geniş rozetler oluşturur. Loplar düz veya hafif dışbükey. Üst yüzey parlak, pürüzsüz, epürinoz, sarımsı yeşil renkte. Apotesyum bol, lekanorin tip, 5 mm genişliğinde, disk kahverengi renkte ve tallin kenar düz. Askus 8-sporlu, klavat, lekanorin tip. Askosporlar tek hücreli, renksiz, elipsoit, $7-9 \times 4-6 \mu\text{m}$. Kimyasal testler: üst korteks K-, C-, KC-; medulla: K-, C-, KC-, Pd+ turuncumsu kırmızı.

Sıralı DNA Sekansları

9 farklı cinse ait toplam 10 taksonun dizi analizleri sonucunda elde edilen sıralanmış sekansları aşağıda verilmiştir.

Tablo 4.1. Taksonların herbaryum numaraları ve sıralı sekansları

Herbaryum numarası	Sıralanmış ITS sekansı
BZK 0.215	GGGGGCGCTCTCTC-CCCTTGCCTACCTTACCACGTTGCTTTG GCGGGCCCGTCCCCCACC CGGACCGTCGGGG--CTTGCCCCCT GACCCGTGCCCCGTCAATGGCCCCCCCCATCAACCCTTGCCCCA GAGAAT-GTCTAAGTCCCAAGCAACCAAAATAAACAAAACCT TTCAACAATGGATCTCTTGGATCTGGCATCTATGAAGAACGC AACGAAATGCGATAAGTAATGCGAA-TTGCAGAA-TTCCGTG AGTCATCGAA-TCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTACC CCGGAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTTCAGCCTTCAAG CCCGGCTTGCGGTTGGGTCTC-GCCGTCTC--AGGGCGGCGGA CCCCAAAATAATGGCCGGG--TCCCGTGGGCGCTCGGATGC AACGAGCTC-TTGCGACGCTTCCGGGCGGTTCCGCGGGGCTC GGCCTCGACCCATTTTCTC-ACCAGGTTGACCTCGGATCAGG GAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGACGGAG GAAA

	Tablo 4.1 devam Taksonların herbaryum numaraları ve sıralı sekansları
BZK 0.066	CGAGAAAGGGGCCTTCGCGCTCCCGGGGGCTTCGGCCTCCA ACTCTTCACCCGCTGCCTATCTACCTTT-TTGCTTTGGCGGGC CGTGGGGTTCGCCTCCCGTTGGCCCTCGGGCCGGCGAGCGC CCGTCAGAGGCCCTTGAAATTCTGTTTGAAACCGTGATGTCC GAGCAAAACATG-AATTGTAAAACTTTCAACAACGGATCTC TTGGTTCCAGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA ACGCACATTGCGCCCCCTCGGCATTCCGGGGGGGCATGCCTGTT CGAGCGTCATTACACCCCTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCC TTCGCCCCCGGGCGTGCCCGAAAAGCAGTGGCGGTCCGGT GTGACTTTGAGCGTAGTAAAATC-CACCCCGCTTTGAAAGTT CGCCCCGCGGCCGGCCAGA-AACTCCAAATTTATTTTCATAAT TGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCAT AT
BZK 0.475	GGGTANGAAAGGGCGT-CAGCCTCGGGGGGTTTCGGCCCCC AACTCTTTACCCTGTGGCTACACGGTCCGTGTTGCTTTGGCG GTT--AAATCGCCGCCAGAAA-CCCTCCAAAACCTCTGATA-TC ATGTGTGGTCCGAGTCATATTCAAT--AACTAAAA-CTTTCAA CAACGGATCTCTTGTTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGAGG GGCATACTGTTCGAGCGTCATTACACCCCTCAAGCGT-----G GCTTGGTGTGTTGGGCT-CGCGTCCCCC-CGGGATGGGCCTGAA GAGCAGTGGCGGTCCGACGTAGACTTCAAGCGCAGTAAA-T AC---GTTTCGCTTGGAAGGCTCGCTGGGCTCTCGCCAGACAAA CC-----CATCATTCATCCGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA TACCCGCTGAACTTAA

	Tablo 4.1 devam Taksonların herbaryum numaraları ve sıralı sekansları
BZK 0.017	GGGNTACGANAAGGGCTTCGGCGCTCCCGGGGGCTCCGGCC CTCAACTCTTCACCCGTTGACGATATACCTTTGTTGCTTTGGC GGACCTCGGGGTGTCTCCCGCGCAGGCTT---CCGGGTCGGCG -----AGCGTCCGTCAGAGGCCCATCAAAATCCGTTTAAT CGTGTCGTCCGAGATTAAAAAACA-TAGTAAAAACTTTCAA CAA-CGGATCTCTTGGTTCCAGCATCGATGAAGAACGCAGCG AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGG GGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACACCCTTCAAGCGCGGCT TGGTATTGGGCCCTCGCCCCCGTGGCGTGCCCGAAAAGCAG GGGCGGTCCGGTGCAACTTTAAGCGTAGTAAATTCGATCCC GCTTTGAAAGTTCGCTCCGCGCCCGGCCAGACAACCCCAT-C ATTCGTTAATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA ACTTAAGCATATCAATAA
BZK 0.677	GGGGAANAAAAAGGGCTTCG-CGCTCCCGGGGGCTCCGGCC CTCAACTCTTCACCCGTTGACGATATACCTTTGTTGCTTTGGC GGACCTCGGGGTGTCTCCCGCGCAGGCTT---CCGGGTCGGCG -----AGCGTCCGTCAGAGGCCCATCAAAATCCGTTTAAT CGTGTCGTCCGAGCTTAAAAAACA-TAGTAAAAACTTTCAA CAA-CGGATCTCTTGGTTCCAGCATCGATGAAGAACGCAGCG AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGG GGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACACCCTTCAAGCGCGGCT TGGTATTGGGCCCTCGCCCCCGTGGCGTGCCCGAAAAGCAG TGGCGGTCCGGTGCGACTTTAAGCGTAGTAAATTCGATCCCG CTTTGAAAGTTCGCTCCGCGCCCGGCCAGACAACCCCAT-CA TTTCGTTAATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAA CTTAAGCATATCA-TAA

	Tablo 4.1 devam Taksonların herbaryum numaraları ve sıralı sekansları
BZK 0.121	GGNNGGGGCTCGCGCTCCCGGGGGTTTCGGCCCCCAACTCTTC ACCCACTGTGTATCTACCTTTGTTGCTTTGGCGGGCCTCG----- -----CCTTCCCGGCTTCCGGGGCCGGCGGGCGCCCGTCGGAGGC CCA-TTAAATTCCGTAAATCAGTGACGTCCGAGCAAACACTAC ACAATTAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCAG CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG CGCCCCTCGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT TACACCCCTCAAGCGTAGCTTGGTACTGGGTCCCTCGTCCCCG CGACGTGCCCCGAAAAGCAGTGGCGGTCCCGTGGGACTTTAA GCGTAGTAAATCTT-ATCCCGCTTTGAAAGTTCGCCCCGGCGA CCGGCCAGATAACCCCATTTATTCAATGATTGACCTCGGATC AGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
BZK 0.170	TAAAAAGGGGCTTCGGCGCCCAGGGGACTCCGGTCCCCGCC TCTACACCCTGTGATTACCTTACCTTTTGTTGCCTTGGCGGG GA-----GTCCCC-----C-----GCCAGCAGCCCACCG AAACCCGTTTCATCCATGCCTGTCTGAGTCTAATTC-ATAATG AATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTTCTGGCATCGA TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCC TCGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTGCACC ATTCAAGCGTAGCTTGGTATTGGGTCCCTTCGCCGGGGGTCA TCCC-CGGCGTGCCCCGAAAAGCATTGGCGGTCCGGCGTGACT TTAAGCGTAGTAAATTTT-CTCCCGCTTTGAAAGCCTCGCGCC GTGGCCGGCCAGACAACCCCATAT-T-TCTCACGATTGACCT CGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT AAGCCGGAGGAA

	Tablo 4.1 devam Taksonların herbaryum numaraları ve sıralı sekansları
BZK 0.071	GGGCCCCGAACCTCCAACCCTTTGTCTACCATACCTTTGTTGC TTTGGCGGGCCCCGCTGGGGC-AACCCGCCGCCGGCGTTGAGC CGGTGAGCGCCC-----GCCGGAGGCCCTGAAAACCTCC-GTCT-G T-CAGTGTCGTCTGAGTACCATATAAGCGTT--AAAA--CTTTC AACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCGGTATTCC-G GGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCT-----CTCAA GCTCTGCTTGGTATTGGGCCCCCGTCCCGTG-----GGGGACGG GCCTGAAAGTGAGTGGCGGTGCGGCCGGGC-TCCAAGCGCA GTAACCTAAAAACCCGCTTCAGGAGCCTC-CAGGCTGGGCCG GCCAGACAACCCA-ACTGTATTTTCCACGGTTGACCTCGGAT CAGGTAGGAATACCCG-CTGAACTTAAGCATATC
BZK 0.466	GGGCTTCGGCGCTCCCGGGGGTTTCGGCCTCCACCTCTTCAC CCATTGCGTACCTACCTTTGTTGCTTTGGCGGGCCATGGGGT TCGCCCCACGCCGGCCTCGGCGCTGGTGAGCGCCCGTCAGA GGCCCTCAAAATTCTGTTTA---TAGTGACGTCCGAGTTAAAA CACAAATAGTTAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCC AGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT TGCGCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC ATTGCACCCCTCAAGCACAGCTTGGTATTGGGTCTCGCCTCC C-GGGCGTGCCCGAAAAGCAGTGGCGGTCCGGAGCGACTTT AAGCGTAGTAAATTTTCATCCCGCTTTGAAAGGTCGTCTCGG GGCTGGCCAGAAA---CCCAAATTTTTCATAATTGACCTCGG ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA

	Tablo 4.1 devam Taksonların herbaryum numaraları ve sıralı sekansları
BZK 0.791	AGAAAGGGCTTCGGTGCTCCCGGGGGTTTCGGCCCC--TAAC TCTTCACCCTTTGCGTACCTACCTTTGTTGCTTTGGCGGGCCC ---GAGAGTCCTCTCGCGCCGACTCTTCGG--CCGGCGAGTGTC CGTCAGAGACCCATTTAA-TTCTATTCA-TTAGAGACGTCGGA GTTCCAACA--CAATAAGTAAAACTTTCAACAACGGATCTC TTGGTTCCAGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA ACGCACATTGCGCCCCCTCGGCATTCCGGGGGGGCATGCCTGTT CGAGCGTCATTGCACCCCTCAAGCGCAGCTTGGTATTGGGCC CTCGCCCCCGCGGGCGTGCCCGAAAAACAGTGGCGGTCCGGT GTGACTTTAAGCGTAGTAATGTCTTCCCGCTCT-AGAGTACTC GCCGTGGCCGGCCAAAGAACCCCATTCATTTTTATAATTGAC CTC

Tablo 4.2. Genbankasından alınan taksonlar, numaraları ve orijinleri

Genbank numarası	Takson	Orijin
MH027416	<i>Dermatocarpon miniatum</i> var. <i>miniatum</i>	Bulgaristan
OQ845878	<i>Dermatocarpon miniatum</i> var. <i>miniatum</i>	Pakistan
MN103131	<i>Dermatocarpon miniatum</i> var. <i>miniatum</i>	Çin
AF333162	<i>Dermatocarpon miniatum</i> var. <i>miniatum</i>	Hindistan
AF333160	<i>Dermatocarpon miniatum</i> var. <i>miniatum</i>	Japonya
AF333151	<i>Dermatocarpon miniatum</i> var. <i>complicatum</i>	İzlanda
AF333152	<i>Dermatocarpon miniatum</i> var. <i>complicatum</i>	İzlanda
AF333155	<i>Dermatocarpon leptophyllum</i>	İsveç
AF333156	<i>Dermatocarpon leptophyllum</i>	İsveç
EF014203	<i>Dermatocarpon luridum</i> var. <i>xerophilum</i>	ABD
EF014202	<i>Dermatocarpon luridum</i> var. <i>xerophilum</i>	ABD
JX645040	<i>Dermatocarpon luridum</i> var. <i>decipiens</i>	Kanada
JX645041	<i>Dermatocarpon luridum</i> var. <i>decipiens</i>	Kanada
EF014134	<i>Dermatocarpon dolomiticum</i>	ABD
EF014135	<i>Dermatocarpon dolomiticum</i>	ABD
EF014191	<i>Dermatocarpon arenosaxi</i>	ABD
EF014189	<i>Dermatocarpon arenosaxi</i>	ABD
JX645038	<i>Dermatocarpon arnoldianum</i>	Avusturya
MH031273	<i>Dermatocarpon arnoldianum</i>	Bulgaristan
EF014184	<i>Dermatocarpon multifolium</i>	ABD
EF014185	<i>Dermatocarpon multifolium</i>	ABD

Tablo 4.2 (devam) Genbankasından alınan taksonlar, numaraları ve orijinleri

AF333142	<i>Dermatocarpon miniatum</i> var. <i>cirsodes</i>	İzlanda
AF333143	<i>Dermatocarpon miniatum</i> var. <i>cirsodes</i>	İsveç
AF333140	<i>Dermatocarpon taminium</i>	ABD
AF333139	<i>Dermatocarpon taminium</i>	ABD
OL457940	<i>Dermatocarpon meiophyllizum</i>	Çekya
OQ504157	<i>Dermatocarpon meiophyllizum</i>	Belçika
KX538749	<i>Endocarpon deserticola</i>	Çin
KX538750	<i>Endocarpon deserticola</i>	Çin
JX978201	<i>Dolichousnea longissima</i>	İsveç
LC657571	<i>Dolichousnea longissima</i>	Japonya
AB051645	<i>Dolichousnea longissima</i>	Japonya
JX978214	<i>Dolichousnea longissima</i>	İsveç
OQ843293	<i>Dolichousnea longissima</i>	Kanada
OQ843197	<i>Dolichousnea longissima</i>	Kanada
FJ494954	<i>Dolichousnea trichodeoides</i>	Tayvan
AB051672	<i>Dolichousnea trichodeoides</i>	Japonya
LC775255	<i>Dolichousnea diffracta</i>	Japonya
AJ748107	<i>Dolichousnea diffracta</i>	Japonya
KJ396444	<i>Bryoria fuscescens</i>	Kanada
KJ396445	<i>Bryoria fuscescens</i>	Kanada
MF151253	<i>Lobaria spathulata</i>	Rusya
MF151254	<i>Lobaria spathulata</i>	Rusya
MF151248	<i>Lobaria gyrophorica</i>	Tayvan
MF151249	<i>Lobaria gyrophorica</i>	Tayvan

Tablo 4.2 (devam) Genbankasından alınan taksonlar, numaraları ve orijinleri		
MF151245	<i>Lobaria pindarensis</i>	Nepal
MF151246	<i>Lobaria pindarensis</i>	Nepal
MF151237	<i>Lobaria chinensis</i>	Tayvan
MF151238	<i>Lobaria chinensis</i>	Tayvan
MF151224	<i>Lobaria orientalis</i>	Rusya
MF151225	<i>Lobaria orientalis</i>	Rusya
DQ419931	<i>Lobaria pseudopulmonaria</i>	Çin
DQ419933	<i>Lobaria pseudopulmonaria</i>	Butan
PP315673	<i>Sticta fuliginosa</i>	Kanada
MK812447	<i>Lobaria pulmonaria</i>	Norveç
GU072752	<i>Lobaria pulmonaria</i>	İspanya
KY471547	<i>Lobaria pulmonaria</i>	Kanada
FJ649594	<i>Lobaria macaronesica</i>	Makronezya
JF733725	<i>Lobaria macaronesica</i>	İspanya
FJ649580	<i>Lobaria immixta</i>	Makronezya
FJ649581	<i>Lobaria immixta</i>	Makronezya
JX466317	<i>Parmelina tiliacea</i>	İtalya
KP659554	<i>Parmelina tiliacea</i>	İran
JX466466	<i>Parmelina tiliacea</i>	İsveç
JX466461	<i>Parmelina pastillifera</i>	Norveç
JX466462	<i>Parmelina pastillifera</i>	Norveç
JX466474	<i>Parmelina atricha</i>	İspanya
JX466475	<i>Parmelina atricha</i>	Fransa
KX457684	<i>Parmelina carporrhizans</i>	Ermenistan

Tablo 4.2 (devam) Genbankasından alınan taksonlar, numaraları ve orijinleri		
KM357893	<i>Parmelina carporrhizans</i>	İspanya
JX466478	<i>Parmelina quercina</i>	İspanya
DQ273847	<i>Parmelina quercina</i>	İspanya
DQ273848	<i>Parmelina quercina</i>	İspanya
AY295103	<i>Parmelia barrenoae</i>	İspanya
KR017139	<i>Pseudevernia cladonia</i>	ABD
AF297736	<i>Pseudevernia cladonia</i>	ABD
EF457783	<i>Pseudevernia consocians</i>	Kanada
EF457784	<i>Pseudevernia consocians</i>	Kanada
MH430110	<i>Pseudevernia intensa</i>	ABD
MH430111	<i>Pseudevernia intensa</i>	ABD
GU300786	<i>Pseudevernia furfuracea</i>	Fas
GU300788	<i>Pseudevernia furfuracea</i>	Slovakya
MN654480	<i>Pseudevernia furfuracea</i>	İsviçre
JX975822	<i>Evernia divaricata</i>	ABD
OQ616751	<i>Ramalina farinacea</i>	İngiltere
FR799283	<i>Ramalina farinacea</i>	İngiltere
MN387154	<i>Ramalina farinacea</i>	Polonya
MN387155	<i>Ramalina farinacea</i>	Polonya
KX132955	<i>Ramalina pollinaria</i>	İsviçre
EF432560	<i>Ramalina pollinaria</i>	Avusturya
EU034670	<i>Ramalina pollinaria</i>	Macaristan
MK811917	<i>Ramalina capitata</i>	Norveç
AF109241	<i>Ramalina sinensis</i>	Kanada

Tablo 4.2 (devam) Genbankasından alınan taksonlar, numaraları ve orijinleri		
DQ383646	Ramalina sinensis	Çin
KP282302	Ramalina fraxinea	İspanya
OQ695770	Ramalina fraxinea	Yunanistan
KC960763	Ramalina fraxinea	Türkiye
HQ650611	Evernia prunastri	ABD
MH302516	Umbilicaria hirsuta	ABD
HM161495	Umbilicaria hirsuta	Arjantin
EU266088	Umbilicaria hirsuta	Macaristan
KY947789	Umbilicaria hirsuta	Rusya
KY947853	Umbilicaria spodochoa	Fransa
MK812519	Umbilicaria spodochoa	Norveç
KY947824	Umbilicaria spodochoa	İspanya
KY947780	Umbilicaria spodochoa	Norveç
AF096207	Umbilicaria spodochoa	ABD
KY947803	Umbilicaria cylindrica	Rusya
KP314357	Umbilicaria cylindrica	Norveç
AY603122	Umbilicaria decussata	Antarktika
HM161501	Umbilicaria decussata	Arjantin
AF284447	Umbilicaria esculenta	Çin
HQ455536	Umbilicaria esculenta	Çin
JQ036204	Umbilicaria esculenta	Çin
KU954063	Peltigera canina	İzlanda
KX132920	Usnea intermedia	İsviçre
OQ718133	Usnea intermedia	Çekya

Tablo 4.2 (devam) Genbankasından alınan taksonlar, numaraları ve orijinleri		
KU352641	<i>Usnea intermedia</i>	İsviçre
JN943541	<i>Usnea wasmuthii</i>	Çin
KU352667	<i>Usnea wasmuthii</i>	İspanya
KU352634	<i>Usnea florida</i>	İspanya
JN943539	<i>Usnea florida</i>	İngiltere
PP510463	<i>Usnea scabrata</i>	Kanada
KX132930	<i>Usnea lapponica</i>	İsviçre
KJ406265	<i>Usnea lapponica</i>	İsveç
JN086317	<i>Usnea lapponica</i>	Estonya
FJ161666	<i>Letharia vulpina</i>	ABD
HM578998	<i>Xanthoparmelia stenophylla</i>	ABD
HM578988	<i>Xanthoparmelia stenophylla</i>	ABD
HM579011	<i>Xanthoparmelia stenophylla</i>	ABD
HM579000	<i>Xanthoparmelia stenophylla</i>	ABD
GU593039	<i>Xanthoparmelia protomatrae</i>	Çin
OM267683	<i>Xanthoparmelia protomatrae</i>	Çin
OM267682	<i>Xanthoparmelia protomatrae</i>	Çin
OM065423	<i>Xanthoparmelia protomatrae</i>	Çin
HM579015	<i>Xanthoparmelia mexicana</i>	ABD
HM579016	<i>Xanthoparmelia mexicana</i>	ABD
KX550107	<i>Xanthoparmelia pulla</i>	Türkiye
AF451747	<i>Xanthoparmelia pulla</i>	Avusturya
AY581071	<i>Xanthoparmelia pulla</i>	İspanya
KP129443	<i>Xanthoparmelia tinctina</i>	İtalya

Tablo 4.2 (devam) Genbankasından alınan taksonlar, numaraları ve orijinleri		
KP129444	<i>Xanthoparmelia tinctina</i>	İtalya
HQ650680	<i>Flavoparmelia caperata</i>	ABD

5.TARTIşMA

Likenlerle yapılan DNA dizi analizleri, son yıllarda çok önemli verilerin elde edilmesine olanak sağlamıştır. ITS 1 ve ITS 2 olarak bilinen kısımlar, bu tür çalışmalarda kullanılması açısından son derece uyumlu bulunmuştur. ITS bölgeleri, ribozomal DNA'nın (rDNA) kodlanan bölümlerine kıyasla daha fazla mutasyona açık oldukları için, tür düzeyinde, tür içi ve türler arası genetik farklılıkların belirlenmesinde etkili olabilmektedirler (Smith et al., 2018). Bu sayede, liken türlerinin genetik çeşitliliği ve evrimi hakkında daha ayrıntılı bilgi sağlanmaktadır.

Geleneksel sistematik yaklaşımlar morfolojik ve anatomik karakterlere dayanırken, moleküler çalışmaların önemi günümüzde daha net bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Geçmişte yapılan liken çalışmalarında, sistematik sınıflandırmalarda çoğunlukla morfolojik ve kimyasal özellikler temel alınmaktaydı. Ancak bu karakterler, likenlerin kesin sistematik kategorilerinin belirlenmesi için yeterli olmamaktadır. Örneğin, aynı liken türü farklı habitat koşullarında veya iklimsel değişimlere bağlı olarak morfolojik ve kimyasal yapılarında değişiklikler gösterebilir. Bu adaptif değişiklikler, morfolojik yapılarında belirgin olsa da genetik yapılarında çok az değişiklik meydana gelir. Genetik yapı, çevresel koşullara göre çok daha stabildir ve bu nedenle elde edilen genetik veriler daha güvenilir sonuçlar sunar. Bu durum, morfolojik ve anatomik çalışmaların moleküler yöntemlerle desteklenmesinin önemini vurgulamaktadır (Jones & White, 2020).

rRNA dizileri, tüm canlı hücrelerde bulunan ve benzer görevler üstlenen genetik materyallerden biri olarak, taksonomik ve filogenetik çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu diziler, evrimsel süreçte korunmuş ve değişim gösteren bölgeleri içerir. Bu özellikleri sayesinde, farklı taksonomik gruplara ait organizmaların karşılaştırılmasında önemli bir rol oynarlar. Genetik çalışmaların temel araçlarından biri olan PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) teknolojisi, sağladığı avantajlar nedeniyle dünya genelinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu araştırmada da DNA dizi analizi, PCR yardımıyla gerçekleştirilmiş ve moleküler biyoteknolojinin önemli bir parçası olarak kullanılmıştır (Watson & Clark, 2019).

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı yerlerinden toplanan ve Yozgat Bozok Üniversitesi liken herbaryumunda saklanan bazı likenler kullanılmıştır. Bu incelemeler morfolojik ve anatomik incelemelere ek olarak, moleküler yöntemlerle de desteklenmiştir. Moleküler

alışmalar kapsamında, ITS bölgeleri PCR yöntemiyle oğaltılmış ve gen bölgelerinin dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizler, likenlerin genetik çeşitliliğini ve evrimsel ilişkilerini daha ayrıntılı bir şekilde ortaya koymayı amaçlamaktadır.

Dermatocarpon miniatum var. *miniatum* taksonunda, ITS bölgesinin toplam uzunluğu yaklaşık 551 baz çifti (bp) olarak belirlenmiştir. Ayrıca, *Dermatocarpon miniatum* var. *miniatum*'un ITS bölgesinin DNA dizisinden 537 nükleotid sıralanabilmiştir.

Dolichousnea longissima taksonunda ITS bölgesi yaklaşık 544 baz çifti uzunluğundadır. Bu taksonun ITS bölgesinden elde edilen sıralanabilir DNA dizisi ise 540 nükleotid uzunluğundadır.

Lobaria pulmonaria taksonu için ITS bölgesinin toplam uzunluğu yaklaşık 544 baz çifti olarak gözlemlenmiştir. ITS bölgesinden sıralanabilen nükleotid sayısı ise 540 olarak belirlenmiştir.

Parmelina tiliacea taksonunda ITS bölgesinin toplam uzunluğu yaklaşık 568 baz çifti olarak tespit edilmiştir. ITS bölgesinden sıralanabilen DNA dizisi ise 547 nükleotid uzunluğundadır.

Pseudevernia furfuracea taksonunda ITS bölgesinin toplam uzunluğu yaklaşık 540 baz çifti olarak tespit edilmiştir. Bu türün ITS bölgesinden elde edilen sıralanabilir DNA dizisi 528 nükleotid uzunluğundadır.

Ramalina farinacea taksonunda ITS bölgesinin toplam uzunluğu yaklaşık 575 baz çifti olarak gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu türün ITS bölgesinden sıralanabilen DNA dizisi 535 nükleotid uzunluğundadır.

Umbilicaria hirsuta taksonunda ITS bölgesinin toplam uzunluğu yaklaşık 546 baz çifti olarak kaydedilmiştir. ITS bölgesinden sıralanabilen DNA dizisi ise 514 nükleotid olarak belirlenmiştir.

Usnea intermedia taksonunda ITS bölgesinin toplam uzunluğu yaklaşık 531 baz çifti olarak gözlemlenmiştir. Bu türde sıralanabilen DNA dizisi 524 nükleotid uzunluğundadır.

Xanthoparmelia protomatrae taksonunda ITS bölgesinin toplam uzunluğu yaklaşık 510 baz çifti olarak tespit edilmiştir. ITS bölgesinden sıralanabilen DNA dizisi ise 498 nükleotid uzunluğundadır.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

10 farklı liken türüne ait ITS verilerinin filogenetik analizi, MEGA X yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu analizde, Neighbour-Joining (NJ) filogenetik yöntemi ile dendrogramlar elde edilmiştir. Elde edilen dendrogramlar, sonuçların yorumlandığı Bulgular bölümünde ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Neighbour-Joining yöntemine dayalı dendrogramlar incelendiğinde, çalışılan liken türlerinin birbirlerine yakınlık göstererek bir grup oluşturduğu görülmüştür. Gen Bankası'ndan dış grup olarak alınan türler ise, çalışılan türlerden ayrılarak farklı bir grup oluşturmuştur. Bu gruplar içindeki türler, genetik benzerliklerine göre yan dallanmalar göstermiştir. Dendrogramlarda gözlenen bu dallanmalar, farklı yüzdelerde çeşitlenmeler ile ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla, türler arasındaki filogenetik ilişkiler bu yöntemle daha net bir şekilde ortaya konmuştur.

Bu çalışmada kullanılan DNA dizi analizi yöntemi, günümüz biyoteknolojisinde önemli bir yere sahiptir ve elde edilen dizi analizleri, NJ filogenetik yöntemi ile türler arasındaki genetik benzerlikleri ve akrabalık derecelerini belirlemiştir. Morfolojik olarak incelenen ve anatomik yapıları incelenen örnekler, moleküler verilerle desteklenmiş ve böylece daha kesin sonuçlar elde edilmiştir.

Türkiye’de liken biyoçeşitliliği ile ilgili yapılan çalışmalarda bugüne kadar büyük ölçüde morfolojik karakterlere dayalı değerlendirmeler yapılmıştır. Ancak, bu tür floristik çalışmaların moleküler yöntemlerle desteklenmesi, Türkiye'deki liken biyoçeşitliliğinin daha doğru ve kapsamlı bir şekilde ortaya konulabilmesi için büyük önem taşımaktadır. Ülkemiz, likenlerin gösterdiği tür zenginliği ve biyoçeşitlilik açısından önemli bir kaynaktır ve bu çalışmanın daha geniş çapta lokalite ve türlerle devam ettirilmesi, türler arasındaki ITS çeşitliliğinin ve evrimsel farklılaşmaların daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir.

Yapılacak benzer çalışmalar ile, ülkemizdeki zengin genetik potansiyel gün yüzüne çıkacak ve bu genetik kaynakların korunmasına yardımcı olacaktır. Likenlerin moleküler düzeyde incelenmesi, ekosistemlerin genetik çeşitliliğini anlamak açısından önemli olduğu gibi, aynı zamanda bu değerli biyolojik kaynakların sürdürülebilir şekilde korunması için de yol gösterici olabilir.

Bu tür çalışmaların devam ettirilmesi, hem Türkiye’deki liken çeşitliliği hakkında daha kapsamlı bilgi sağlar hem de likenlerin ekolojik ve biyolojik işlevlerinin daha iyi anlaşılmasına olanak tanır.



7.KAYNAKLAR

- Acharius, E. 1803. *Methodus Lichenum*. C. F. Marquard, Stockholm,
- Brodo IM, Sharnoff SD (2001). *Lichens of North America*. New Haven, Connecticut: Yale University Press.
- Brown, T.A., vd. (2023). *Molecular Biology of the Gene*. Pearson.
- Crespo, A., Divakar, P. K., & Blanco, O. (2007). Lichen phylogenetics. *In Lichen biology* (s. 151-170). Cambridge University Press.
- Ellis, R. L. (1991). The role of lichens in primary succession. *In Lichen biology* (s. 101-114). Cambridge University Press.
- Felsenstein, J. (1981). Statistical Methods for Estimating Evolutionary Trees. *Journal of the Royal Statistical Society*.
- Güvenç, A. (2001). *Erciyes Dağı Likenleri Üzerine Bir Araştırma*. Erciyes Üniversitesi Yayınları.
- Halıcı, M., Aras, S., & Yüceer, S. (2005). Erciyes Dağı'nda Bulunan Likenler Üzerine Bir Çalışma. *Turkish Journal of Botany*, 29(2), 85-95.
- Hawksworth, D. L. (1996). The lichen symbiosis. *In The lichenologist* (s. 23-40). Academic Press.
- Hawksworth, D. L., & Hill, D. J. (2021). *The Fungal Kingdom: The Mycota*. Springer International Publishing.
- Hawksworth, D. L., & Hill, D. R. (1984). *The lichen symbiosis*. Academic Press.
- Kress, W.J., vd. (2002). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Academic Press.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). Mega X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Linnaeus, C. (1753). *Species Plantarum*. Stockholm.
- Lumbsch, H. T., & Leavitt, S. D. (2011). *Lichen-forming Fungi and Their Photobionts. The Mycota*.

- Lücking, R., Forbus, E., & Lücking, M. (2017). Fungal diversity and taxonomy. In *Fungal Diversity* (s. 137-164). Springer.
- Lücking, R., Hill, D., & Lücking, M. (2020). Fungal diversity and taxonomy. In *The lichenological society* (s. 45-60). Springer.
- Maxam, A.M., & Gilbert, W. (1977). A New Method for Sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Miller, J. L. (2001). The classification of lichens. In *Lichen systematics* (s. 13-28). Elsevier.
- Miller, J. L. (2001). The classification of lichens. In *The lichens* (s. 1-12). Elsevier.
- Myllys, L., Ruotsalainen, T., & Korpela, J. (2001). Molecular phylogenetics of lichens. In *Molecular Phylogenetics and Evolution* (s. 173-182). Academic Press.
- Nash, T. H. (2008). *Lichen Biology*. Cambridge University Press.
- Pell, J. (1999). The parasitic behavior of lichens. In *Symbiosis and Parasitism* (s. 122-140). Springer.
- Rokas, A., & Carroll, S.B. (2006). *Rethinking the Phylogenetic Relationships of the Animal Kingdom*. Current Biology.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The Neighbor-Joining Method: *A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees*. Molecular Biology and Evolution.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5463-5467
- Schuster, S.C. (2005). *Next-generation DNA Sequencing*. Nature.
- Schwendener, S. (1869). *Über die Lichen*. Verlag von Wilhelm Engelmann.
- Smith, T.F., & Wilke, C.M. (2022). *Evolutionary Genomics*. Academic Press.
- Steiner, J. (1905). Lichenologische Untersuchungen auf dem Erciyes. *Botanische Jahrbücher*, 34, 142-163.
- Yang, Z. (1996). Among-site Rate Variation and its Impact on Phylogenetic Analysis. *Trends in Ecology and Evolution*. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10041-0](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10041-0)

Dilara YÜCELER

Yüksek Lisans Tezi

YOZGAT 2024



**T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**