



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

PROJE ADI

**BİLECİK İLİNDE YETİŞEN *XANTHORIA PARIETINA* TÜRÜNÜN
POPÜLASYON GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Yrd.Doç.Dr. İsmail POYRAZ

ARAŞTIRMACILAR: Yrd.Doç.Dr. Dilek ÜNAL ÖZAKÇA

BAŞLAMA TARİHİ: Şubat 2011

BİTİŞ TARİHİ: Şubat 2013

**BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLECİK, 2013**

ÖZET

Likenler bir mantar (mikobiyont) ve bir yada fazla fotosentetik partnerden(fotobiyont) oluşan simbiyotik birliklerdir. Ekonomik ve ekolojik öneme sahip olan bu küçük ekosistemler, morfoloji, fizyoloji ve filogenetik çalışmalar gibi bir çok araştırma alanındaki birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Bu araştırma projesinin temel amacı Bilecik’te farklı bölgelerde gelişen *Xanthoria parietina*’nın popülasyon genetik çeşitliliğini belirlemektir. Bu araştırma projesinde, *X. parietina* türünün popülasyon genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan 3 farklı teknik (RAPD-PCR, ISSR-PCR ve ITS Analizi) uygulanmıştır. Sonuçların istatistiksel analizi UPGMA yöntemi ile hesaplanmış ve her yöntem için bir filogenetik ağaç çizilerek yorumlanmıştır. Sonuçlar, Bilecik ili sınırlarında yayılış gösteren *X. parietina* türüne ait popülasyonların yüksek oranda genetik çeşitliliğe sahip olduklarını ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: *Xanthoria parietina*, Popülasyon Genetiği, Bilecik, RAPD, ISSR, ITS.

ABSTRACT

Lichens are symbiotic organism including fungi (mycobionts) and one or more photosynthetic partners (photobionts). The economical and ecological importance of lichens is clearly apparent and these small ecosystems which excite many researchers have major implications for many areas of investigation such as morfological, physiological and phylogenetical studies. The main objective of this research project was to investigate the variety of population genetics of lichen *Xanthoria parietina* in different localization from Bilecik. In this research project, three different techniques (RAPD-PCR, ISSR-PCR and ITS Analysis) that extensively-used have been applied for determination of population genetics of *X. parietina* species. Statistical analyses of results have been calculated with UPGMA methods and commented on thereby to draw phylogenic tree for each techniques. Results were exhibited that populations of *X. parietina* species spread into borders of Bilecik city have got highly-rated genetic variety.

Key Words: *Xanthoria parietina*, Population Genetics, Bilecik, RAPD, ISSR, ITS.

TEŞEKKÜR

Araştırma projemiz süresince maddi ve manevi her zaman desteklerini hissettiğimiz, çalışma ortamı ve imkanlarını bize sunan; başta Rektörümüz Prof. Dr. Azmi ÖZCAN, Rektör Yardımcısı ve Fen Edebiyat Fakültesi Dekanımız Harun TUNÇEL, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyeleri ve tüm Bilecik Şeyh Edebalı Üniversitesinin Akademik ve İdari Personeli'ne teőekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR ve GÖSTERİMLER.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. AMAÇ ve KAPSAM	3
3. MATERYAL ve METOD.....	4
3.1. Çalışma Materyali.....	4
3.2. DNA izolasyonu.....	5
3.3. Popülasyon Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi.....	6
3.3.1. ITS Bölge Analizi.....	6
3.3.2. ISSR-PCR Yöntemi.....	7
3.3.3. RAPD-PCR Yöntemi.....	8
3.4. Reaksiyonların Agaroz Jele Yüklenmesi ve Dokümantasyonu.....	9
3.5. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	10
4. SONUÇLAR.....	11
4.1. DNA İzolasyonu.....	11
4.2. Popülasyon Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi.....	11
4.2.1. ITS Bölge Analizi Sonuçları.....	11
4.2.2. ISSR-PCR Yöntemi Sonuçları.....	14
4.2.3. RAPD-PCR Yöntemi.....	15
4.3. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	17
4.3.1. ITS Bölge Analizi Verilerinin İstatistiksel Analizi.....	17
4.3.2. ISSR-PCR Verilerinin İstatistiksel Analizi.....	19
4.3.3. RAPD-PCR Verilerinin İstatistiksel Analizi.....	20
5. TARTIŞMA ve ÖNERİLER.....	23
6. KAYNAKLAR.....	27

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>X. parietina</i> türüne ait popülasyonların lokalitelerinin harita üzerindeki görünümü.....	5
Şekil 2. <i>X. parietina</i> türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneğinin DNA'ları kalıp kullanılarak ITS PCR reaksiyonu sonucu ürün ve restriksiyon enzimleri ile kesime uğratılmadan önceki band kalitesinin gösterilmesi.....	11
Şekil 3. AluI Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile <i>X. parietina</i> ITS bölgelerinin kesimi.....	12
Şekil 4. EcoRI Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile <i>X. parietina</i> ITS bölgelerinin kesimi.....	12
Şekil 5. HindIII Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile <i>X. parietina</i> ITS bölgelerinin kesimi.....	13
Şekil 6. SmaI Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile <i>X. parietina</i> ITS bölgelerinin kesimi.....	13
Şekil 7. ISSR3 primeri kullanılarak <i>X. parietina</i> türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların ISSR PCR reaksiyonu ile gösterilmesi.....	14
Şekil 8. ISSR4 primeri kullanılarak <i>X. parietina</i> türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların ISSR PCR reaksiyonu ile gösterilmesi.....	14
Şekil 9. ISSR6 primeri kullanılarak <i>X. parietina</i> türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların ISSR PCR reaksiyonu ile gösterilmesi.....	15
Şekil 10. P-11 RAPD primeri kullanılarak <i>X. parietina</i> türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların RAPD PCR reaksiyonu ile gösterilmesi.....	15
Şekil 11. OPA-06 RAPD primeri kullanılarak <i>X. parietina</i> türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların RAPD PCR reaksiyonu ile gösterilmesi.....	16
Şekil 12. OPA-07 RAPD primeri kullanılarak <i>X. parietina</i> türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların RAPD PCR reaksiyonu ile gösterilmesi.....	16

Şekil 13. OPA-11 RAPD primeri kullanılarak <i>X. parietina</i> türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların RAPD PCR reaksiyonu ile gösterilmesi.....	16
Şekil 14. OPA-20 RAPD primeri kullanılarak <i>X. parietina</i> türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların RAPD PCR reaksiyonu ile gösterilmesi.....	17
Şekil 15. OPD-07 RAPD primeri kullanılarak <i>X. parietina</i> türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların RAPD PCR reaksiyonu ile gösterilmesi.....	17
Şekil 16. ITS Bölge Analizi verilerinin UPGMA istatistik analizi sonucu çizilen ve popülasyon genetik çeşitliliğini gösteren ağaç.....	19
Şekil 17. ISSR-PCR Analizi ile elde edilen verilerin UPGMA istatistik analizi sonucu çizilen ve popülasyon genetik çeşitliliğini gösteren ağaç.....	20
Şekil 18. RAPD-PCR Analizi ile elde edilen verilerin UPGMA istatistik analizi sonucu çizilen ve popülasyon genetik çeşitliliğini gösteren ağaç.....	22
Şekil 18. RAPD-PCR ile elde edilen verilerden oluşturulmuş, <i>X. parietina</i> türünün farklı lokalitelerde bulunan popülasyonlarının genetik çeşitliliğini gösteren ağacın harita üzerine uygulanması.....	25

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1. <i>X. parietina</i> türüne ait popülasyonların toplandığı Bilecik ili sınırları içerisindeki lokalitelerin numaraları, mevkii ve GPS koordinatları.....	4
Tablo 2. ITS Bölge Analizi Verilerinin Jaccard Benzerlik Matriksi.....	18
Tablo 3. ITS Bölge Analizi Verilerinin Jaccard Distance Matriksi.....	18
Tablo 4. ISSR-PCR Analizi ile elde edilen verilerin Jaccard Benzerlik Matriksi.....	19
Tablo 5. ISSR-PCR Analizi ile elde edilen verilerin Jaccard Distance Matriksi.....	20
Tablo 6. RAPD-PCR Analizi ile elde edilen verilerin Jaccard Benzerlik Matriksi.....	21
Tablo 7. RAPD-PCR Analizi ile elde edilen verilerin Jaccard Distance Matriksi.....	21

KISALTMALAR ve GÖSTERİMLER

DNA: Deoksiribo nükleik asit

PCR (Polymerase Chain Reaction) : Polimeraz zincir reaksiyonu

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA): Rastgele çoğaltılmış Polimorfik DNA

ITS (Internal Transcribed Spacer): rRNA'ları kodlayan DNA'lar arasındaki bölge.

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat): Basit ara tekrar zincirleri

SSU (Small SubUnit): Küçük alt ünite

IGS (Intergenic Spacer): Genler arası aralayıcı

DTT: Dithiothreitol

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

NaCl : Sodyum klorür

TBE : Tris Borik asit EDTA

UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean): Ağırlıksız çift grup metodu.

1. GİRİŞ

Likenler, bir mantar (mikobiyont) ve en az bir algin (fikobiyont) bir araya gelmesi ile oluşan simbiyotik birliklerdir. Likenler, çöllerden, kutuplara, dik yamaçlardan ve UV ışınlarının yüksek olduğu alpin zona kadar geniş alanına sahiptir. 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 (Nash, 1996).

Dünyada yaklaşık 25 000 liken türü bilinmektedir. Mikobiyont üyelerinin 16,750 tanesi *Ascomycetes*, 200 tanesi *Deuteromycetes* ve 50 tanesi *Basidiomycetes* gruplarındandır. Birçok fitobiyont *Chloococcales* (%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).

Türkiye’de yaygın olarak görülen bir liken türü olan *Xanthoria parietina* ile ilgili ilk morfolojik bilgiler ışık ve elektron mikroskobu ile elde edilmiştir (Collins ve Farrar, 1978). Sonraki yıllarda *X. parietina*’dan izole edilmiş bromoperoksidaz gibi aktivasyonu için vadyum elementine ihtiyaç duyan enzimler üzerine de çalışılmalar yapılmıştır (Plat ve ark., 1987).

Günümüze gelirken bu liken türünden ışığa karşı koruma sağlayan parietin maddesinin varlığı (Solhaug ve Gauslaa, 1996) ve çevre kirliliğine karşı gösterdiği direnç (Silberstein ve ark., 1996) gibi yönlerden çalışmalar devam etmiştir. Likenlerdeki sistematik çalışmalar, diğer organizmalarda olduğu gibi klasik olarak daha fazla morfolojik karakterlere dayalı tanımlamaya dayanmaktadır. Fakat bu tanımlama çalışmaları da liken sistematik kategorilerini tam olarak belirlemeye yetmemektedir (Guzow ve ark. 2001).

Likenlerde moleküler biyolojik tekniklere dayalı olan çalışmalar sonucunda, Transkripsiyonu yapılan ITS (Internal Transcribed Spacer) ve RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)-PCR kullanılarak liken sistematik kategorilerinde sorun yaşanan türlerin ayrımı net bir şekilde ortaya konabilmiştir (Hofstetter ve ark. 2007). Likenlerde PCR yöntemi ile ITS bölgesinin dizi analizi yönteminde mantara özgü

spesifik primerler kullanılmaktadır. Likenler için yaklaşık 9 adet spesifik mantar primeri bulunmaktadır ve bunlar ribozomal DNA (rDNA)'nın küçük alt ünitesinde (SSU) dizi analizi yöntemi için uygun primerler olarak belirlenmiştir (Gardes ve Bruns, 1993; Gargas ve Taylor 1992).

Dyen ve Murtagh (2001), *Buellia frigida* ve *Xanthoria elegans* liken türü ile yaptıkları çalışmalarda genetik varyasyonların oldukça düşük olduğunu kaydetmelerine karşın, değişik bölgelerden toplanan *X. elegans*'ın tür içinde dahi oldukça yüksek genetik varyasyon gösterdiği ITS bölgelerinin incelenmesi ile ortaya çıkarılmıştır.

Lindblom ve Ekman (2006) tarafından Storfosna adasındaki (Norveç) *X. parietina* türünün genetik çeşitliliği ve popülasyon farklılıkları üzerine çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada IGS (Intergenic Spacer) ve ITS bölgelerindeki farklılıklar üzerine yoğunlaşmıştır.

Bu araştırma projesinde farklı ortamlarda yayılış gösterme yeteneğinde olan *X. parietina* türünün Bilecik ili sınırları içerisinde yayılış gösteren bireylerinin popülasyon genetik çeşitliliklerinin belirlenmesi, farklı yaşam koşullarında bulunan aynı türe ait bireylerdeki genetik varyasyonların ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

2. AMAÇ ve KAPSAM

Likenlerin özellikle ekstrem koşullarda nasıl yaşamlarını sürdürdüklerinin sorusu, birçok araştırmacı için büyük bir merak uyandırmaktadır. Günümüzde likenlerin stres koşullarındaki davranışlarına, moleküler ve fizyolojik mekanizmalarının aydınlatılmasına ilişkin çalışmalar çok sınırlıdır. Bu çalışmada farklı ortamlarda yayılış gösterme yeteneğinde olan *Xanthoria parietina* türünün popülasyon genetik çeşitliliğinin ortaya çıkartılması amaçlanmıştır.. Farklı yaşam ortamlarında bulunan aynı türe ait bireylerdeki genetik varyasyonlar ortaya konmaya çalışılmıştır.

Aynı türe ait farklı lokasyonlarda yaşamını sürdüren bu bireylerin oluşturdukları farklı popülasyonların, buldukları ortam koşullarına bağlı olarak genetik çeşitliliği oluşturan yeni jenerasyonlar ile temsil edildikleri görülmektedir. Bu amaç için, proje önerisinde ilk olarak verilen ITS bölgelerinin çoğaltılması ve tespiti yöntemine ilaveten RAPD ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) -PCR yöntemlerinin proje kapsamında kullanılmasına karar verilmiştir. Bu nedenle lokalite sayısı sınırlandırılırken, deney sayısında artırıma gidilmiştir. Bu değişiklik ile elde edilen verilerin bilimsel anlamda önemi arttırılmış olmaktadır. Bilecik ili sınırları içerisinde belirlenen 10 farklı lokasyondan alınan *X. parietina* örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bu örneklerin genetik çeşitliliklerinin ortaya çıkartılması amacıyla kullanılan üç farklı genetik analiz yöntem ile elde edilen verilerin karşılaştırılması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar hem *X. parietina* türünün popülasyonlarına ait genetik çeşitliliği ortaya çıkarmada, hem de bu alanla kullanılan üç farklı tekniğin karşılaştırılması ve aralarındaki korelasyonun ortaya çıkartılmasında yararlı olmuştur.

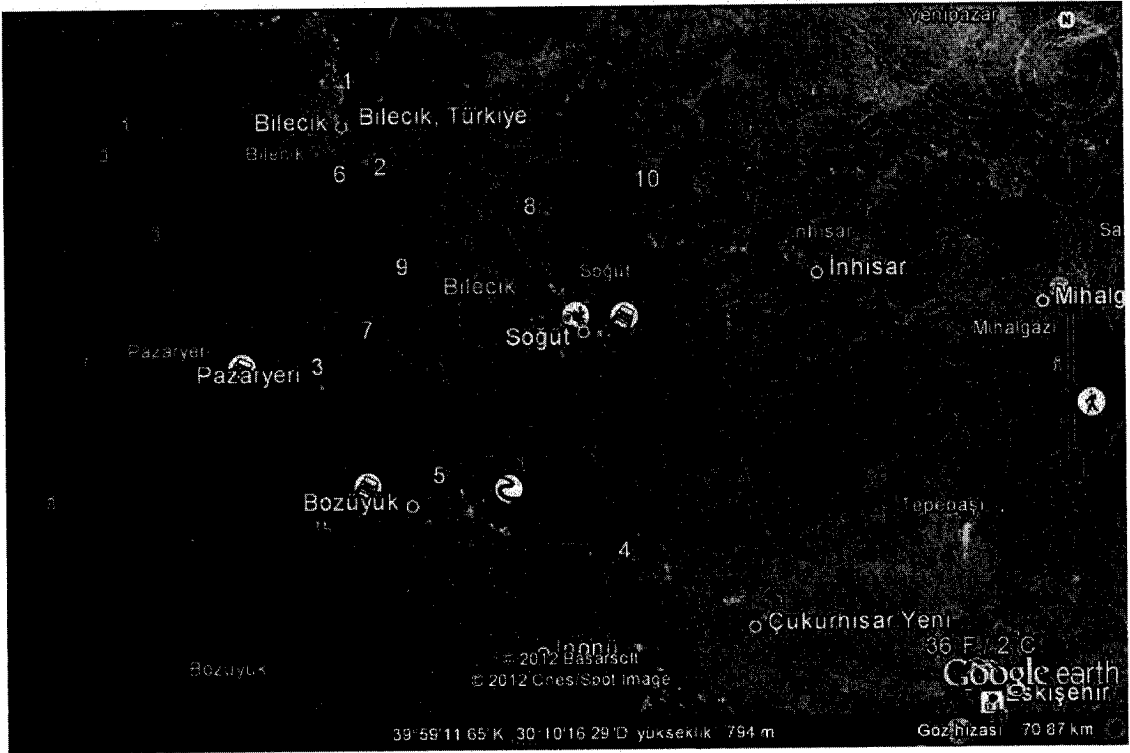
3. MATERYAL ve METOD

3.1. Çalışma Materyali

Bu proje kapsamında kullanılacak örnekler, Bilecik ili sınırları içerisinde *X. parietina* meşe, alıç gibi ağaçların dalları ile kayalar üzerinden toplanmıştır. Toplam 10 farklı istasyondan toplanan örnekler ile çalışma materyali oluşturulmuştur. Yükseklik ve coğrafi veriler, günümüzde yapılan çalışmalarda standart olarak kullanılan GPS cihazıyla belirlenmiştir. Örnekler ağaç kabuklarından bıçak yardımıyla substratlarıyla birlikte toplanmıştır. Örneklerin toplandığı lokalitelerin GPS koordinatları Tablo 1.'de, haritada üzerindeki dağılımları da Şekil 1.'de gösterilmektedir.

Tablo 1. *X. parietina* türüne ait popülasyonların toplandığı Bilecik ili sınırları içerisindeki lokalitelerin numaraları, mevkii ve GPS koordinatları.

Lokalite No	GPS Koordinatı	Toplanma Yeri
1 no'lu	N 40° 02' 45.9" E 030° 12' 33.8"	Dereboyu Köyü yolu 2.5 km.
2 no'lu	N 40° 06' 18.3" E 029° 59' 12.7"	Orhangazi Mahallesi, tren yolu yanı.
3 no'lu	N 39° 58' 41.7" E 029° 58' 30.7"	Pazaryeri, lastik fabrikasına 100 m., çalı üzeri.
4 no'lu	N 39° 51' 27.2" E 030° 13' 49.32"	Bozüyük, Toprak Demirdöküm Fabrikası yakınları.
5 no'lu	N 39° 53' 52.1" E 030° 03' 11.1"	Bozüyük, çevre yolu siteler karşısı, kavak dipleri.
6 no'lu	N 40° 06' 02.1" E 029° 59' 47.2"	Sorgun çayına 1 km.
7 no'lu	N 39° 59' 26.7" E 029° 59' 42.8"	Demirköy-Karaköy arası. akarsu yanı.
8 no'lu	N 40° 04' 03" E 030° 08' 08"	Dönmez Köyüne 4.7 km.
9 no'lu	N 40° 01' 50.0" E 030° 01' 33.4"	Bilecik, tünel mevkii, ağaç üzeri.
10 no'lu	N 40° 05' 36.5" E 0.30° 12' 29"	Sögüt'e 2 km.



Şekil 1. *X. parietina* türüne ait popülasyonların lokalitelerinin harita üzerindeki görünümü.

Toplanan liken örnekleri kâğıt poşetler içinde laboratuara getirilmiş ve örnekler -20 °Cde saklanmıştır.

3.2. DNA izolasyonu

DNA izolasyon için daha önceki çalışmalarımızda kullanmış olduğumuz ve başarılı sonuç elde ettiğimiz Hughey ve ark. (2001)'nin DNA izolasyon yöntemi uygulanmıştır.

Bu yöntemde, izolasyonda kullanılacak olan çözelti EB: 100 mM Tris (pH8.0), 50 mM EDTA, 500 mM NaCl kullanılarak hazırlanır. Bir adet eppendorf tüpüne 1400 µl EB ve 1 µl β-ME eklenir ve 65°C'de bekletilir.

Diğer eppendorf tüpüne 50 µl %20 SDS, 10 µl 0.1 M DTT ve 4 mg liyofilize Proteinaz K koyulur. Tüplerin her birine 700 µl EB (sıcak) eklenir, üzerine örnekler koyulur (min çap 2 mm²) ve tekrar 65°C'de 3 saat inkübe edilir.

Örnekler 30 dk.da bir pestle ile öğütülür. Her tüpe 250 µl 5 M potasyum asetat eklenir, birkaç kez ters-yüz edilip buzda 30 dk. inkübasyona bırakılır (polisakkaritlerin

çökmesi için). 12.000 g.de 30 dk. santrifüj edildikten sonra 750 µl sıvı faz yeni bir tüpe aktarılır.

Eşit hacimde kloroform eklenir ve 2 dk. ters-yüz edilir.15 dk. max.da santrifüjün ardından iki faz oluşur (üst faz sıvı, alt faz kloroform) üstteki faz yeni tüpe alınır. 2/3 hacim isopropanol eklenir ve -20°C'de gece boyunca (DNA'nın çökmesi için) inkübasyona bırakılır.

Ertesi gün örnekler 20 dk. 12.000 rpm de santrifüj edilir ve sonunda dipte beyaz ya da renkli bir pellet elde edilir. Sıvı fazı atılır. Pellet 450 µl %70 etanol ile yıkanır ve max.da 5 dk. santrifüj edilip sıvı fazı atılır. Pellet kurumaya bırakılır. 100 µl distile su veya TE'de çözülür.

DNA'nın kalitesi ve miktarını belirlemek için spektrofotometrede 260 ve 280 nm. dalga boylarında 1 ml.lik quartz küvetler kullanılarak ölçüm yapılmıştır.

3.3. Popülasyon Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi

3.3.1. ITS Bölge Analizi

Nüklear ribozomal DNA üzerinde bulunan ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgelerinin çoğaltılmasına dayanan bu yöntem göre, daha önce dizayn edilmiş bu bölgeleri tanıyan forward (ileri) 5'gaaatcatcgaatcttgaacgcag3' ve reverse (geri) 5'cgaggtaatcattggaattgg3' iki primer kullanılarak kurulan PCR ile elde edilen ürünler; spesifik kesim yapan endonükleazlar ile bir gece boyunca kesime uğratılırlar.

ITS-PCR Reaksiyonunun Bileşenleri:

Çalışma Solüsyonu	Miktar (25µl)
H ₂ O	8,8 µl
10x PCR Tamponu	2,5 µl
MgCl ₂ 25mM	1,5 µl
10x dNTP 2,5 mM	2 µl
DNA Kalıbı (2 ng/µl)	5 µl
Forward ITS Primer 2,5 µM	2,5 µl
Reverse ITS Primer 2,5 µM	2,5 µl
Taq Polimeraz 5 u/µl	0,2 µl (1u/µl)

ITS-PCR Reaksiyonunun Termal Profili:

	Isı	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	12 dk	1x
Denatürasyon (çift ipliğin ayrılması)	94 °C	30 s	
Annealing (primerin oturması)	55 °C	30 s	33x
Elongasyon (Uzama)	72 °C	1 dk	
Final Elongasyonu	72 °C	7 dk.	1x

ITS bölgelerinin PCR ile çoğaltılmasından sonra, PCR ürünleri Alu I, EcoRI, Hind III, Sma I ve BamHI restriksiyon enzimleri ile 37°C'de kesime uğratılmış ve sonuçlar % 1.3'lük agaroz jelde yürütülüp jel dökümantasyon cihazında fotoğraflanmıştır. BamHI dışında diğer tüm enzimlerden kesim sonucu elde edilmiştir.

Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesim Reaksiyonu:

- Nükleaz'sız Su : 17 µl
- Enzim Tamponu : 2 µl
- PCR Ürünü : 10 µl
- Enzim : 1 µl

Bu sayede bu bölgelerde olası baz değişimlerine göre, kesim reaksiyonlarında farklı ürünlerin gözlenmesi beklenir. Bu yöntem ile çalışılan *X. parietina* türünün bireyleri arasındaki genetik çeşitliliğinin var olup olmadığı belirlenmiş olur.

3.3.2. ISSR-PCR Yöntemi

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) tekniği, basit tekrarlı diziler arası polimorfizm olarak ifade edilir. Bu teknik, RAPD PCR tekniğine olduğu gibi tek primer ile kurulan bir PCR reaksiyonudur. Bu reaksiyonda kullanılan primerler basit tekrarlı diziler şeklindedir. Bu primerler kullanılarak hedef genomik DNA'ların benzer ya da farklılıklarına göre karşılaştırılması hedeflenmektedir. Genetik çeşitliliğin araştırılması ve canlıların sınıflandırılması gibi amaçları kapsayan çalışmalar için kullanılan bir yöntemdir. Çalışmada 4 farklı ISSR primeri denenmiş ve 3 tanesi (ISSR-3, ISSR-4 ve ISSR-6) tüm örnekler için çalışmıştır.

PCR bileşenleri ve koşulları standart PCR'lara benzerdir. Her primer için hesaplanan annealing temperature (primer oturma ısısı)'a göre PCR kurulur.

PCR Reaksiyonunun Bileşenleri:

Çalışma Solüsyonu	Miktar (25µl)
H ₂ O	10,8 µl
10x PCR Tamponu	2,5 µl
MgCl ₂ 25mM	1,5 µl
10x dNTP 2,5 mM	2 µl
DNA Kalıbı (2 ng/µl)	5 µl
ISSR Primer 2,5 µM	2 µl
Taq Polimeraz 5 u/µl	0,2 µl (1u/µl)

PCR Reaksiyonunun Termal Profili:

	Isı	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	2 dk	1x
Denatürasyon (çift ipliğin ayrılması)	94 °C	45 s - 60 s	
Annealing (primerin oturması)	40-60 °C	45 s - 75 s	40x
Elongasyon (Uzama)	72 °C	30 s - 75 s	
Final Elongasyonu	72 °C	7 dk.	1x

3.3.3. RAPD-PCR Yöntemi

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR tekniği kolay, hızlı ve daha önce hiçbir dizi bilgisi gerektirmeyen bir yöntemdir. RAPD PCR, geniş bir uygulama yelpazesi ile yaygın olarak kullanılan bir parmak izi yöntemidir. Primerlerin rastgele DNA zinciri üzerinde 200 ile 2000 bp mesafede farklı dizilere oturması ve ürün vermesi beklenir. Bu teknik 1990 yılında Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Williams ve ark., 1990).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniği basit ve kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA'nın rastgele bölgelerinin çoğaltılması prensibine dayanır. Araştırma projesi kapsamında 5 adet RAPD primeri alınmış olup, bu primerlerin dışında 20 adet farklı RAPD primerinden PCR reaksiyonu

kurulmuştur. Bu primerlerle kurulan reaksiyonlardan sadece, tüm örneklerde ürün verenler (P-11, OPA-06, OPA-07, OPA-11, OPA-20, OPD-07) proje sonuç raporunda kullanılmıştır.

RAPD-PCR Reaksiyonunun Bileşenleri:

Çalışma Solüsyonu	Miktar (25µl)
H ₂ O	11,3 µl
10x PCR Tamponu	2,5 µl
MgCl ₂ 25mM	1,5 µl
10x dNTP 2,5 mM	2 µl
DNA Kalıbı (2 ng/µl)	5 µl
RAPD Primer 2,5 µM	2,5 µl
Taq Polimeraz 5 u/µl	0,2 µl (1u/µl)

PCR Reaksiyonunun Termal Profili:

	Isı	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denaturasyon (opsiyonel)	85 °C	15 s	1x
Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	2 dk	1x
Denatürasyon (çift ipliğin ayrılması)	94 °C	45 s - 60 s	
Annealing (primerin oturması)	30-40 °C	45 s - 60 s	40x
Elongasyon (Uzama)	72 °C	30 s - 3 dk	
Final Elongasyonu	72 °C	7 dk.	1x

Dominant bir belirteç olmasına karşın günümüzde halen RAPD belirteçleri kullanılarak genetik çeşitlilik, moleküler akrabalık çalışmaları halen yapılmakta ve RAPD-PCR tekniği geçerliliğini devam ettirmektedir.

3.4. Reaksiyonların Agaroz Jele Yüklenmesi ve Dokümantasyonu

Araştırma projesinde kullanılan her üç tekniğin reaksiyon ürünleri yatay jel elektroforezinde % 1.3'lük agaroz jele yüklenerek TBE (Tris Borik asit EDTA)

tamponunda yürütülmüştür. Agaroz jel, etidyum bromür ile boyanarak reaksiyon ürünlerini oluşturan DNA fragmentleri boyanarak görünür hale getirilmiştir.

Boyanan agaroz jel, U.V. (ultra viyole) ışık altında jel dokümantasyon Gel Logic 2200 Pro marka jel dokümantasyon cihazında fotoğraflanmış ve görsel veriye dönüştürülmüştür.

3.5. Verilerin İstatistiksel Analizi

Araştırma projesinde kullanılan her üç yöntemden elde edilen jel resimleri, tek band sayımı ve analizi yapılarak, sayısal verilere dönüştürülmüştür. Her tekniğe ait bu sayısal verilerin UPGMA(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) yöntemine göre istatistiksel analizleri yapılarak, bu analizlerden her teknik için dendogram çizimleri elde edilmiştir.

4. SONUÇLAR

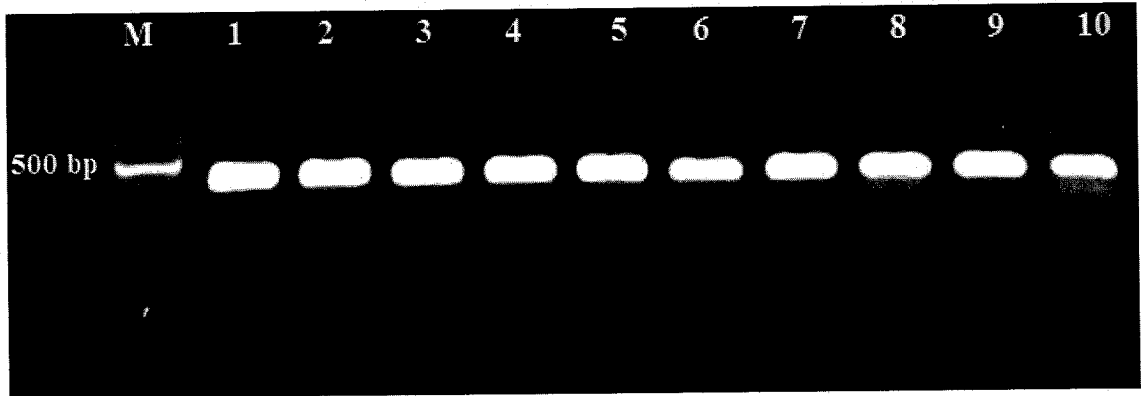
4.1. DNA İzolasyonu

X. parietina türüne ait 10 lokaliteden toplanan bireylerden DNA izolasyonu yapılmış, DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümlerinde $Od_{260/280}$ değerlerinin 1.8-2.0 arasında olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak elde edilen DNA örneklerinin miktar ve kalite bakımından kullanıma uygun bulunmuştur.

4.2. Popülasyon Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi

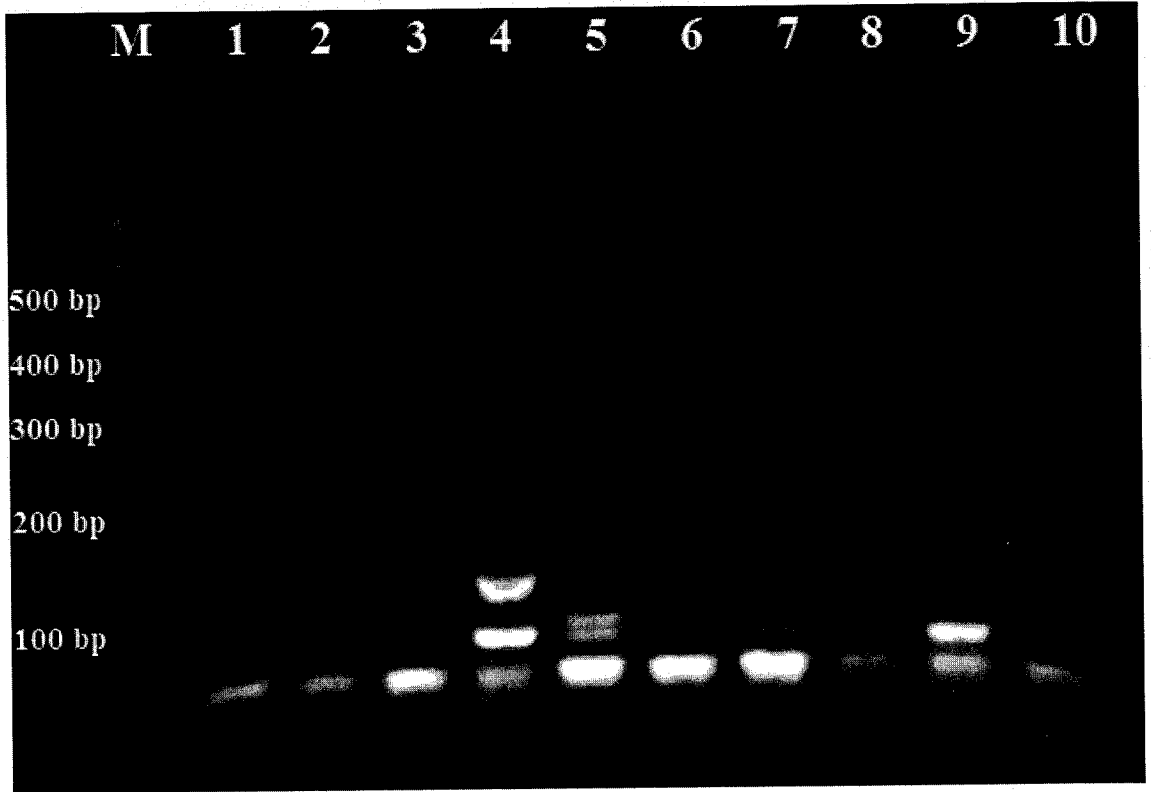
4.2.1. ITS Bölge Analizi Sonuçları

ITS bölgelerinin PCR ile çoğaltılarak elde edilen ürünler, %1.3'lük agaroz jele yüklenmiş ve 445 bp büyüklüğünde tek bir ürün bandı verdikleri gözlenmiştir (şekil 2.).

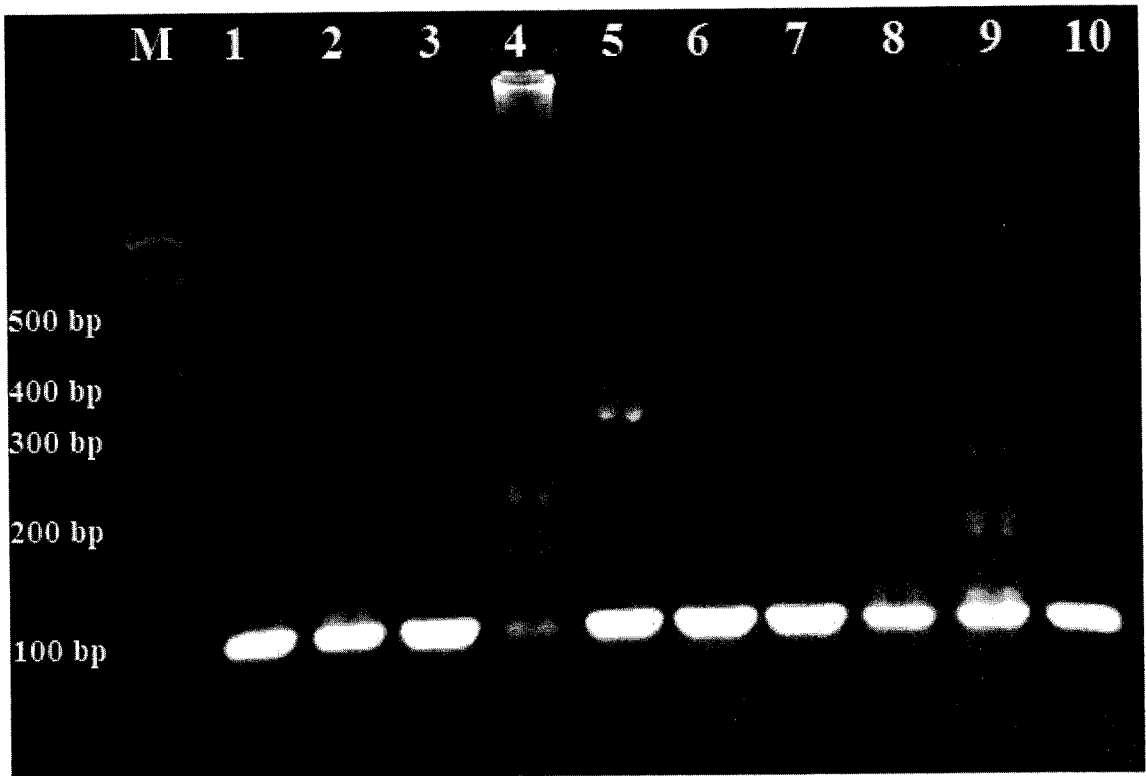


Şekil 2. *X. parietina* türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneğinin DNA'ları kalıp kullanılarak ITS PCR reaksiyonu sonucu ürün ve restriksiyon enzimleri ile kesime uğratılmadan önceki band kalitesinin gösterilmesi. M: Fermentas 100 bp plus marker, 1-10: popülasyonları temsil eden örnek sayıları.

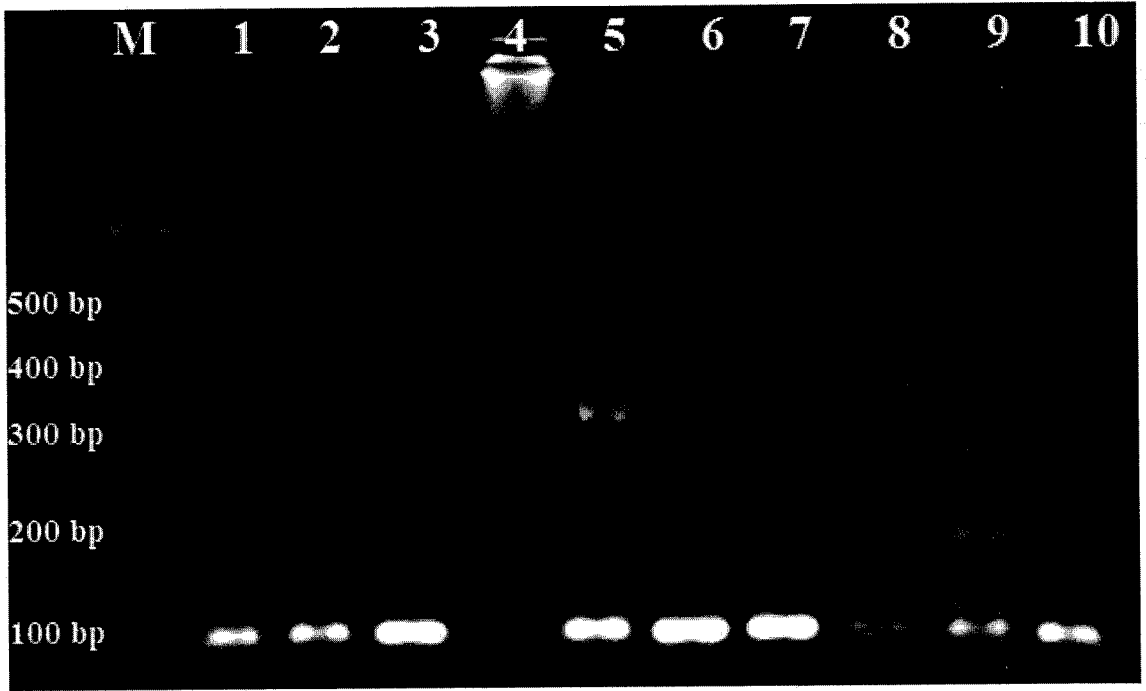
AluI, EcoRI, HindIII ve SmaI restriksiyon enzimleri ile gerçekleştirilen kesim reaksiyonları %1.3'lük agaroz jele yüklenerek fotoğrafı çekilmiştir (şekil 3-6).



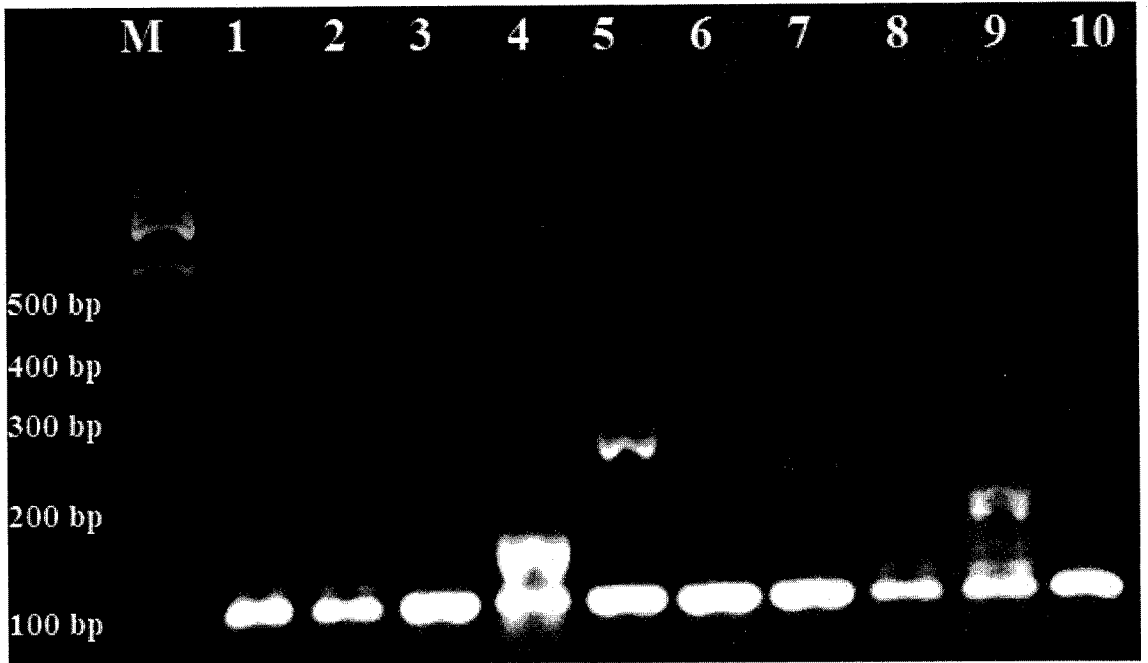
Şekil 3. AluI Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile *X. parietina* ITS bölgelerinin kesimi.



Şekil 4. EcoRI Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile *X. parietina* ITS bölgelerinin kesimi.



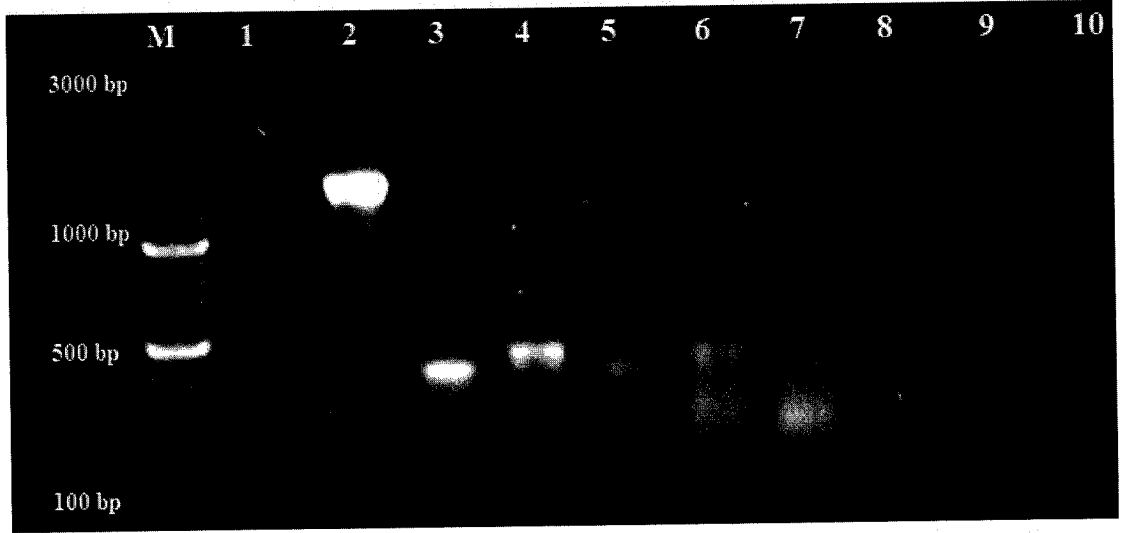
Şekil 5. HindIII Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile *X. parietina* ITS bölgelerinin kesimi.



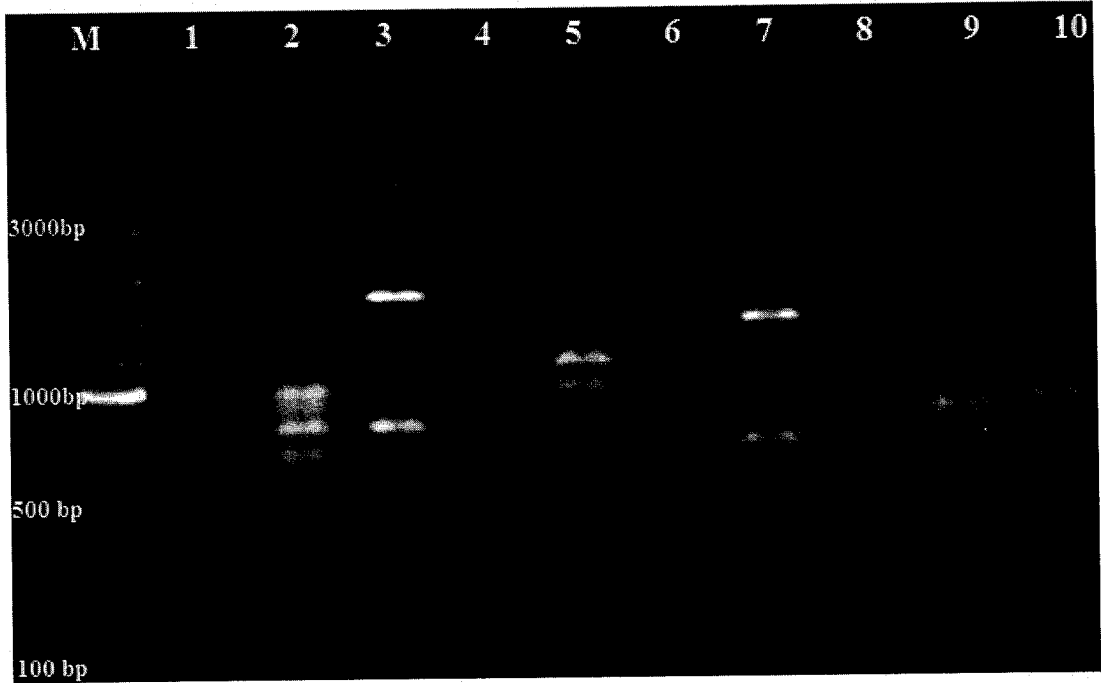
Şekil 6. SmaI Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile *X. parietina* ITS bölgelerinin kesimi.

4.2.2. ISSR-PCR Yöntemi Sonuçları

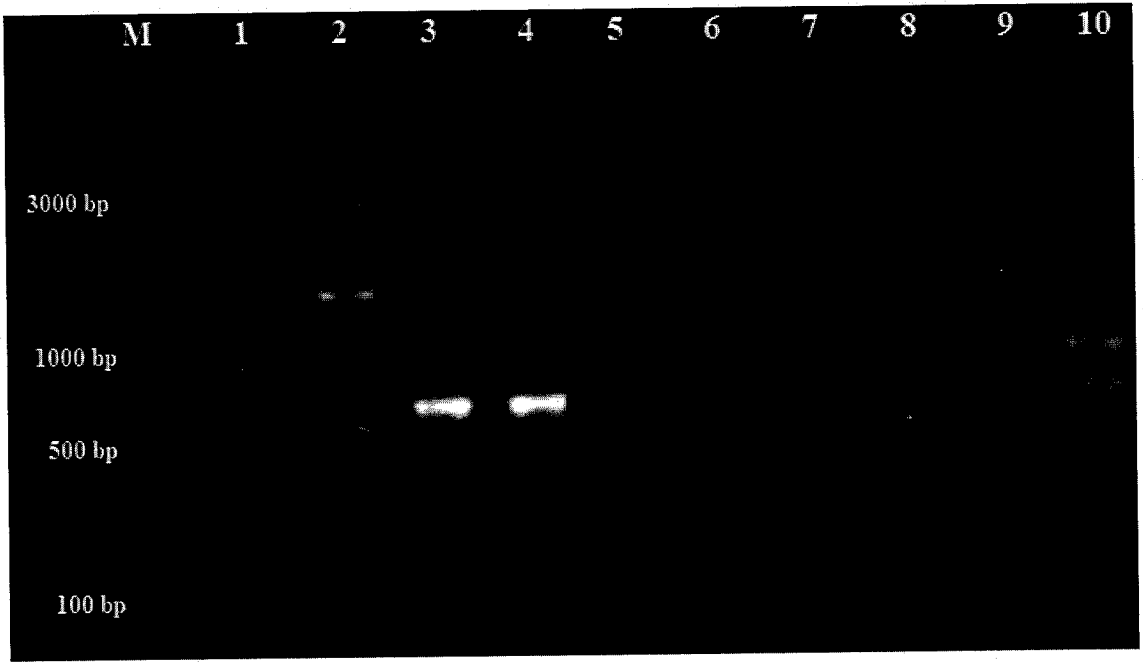
ISSR-3, ISSR-4 ve ISSR-6 primerleri ile kurulan PCR ile elde edilen ürünler %1.3'lük agaroz jele yüklenmiş ve yürütüldükten sonra fotoğraflanmıştır (Şekil 7-9).



Şekil 7. ISSR3 primeri kullanılarak *X. parietina* türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların ISSR PCR reaksiyonu ile gösterilmesi. M: Fermentas 100 bp plus marker, 1-10: popülasyonları temsil eden örnek sayıları.



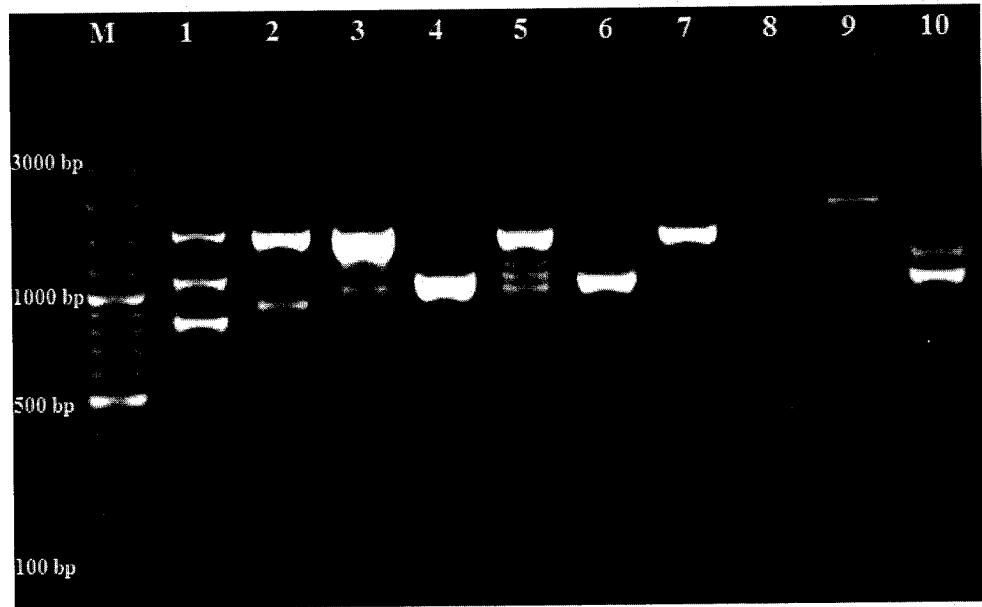
Şekil 8. ISSR4 primeri kullanılarak *X. parietina* türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların ISSR PCR reaksiyonu ile gösterilmesi. M: Fermentas 100 bp plus marker, 1-10: popülasyonları temsil eden örnek sayıları.



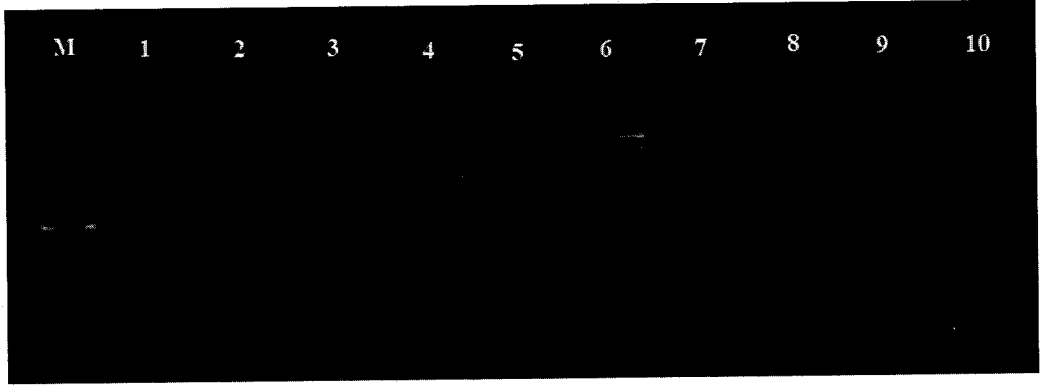
Şekil 9. ISSR6 primeri kullanılarak *X. parietina* türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların ISSR PCR reaksiyonu ile gösterilmesi. M: Fermentas 100 bp plus marker, 1-10: popülasyonları temsil eden örnek sayıları.

4.2.3. RAPD-PCR Yöntemi

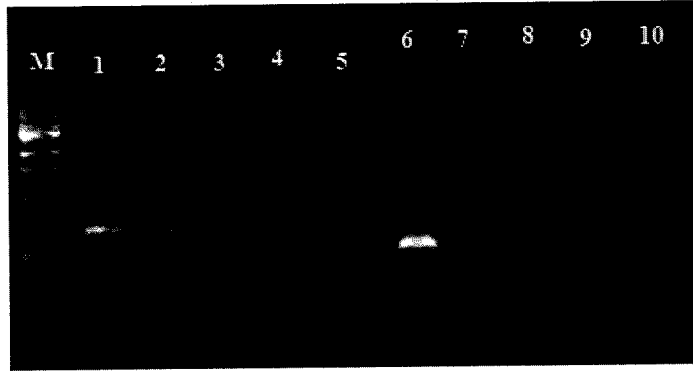
P-11, OPA-06, OPA-07, OPA-11, OPA-20 ve OPD-07 RAPD primerleri ile gerçekleştirilen PCR'lar sonucunda elde edilen ürünler %1.3'lük agaroz jele yüklenmiş ve fotoğraflanmıştır (şekil 10-15).



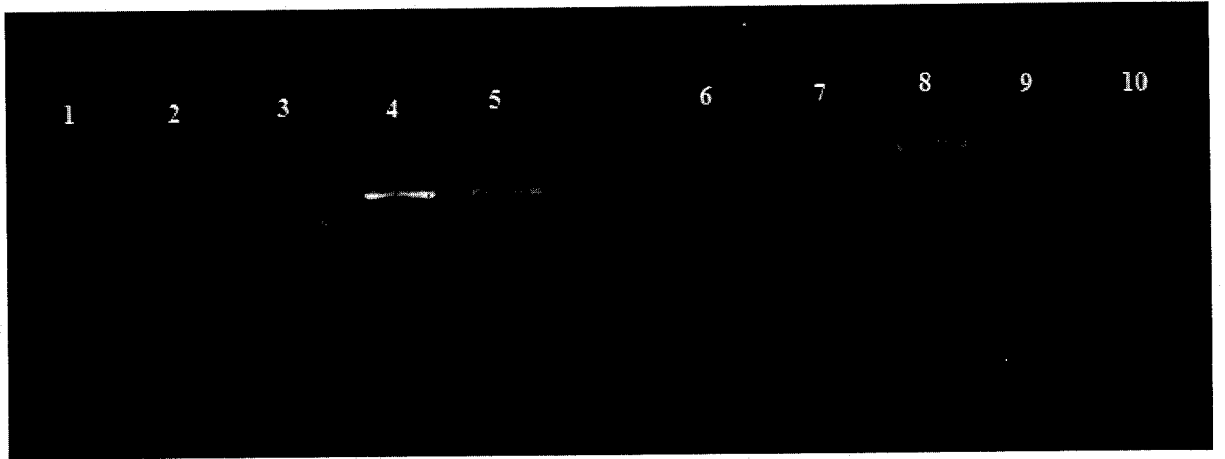
Şekil 10. P-11 RAPD primeri kullanılarak *X. parietina* türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların RAPD PCR reaksiyonu ile gösterilmesi. M: Fermentas 100 bp plus marker, 1-10: popülasyonları temsil eden örnek sayıları.



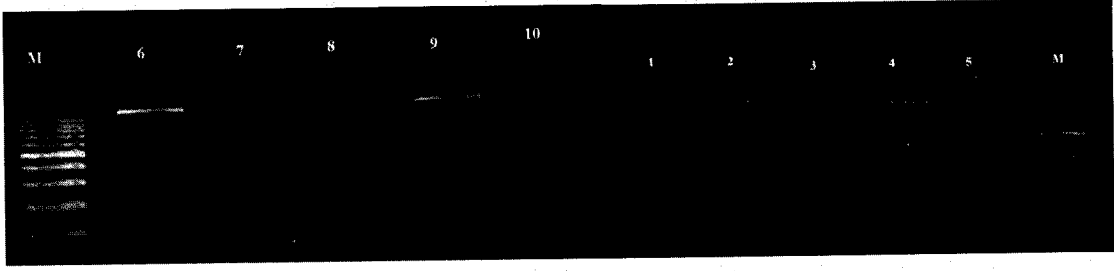
Şekil 11. OPA-06 RAPD primeri kullanılarak *X. parietina* türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların RAPD PCR reaksiyonu ile gösterilmesi. M: Fermentas 100 bp plus marker, 1-10: popülasyonları temsil eden örnek sayıları.



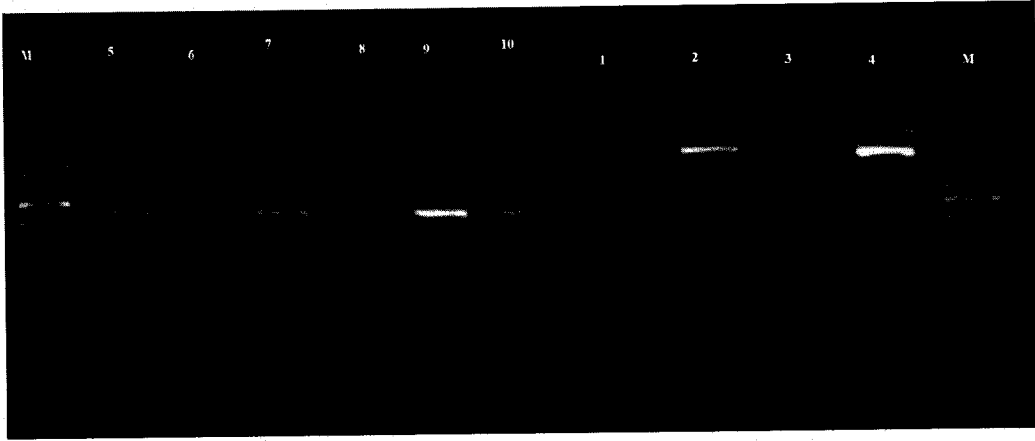
Şekil 12. OPA-07 RAPD primeri kullanılarak *X. parietina* türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların RAPD PCR reaksiyonu ile gösterilmesi. M: Fermentas 100 bp plus marker, 1-10: popülasyonları temsil eden örnek sayıları.



Şekil 13. OPA-11 RAPD primeri kullanılarak *X. parietina* türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların RAPD PCR reaksiyonu ile gösterilmesi. M: Fermentas 100 bp plus marker, 1-10: popülasyonları temsil eden örnek sayıları.



Şekil 14. OPA-20 RAPD primeri kullanılarak *X. parietina* türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların RAPD PCR reaksiyonu ile gösterilmesi. M: Fermentas 100 bp plus marker, 1-10: popülasyonları temsil eden örnek sayıları.



Şekil 15. OPD-07 RAPD primeri kullanılarak *X. parietina* türüne ait farklı lokalitelerdeki 10 popülasyon örneği arasındaki genetik varyasyonların RAPD PCR reaksiyonu ile gösterilmesi. M: Fermentas 100 bp plus marker, 1-10: popülasyonları temsil eden örnek sayıları.

4.3. Verilerin İstatistiksel Analizi

4.3.1. ITS Bölge Analizi Verilerinin İstatistiksel Analizi

ITS bölgelerinin kesimlerini içeren agaroz jel fotoğraflarının analiz edilmesi ile elde edilen verilerin UPGMA yöntemine göre istatistiksel analizleri yapılmıştır. Analizler sonucu elde edilen ITS verilerinin Jaccard Benzerlik Matrisi tablo 2'de, Jaccard Distance Matrisi tablo 3.'de gösterilmektedir.

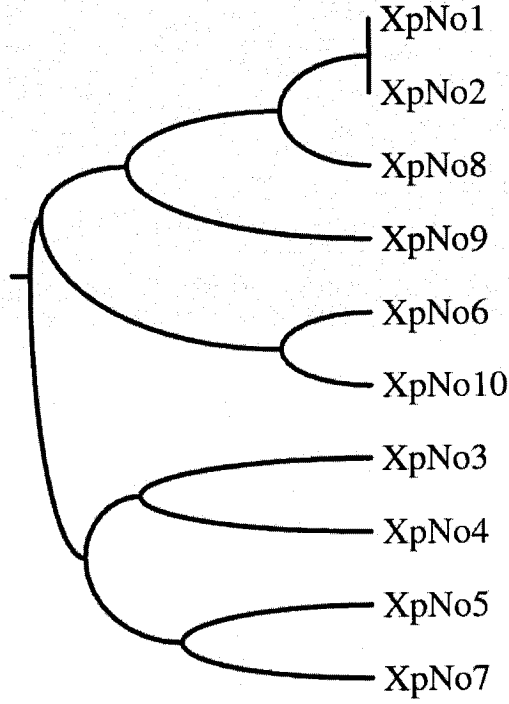
Bu analizden elde edilen popülasyon genetik çeşitliliğini gösteren ağaç (dendogram) çizimleri şekil 16.'da verilmiştir.

Tablo 2. ITS Bölge Analizi Verilerinin Jaccard Benzerlik Matriksi.

	XpNo1	XpNo2	XpNo3	XpNo4	XpNo5	XpNo6	XpNo7	XpNo8	XpNo9	XpNo10
XpNo1	1	1.000	0.412	0.269	0.273	0.500	0.333	0.833	0.600	0.417
XpNo2		1	0.412	0.269	0.273	0.500	0.333	0.833	0.600	0.417
XpNo3			1	0.571	0.400	0.500	0.500	0.467	0.391	0.417
XpNo4				1	0.542	0.286	0.435	0.292	0.519	0.238
XpNo5					1	0.375	0.647	0.300	0.333	0.312
XpNo6						1	0.500	0.600	0.300	0.833
XpNo7							1	0.375	0.280	0.417
XpNo8								1	0.500	0.500
XpNo9									1	0.250
XpNo10										1

Tablo 3. ITS Bölge Analizi Verilerinin Jaccard Distance Matriksi.

	XpNo1	XpNo2	XpNo3	XpNo4	XpNo5	XpNo6	XpNo7	XpNo8	XpNo9	XpNo10
XpNo1	0	0.000	0.588	0.731	0.727	0.500	0.667	0.167	0.400	0.583
XpNo2		0	0.588	0.731	0.727	0.500	0.667	0.167	0.400	0.583
XpNo3			0	0.429	0.600	0.500	0.500	0.533	0.609	0.583
XpNo4				0	0.458	0.714	0.565	0.708	0.481	0.762
XpNo5					0	0.625	0.353	0.700	0.667	0.688
XpNo6						0	0.500	0.400	0.700	0.167
XpNo7							0	0.625	0.720	0.583
XpNo8								0	0.500	0.500
XpNo9									0	0.750
XpNo10										0



Şekil 16. ITS Bölge Analizi verilerinin UPGMA istatistik analizi sonucu çizilen ve popülasyon genetik çeşitliliğini gösteren ağaç.

4.3.2. ISSR-PCR Verilerinin İstatistiksel Analizi

ISSR-PCR Analizi sonuçlarını içeren agaroz jel fotoğraflarının analiz edilmesi yoluyla elde edilen verilerin, UPGMA yöntemine göre istatistiksel analizleri yapılmıştır. Analizler sonucu elde edilen ISSR-PCR Analizi verilerinin Jaccard Benzerlik Matrisi tablo 4’de, Jaccard Distance Matrisi tablo 5.’de gösterilmektedir.

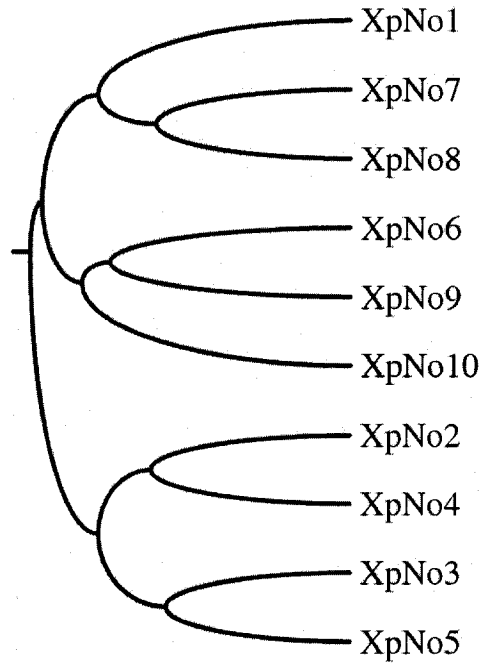
Bu analizden elde edilen popülasyon genetik çeşitliliğini gösteren ağaç (dendogram) çizimleri şekil 17.’da verilmiştir.

Tablo 4. ISSR-PCR Analizi ile elde edilen verilerin Jaccard Benzerlik Matrisi.

XpNo1	XpNo2	XpNo3	XpNo4	XpNo5	XpNo6	XpNo7	XpNo8	XpNo9	XpNo10	
XpNo1	1	0.189	0.194	0.273	0.300	0.346	0.435	0.471	0.286	0.286
XpNo2		1	0.432	0.568	0.410	0.275	0.361	0.206	0.229	0.238
XpNo3			1	0.457	0.600	0.333	0.400	0.308	0.286	0.364
XpNo4				1	0.514	0.361	0.382	0.258	0.242	0.282
XpNo5					1	0.438	0.467	0.333	0.357	0.424
XpNo6						1	0.481	0.391	0.478	0.433
XpNo7							1	0.579	0.333	0.367
XpNo8								1	0.412	0.269
XpNo9									1	0.400
XpNo10										1

Tablo 5. ISSR-PCR Analizi ile elde edilen verilerin Jaccard Distance Matrisi.

XpNo1	XpNo2	XpNo3	XpNo4	XpNo5	XpNo6	XpNo7	XpNo8	XpNo9	XpNo10	
XpNo1	0	0.811	0.806	0.727	0.700	0.654	0.565	0.529	0.714	0.714
XpNo2		0	0.568	0.432	0.590	0.725	0.639	0.794	0.771	0.762
XpNo3			0	0.543	0.400	0.667	0.600	0.692	0.714	0.636
XpNo4				0	0.486	0.639	0.618	0.742	0.758	0.718
XpNo5					0	0.562	0.533	0.667	0.643	0.576
XpNo6						0	0.519	0.609	0.522	0.567
XpNo7							0	0.421	0.667	0.633
XpNo8								0	0.588	0.731
XpNo9									0	0.600
XpNo10										0



Şekil 17. ISSR-PCR Analizi ile elde edilen verilerin UPGMA istatistik analizi sonucu çizilen ve popülasyon genetik çeşitliliğini gösteren ağaç.

4.3.3. RAPD-PCR Verilerinin İstatistiksel Analizi

PARD-PCR Analizi sonuçlarını içeren agaroz jel fotoğraflarının analiz edilmesi yoluyla elde edilen verilerin, UPGMA yöntemine göre istatistiksel analizleri yapılmıştır. Analizler sonucu elde edilen RAPD-PCR Analizi verilerinin Jaccard Benzerlik Matrisi tablo 6'de, Jaccard Distance Matrisi tablo 7.'de gösterilmektedir.

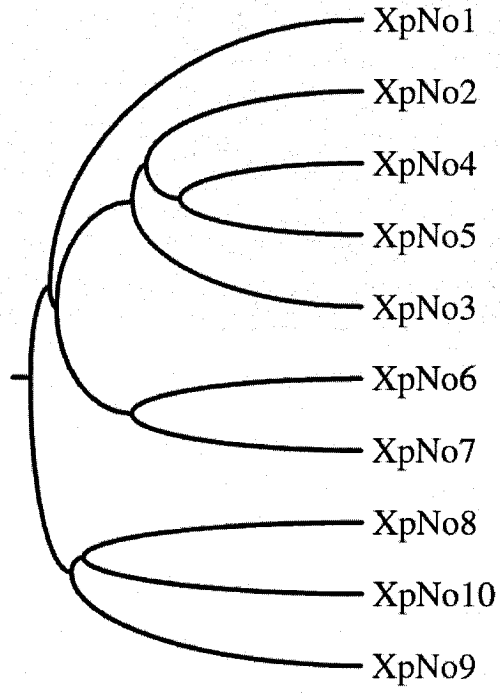
Bu analizden elde edilen popülasyon genetik çeşitliliğini gösteren ağaç (dendogram) çizimleri şekil 17.'da verilmiştir.

Tablo 6. RAPD-PCR Analizi ile elde edilen verilerin Jaccard Benzerlik Matrisi.

	XpNo1	XpNo2	XpNo3	XpNo4	XpNo5	XpNo6	XpNo7	XpNo8	XpNo9	XpNo10
XpNo1	1	0.364	0.279	0.370	0.409	0.333	0.300	0.308	0.263	0.381
XpNo2		1	0.513	0.595	0.467	0.333	0.273	0.250	0.182	0.240
XpNo3			1	0.590	0.386	0.275	0.308	0.282	0.306	0.163
XpNo4				1	0.605	0.405	0.372	0.261	0.250	0.250
XpNo5					1	0.568	0.487	0.188	0.227	0.333
XpNo6						1	0.500	0.205	0.222	0.256
XpNo7							1	0.270	0.333	0.256
XpNo8								1	0.387	0.395
XpNo9									1	0.351
XpNo10										1

Tablo 7. RAPD-PCR Analizi ile elde edilen verilerin Jaccard Distance Matrisi.

	XpNo1	XpNo2	XpNo3	XpNo4	XpNo5	XpNo6	XpNo7	XpNo8	XpNo9	XpNo10
XpNo1	0	0.636	0.721	0.630	0.591	0.667	0.700	0.692	0.737	0.619
XpNo2		0	0.487	0.405	0.533	0.667	0.727	0.750	0.818	0.760
XpNo3			0	0.410	0.614	0.725	0.692	0.718	0.694	0.837
XpNo4				0	0.395	0.595	0.628	0.739	0.750	0.750
XpNo5					0	0.432	0.513	0.812	0.773	0.667
XpNo6						0	0.500	0.795	0.778	0.744
XpNo7							0	0.730	0.667	0.744
XpNo8								0	0.613	0.605
XpNo9									0	0.649
XpNo10										0



Şekil 18. RAPD-PCR Analizi ile elde edilen verilerin UPGMA istatistik analizi sonucu çizilen ve popülasyon genetik çeşitliliğini gösteren ağaç.

5. TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Bilecik ili sınırları içerisinde yayılış gösteren bir liken türü olan *X. parietina* türünün, farklı lokalitelerde bulunan popülasyonlarının genetik çeşitliliklerinin belirlenmesini amaçlayan bu araştırma projesi; aynı tür olmasına rağmen farklı bireylerden elde edilmiş DNA örnekleri üzerinde üç farklı tekniği (ITS Bölge Analizi, ISSR-PCR tekniği, RAPD-PCR tekniği) uygulamış ve her bir teknikten elde edilen veriler, bu popülasyonlar arasındaki mevcut genetik çeşitliliği net olarak ortaya çıkarmıştır.

Xanthoria parietina ile ilgili ilk bilgilerin ışık ve elektron mikroskobu kullanılarak ve sadece morfolojik olarak elde edildiği (Collins ve Farrar, 1978), gelişen teknoloji ve teknikler ile yıllarda bu türe ait enzim ve maddeler üzerine de çalışmaların yapıldığı görülmektedir (Plat ve ark., 1987; Solhaug ve Gauslaa, 1996). Likenlerdeki sistematik çalışmaların daha çok morfolojik karakterlere bağlı olduğu ve bu çalışmaların da liken sistematığını tam olarak belirlemeye yetmediği anlaşılmaktadır (Guzow ve ark. 2001). ITS ve RAPD-PCR kullanılarak yapılan çalışmalar, liken sistematik kategorilerinde sorun yaşanan türlerin ayrımı net bir şekilde ortaya koymuş (Hofstetter ve ark. 2007, ITS bölgesinin dizi analizi yöntemi de kullanılmıştır. Ribozomal DNA (rDNA)'nın küçük alt ünitesinin (SSU) dizi analizi yöntemi de (Gardes ve Bruns, 1993; Gargas ve Taylor 1992) alternatif yöntemler arasındadır.

Buellia frigida ve *Xanthoria elegans* liken türleri ile yapılan çalışmalarda genetik çeşitliliğin oldukça düşük olduğu görülmesine karşın, değişik bölgelerden toplanan *X. elegans*'in tür içinde dahi oldukça yüksek genetik varyasyon gösterdiği ITS bölgelerinin incelenmesi ile ortaya çıkarılmıştır (Dyen ve Murtagh, 2001). Aynı türe ait popülasyonların birbirlerinden uzaklaştıkça ve farklı ortamlara yayıldıkça, tür içi genetik çeşitliliğin artış gösterdiği bilinmektedir. Bilinen bir gerçek olan bu durumu *X. parietina* türü için ilginç kılan nokta ise; Bilecik ili gibi sınırları dar ve bu kadar küçük bir bölge için, bu liken türünde görülen tür içi genetik çeşitliliğin çok fazla olmasıdır. Genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan ve bu araştırma projesinde uygulanan her üç teknik de bu durumu net bir şekilde ortaya koymuştur.

Bu tekniklere bakıldığında; RAPD-PCR yönteminde denenen 20 primerden 6'sının primer verisi, ITS bölge analizinde denenen 5 restriksiyon enziminden 4'ünün

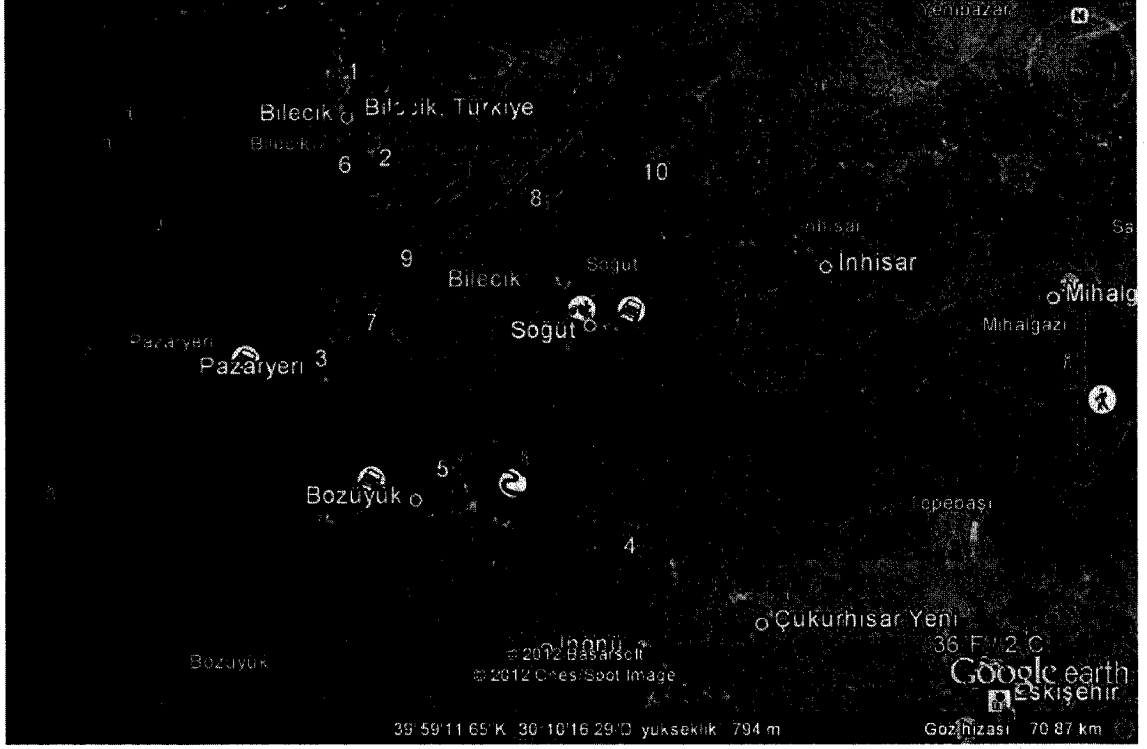
verisi, ISSR-PCR tekniğinde ise denenen 4 primerden 3'ünün primer verisi analize tabii tutulduğu görülmektedir. Araştırma projesinden elde edilen tüm sonuçlara bakıldığında, uygulanan teknikler ile elde edilen verilerin farklılıklar içerdiği ve genetik çeşitliliği gösteren ağaç çizelgelerinde de farklılıklar taşıdığı görülmektedir.

Norvetçe bulunan Storfosna adasındaki *X. parietina* türünün genetik çeşitliliği ve popülasyon farklılıkları üzerine çalışmalar yapılmış, bu çalışmalarda IGS (Intergenic Spacer) ve ITS bölgelerindeki farklılıklar üzerine yoğunlaşmıştır (Lindblom ve Ekman, 2006).

Araştırma projesi kapsamında tek bir teknik ile çalışma planlanmış olmasına rağmen, proje bütçesi dışında sağlanan imkanlar ile diğer iki tekniğin uygulanması mümkün olmuştur. Ancak sınırlı imkanlar bu iki teknik için deneme ve analiz sayısını da sınırlamış olmaktadır. Bu negatif durum, her iki tekniğin deney sonuçlarının da doğruya yakınlığını azaltmış olmaktadır. Bu durum, uygulanan 3 tekniğin sonuçlarında da bazı farklılıkların görülmesine yol açmıştır. Doğal olarak en fazla veri imkanı olan RAPD-PCR tekniğinin sonuçlarının daha anlamlı olduğu görülmektedir. Bununla birlikte diğer iki tekniğin verileri az olmasına rağmen, RAPD-PCR verilerindeki görülen popülasyon gruplarını destekler nitelikte sonuçlara sahip oldukları gözlenmiştir.

RAPD-PCR tekniği sonuçları ile elde edilen sonuçlara bakıldığında, analizleri yapılan popülasyonların temel olarak iki grupta toplandığı ve bu iki grubun bir tanesinde çeşitliliğin fazla olduğu ve kendi içinde 3 gruba ayrıldığı görülmektedir (şekil 18.). Bu gruplaşmalar harita üzerine yansıtıldığında, lokasyonlar bakımından anlamlı olarak ayrıldıkları ve dallandıkları görülmektedir (şekil 19.). Sonuçta, ilk ayrılan grubu oluşturan 8., 9. ve 10. lokalitelerin birbirine yakın olmalarına bağlı olarak aynı grupta bulunduğu ve genetik çeşitlilik bakımından birbirine yakın oldukları görülmektedir. Yine ayrı bir grubu oluşturan lokalitelerin bir arada toplandıkları görülmektedir. Diğer ikinci grubun 1. lokalitedeki bireylerinin daha önce ayrıldığı ve kalan 6., 7. ile 2., 3., 4. ve 5. lokalitedeki bireylerin aynı hat boyunca yayılarak tür içi genetik çeşitlenmeye uğradıkları görülmektedir. Verilerin azlığına bağlı olarak, zayıf da olsa ISSR-PCR tekniği sonuçlarına bakıldığında; RAPD-PCR tekniğindeki gibi 8., 9. 10. lokaliteler ile 7.,8. ve 2., 3., 4. 5., lokalitelerin ayrı ayrı gruplaştıkları görülmektedir. Bu durum, bu tekniklerin genetik çeşitliliğin belirlenmesinde birbirine paralel ve veri sayısı

arttırıldıkça doğruya daha yakın sonuçlar verdiklerini; bu tarz çalışmalar için geçerli teknikler olduklarını teyit etmektedir.



Şekil 19. RAPD-PCR ile elde edilen verilerden oluşturulmuş, *X. parietina* türünün farklı lokalitelerde bulunan popülasyonlarının genetik çeşitliliğini gösteren ağacın harita üzerine uygulanması.

Sonuç olarak, bu araştırma projesinden elde edilen veriler *X. parietina* türünün Bilecik ili gibi sınırları dar ve bu kadar küçük bir bölge içinde yayılış gösteren popülasyonlarında bile tür içi genetik çeşitliliğin çok fazla olduğunu göstermektedir.

Bilecik ilinde Marmara bölgesinin Akdeniz-Karadeniz ve kısmen de İç Anadolu etkilerinin birbirine karıştığı bir geçiş iklimi hüküm sürmektedir. Bilecik ili iklim açısından karmaşık bir yapıya sahiptir. İl toprakları genellikle akarsu vadileriyle parçalanmış, tepelik alanlara sıkça rastlanan orta yükselteli dalgalı düzlüklerden oluşmaktadır (Türkiye İller Ansiklopedisi, 2005). Bilecik iline ait bu özellikler, çevre şartlarına dirençliliği ile bilinen likenlerin tür içi genetik çeşitliliğinin de fazla olmasını açıklayacak bir durumdur.

Mevcut imkanlardan dolayı zayıf kalan bu iki teknik için daha fazla deney yapılamamıştır. Gelecekte sağlanacak yeni imkanlar dahilinde bu iki teknik için elde

edilecek daha fazla yeni verinin, diğer tekniği destekleyecek nitelikte olacağı tahmin edilmektedir. Çalışmayı yapan proje ekibi, daha az veri elde edilen ITS ve ISSR-PCR teknikleri için deneysel çalışmalara devam etmeyi ve daha fazla veri elde etmeyi hedeflemektedir. Bu sayede araştırma projesinde uygulanan tüm teknikler için, eşit veri desteği ile karşılaştırma yapma imkanı sağlanmış olacaktır.

Bu araştırma projesi, *X. parietina* türünün farklı lokalitelerdeki popülasyonları arasındaki tür içi genetik çeşitliliği ortaya çıkararak amacına ulaşmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Collins, C.R.** And **Farrar, J.F.**, Structural Resistances To Mass Transfer In The Lichen *Xanthoria Parietina*, *New Phytol.*, 81, 71-83, (1978).
- Dyen Ps, Murtagh J.**, Variation In Ribosomal Its Sequence Of Lichens *Buellia Firigida* And *Xanthoria Elegans* From Vestfold Hills, Eastern Antartica. *Lichenologist*,; 33(2), 151-159 (2001).
- Gardes, M., Bruns, T. D.**, Its Primers With Enhanced Specificity For Basidiomycetes - Application To The Identification Of Mycorrhizae And Rusts, *Molecular Ecology Of The Lecanoromycetes (Ascomycota)*, *Molecular Phylogenetics And Evolution* 44 412–426 (2007).
- Gargas, A., Taylor, J. W.**, Polymerase Chain Reaction (Pcr) Primers For Amplifying And Sequencing 18s rDNA From Lichenized Fungi, *Mycologia*, 84, 589-592, (1992).
- Guzow-Krzemińska B., Górniak M., Węgrzyn G.** Molecular Determination Keys: Construction Of Keys For Species Identification Based On Restriction Fragment Length Polymorphism. *International Archives Of Bioscience*, 1, 1057-1067, (2001).
- Hofstetter V., Miadlikowska J., Kauff F., Lutzoni F.** Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: A case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 44:412-426 (2007).
- Hughey, J.R., Silva, P.C. & Hommersand, M.H.**, Solving taxonomic and nomenclatural problems in *Pacięc Gigartinaceae* (Rhodophyta) using DNA from type material. *Journal of Phycology*, 37, 1091-1109 (2001).
- Innis MA., Gelfand DH., Sninsky JJ., White TJ.** PCR Protocols: A guide to methods and applications In: *White TJ, Bruns T., Lee S., Taylor J. eds. Amplification and direct*

sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. San Diego:Academic Press, 315-322 (1990).

Lindblom, L. and Ekman, S., Genetic Variation And Population Differentiation In The Lichen-Forming Ascomycete *Xanthoria Parietina* On The Island Storfosna, Central Norway, *Molecular Ecology* 15 , 1545–1559, (2006).

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

Plat, H., Bea E. Krenn And Ron Wever, The Bromoperoxidase From The Lichen *Xanthoria Parietina* Is A Novel Vanadium Enzyme, *Biochem. J.* 248, 277-279, (1987).

Silberstein, L., Siegel B. Z. , Siegel, S. M. , Mukhtar, A., and Galun, M., Comparative Studies On *Xanthoria Parietina*, A Pollution Resistant Lichen, *Andramalina Duriaei*, A Sensitive Species. Ii. Evaluation Of Possible Air Pollution-Protection Mechanisms, *The Lichenologist* /Volume 28 Issue 04 , Pp 367-383 (1996).

Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., Parietin, A Photoprotective Secondary Product Of The Lichen *Xanthoria Parietina*, *Oecologia*, 108, 412-418, (1996).

Türkiye İller Ansiklopedisi, 1. Cilt, Sayfa 198, Prizma Press, İstanbul, (2005).

Valérie Hofstetter, Jolanta Miadlikowska, Frank Kouv, François Lutzoni, Phylogenetic Comparison Of Protein-Coding Versus Ribosomal Rna-Coding Sequence Data: A Case Study Volume 2, Issue 2, Pages 113–118, April (1993).

Williams, JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535, (1990).