

LİKENLER VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ UYGULAMALARI

Lichens and Molecular Biological Applications

Demet CANSARAN DUMAN¹

¹Refik Saydam Hıfzıssıhha
Merkezi Başkanlığı,
İlaç ve Kozmetikler Araştırma
Müdürlüğü,
ANKARA

İletişim:

Demet Cansaran DUMAN

Refik Saydam Hıfzıssıhha

Merkezi Başkanlığı

İlaç Kozmetik ve Araştırma

Müdürlüğü

Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0 312 458 2129

Faks: 0 312 458 24 08

e-mail: dcansaran@yahoo.com

ÖZET

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), liken filogenisi ve populasyon genetiğinin moleküler incelemelerinin yapılabilmesi için oldukça basit ve güçlü bir tekniktir. Likenler alg ve mantardan oluşan simbiyotik bir birlikteliktir bu nedenle moleküler çalışmalarda özel dikkat edilmesi gerekir. Bu derlemede, likenlerden DNA ekstraksiyonu, RAPD metodu ve rRNA'nın ITS bölgesi çalışmaları üzerine yoğunlaşılmıştır. Önümüzdeki yıllarda, moleküler biyolojik teknikler daha güvenli tanımlamalar için kullanılabilir ve yeni moleküler teknikler liken filogenisini daha iyi anlayabilmemize katkıda bulunacaktır.

Anahtar Sözcükler: Liken, PCR, Moleküler Sistematik.

ABSTRACT

The Polymerase Chain Reaction (PCR) is a fairly simple but powerful technique for molecular investigations of lichen phylogeny and population genetics. Lichens are a symbiotic association of a fungus and alga, thus they require special considerations for molecular studies. The present review focuses on nucleic acid extraction from lichens studies on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method and the internal transcribed spacer regions of rRNA. In the coming years, molecular biological techniques will be used for more accurate identification of lichen and the newly available molecular methods will significantly contribute to our understanding of lichen phylogeny.

Key Words: Lichens, PCR, Molecular systematic.

GİRİŞ

Likenler; alg ve mantarların bir araya gelerek meydana getirdikleri morfolojik ve fizyolojik birliklerdir. Diğer bir deyişle likenler; alg ile mantarların kurdukları simbiyoz (ortak yaşayış) bir yaşam şeklidir. Fungus bileşeni (mikobiyont), yeşil algler veya mavi yeşil algler (fotobiyont) ile simbiyotik işbirliği kurmayı başaran bir Ascomycetes veya Basidiomycetes üyesidir. Bu ayrı bileşenler bir araya geldiklerinde liken oluşturmeyen fungus ve algler ile hiçbir benzerlik göstermeyen uzun ömürlü bir tallus meydana getirirler. Yapıya katılan fungus ve algler sadece tallustan kesit alındığında ve mikroskop altında incelendiğinde tanımlanabilirler (1). Bu birliktelikteki; mantar hücreleri, liken tallusunun ihtiyacı olan su, CO₂ ve mineral maddeleri temin eder. Alg hücreleri ise klorofili vasıtasıyla sentezlediği organik maddeleri ve çıkardığı oksijeni verirler. Çeşitli kaynaklara göre dünyadaki liken türü sayısı yaklaşık olarak 25.000 civarındadır (2).

Likenler ekolojik açıdan son derece önemli bir gruptur. Salgıladıkları liken asitleri ile kalkertli ve granitik kayaları kademeli olarak parçalarlar. Daha sonra oluşan bu ufak taşlar üzerinde yapraklı karayosunları gelişir. Bunun sonunda oluşan ince toprak tabakası ve humus üzerinde yüksek bitkiler gelişir. Bu nedenle likenler, bitki örtüsünün süksesyonal gelişim sürecinde öncül birlikteliklerdir. Ekonomik açıdan ise tıpta, besin ve parfümeri sanayisinde eski çağlardan bu yana kullanıla gelmişlerdir. Son yıllarda likenlerin oluşturdukları özel bileşiklerin antimikrobial (3), antiproliferatif, antinosiseptif, antiinflamatuvar, analjezik, antiprotozoal etkileri bulunmuş olup çok farklı bilim dallarına yönelik çalışmalara konu olmaya başlamışlardır. Ayrıca hava kirliliğinin belirlenmesi ve izlenmesinde likenlerin kullanımı güncel araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır.

LİKENLERİN SINIFLANDIRILMASINDA MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNTEMLERİN ÖNEMİ

Geleneksel taksonomi, çoğunlukla organizmaların morfolojik ve anatomik özelliklerine dayanır. Ancak,

günümüzde moleküler biyoloji tekniklerinin çok hızlı gelişmesi, taksonomi dahil olmak üzere tüm biyolojik disiplinleri etkilemiştir. Geleneksel teşhis anahtarları, organizmaların morfolojik, anatomik ve nadiren kimyasal özelliklerine göre çalışırlar. Ancak, bazen incelenen organizmaların özelliklerinin birbirine çok yakın olması nedeniyle sınıflandırılması oldukça zordur. Organizmaların kesin teşhis edilebilmesi için değişik türler arasında morfolojik ve anatomik özelliklerin farklılıkları yeterli olmaz. Bir diğer durumda da farklı habitatlarda yaşayan organizmalarda oldukça fazla değişiklikler meydana gelir, böylece aynı türlere ait organizmalar farklı morfolojik ve anatomik özellikler gösterirler. Doğal habitatlar içinde genomun yapısı üzerine çevre şartlarının etkisi olmaktadır. Bu nedenle, genotip; fenotipten daha stabildir ve genetik özellikler, taksonomide; morfolojik veya anatomik özellikleri kesinleştirmeye yardımcı olur (4).

Likenlerdeki sistematik çalışmalar; diğer organizmalarda olduğu gibi klasik olarak daha çok morfolojik karakterlere dayalı tanımlamaya dayanmaktadır. Likenlerin talluslarında içerdikleri liken asitlerinin belli kimyasal maddelerle reaksiyona girerek verdiği renk reaksiyonları tanımlanmalarına yardımcı faktördür. Fakat bu tanımlama çalışmaları da likenlerin sistematik kategorilerini tam olarak belirlemeye yetmemektedir (4).

Liken sistematğine kesinlik kazandıran moleküler biyolojik tekniklere dayalı olan PCR tekniğinin gelişiminden önce çok azdı. Moleküler çalışmaların başlamasından önce, Blum ve Keshevarov, *Lasallia* ve *Umbilicaria* genuslarının türlerinde akrabalık derecesini belirlemek için DNA hibridizasyonu yöntemi kullanmıştır (5,6). Çeşitli mantar kültürlerinden DNA'nın izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi 1987'de Ahmadjian ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. PCR uygulamalarının başlaması ile nükleik asitler yeni karakterlerin belirlenmesinde kullanılmıştır (7). Bugün populasyon genetiği ve mantar filogenisinin moleküler biyolojik incelemesi çalışmalarında PCR önemli bir yöntemdir.

Bu çalışmalar sonucunda elde edilecek bilgiler doğrultusunda, moleküler filogeniye dayalı olarak çalışılacak cinslerin taksonomik problemlerinin çözümlenmesi, liken oluşturan mantarların sınıflandırılmasındaki yerlerini moleküler boyutta ortaya koyması açısından oldukça büyük önem taşımaktadır.

LİKENLERDEN DNA İZOLASYONU

Likenlerden DNA izolasyonuna başlamadan önce; liken materyalini mikroskop altında ayrıntılı bir şekilde incelemek gerekir. Likenler, diğer liken türleri veya bitki grupları ile birlikte parazit veya ortak gelişebilirler (8). Bunlar; mantar, karayosunu, likenin üzerinde gelişen bir diğer liken olabilir. Bu nedenle incelenecek liken türü diğer organizmaların kontaminasyonundan dikkatlice ayrılmalıdır (9).

Standart DNA izolasyon protokolleri likenler ve mantarlar için de geniş ölçüde kullanılmakla birlikte, likenlerden ve mantarlardan DNA'nın izolasyonu ve çoğaltılabilmesi için birçok yöntem geliştirilmiştir (10-19). Geliştirilmiş bu yöntemlerle, izolasyon protokolu bir günde gerçekleştirilebilir ve elde edilen DNA eğer -20°C'de saklanabilirse en az üç sene moleküler uygulamalar için kullanılabilir (20). Lee ve Taylor (1990) tarafından yapılan bir çalışmada bazı yöntemlerin bazı likenler için çok uygun olmayabileceği ileri sürmüşlerdir (12). Bir diğer yöntemde ise polisakkaritlerin ayrılması için enzimatik muamele yöntemi kullanılmıştır (21).

Likenlerden DNA izole ederken dikkat edilmesi gereken bir konu ise, likenlerin çok fazla miktarda polisakkarit içermeleri nedeniyle yüksek konsantrasyonlarda enzimatik aktivitenin etkilenmesidir. Likenleri oluşturan mantar genellikle protein katalizini engelleyip fenolik bileşikler üretir; bu da polimeraz ve restriksiyon enzimlerinin aktivitesini engeller. Likenlerden DNA ekstraksiyonu yapılırken, birçok türde bulunan yüksek konsantrasyonlu polisakkaritler dikkatlice ayrılmalıdır. Bu amaçla, likenlerden DNA izole ederken CTAB (etil-trimetil amonyum bromür) (14, 17), SiO₂ (15), rezin gibi maddeler veya kromotografik kolonlar kullanılarak ilave saflaştırma yapılması ge-

rekmetedir (20).

Başarılı bir DNA izolasyonu yapabilmek için genellikle taze liken materyali kullanılmalıdır. Ancak, her zaman taze materyale ulaşılama- cağından herbaryum koleksiyonlarının kullanımına yönelik çalışmalar da yapılmıştır (18). Son yıllarda, herbaryumda bulunan mantarlardan ve likenlerden bozulmamış DNA izole edildiği belirlenmiştir (11,21,22). Ancak herbaryum materyallerinde farklı likenler ve mantarlar arasında DNA'nın elde edilmesinde saflık oranı değişiktir. Liken örneğinin yaşı 10'dan fazla ise bazı liken türlerinden (örneğin *Usnea*) yeterli miktarda DNA elde etmenin zor olduğu belirtilmiştir (23). Buna karşın 30 yıllık herbaryum örneği olan *Multiclavula mucida*'dan izole edilen DNA'da çok miktarda PCR ürünü elde etmek mümkün olmuştur (23). Aras ve Cansaran (2006) herbaryumda bulunan farklı liken örneklerinden dizi analizi yöntemi uygulanabilmesi için DNA izolasyonu protokolü gerçekleştirmişlerdir. Her biri en az 8 yıllık olan liken örneklerinden optimum koşullarda DNA izolasyonu sağlamışlardır. Böylelikle likenlerden DNA izolasyonunu sağlayan bu protokol ile herbaryum örneklerinden daha hızlı ve güvenilir DNA ürünü elde etmişlerdir (24).

Gargas ve arkadaşlarının 1994'de buzul kaplı alanlarda gelişen likenlerin DNA'sını izole etmek için çalışmışlardır. Buzullar eridikten sonra ortaya çıkan *Umbilicaria cylindrica* liken türünden DNA izole etmişlerdir. Bu türün, Radiokarbon döneminde 1300 yıl buz altında kaldığı ileri sürülmektedir. Başarılı bir şekilde DNA'nın PCR ile çoğaltılabilmesi, materyalin iyi bir şekilde korunması ile mümkündür. Bu nedenle özenle korunmuş liken ve mantar örnekleri uzun zaman periyodu içerisinde genetik farklılıklarını incelemek için kullanılabilir (25).

LİKENLERDE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUNA (PCR) DAYANAN UYGULAMALAR

Likenlerde sınıflandırma, liken oluşturan mantarın tanımlanması ile olur. Bu nedenle, likenler ile yapılan moleküler çalışmaların çoğu, birliktelikteki

mantarın (mycobiont) çekirdek ribozomal genleri ile yapılmıştır. Likenin yapısında ortak olan fotosentetik organizmaların (alg ve siyanobakteri) genetik materyalinin çoğaltılması iki şekilde engellenebilir. İlki, likenin tallusundan mantar materyali çeşitli yöntemlerle izole edilebilir, ikincisi ise oligonükleotid primerler ile mantarın DNA'sı seçilip çoğaltılabilir. Ancak birliktelikteki ortaklardan alg veya siyanobakteriler DNA izolasyonunda veya PCR tekniğinin uygulanmasında genellikle problem yaratmazlar. Mantarın ribozomal DNA (rDNA)'sı ile çalışıldığı zaman ise PCR'da bazı anormallikler meydana gelebilir. Yapılan bazı çalışmalarda primer çifti, taze materyal kullanılsa bile hedef bölgeyi her zaman çoğaltmayabilir. Diğer taraftan, liken örneğine diğer mantar türleri tarafından kontaminasyon olmadığı durumlarda bile birçok PCR ürünü meydana gelebilir. Bunun nedeni seçilen primer bölgelerinde insersiyon (ekleme)'ların olması olarak açıklanabilir. Çünkü bu insersiyonlar mantarların rDNA'sında oldukça çok bulunur ve bu durum daha da dikkatli çalışmayı gerektirir (21).

A- Likenlerde Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) Uygulamaları

Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) tekniği ile taksonomik olarak birbirine çok yakın türlerin farklılık dereceleri belirlenmekte ve tür içi varyasyonlar tanımlanabilmektedir. Özellikle farklı habitat ve populasyonlarda varyasyon gösteren örneklerin moleküler filogenisi belirlenerek taksonomik değerleri kesin olarak ortaya konulabilmektedir. Kısa primerler, genetik işaretleyici olarak kabul edilen fragmanların rasgele çoğaltılması için kullanılmaktadır. Bu teknik tüm genomun üzerindeki farklılıkları değerlendirmek için kullanılabilir.

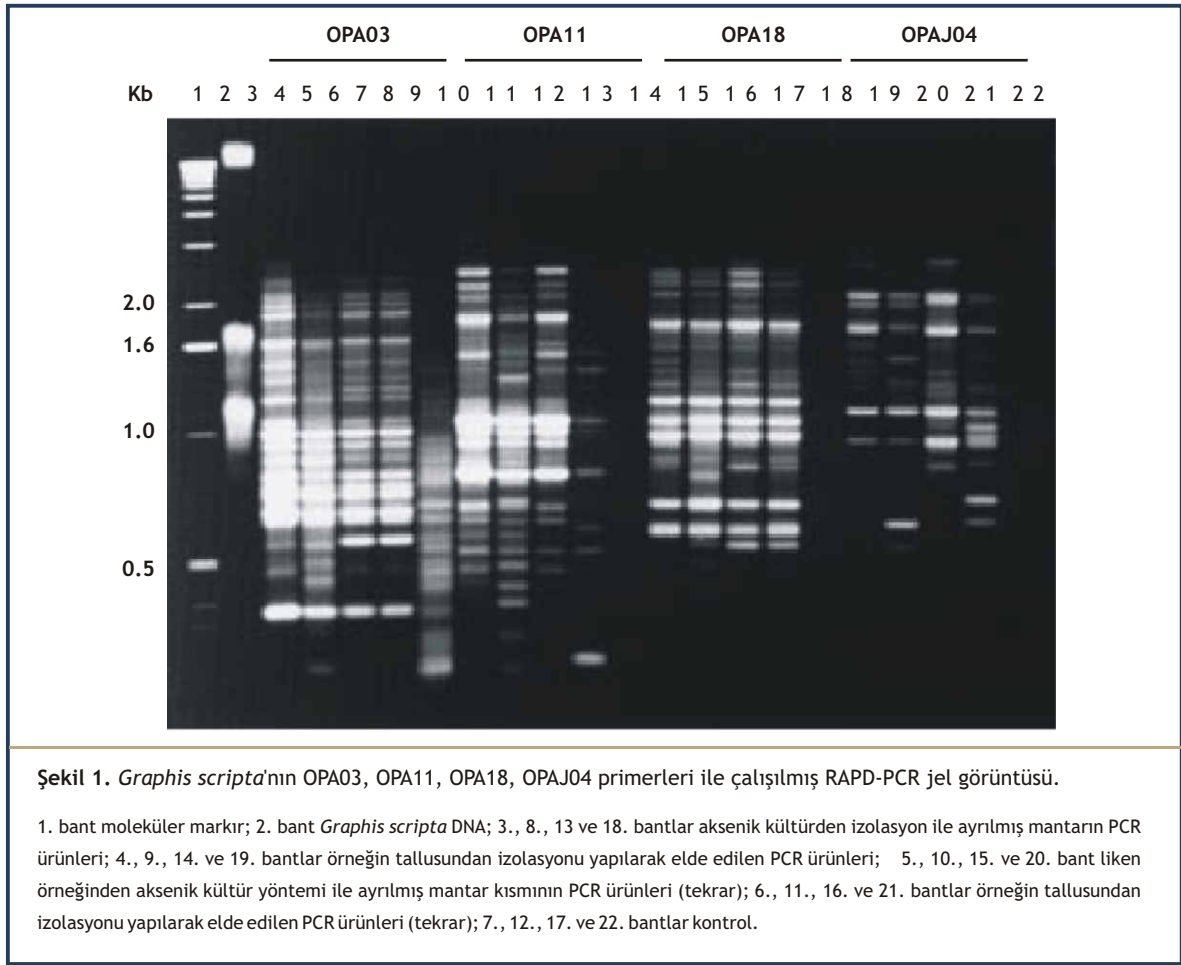
Likenlerin yapısında bulunan mantarlara RAPD-PCR tekniği uygulanırken karşılaşılan en büyük sorun, RAPD primerlerinin mantara özgü olmamasıdır. DNA izolasyonun tüm liken tallusuyla veya alg içeren apotesyumla yapılmış çalışmalarını çok güvenilir sonuçlar vermemiştir; çünkü bu yöntemle her iki simbiyontun DNA'sı da çoğaltılmış olmaktadır. Son yıllarda RAPD

tekniği uygulaması ile yapılan çalışmalarda, apotesyumun (askusdan spor taşıyarak) veya tallusun alg içermeyen kısımlarını (örneğin; biatorine apotesyum, liken örneğinin merkezi ipliği, kabuksu likenlerin medulla kısmı) veya aksenik kültüre alınan liken örneğinin mantar kısmının DNA'sını izole ederek bu soruna çözüm getirilmiştir (20). Yapılan birçok çalışmada, podesyum (26), basid (27), askus (15) ve rizinlerden (17) başarılı DNA izolasyonları ve bunun sonucunda RAPD-PCR tekniği uygulanabildiği belirlenmiştir.

Değişik bölgelerdeki liken populasyonları arasındaki farklılıkların belirlenmesi ile karışık bant desenlerinin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (28). Murtagh vd. 1999'da *Graphis scripta*'nın RAPD tekniği ile filogenetik analizini yapmışlardır. DNA izolasyonu hem tallusun tümünden hemde tallustan aksenik kültürle izole edilen mantar kısmı ile izolasyonunu yapıp değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, aksenik kültür ile mantar kısmı izole edilerek çalışılan liken materyalinden DNA izolasyonundan ve PCR uygulamalarından daha sağlıklı sonuçlar alındığını göstermişlerdir (29) (Şekil 1). Honegger ve Zippler (2007)'de Parmeliaceae, Ramalinaceae ve Physciaceae familyalarına ait türlerde tek spor izolasyonu yöntemi ile genomik DNA'yı RAPD-PCR yöntemi kullanarak analiz etmişlerdir (30).

B- Likenlerde Transkripsiyonu Yapılan İç Ara Bölgeler (ITS) ile İlgili Uygulamalar

Çekirdek rRNA'daki tekrar birimleri [örneğin; Transkripsiyonu Yapılan İç Ara Bölgeler (ITS)] hızlı evrimleşir ve cins veya populasyonlar içinde türler arasındaki farklılıkları gösterir (31). Likenlerde PCR yöntemiyle ITS bölgesinin dizi analizi yöntemi ile çalışılabilmesi için, likenin mantar kısmının DNA'sı çoğaltılırken en önemli ve uygun metot PCR primerleri olarak spesifik-mantar oligonükleotidlerinin kullanılmasıdır. Mantara özgü spesifik primerlerin olması bu yöntemi kullanırken, likenin mantar, alg ve siyanobakteri içeren tallusunun tümünden DNA izole etmeyi mümkün hale getirmiştir. 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 (32-34). Optimize edilmiş PCR şartlarında kullanılması gereken primer çiftleri içinden spesifik mantar primerlerinden yalnızca biri yeterlidir (Örneğin ITS1, ITS1F, ITS4 primerleri gibi). Bu primerler likenin mantar kısmında rDNA'ya ait ara bölgeleri (ITS) kopyalayarak çoğaltmasını sağlar (27, 34). PCR uygulaması için farklı primer çiftleri ile hedef bölgenin çoğaltılması tavsiye edilir. PCR ürünlerin çoğaltılması ve dizi analizi yöntemi uygulamaları için kolaylık ve çabukluk sağlar. Likenin yapısında bulunan mantarın PCR ürünlerinden dizi analizi yöntemi en çok uygulanan tekniktir ve günümüzde otomatik dizi analizi sistemi kısa zamanda

genomdaki dizi hakkında bilgi edinmeye izin vermektedir.

Dyen ve Murtagh (2001) Doğu Antartika'da Vestfold Tepelerinde bulunan *Buellia frigida* ve *Xantharia elegans* liken türü ile yaptıkları çalışmadaki genetik varyasyonları 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 (35).

Murtagh ve arkadaşları (2002) değişik coğrafik lokalitelerden ve iklim şartlarından toplanan *X. elegans* örnekleri ile yaptıkları çalışmada ITS bölgelerinin incelenmesi yanı sıra RAPD tekniği de uygulamışlardır. Her iki teknik de oldukça yüksek genetik varyasyonun varlığını ortaya koymuştur (36).

Krzeminska ve arkadaşları *Cetraria* cinsinde moleküler tayin anahtarları oluşturmak üzere Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizi gerçekleştirmişlerdir. Bu analizde yine ITS bölgeleri PCR'la çoğaltılmış ve restriksiyon kesim enzimleri (RE) ile kesilmiştir. Sonuçta elde edilen polimorfizmi ifade eden değişik bant desenleri ile moleküler tanımlama anahtarları oluşturulmuştur (37).

Literatürde, rDNA, ITS bölgeleri incelenerek genetik farklılık ve benzerlikleri tanımlanan daha birçok liken türü bulunmaktadır. Högberg ve arkadaşları (2002) *Letharia vulpina* türünün kıtalararası popülasyonlarının genetik farklılaşmasını çalışmışlardır (38). Grube ve Arup (2001), *Physciaceae* familyasına ait değişik cinsleri yine ITS verilerine göre değerlendirilmiştir (39). Rios ve arkadaşları (2002) *Rimularia insularis*'e ait ITS verilerini çalışmalarında kullanmışlardır (40). Martin ve arkadaşları (2003) ise *Diploschistes* genusunun moleküler filogenisini (41), Cansaran ve ark.'ları 2006'da *Rhizoplaca* genusunun (42), Aras ve ark.'ları ise 2007'de *Aspicilia* genusunun ITS bölgesinin dizi analizini yaparak incelemişlerdir (43).

Ayrıca son yıllarda rRNA'daki ITS bölgesinin çoğaltılması ile yapılan çalışmalara ilave olarak, genomda daha detaylı incelemeler yapılmaya başlanmıştır. Hofstetter ve ark. 2007'de Lecanoromycetes sınıfına ait türlerde protein kodlayan RPB1 ve RPB2 geni ve ribozomal RNA'yı kodlayan çekirdek küçük alt ünitesi (nucSSU), çekirdek büyük alt ünitesi (nucLSU) ve mitokondri küçük alt ünitesinin tümünü kapsayan incelemelerde bulunmuştur. Bu çalışma maksimum olasılıklı bootstrap istatistiksel analizi ile yorumlanmıştır. Yapılan filogenetik analizler sonucunda Lecanoromycetes'in alt grupları olan Acarosporomycetidae, Ostropomycetidae ve Lecanoromycetidae'e ait türlerin ayrımın net bir şekilde yapılmıştır (44). Yine, Gueidan ve ark.'ları 2007'de Verrucariaceae familyasına ait 83 liken türünde çoklu lokus filogenisini inceleyerek (çekirdek büyük alt ünitesi, çekirdek küçük alt ünitesi ve RPB1) sistematik dizilimini tekrar yapılandırmışlar. Böylelikle morfolojiye dayalı olan sınıflandırmayı moleküler filogeni a-

nalizleri ile sağlamlaştırmışlardır (45).

SONUÇ

PCR tekniği, liken yapısındaki mantarın çekirdek rDNA'sındaki genetik farklılığın araştırılması için mükemmel bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. Dizi analizi yöntemi ile yapılacak yeni çalışmalarla birlikte liken filogenisini daha iyi anlayabilmemize çok fazla katkıda bulunacaktır. Örneğin, *Ascomycetes* sınıfının farklı ordolarının birçok türüne moleküler biyoloji teknikleri uygulanarak, liken birliğindeki üyelerin evrimsel yorumu üzerine görüşlerimizin artması sağlanacaktır.

Yapılacak yeni çalışmalarla liken popülasyonları, familya, genus ve türleri arasında ve kendi içindeki evrim süreci hakkında bilgimizi artıracaktır. Böylece likenin yapısındaki mantarın farklı gruplar içindeki filogenetik ayrımı ile kimyasal ve morfolojik karakterler ile genetik bilgi arasında bağlantı kurmak mümkün olacaktır.

ITS bölgeleri, rDNA'daki büyük alt ünite (LSU) ve protein kodlayan genler filogenetik çalışmalar için kullanılacak karakterlerin önemli kaynakları olarak moleküler sistematik bilgilerine eklenecektir. Moleküler teknikler kullanılarak yapılacak çalışmalar önümüzdeki yıllarda liken sistematikliğinde daha net ayrımlar yapılabilmesini olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Hale ME. The Biology of Lichens. London: Cambridge, 1974; 1-200.
2. Ahmadjian V. The Lichen Symbiosis. New York: Wiley, 1993; 1-264.
3. Duman-Cansaran D. Farklı Liken Örneklerindeki Usnik Asit Miktarlarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemi İle Belirlenmesi ve Antimikrobiyal Aktiviteleri. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 2007; 64(3): 17-21.
4. Guzow B, Garniak MK, Wegrzyn G. Molecular determination keys: construction of keys for species identification based on restriction fragment length polymorphism. Int Arch Biosci, 2001; 1057-67.

5. Blum OB, Kashevarov GP. The DNA homologies as a proof of the legitimacy of the establishment of the lichen genus *Lasallia* Merat (*Umbilicariaceae*). Doklady Akademii nauk Ukrainskoi SSR, Ser. B, 1986; 61-4.
6. Blum OB, Kashevarov GP. The DNA homologies as a proof of the legitimacy of the establishment of the lichen genera *Lasallia* merat, *Cladina* (Nyl.) harm. and *Pseudevernia* Zopf. IAL2 Abstracts, 1992; 1.
7. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. Methods in Enzymology, 1987; 155: 355-350.
8. Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. CAB International, England: Wallingford, 1995:350-5.
9. Petrini O, Hale U, Dreyfuss MM. An analysis of fungal communities isolated from fruticose lichens. Mycologia, 1990; 82: 444-51.
10. Lee SB, Milgroom MG, Taylor JW. A rapid, high-yield miniprep method for isolation of total genomic DNA from fungi. Fungal Genet Biol, 1988; 35: 23-4.
11. Bruns TD, Fogel R, Taylor JW. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. Mycologia, 1990; 82(2): 175-84.
12. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications In: Lee SB, Taylor JW, eds. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. San Diego: Academic Press, 1990: 282-87.
13. Armeleo D, Clerc P. Lichen chimeras: DNA analyses suggest that one fungus forms two morphotypes. Exp Mycol, 1991; 15: 1-10.
14. Armeleo D, Clerc P. A rapid and inexpensive method for the purification of DNA from lichens and their Symbionts. Lichenologist, 1995; 27: 207-13.
15. Grube M, DePriest PT, Gargas A, Hafellner J. DNA isolation from lichen ascomata. Mycological Research, 1995; 99: 1321-24.
16. Landvik S, Shailer NFJ, Eriksson O. SSU rDNA sequence support for a close relationship between the Elaphomycetales and the Eurotiales and Onygenales. Mycoscience, 1996; 37: 83-92.
17. Crespo A, Bridge PD, Hawksworth DL. Amplification of fungal rDNA-ITS regions from non-fertile specimens of the lichen-forming genus *Parmelia*. Lichen, 1997; 29: 275-82.
18. Cubero FO, Crespo A, Fatehi J, Bridge PD. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. Pl. Syst. Evol., 1999; 216: 243-49.
19. Grube M. Nucleic acid isolation from ecological samples-fungal associations, lichens. Method Enzymol, 2005; 395: 48-57.
20. Bridge PD, Arora DK, Reddy CA, Elander RP. Applications of PCR in Mycology. In: Crespo A, Cubero OF, Grube M, eds. PCR Applications in Studies of Lichen-Forming Fungi. Cab International, 1998: 231-69.
21. Kranner I, Beckett RP, Varma AK. Protocols in Lichenology. New York: Springer, 2002: 1-580.
22. Herrman B, Hummel S. Ancient DNA. In: Taylor JW, Swann EC, eds. DNA from herbarium specimens. Berlin. Springer-Verlag, 1994.
23. Gargas A, DePriest PT, Grube M, Tehler A. Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. Science, 1995; 268:1492-95.
24. Aras S, Cansaran D. Isolation of DNA for sequence analysis from herbarium material of some lichen specimens. Turk J Bot, 2006; 30: 449-53.
25. Gargas A, DePriest PT, Ivanova N. Glacier-covered lichens: sources of ancient DNA. IMC5 Abstracts, 1994: 69.
26. DePriest PT, Been MD. Numerous group I introns with variable distribution in the ribosomal DNA of a lichen fungus. Journal of Molecular Biology, 1992; 228: 315-21.
27. Lutzoni F, Vilgalys R. *Omphalina* (Basidiomycota, Agaricales) as a model system for the study of coevolution in lichens. Cryptogamic Botany, 1995; 5: 71-81.
28. Cubero FO, Crespo A, Ochando MD. Aplicacion de latecnica de RAPD a estudios en liquenes. Resumenes de IXI Simposium Nacional de Botanicacriptogamica, Santiago de Compostela, 1995: 231.
29. Murtagh GJ, Dyer PS, McClure PC, Crittenden PD. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers as a tool to study variation in lichen-forming fungi. Lichenologist, 1999; 31: 257-67.
30. Honegger R, Zippler U. Mating systems in representatives of Parmeliaceae, Ramalinaceae and Physciaceae (Lecanoromycetes, lichen forming ascomycetes). Mycological Research, 2007; 424-32.
31. 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, 1990: 315-22.
32. Gargas A, Taylor JW. Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. Mycologia, 1992; 84: 589-92.

33. Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes. Application to the identification of mycorrhizae and rust. *Molecular Ecology*, 1993; 2: 113-8.
34. Gargas A, DePriest PT. A nomenclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing SSU rDNA. *Mycologia*, 1996; 88: 745-8.
35. Dyen PS, Murtagh GJ. Variation in ribosomal ITS sequence of lichens *Buellia frigida* and *Xanthoria elegans* from vestfold Hills, eastern Antarctica. *Lichenologist*, 2001; 33(2): 151-9.
36. Murtagh GJ, Dyer PS, Furneaux PA, Crittenden PD. Molecular and physiological diversity in bipolar lichen-forming fungus *Xanthoria elegans*. *Mycol. Res.*, 2002; 106(11): 1277-86.
37. Krzeminska BG, Gorniak M, Wegrzyn G. Molecular determination keys: construction of keys for species identification based on restriction fragment length Polymorphism. *Int Arch Biosci*, 2001; 1057-67.
38. Högborg N, Kroken S, Thor G, Taylor JW. Reproductive mode and genetic variation suggest a North American origin of European *Letharia vulpina*. *Molecular Ecology*, 2002; 11: 1191-96.
39. Grube M, Arup U. Molekuler and morphological evolution in the Physciaceae (*Lecanorales*, lichenized Ascomycota), with special emphasis on the genus *Rinodina*. *Lichenologist*, 2001; 33(1): 63-72.
40. Rios A, Ascaso C, Grube M. An ultrastructural Anatomical and molecular study of the lichenicolous lichen *Rimularia insularis*. *Mycol. Res.*, 2002; 106 (8): 946-53.
41. Martin MP, LaGreca S, Lumbsch T. Molecular phylogeny of *Diploschistes* inferred from ITS sequence data. *Lichenologist*, 2003; 35(1): 27-32.
42. Cansaran D, Aras S, Kandemir I, Halıcı M.G. Phylogenetic relations of *Rhizoplaca* Zopf from Anatolia inferred from ITS sequence data. *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 2006; 5/6: 405-12.
43. Aras S, Cansaran D, Özdemir-Türk A, Kandemir I, Candan M. Resolving genetic relationships in manna group of lichens from genus *Aspicilia*. *African Journal of Biotechnology*, 2007; 6: 1154-1160.
44. 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*, 2007; 44: 412-426.
45. Gueidan C, Roux C, Lutzoni F. Using a multigene phylogenetic analysis to assess generic delineation and character evolution in Verrucariaceae (Verrucariales, Ascomycota). *Mycological Research*, 2007; 110: 1147-1170.