



**T.C.  
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU**

**Liken Kültüründe Simbiyotik Yaşamın Karakterize  
Edilmesi**

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Yrd. Doç. Dr. Dilek ÖZAKÇA**

**ARAŞTIRMACILAR: Yrd. Doç. Dr. Aslıhan ÖRS**

**BAŞLAMA TARİHİ: 1 Mayıs 2011**

**BİTİŞ TARİHİ 1 Mayıs 2013**

**BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ  
BİLECİK, 2013**

## **Liken Kùltüründe Simbiyotik Yaşamın Karakterize Edilmesi**

ÖZET; Doğada bulunan simbiyotik yaşam formunun amacı, simbiyotik ilişkide yer alan her iki organizmaya da hayatta kalma konusunda avantaj sağlamasıdır. Bunu göz önünde bulundurarak projenin ilk kısmında, isole edilmiş ve birlikte yaşayan mantar ve algin büyüme hızları karşılaştırılacaktır. Bu anlamda laboratuvar koşullarında sağlanan ve doğadaki optimum koşullara benzer kùltürlerde yetişen simbiyotik ve aposimbiyotik likenin büyümeleri takip edilecektir. Önemli bir diğer konu da likenlerin doğada hava kirliliği için stres teşkil edecek koşullara maruz kalabilmeleridir. Bu durum göz önünde bulundurularak, projenin ikinci aşamasında osmotik stres, ısı şoku ve ağır metal gibi doğadaki stresli koşullara benzer koşullar laboratuvar ortamında hazırlanarak, kùltürlerdeki simbiyotik ve aposimbiyotik likenlerin büyüme hızlarının gözlemlenmesi planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler; Liken, simbiyoz, kùltür, stres

## **Characterization of Symbiotic Life in Lichen Cultures**

**Abstract;** Symbiotic relationships are built in the nature so that it is beneficial for the survival of both of the organisms involved in this state. Hence, as a first part we plan to compare the growth rate of the isolated and symbiotic fungus and algae. To this end, we will prepare different cultures and follow their growth in laboratory conditions, which mimic the optimum natural conditions for the organisms. It is also noteworthy that lichens populate in different environments, where they may be exposed to stress conditions such as air pollution. At the second part of the project, we plan to mimic stress conditions in the environment by applying osmotic stress, heat shock and heavy metals to the isolated and symbiotic fungus and algae.

**Keyword;** Lichen, simbiotic, culture, stress

## TEŞEKKÜR

Bu projenin tamamlanmasında desteğini benden eksik etmeyen Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümündeki hocalarıma, ve arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bu proje boyunca beni destekleyen çalışma arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Hülya SİLAH'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	2
ABSTRACT.....	3
TEŞEKKÜR.....	4
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	6
ÇİZELGE DİZİNİ.....	7
1. GİRİŞ.....	8
2. AMAÇ VE KAPSAM.....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	9
3.1. Materyal.....	9
3.2. Kültür Ortamında Yetiştirilmesi.....	9
3.3. DNA izolasyonu.....	10
3.4. PZR.....	10
3.5. RNA izolasyonu ve cDNA eldesi.....	10
3.6. cDNA-RAPD-PZR.....	12
3.7. Parafin Bloğa Gömme ve Kesit Alma.....	12
3.8. İmmunohistokimyasal Boyama.....	13
4. ANALİZ VE BULGULAR.....	13
5. SONUÇ.....	15
6. KAYNAKLAR.....	15
7. EKLER.....	16

## ŞEKİL DİZİNİ

### Sayfa

Simbiyotik tallus, mikobiyont kültürü ve izole edilen alg'in lektin geni PCR ürünü jel görüntüsü.....	13
İmmünohistokimyasal lektin boyama.....	14
cDNA-RAPD-PCR (OPC03 primeri) jel görüntüsü.....	15

## ÇİZELGE DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
PZR koşulları.....	10
cDNA-RAPD-PZR koşulları.....	12

## 1. GİRİŞ

Likenler bir mantar (mikobiyont) ve en az bir algin (fikobiyont) bir araya gelmesi ile oluşan simbiyotik birliklerdir. Mikobiyont üyelerinin 16,750 tanesi *Ascomycetes*, 200 tanesi *Deuteromycetes* ve 50 tanesi *Basidiomycetes* gruplarındandır. Birçok fitobiont *Chloorococales* (%83; *Trebouxia sp.*, *Myrmecia sp.*, *Pleurococcus sp* ve *Coccomyxa sp*), ile diğer *Ulotrichales* (%9) ve *Cyanobacteria* (%8; *Nostoc sp.*, *Gloeocapsa sp.*, *Scytonema sp.* ve *Calothrix sp.*) gruplarına aittir (Nash 1996).

Morfolojik yapılarına göre likenler yapraksı, dalsı ve kabuksu olarak üç sınıfa ayrılır. Üstünde yaşadıkları substratlara göre de adlandırılan likenlerin, ülkemizde en çok bulunan formları ağaç gövde ve dalları üzerinde yaşayan epifitik likenler, kaya ve taşlar üzerinde yaşayan epilitik likenlerdir.

Likenler doğada mantar ve algden oluşan simbiyotik yaşam tarzında bulunurlar. Ancak bu simbiyotik yaşam formunu laboratuvar koşullarında korumak zor olduğundan, likenler üzerinde yapılan çalışmaların çoğunda yalnızca likeni oluşturan mantar kullanılmaktadır. Mantarın aposimbiyotik hali her zaman doğadaki simbiyotik formu yansıtmayacağından, isole edilmiş aposimbiyotik mantarla yapılan çalışmalar yanıltıcı olabilir. Örneğin 2007'de yapılan bir çalışmada simbiyotik *L.rupicola* likeninin salgıladığı maddelerin steril kültürde yetişmiş aposimbiyotik mantarinkilerden farklı olduğu rapor edilmiştir. Sayısız liken ve liken mikobiontları geçmiş 20 yılı aşkın bir sürede kültüre alınmaktadır. Crittenden ve ark. (1995) 77 familyadan mikobiyontların 1183 türünü ve likenlerin 280 genusunun izolasyonunu yapmıştır. Likenlerin doku kültürüne uygulanması ve in vitro da liken thallusununun kültürü ise Yamamoto (1990) ve Yashimura ve ark. (1994) tarafından geliştirilmiştir. Buna rağmen, likenlerde kültür çalışmaları hem katı hem de sıvı kültür ortamında bulunmasına rağmen, simbiyotik birliğin doğasını karakterize etmek üzerine ayrıntılı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu projemizde şüana kadar simbiyotik ilişkide hem mantarın hem de algin birbirlerini tanımada iş gören lektinler üzerinde çalışılmıştır. İlk önce şüana kadar literatürde bulunan lektin geninin hem mantar kültüründe hem de liken tallusundan elde edilen DNA'lardan PCR ile çoğaltılması başarı ile gerçekleştirildikten sonra liken tallusunda lektin boyama yapılmıştır. Flüoresans lektin boyama sonuçlarımız PCR sonuçlarımızı doğrulamakta ve çoğaltılan lektinin mantar tabakasına ait olduğunu kanıtlamaktadır. Stres denemelerine bağlı CDNA'da ki polimorfizime RAPD-PCR

tekniki ile bakılmış ve liken tallusu ve mantar kültürü arasında band farklılıkları elde edilmiştir. Bu da bize simbiyotik ilişkiye bağlı farklı gen bölgelerinin transkribe olduğunu göstermektedir. Bu gen bölgelerinin karakterize edilmesi ileride liken simbiyozisini anlamamızda önemli adımlar atmamızı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

## **2. AMAÇ VE KAPSAM**

Doğada bulunan simbiyotik yaşam formunun amacı, simbiyotik ilişkide yer alan her iki organizmaya da hayatta kalma konusunda avantaj sağlamasıdır. Bunu göz önünde bulundurarak projenin ilk kısmında isole edilmiş ve birlikte yaşayan mantar ve algin bu simbiyotik birlikteliğin oluşumundaki faktörler araştırılmıştır.. Bu anlamda laboratuvar koşullarında sağlanan ve doğadaki optimum koşullara benzer kültürlerde yetişen simbiyotik ve aposimbiyotik likenin büyümeleri takip edilmiş ve lektin geni ve imminohistokimyasal yöntemlerle lektinin fotbiyont ya da mikobiyonta mı ait olduğu sorusunun cevabı araştırılmıştır.

Önemli bir diğer konuda likenlerin doğada hava kirliliği için stres teşkil edecek koşullara maruz kalabilmeleridir. Bunu göz önünde bulundurarak, projenin ikinci kısmında doğadaki stresli koşullara benzer, laboratuvarında hazırlanan farklı stres koşullarında simbiyotik ve aposimbiyotik mantarların cDNA-PCR profilleri karşılaştırılmıştır. Böylelikle simbiyotik yaşamın organizmanın ekstrem koşullarda hayatta kalmasındaki önemini az da olsa belirlemeyi amaçlanmıştır.

## **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **3.1. Materyal**

Çalışmamızda *Evernia prunastri* türü kullanılacaktır. *E. prunastri* Bilecik ili civarından çam ağaçları üzerinden toplanacaktır. Toplanan örnekler laboratuvara getirildikten sonra bir fırça yardımı ile tozlarından temizlendikten sonra, -20 de deneme grupları kuruluncaya kadar saklanacaktır.

### **3.2. Kültür ortamında yetiştirilmesi**

1. Deneme grubumuzda liken thallusu saf suda dövüldükten sonra 1 M KI/sucrose karışımı içine alınır. 5000 g de 2 defa döndürüldükten sonra KI fazından alg hücreleri toplanır. Toplanan alg hücreleri, yeşil alg sıvı ve katı kültür ortamında 12:12 fotoperiod uygulanarak büyümesi incelenecektir.
2. Deneme grubunda *E.prunastri* thallusu küçük kesitlere bölünür ve malt extract ve sıvı büyüme ortamına alınmıştır.

3. Deneme grubumuzda liken thallusundan izole edilen mantar dokusu malt extract ortamına alınmıştır.
4. Malt extract ortamına çeşitli büyüme hormonları konularak liken kültürü yapılmıştır.
5. Yukarıda belirtilen 4 farklı büyüme ortamlarından organizmanın en iyi geliştiği kültürler seçilir ve bunlara ağır metal (250 µM kurşun) ve osmatik stres (5 M sorbitol eklenerek) uygulanarak örnekler strese maruz bırakılmıştır.

Bu ortamlarda yetişen hem mantarlarda lektin geni tespiti, cDNA-RAPD PCR analizi yapılmıştır.

### 3.3. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu Invitrogen bitki izolasyon kiti ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.4. PZR

PZR analizi Tablo 1' de gösterilen koşullarda gerçekleştirilmiştir

Tablo 1. PZR koşulları

95 °C	4 dakika	1 döngü
94 °C	1 dakika	45 döngü
47 °C	1 dakika	
72 °C	2 dakika	
72 °C	10 dakika	1 döngü

### 3.5. RNA izolasyonu ve cDNA eldesi

Mantar hücreleri örnekleri sıvı nitrojenle porselen havanlarda toz haline getirilerek TRIZOL® solüsyonuyla total RNA izolasyonu gerçekleştirilecektir. İzolasyon sonucunda RNA örneklerinin miktar ve kalite tayini; spektrofotometrik ve elektroforetik yöntemlerle yapılmıştır. RNA izolasyonunda materyalin hızlı ve etkin bir biçimde homojenize edilmesi önemlidir. Bu çalışmada havan ve tokmak kullanılarak liken dokusunun homojenizasyonu gerçekleştirilir. Homojenizasyona başlamadan önce havan, tokmak ve spatula dH<sub>2</sub>O ile yıkandıktan sonra 3 kez DEPC'li sudan geçirilerek temiz kağıt havlu ile kurulur. Daha sonra oldukça hızlı bir şekilde liken dokusu sıvı nitrojene maruz bırakılarak havanda tokmakla ezmek suretiyle doku pudra haline getirilir. Pudra halindeki alg dokusu spatula yardımıyla temiz ependorflara alınır ve derhal üzerine TRIZOL solüsyonu eklenir (100 µl protoskolekse 1 ml trizol olacak şekilde). Oda ısısında 5 dk bekletilerek nükleoprotein komplekslerinin tamamen

ayrılması sağlanır. İnkübasyon sonrasında tüplere 200 µl kloroform ilave edilir (1 ml trizol için 0.2ml. kloroform). Tüpler hızlı bir biçimde 30 sn. elle sallanır ve 2-3 dk daha oda ısısında tutulur. İnkübasyondan sonra 10000 devirde 15 dk +4 °C’de santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında tüplerde 3 faz gözlenir. Bunlar; en üstte RNA’nın bulunduğu renksiz sıvı faz, altta kırmızı renkte fenol-kloroform faz ve iki fazın ortasında bir ara fazdır. Aqua faz dikkatlice temiz bir tüpe alınır. Organik faz ise DNA izolasyonu için +4°C’ de saklanır. RNA’nın bulunduğu aqua fazın üzerine 500 µl isopropil alkol ilave edilir (Başlangıçtaki her 1 ml trizol için 0.5 ml isopropil alkol). Tüpler 10-15 dk. oda ısısında bekletilir. Sonra 10000 devirde 10 dk. +4 °C’ de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası tüpün dibinde jelimsi RNA pelleti gözlenir. Pelletin üzerindeki süpernatant dikkatlice atılır ve pelletin üzerine 1-2 ml. %75’ lik alkol ilave edilerek bir kez yıkanır (Başlangıçtaki bir 1 ml trizol için en az 1 ml %75’ lik etanol). Vorteks yapılır. 4000 devirde 5 dk. +4 °C’de santrifüj edilir. RNA pelleti yaklaşık 5-10 dk kurumaya bırakılır. Pelletin tamamen kurummasına asla izin verilmez. RNA pelletin üzerine 50-100 µl DEPC’ li su ilave edilir. Gerekirse hafifçe pipetlenir. Tüpler 10 dk 55–60 °C’de inkübe edilir. mRNA’ dan ters transcriptase enzimi ile önce cDNA’nın sentezlenmesi ve oluşan cDNA’ nın amaca uygun primerler kullanılarak PZR tekniği ile çoğaltılması esasına dayanır. RNA ile yapılan tüm deneylerde olduğu gibi RNAz kontaminasyonunu engellemek için gerekli önlemler alınmalıdır. Bu teknikte kaliteli ve DNA ile kontamine olmamış RNA ile çalışmak oldukça önemlidir. Bu nedenle RNA örnekleri önce DNAz ile muamele edildikten sonra RT-PZR çalışmasına geçilir. RNA örnekleri muhtemel DNA kontaminasyonuna karşı RT-PZR işlemine geçmeden önce DNAz enzimi ile muamele edilir. RNA örneklerinden 10 µl temiz tüplere alınır. Üzerine 3 µl DNAz (1 u/µl,1000 u)(EN0521, Fermentas) ilave edilerek 37 °C’ de 1 saat inkübasyona bırakılır. Daha sonra RT işlemine geçilir;

1. RNAz’ sız tüp içine aşağıdaki örnekler konur.

RNA..... 10 µl.

Oligo (dT) primer (70 µM) ..... 2 µl.

Dikkatlice karıştırılır ve 3-5 sn santrifüj edilir.

2. 70 °C sıcaklıkta 5 dk bırakılır. Derhal buza alınır.

3. Buz üzerinde aşağıdaki reaktifler konur.

5x reaksiyon tamponu.....8 µl.

dNTP(2mM) ..... 2 µl.

dH<sub>2</sub>O..... ...19 µl.

4. Karışım 37 °C' de 5 dk bırakılır.

5. Karışıma, Ters transcriptase .....1 µl ilave edilir.

6. 42 °C' de 60 dk inkübe edilir. 70 °C' de 10 dk inkübe edilerek enzim inhibe edilir.

7. İnkübasyon sonrasında tüpler buza alınır ve PZR yapıncaya kadar buzda bekletilir.

### 3.6. cDNA-RAPD PZR

Elde edilen cDNA'lar OPC03 RAPD primeri kullanılarak RAPD-PCR analizi yapılmıştır. RAPD-PCR koşulları aşağıdaki tablo 2'de belirtildiği gibidir.

Tablo 2. cDNA-RAPD-PZR koşulları

95 °C	4 dakika	1 döngü
94 °C	1 dakika	35 döngü
36 °C	1 dakika	
72 °C	2 dakika	
72 °C	10 dakika	1 döngü

### 3.7. Parafin Bloğa Gömme ve Kesit Alma

*Evernia prunastri* örnekleri bisturi yardımı ile küçük parçalara kesilir. Bu parçalar fiksasyon için formaldehit-etanol-gliasial asetik asit (FAA) karışımına alındı. FAA içindeki parçalar 24 saat sonra çıkarılarak alkol ve ksilol serilerinden geçirildi. Ksilol serisinden sonra kesitler 55 °C' deki etüvde parafin içine konuldu. 48 saat parafin içinde bekletilen tallus parçaları, temiz parafinle tekrar yıkandıktan sonra buz kalıplarına dökülen parafin içine alınarak gömme işlemi tamamlanmıştır.

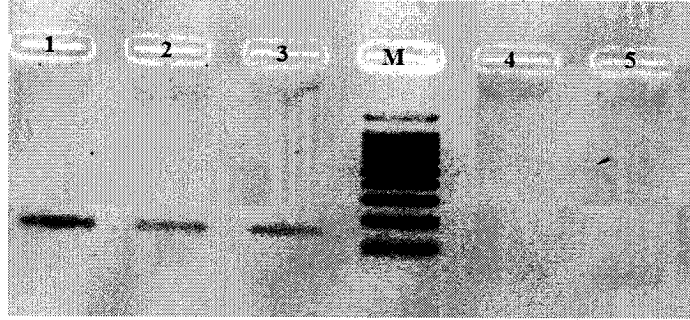
Flüoresans mikroskopik kesitler için Leica RM 2145 model mikrotomda 5 µ' luk kesitler 45 °C'lik su banyosunda alındı. Kesitlerin lama iyice yapıştırılması ve parafin uzaklaştırma işlemlerinde mikrodalga fırın (Arçelik MD554) kullanıldı. Tüm gruplardan elde edilen histolojik preparatlarda uygun immunohistokimyasal boyamalar gerçekleştirildi.

### 3.8. İmmunohistokimyasal Boyama

Alınan kesitler ksilol, ve alkol serilerinden geçirildikten sonra distile su ile 5 dk muamele edildi. Bu kesitlerde immunohistokimyasal boyama gerçekleştirildi. Primer antibody olarak rat anti-mouse mannose-bağlı lektin A (MBL-A) kullanıldı. Olymos Flüoresans mikroskobunda kesitler incelendi.

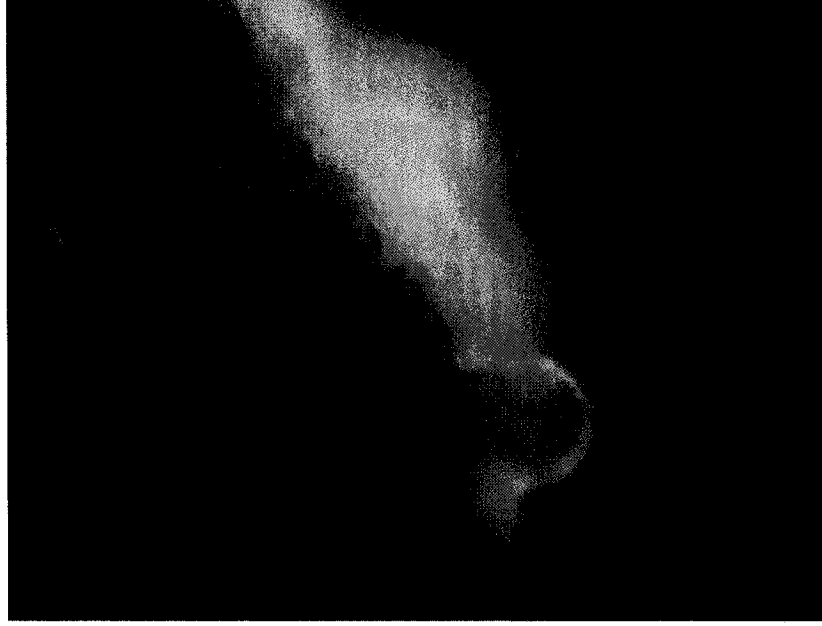
### 4. ANALİZ VE BULGULAR

Liken tallusunu oluşturan mantar tabakası ve bu likenin algi ile ortak yaşam sürmesinde polisakkaritlerin önemli rolleri mevcuttur (Lucimara ve ark. 2007). Bu polisakkaritler sadece mikobiyont ya da fotobiyont veya her ikisi tarafından da üretilmektedir. Takahashi ve ark (1979)' larının mikobiyont ve fotobiyont kültürleri üzerinde yaptıkları araştırmalar farklı fiziksel yapıya sahip farklı monosakkarit bileşiklere sahip olduklarını göstermiştir. Cordeiro ve ark. (2004) detaylı yapısal analize dayalı çalışmalar Takashaski ve arkadaşlarının çalışmalarını doğrulamakta ve nigeran, laminaran ve galaktomannan gibi bileşiklerin *Ramalina peruviana*'nın mikobiyont kültürlerinde tanımlamışlardır. Bu çalışmamız da benzer şekilde daha önce *Cladonia sp.* türünde tanımlanan (Joneson ve ark. 2011) lektin geni, *Evernia prunastri*'nin hem simbiyotik tallusu, izole edilen fikobiyontu hem de mikobiyont kültüründe PCR'ı yapılarak bakılmış ve sadece mikobiyont kültürlerinde olduğu tespit edilmiştir (şekil 1).



Şekil 1. Simbiyotik tallus, mikobiyont kültürü ve izole edilen alg'in lektin geni PCR ürünü jel görüntüsü. 1) simbiyotik *Evernia prunastri* tallusu 2) mikobiyont kültürü (1 haftalık) 3) mikobiyont kültürü (3 haftalık) 4) izole edilmiş alg 5) izole edilmiş alg

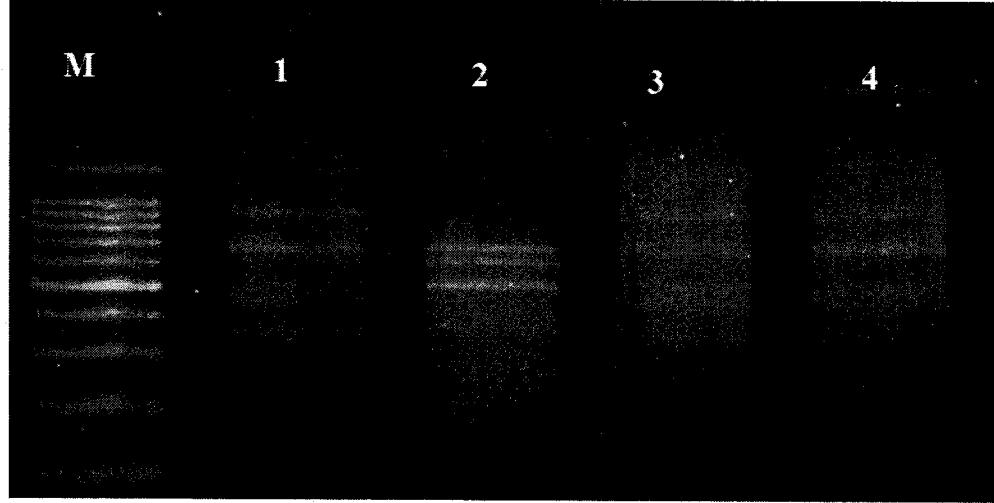
Bunun yanı sıra, MBL-A mantarlarda tanıma molekülü olarak iş görmektedir (Hogaboam ve ark. 2004). Bu projemizde, immunohistokimyasal boyama ile kesit üzerinde mannose-bağlı lektin A belirlenmiştir (Şekil 2). İmmunohistokimyasal sonuçlarımızda da görüldüğü gibi mannoza bağlı lektin A sadece mikobiyont tabakasında bulunmaktadır.



Şekil 2; İmmünohistokimyasal lektin boyama, yeşil flüoresans katman mannose-bağlı lektin A boyaması pozitif (mantar tabakası), kırmızı tabaka lektin boyaması negatif (algin flüoresans mikroskopta doğal görüntüsü)

Bunun dışında farklı iki strese maruz bırakılan liken tallusu ve simbiyotik ilişkide rol oynayan mantar kültüründen örnekler alınarak cDNAları elde edilmiş ve RAPD-PCR yapılarak transkripsiyondaki farklılıklar gözlenmeye çalışılmıştır (Şekil 3). Geçtiğimiz yıllarda, liken oluşturan mantarlara ait birçok gen bölgesi tanımlanmıştır (Wang ve ark. 2011). Buna karşın, tanımlanan gen bölgelerinin çoğu liken türleri arasındaki varyetelerin filogenetik olarak ayırımında kullanılmaktadır. Liken gelişiminde ve strese bağlı gen ifadesi profil çalışmaları ile elde ettiğimiz bilgiler ise günümüzde hala çok sınırlıdır. Joneson ve ark (2011) *Cladonia grayi*'nin mikobiyontunun gelişim sürecinde ifade olan genlerin cDNA kütüphanesini oluşturmuşlardır. Projemizde farklı stres koşullarına bağlı hem simbiyotik liken tallusunda hem de mikobiyont kültüründe gen ifadesindeki değişimler cDNA-RAPD PCR yöntemi kullanılarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Buna göre aynı strese maruz kalan her iki farklı grup arasında gen ifadesi profili arasında farklılıklar bulunmuştur. Her ne kadar bu projemizde farklı olduğu düşünülen bandların tanımlanması yapılmamış olsa da, simbiyotik ilişkiye bağlı farklı sentez edilen ürünlerin olabileceğini söylemek mümkündür. Ayrıca cDNA-PCR profilindeki farklılık fotobiyonta özgül başka gen bölgelerinden de kaynaklanabilmektedir (şekil 3). Ayrıca, strese bağlı profil farklılığı da elde ettiğimiz

sonuçlarda görülmektedir. 250 µM kurşun uygulanarak yapılan stres denemelerimizde yaklaşık 900 bp, 300 bp ve 200 bp'lik bölgelerde fark olduğu tespit edilirken, 5 M sorbitol uygulanan örneklerde OPC03 primeri kullanılarak profil farkı tespit edilmemiştir. İlerleyen çalışmalarda bu profil farkında ortaya çıkan gen bölgelerinin tanımlanmasına ve daha detaylı çalışılmasına gereksinim olmaktadır.



Resim 3; cDNA-RAPD-PCR (OPC03 primeri) jel görüntüsü M; marker, 1) 250 µM kurşun uygulanan simbiyotik liken tallusu 2) 250 µM kurşun uygulanan mikobiyont kültürü, 3) 5 M sorbitol uygulanan simbiyotik liken tallusu, 4)5 M sorbitol uygulanan mikobiyont kültürü

## 5. SONUÇ

Projemizde daha önce *C. grayi*' de tanımlanmış olan simbiyoziste rol oynayan mantarlara ait lektin geni PZR ile çoğaltılmıştır. Flüoresans boyamalar ile sadece mantarda bulunan mannoza bağlı lektin A belirlenerek mantara özgül lektinin varlığı tespit edilmiştir. Hiç şüpesiz mantar tabakasına özgü lektinler olduğu gibi alg tabakasına özgü lektinler de mevcuttur. Bu projede ise sadece mikobiyonta özgü lektinler çalışılmıştır. Ayrıca hem kültüre alınmış mantarda hem de liken tallusunun cDNA larında RAPD-PZR yöntemi ile bakılan polimorfizm çalışmamızın sonuçları simbiyotik ilişkiye özgü gen ifadelerinin olduğunu göstermektedir. İlerideki çalışmalar bu gen farklılıklarının çalışılması ve bu transkripsiyon düzeyinde çıkan farklılıkların hangi gen bölgelerinde olduğunu bulunması üzerine olabilir.

## 6. KAYNAKLAR

Crittenden P.D., David J.C., Hawksworth D.I., Campell F.S., 1995 Attempted isolation and success in the culturing of a broad spectrum of lichen forming and lichenicolous fungi. *New Phytol.* 130: 267-297

Cordeiro, L.M.C., Wörgötter, E.S., Gorin, P.A.J. and Iacomini, M. 2004. Elucidation of polysaccharide origin in *Ramalina peruviana* symbiosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 238; 79–84.

Nash III T (1996). *Lichens Biology*. Chapter I. Cambridge University Press.

Hogaboam C.M., Takahashi K., Ezekowitz R.A.B., Kunke IS., Schuh J. M 2004. Mannose-binding lectin deficiency alters the development of fungal asthma: effects on airway response, inflammation, and cytokine profile. *J.Leukocyte Biol.* 75:805-814

Joneson S., Armaleo D., Lutzoni F. 2011. Fungal and algal gene expression in early developmental stages of lichen-symbiosis *Mycologia*, 103(2): 291–306

Takahashi, K., Takeda, T. and Shibata, S. 1979. Polysaccharides of lichen symbionts. *Chem. Pharm. Bull.* 27, 238–241.

Yamamoto, Y. 1990. *Studies of Cell Aggregates and the Production of Natural Pigments in Plant Cell Culture*. Nippon Paint Publications, Osaka.

Yashimura, I., T. Kurokawa, Y. Kinoshita, Y. Yamamoto & H. Miyawaki. 1994. Lichen Substances in cultured lichens. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 76: 249–261.

## 7. EKLER

Moleküler Biyoloji çalışmaları maalesef çok pahalı çalışmalardır. Bu açıdan projemize verilen para ucu ucuna yetmiş, bazı çalışmaların yapılmasında ise Ege Üniversitesinin kaynakları kullanılmıştır. Bu proje de Ege Üniversitesinin kaynaklarının kullanılmasının nedeni, çalışmanın gidişatına göre immünohistokimyasal denemelerin eklenmesidir. Bu denemelerin eklenmesi ile mantara özgü olan lektinin belirlenmesi sağlanmıştır. Projenin ilk yazımında bu tarz bir deneme tasarlanmadığı için alım kalemlerinde belirtilmemiştir. Bundan dolayı, bu analizlerle ilgili çalışmalar Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümünün olanakları ile gerçekleştirilmiştir.

Bu projemizde alınan sarf malzemelerin hepsi kullanılmıştır. Özellikle başta liken kültürünün elde edilmesinde birçok sorunla karşılaşmıştır. Ayrıca, PCR çalışmalarının oturtulması aşamasında 25 den fazla PCR kurulmuş, en az 10 defa DNA izole edilmiş, 5 defa cDNA eldesi gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Likenlerde DNA ve cDNA eldesi içerdiği fenolik bileşiklerden dolayı problemlidir. Bu yüzden ilk seferde çalışmalara uygun kalitede DNA ya da cDNA sentezi gerçekleştirilmemiştir.

Proje kapsamında yatay elektroforez, mikrodalga fırın ve buzdolabı alınmıştır.