

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

Neotinea ustulata ve *Neotinea tridentata* (Orchidaceae)

TÜRLERİNİN FİLOGENETİK ANALİZLERİ

ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Kaan HÜRKAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **03/07/2015**

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

ÇANAKKALE

Kaan HÜRKAN tarafından Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN yönetiminde hazırlanan ve **03/07/2015** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “*Neotinea ustulata* ve *Neotinea tridentata* (Orchidaceae) Türlerinin Filogenetik Analizleri Üzerine Çalışmalar” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

Başkan

Prof. Dr. Ahmet GÖNÜZ

Üye

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Üye

Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER

Üye

Yrd. Doç. Dr. Hilal ÖZKILINÇ

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Kaan HÜRKAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bana yaratıcı fikirleri ile ilham veren, yeni teknikler uygulama konusunda cesaretlendiren, motivasyonumu yüksek tutan ve çalışmamın tamamlanmasına sonsuz katkısı olan değerli danışmanım Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN'a,

Yüksek Lisans araştırmalarımın bugüne kadar yaptığım çalışmaların arkasında duran, çalışma temposu, isteği ve disiplinini örnek aldığım Yüksek Lisans Tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Ahmet GÖNÜZ'e,

Orkideleri öğrenmem ve hayran olmamı sağlayan, arazi tekniği konusunda bana değerli tecrübelerini aktaran, orkide sistematığı ve filogenisindeki eksik alanları görüp beni yönlendiren değerli orkide bilimci hocam Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER'e,

Tez savunma sınavıma katılarak değerli yorumları, fikir ve görüşleri ile tezin değerinin artmasına katkıda bulunan değerli hocam Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya

Tez çalışmamda kullandığım Avrupa örneklerinin toplanmasında ve analizinde bana yardımcı olan, Debrecen Üniversitesi (Macaristan) laboratuvarında gerçekleştirdiğim çalışmalarımın bana destek veren ve moleküler bitki filogenisi konusunda bana aktardığı önemli tecrübeleri için Dr. Sramkó GABOR'a,

Tez İzleme Komitesi toplantılarımda çalışma konumu destekleyen, moleküler filogeni konusunda tavsiyeleri ve fikirleri için Yrd. Doç. Dr. Hilal ÖZKILINÇ'a,

Laboratuvar çalışmalarımın bana destek olan, problemleri aşmama yardımcı olan, yoğun çalışma temposunda bile yaptığım işten keyif almamı sağlayan değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Fatih SEZER ve Uzm. Biyolog Aslıhan ÖZBİLEN'e,

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi açıdan beni destekleyen, güvenen, kararlarımın arkasında durmamı sağlayan annem Sema HÜRKAN, babam Atilla HÜRKAN ve kardeşim Mine HÜRKAN'a,

Hayatımın son beş yılını mutlu geçirmeme neden olan, her zaman yanımda olan beni destekleyen Uzm. Biyolog Yasemin KEMEÇ'e sonsuz teşekkürler.

Kaan HÜRKAN

Çanakkale, Temmuz 2015

SİMGELER VE KISALTMALAR

MP	Maximum Parsimony
ML	Maximum Likelihood
nrITS	Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer
BI	Bayesian Inference
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
BSA	Bovine Serum Albumin
DMSO	Dimetil sülfoksit
EPA	Ek Polimorfizm Alanları
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
IGS	Intergenic Spacer
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
IPNI	The International Plant Names Index
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
PVP	Polyvinylpyrrolidone
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
PAUP	Phylogenetic Analysis Using Parsimony
Kb	Kilo Baz
EPA	Eklenti Polimorfizm Alanları
APS	Additional Polymorphic Sites

ÖZET

Neotinea ustulata ve *Neotinea tridentata* (Orchidaceae) TÜRLERİNİN FİLOGENETİK ANALİZLERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Kaan HÜRKAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

03/07/2015, 75

Bu doktora tez çalışmasının amacı: Avrupa ve Anadolu'nun, Akdeniz ve Akdeniz dışı bölgelerinde yayılış gösteren yakın ilişkili *Neotinea tridentata* (Scop.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase ve *Neotinea ustulata* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase türlerinin genomik (nrITS) ve kloroplast (*accD-psaI*) DNA dizileri kullanılarak (i) filogenetik yapılarının incelenmesi, (ii) ribotip farklılıklarının test edilmesi, (iii) coğrafi olarak genetik farklılıklara sahip olma durumlarının ortaya çıkarılması ve (iv) iki tür arasında yaşanmış tarihsel bir melezleşme olayının, veriler ışığında tartışılmasıdır.

Bu doktora tez çalışmasında şu hipotezler araştırılmıştır; (i) Anadolu'da ve Avrupa'da yayılış gösteren *N. tridentata* bireyleri melezleşme geçmişine sahip olduklarından aynı ribotiplere sahiptir, (ii) Anadolu'da yayılış gösteren *N. tridentata* bireyleri heterozigoti gösterebilir, (iii) Anadolu'da ve Avrupa'da yayılış gösteren *N. tridentata* bireyleri farklı ribotiplere sahiptir.

N. tridentata ve *N. ustulata* türlerine ait taze yapraklar Türkiye, Yunanistan, Macaristan, Hırvatistan, Bulgaristan, Çek Cumhuriyeti ve Romanya'dan 2012 – 2014 yılları arasında toplanmış ve DNA izolasyonu yapılmıştır. İlgili primer çiftleri ile nrITS ve *accD-psaI* bölgeleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile çoğaltılmış ve nükleotid dizilişleri ortaya çıkarılmıştır. Çalışmada ilk olarak, ortaya çıkarılan genomik ve plastid DNA dizileri Basic Local Search Alignment Tool (BLAST) ile veri bankalarındaki mevcut diziler ile karşılaştırılmıştır. Daha sonra elde edilen tüm diziler Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP) ve Bayesian Posterior Probability (BPP) algoritmaları kullanılarak filogenetik ağaçlar çizilmiştir. Bu ağaçlarda Anadolu ve Avrupa yayılışlı *N.*

tridentata bireyleri farklı kladlara yerleşirken, Anadolu yayılışlı *N. tridentata* bireyleri ile Avrupa yayılışlı *N. ustulata* bireyleri aynı klad içerisine yerleşmiştir. Ayrıca bazı Anadolu yayılışlı *N. tridentata* bireylerinde heterozigoti görülmüştür. Bu sonuçlar Anadolu kaynaklı *N. tridentata* bireylerinin *N. ustulata* türü ile bir melezlenme geçmişinin olduğunu göstermektedir. Çift ebeveynli ve tek ebeveynli kalıtım gösteren dizilerden elde edilen filogenetik ağaçlar, melezlenmenin belirlenmesinde önemli bilgiler vermektedir. Buna karşın, melezlenme sürecini daha detaylı anlayabilmek ve moleküler tarihlendirme çalışmaları için ileride bu orkide türlerinin tüm plastid genom dizilerinin ortaya çıkarılmasını tavsiye etmekteyiz.

Anahtar sözcükler: *Neotinea tridentata*, *Neotinea ustulata*, Melezlenme, Internal Transcribed Spacer, Orchidaceae, Moleküler Filogeni.

ABSTRACT

STUDIES ON PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *Neotinea ustulata* and *Neotinea tridentata* (Orchidaceae)

Kaan HÜRKAN

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Doctoral Dissertation in Plant Science

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

03/07/2015, 75

The aims of this thesis research are: (i) check phylogenetic structure, (ii) discuss having identical ribotypes, (iii) conclusion of geographic ribotype variations and (iv) reveal the hybridisation possibility of closely related orchids, *Neotinea tridentata* (Scop.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase and *Neotinea ustulata* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase, spread in the Anatolian and extra–Anatolian regions based on the genomic (nrITS) and plastid (*accD–psaI*) DNA sequences.

Following hypotheses were investigated in this PhD thesis: (i) Anatolian *N. tridentata* and European *N. ustulata* species have identically preserved ribotypes because of having a hybridisation history, thus (ii) Anatolian *N. tridentata* individuals may show heterozygoty, (iii) Anatolian and extra–Anatolian *N. tridentata* have different ribotypes.

Fresh leaves of *N. tridentata* and *N. ustulata* from various countries, including Turkey, Greece, Italy, Hungary, Croatia, Bulgaria, Czech Republic and Romania, collected in 2012–2014 and DNA samples were isolated using the CTAB method. nrITS and *accD–psaI* regions were amplified and then sequenced. We conducted phylogenetic analysis for a data set consisting of genomic and plastid sequences and related sequences obtained from BLAST search against plant genomic databases using Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP) and Bayesian Posterior Probability (BPP) methods. Results show that the Anatolian and European *N. tridentata* individuals are distributed on different clades of the phylogenetic tree. Moreover, Anatolia distributed *N. tridentata* individuals are placed on same clade with *N. ustulata*. Additionally, some Anatolian *N. tridentata* individuals showed heterozygoty. Therefore we infer that Anatolia originated *N. tridentata*

and European *N. ustulata* shares a hybridisation history. Comparative phylogenetic trees gathered from the sequences of biparental and maternally inherited regions provide valuable data to detect hybridisation. However, increase our understanding of the hybridisation process and further molecular clock studies, we suggest sequencing whole plastid genome of these species.

Keywords: *Neotinea tridentata*, *Neotinea ustulata*, Hybridization, Internal Transcribed Spacer, Orchidaceae, Molecular Phylogeny.

İÇİNDEKİLER

TEZ SINAV SONUÇ BELGESİ.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
BÖLÜM 1 - GİRİŞ.....	1
1.1. Salepgiller Familyası Hakkında Genel Bilgiler	1
1.2. Botanik Özellikleri	3
1.3. Türkiye Orkideleri.....	5
BÖLÜM 2 - ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1. Orkide Moleküler Filogenisi, Evrimsel Geçmişi ve Filogeni Çalışmalarında DNA Verilerinin Kullanımı.....	7
2.2. Filogeni Çalışmaları İçin Genom Bölgelerin Seçimi	8
2.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Türler ve DNA Bölgeleri İle İlgili Önceki Çalışmalar	11
BÖLÜM 3 - MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1. Bitki Materyali	18
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Bitki teşhisi	26
3.2.2. DNA izolasyonu.....	26
3.2.3. Uygulanan CTAB yöntemi.....	27
3.2.4. nrITS bölgesinin PZR ile çoğaltılması	28
3.2.5. <i>accD</i> – <i>psaI</i> bölgesinin PZR ile çoğaltılması	30
3.2.6. PZR ürünleri saflaştırma yöntemi.....	31
3.2.7. Agaroz jelden PZR ürünü saflaştırma yöntemi	31
3.2.8. PZR ürünleri saflaştırma protokolü.....	32
3.2.9. DNA dizileme	32
3.2.10. DNA dizilerinin işlenmesi ve düzenlenmesi	32
3.2.11. DNA dizilerinin hizalanması “Alignment”	33
3.2.12. DNA dizisi nükleotid değişikliği çalışması	34

3.2.13. Filogenetik ağaçların oluşturulması	34
BÖLÜM 4 - ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	37
4.1. DNA İzolasyonu	37
4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları	40
4.2.1. nrITS bölgesine ait PZR bulguları	40
4.2.2. <i>accD-psaI</i> bölgesine ait PZR bulguları	43
4.3. DNA Dizileme Bulguları	47
4.4. Biyoenformatik Bulgular	48
4.5. Filogenetik Bulgular	56
4.5.1. nrITS bulguları	56
4.5.2. <i>accD-psaI</i> bulguları	62
BÖLÜM 5 - SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. nrITS bölgesinin şematik gösterimi	9
Şekil 2.2. <i>accD-psaI</i> bölgesinin şematik gösterimi	11
Şekil 3.1. Tez çalışmasında kullanılan bitki örnekleme haritası.....	21
Şekil 3.2. <i>N. tridentata</i> genel ve çiçek detay görünümü	22
Şekil 3.3. <i>N. ustulata</i> genel ve çiçek detay görünümü.....	24
Şekil 3.4. <i>N. tridentata</i> ve <i>N. ustulata</i> türlerinin Türkiye'deki yayılış haritası.....	26
Şekil 3.5. 1kb DNA Ladder haritası	29
Şekil 3.6. 100 bç DNA Ladder haritası.....	29
Şekil 4.1. DNA izolasyonu sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	40
Şekil 4.2. nrITS bölgesine ait birinci PZR ürün grubunun agaroz jel elektroforez görüntüsü	41
Şekil 4.3. nrITS bölgesine ait ikinci PZR ürün grubunun agaroz jel elektroforez görüntüsü	42
Şekil 4.4. nrITS bölgesine ait üçüncü PZR ürün grubunun agaroz jel elektroforez görüntüsü	42
Şekil 4.5. nrITS bölgesine ait dördüncü PZR ürün grubunun agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	43
Şekil 4.6. nrITS bölgesine ait beşinci PZR ürün grubunun agaroz jel elektroforez görüntüsü	44
Şekil 4.7. <i>N. tridentata</i> (Adana-TR, kuyucuklar 1,2 ve 3) ve <i>N. tridentata</i> (Hatay-TR, kuyucuklar 4,5 ve 6) örnekleri için 3'er tekrarlı PZR sonucu.....	45
Şekil 4.8. <i>N. tridentata</i> (Adana-TR, kuyucuk 3, 28,77 ng/µl) ve <i>N. tridentata</i> (Hatay-TR, kuyucuk 4, 26,98 ng/µl) örneklerine ait <i>accD-psaI</i> PZR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi görüntüleri.....	46
Şekil 4.9. <i>N. tridentata</i> (Antalya-TR) örneğine ait <i>accD-psaI</i> PZR ürününün (31,08 ng/µl) agaroz jel elektroforezi görüntüsü	47
Şekil 4.10. <i>accD-psaI</i> bölgesine ait birinci grubun PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	47
Şekil 4.11. <i>accD-psaI</i> bölgesine ait ikinci grubun PZR ürünlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	48
Şekil 4.12. DNA bölgelerinin varyasyon yüzdelerinin karşılaştırıldığı grafik	55

Şekil 4.13. Ek polimorfizm alanları'nın DNA dizi kromatogramları üzerinde görünümü.....	56
Şekil 4.14. nrITS verileri ile çizilmiş maximum-likelihood filogramı	58
Şekil 4.15. nrITS verileri ile çizilmiş maximum parsimony filogramı.....	59
Şekil 4.16. <i>Neotinea</i> ve yakın akrabalarının MP kladogramı	60
Şekil 4.17. nrITS verileri ile çizilmiş bayesian posterior output filogramı	61
Şekil 4.18. <i>accD-psaI</i> verileri ile çizilmiş maximum-likelihood filogramı	62
Şekil 4.19. <i>accD-psaI</i> verileri ile çizilmiş maximum parsimony filogramı	63
Şekil 4.20. <i>accD-psaI</i> verileri ile çizilmiş bayesian posterior probability filogramı.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. <i>Neotinea tridentata</i> grubu için teşhis anahtarı	4
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bitkilere ait detaylı örnekleme tablosu	19-20
Çizelge 3.2. nrITS bölgesinin PZR tekniği ile çoğaltılması için kullanılan primer dizileri	30
Çizelge 3.3. nrITS bölgesi için kullanılan PZR karışımı.....	30
Çizelge 3.4. nrITS bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR profili.....	30
Çizelge 3.5. accD – psal bölgesinin PZR tekniği ile çoğaltılması için kullanılan primer dizileri	31
Çizelge 3.6. accD – psal bölgesi için kullanılan PZR karışımı.....	31
Çizelge 3.7. accD – psal bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR profili	31
Çizelge 3.8. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) anlaşmazlık sembolleri.....	34
Çizelge 4.1. DNA miktar ve kalite ölçümleri NanoDrop sistemi ile yapılan örnekler	39
Çizelge 4.2. Şekil 4.1’de örneklerin kuyucuk sıralaması ve Qubit DNA miktarı ölçümleri	40
Çizelge 4.3. Şekil 4.5’te bulunan agaroz jel elektroforezi görüntüsündeki PZR ürün miktarlarının Qubit 2.0 cihazı ile ölçüm sonuçları	43
Çizelge 4.4. nrITS bölgesinde bulunan ITS1, 5.8S ve ITS2 parça uzunlukları.....	50
Çizelge 4.5. DNA dizileme sonuç raporu	52
Çizelge 4.6. nrITS dizilerinde karşılaşılan Ek Polimorfizm Alanları (EPA) tablosu	54
Çizelge 4.7. Çalışmada kullanılan DNA bölgelerinin detaylı karşılaştırma tablosu.....	55

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1. Salepgiller Familyası Hakkında Genel Bilgiler

Çiçekli bitkiler grubu içerisinde 27.801 takson kabul edilmiş olup, bunlar arasında ilk sırada 32.913 takson ile Papatyagiller (Asteraceae) ikinci sırada ise 27.801 takson ile Salepgiller (Orchidaceae, Orkideler) yer almaktadır (The Plant List, 2015). Orkidelere her yıl ortalama 500 yeni takson ve 13 yeni cins tanımlanmaktadır, fakat bu tanımlamaların büyük bir çoğunluğunu yeni keşfedilenler değil, taksonomik yenilemeler ile diğer cinslerden ayrılan gruplar oluşturmaktadır (Chase ve ark., 2015).

Orkideler, çok değişken habitatlarda yaşayan ve dünyanın hemen her tarafına yayılmış kozmopolit bir familyadır. Orkidelerin %70 kadarı başka bitkiler üzerinde yaşamlarını sürdüren epifit formda, %25 kadarı toprakta yaşayan karasal formda ve %5'lik bölümü ise toprak altında, litofit olarak kayaların üzerinde veya saprofit olarak çürüyen bitkilerin üzerinde yaşam sürdüren bitkilerdir (Arditti, 1979; Renz ve Taubenheim, 1984). Orchidaceae familyasının yaklaşık 450 cins ve 18.000 – 20.000 türle çiçekli bitkilerin en geniş familyalarından biri olduğu bildirilmiştir (Sezik, 1984). Ayrıca bu familyanın bitkiler aleminin en zengin familyası olduğu ifade edilmiştir (Arditti, 1979). Orchidaceae familyasının bitkiler alemindeki yeri aşağıda şematize edilmiştir.

Ekvatorial bölgelerde bulunan ve çok sık ağaçlı veya yüksek yoğun otlu tropikal ormanlarında, ağaçların zeminde meydana getirdiği koyu gölgelik bölgeler zemin bitkileri açısından oldukça fakirdir. Bu bölgelerde bitkilerin ışık bulabilmeleri ve fotosentez yapabilmeleri oldukça zordur. Bunun sonucu olarak bitkilerin büyük bir kısmını başka bitkilerin üzerinde yaşayan epifit bitkiler oluşturmaktadır. Epifit yaşam biçimine en iyi örnekler Orchidaceae familyasıdır. Dünyanın epifit florasının büyük bir kısmı olan yaklaşık üçte ikisini orkideler oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra gösterişli ve büyük çiçeklere sahip epifit orkideler, kültürü en fazla yapılan bitkilerin başında gelmektedir (Arditti, 1979; Sezik, 1984).

Alem: Bitkiler
Bölüm: Spermatophyta (Tohumlu Bitkiler)
Alt bölüm: Angiosperm (Kapalı Tohumlular)
Sınıf: Monocotylydonae (Tek Çenekliler)
Takım: Orchidales
Familiya 1: **Orchidaceae (Salepgiller)**
Familiya 2: Apostasiaceae
Familiya 3: Cypripediaceae

Alt familiya A: Neottioideae

Oymak 1: Neottieae
Alt oymak a: Limodorinae
Alt oymak b: Listerinae
Oymak 2: Chranichideae
Alt oymak a: Spirantinae
Alt oymak b: Goodyerinae

Alt familiya B: Epidendroideae

Oymak 1: Maxillarieae
Alt oymak a: Corallorhizinae
Oymak 2: Malaxideae
Alt oymak a: Liparinae

Alt familiya C: Orchidoideae

Oymak 1: Orchideae
Alt oymak a: Gymnadeniinae
Alt oymak b: Serapiadinae

Orkidelerde simbiyotik ilişkiler birçok şekilde incelenebilir çünkü orkideler partnerlerini ödüllendirmez, adeta aldatırlar. Fakat buna rağmen orkideler, diğer canlı grupları ile tepeden tırnağa sıkı bir biyolojik etkileşim içerisinde. Burada “tepe” böcekler sayesinde tozlaşmayı, “tırnak” ise mantarlar ile gerçekleştirdiği mikorizal ilişkiyi sembolize etmektedir. Bu nedenle orkideler biyolojik etkileşimlerin ekolojisini ve evrimini araştırmak için mükemmel bir modeldir. 2013 yılının 14–16 Mayıs tarihleri arasında İtalya’nın Calabria bölgesinde gerçekleştirilen New Phytologist Sempozyumu’nda orkideler, evrimsel ekolojinin model organizması olarak kabul görmüştür (Selosse, 2014).

Birçok karasal bitki, mineral kaynağı için toprak mantarları ile mikoriza oluşturmaktadır. Fakat orkidelerdeki gariplik ise, orkidelerin mikoriza oluşturduğu mantarların “*Rhizoctonia*” monofiletik grubu içerisinde yer alan çürükçül mantarlar olması ve orkidelere özgü olmalarıdır (Dearnaley ve ark., 2012) İkinci gariplik ise orkide tohumlarının küçük ve besleyici doku (endosperm) açısından fakir olmalarıdır. Bu nedenle bu tohumların çimlenmeleri, orkide tohumlarının bir mikorizal fungus tarafından kolonize edilmesine bağlıdır. Tüm bu şartlar gerçekleştiikten sonra çimlenme sonrası oluşan yapı protokorm olarak adlandırılan klorofilsiz ve heterotrofik bir fideciiktir ve hala fungusa ihtiyaç duymaktadır (Willis ve ark., 2014).

Mikoriza sırasında fungus, orkideye çimlenme sırasında besin ve karbon sağlarken ödülü veya mutualizm durumu şüphelidir. Orkideler erişkin ve ototrofik yapıya ulaştıklarında karbon döngüsü tersine döner ve fungus, orkideden karbon sağlar. Fakat fotosentez yapmayan ve hatta fotosentez yapan bazı orkideler, erişkin dönemlerinde bile fungus tarafından sağlanan karbona gereksinim duyar (Yagame ve ark., 2012).

Tam heterotrof beslenme tarzı 30 orkide soyundan fazlasında evrimleşmişken, kısmi heterotrof beslenme tarzı, evrimsel bir aşama olarak değerlendirilmektedir. Çünkü orkidelerin beslenme tarzlarındaki evrimleşme yönü heterotrof olma yönündedir (Roy ve ark., 2013).

1.2. Botanik Özellikleri

Orkideler, ototrofik veya bazen heterotrofik bitkilerdir. Endotrofik mikoriza yaparak mantarlar ile simbiyotik olarak yaşarlar. Sürünücü rizom veya indirgenmiş, fibröz, etli veya tuber benzeri köklere sahiptir. Yapraklar bazal veya sap şeklinde, nadiren yoktur. Gövde dik duruşlu, zayıf veya güçlü, terminal çiçek durumu bulundurur. Çiçek durumu bir kaç veya birçok spikaya sahiptir. Çiçekler zigomorfik, boyut ve renk olarak çok fazla varyasyona sahip, genellikle resupinat. Çiçek örtüsü; dıştaki halka 3 benzer segmentten oluşur (sepaller) ve iç halka iki eşit segment (petaller) ve bir eşit olmayan (labellum, dudak) segmentten oluşur. Labellum dikkat çeken, şekil ve renk bakımından yüksek derecede farklılaşmış, sıklıkla mahmuza sahip, bazen böceklere sıra dışı şekilde adapte olmuş ve karşı tozlaşma sağlamaktadır. Kolumna, stigma ve stamenlerin birleşiminden oluşan, tek fertil biloküler anter ve stemenlerin birleşimini içeren merkezi etli organdır (Renz ve Taubenheim, 1984).

Tez çalışmasında kullanılan *N. tridentata* ve *N. ustulata* türlerinin teşhisi için gerekli anahtar Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. *Neotinea tridentata* grubu için teşhis anahtarı (Delforge, 2006)’dan değiştirilerek

1	Çiçekler çok küçük; çiçek örtüsünün dış kısmı soluk, dudak 3–5 mm uzunluğunda	<i>N. maculata</i>
1*	Çiçekler bu karakterlerde değilse.....	2
2	Sepallerin tabanı yeşil.....	3
2*	Sepallerin tabanı yeşil tonlarda değilse.....	4
3	Dudak düz veya hafifçe konkav.....	<i>N. conica</i>
3*	Dudak konveks.....	<i>N. lactea</i>
4	Sepaller pembe veya koyu kahverengi.....	<i>N. ustulata</i>
4*	Sepaller pembe, lila veya mor.....	5
5	Dudak 7–12 mm uzunluğunda.....	<i>N. tridentata</i>
5*	Dudak 13 – 20 mm uzunluğunda.....	<i>N. commutata</i>

Epifit olarak bilinen *Liparis* ve *Malaxis* cinsleri dışında Avrupa’da bulunan bütün orkideler karasal orkidelerdir. Avrupa orkidelerinde (orta kuşak orkideleri) kökler, genelde rizom yapısından ortaya çıkar ve *Neottia nidus-avis* türünde olduğu gibi karmaşık ve kuş yuvasına benzer biçimlerde veya *Limodorum* cinsinde olduğu gibi şişkin ve bir araya toplanmış biçimde olabilirler. Rizom yapısı, *Corallorhiza* ve *Epipogium* cinslerindeki gibi bir mercan içinde dallanmış şekilde görülebilmektedir. Tuberler; *Orchis* ve *Ophrys* cinslerindeki gibi ovoit, *Coeloglossum* ve çoğu *Dactylorhiza* cinslerindeki gibi palmat şekilli olabilmektedirler (Delforge, 2006). Tuberlerin şekilleri ve büyüklükleri, cinslerin ayırımında önemli bir anahtardır (Sezik, 1984).

Avrupa’da ve Türkiye’de bulunan yumrulu orkidelerde, her bitki genellikle 2 yumru taşır. Kışı bir önceki sene meydana gelen yumrunun aracılığıyla geçiren bitkinin, ilkbahara doğru ek köklerinden biri farklılaşarak kalınlaşmaya başlar ve bir yumru daha oluşturur. Bu yumru gelişirken diğer taraftan yukarıya doğru da bir tomurcuk vasıtasıyla, yeni yılın gövdesi meydana gelmeye başlar. Bitkinin gelişmesi ilerledikçe yeni yumru da gelişir. Besin içeriğini kaybeden eski yumru ise buruşarak, yeni yumrunun yanına yapışık ve içi boşalmış halde bulunur (Sezik, 1984).

Orkidelerdeki polenleşme sistemleri, çoğunlukla ve hatalı bir şekilde beraber evrimleşme “co–evolution” süreçleri sonucu olarak sanılmaktadır (Dressler, 1990). Orkideler ve polinatörleri arasında beraber evrimleşme muhtemelen alışılmış değildir ve polinatörlerinin aksine, evrimin çoğu tek taraflı olarak orkidelerde görülmektedir. Çünkü evrimleşmiş ve neredeyse durağan formda olan polinatörlere karşı orkideler, sürekli evrimleşme ve polinatörlerini kandırma yönünde farklılaşma eğilimindedirler (Szentesi ve ark., 2002). Orkidelerde çiçek aldatmacası, Darwin zamanından beri yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Fakat ödül vermeyen “non–rewarding” çiçeklerin evrimi yapbozun önemli bir parçasını gizlemektedir. Ödül alamamalarına rağmen polinatörler neden orkide çiçeklerini ziyaret etmektedir?

Polinatörlerini etkilemek için orkideler çiçek durumu şekli, çiçek rengi, kokusu ve nektar kılavuzları, mahmuz ve polen görünümlü papillalar gibi genel çiçek sinyalleri göndermektedir (Kunze ve Gumbert, 2001; Galizia ve ark., 2005). Sonuç olarak bu durum mimikri olarak adlandırmıştır (Dafni, 1984).

Tez çalışmasında kullanılan *N. tridentata* ve *N. ustulata* türleri, polinatörlerini etkilemek için “besin aldatmacası” stratejisini uygulamaktadır ve nektar bulundurmamaktadır (Inda ve ark., 2012).

1.3. Türkiye Orkideleri

Türkiye, tropikal kuşak ile kutup bölgeleri arasında kalan Orta Kuşak Orkideleri bakımından diğer Avrupa ülkelerine göre oldukça zengin bir floraya sahiptir. Karasal özellikte olan bu orkidelerinin büyük bir kısmı toprakta yaşamaktadır ve genellikle toprak altı yumruları bulunmaktadır (Güler ve ark., 2008). Türkiye’de 24 cinse ait 148 türün varlığından söz edilmektedir (Sezik ve ark., 2007).

Türkiye orkideleri üzerine en güncel flora çalışması Kreutz tarafından gerçekleştirilmiştir ve bu çalışmaya göre; Türkiye’nin flora özellikleri bakımından Avrupa ile Yakın Doğu bölgelerinin ortak karakterlerini gösterdiği belirtilmiştir. Araştırmacıya göre, Türkiye’de yaklaşık 170 orkide taksonu bulunmaktadır (Kreutz, 2009).

Araştırma Fonu tarafından desteklenen (TÜBAP-488) Çanakkale ilinde yapılan Orchidaceae taksonları belirleme çalışmalarında Kazdağları ve çevresinin Orchidaceae familyası üyeleri incelenmiş ve 38 taksonun ayrıntılı bilgileri verilmiştir (Güler, 2005).

Bu doktora tez çalışmasında, 11 ülkeden 20'si tarafımızdan toplanan, 12'si ise GenBank veri tabanından alınan toplamda 32 orkide taksonuna ait çekirdek ribozomal "Internal Transcribed Spacer" (ITS) ve kloroplast *accD-psaI* bölgelerine ait nükleotid dizileri kullanılarak moleküler filo-coğrafya çalışması gerçekleştirilmiştir. Üç farklı filogenetik yaklaşımın (MP, ML ve Bayesian Posterior Probability) kullanılarak oluşturulan ağaçlar birbirleri ve literatürdeki çalışmalar ile karşılaştırılmış ve Anadolu kökenli *N. tridentata* örneklerinin, Avrupa kökenli *N. tridentata* örneklerinden nrITS bölgesine göre farklı ribotiplere sahip olduğu ve filogenetik ağaçlarda birbirlerinden ayrıldığı, Anadolu kökenli *N. tridentata* örnekleri ile Avrupa kökenli *N. ustulata* örneklerinin birebir aynı ribotipe sahip olduğu ve filogenetik ağaçlarda iç içe oldukları sonuçlarına varılmıştır. *accD-psaI* bölgesine ait nükleotid dizileri ile çizilen ağaçlarda ise bu durumla karşılaşılmamıştır. Bu uyumsuzluk ise Anadolu kökenli *N. tridentata* ve Avrupa kökenli *N. ustulata* türü arasında geçmiş dönemlerde yaşanmış bir melezlenme olayını işaret etmektedir.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Orkidelerde moleküler filogeni, barkodlama, filo-coğrafya, melez soyların belirlenmesi ve tez çalışması ile ilgili literatür özetine bu bölümde yer verilmiştir.

2.1. Orkide Moleküler Filogenisi, Evrimsel Geçmişi ve Filogeni Çalışmalarında DNA Verilerinin Kullanımı

Orkidelerde birçok yeni cins tanımlanması ve bunların doğruluğunun moleküler DNA analiz yöntemleri ile başarılı bir şekilde yapılmaktadır. Bundan önceki zamanlarda morfoloji, genel anlamda kabul edilen temel bir sistematik ve filogeni ölçütü olmasına karşın günümüzde bu verilere ek olarak DNA temelli yöntemler de gerekli olmaktadır (Chase ve ark., 2015).

Orkidelerin sınıflandırılması üzerine yapılan son araştırmalarda ve bunu takiben yapılan düzenlemelerden sonra bile Epidendroideae alt familyasının filogenisinin anlaşılabilmesi için halen birçok araştırma yapılmaktadır (Pridgeon ve ark., 1997; Pridgeon ve ark., 2001; Pridgeon ve Light, 2005). Epidendroideae dışında, Orchidoideae alt familyasında da moleküler teknikler kullanılarak cins bazında halen kayda değer birçok değişiklik gerçekleştirilmektedir (Chase ve ark., 2015).

Chase ve ark., (2003) plastid ve çekirdek verilerine dayalı filogenetik çalışmalar ile Orchidoideae alt familyasında bir seri nomenklatüral değişiklikler gerçekleştirmişlerdir. Dört oymak olan Cranichideae, Diurideae, Codonorchideae ve Orchideae, alt familya olarak tanımlanmıştır. Ayrıca Orchideae oymağının içindeki üç alt oymak olan Brownleeinae, Disinae ve Orchidinae yine aynı araştırmacı tarafından tanımlanmıştır.

Pridgeon ve ark. (1997) tarafından, Orchidinae alt oymağında ribozomal ITS verileri kullanılarak moleküler analizler yapılmıştır ve bu çalışmalar cinsler ve türler arasındaki ilişkiler için yeni bir anlayış getirmiştir. Bu çalışmadan çıkarılan üç önemli sonuç; 1) *Orchis* cinsi, önceden floral karakterlerle tanımlandığı gibi üç atadan gelmiştir (triphyletic). Bunun sonucu olarak araştırmacılar *Orchis sensu lato* (s.l.) grubunu *Neotinea* ve özellikle *Anacamptis* olarak yeniden tanımlamışlardır. Ayrıca tek türlü *Aceras* cinsi, *Orchis sensu stricto* (s.s.) içerisine dahil edilmiştir. 2) Daha önce tanımlandığı üzere *Gymnadenia*, *Nigritella* dahil edilmese bile parafiletik bir gruptur. 3) Son olarak, *Coeloglossum*, *Dactylorhiza* kladının içerisine dahil edilmiştir.

Moleküler verilere dayalı sistematik ve filogeni çalışmaları, özellikle orkideler gibi büyük, karmaşık ve son derece değişken morfolojik yapılara sahip bitki gruplarının yeniden düzenlenmesinde ve akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde çok büyük önem taşımaktadır.

ITS dizileri, kapalı tohumluların birçok grubunda filogeninin anlaşılabilmesi için çok değerli bir araçtır (Baldwin ve ark., 1995). ITS bölgesinin çekirdek genomunda birden fazla kopya ile tekrar etmeleri ve bir türün geçmişindeki melezlenme delillerini ortaya çıkarmada ve türleşme sürecinin takibinde çok önemli rol oynamaktadır (Suh ve ark., 2002).

ITS bölgesindeki heterojenitenin nedenleri arasında, poliploidi ve melezlenmeden kaynaklanan düzenlenmiş evrimleşme “concerted evolution” gösterilmektedir. Tamamlanmamış birlikte evrimleşme durumu; yüksek mutasyon sayısı, türler arası melezlenme, seksüel rekombinasyonun kaybı veya homolog olmayan kromozomlardaki nrDNA lokuslarına dayandırılabilir (Campbell ve ark., 1997).

Son yıllarda orkidelerde bir çok polinasyon sistemleri ve filogeni çalışmaları yapılmasına rağmen, filogenetik ve ekolojik bilgilerin birleştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle örneklemelerde DNA bölgelerinin ve örnekleme alanlarının çözünürlüğünün artırılmasına ihtiyaç vardır (Cozzolino ve Widmer, 2005).

2.2. Filogeni Çalışmaları İçin Genom Bölgelerinin Seçimi

Tür seviyesinde moleküler filogenetik çalışmalarda DNA bölgeleri kullanılırken intronlar veya genler arası bölgeler gibi hızlı evrimleşen bölgelere ihtiyaç duyulur. Bu bölgeler çekirdek genomundan ve / veya plastid genomundan seçilir. Genellikle ikisinin birden kullanımı daha iyi sonuç vermektedir (Sramko ve ark., 2014).

nrITS bölgesi tür seviyesindeki moleküler filogenetik çalışmalarında kullanılan en güçlü bölgelerden biri olduğu birçok çalışmada ifade edilmiştir (Álvarez ve Wendel, 2003; Bailey ve ark., 2003; Nieto-Feliner ve ark., 2007; Sramko ve ark., 2014).

nrITS bölgesi, çekirdek genomunda 18S ve 26S bölgeleri arasında bulunan, 5.8S kodlayan bölge tarafından ITS1 ve ITS2 olmak üzere ikiye ayrılan, ortalama 620–640 bp uzunluğunda genler arası bir parçadır. ITS1 ve ITS2 bölgeleri herhangi bir protein kodlaması yapmazken, 5.8S bölgesi ribozomal RNA kodlanmasında görev almaktadır

(Şekil 2.1).



Şekil 2.1. nrITS bölgesinin şematik gösterimi (Baldwin ve ark., 1995)

Birçok bitki genomunda nrITS bölgesi kopyalar halinde bulunur. nrITS kopyalarının hepsi fonksiyonel değildir (çoğu zaman bir bireyin genomunda birden fazla farklılaşmış kopya bulunabilir). Bu farklı kopyalar nrITS bölgesinin çözünürlük seviyesini düşürebilir. Bununla birlikte bireyler arası genetik farklılıkların incelenmesinde en etkili yol, nrITS bölgesinin direkt PZR ile çoğaltılarak dizilenmesidir (Sramko ve ark., 2014).

nrITS bölgesinin, moleküler filogenetik çalışmalarda oldukça yaygın olarak kullanılma nedenlerinden en önemlileri; (i) birçok bitki grubunda, birçok evrensel primer ile çalışılabilmesi (White ve ark., 1990), (ii) çok kopyalı olması, herbaryum örneklerinden bile PZR tekniği ile bu bölgenin kolay bir şekilde çoğaltılabilmesine izin vermesi, (iii) makul bir uzunluğa sahip olması (700 bp'nin altında) iç primerlere gerek duyulmadan çoğaltılabilmesi, (iv) varyasyon seviyesinin, evrimsel çalışmalarda tür seviyesinde kullanılmaya uygun olması, (v) poliploidinin belirlenmesi, melezlenme, geri melezlenme ve filogenetik anlam çıkarmadaki başarısıdır (Nieto-Feliner ve ark., 2007).

nrITS bölgesinin bir başka potansiyel üstünlüğü ise çift ebeveynli kalıtım göstermesidir. nrITS bölgesi, ata ve soy belirlenmesinde, çekirdek genomu içerisinde homojenize olmayan kopyaları sayesinde oldukça kullanışlı olmuştur (Sang ve ark., 1997).

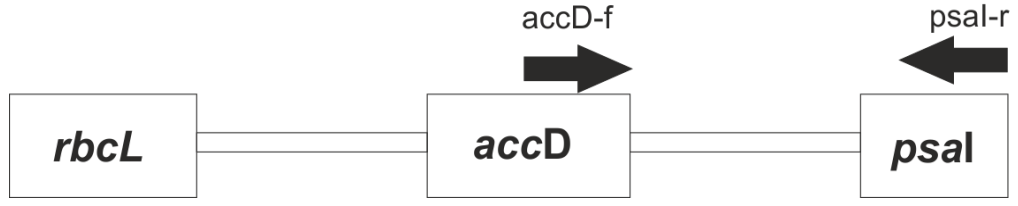
Bitki gruplarının tür düzeyinde filogenetik çalışmalarında nrITS bölgesi ile birlikte bir plastid bölgesinin incelenmesi neredeyse bir rutin laboratuvar protokolü olmuştur (Bailey ve ark., 2003).

Çekirdek genomunda bulunan ribozomal bölge 18S, 5.8S ve 25S genleri ile bu genleri bölen ITS1 ve ITS2 bölgeden ve dış kısımlardaki genler arası bölgeden (IGS)

oluşmaktadır. Kodlayan nrITS bölgeleri ve IGS'nin bir parçası, RNA'ları üretmek için gerekli transkripsiyonel üniteleri oluşturmaktadır. Her bir lokus, yüzlerce binlerce kadar ardışık kopyalardan oluşmaktadır. Dahası, birçok ribozomal lokus, transkripsiyonel olarak aktif olsun ya da olmasın bitki genomunda yer almaktadır. Bu durumda her nrITS kopyasının fonksiyonel olduğu söylenemez. Bu nedenle PZR ile çoğaltılmış nrITS ürünleri, çekirdek genomunda bulunan fonksiyonel olan veya olmayan tüm kopyaların bir ortak karar ürününü içerir (Nieto-Feliner ve ark., 2007). Tür düzeyindeki senaryolar incelendiğinde, tamamlanmamış birlikte evrimleşme, melezlenmenin bir sonucu olarak nrITS tekrarlarında görülecektir. Bu tür çalışmalarda tüm ITS kopyalarının örneklenmesi ve çoğaltılması tavsiye edilir (Rascher ve ark., 2003). Özellikle türlerin coğrafik dağılışları ve soyları arasındaki ilişki incelenirken, nrITS'nin tüm bu özelliklerinin kullanışlı olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Nieto-Feliner ve ark., 2007).

Çekirdek genomunda bulunan ve fonksiyonel olmayan ITS kopyaları yalancı genler "pseudogenes" olarak bilinirler (Mayol ve Rosselló, 2001). Bu durumun, filogenetik araştırmalarda ciddi sorunlara neden olmadığı görülmüştür. Fonksiyonel olan ITS bölgesindeki varyasyonların (özellikle gen kodlayan 5.8S bölgesi), fonksiyonel olmayanlara göre çok daha az olduğu, elde edilen DNA dizilerinin incelenmesi ile bu durumun kolaylıkla anlaşılabilir olduğu belirtilmiştir (Besnard ve ark., 2007).

Melezleşme, bitkilerde türleşme sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Melezleşmenin moleküler düzeyde belirlenmesindeki en kolay yöntem, çift ebeveynli kalıtım gösteren çekirdek markörleri ile tek ebeveynli kalıtım gösteren plastid markörlerinden gelen bilgilerin karşılaştırılmasıdır. Seçilecek olan plastid markörünün, çalışmada iyi sonuç verebilmesi ve en az tür seviyesinde çözünürlüğe sahip olması gerekmektedir. Bu nedenle tez çalışmasında çekirdek nrITS markörü ile birlikte ikinci bir markör olarak, kloroplast genomunda bulunan, kloroplast genomunda yüksek varyasyona sahip (Sramko ve ark., 2014) ve kolay çoğaltılabilen genler arası bir ara parça olan *accD-psaI* bölgesi kullanılmıştır (Şekil 2.2). Bu bölgenin 3' ucunda *accD* genini kodlayan, 5' ucunda ise *psaI* genini kodlayan bölgeler bulunmaktadır.



Şekil 2.2. *accD* – *psaI* bölgesinin şematik gösterimi

Cox ve ark. (1997), *Cypripedioideae* (Orchidaceae), Bu çalışmada 100'e yakın orkide türünün ribozomal ITS bölgesi nükleotid dizi analizleri, parsinomi analizleri ile birlikte kendi içlerindeki ilişkiler araştırılmıştır. Çalışmanın sonucu her cinsin monofiletik olduğunu göstermiştir. *rbcL* verileri gibi, ITS dizileri de *Mexipedium* cinsinin *Phragmipedium* cinsi ile kardeş olduğunu ortaya koymuştur.

2.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Türler ve DNA Bölgeleri İle İlgili Önceki Çalışmalar

Cozzolino ve ark. (1998), *Neotinea tridentata* ve *Neotinea ustulata* melezi olan *Orchis* × *dietrichiana* Bogenh. tanımlamasını yapmışlardır. Bu melez, İtalya'nın Salerno bölgesindeki Kuzey Vallo di Diano dağlarından toplanarak morfolojik ve moleküler olarak karakterize edilmiştir. RAPD ve RFLP analizleri ile melezlik durumu hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. RAPD bitkinin kesinlikle bir melez olduğunu göstermiştir. cpDNA yapısı ise *N. tridentata* türünün anne soyu olduğu açıkça belirlenmiştir.

Aceto ve ark. (1999), çalışmalarında; *Orchis* ve bununla ilişkili *Aceras*, *Anacamptis*, *Neotinea*, *Ophrys*, *Platanthera* ve *Serapias* cinslerinin ITS bölgelerindeki varyasyonlar ve varyasyonların filogenetik ilişkilerini karşılaştırmışlardır. Çalışma ile birlikte çiçek morfolojinin yüksek derecede değişken olduğu, günümüzde kabul edilen tür ve cins tanımlarının oldukça yapay olduğu ortaya konulmuştur.

Douzery ve ark. (1999), çalışmalarında; Orchidaceae familyasının bir tribusu olan *Diseae* (Orchidoideae: Orchidaceae) için ilk defa moleküler filogeni analizleri yapmışlardır. Nüklear ribozomun ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 dizileri, 30 *Diseae*, 20 *Orchideae*, 4 *Cranichideae* ve *Diurideae* grupları arasında karşılaştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda morfolojik karakterlerin, ITS filogenisi ile tanımlanan ve desteklenen gruplarla uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

van den Berg ve ark. (2000), çalışmalarında; Laeniidae (Orchidaceae) alt oymağının en iyi bilinen cinslerinden 295 aksesyon ile Pleurothallidinae, Coeliinae, Meiracylliinae, Bletiinae ve diğer dış gruplar için nükleer ribozomal ITS1 ve ITS2 DNA dizileri kullanılarak filogenetik analizler yapmışlardır. Çalışma sonucunda *Arpophyllum*, geriye kalan Laeliinae üyelerinin kardeşi olarak tanımlanmış, ayrıca *Meiracyllium* (Meiracylliinae), *Euchile* üyelerine yakın bir pozisyona yerleştirilmiştir.

Widmer ve ark. (2000) çalışmalarında, İtalya'da, Sassano'ya yakın bir bölgeden toplanan 16 bireylik küçük bir *Orchis x colemanii* popülasyonunun, *O. mascula* ve *P. pauciflora* türlerinin doğal melezi olduğunu göstermişlerdir. *O. x colemanii*, *O. mascula* ve *O. pauciflora* türlerinin, rDNA fragmentinin 18S ve 25S bölgelerini de içeren ITS1, 5.8s rDNA ve ITS2 bölgeleri PZR tekniği ile çoğaltılıp ribozomal fragmentleri dizilenmiştir ve dot blot analizi yapılmıştır. Böylece melez türde, atasal bireylere ait genetik materyalin hangi oranlarda bulunduğu ortaya çıkarılmıştır.

Cozzolino ve ark. (2001) çalışmalarında, Akdeniz orkideleri olan *Orchis s.l.* türlerinin, polinasyon biyolojisi ve moleküler kanıtlar kullanılarak türleşme süreçlerini incelemişlerdir. Bu çalışmada moleküler markör olarak çekirdek genomunda bulunan nrITS bölgesi kullanılmıştır. *Orchis*, *Neotinea*, *Anacamptis* ve benzer familyalarda yapılan çalışmada Yakın Doğu ve Doğu Avrupa'dan (özellikle İsrail'den) örneklemeler yapılmıştır. Doğu Akdeniz orkidelerinin monofili göstermediği görülmüştür. *Anacamptis collina*, *Anacamptis coriophora* ve *Orchis italica* türlerinden elde edilen nrITS dizilerinin ITS1 bölgelerinde tek bir nokta mutasyonu dışında, İtalyan örneklerinde olduğu gibi birbirinin aynı olduğu görülmüştür. İsrail'den toplanan *Neotinea tridentata* nrITS dizisinin İtalyan kökenli olandan farklı olduğu görülmüştür. Araştırmacılar, Akdeniz Bölgesi'nin farklı bölgelerinde *Neotinea tridentata* nrITS dizilerinde ufak farklılıklar olabileceğini belirtmiştir.

Pridgeon ve ark. (2001), çalışmalarında; Pleurothallidinae (Epidendreae: Orchidaceae) subtribusunun evrimsel ilişkilerini incelemek amacıyla 18 taksonun nükleer ribozomal DNA'larının nrITS bölgesini dizilemişlerdir. Çalışmada doğruluğu arttırmak için ayrıca *matK*, *trnL* intronu, ve *trnL-F* bölgeleri de dizilenmiştir. Çalışmanın sonucunda Pleurothallidinae alt oymağının monofiletik bir grup olduğu önemle vurgulanmıştır.

Soliva (2001), çalışmasında *Ophrys* (Orchidaceae) taksonlarının ana soylarının filogenetik analizleri yapılmıştır. Bu analizlerde yol gösterici olarak ribozomal DNA'sının

ITS bölümü ile kloroplast DNA'sının *trnL-trnF* bölümleri sekanslanmıştır. Çalışma, *Ophrys* cinsinin *Euophrys* ve *Pseudoophrys* olarak iki ana gruba ayrıldığını desteklemiştir.

Álvarez ve Wendel (2003), çalışmalarında; bitkilerde cins ve cins ötesi seviyelerde filogenetik ifade için en popüler sekans dizilerinden birinin, nükleer ribozomal sistronun 18S-5.8S-26S bölgesinde bulunan ITS bölgesi olduğu belirtilmiştir. Son beş yıldaki çalışmalar incelendiğinde, yayımlanan 244 makalenin %66' sının ITS bölgesi sekans verisi içerdiği görülmüştür. Çalışmada ITS bölgesinin neredeyse tamamen universal olarak kullanılmasına rağmen, moleküler filogeni çalışmalarının, filogenetik analizlerde tamamen güvenilir olmadığı vurgulanmıştır.

Tsai ve ark. (2004), çalışmalarında Tayvan' da bulunan 12 *Dendrobium* türünün genetik ilişkileri ITS bölgesi çalışılarak belirlenmiştir. 12 *Dendrobium* türü arasında genetik uzaklık belirlenip filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda; *Dendrobium linawianum*, *Dendrobium moniliforme*, *Dendrobium tosaense*, *Dendrobium leptoclandum* ve *Dendrobium falconeri* türlerinin *Dendrobium aurantiacum* grubuna dahil olduğu, *Dendrobium chameleon* türünün *Denrobium miyakei* grubuna dahil olduğu ve *Dendrobium crumenatum* türünün ise *Dendrobium equitans* grubuna dahil olduğu ortaya konmuştur.

Cozzolino ve Widmer (2005), araştırmalarında Akdeniz orkidelerinin üreme izolasyonlarının evrimsel temellerini çalışmışlardır. Orkidelerin çiçek yapılarındaki sıra dışı farklılık, orkide-polinatör ilişkilerinin önemini artırmaktadır. Çiçeklerin morfolojilerindeki, renklenmelerindeki veya kokularındaki değişiklikler farklı polinatörleri kendilerine çekmelerine neden olabilmektedir. Akdeniz orkidelerinin Orchidinae oymağında yapılan filogenetik çalışmalar, orkidelerin polinasyon biyolojilerindeki varyasyonların, türleşme ile pek ilgili olmadığını ortaya çıkarmıştır. Akdeniz orkidelerinin çoğu besin aldatmacası stratejisi ile polinatörlerini çekmektedir ve bunu genellikle polinatörlerini nektar ile ödüllendiren bitkileri taklit ederek yaparlar. Çalışma Akdeniz orkidelerinin, poliploidi olmadığı durumlarda türleşmenin oldukça sınırlı olduğunu göstermektedir.

Devos ve ark. (2006), çalışmalarında *Dactylorhiza fuchsii*, *Dactylorhiza saccifera*, *Dactylorhiza foliosa* ve *Dactylorhiza maculata* türlerinin nrITS ve ETS (*External transcribed spacers*) bölgelerini dizilemişlerdir. Diploid olan *D.fuchsii* ve otopoliploid olan *D. maculata* türlerinin DNA polimorfizmleri bu çalışma ile açığa çıkarılmıştır.

Filogenetik ağaçların tekrar oluşturulabilmeleri için Parsimoni ve Bayesian analizleri yapılmıştır.

Gulyás ve ark. (2005), çalışmalarında Carpatho–Pannonian bölgesinde melez kökenli olduğu düşünülen *Ophrys holubyana* Andrasovzskiy (Orchidaceae) türünü çalışmışlardır. Türün melez kökenli olduğu birçok araştırmacı tarafından kabul edilmesine karşın bu hipotezi destekleyecek, daha önceden bulunmuş herhangi bir moleküler kanıt yoktur. Bu çalışmada *Ophrys holubyana* türü ile birlikte *Ophrys fuciflora* (Cr.) Rehb. ve *Ophrys bicornis* Sadler ex. Nendtvich türlerinin de nrITS bölgeleri dizilenmiştir. Carpatho–Pannonian bölgesindeki hemen hemen bütün türler örneklenmiş ve *Ophrys holubyana*, *Ophrys fuciflora* ve *Ophrys bicornis* türlerinin nrITS sekansları verilmiştir. Çalışmanın sonucunda *Ophrys holubyana* türünün nrITS bölgesinin, *Ophrys* sistematığı ve filogenisi ile birlikte melezlik durumu ve derecelerinin belirlenmesinde kullanışlı olduğu belirtilmiştir.

Kress ve ark. (2005), çalışmalarında DNA barkodlamasının; biyoçeşitlilik çalışmaları, juvenil bireylerin teşhisleri, cinsiyet belirlenmesi ve adli tıp uygulamalarında kullanıldığını belirtmişlerdir. Sitokrom C oksidaz 1, hayvan türlerinin barkodlanması için oldukça ideal bir enzimdir. Bitkiler için bu enzimin sekansı taksonomik açıdan uygun bir sonuç vermemektedir çünkü bitkilerde bu enzim çok yavaş evrimleşmektedir. Çiçekli bitkilerin barkodlanmasında nükleer *ITS* bölgesi ve plastid geni olan *trnH – psbA*, barkodlama için oldukça ideal alanlardır. *trnH – psbA* bölgesi, yaklaşık 450 bp uzunluğunda olup karasal bitkilerde sekans kullanımı için idealdir sonucu verilmiştir.

Barrett ve Freudenstein (2008), çalışmalarında *rbcL* bölgesinin birçok bitkinin filogenetik çalışmalarında ve parazitik bitkilerin evrimsel gelişim çalışmalarında sıklıkla kullanılan geniş bir alt ünite olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada sekiz *Corallorhiza* türünün *rbcL* geni dizilenmiştir. *rbcL* geninin filogenetik çalışmalarda kullanılabilirliğinin, 400’den fazla çalışma ile desteklendiği, bu çalışmada ortaya konmuştur.

Kress ve Erickson (2008), çalışmalarında DNA barkodlama tekniğinin, genomik tabanlı araştırmalarda çok fazla kullanılmalarının bir tesadüf olmadığını, DNA barkodlarının ve genomiklerin, geleneksel disiplinlerin ötesinde yeni sorulara cevap verebildiğini belirtmektedir. Standartlaştırılmış kısa DNA sekanslarından oluşan DNA barkodlarının, bütün türlerde karakterize olabileceği, araştırmacılar tarafından göz önüne serilmektedir. Araştırmacılara göre DNA barkodunu oluşturacak bölgenin (1) tür seviyesinde

genetik varyabilite ve farklılaşma içermesi, (2) evrensel primerlerin bağlanabileceği bölgeler içermesi, (3) DNA izolasyonu ve çoğaltılması için elverişli ve kısa olması gerektiği vurgulanmaktadır.

Lahaye ve ark. (2008), çalışmalarında ekolojik araştırmalar ve koruma çalışmalarının büyük bölümünde, klasik taksonomik tanımlamalar kullanışlı olmadığına DNA barkodlama yöntemi oldukça yararlıdır. Bu çalışmada plastid genomunun *matK* geninin çiçekli bitkilerin barkodlanmasında kullanılabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada, 1000'den fazla takson içeren Mesoamerican orkidelerinin *matK* genlerinin barkodlanması yer almıştır.

Sharma ve ark. (2012), nrITS bölgesinden elde edilen dizi verileri ile on adet *Cymbidium* (Orchidaceae) türünde, cins üzeri taksonomik kategorilerde incelemeler yapmışlardır. Çalışmada kullanılan *Cymbidium* türleri, kuzey–doğu Hindistan'dan toplanmıştır. Çalışmada, ITS1 ve ITS2 bölgeleri dizi uzunluğu ile G + C içeriği olarak varyasyon göstermiştir. 5.8S bölgesinin daha korunmuş olduğu görülmüştür (%98,71). ITS2 bölgesinin en çok parsimoni bilgi içeren bölge olduğu (%7,46) ve en çok dizi farklılığına sahip (%24,63) bölge olduğu görülmüştür. ITS bölgesinin Asya kökenli *Cymbidium* türlerinde yüksek destek değeri ile filogeniyi belirlediği görülmüştür. Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, Neighbour Joining ve Bayesian Inference yöntemleri ile güvenli sonuçlar alınmıştır. Özellikle ITS2 bölgesinin orkidelerde tür üzeri taksonomik seviyelerde de kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Inda ve ark. (2012), Orchideae (Orchidaceae: Orchidoideae) oymağında, kombine edilmiş DNA matrisleri ile gerçekleştirilmiş bir filogenetik çalışma yapmışlardır. Çalışmanın temelinde kuzey ılıman bölgede yayılış gösteren 62 adet çoğunlukla karasal olan orkideler kullanılmıştır. Araştırmacılar, nrITS bölgesi kullanılarak bu oymağın daha önceden çalışıldığını fakat filogenetik ağacın bazı bölgelerinde güvenilirliğin az olduğunu belirtmektedirler. Çalışmada 103 tür ve 25 cinse ait 118 örnekleme yapılmış, nrITS, *cox1* intronu, ve plastid *rpl16* intronu kullanılmıştır. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında Bayesian ve Maximum Parsimony yaklaşımları kullanılmıştır. Moleküler tarihlendirme kullanılarak çizilmiş olan filogenetik ağacın güvenilirlik değeri yüksek bulunmuştur. Orchidinae alt oymağının 15 milyon yıl önce Akdeniz havzasında farklılaştığı sonucuna elde edilmiştir. Atasal Orchidinae alt oymağının Hymenoptera türleri ile tozlaştığı, bu orkidelerin yiyecek kandırmacası ile polinatörleri kendisine çektiği anlaşılmıştır.

Tyteca ve ark. (2012), çalışmalarında *Orchis* (Orchidaceae, Orchidinae) cinsinde morfolojik ve genetik çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Son on yılda *Orchis* cinsi birçok değişikliğe uğramıştır. Fakat cinsin bölünmüş olması hala tartışma konusudur. Bu durumda, *Orchis s.s.* birbirinden iyice farklılaşmış iki monofiletik tür grubunu içeren *Orchis s.s.* ve *Masculae* alt cinslerinden oluştuğu görülmektedir. Çalışmada iki alt cinsten ve ilişkili *Anacamptis* cinsinden geniş çapta örnekleme yapılarak, detaylı floral morfolojik ölçümler ve vejetatif karakterler analiz edilmiştir. Çalışma göstermiştir ki, üç tür grubu morfolojik olarak birbirlerinden açıkça ayrılmıştır.

Pavarese ve ark. (2013), çalışmalarında *Neotinea commutata* türünün kompleks kökenini araştırmışlardır. Poliploidi ve melezlenme sıklıkla genetik ve fenotipik varyasyonlara neden olmaktadır. Bu olaylar evrimsel olarak etki eden güçlerdir ve bu nedenle evrimsel sürecin temelini oluşturmaktadır. Poliploid türleşme karmaşık bir süreç olsa da, potansiyel olarak soylar arası ekolojik farklılıklar, ebeveynlerin birbirleri ile melezlenmesine ve karışmasını sağlamaktadır. Bu çalışmada ilk defa 1984 yılında Sicilya endemiği olarak tanımlanan *N. commutata* ve öngörülen ebeveyn türlerin ilişkileri moleküler, sitogenetik ve morfometrik olarak analiz edilmiştir. *N. commutata* türünün tetraploid olduğu ortaya çıkmıştır ve *N. tridentata* ile *N. lactea* türlerinin melezi olduğu görülmüştür. Ayrıca *N. commutata* türünde kromozom sayısı varyasyonları da görülmüştür.

Sramko ve ark. (2014) tarafından bir Avro–Asya orkide cinsi olan *Himantoglossum s.l.* (Orchidaceae) üzerinde moleküler filogeni ve evrimsel geçmişi ortaya çıkartma çalışması yapılmıştır. Cins şimdiye kadar sınırlı ve tamamen geleneksel filogeni yöntemleriyle çalışılmıştır. Bu nedenle çalışmada moleküler filogeni ile evrimsel geçmişin daha iyi anlaşılması amaçlanmıştır. Avrupa ve Asya kıtalarında 153 popülasyondan örnekleme yapılmıştır. Çalışmada moleküler markör olarak çekirdek genomunda bulunan nrITS ve *LEAFY* ile birlikte plastid genomunda bulunan *accD-psaI*, *atpF-atpH*, *rps16*, *trnH-psbA*, *trnL-rpl32-ndhF* ve *ycf1* bölgeleri kullanılmıştır. *Himantoglossum* cinsinde nrITS doğası gereği çok kopyalı olmasından dolayı çalışmada kullanılmak üzere klonlanmıştır. Çalışmada plastid markörü olarak en fazla bilgi verici bölge *accD-psaI* bölgesi olmuştur. Plastid dizi farklılıkları *H. Hircinum-adriaticum* ayrımını göstermiştir. nrITS ribotipleri ve *LEAFY* filogenileri taksonomik yeniden düzenleme için daha az uyum göstermiştir.

Chase ve ark. (2015), çalışmalarında Orchidaceae familyasının sistematğini güncellemiştir. Familya, sistematik açıdan ilişkilerin daha iyi anlaşılabilmesi için 2003 yılından bu yana bazı büyük güncellemelere uğramıştır. Bu çalışmada 736 güncel olarak tanımlanmış cins için güncellenmiş edilmiş sistematik bilgiler bulunmaktadır. Orchideae alt familyasında da değişiklikler yapılmasına rağmen en çok değişikliğe Epidendroideae alt familyası uğramıştır. Çalışmada moleküler markör olarak düşük kopya sayılı *Xhd* ekirdek bölgesi ile birlikte plastid bölgeleri kullanılmıştır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Çalışmada ana bitki materyali olarak *N. tridentata*, *N. ustulata*, *Neotinea maculata*, *Neotinea conica* orkide türlerine yer verilmiştir (Çizelge 3.1). Örneklemeler Akdeniz, Batı–Alt Akdeniz, Orta–Alt Akdeniz, Balkan–Alt Akdeniz ve Doğu–Alt Akdeniz olmak üzere büyüklüğü yaklaşık 3 milyon km² olan beş farklı coğrafi bölgeden yapılmıştır (Şekil 3.1).

Orkide türlerine ait taze yeşil yaprak parçaları, çiçeklenme dönemlerinde (Nisan–Haziran) araziden toplanmış ve toplandığı andan itibaren DNA izolasyonuna kadar silika–jel içerisinde, oda sıcaklığında saklanmıştır.

Arazide taze olarak bulunamayan veya ziyaret edilemeyen coğrafi bölgelerdeki örnekler için ise herbaryum örneklerinden yararlanılmıştır. Herbaryum örneklerinden alınan doku parçaları da silika–jel içerisinde ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

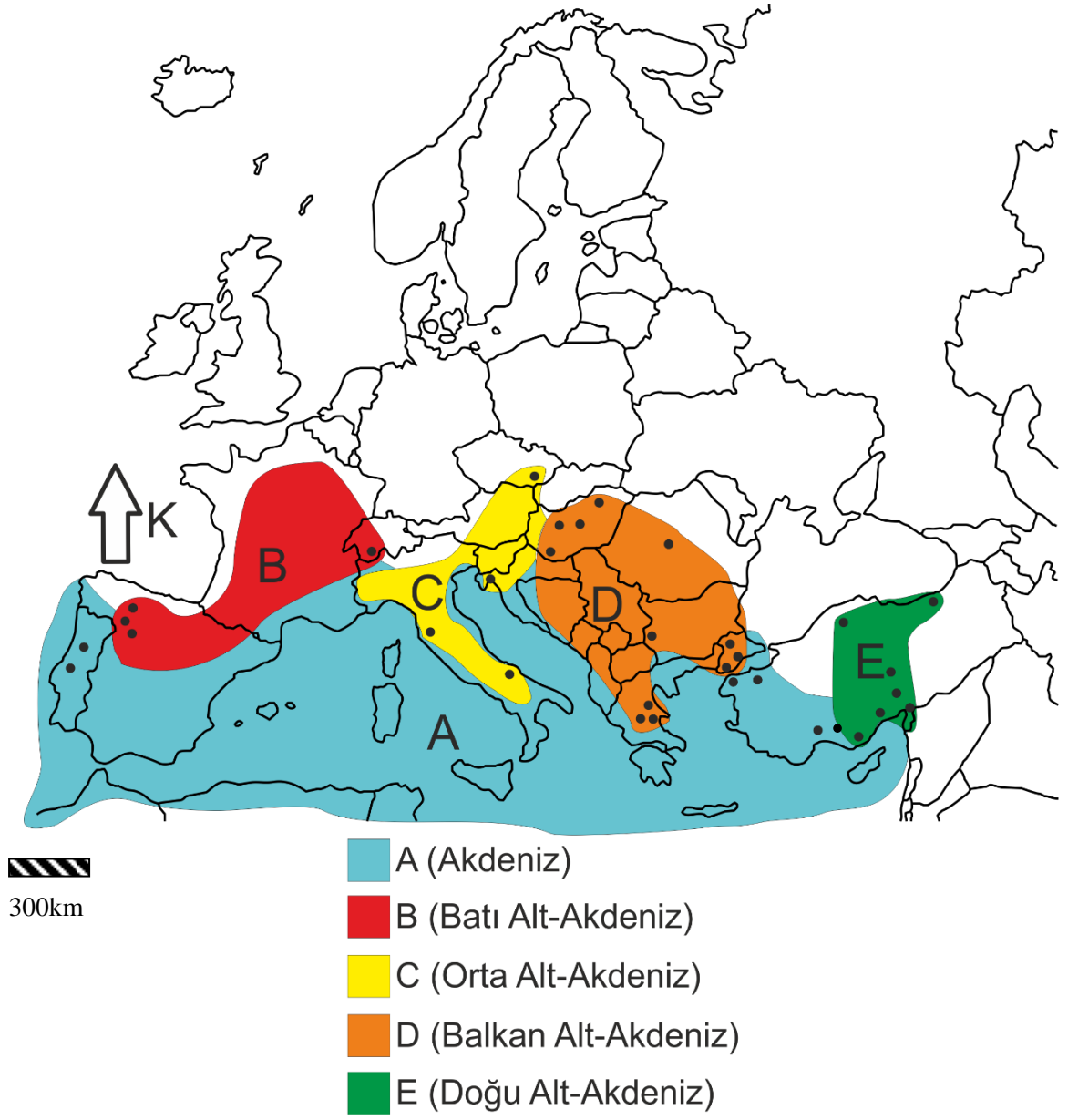
Çalışmada örnekleme alanının artırılması amacıyla ayrıca National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanında bulunan ve çalışılan türlere yakın olan 10 adet DNA verisi de kullanılmıştır. Çalışmada toplamda 33 farklı popülasyondan örnekler yer verilmiştir. Çalışmada kullanılan ve Türkiye haricinden toplanan örnekler Debrecen Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Botanik laboratuvarında (Macaristan), Türkiye’den toplanan örnekler ise Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Genomikler ve Transkriptomikler Laboratuvar’ında saklanmaktadır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bitkilere ait detaylı örnekleme tablosu

Takson	Ülke	Bölge	Toplama Tarihi	Saklama	Elde Ediliş
<i>N. tridentata</i>	Türkiye	Çanakkale / Gelibolu	2012	Silika – Jel	Arazi
<i>N. tridentata</i>	Türkiye	Çanakkale / Merkez	2012	Silika – Jel	Arazi
<i>N. tridentata</i>	Türkiye	Balıkesir	2013	Silika – Jel	Arazi
<i>N. tridentata</i>	Türkiye	Tekirdağ	1987	Herbaryum	EDTU Herbaryumu
<i>N. tridentata</i>	Türkiye	Edirne / Keşan	1995	Herbaryum	EDTU Herbaryumu
<i>N. tridentata</i>	Türkiye	Kastamonu / Daday	1998	Herbaryum	EDTU Herbaryumu
<i>N. tridentata</i>	Türkiye	Kahramanmaraş	2015	Silika – Jel	Arazi
<i>N. tridentata</i>	Türkiye	Adana	2014	Silika – Jel	Arazi
<i>N. tridentata</i>	Türkiye	Hatay	1991	Herbaryum	RBGE Herbaryumu
<i>N. tridentata</i>	Türkiye	Osmaniye	2015	Silika – Jel	Arazi
<i>N. tridentata</i>	Türkiye	Antalya	2015	Silika – Jel	Arazi
<i>N. tridentata</i>	Türkiye	Trabzon	1987	Herbaryum	RBGE Herbaryumu
<i>N. tridentata</i>	Bulgaristan	Lyalintsi	2012	Silika – Jel	Arazi
<i>N. tridentata</i>	Yunanistan	Litochoro	2012	Silika – Jel	Arazi
<i>N. tridentata</i>	Yunanistan	Pelion	2013	GenBank	KF499509
<i>N. tridentata</i>	Macaristan	Siklos	2013	Silika – Jel	Arazi
<i>N. tridentata</i>	Macaristan	Tokaj	2012	Silika – Jel	Arazi
<i>N. tridentata</i>	Hırvatistan	Učka	2013	Silika – Jel	Arazi

Çizelge 3.1'in devamı

Takson	Ülke	Bölge	Toplama Tarihi	Saklama	Elde Ediliş
<i>N. tridentata</i>	İtalya	Mt. Gargano	2013	Silika – Jel	Arazi
<i>N. tridentata</i>	İtalya	Toskana	2013	Silika – Jel	Arazi
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>ustulata</i>	Macaristan	Varpalota	2010	Silika – Jel	Arazi
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>aestivalis</i>	Romanya	Kirlyko	2013	Silika – Jel	Arazi
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>ustulata</i>	Çek Cumhuriyeti	Velká nad Veličkou	2012	Silika – Jel	Arazi
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>ustulata</i>	İsviçre	Valais	2001	GenBank	AY014549
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>ustulata</i>	İspanya	Leon	2003	GenBank	AY364883
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>ustulata</i>	Macaristan	Budapeşte	2011	GenBank	FR750397
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>ustulata</i>	İspanya	Salamanca	2003	GenBank	AY364883
<i>N. maculata</i>	Yunanistan	Likouria	2012	Silika – Jel	Arazi
<i>N. maculata</i>	Portekiz	Tras os Montes	2002	GenBank	AY364873
<i>N. conica</i>	İspanya	Caceres	2003	GenBank	AY364880
<i>N. maculata</i>	Yunanistan	Kythera	2007	GenBank	AM711744
<i>Platanthera dilatata</i>	ABD	Colorado	2012	GenBank	JX484921
<i>Ophrys phrygia</i>	Türkiye	Antalya	2014	Silika–Jel	Arazi



Şekil 3.1. Tez çalışmasında kullanılan bitki örnekleme haritası

Neotinea tridentata (Scop.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase



Şekil 3.2. *N. tridentata* genel (solda) ve çiçek detay görünümü (sağda) (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Terzioğlu Yerleşkesi, 20.04.2013) (Kaan HÜRKAN)

Basiyonim: *Orchis tridentata* Muhl. ex Willd.

Botanik özellikleri

Bitki 15 – 40 cm yükseklikte olup, yapraklar 4 – 11 adet, lanseolat ve beneksizdir. Brakteler ovaryumun yarısından daha kısadır, soluk lila renktedir. Çiçek durumu sıkça, çiçekler açık kırmızı, mor, leylak rengi veya beyazdır, kokuludur. Sepaller, petallerle beraber miğfer şeklinde, lanseolat ve uzun uçludur, 8 – 13 mm uzunluktadır. Dudak derin üç loplu olup, orta lop iki yarıklı, düz, her iki yan lop orta loptan daha küçük ve daha kısadır. Orta lop ek olarak küçük bir dişçik oluşturur. Orta lop ve yan loplar kenarda hafif yukarıya dönük, beyazımsıdan açık pembeye veya menekşeye kadar renklidir ve sık kırmızı noktaları veya lekeleri bulunur. Mahmuz silindirik ve aşağıya doğru bükülmüştür (Sezik, 1984; Delforge, 2006; Kreutz, 2009). Kromozom sayısı $2n=42$ (Pavarese ve ark., 2013).

Yetiştirme ortamı

Türün yetiştirme ortamı Kreutz (2009)'e göre;

Makilikler, friganalar, çayır alanları, kıraç araziler, yamaç çayırları, seyrek çam ormanları ve yapraklı ormanlar, (Meşe) çalılıklar, zeytinlikler ve fındık kültürleridir. Buralarda daha çok alkalen ve kireçli topraklarda bulunur.

Yükseltiye bağlı (dikey yayılışı) kıyıdan yaklaşık 1700m' ye kadardır.

Genel (yatay) yayılışı; özellikle Orta ve Doğu Akdeniz Rejyonu'nda yayılış göstermekle birlikte bu tür, Orta Avrupa'da Hessen ve Thüringen' de adacıklar şeklinde bulunur. Ayrıca Türkiye'de, Kafkaslar'da, Kuzey Suriye, Kuzey Irak ve Kuzey İran'da görülür.

Türkiye'deki yayılışı; Karadeniz, Marmara, Ege, Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgeleri'nde bulunur. Yayılış alanı Orta Anadolu ve Güney Doğu Anadolu istisnasıyla hemen hemen bütün ülkeyi kapsar. Yetiştirme ortamlarının çoğunluğu Ege, Doğu Akdeniz Bölgesi ve Karadeniz kıyılarıdır. Yerel adı "beyaz dağ salebi" olarak bilinmektedir.

Çiçeklenme zamanı

Türkiye'de deniz seviyesinde Nisan ayının başından Karadeniz'de dağlık alanlarda Haziran ayının ortasına kadardır. Avrupa'da Mart–Haziran (–Temmuz) arasındadır. Çanakkale'de çiçeklenme zamanı Nisan ayının sonundan Mayıs ayının sonuna kadardır.

Melezleri

The International Plant Names Index (IPNI) veritabanına göre;

× *Neotinacampsis huteri* (M.Schulze) B.Bock

Melez soyu:

(*Anacamptis morio* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase × *Neotinea tridentata* (Scop.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase)

× *Neotinacampsis tremezinae* (G.Keller) B.Bock

Melez soyu:

(*Neotinea tridentata* (Scop.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase × *Anacamptis coriophora* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase)

× *Neotinorchis canutii* (K.Richt.) B.Bock

Melez soyu:

(*Orchis militaris* L. × *Neotinea tridentata* (Scop.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase)

× *Neotinorchis untchjii* (M.Schultze) B.Bock

Melez soyu:

(*Neotinea tridentata* (Scop.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase × *Orchis mascula* (L.) L.)

Neotinea ustulata (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase



Şekil 3.3. *N. ustulata* genel (solda) ve çiçek detay görünümü (sağda) (Macaristan, Varpalota, 02.05.2013) (Djordjević V.)

Basiyonim: *Orchis ustulata* (L.)

Botanik özellikleri

10 – 50 (– 60) cm uzunluğunda; 5 – 10 yapraklı, yapraklar beneksiz, oblong – akuminat görünüşten geniş lanseolat duruma kadar, 2,5 – 15 cm × 0,5 – 3 cm boyutlarındadır. Üst 1 – 2 yaprak brakte gibidir. Brakteler membranımsı, kırmızımsı, ovaryumdan hafifçe kısadır. Çiçek durumu yoğun, kısa ve ovoid şeklindedir. Çiçekler hafif

kokulu, 80 adete kadardır. Çiçek durumunun iç kısmı pembeden yeşilimsi mora, dış kısmında ise pembeden, koyu siyahımsı kahverengiye kadar renklenme göstermektedir.

Çok fazla varyasyon göstermemekte olup, “*aestivalis*” alttüründe çiçeklenmenin sonuna doğru bitki 82 cm uzunluğunda olabilmektedir. Muhtemelen bir ekotiptir (Delforge, 2006). Koromozom sayısı $2n=42$ (Pavarese ve ark., 2013).

Yetiştirme ortamı

Avrupa – Sibiryaya elementidir. Akdeniz’den Baltık Denizi’ne kadar geniş yayılışa sahip ve bazen dağlık alanlarda bol, diğer yerlerde nadirdir. Akdeniz Bölgesi’nde çok nadirdir (Delforge, 2006).

Türkiye’de ise tek yayılışı Artvin, Şavşat’tadır.

Çiçeklenme zamanı

Avrupa’da Nisan ayından Ağustos ayına kadardır. Türkiye’de ise Haziran ayındadır.

Melezleri

IPNI veritabanına göre;

× *Neotinacamptis durandii* (Bréb.) B.Bock

Melez soyu:

(*Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich. × *Neotinea ustulata* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase)

× *Neotinarhiza labbei* (C.Bernard) B.Bock

Melez soyu:

(*Neotinea ustulata* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase × *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó)

× *Neotinorchis doellii* (W.Zimm.) B.Bock

Melez soyu:

(*Neotinea ustulata* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase × *Orchis simia* Lam.)

× *Neotinacamptis franzonii* (M.Schulze) B.Bock

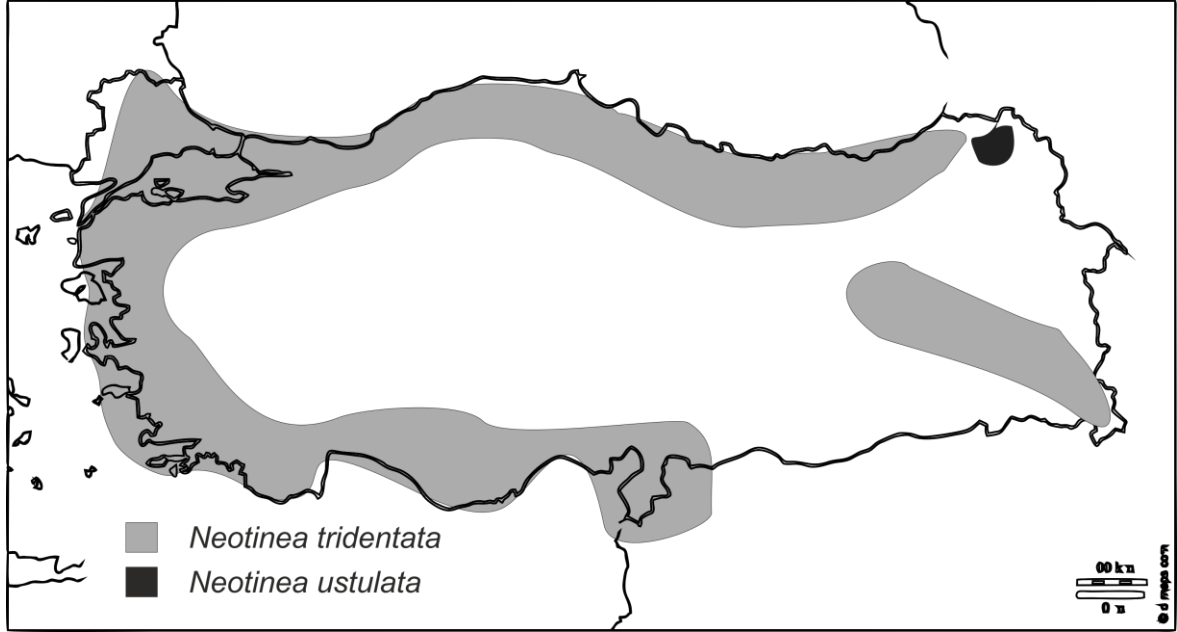
Melez soyu:

(*Neotinea ustulata* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase × *Anacamptis coriophora* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase)

Neotinea × dietrichiana (Bogenh.) H.Kretzschmar , Eccarius & H.Dietr.

Melez soyu:

(*Neotinea ustulata* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase × *Neotinea tridentata* (Scop.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase)



Şekil 3.4. *N. tridentata* ve *N. ustulata* türlerinin Türkiye’deki yayılış haritası (Kreutz, 2009)’dan değiştirilerek

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki teşhisi

Çalışmada kullanılan bitkilerin teşhisleri arazi sırasında, ilgili floralar aracılığı ile yapılmıştır (Sezik, 1984; Buttler, 1996; Delforge, 2006; Kreutz, 2009). Arazide bitki teşhislerinde ayrıca orkide filogenisi araştırmacısı Dr. Sramko GABOR’un, arazi sırasında çekilen genel ve detaylı fotoğraflardan teşhis kontrollerinde ise C.A.J. Kreutz’un yardımları alınmıştır.

3.2.2. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için Modifiye “Cetyltrimethylammonium bromide” (CTAB) yöntemi kullanılmıştır (Doyle, 1987). DNA izolasyonu sonrasında DNA miktarı ve kalitesi değerlendirmesi için NanoDrop 1000, Qubit 2.0 veya jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır.

CTAB yöntemi için tampon çözeltilerin hazırlanması

150 ml'lik hacimde CTAB izolasyon tamponunu hazırlamak için; toz halindeki 3 g CTAB 15 ml 1 M Tris-HCL, 42 ml 5 M NaCl, 6ml 0,5 M EDTA ve 86,7 ml ultra saf su (Gibco, UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, USA) içerisinde çözdürülmüştür. Çözelti oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.2.3. Uygulanan CTAB yöntemi

İzolasyon için gerekli Polyvinylpyrrolidone (PVP) (0,3 g / örnek) ve B-mercaptoethanol (2 µl / örnek) protokolün uygulanmasından hemen önce CTAB tampon çözeltisine eklenmiştir ve 65°C sıcaklıktaki su banyosuna (Mammert marka) alınmıştır.

- Yaklaşık 0,5 g yaprak dokusu homojenizasyon işlemi için önceden soğutulmuş porselen havanlarda sıvı azot ile dondurulmuş ve toz haline gelinceye kadar havan eli ile ısınmasına izin verilmeden parçalanmıştır. Daha sonra üzerine 800 µl CTAB çözeltisi eklenmiş ve tekrar homojenize edilerek, 1,5 ml'lik tüplere alınmıştır. Örnekler bekletilmeden 65°C sıcaklıktaki su banyosunda her 10 dakikada bir hafifçe karıştırılarak 1 saat bekletilmiştir.

- Bu süre sonunda tüpler azami hızda (14000 x g) 3 dakika santrifüj edilmiştir (Eppendorf Minispin Plus).

- Santrifüj sonrasında oluşan supernatant kısım yeni eppendorf tüplerine alınarak üzerine 700 µl saf kloroform eklenmiş ve 10 dakika boyunca hafifçe karıştırılmıştır.

- Tüpler 4 dakika boyunca azami hızda 4 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

- Tüplerde oluşan supernatant yeni bir eppendorf tüpe alınmış ve üzerine 550 µl saf kloroform eklenerek 10 dakika hafifçe karıştırılmıştır.

- Tüpler 5 dakika boyunca azami hızda 4 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

- Daha sonra supernatant yeni eppendorf tüpe alınmış ve üzerine 550 µl saf izopropanol ve 85 µl (8,5 M) amonyum asetat eklenerek -20°C'de bir saat bekletilmiştir.

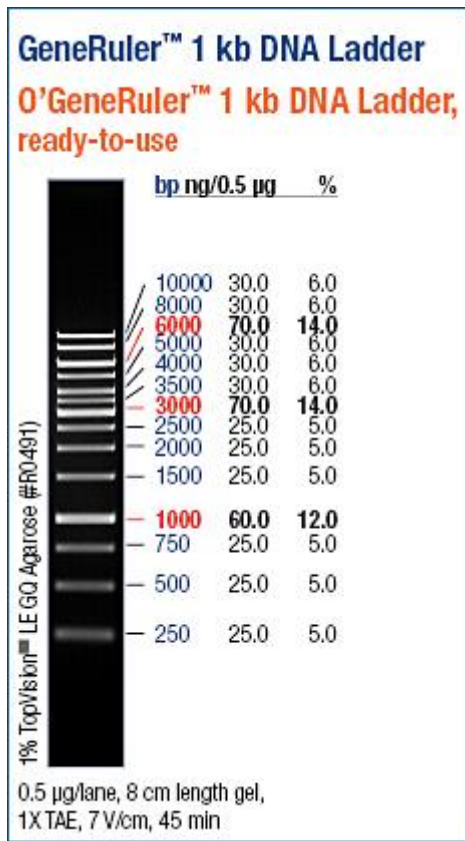
- Bu süre sonunda tüpler azami hızda 12 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.

- Ardından supernatant atılarak tüplere %70'lik 400 µl soğuk etanol eklenmiş, 7000 d/d 3 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki defa tekrarlanarak çift yıkama yapılmıştır.

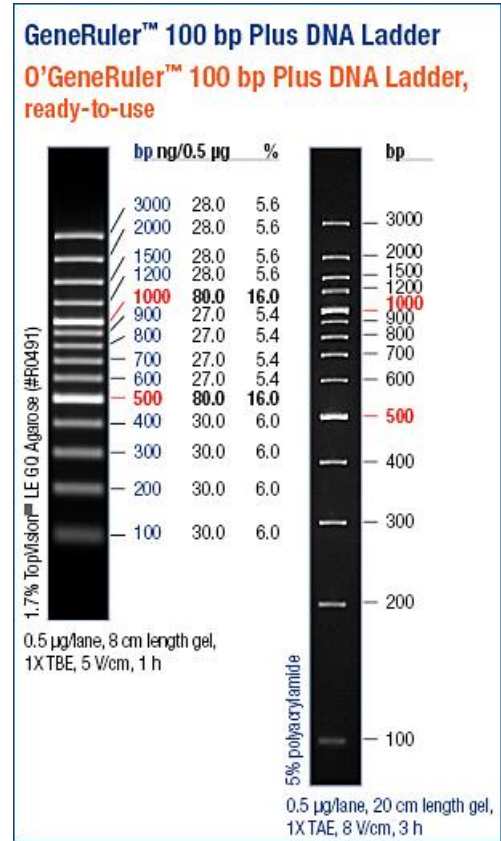
- Üst fazlar atılarak tüplerin kurumaları ve alkolün tamamen uzaklaşması beklenmiştir.

• Tüplere DNA miktarına göre 70-100 µl arasında 10 mM pH 8,5 TE çözeltisi eklenmiş, oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiş, daha sonra 4°C’de bir gece bekletildikten sonra -20°C’de saklanmıştır.

İzole edilmiş DNA’ların görüntülenmesinde agaroz jel (Biomax, Prona, EU) elektroforezi yöntemi ve UV görüntüleme sistemi kullanılmıştır. Jel elektroforezinde DNA markörü olarak Fermentas 1kb DNA Ladder (Fermentas, USA) (Şekil 3.4) ve GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas, USA) (Şekil 3.5) kullanılmıştır. DNA miktar ölçümü için ise Qubit 2.0 flourometre (Life Technologies, USA) cihazı ile birlikte Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies, USA) kullanılmıştır. Ayrıca bazı DNA miktarı ölçümleri için NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) spektrofotometre kullanılmıştır.



Şekil 3.5. 1kb DNA Ladder haritası



Şekil 3.6. 100 bç DNA Ladder haritası

3.2.4. nrITS bölgesinin PZR ile çoğaltılması

Tez çalışmasında nrITS bölgesinin PZR ile çoğaltılmasında bitkilere özgü ITS1A ve evrensel ITS4 primerleri kullanılmıştır (White ve ark., 1990) (Çizelge 3.2). Primerler Thermo Scientific firmasına sentezletilmiştir. 100 µmol ana stok hazırlanmış, PZR

reaksiyonunda kullanılmak üzere ise 10 kat sulandırılmış (10 µmol) ve -20° C’de depolanmıştır.

PZR BIO–RAD marka PTC–200 model thermal cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. Bu bölgenin çoğaltılması için hazırlanan 25 µl’lik PZR karışımında 2,5 µl 10x reaksiyon tamponu (Fermentas, USA), 0,5 µl 10 mM dNTP (Fermentas, USA), 2 µl 25 mM MgCl₂ (Fermentas, USA), 1,25 µl 20 mg/ml BSA, 0,5 µl 10 µM ileri ve geri primer (Thermo Scientific, USA), 0,1 µl 5 U Taq polimeraz (Fermentas, High – Fidelity, USA), 16,65 µl su ve 1 µl (~5 ng µl⁻¹) kalıp DNA kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Bölgenin çoğaltılması için kullanılan PZR profili Çizelge 3.4’te verilmiştir. PZR ürünleri -20°C’ de saklanmıştır. Çoğaltılması beklenen ürün boyutu yaklaşık 850 bç uzunluğundadır.

Çizelge 3.2. nrITS bölgesinin PZR tekniği ile çoğaltılması için kullanılan primer dizileri

İleri: ITS1A	5’ GACGTCGCGAGAAGTCCA 3’
Geri: ITS4	5’ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3’

Çizelge 3.3. nrITS bölgesi için kullanılan PZR karışımı (1 reaksiyon için toplam 25µl)

Kimyasal	Miktar (µl)
Su	16,65
10× Reaksiyon tamponu	2,5
10 mM dNTP	0,5
25 mM MgCl ₂	2
20 mg/ml BSA	1,25
10 µM İleri primer	0,5
10 µM Geri primer	0,5
5 U Taq	0,1
Kalıp DNA	1

Çizelge 3.4. nrITS bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR koşulları

İşlem	Sıcaklık Değeri	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94° C	2 dakika	1
Denatürasyon	94° C	20 saniye	33
Bağlanma	51° C	30 saniye	33
Uzama	72° C	1 dakika	33
Son Uzama	72° C	10 dakika	1

3.2.5. *accD* – *psaI* bölgesinin PZR ile çoğaltılması

accD – *psaI* kloroplast bölgesinin PZR ile çoğaltılmasında *accD*-f ve *psaI*-r primerleri kullanılmıştır (Small ve ark., 1998) (Çizelge 3.5). PZR BIO–RAD marka PTC–200 model thermal cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. Bu bölgenin çoğaltılması için hazırlanan 25 µl’lik PZR karışımında 2,5 µl 10x reaksiyon tamponu (Fermentas, USA), 0,5 µl 10 mM dNTP (Fermentas, USA), 2 µl 25 mM MgCl₂ (Fermentas, USA), 1,25 µl 20 mg/ml BSA, 0,5 µl 10 µM ileri ve geri primer (Thermo Scientific, USA), 0,1 µl 5U Taq polimeraz (Fermentas, High – Fidelity, USA), 16,65 µl su ve 1 µl (~5 ng µl⁻¹) kalıp DNA kullanılmıştır (Çizelge 3.6). Bölgenin çoğaltılması için kullanılan PZR profili çizelge 3.7’de verilmiştir. PZR ürünleri -20°C’ de saklanmıştır. Çoğalması beklenen ürün boyutu yaklaşık 1200 bp uzunluğundadır.

Çizelge 3.5. *accD* – *psaI* bölgesinin PZR tekniği ile çoğaltılması için kullanılan primer dizileri

İleri: <i>accD</i> -f	5' GGTA AAAAGAGTAATTGAACAAAC 3'
Geri: <i>psaI</i> -r	5' GGAAATACTAAGCCCACTAAAGGCACA 3'

Çizelge 3.6. *accD* – *psaI* bölgesi için kullanılan PZR karışımı (1 reaksiyon için toplam 25 µl)

Kimyasal	Miktar (µl)
Su	16,65
10× Reaksiyon tamponu	2,5
10 mM dNTP	0,5
25 mM MgCl ₂	2
20 mg/ml BSA	1,25
10 µM İleri primer	0,5
10 µM Geri primer	0,5
5U Taq	0,1
Kalıp DNA	1

Çizelge 3.7. *accD – psal* bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR koşulları

İşlem	Sıcaklık Değeri	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94° C	3 dakika	1
Denatürasyon	94° C	30 saniye	34
Bağlanma	55° C	30 saniye	34
Uzama	72° C	1 dakika	34
Son Uzama	72° C	10 dakika	1

PZR ürünlerinin görüntülenmesinde agaroz jel elektroforezi yöntemi ve UV görüntüleme sistemi kullanılmıştır. Oluşan PZR ürünlerinin ölçümü için ise Qubit 2.0 flourometre (Life Technologies, USA) cihazı ile birlikte Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies, USA) kullanılmıştır.

PZR ürünleri dizileme işlemlerinde hatalara yol açabilecek artık maddelerden (primerler, nükleotidler enzim ve tuz gibi) kit yardımı ile üretici firmanın (Thermo Scientific PCR Purification Kit–K0701) önerdiği şekli ile saflaştırılmıştır.

3.2.6. PZR ürünleri saflaştırma yöntemi

- Tüm döndürme işlemleri 14000 d/d ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.
- PZR ürününe 1:1 hacimde bağlama tamponu (Binding buffer) eklenmiş ve karıştırılmıştır. Sarı renkli olan bu karışım kolona DNA bağlanması için ideal pH sağlandığını göstermiştir.
- Karışım saflaştırma kolonuna aktarılmış ve 60 saniye santrifüj edilmiş ve alt kısımda biriken sıvı atılmıştır.
- Kolon üzerine 700 µl yıkama tamponu eklenmiş ve 60 saniye santrifüj edilmiştir. Alt kısımda toplanan sıvı atılmış ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- Boş olan saflaştırma kolonu tekrar 60 saniye santrifüj edilmiştir.
- Saflaştırma kolonu temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve 50 µl DNA çözdürme tamponu (Elution buffer) eklenerek 60 saniye santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpü ve saflaştırma kolonu -20°'de saklanmıştır.

3.2.7. Agaroz jelden PZR ürünü saflaştırma yöntemi

Dizilemeye gönderilecek bazı PZR ürünleri, agaroz jelden izole edilip saflaştırılmıştır. Jelden izolasyon için Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit

(K0691), üretici firmanın protokolüne uyularak aşağıda anlatıldığı gibi kullanılmıştır.

3.2.8. PZR ürünleri saflaştırma protokolü

- Tüm döndürme işlemleri 14000 d/d ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.
- Jelden kesilerek alınan ve ağırlığı ölçülen jele 1:1 hacimde bağlama tamponu (Binding buffer) eklenmiş ve 65° C sıcaklıktaki su banyosunda 10 dakika boyunca jelin erimesi sağlanmıştır.
- Karışım saflaştırma kolonuna aktarılmış ve 60 saniye santrifüj edilmiş ve alt kısımda biriken sıvı atılmıştır.
- Kolon üzerine 700 µl yıkama tamponu eklenmiş ve 60 saniye santrifüj edilmiştir. Alt kısımda toplanan sıvı atılmış ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- Boş olan saflaştırma kolonu tekrar 60 saniye santrifüj edilmiştir.
- Saflaştırma kolonu temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve 50 µl DNA çözdürme tamponu (Elution buffer) eklenerek 60 saniye santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpü ve saflaştırma kolonu -20°'de saklanmıştır.

3.2.9. DNA dizileme

DNA dizileme işlemleri hizmet alımı yoluyla yapılmıştır. Saflaştırılan PZR ürünleri ve ilgili primerler MacroGen Inc. (Hollanda) firmasına gönderilmiştir. PZR ürünlerinin dizilenmesi hizmet alımı yolu ile gerçekleştirilmiştir. Dizileme cihazı olarak ABI 3100 Genetic Analyzer kullanılmıştır. nrITS bölgesi için tek primer ile tek yönlü dizileme işlemi gerçekleştirilirken, *accD* – *psaI* bölgesi için çift primer ile iki yönlü okuma gerçekleştirilmiştir.

3.2.10. DNA dizilerinin işlenmesi ve düzenlenmesi

Hizmet alım yolu ile elde edilen DNA okumalarının kalite kontrolleri, düzenlenmesi ve işlenmesi Geneious R8 (Kearse ve ark., 2012) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yazılımın kullanılarak okumalar sonrasında elde edilen dizilerimizin 3' ve 5' bölgelerinde bulunan primer bağlanma noktaları ve gereksiz bölgeler silinmiş ve okuma kalitesi düşük DNA bölgelerinin elenmesini sağlamıştır. DNA dizileri daha sonra National Center for Biotechnology Information (NCBI) veritabanında Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) aracı kullanılarak analiz edilmiştir. BLASTn programında sorgu dizisi olarak hizmet alımı yolu ile elde edilen DNA dizileri, veritabanı olarak da Nükleotid Koleksiyonu kullanılmış ve program parametreler değiştirilmeden çalıştırılmıştır. Daha

sonra, BLASTn sonuçları e değeri ve % benzerlik dikkate alınarak incelenmiş ve veritabanında benzerlik oranı en yüksek olan diğer türlere ait diziler bilgisayara GenBank (full) formatında indirilmiştir.

accD – psaI bölgesi için de Geneious R8 yazılımı kullanılarak okumalar sonrasında elde edilen dizilerimizin 3' ve 5' bölgelerinde bulunan primer bağlanma noktaları ve gereksiz bölgeler silinmiş ve okuma kalitesi düşük DNA bölgelerinin elenmesini sağlamıştır. Bu bölge için gerçekleştirilen iki yönlü dizileme sonuçları karşılaştırılmış, düşük sinyalli veya kararsız bölgeler, diğer yön dizisindeki daha kaliteli bölgeler ile değiştirilmiş ve karar dizileri elde edilmiştir. Polimorfik bölgeler için dizilerde International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) anlaşmazlık sembolleri kullanılmıştır (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) anlaşmazlık sembolleri

Sembol	Çevirisi
R	A veya G (pürinler)
Y	C veya T/U (pirimidinler)
M	A veya C
K	G veya T/U
S	C veya G
W	A veya T/U
H	A, C veya T/U
B	C, G veya T/U
V	A, C veya G
D	A, G veya T/U
N	A, C, G veya T/U

3.2.11. DNA dizilerinin hizalanması “Alignment”

Her iki genom bölge dizileri için çoklu hizalama (multiple alignment) işlemi ClustalW yazılımı (Larkin ve ark., 2007) kullanılarak, Gap open cost 15, Gap extend cost 6.66 parametreleri ile yapılmıştır. Optimum hizalama elde edebilmek için hizalama sonuçları göz ile kontrol edilmiş, gerektiğinde düzenlemeler yapılmıştır. Daha sonra NCBI veritabanındaki nrITS dizi verileri kullanılarak ITS1, 5.8s rRNA ve ITS2 bölgelerin etiketleme işlemi (annotation) yapılmıştır.

3.2.12. DNA dizisi nükleotid değişikliği çalışması

DNA dizilerinin hizalanmasından sonra her iki genomik bölge için de ayrı ayrı nükleotid değişikliği sayıları ile yüzdelerinin verildiği ve karşılaştırıldığı bir tablo hazırlanmıştır (Çizelge 4.8). Bu tablo, DNA dizi verilerinin olarak değerlendirildiği ve çalışılan hangi genomik bölgenin grup içinde ve grup dışında ne derece çözünürlüğe sahip olduğunu göstermektedir. Nükleotid değişiklik analizleri iki grupta incelenmiştir. İlk grup olan “iç grup”; *N. tridentata*, *N. ustulata* subsp. *ustulata*, *N. ustulata* subsp. *aestivalis*, *N. maculata*, *N. conica* örneklerinden oluşmakta, ikinci grup olan “dış grup” ise; *O. phrygia* türüne ait bir bireyden oluşmaktadır. Bu aşamada nrITS bölgesini oluşturan ITS1, 5.8S rRNA ve ITS2 parçalarının ayrı ayrı kendi aralarında varyasyon durumları da incelenmiştir. Bunun için ilk olarak elimizdeki DNA dizilerinin gen bölgelerinin etiketlenmesi (annotation) gerekmektedir. Soliva (2001) tarafından NCBI veritabanına AY014549 erişim numarası ile kaydedilen nrITS bölgesinin parçaları olan ITS1, 5.8S ve ITS2 alanlarının etiketlenmesinin bulunduğu *N. ustulata* (Valais-CH) örneği Geneious R8 yazılımı içerisine alınmıştır. Yazılım içerisinde etiketlenmesi yapılmamış tüm diziler seçilerek “Live Annotation” seçeneği ve %100 benzerlik ayarı seçilerek tüm dizilerin etiketlenmesi yapılmıştır.

accD-psaI bölgesi için ise etiketleme işlemi GenBank veritabanından indirilen orkide komple kloroplast genom dizileri (erişim numaraları KJ566307, KJ524104 ve KJ566307) referans alınarak Geneious R8 yazılım ortamında %100'den %50'ye kadar değişen benzerlik ayarı seçilerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.13. Filogenetik ağaçların oluşturulması

Tez çalışmasında, hizalama işlemleri yapılmış olan nrITS ve *accD – psaI* bölgelerine ait DNA dizileri kullanılarak filogenetik ağaçlar yeniden oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında üç farklı arama felsefesi kullanılmıştır; a) PAUP v4.0b10 (Swofford, 2003) yazılımı ile Maximum Parsimony (MP) altında Heuristic Search ve Maximum Likelihood, c) MrBayes v3.2.1 (Ronquist ve ark., 2012) yazılımı ile Bayesian Phylogeny Estimation.

N. maculata ve *N. conica* örneklerinin çalışmaya eklenmelerinin sebebi, çalışmanın ana bitki materyali olan *N. tridentata* ve *N. ustulata* örneklemeleri sırasında sistematik açıdan yanlış bir teşhis veya laboratuvar çalışmalarında yanlış etiketleme gibi olası hataları tespit edebilmektir. *N. tridentata* ve *N. ustulata* türlerine sistematik açıdan yakın olan bu

türler bize, oluşturulan ağaçların doğruluğu açısından ipucu sağlamaktadır. PAUP yazılımında sezgisel arama (Heuristic Search) parametreleri; ağaçlar 1000 rastgele dizi tekrarı ile elde edilmiş, nrITS ağacı için dış grup olarak *O. phrygia*, *accD-psaI* ağacı için ise *Platanthera dilatata* seçilmiştir. Oluşturulan ağaç, Geneious R8 yazılımı içerisine aktarılarak dallanma ile ilgili işlemler (branch swap, destek değerlerinin gösterimi, dalların transformasyonu) bu yazılım ortamında gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında kullanılan PAUP komutları ve yazılım tarafından verilen tepkiler şu şekildedir;

Heuristic search settings:

Optimality criterion = parsimony

Character-status summary:

of 620 total characters:

All characters are of type 'unord'

All characters have equal weight

576 characters are constant

7 variable characters are parsimony-uninformative

Number of parsimony-informative characters = 37

Gaps are treated as "missing"

Starting tree(s) obtained via stepwise addition

Addition sequence: simple (reference taxon = taxon1)

Number of trees held at each step during stepwise addition = 1

Branch-swapping algorithm: tree-bisection-reconnection (TBR)

Steepest descent option not in effect

Initial 'MaxTrees' setting = 100 (will be auto-increased by 100)

Branches collapsed (creating polytomies) if maximum branch length

is zero

'MulTrees' option in effect

Topological constraints not enforced

Trees are unrooted

Outgroup status changed:

1 taxon transferred to outgroup

Total number of taxa now in outgroup = 1

Number of ingroup taxa = 27

Bootstrap method with heuristic search:

Number of bootstrap replicates = 1000

Starting seed = 222833220

Optimality criterion = parsimony

Maximum Likelihood (ML) ağaçlarının çizilmesi için nükleotid değişikliği modeli hesaplanmıştır. ITS bölgesi ağaç çizimleri için “Modified Kimura” (K2) modeli, *accD-psaI* ağacı için ise “Tamura ve Nei 1993” (TN93) modelinin uygunluğu MEGA 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, ve Kumar 2013) yazılımı ile belirlenmiştir. Ağaçlar 1000 rastgele dizi tekrarı ile elde edilmiş, nrITS ağacı için dış grup olarak *O. phrygia*, *accD-psaI* ağacı için ise *Platanthera dilatata* seçilmiştir.

Bayesian Phylogeny Estimation yaklaşımında ise parametreler; substitution model: HKY85, outgroup: *N. maculata*, chain length: 1100000, heated chains: 4, rate variation: gamma, unconstrained branch lengths: 10, random seed: 23,851 şeklindedir.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan yöntem ile hem araziden toplanan taze dokulardan hem de herbaryum örneklerinin tamamından DNA izole edilebilmiştir. Daha sonra izole edilen DNA'ların kalitesi ve miktarları Agaroz Jel Elektroforezi (Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3), NanoDrop (Çizelge 4.1) ve Qubit analizleri (Çizelge 4.2) ile gerçekleştirilmiştir. DNA örneklerinin miktarları 12,93 ve 495,32 ng/ul arasında değişmiştir.

Bu sonuçlara göre, araziden taze olarak toplanan yaprak örneklerinden izole edilen DNA miktarı 400 ng/μl seviyesine çıkabilirken, herbaryum örneklerinden izole edilen DNA miktarı, yaprakların kuruma şartlarına göre 79,16 ng/μl ile 284,12 ng/μl aralığında değişiklik göstermiştir.

Bu sonuçlara göre herbaryum örneklerinden izole edilen DNA miktarının, araziden taze olarak toplanan örneklere göre istisnai durumlar dışında genel anlamda daha az olduğu görülmüştür.

Bununla birlikte çalışmada *N. tridentata* (Mt. Gargano-IT) örneklerinden 37,52 ng/μl ve *N. tridentata* (Toskana-IT) örneklerinden ise sadece 12,93 ng/μl DNA elde edilmiştir. Bu miktarların diğer örnekler ile karşılaştırıldığında daha az miktarda olduğu anlaşılmıştır (Çizelge 4.1). Bu durumun nedeni her iki örnekte yaprakların toplanırken vejetasyon sürecinin sonlarına yaklaşmış ve çürümeye başlamış olmasından kaynaklanabilir.

Çalışmada miktarları az olmasına karşın *N. tridentata* (Mt. Gargano-IT) ve *N. tridentata* (Toskana-IT) örnekleri de dahil olmak üzere tüm bitkilerden elde edilen DNA'lar ile PZR çalışmalarına devam edilmiştir. Toplam DNA miktarı 200 ng/μl'den fazla olan DNA örnekleri, PZR reaksiyonunda daha iyi verim alınması amacıyla gerekli oranlarda sulandırılmış ve DNA miktarları 100 ng/μl olacak şekilde ayarlanmıştır.

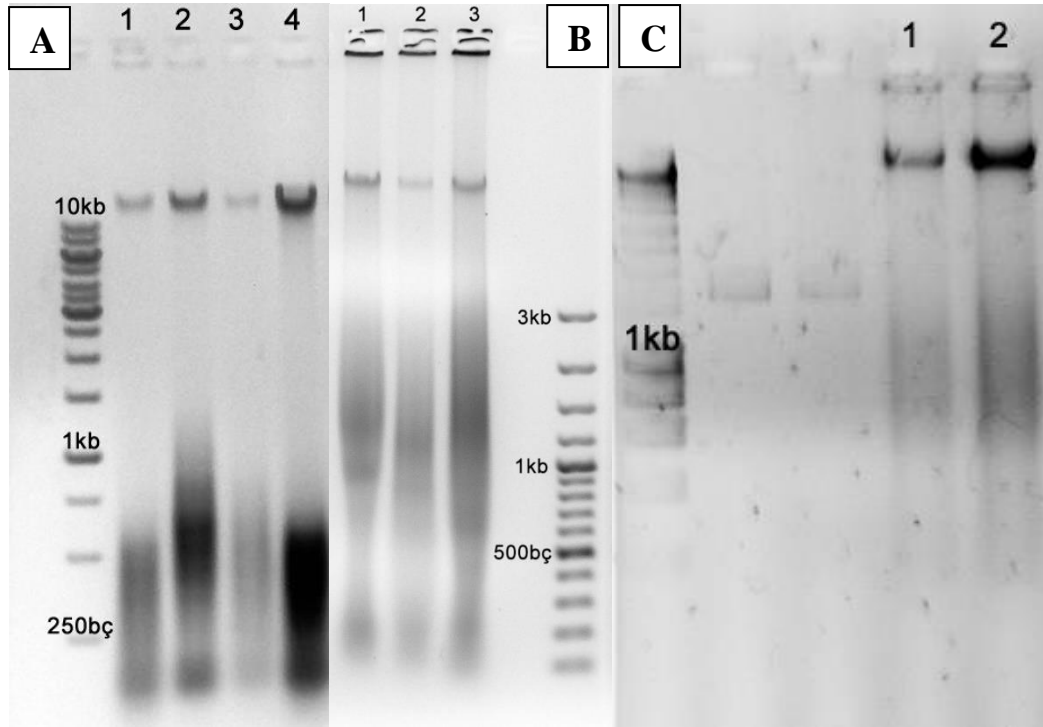
Çalışmada ayrıca NanoDrop ile 260/230 nm dalga boylarında ölçümler yapılarak DNA örneklerinin protein kontaminasyonu belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Örneklerde 260/230 nm oranının 1,8'den farklı olması izolatin içerisinde fenol veya protein gibi aromatik içerikler taşıyabilen organik kontaminantların olabileceğini göstermektedir. Bu kalıntıların DNA izolasyonu sırasında etanol yıkaması aşamasından kalıntılar olabilmektedir. Bu kontaminasyon PZR performansını etkileme ihtimali düşük olsa da 260/230 nm oranının

1,0 değerinin altına düştüğü *N. tridentata* (Toskana-IT), *N. tridentata* (Monte Gargano-IT) ve *N. tridentata* (Tokaj-HU) örnekleri için DNA izolasyon işlemleri tekrarlanması gerektiğine karar verilmiştir. Buna karşın *N. tridentata* (Mt. Gargano-IT) ve *N. tridentata* (Toskana-IT) örnekleri için yeteri kadar doku olmaması nedeniyle bu iki örnek için DNA izolasyon tekrarlanmamıştır.

Çalışmada ayrıca izolasyon sonrası DNA örnekleri %1.0 agaroz jel içerisinde yürütülmüş ve kalitesi kontrol edilmiştir (Şekil 4.1). Bu sonuçlara göre taze dokuların kullanıldığı izolasyonlardan *N. tridentata* (Antalya-TR), *N. tridentata* (Osmaniye-TR), *N. tridentata* (Hatay-TR), *N. tridentata* (Trabzon-TR), *N. tridentata* (Adana-TR), *N. tridentata* (Kahramanmaraş-TR) örneklerinde DNA'ların sürüntü oluşturmadıkları, buna karşın herbaryum örneklerinin kullanıldığı *N. tridentata* (Tekirdağ-TR), *N. tridentata* (Edirne-TR) ve *N. tridentata* (Kastamonu-TR) örneklerinde sürüntü miktarlarının yüksek olduğu anlaşılmıştır. Bu örneklerde sürüntü miktarlarının yüksek olması herbaryumlardan alınan dokuların uygun şartlarda saklanmamasından kaynaklanmıştır.

Çizelge 4.1. DNA miktar ve kalite ölçümleri NanoDrop sistemi ile yapılan örnekler

No	Örnek	DNA Miktarı (ng/µl)	260/230 nm Safılık
1	<i>N. tridentata</i> (Çanakkale-TR)	495,32	1,2
2	<i>N. tridentata</i> (Gelibolu-TR)	400,35	1,25
3	<i>N. tridentata</i> (Balıkesir-TR)	314,55	1,66
4	<i>N. tridentata</i> (Antalya-TR)	214,05	1,58
5	<i>N. maculata</i> (Likouria-GR)	164,39	1,2
6	<i>N. tridentata</i> (Litochoro-GR)	94,34	1,2
7	<i>N. ustulata</i> (Lyalintsi-BU)	220,83	1,33
8	<i>N. ustulata</i> subsp. <i>aestivalis</i> (Kiralykö-RO)	133,58	1,18
9	<i>N. tridentata</i> (Siklos-HU)	233,22	2,154
10	<i>N. ustulata</i> (Velká nad Veličkou -CZ)	335,43	3,163
11	<i>N. tridentata</i> (Tokaj-HU)	177,45	1,674
12	<i>N. tridentata</i> (Učka-HR)	197,36	1,877
13	<i>N. tridentata</i> (Monte Gargano-IT)	37,52	1,114
14	<i>N. tridentata</i> (Toskana-IT)	12,93	1,025
15	<i>N. ustulata</i> (Varpalota-HU)	117,49	1,086



Şekil 4.1. DNA izolasyonu sonrası Agaroz Jel Elektrofrez görüntüsü Kuyucuklar **A:** 1) *N. tridentata* (Hatay-TR), 2) *N. tridentata* (Trabzon-TR), 3) *N. tridentata* (Adana-TR), *N. tridentata* (Kahramanmaraş). DNA Ladder: 1 kb. **B:** 1) *N. tridentata* (Tekirdağ-TR), 2) *N. tridentata* (Edirne-TR), 3) *N. tridentata* (Kastamonu-TR). DNA Ladder: 100 bç. **C:** *N. tridentata* (Antalya-TR) (1 numaralı örnek, daha önceden NanoDrop ile ölçüldü Çizelge 4.1) ve *N. tridentata* (Osmaniye-TR) (2 numaralı örnek) Qubit ölçüm değerleri 1) 110,12 ng/µl, 2) 317,55 ng/µl. DNA Ladder: 1 kb

Çizelge 4.2. Şekil 4.1'deki örneklerin Qubit DNA miktarı ölçüm sonuçları

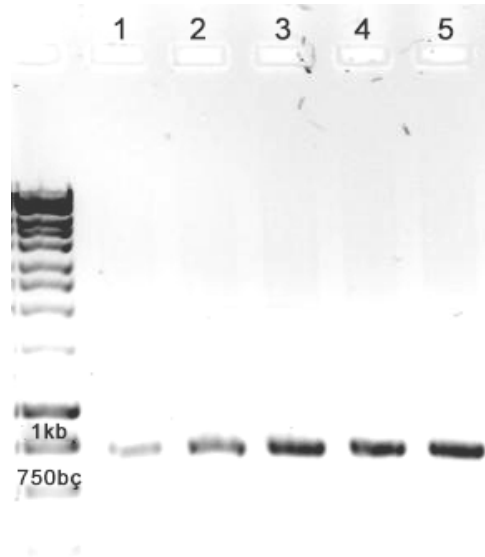
Kuyucuk No	Örnek	DNA Miktarı (ng/µl)
A1	<i>N. tridentata</i> (Hatay-TR)	88,50
A2	<i>N. tridentata</i> (Trabzon-TR)	214,22
A3	<i>N. tridentata</i> (Adana-TR)	79,16
A4	<i>N. tridentata</i> (Kahramanmaraş)	284,12
B1	<i>N. tridentata</i> (Tekirdağ-TR)	125,12
B2	<i>N. tridentata</i> (Edirne-TR)	98,16
B3	<i>N. tridentata</i> (Kastamonu-TR)	141,02

4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

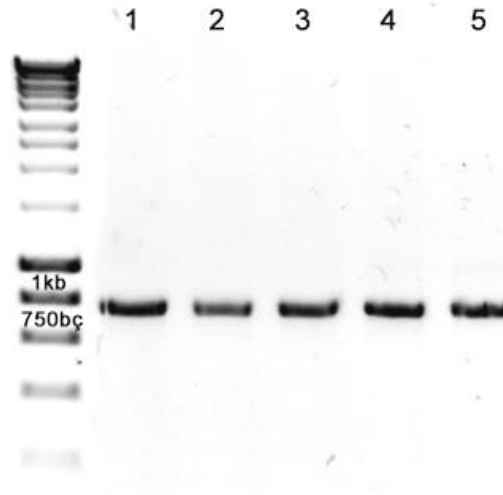
4.2.1. nrITS bölgesine ait PZR bulguları

Çalışmada tüm örneklerden nrITS bölgesi PZR tekniği ile sorunsuz bir şekilde çoğaltılmıştır. nrITS bölgesinin çoğaltılması için GC içeriği yüksek (%52,6) ve literatür araştırmalarında sıklıkla önerilen primerler seçilmiştir (White ve ark., 1990). Ayrıca bu bölge GC içeriği açısından uygun olan (%46-50) bir DNA bölgesidir. Buna ek olarak çalışmada yüksek verimli ve hata düzeltme özelliği olan bir Taq DNA polimeraz enzimi tercih edilmiştir. Bunun dışında çalışmada, fungus kontaminasyon riski nedeni ile kapalı tohumlular (Angiosperm) grubuna özgü tasarlanmış ITS1A primeri tercih edilmiştir.

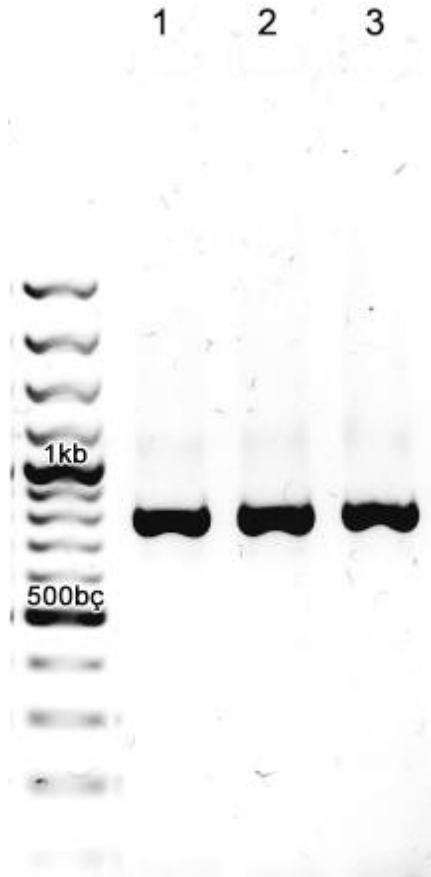
PZR sonrasında ürünlerin varlıkları agaroz jel elektroforezi ile miktarları ise Qubit veya Nanodrop cihazları ile ölçülmüştür (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Çizelge 4.3). Agaroz jel elektroforezi sonuçlarına göre tüm örneklerden beklenen boyutlarda (yaklaşık 850 bp) ürün elde edilmiştir. Bu ürünlerin miktarlarının birçok örnek için 40ng/ul üzerinde olduğu anlaşılmıştır. Qubit veya NanoDrop cihazlarının kullanılmadığı durumlarda ise çoğaltılan ürünlerin jel görüntüleri DNA Ladder ile karşılaştırılarak dizilemeye uygun miktarda olduklarına karar verilmiştir.



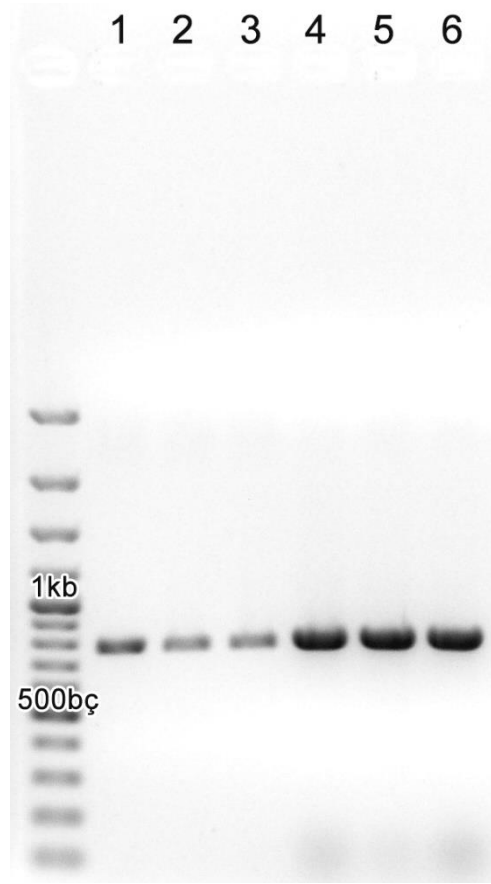
Şekil 4.2. nrITS bölgesine ait birinci PZR ürün grubunun agaroz jel elektroforez görüntüsü
Kuyucuklar: 1) *N. tridentata* (Gelibolu-TR), 2) *N. tridentata* (Çanakkale-TR), 3) *N. tridentata* (Litochoro-GR), 4) *N. maculata* (Likouria-GR), 5) *N. tridentata* (Lyalintsi-BU). DNA Ladder: 1 kb



Şekil 4.3. nrITS bölgesine ait ikinci PZR ürün grubunun agaroz jel elektroforez görüntüsü
Kuyucuklar: 1) *N. ustulata* (Varpalota-HU), 2) *N. ustulata* subsp. *aestivalis* (Kiralykö-RO), 3) *N. tridentata* (Siklos-HU), 4) *N. ustulata* (Velka nad Velickou-CZ), 5) *N. tridentata* (Tokaj-HU).
DNA Ladder: 1 kb



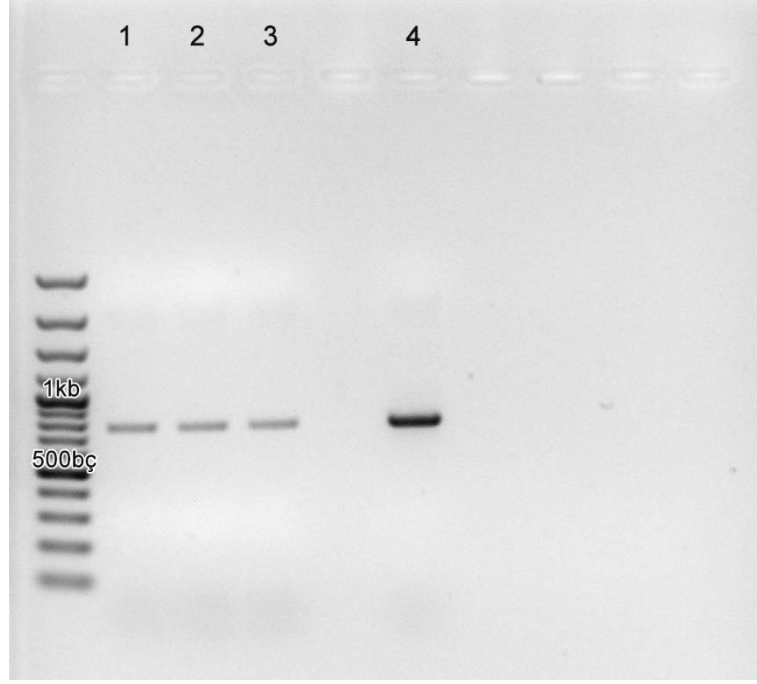
Şekil 4.4. nrITS bölgesine ait üçüncü PZR ürün grubunun agaroz jel elektroforez görüntüsü
Kuyucuklar: 1) *N. tridentata* (Učka-HR), 2) *N. tridentata* (Mt.Gargano-IT), 3) *N. tridentata* (Toscana-IT). DNA Ladder: 100 bç



Şekil 4.5. nrITS bölgesine ait dördüncü PZR ürün grubunun agaroz jel elektroforez görüntüsü
 Kuyucuklar: 1) *N. tridentata* (Tekirdağ-TR), 2) *N. tridentata* (Edirne-TR), 3) *N. tridentata* (Kastamonu-TR), 4) *N. tridentata* (Adana-TR), 5) *N. tridentata* (Hatay-TR), 6) *N. tridentata* (Trabzon-TR). DNA Ladder: 100 bç

Çizelge 4.3. Şekil 4.5'te bulunan agaroz jel elektroforezi görüntüsündeki PZR ürün miktarlarının Qubit 2.0 cihazı ile ölçüm sonuçları

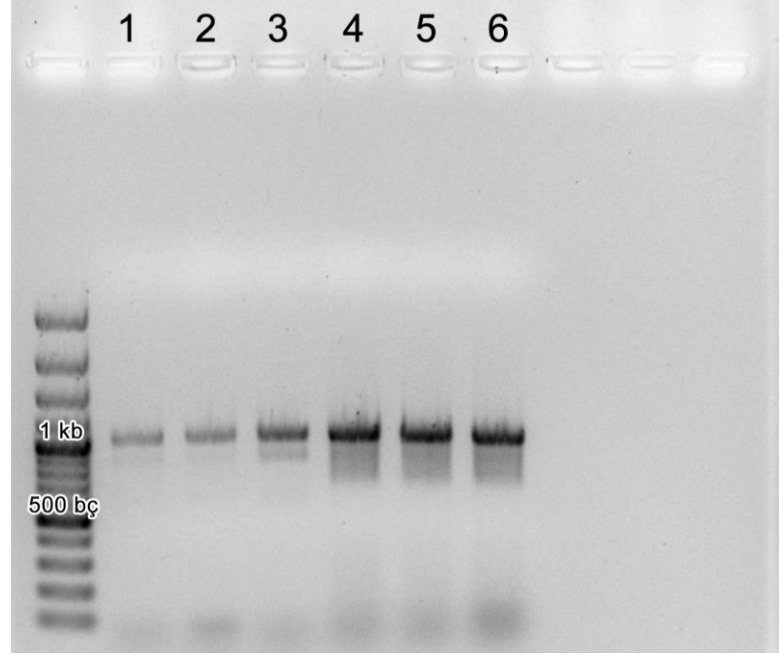
Örnek	PZR Ürün Miktarı (ng/µl)
<i>N. tridentata</i> (Tekirdağ-TR)	43,73
<i>N. tridentata</i> (Edirne-TR)	37,16
<i>N. tridentata</i> (Kastamonu-TR)	38,11
<i>N. tridentata</i> (Adana-TR)	88,20
<i>N. tridentata</i> (Hatay-TR)	89,14
<i>N. tridentata</i> (Trabzon-TR)	87,05



Şekil 4.6. nrITS bölgesine ait beşinci PZR ürün grubunun agaroz jel elektroforez görüntüsü 1) *N. tridentata* (Kahramanmaraş-TR), 2) *N. tridentata* (Osmaniye-TR), 3) *N. tridentata* (Balıkesir-TR), 4) *N. tridentata* (Antalya-TR) örneğine ait ITS ürünü bulunmaktadır. DNA Ladder: 100 bç

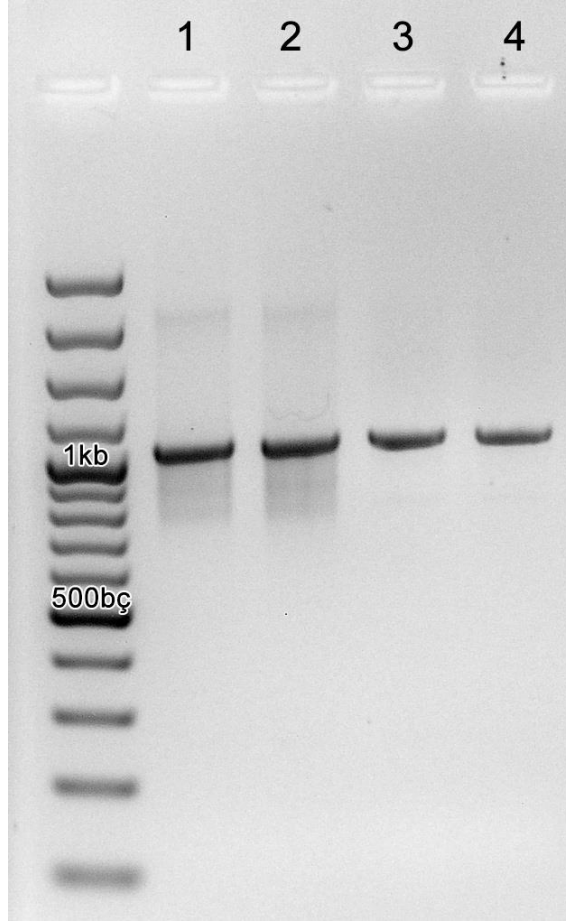
4.2.2. *accD-psaI* bölgesine ait PZR bulguları

accD-psaI bölgesinin PZR ile çoğaltımı optimizasyon sürecinden sonra sorunsuz gerçekleşmiştir. Bölgenin çoğaltılması için literatürde GC içeriği %38 olan güncel olarak kullanılan primerler seçilmiştir (Dong ve ark., 2012). Bölgenin nrITS bölgesine göre daha uzun olması (yaklaşık 940 bç) ve kloroplast genomunda tek kopyaya sahip olması nedeniyle nrITS PZR profiline göre farklı bir PZR profili uygulanmıştır (Çizelge 3.7). Yapılan ilk PZR denemelerinde primer bağlanma sıcaklığı 58° C olarak ayarlanmıştır ve ürünlerin jel görüntülerinde spesifik olmayan primer bağlanmaları tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Daha sonra PZR profilinde bağlanma sıcaklığı 55° C ve 60° C aralığında gradient PZR denenmiştir ve 55° C ile 56.2° C'de primerlerin spesifik olarak bağlandığı görülmüştür (Şekil 4.8). Bu sonuca göre bu bölgenin çoğaltılması için geliştirilen PZR profilinde bağlanma sıcaklığı 55° C olarak belirlenmiştir.

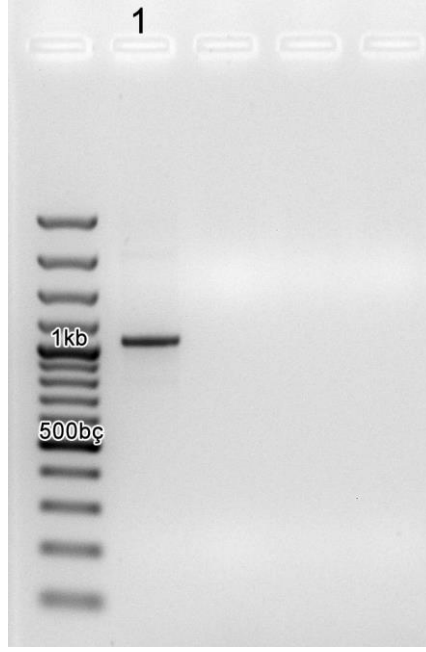


Şekil 4.7. *N. tridentata* (Adana-TR, kuyucuklar 1,2 ve 3) ve *N. tridentata* (Hatay-TR, kuyucuklar 4,5 ve 6) örnekleri için 3'er tekrarlı PZR sonucu. DNA Ladder: 100 bç. 58° C'deki primer bağlanma sıcaklığında oluşan spesifik olmayan bağlanma ve ürün oluşumları

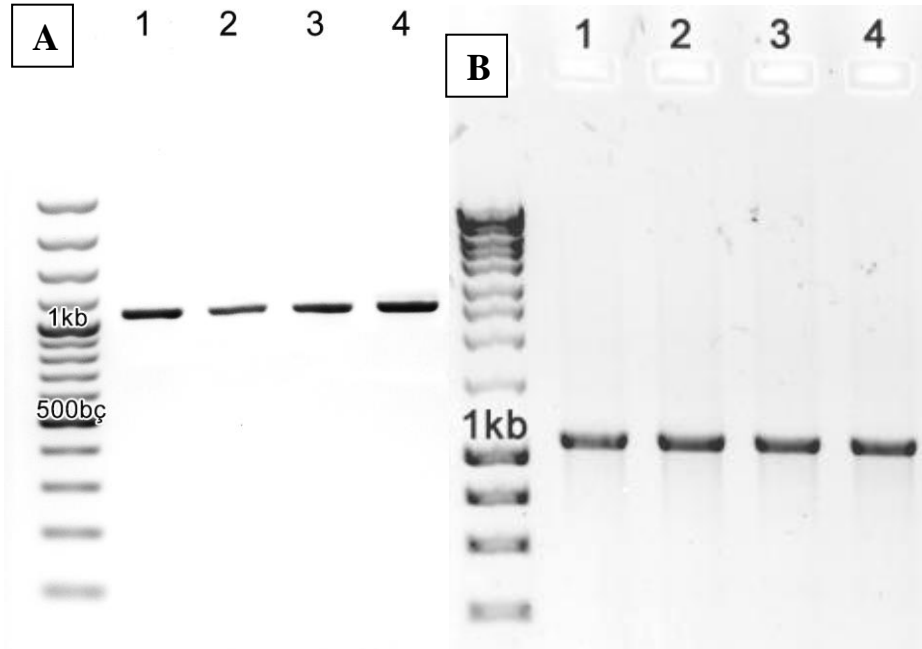
N. tridentata Antalya örneğinde de *accD-psaI* başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır (Şekil 4.9). Diğer PZR sonuçlarına ait Agaroz Jel Elektrofrezisi görüntüleri Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.



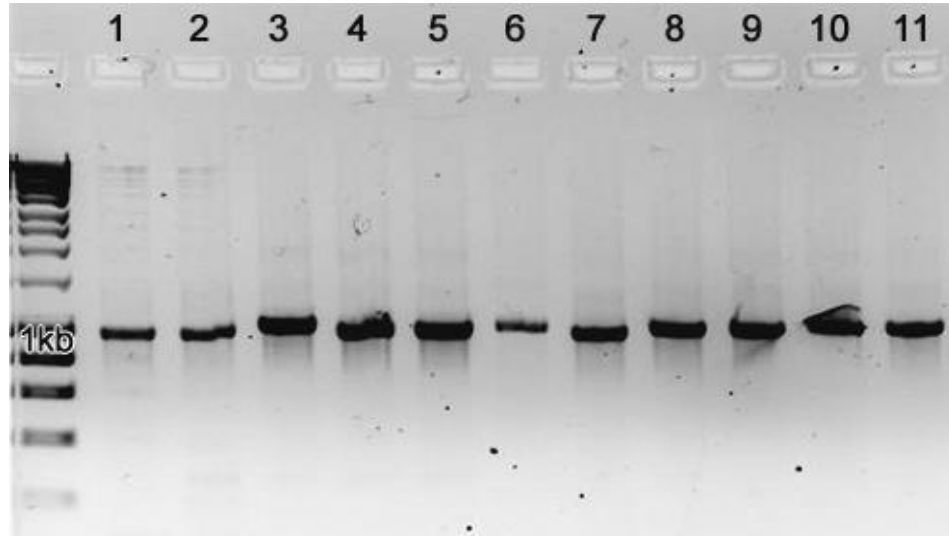
Şekil 4.8. *N. tridentata* (Adana-TR, kuyucuk 3, 28,77 ng/ μ l) ve *N. tridentata* (Hatay-TR, kuyucuk 4, 26,98 ng/ μ l) örneklerine ait *accD-psaI* PZR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi görüntüleri. DNA Ladder: 100 bç. 1. kuyucuk 60° C, 2. kuyucuk 58.2° C, 3. kuyucuk 56.2° C ve 4. kuyucuk 55.0° C



Şekil 4.9. *N. tridentata* (Antalya-TR) örneğine ait *accD-psaI* PZR ürününün (31,08 ng/μl) Agaroz Jel Elektroforezi görüntüsü. DNA Ladder: 100 bç



Şekil 4.10. *accD-psaI* bölgesine ait PZR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez görüntüsü. Kuyucuklar A: 1) *N. tridentata* (Çanakkale-TR), 2) *N. tridentata* (Gelibolu-TR), 3) *N. tridentata* (Tekirdağ-TR), 4) *N. tridentata* (Edirne-TR). DNA Ladder: 100 bç. B: 1) *N. tridentata* (Kahramanmaraş-TR), 2) *N. tridentata* (Trabzon-TR), 3) *N. tridentata* (Lyalintsi-BG), 4) *N. tridentata* (Litochoro-GR). DNA Ladder: 100 bç



Şekil 4.11. *accD-psaI* bölgesine ait PZR ürünlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü
Kuyucuklar: 1) *N. tridentata* (Siklos-HU), 2) *N. tridentata* (Tokaj-HU), 3) *N. tridentata* (Ucka-HR), 4) *N. tridentata* (Balıkesir-TR), 5) *N. tridentata* (Mt. Gargano-IT), 6) *N. tridentata* (Toskana-IT), 7) *N. ustulata* (Varpalota-HU), 8) *N. ustulata* subsp. *aestivalis* (Kiralyko-RO), 9) *N. ustulata* (Velka nad Velickou-CZ), 10) *N. maculata* (Likouria-GR), 11) *N. tridentata* (Kastamonu-TR).
DNA Ladder: 1 kb

4.3. DNA Dizileme Bulguları

Çalışmada başarılı bir şekilde elde edilen PZR ürünleri öncelikle PCR Purification Kit (Thermo Scientific-K0701) kullanılarak temizlenmiş ve dizi analizleri yapılmak üzere Macrogen Inc. (Hollanda) firmasına gönderilmiştir (Çizelge 4.6). DNA dizi analiz sonuçları adı geçen firma tarafından bilgisayar ortamında ab1 formatında telsim edilmiştir. Çalışmada ilk olarak bu okumaların kaliteleri Geneious R8 yazılım ortamında ile araştırılmıştır. Quality Value değerleri 20 olan örnekler için, dizi okuma doğruluğu %99.0 anlamına gelmektedir. Bu analizler sonrasında İtalya'dan toplanan iki örneğin hem nrITS hem de *accD-psaI* okuma kalitelerinin kabul edilemez olduğu anlaşılmıştır (Çizelge 4.6). Okuma kalitesi yetersiz bir başka reaksiyon ise *N. tridentata* (Tokaj-HU) örneği olmuştur. Bu örneklerin PZR ve okumaları tekrarlanmış olmasına rağmen bu durumun devam ettiği görülmüştür. Örneklerin araziden toplanması veya saklanması ya da Macrogen firmasında analizler sırasında gerçekleşen bir kontaminasyon ihtimalinin bu durumu yarattığını düşünmekteyiz. Bu örnekler dışında genel anlamda dizileme sonuçları oldukça kaliteli ve sinyaller oldukça temiz bulunmuştur (Çizelge 4.6).

nrITS bölgesi için dizileme işlemi ITS1A primeri kullanılarak tek yönlü yapılmıştır.

Buna karşın, *accD-psaI* bölgesi ise iki primer ile çift yönlü olarak okutulmuştur. Her iki yön okumaları Geneious R8 yazılımı sayesinde üst üste bindirilerek karar dizisi oluşturulmuştur.

4.4. Biyoenformatik Bulgular

nrITS DNA dizileme kalitesinin oldukça düşük olduğu ve kararsız birçok sinyali içeren ve analiz güvenilirliğini azaltan iki İtalyan ve bir Macaristan *N. tridentata* (Tokaj-HU) örneği (toplam 3 örnek) bu aşamadan sonraki nrITS analizlerinden çıkartılmıştır (bu örnekler Çizelge 4.5'te "*" ile işaretlenmiştir).

nrITS bölgesi; ITS1, 5.8S ve ITS2 bölgelerinden oluşmaktadır (Álvarez ve Wendel, 2003). Çalışmada tüm örneklemeler için nrITS bölgeleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.4). nrITS bölgesinin toplam uzunluğu, çalıştığımız örnekler arasında 609-623 bp arasında farklılık göstermektedir. Etiketleme işlemi sonrasında çalıştığımız orkide örneklerinde intron bölgelerinden ITS1 bölgesinin 234–244 bp uzunluk aralığında olduğu, ITS2 bölgesinin ise 217–225 bp uzunluk aralığında olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4). Tüm nrITS bölgesi için grup içinde nükleotid farklılığı sayısı 44 (%7) iken, grup dışı – grup içi arasında ise 111'dir (%17.56) (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.12). Çalıştığımız örneklerde grup içindeki nükleotid farklılığı oranının ITS1 bölgesi için %3.3 (8 nükleotid farklılığı), ITS2 bölgesi için ise %0.90 (3 nükleotid farklılığı) olduğu görüşmüştür. Gen kodlayan 5.8S bölgesi ise tüm örneklerde 153 bp uzunluğundadır ve nükleotid farklılığı içermemektedir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. nrITS bölgesinde bulunan ITS1, 5.8S ve ITS2 parça uzunlukları (birim: bç)

Örnek	ITS1	5.8S	ITS2
<i>N. conica</i> (Caceres-SP)	243	153	217
<i>N. maculata</i> (Kythera-GR)	234	153	222
<i>N. maculata</i> (Likouria-GR)	234	153	222
<i>N. maculata</i> (Tras os Montes-PT)	234	153	222
<i>N. tridentata</i> (Adana-TR)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Antalya-TR)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Balıkesir-TR)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Çanakkale-TR)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Edirne-TR)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Gelibolu-TR)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Hatay-TR)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Kahramanmaraş-TR)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Kastamonu-TR)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Litochoro-GR)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Lyalintsi-BG)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Mt. Gargano-IT)	222	153	221
<i>N. tridentata</i> (Osmaniye-TR)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Pelion-GR)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Siklos-HU)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Tekirdağ-TR)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Tokaj-HU)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Toskana-IT)	222	153	221
<i>N. tridentata</i> (Trabzon-TR)	242	153	221
<i>N. tridentata</i> (Uçka-HR)	242	153	221
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>ustulata</i> (Budapeşte-HU)	242	153	221
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>ustulata</i> (Leon-SP)	242	153	221
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>ustulata</i> (Salamaca-SP)	242	153	221
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>ustulata</i> (Valais-CH)	242	153	221
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>ustulata</i> (Varpalota-HU)	242	153	221
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>ustulata</i> (Velka nad Velickou-CZ)	242	153	221
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>aestivalis</i> (Kiralyko-RO)	242	153	221
<i>O. phrygia</i>	234	153	225

Tüm *N. tridentata* ve *N. ustulata* örnekleri arasında ise ITS1 bölgesinde herhangi bir uzunluk farklılığı bulunmamakta ve bu bölge 242 bç uzunluğundadır (Çizelge 4.4). En uzun ITS1 bölgesinin *N. conica* örneğinde (243 bç), en kısının ise *N. maculata* ve *O. phrygia* türlerinde olduğu görülmüştür (234 bç). Aceto ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmada kendi topladıkları *N. tridentata* örneğinde bu bölgenin uzunluğunun 248 bç, *N. ustulata* örneğinde ise 247 bç uzunluğunda olduğu belirtilmiştir. Araştırmacıların sonuçlarına göre ITS2 bölgesi ise kendi örneklerinde 229-230 bç uzunluğundadır. Araştırmacılar örneklerin İtalya'dan toplandığını ve daha sonra Napoli Botanik Bahçesi'nde (İtalya) kültüre alındıkları belirtmişlerdir. Çalışma materyalimiz arasında İtalya'dan toplanan *N. tridentata* (Mt. Gargano-IT) ve *N. tridentata* (Toskana-IT) örneklerinde ITS1 bölgesi 222 bç ve ITS2 bölgesi ise 221 bç uzunluğunda bulunmuştur. Fakat bu iki örneğimize ait okuma kaliteleri oldukça düşüktür. Bu nedenle bu iki örnek için elde ettiğimiz sonuçlar güvenli değildir. Bu iki İtalya örneği haricinde diğer örneklerimize ait dizileme sonuçlarının yüksek kalitede güvenilir düzeydedir (Çizelge 4.5). Örnek setimizdeki coğrafi alanlarda yayılış gösteren *N. tridentata* ve *N. ustulata* örneklerinin ITS1 ve ITS2 dizi uzunluklarının, Aceto ve ark. (1999)'nın çalışmalarında İtalya'dan toplanan *N. tridentata* ve *N. ustulata* örneklerinden farklı olduğu görülmüştür. Buna göre ITS1 ve ITS2 dizi uzunluklarının İtalyan Yarımadası'nda varyasyon göstermektedir.

Gen kodlayan 5.8S bölgesi çalışmada kullanılan tüm örneklerinde 153 bç uzunluğundadır ve herhangi bir nükleotid farklılığı içermemektedir. Bu sonuç 5.8S kodlayan bölgesinin oldukça korunmuş olduğunu belirten çalışmalar (Hershkovitz ve Lewis, 1996; Stanford ve ark., 2000; Pridgeon ve ark., 2001; Soliva, 2001; Álvarez ve Wendel, 2003; Cozzolino ve Widmer, 2005; Gillespie ve ark., 2006; Nieto-Feliner ve ark., 2007) ile paralellik göstermiştir. Bu bölgenin kodlayan bölge olması dolayısı ile varyasyon oranının asgari sayıda olması beklenen bir durumdur. Bu durum, direkt olarak çoğaltılan ITS ürünlerinin doğru kopyalarının çoğaltıldığından emin olmak için kontrol edilmesi gereken bir noktadır. 5.8S bölgesindeki fazla sayıda farklılık, PZR sırasında fonksiyonel olmayan ITS kopyalarının ve pseudogen yapılarının çoğaldığı anlamına gelmekte olup filogenetik çalışmaların sonucunu radikal bir şekilde etkileyebilmektedir. Tez çalışmasındaki örneklerde 5.8S kodlayan bölgenin hem iç grupta hem de dış grupta bulunan örneklerde farklılık göstermemiş olması, çalışmada ITS kopyalarının pseudogen olmadığını göstermektedir (Nieto-Feliner ve ark., 2007; Bateman ve ark., 2008).

Literatürde 5.8S bölgesinin *N. tridentata* ve *N. ustulata* grubundaki uzunluğuna ait bir bilgiye ulaşılamamış olup, ilk defa tarafımızdan belirlenmiştir. ITS2 bölgesi ise, tüm *N. tridentata* ve *N. ustulata* örneklerinde eşit uzunlukta olup 221 bç uzunluğundadır. Yine Aceto ve ark. (1999)'nın çalışmasında bu bölge *N. tridentata* için 230 bç, *N. ustulata* için ise 229 bç uzunluğunda belirtilmiştir. İtalyan Yarımadası'ndaki örneklere ait uzunluk varyasyonu bu bölgede de görülmektedir.

Çizelge 4.5. DNA dizileme sonuç raporu (QV \geq 20: kalite değeri 20'nin üzerinde olan nükleotid sayısı, Okuma: dizileme uzunluğu)

Örnek	ITS1A		accD-f		psaI-r	
	Okuma	QV \geq 20	Okuma	QV \geq 20	Okuma	QV \geq 20
<i>N. tridentata</i> (Gelibolu-TR)	739	719	988	901	1044	974
<i>N. tridentata</i> (Çanakkale-TR)	737	722	983	912	1046	958
<i>N. tridentata</i> (Tekirdağ-TR)	739	724	987	908	1044	965
<i>N. tridentata</i> (Edirne-TR)	737	725	988	903	1045	948
<i>N. tridentata</i> (Kastamonu-TR)	736	725	989	927	1040	946
<i>N. tridentata</i> (Kahramanmaraş-TR)	737	723	988	933	1044	921
<i>N. tridentata</i> (Adana-TR)	719	587	984	915	1041	902
<i>N. tridentata</i> (Hatay-TR)	722	698	988	914	1039	900
<i>N. tridentata</i> (Trabzon-TR)	733	658	986	941	1038	904
<i>N. tridentata</i> (Lyalintsi-BG)	735	625	977	925	1022	911
<i>N. tridentata</i> (Litochoro-GR)	735	665	984	910	1018	848
<i>N. tridentata</i> (Siklos-HU)	736	678	989	911	1021	824
* <i>N. tridentata</i> (Tokaj-HU)	738	311	988	878	1038	905
<i>N. tridentata</i> (Uçka-HR)	725	635	979	889	1030	832
<i>N. tridentata</i> (Antalya-TR)	737	633	988	901	1045	841
<i>N. tridentata</i> (Balıkesir-TR)	734	639	988	911	1044	808
* <i>N. tridentata</i> (Mt. Gargano-IT)	712	225	977	302	1012	389
* <i>N. tridentata</i> (Toskana-IT)	713	401	977	404	1012	358
<i>N. ustulata</i> (Varpalota-HU)	721	598	987	877	1008	784
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>aestivalis</i> (Kiralyko-RO)	721	601	976	904	1010	714
<i>N. ustulata</i> (Velka nad Velickou-CZ)	723	612	975	895	1005	755
<i>N. maculata</i> (Likouria-GR)	714	639	982	862	1024	771

accD-psaI bölgesi genler arası bir intron bölgesidir (Dong ve ark., 2012) ve ayrıca diğer plastid bölgeleri ile karşılaştırıldığında (*atpF-atpH*, *rps16*, *trnH-psbA*, *trnL-rpl32-ndhF* ve *ycf1*) orkidelerde daha yüksek nükleotid farklılığı oranına sahiptir (Sramko ve ark., 2014). Çalışmada kullandığımız primerler intron bölgesinin tamamı çoğaltmıştır. Çalışmamızda *accD-psaI* bölgesinin, çalışılan örnekler arasında uzunluk analizi yapılmış, ayrıca grup içinde (3 nükleotid farklılığı, %0.32) ve grup dışında nükleotid farklılık sayıları hesaplanmış (8 nükleotid farklılığı, %0.86) ve yüzde oranları çıkarılmıştır (Çizelge 4.8). Ayrıca bu oranlar grafik üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.12). *accD-psaI* bölgesi, çalıştığımız örnekler arasında grup içerisinde uzunluk farklılığı göstermemiştir ve 923 bç uzunluğundadır. Dış grup olarak seçtiğimiz *P. dilatata* türünde ise bu uzunluk 933 bç'dir. Hizalama işleminden sonra oluşan boşluklar (gap) ile toplam hizalama uzunluğu 933 bç olmuştur. KJ566307, KJ524104 ve KJ566307 erişim numaralarına sahip orkide kloroplast genomları ile etiketleme işlemi %50 benzerlik düzeyine kadar düşürülerek denenmiş ve hiçbir gen bölgesinin etiketlenmediği görülmüş, böylece kullandığımız primer çifti ile öngördüğümüz sadece intron bölgesinin çoğaldığından emin olunmuştur. Sramko ve ark., (2014) çalışmalarında *Himantoglossum sensu lato* türleri için aynı bölgeyi çoğaltmışlar, bu cins için *accD-psaI* bölgesinin 938-941 bç aralığında olduğunu, *Himantoglossum* grubu içerisinde varyasyon oranının %0.32, grup dışı – grup içinde ise %1.47 olduğunu bulmuşlardır. Kloroplast kökenli bu bölgenin, hem tarafımızdan çalışılan *Neotinea* cinsi içerisinde, hem de araştırmacılar tarafından çalışılan *Himantoglossum* cinsi içerisinde düşük varyasyona sahip oldukları görülmüştür.

Grup içi parsimoni bilgi verici alan sayısında nrITS bölgesi, *accD-psaI* bölgesine göre yaklaşık 12 kat daha fazla üstünlük göstermiştir. Bu sonuç, farklı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarla paralellik göstermektedir (Soliva ve ark., 2001; Inda ve ark., 2012; Sharma ve ark., 2012; Sramko ve ark., 2014 v.b.).

Çekirdek kökenli nrITS bölgesinin, kloroplast kökenli *accD-psaI* bölgesine göre grup içinde ve grup dışı – grup içi arasında yaklaşık 14 kat daha fazla nükleotid değişikliği içerdiği görülmüştür (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.12). Çekirdek genomunda bulunan nrITS bölgesinin, plastid genomunun aksine (genellikle açık tohumlularda plastid genomu maternal kalıtım göstermektedir) hem anne hem de babadan gelen DNA dizilerini içermesi yani biparental kalıtıma sahip olması ve çekirdek genomunun plastid genomuna göre daha değişken yapıda olması (poliploidi, genetik varyasyonlar ve mutasyonlar), bu bulguyu desteklemektedir (Soliva ve ark., 2001).

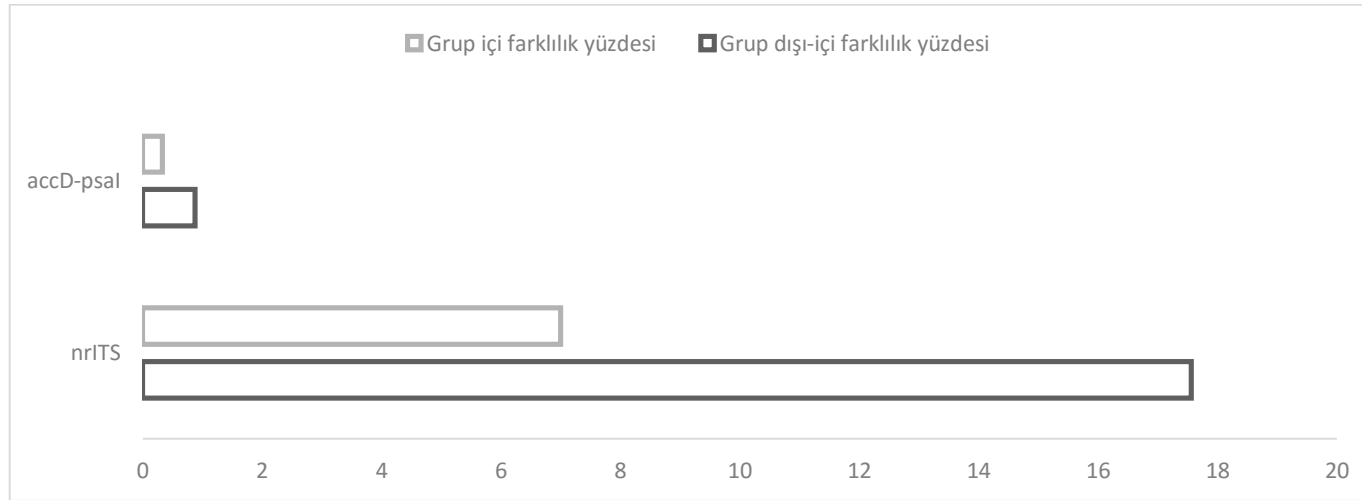
DNA dizi kromatogramlarında, birbiri üzerine binmiş sinyaller Ek Polimorfizm Alanları'nı (EPA veya Additional Polymorphic Sites – APS) oluşturmaktadır (Sramko ve ark., 2014). Bu alanların görülme nedenleri, çekirdek genomunda bulunan farklı ITS kopyalarının DNA dizi kromatogramlarında gölge sinyaller oluşturmalarıdır. Çalıştığımız *N. tridentata* türünün Balıkesir, Çanakkale, Adana, Trabzon ve Antalya örneklerinde ve ayrıca *N. ustulata* subsp. *aestivalis* (Kiralyko-RO) ile *N. ustulata* (Velka nad Velickou-CZ) örneklerinde EPA tespit edilmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.13). Bu alanların IUPAC sistemine göre kodlanması tavsiye edilmektedir (Sramko ve ark., 2014) bu nedenle çalışmamızda bu alanlar kodlanmıştır. EPA sadece intron bölgelerinde görülmüştür.

Çizelge 4.6. nrITS dizilerinde karşılaşılan Ek Polimorfizm Alanları (EPA) tablosu

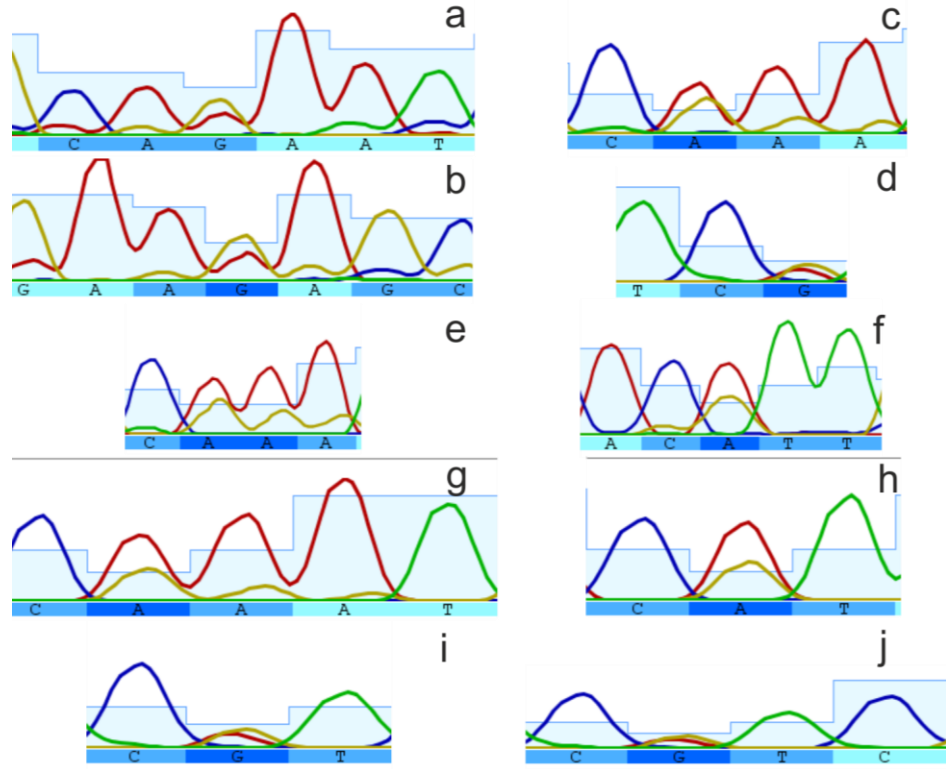
Örnek	EPA Sayısı	Baz Bölgesi	Bazlar
<i>N. tridentata</i> (Balıkesir-TR)	1	432	G veya A (R)
<i>N. tridentata</i> (Çanakkale-TR)	1	513	G veya A (R)
<i>N. ustulata</i> subsp. <i>aestivalis</i> (Kiralyko-RO)	2	513, 606	G veya A (R)
<i>N. ustulata</i> (Velka nad Velickou-CZ)	3	513, 514, 606	G veya A (R)
<i>N. tridentata</i> (Adana-TR)	1	555	G veya A (R)
<i>N. tridentata</i> (Trabzon-TR)	1	555	G veya A (R)
<i>N. tridentata</i> (Antalya-TR)	1	555	G veya A (R)

Çizelge 4.7. Çalışmada kullanılan DNA bölgelerinin detaylı karşılaştırma tablosu

DNA Bölgesi	Kökeni	Uzunluk Aralığı	nrITS Parçalarında Nükleotid Farklılık Sayıları (Grup İçi)			Parsimoni Alan Sayısı	Hizalanan Uzunluk	Nükleotid Farklılığı			
			ITS1	5.8S rRNA	ITS2			Farklılık Sayısı		Farklılık Yüzdesi	
								Grup Dışı-İçi	Grup İçi	Grup Dışı-İçi	Grup İçi
nrITS	Çekirdek	609–623	8 (%3.3)	0 (%0)	3 (%0.9)	37	632	111	44	% 17.56	% 7.0
<i>accD-psaI</i>	Kloroplast	923	-	-	-	3	933	8	3	% 0.86	% 0.32



Şekil 4.12. DNA bölgelerinin varyasyon yüzdelerinin karşılaştırıldığı grafik (dikey eksen: DNA bölgeleri, yatay eksen: yüzde değerleri)



Şekil 4.13. Ek Polimorfizm Alanları'nın DNA dizi kromatogramları üzerinde görünümü. a) *N. tridentata* (Balıkesir-TR, 432. baz), b) *N. tridentata* (Çanakkale-TR, 513. baz), c) *N. tridentata* (Balıkesir-TR, 314. baz), d) *N. tridentata* (Trabzon-TR, 555. baz), e) *N. ustulata* (Velka nad Velickou-CZ, 513 ve 514. baz), f) *N. ustulata* (Velka nad Velickou-CZ, 606. baz), g) *N. ustulata* subsp. *aestivalis* (Kiralyko-RO, 513. baz), h) *N. ustulata* subsp. *aestivalis* (Kiralyko-RO, 606. baz), i) *N. tridentata* (Adana-TR, 555. baz), j) *N. tridentata* (Antalya-TR, 513. baz)

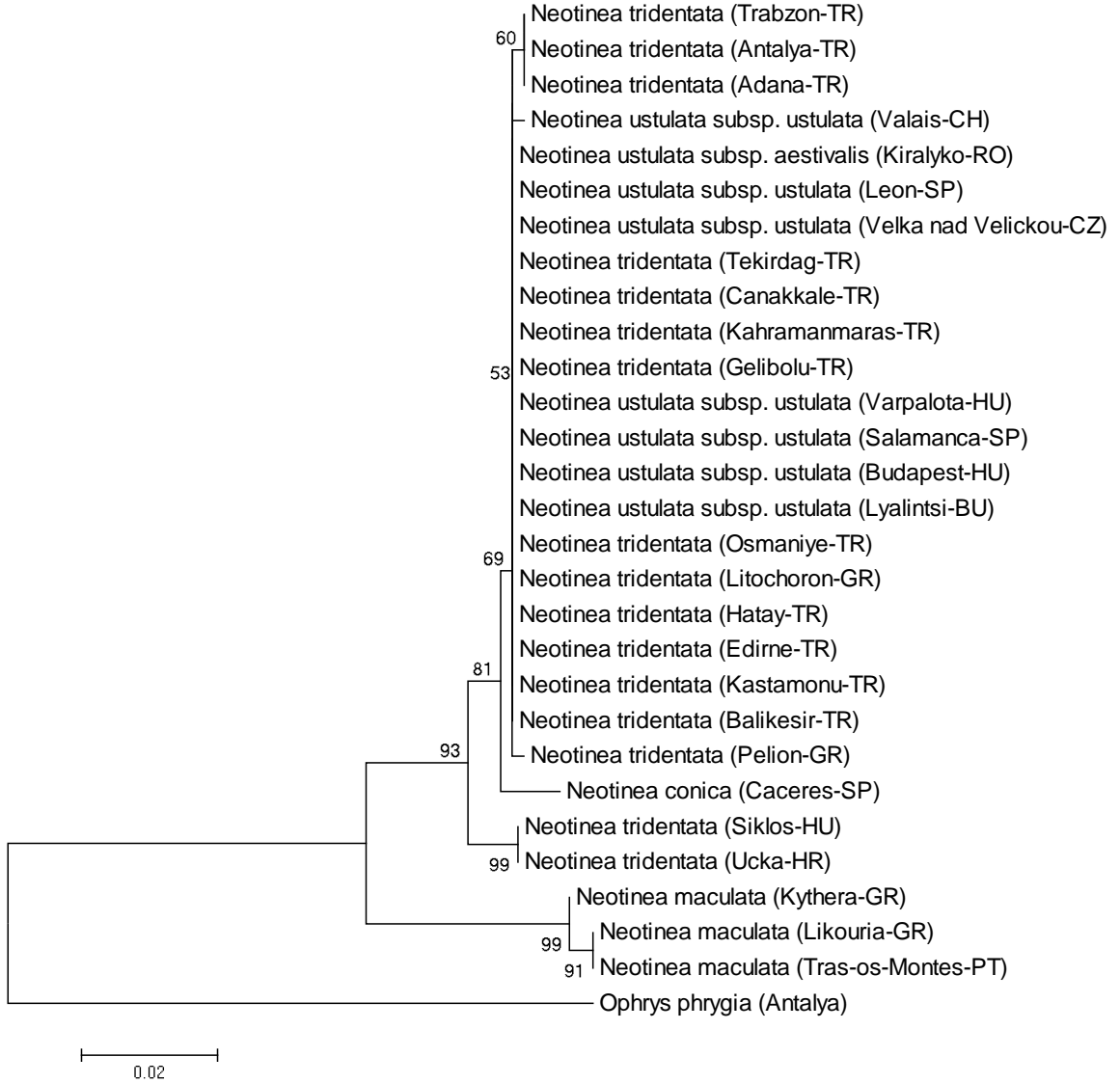
4.5. Filogenetik Bulgular

ClustalW ile hizalanan ve göz ile kontrol edilen DNA dizi verileri, üç farklı algoritma (Maximum-Likelihood, Maximum Parsimony ve Bayesian Posterior Probability) kullanılarak bireyler arasındaki atasal ve evrimsel ilişkiyi gösteren ağaçlar çizilmiştir. nrITS ağaçları için *O. phrygia* dış grup olarak seçilmiştir. *accD-psaI* ağacı için ise *P. dilatata* dış grup olarak seçilmiştir.

4.5.1. nrITS bulguları

nrITS DNA dizilerine göre PAUP v4.0b10 yazılımı kullanılarak Maximum Likelihood (ML) algoritması ile çizilen ağaç incelendiğinde, dallanmaların Bootstrap destek değerlerinin %53-99 aralığında değiştiğini ve ana dalların Bootstrap değerlerinin yüksek ve desteklenir olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.14). nrITS ağaçları için *O. phrygia* dış grup olarak seçilmiştir. Anadolu *N. tridentata* örnekleri olan Balıkesir, Kastamonu, Edirne,

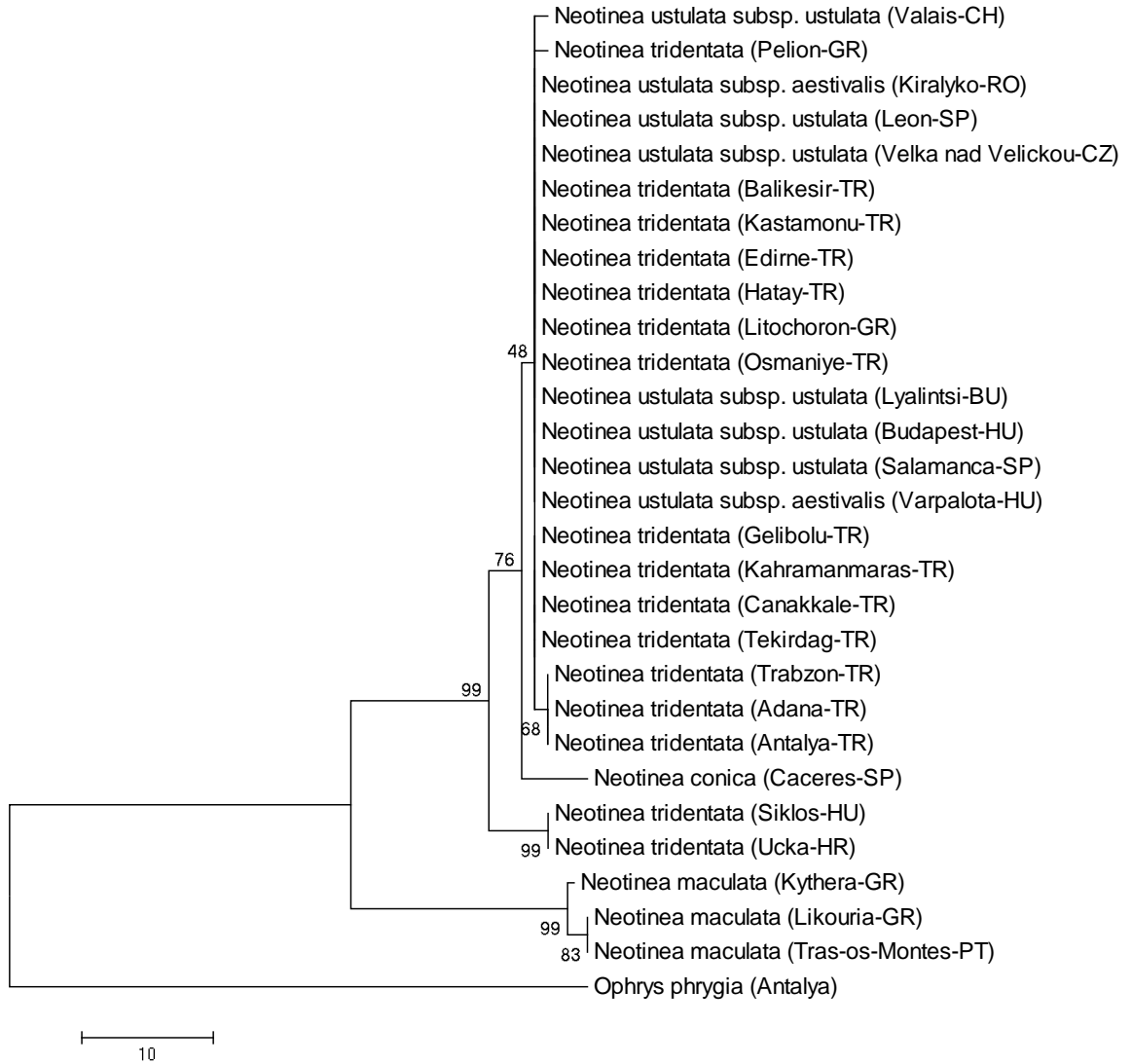
Hatay, Osmaniye, Gelibolu, Kahramanmaraş, Çanakkale, Tekirdağ Adana, Trabzon ve Antalya ile Avrupa *N. ustulata* ssp. örnekleri olan Lyalintsi-BU, Salamanca-SP, Budapest-HU, Velka nad Velickou-CZ, Varpalota-HU, Leon-SP ve Kiralyko-RO örnekleri arasında nükleotid değişim sayılarında bir fark bulunmadığı görüşmüştür. Bu örneklerle ait nrITS dizileri de tamamen aynıdır. *N. tridentata* bireylerinin ağaçtaki dağılımları incelendiğinde, örneklerin birbirlerinden coğrafik konumlarına göre ayrıldıkları anlaşılmıştır (Anadolu'dan toplanan örnekler ve Orta Avrupa'dan toplanan örnekler farklı dallar üzerindedirler). Bununla birlikte, Adana, Trabzon ve Antalya *N. tridentata* örneklerinin diğer Anadolu örneklerinden farklı bir dal üzerinde olduğu görülmüştür. Yunanistan Litochoron'dan toplanan *N. tridentata* örneği Anadolu'daki *N. tridentata* örnekleri ile aynı dal üzerine yer almıştır. Yunanistan Pelion'dan toplanan diğer *N. tridentata* örneği ise hem Anadolu örneklerinden, hem de Avrupa *N. tridentata* örneklerinden ayrı ve tüm Anadolu *N. tridentata* örnekleri ile tüm *N. ustulata* örneklerine kardeş grup olarak yerleşmiştir. Bu ağaç üzerinde ayrıca üç örnekten oluşan *N. maculata* grubu diğer türlerden net bir şekilde ayrılmıştır. *N. maculata* örneklerinin, *N. tridentata* (Siklos-HU) ve *N. tridentata* (Ucka-HR) ile kardeş grup olarak düzenlendiği görülmüştür. nrITS verileri ile oluşturulan bu ML ağacında dikkat çeken en önemli bulgular; i) Anadolu *N. tridentata* örnekleri (Balıkesir, Kastamonu, Edirne, Hatay, Osmaniye, Gelibolu, Kahramanmaraş, Çanakkale ve Tekirdağ) ile Avrupa *N. ustulata* ssp. örneklerinin (Kiralyko-RO, Leon-SP, Varpalota-HU, Velka nad Velickou-CZ, Budapest-HU, Salamanca-SP ve Lyalintsi-BU) aynı dallanma üzerine dağılımları, ii) aynı tür olmasına rağmen Anadolu *N. tridentata* örnekleri (Balıkesir, Kastamonu, Edirne, Hatay, Osmaniye, Gelibolu, Kahramanmaraş, Çanakkale ve Tekirdağ) ile orta Avrupa *N. tridentata* (Siklos-HU, Ucka-HR ve Pelion-GR) örneklerinin birbirlerinden ayrılmış olmasıdır. Bu bulgular Anadolu ve Avrupa *N. tridentata* bireylerinin farklı ribotiplere sahip olduğu hipotezimizi desteklemektedir.



Şekil 4.14. nrITS verileri ile çizilmiş Maximum-Likelihood filogramı

Maximum Parsimony (MP) algoritması ile çizilen Kladogram ağacı iki klada ayrılmış ve bazı farklar haricinde ML ağacı ile benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır (Şekil 4.15). MP ağacında da Anadolu kökenli *N. tridentata* örnekleri ile Orta Avrupa kökenli *N. tridentata* örnekleri birbirlerinden ayrılarak farklı dallar üzerinde yer almıştır. Buna karşın, Anadolu *N. tridentata* örnekleri ile *N. ustulata* ssp. örnekleri tıpkı ML ağacında olduğu gibi iç içe geçmiştir. Ağacın Bootstrap destek değerleri ise %48-100 arasında değişmiştir. MP ağacında Adana, Trabzon ve Antalya'dan toplanan *N. tridentata* örneklerinin diğer tüm Anadolu kökenli *N. tridentata* örneklerinden farklı dalda olduğu görülmüştür. Bu örnekler aynı zamanda Avrupa kökenli *N. ustulata* ssp. örneklerinden de farklı bir dal üzerinde yer almış ve kardeş grup olarak temsil edilmiştir. Macaristan (Siklos) ve

Hırvatistan (Ucka) *N. tridentata* örnekleri ise diğer *N. tridentata* örneklerinden farklı grup içine yerleşmiştir.



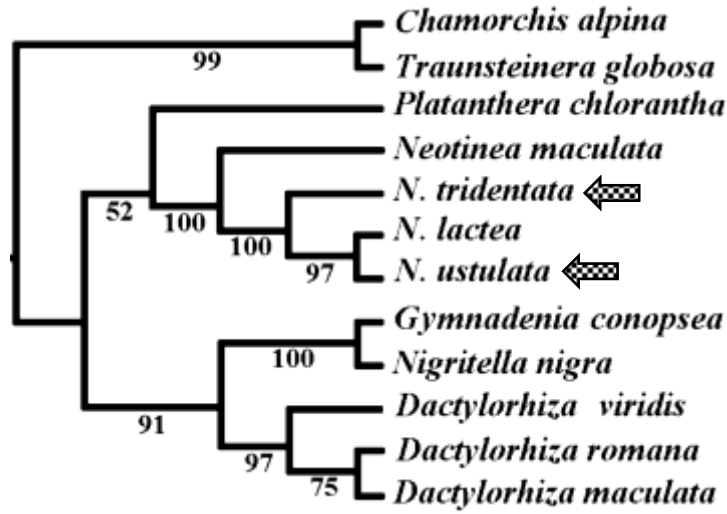
Şekil 4.15. nrITS verileri ile çizilmiş Maximum Parsimony filogramı

N. tridentata (Pelion-GR) örneği ise Anadolu kökenli *N. tridentata* türleri ile iç içe yerleşmiştir ve diğer Avrupa örneklerinden ayrılmıştır.

Cozzolino ve ark. (2001) Doğu Akdeniz *Orchis* üyelerinin türleşmeleri ile ilgili çalışmalarında ITS1 ve ITS2 verileri ile MP ağacı oluşturmuşlardır (Şekil 4.16). Araştırmacılar Güney İtalya'dan toplanan *N. tridentata* ve *N. ustulata* örneklerinin birbirlerinden %100'lük bir Bootstrap desteği ile ayrıldığını ve *N. lactea* ve *N. ustulata* türlerinin *N. tridentata* türünden evrimleştiğini bildirmişlerdir. Buna karşın, bu çalışmada bitki örnekleri tek lokasyondan toplanmış (Güney İtalya) olmasından dolayı *Neotinea*

cinsine ait filogeniyi temsil edememektedir. Bu nedenle çalışmamızda daha detaylı ve doğru sonuçlar için *N. tridentata* örneklememizi mümkün olduğu kadar farklı coğrafik bölgelerden yapmayı uygun gördük. Bateman (2009), nrITS verilerini kullanarak gerçekleştirdiği orkide filogenisi çalışmasında *N. ustulata* ve *N. ustulata* subsp. *aestivalis* bireylerinin birbirlerinden ayrılmadığı sonucuna varmıştır. Bu sonuç, bizim de elde ettiğimiz verilerle paralellik göstermektedir.

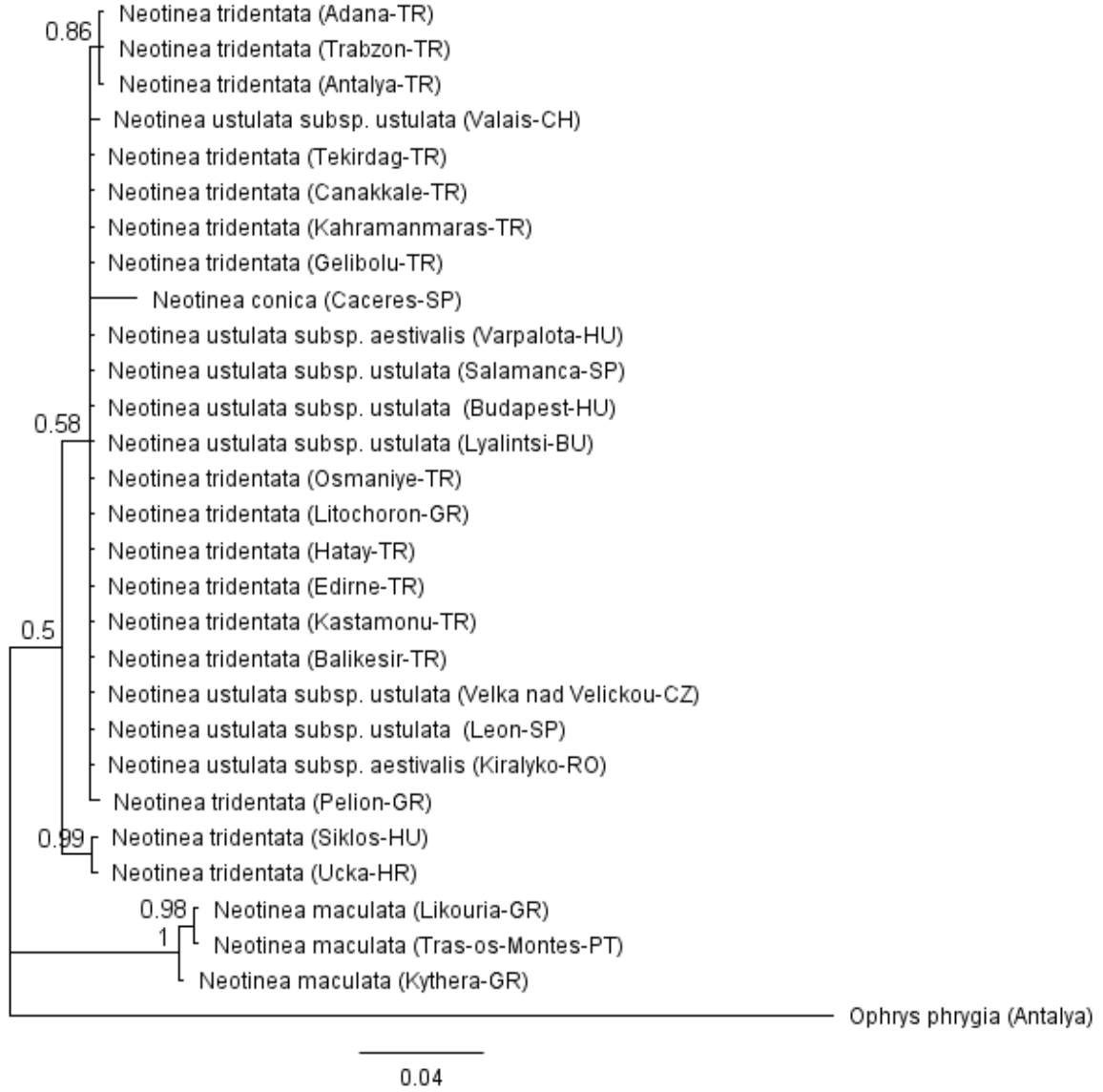
Çalışmada kullandığımız iki ana tür olan *N. tridentata* ve *N. ustulata* türlerinin kendi aralarında doğal melezleşebilen ve fertil bireyler meydana getirebilen türler olduğu Cozzolino ve ark. (1998) tarafından belirtilmiştir. İlk defa Sırbistan’da bulunan *Orchis* × *dietrichiana* (*N. tridentata* × *N. ustulata*) melez türünün karakterizasyonu Cozzolino ve ark., (1998) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, *N. tridentata* ve *N. ustulata* türlerinin genetik olarak birbirlerine oldukça yakın olduğunu göstermektedir ve çalışmamızdaki *N. tridentata*–*N. ustulata* ribotip eşitliğini destekler niteliktedir.



Şekil 4.16. *Neotinea* ve yakın akrabalarının MP kladogramı (Cozzolino ve ark., 2001)

Çalışmada ayrıca MrBayes v3.2.1 (Ronquist ve ark., 2012) yazılımı ile Posterior Output ağacı çizilmiştir (Şekil 4.17). Bu ağaç üç ana daldan oluşmaktadır; dış grup *O. phrygia* türüne ait dal, *N. tridentata*, *N. ustulata* subsp. *ustulata*, *N. ustulata* subsp. *aestivalis* türlerine ait dal ve *N. maculata* grubunu içeren dal. Ağacın dalları posterior probability destek değerleri %50-100 arasında değişmiştir. Diğer iki ML ve MP ağaçlarında olduğu gibi, Bayesian Posterior Output ağacında da tüm Anadolu kökenli *N. tridentata* örnekleri, Avrupa kökenli *N. ustulata* ssp. örnekleri ile aynı dallanma üzerine

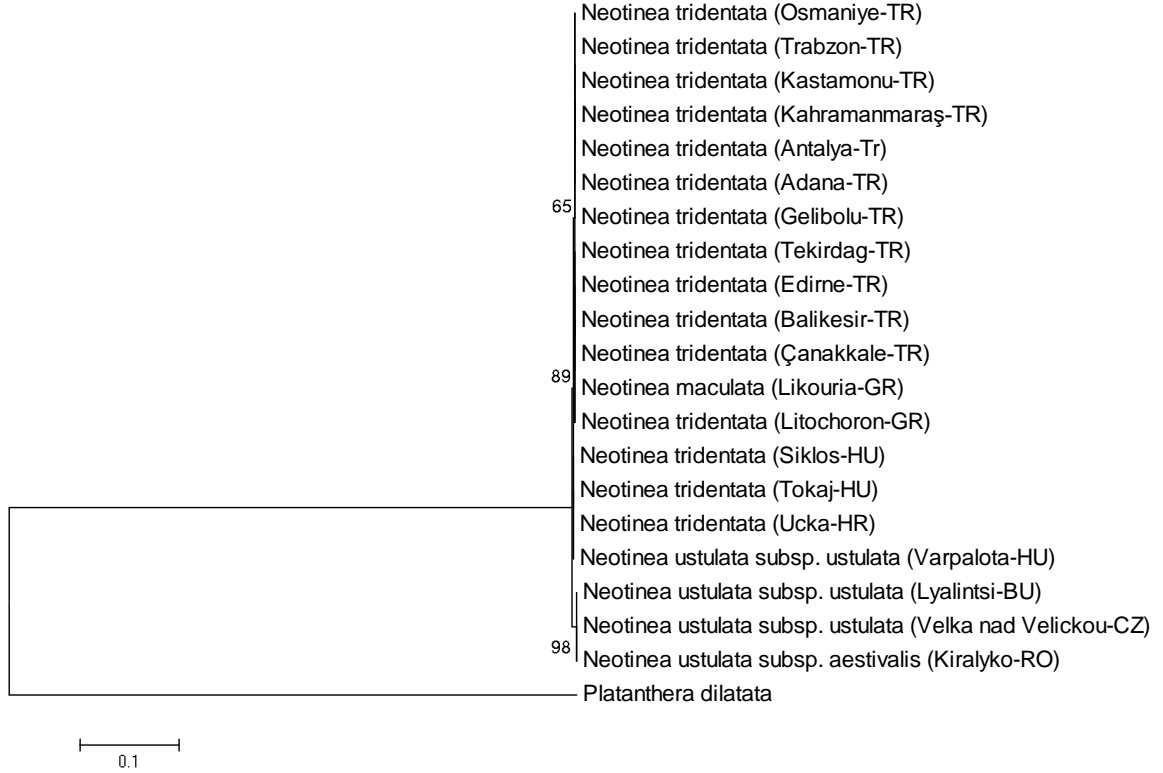
yerleşmişlerdir. Adana, Trabzon ve Antalya *N. tridentata* örnekleri yine aynı dal üzerinde fakat ayrı bir grup olarak yerleşmişlerdir. Macaristan Siklos ve Hırvatistan Ucka *N. tridentata* örnekleri diğer *N. tridentata* örneklerinden ayrı bir kardeş grup olarak yerleşmiş, aynı zamanda *N. maculata* grubu ile de kardeş grup olarak görülmüştür.



Şekil 4.17. nrITS verileri ile çizilmiş Bayesian Posterior Output filogramı

4.5.2. *accD-psaI* bulguları

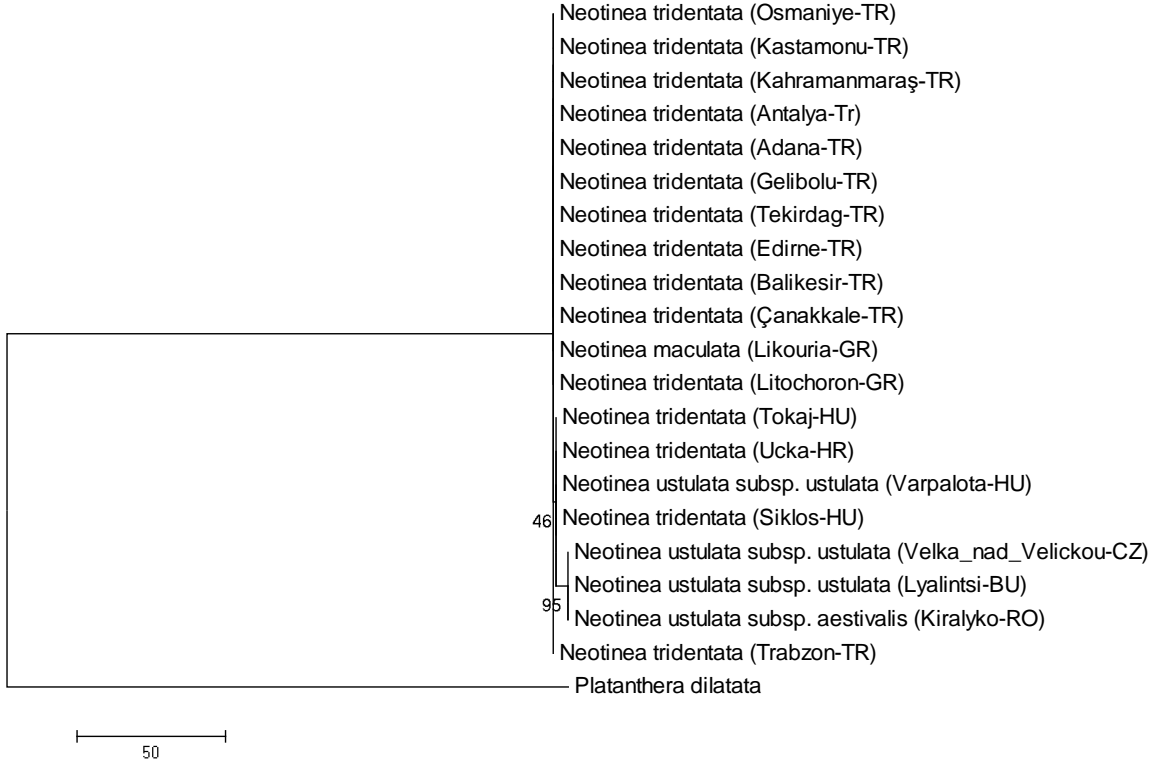
Çalışmada *accD-psaI* ağaçlarında dış grup olarak *Platanthera dilatata* seçilmiştir.



Şekil 4.18. *accD-psaI* verileri ile çizilmiş Maximum-Likelihood filogramı

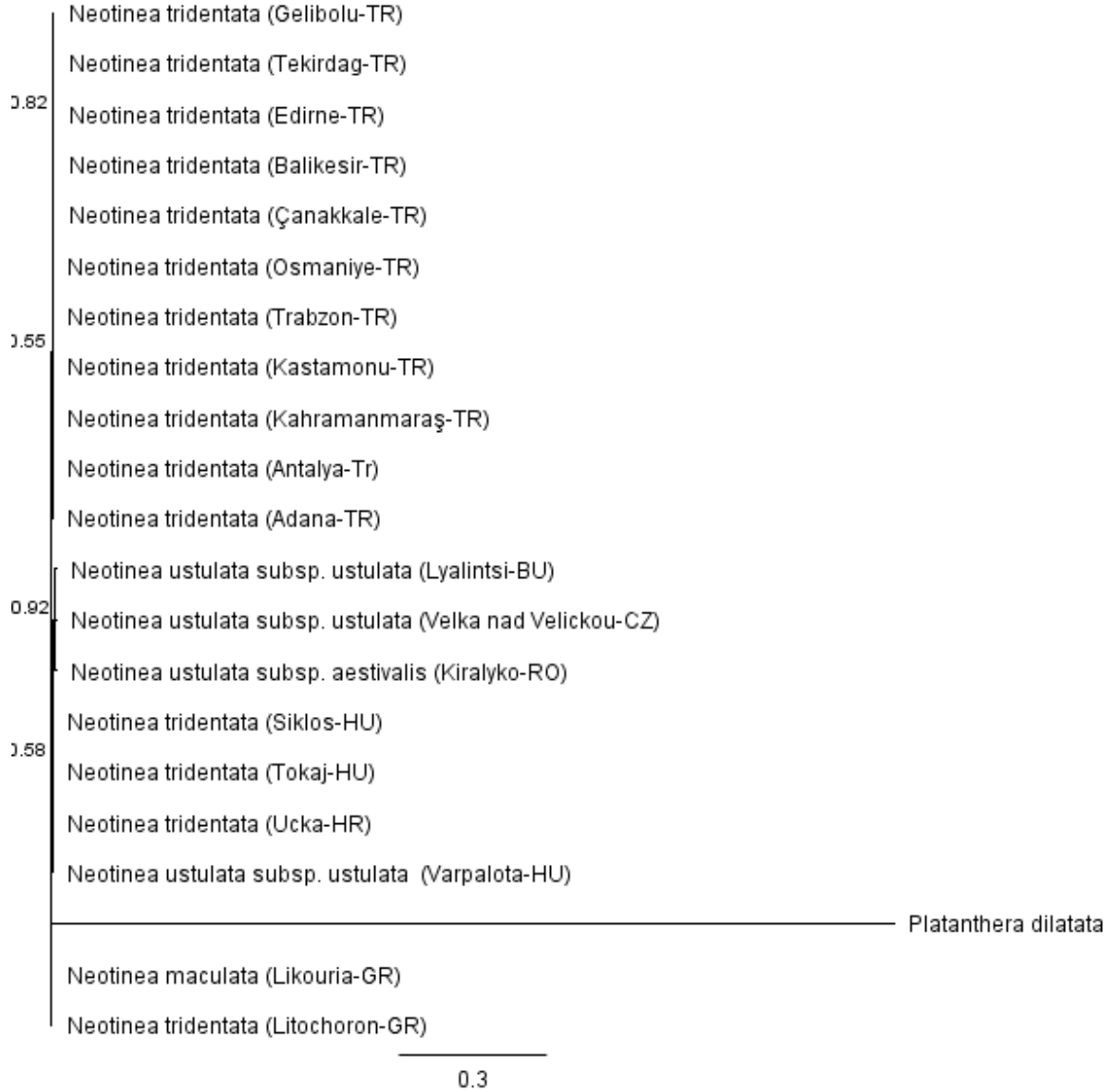
accD-psaI verileri kullanılarak ML ağacı çizilmiştir (Şekil 4.18). Bu ağaç dış grup hariç tek kladdan oluşturmuştur ve %89 Bootstrap değeri ile desteklenmiştir. Çalışmada Anadolu *N. tridentata* örnekleri ile Avrupa *N. tridentata* örnekleri aynı ana dal üzerinde yer almıştır. Bu ağaç Anadolu *N. tridentata* ve Avrupa *N. ustulata* ssp. Örneklerini birbirinden net bir şekilde ayırmıştır (Varpalota-HU örneği hariç). Ağaç üzerinde *N. maculata* (Likouria-GR) örneğinin, *N. tridentata* örneklerinden ayrılamadığı görülmüştür.

accD-psaI verileri kullanılarak MP ağacı tek kladdan oluşmuştur ve tüm dallanmalar bu kladdın içerisinde gerçekleşmiştir (Şekil 4.19). *N. ustulata* ssp. örneklerinin diğer tüm örneklerden %95'lik Bootstrap destek değeri ile ayrıldığı görülmektedir. Lyalintsi, Velka nad Velickou ve Kiralyko bölgelerinden toplanan *N. ustulata* ssp. örnekleri de diğer *N. tridentata* örneklerinden farklı gruplanmıştır. *N. ustulata* subsp. *ustulata* (Varpalota-HU) örneği ise *N. tridentata* örneklerinin içerisine karışmıştır. *accD-psaI* MP ağacında nrITS ağaçlarının aksine coğrafi açıdan bir fark oluşmamıştır.



Şekil 4.19. *accD-psaI* verileri ile çizilmiş Maximum Parsimony filogramı

Çalışmada ayrıca *accD-psaI* verileri kullanılarak Bayesian Posterior Probability ağacı oluşturulmuştur (Şekil 4.20). Ağaç dış grup haricinde tek kladdan oluşmaktadır. Ağaçta *N. ustulata* ssp. örnekleri, 0.92 posterior probability değeri ile diğer örneklerden ayrılmıştır. MP ağacındaki gibi *N. maculata* türünün diğer türlerden ayırt edilemediği görülmüştür.



Şekil 4.20. *accD-psaI* verileri ile çizilmiş Bayesian Posterior Probability filogramı

Genel anlamda kloroplast kökenli *accD-psaI* ağaçları, çekirdek kökenli nrITS ağaçları ile karşılaştırıldığında yüksek çözünürlük sağlamasa da nrITS ağaçlarının aksine *N. tridentata* – *N. ustulata* ssp. ayrımını sağlayabilmiştir. nrITS ağaçlarının bu ayrımı yapamamasının nedeni bu bölge kullanılarak analiz edilen türler arasında geçmişte yaşanmış bir melezlenme olayından kaynaklanan genetik birleşmenin ITS1 ve ITS2 intron bölgelerinde tam olarak homojenize olamaması ve ebeveyn gen dizilerinin hala bu bölgelerde görünmesidir (Gernandt ve Liston, 1999; Bailey ve ark., 2003; Lahaye ve ark., 2008). Bu nedenle aralarında melezlenme yaşanmış bireylerde maternal kalıtım gösteren plastid ve biparental kalıtım gösteren çekirdek DNA verileri ile elde edilen ağaçlarda uyumsuzluk olduğu açıkça görülmektedir ve bu karşılaştırmalı yöntem yaygın olarak

kullanılmaktadır (Sramko ve ark., 2014).

DNA dizileri ile oluşturulan nükleotid farklılığı analizinde *accD-psaI* kloroplast bölgesinin grup içi – grup dışında varyasyon sayılarının, çekirdek nrITS bölgesine göre yaklaşık 14 kat daha az olduğu ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.8). Bu durumun sebebi kloroplast genomunun daha fazla korunmuş olması, sadece maternal olarak kalıtım göstermesi olmaktadır. Çekirdek DNA verileri (nrITS) ile elde ettiğimiz ve kloroplast DNA verileri (*accD-psaI*) ile elde ettiğimiz ağaçlardaki uyumsuzluk ve nrITS ağacında *N. tridentata* – *N. ustulata* ayrımının olmaması bu iki tür arasında kesin olarak melezlenme olayının yaşandığını göstermektedir. Ina ve ark., (2012) çalışmalarında Bayesian analizi ile moleküler tarihlendirme çalışması yaparak *N. tridentata* – *N. ustulata* ayrımının Pleistosen döneminde (1,18 myö ile 0,01 myö arası Buzul Çağı) gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Bu melezlenme olayının ne zaman yaşandığını tahmin edebilmek için, fosil kayıtlarının kullanıldığı benzer bir Moleküler Tarihlendirme çalışmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu doktora tez çalışmasında Akdeniz, Batı–Alt Akdeniz, Orta–Alt Akdeniz, Balkan–Alt Akdeniz ve Doğu–Alt Akdeniz olmak üzere büyüklüğü yaklaşık 3 milyon km² olan bir bölgeyi kapsayan, Türkiye, Bulgaristan, Yunanistan, Romanya, Macaristan, Çek Cumhuriyet, İtalya ve Hırvatistan ülkelerinden *N. tridentata*, *N. ustulata* subsp. *ustulata*, *N. ustulata* subsp. *aestivalis*, *N. maculata* ve *O. phrygia* türlerine ait taze yaprak örnekleri toplanmıştır. Ayrıca Trakya Üniversitesi Herbaryumu’ndan (EDTU) 3 adet *N. tridentata*, Royal Botany Garden Edinburgh (RBGE)’dan 2 adet *N. tridentata* ve National Center for Biotechnology Information (NCBI) veritabanından 10 adet örnek alınarak coğrafi kapsam genişletilmiştir. Çalışmada toplamda 33 adet orkide örneği kullanılmıştır. Taze olarak toplanan ve herbaryumlardan elde edilen örneklerden total DNA izole edilmiş, nrITS ve *accD-psaI* bölgeleri PZR tekniği ile çoğaltılmıştır. DNA dizileri hizmet alımı yolu ile belirlenmiştir. Tez çalışmasının amaçlarından biri ribotip farklılıklarının tespit edilmesidir. Türlerle ait gen bölgeleri biyoenformatik olarak incelenmiş ve Anadolu kökenli *N. tridentata* örneklerinin, Avrupa kökenli *N. tridentata* örneklerinden farklı ribotiplere sahip olduğu ve ayrıca Anadolu kökenli *N. tridentata* örneklerinin, Avrupa kökenli *N. ustulata* örnekleri ile tamamen aynı ribotiplere sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca nrITS bölgesinin, *accD-psaI* bölgesine göre 14 kat daha yüksek varyasyona sahip olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra, Balıkesir, Çanakkale, Adana, Trabzon, Antalya, Kiralyko-RO ve Velka nad Velickou-CZ örneklerinde Ek Polimorfizm Alanları tespit edilmiştir.

Daha sonra diziler ClustalW uygulaması ile hizalanmışlardır ve Geneious R8 yazılım ortamında göz ile optimize edilmiştir. Tez çalışmasının diğer amacı *N. tridentata* ve *N. ustulata* ssp. örneklerinin filogenetik yapılarının incelenmesidir. Bu amaçla, Maximum Likelihood, Maximum Parsimony ve Bayesian Posterior Probability yöntemleri ile her iki gen bölgesi için de filogenetik ağaçlar çizilmiştir. nrITS dizileri kullanarak çizilen ağaçlarda Anadolu kökenli *N. tridentata* örneklerinin ve Avrupa kökenli *N. tridentata* örneklerinin farklı dallara ayrıldığı ve ayrıca Anadolu kökenli *N. tridentata* örneklerinin, Avrupa kökenli *N. ustulata* ssp. örnekleri ile aynı dallar üzerine yerleştiği görülmüştür. Buna karşın, *accD-psaI* dizileri kullanılarak çizilen ağaçlarda ise *N. tridentata* ve *N. ustulata* ssp. örneklerinin ağaçlarda birbirlerinden ayırt edilebilir şekilde yerleştiği görülmüştür.

Çift ebeveynli ve tek ebeveynli kalıtım gösteren genom bölgelerine ait DNA dizilerinin aynı anda kullanıldığı ve karşılaştırıldığı moleküler filogenetik ve melez belirleme çalışmalarının doğruluğu, kullanılan genom bölgelerinin özellikleri iyi bilindiğinde oldukça yüksek olmaktadır. Tez çalışmasının diğer bir amacını iki tür arasında geçmişte yaşanmış bir melezlenmenin incelenmesidir. Tez çalışmasında kullanılan nrITS bölgesi hem anneden hem babadan gelen genetik verileri içermektedir ve biparental kalıtım göstermektedir. nrITS bölgesinden elde edilen sonuçlara göre, *N. tridentata* türünde farklı coğrafik bölgelerden toplanan popülasyonların farklı DNA dizilerine sahip olduğu, bu DNA dizileri ile elde edilen ağaçlarda aynı türe ait bireylerin birbirlerinden coğrafik olarak ayrıldığı anlaşılmıştır. *N. tridentata* türü, bu çalışmanın sonucuna göre Filo-coğrafik bakımdan Anadolu kökenli ve Avrupa kökenli bireyler olarak iki gruba ayrılmaktadır. Öte yandan *accD-psaI* verileri ile çizilmiş filogenetik ağaçlarda bu duruma rastlanmamıştır. nrITS ve *accD-psaI* filogenetik ağaçları arasındaki uyumsuzluk, geçmişte *N. tridentata* ve *N. ustulata* türlerinin melezlenmiş olduğunu bilgisini vermektedir. nrITS dizisi sonuçlarına göre Avrupa ve Anadolu *N. tridentata* bireylerinin birbirlerinden ayrılması, Anadolu *N. tridentata* bireylerinin Avrupa'dakilerle farklı ribotiplere sahip olması ise, geçmişte melezleşen bireylerin, Anadolu'da izole olması ve Avrupa'daki *N. tridentata* bireyleri ile gen alışverişlerinin kesildiği anlamına gelmektedir.

Daha önceden *N. tridentata* türünde, nrITS kullanılarak gerçekleştirilmiş filogeni çalışmaları için “örneklerin toplandığı lokasyonların, çalışmanın sonucunu radikal olarak etkileyebileceği” anlaşılmıştır. Bu nedenle tek bir lokasyondan toplanmış *N. tridentata* ile gerçekleştirilmiş nrITS çalışmaları evrensel boyut kazanamamakta, yerel sonuçlar vermektedir.

Öte yandan anneden kalıtılan kloroplast kökenli *accD-psaI* bölgesinin, kloroplast içerisinde en çok varyasyona sahip bölgelerden biri olmasına rağmen *N. tridentata* türü için nrITS bölgesi kadar varyasyona sahip olmadığı sonucuna varılmıştır.

Inda ve ark., (2012) çalışmalarında *N. ustulata* ve *N. lactea* türlerinin Pleistosen döneminde (1,81 myö ile 0,01 myö arası) *N. tridentata* türünden ayrıldığını belirtmişlerdir. Bu dönemden günümüze kadar olan süreçle gerçekleşen gen akışı, melezlenmeler ve ayrıca birlikte evrimleşme etkisi, yakın ilişkili olan *Neotinea* cinsi içerisinde kendini açıkça göstermektedir.

Anadolu’da yayılış gösteren *N. tridentata* ile Avrupa’da yayılış gösteren *N. ustulata* ssp. örnekleri arasında geçişte bir melezlenme olayının yaşandığı hem filogenetik bulgular, hem de biyoformatik bulguları ile desteklenmektedir. Dolayısı ile nrITS ve *accD-psaI* bölgelerinin karşılıklı kullanımı ile geçmişe yönelik melezlenme tespitlerinin yapılabileceği ortaya çıkarılmıştır. Yakın zamanda gerçekleşmeyen ve / veya geri melezlenen bireylerde, melez özellikler kendini morfolojide belli edemezken, bu bilgiler çekirdek DNA’sında gizli kalmaktadır (Pavarese ve ark. 2013). Literatürde Anadolu veya Türkiye *N. tridentata* örnekleri ile Avrupa *N. tridentata* örneklerinin birbirlerinden morfolojik olarak ayrıldığını veya benzediğini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Böyle bir çalışmanın gerçekleştirilmesi, moleküler filogeni çalışmaları ile birleştirilerek türlerin detaylı soy çalışmaları gerçekleştirilebilir.

Coğrafi yayılış alanı neredeyse tüm Avrupa, Akdeniz ve Ortadoğu’yu kapsayan *N. tridentata* ile ilgili yapılacak moleküler filogeni çalışmalarında, mümkün olduğu kadar fazla alandan örnekleme yapılmalıdır. nrITS bölgesinin doğası gereği farklı kopyaları çekirdek genomunda bulundurması nedeni ile sadece çalıştığımız türde değil, tüm orkidelerde bu duruma dikkat edilerek örnekleme yapılması gerekmektedir.

Moleküler biyoloji tekniklerinin, bitki filogenisi ve sistematigi teknik ve ihtiyaçlarının sürekli bir kademe ileri giderek evrimleşmesi, daha yeni ihtiyaçları ortaya çıkarmaktadır. Günümüz teknolojilerine uygun en iyi yöntemlerden biri olan Yeni Nesil Dizileme alt yapısını kullanan Dizileme İle Genotipleme “Genotyping by Sequencing” ile bitki sistematigi ve filogenisi çalışmaları yapılmaktadır. Fakat yöntemin yurt dışından hizmet alımı ile satın alınabilir olması ve ayrıca popülasyon çalışmalarında mümkün olduğunca fazla örnekle çalışılması gerekliliği bu yöntemin oldukça pahalı olmasına neden olmaktadır.

Tez çalışması sonrasında *N. tridentata* türünde tüm kloroplast genomunu dizileyerek bu türün evrimsel geçmişini bir adım daha ilerletmeyi amaçlamaktayız. Sistematik açıdan karmaşık ve filogenetik açıdan eşsiz olan orkidelerde bu tekniği uygulanması ve sonuçlarının klasik kısa gen bölgeleri dizileme yöntemi ile karşılaştırılması hem geçmiş filogenetik çalışmaların kontrol edilmesini sağlayabilir, hem de orkide filogenisinin anlaşılmasına yeni bir araç olabilir.

KAYNAKLAR

- Aceto S., Caputo P., Cozzolino S., Gaudio L., Moretti A., 1999. Phylogeny and Evolution of Orchis and Allied Genera Based on ITS DNA Variation: Morphological Gaps And Molecular Continuity. *Molec. Phylogen. Evol.*, 13: 67-76.
- Álvarez I., Wendel J.F., 2003. Ribosomal ITS Sequences and Plant Phylogenetic Inference. *Molec. Phylogen. Evol.*, 29: 417-434.
- Arditti J., 1979. *Aspects of the Physiology of Orchids*. Advances in Botanical Research NY, 422-697.
- Bailey C.D., Carr T.G., Harris S.a., Hughes C.E., 2003. Characterization of Angiosperm Nrdna Polymorphism, Paralogy, and Pseudogenes. *Molec. Phylogen. Evol.*, 29: 435-455.
- Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F., Campbell C.S., Donoghue M.J., Porter J.I.M., Wojciechowski F., Campbell S., 1995. The its Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 82: 247-277.
- Barrett C.F., Freudenstein J.V., 2008. Molecular Evolution of *rbcl* in the Mycoheterotrophic Coralroot Orchids (*Corallorhiza gagnebin*, Orchidaceae). *Molec. Phylogen. Evol.*, 47 (2): 665-679.
- Bateman R.M., 2009. Evolutionary Classification of European Orchids: The Crucial Importance of Maximising Explicit Evidence and Minimising Authoritarian Speculation. *J. Eur. Orch.*, 41: 243-318.
- Bateman R.M., Smith R.J., Fay M.F., 2008. Morphometric and Population Genetic Analyses Elucidate the Origin, Evolutionary Significance and Conservation Implications of *Orchis xangusticruris* (*O. purpurea* x *O. simia*), a Hybrid Orchid New to Britain. *Bot. J. Linn. Soc.*, 157: 687-711.
- Besnard G., Rubio de Casas R., Vargas P., 2007. Plastid and Nuclear DNA Polymorphism Reveals Historical Processes of Isolation and Reticulation in the Olive Tree Complex (*Olea europaea*). *J Biogeogr*, 34 (4): 736-752.
- Buttler K.P., 1996. *Orchideen: Die Wildwachsenden Arten Und Unterarten Europas, Vorderasiens und Nordafrikas*. Mosaik Verlag. München. 287 p.
- Campbell C.S., Wojciechowski M.F., Baldwin B.G., Alice L.A., Donoghue M.J., 1997. Persistent Nuclear Ribosomal DNA Sequence Polymorphism in the *Amelanchier agamic* Complex (Rosaceae). *Molec. Biol. Evol.*, 14 (1): 81-90.

- Chase M.W., Cameron K.M., Freudenstein J.V., Pridgeon A.M., Salazar G., van den Berg C., Schuiteman A., 2015. An Updated Classification of Orchidaceae. *Bot. J. Linn. Soc.*, 177: 151-174.
- Cox A.V., Pridgeon A.M., Albert V.a., Chase M.W., 1997. Phylogenetics of the Slipper Orchids (Cypripedioideae, Orchidaceae): Nuclear rDNA ITS Sequences. *Pl. Syst. Evol.* 208: 197-223.
- Cozzolino S., Aceto S., Caputo P., Menale B., 1998. Characterization of *Orchis* x *dietrichiana* Bogenh., a Natural Orchid Hybrid. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 132: 71-76.
- Cozzolino S., Caputo P., Aceto S., Widmer A., Dafni A., 2001. Speciation Processes in Eastern Mediterranean *Orchis* s.l. species: Molecular Evidence and the Role of Pollination Biology. *Israel J. Pl. Sci.*, 49: 91-103.
- Cozzolino S., Widmer A., 2005. The Evolutionary Basis of Reproductive Isolation in Mediterranean Orchids. *Taxon*, 54: 977-985.
- Dafni a., 1984. Mimicry and Deception in Pollination. *Annual Rev. Ecol. Syst.*, 15: 259-278.
- Dearnaley J., Martos F., Selosse M.-A., 2012. 12 Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. *Fungal Associations*, Springer: 207-230.
- Delforge P., 2006. *Orchids of Europe, North Africa and the Middle East*. A & C Black. London. 640 p.
- Devos N., Raspé O., Oh S.H., Tyteca D., Jacquemart A.L., 2006. The Evolution of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) Allotetraploid Complex: Insights from Nrdna Sequences And cpDNA PCR-RFLP Data. *Molec. Phylogen. Evol.*, 38: 767-778.
- Dong W., Liu J., Yu J., Wang L., Zhou S. (2012). Highly Variable Chloroplast Markers for Evaluating Plant Phylogeny at Low Taxonomic Levels and for DNA Barcoding. *PLoS ONE*. 7: e35071.
- Douzery E.J., Pridgeon A.M., Kores P., Linder H., Kurzweil H., Chase M.W., 1999. Molecular Phylogenetics of Diseae (Orchidaceae): A Contribution from Nuclear Ribosomal ITS Sequences. *Amer. J. Bot.*, 86 (6): 887-899.
- Doyle J.J., 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochem bull.* 19: 11-15.
- Dressler R.L., 1990. *The Orchids. Natural History and Classification*. Harvard University Press. Cambridge. 85 p.

- Galizia C.G., Kunze J., Gumbert A., Borg-Karlson A.-K., Sachse S., Markl C., Menzel R., 2005. Relationship of Visual and Olfactory Signal Parameters in A Food-Deceptive Flower Mimicry System. *Behav. Ecol.*, 16 (1): 159-168.
- Gernandt D., Liston A., 1999. Internal Transcribed Spacer Region Evolution in *Larix* and *Pseudotsuga* (Pinaceae). *Amer. J. Bot.*, 86: 711-723.
- Gillespie J.J., Johnston J.S., Cannone J.J., Gutell R.R., 2006. Characteristics of the Nuclear (18S, 5.8S, 28S and 5S) and Mitochondrial (12S and 16S) rRNA Genes of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera): Structure, Organization, and Retrotransposable Elements. *Insect Molecular Biology*, 15: 657-686.
- Gulyás G., Sramkó G., Molnár V.A., Rudnóy S., Illyés Z., Balázs T., Bratek Z., Molnár V. A., Rudnóy S., Illyés Z., Balázs T., Bratek Z., 2005. Nuclear Ribosomal DNA ITS Paralogs As Evidence of Recent Interspecific Hybridization in the Genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Acta Biol. Cracov., Ser. Bot.*, 47: 61-67.
- HersHKovitz M.a., Lewis L.a., 1996. Deep-Level Diagnostic Value of the Rdna-ITS Region. *Molec. Biol. Evol.*, 13: 1276-1295.
- Inda L.a., Pimentel M., Chase M.W., 2012. Phylogenetics of Tribe Orchideae (Orchidaceae: Orchidoideae) Based on Combined DNA Matrices: Inferences Regarding Timing of Diversification And Evolution of Pollination Syndromes. *Ann. Bot.*, 110: 71-90.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Meintjes P., Drummond A., 2012. Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data. *Bioinformatics*, 28 (12): 1647-1649.
- Kress W.J., Erickson D.L., 2008. DNA Barcodes: Genes, Genomics, and Bioinformatics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105: 2761-2762.
- Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A., Janzen D.H., 2005. Use of DNA Barcodes to Identify Flowering Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 8369-8374.
- Kreutz C.A.J., 2009. *Türkiye Orkideleri*. Rota Yayınları. İstanbul. 1-848.
- Kunze J., Gumbert A., 2001. The Combined Effect of Color and Odor on Flower Choice Behavior of Bumble Bees in Flower Mimicry Systems. *Behav. Ecol.*, 12 (4): 447-456.

- Lahaye R., van der Bank M., Bogarin D., Warner J., Pupulin F., Gigot G., Maurin O., Duthoit S., Barraclough T.G., Savolainen V., 2008. DNA Barcoding the Floras of Biodiversity Hotspots. *PNAS*, 105: 2923-2928.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21): 2947-2948.
- Mayol M., Rosselló J.A., 2001. Why Nuclear Ribosomal DNA Spacers (ITS) Tell Different Stories in *Quercus*. *Molec. Phylogen. Evol.*, 19 (2): 167-176.
- Nieto-Feliner G., Rosselló J.a., Feliner G.N., Rosselló J.a., 2007. Better the Devil You Know? Guidelines for Insightful Utilization of nrDNA ITS in Species-Level Evolutionary Studies in Plants. *Molec. Phylogen. Evol.*, 44: 911-919.
- Pavarese G., Tranchida-Lombardo V., Galesi R., D'Emerico S., Casotti R., Cristaudo A., Cozzolino S., 2013. When Polyploidy and Hybridization Produce A Fuzzy Taxon: The Complex Origin of the Insular Neoendemic *Neotinea commutata* (Orchidaceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 173: 707-720.
- Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P., 2009. Fasttree: Computing Large Minimum Evolution Trees with Profiles Instead of A Distance Matrix. *Molec. Biol. Evol.*, 26: 1641-1650.
- Pridgeon A.M., Bateman R.M., Cox A.V., Hapeman J.R., Chase M.W., 1997. Phylogenetics of Subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) Based on Nuclear ITS Sequences. 1. Intergeneric Relationships and Polyphyly of *Orchis sensu lato*. *Lindleyana*, 12: 89-109.
- Pridgeon A.M., Light M.H.S., 2005. Tribe Neottieae. Pollination. *Genera Orchidacearum*. Volume 4. Epidendroideae (Part One). A. M. Pridgeon, P. J. Cribb, M. W. Chase and F. N. Rasmussen. Oxford, Oxford University Press: 505 p.
- Pridgeon A.M., Solano R., Chase M.W., 2001. Phylogenetic Relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): Combined Evidence from Nuclear and Plastid DNA Sequences. *Amer. J. Bot.*, 88: 2286-2308.
- Rascher A., Hu Z., Viswanathan N., Schirmer A., Reid R., Nierman W.C., Lewis M., Hutchinson C.R., 2003. Cloning And Characterization of A Gene Cluster for Geldanamycin Production in *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3602. *FEMS microbiology letters*, 218 (2): 223-230.

- Renz J., Taubenheim G., 1984. *Orchidaceae. The Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. P. H. Davis. Edinburgh, Edinburgh University Press: 450-552.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P., 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst. Biol.*, 61 (3): 539-542.
- Roy M., Gonneau C., Rocheteau A., Berveiller D., Thomas J.C., Damesin C., Selosse M.A., 2013. Why Do Mixotrophic Plants Stay Green? A Comparison Between Green and Achlorophyllous Orchid Individuals in Situ. *Ecological Monographs*, 83 (1): 95-117.
- Sang T., Crawford D.J., Stuessy T.F., 1997. Chloroplast DNA Phylogeny, Reticulate Evolution, And Biogeography of Paeonia (Paeoniaceae). *Amer. J. Bot.*, 84: 1120-1136.
- Sellosse M.A., 2014. The Latest News From Biological Interactions in Orchids: In Love, Head To Toe. *New Phytol.* 202: 337-340.
- Sezik E., 1984. Orkidelerimiz Türkiye'nin Orkideleri. Sandoz Yayınları. Ankara. 166 s.
- Sezik E., İşler S., Orhan Ç., Deniz İ.G., Güler N., Aybeke M., Üstün O. 2007. Salep ve Orkidelerin Tahribi, TÜBİTAK, Ankara. 56 s.
- Sharma S.K., Dkhar J., Kumaria S., Tandon P., Rao S.R., 2012. Assessment of Phylogenetic Inter-Relationships in the Genus *Cymbidium* (Orchidaceae) Based on Internal Transcribed Spacer Region of rDNA. *Gene*, 495: 10-15.
- Small R.L., Ryburn J.A., Cronn R.C., Seelanan T., Wendel J.F., 1998. The Tortoise and The Hare: Choosing Between Noncoding Plastome and Nuclear ADH Sequences for Phylogeny Reconstruction in A Recently Diverged Plant Group. *Amer. J. Bot.*, 85: 1301-1315.
- Soliva M., 2001. Molecular Phylogenetics of the Sexually Deceptive Orchid Genus *Ophrys* (Orchidaceae) Based on Nuclear and Chloroplast DNA Sequences. *Molec. Phylogen. Evol.*, 20: 78-88.
- Sramko G., Attila M.V., Hawkins J.a., Bateman R.M., 2014. Molecular Phylogeny and Evolutionary History of the Eurasiatic Orchid Genus *Himantoglossum s.l.* (Orchidaceae). *Ann. Bot.*, 114: 1609-1626.
- Stanford A., Harden R., Parks C., 2000. Phylogeny and Biogeography of Juglans (Juglandaceae) Based on matK and ITS Sequences Data. *Amer. J. Bot.*, 87: 872-882.

- Suh Y., Lee J., Lee S., Lee C., Yeau S.H., Lee N.S., 2002. Molecular Evidence for the Taxonomic Identity of Korean Adonis (Ranunculaceae). *J. Pl. Res.*, 115: 217-223.
- Swofford D.L., 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4 b 5.
- Szentesi Á., Weber D.C., Jermy T., 2002. Role of Visual Stimuli in Host and Mate Location of the Colorado Potato Beetle. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 105 (2): 141-152.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S., (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*: 30 2725-2729.
- Tsai C., Peng C., Huang S., Huang P., Chou C., 2004. Determination of The Genetic Relationship of *Dendrobium* Species (Orchidaceae) in Taiwan Based on the Sequence of the Internal Transcribed Spacer of Ribosomal DNA. *Scientia horticulturae*, 101 (3): 315-325.
- Tyteca D., Ceinos M., Gathoye J.L., Brys R., Jacquemyn H., 2012. On The Morphological, Biological and Genetic Heterogeneity of the Genus *Orchis* (Orchidaceae, Orchidinae). *Phytotaxa*, 75: 19-32.
- van den Berg C., Higgins W., Dressler R., Whitten W., Soto-Arenas M., Culham a., Chase M., 2000. A Phylogenetic Analysis of *Laeliinae* (Orchidaceae) Based on Sequence Data from Internal Transcribed Spacers (ITS) of Nuclear Ribosomal DNA. *Lindleyana*, 15: 96-114.
- White T.J., Bruns T.D., Lee S., Taylor J.W., 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. PCR protocols: A guide to methods and applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. San-Diego, Academic Press: 315-322.
- Widmer A., Cozzolino S., Pellegrino G., Soliva M., Dafni A., 2000. Molecular Analysis of Orchid Pollinaria and Pollinaria-Remains Found on Insects. *Molec. Ecol.*, 9: 1911-1914.
- Willis C.G., Baskin C.C., Baskin J.M., Auld J.R., Venable D.L., Cavender-Bares J., Donohue K., Rubio de Casas R., 2014. The Evolution of Seed Dormancy: Environmental Cues, Evolutionary Hubs, and Diversification of the Seed Plants. *New Phytol.*, 203 (1): 300-309.

Yagame T., Orihara T., Selosse M.-A., Yamato M., Iwase K., 2012. Mixotrophy of *Platanthera Minor*, an Orchid Associated with Ectomycorrhiza-Forming Ceratobasidiaceae Fungi. *New Phytol.*, 193 (1): 178-187.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Kaan HÜRKAN

Doğum Yeri: İstanbul

Doğum Tarihi: 24.05.1984

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Biyoloji

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Biyoloji

Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce YDS: 80 (21.04.2015)

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

Güler N., Hürkan K., Gönüz A., Report 48: Orchidaceae: Neotinea maculata (Desf.) Stearn. In Vladimirov, V. & al. (ed.) New floristic records in the Balkans: 9, 2008, Phytologia Balcanica.

b) Bildiriler -Uluslararası –Ulusal

Hürkan, K., Mizsei, E., Molnar, V. A., Gönüz, A., Sramko, G., 2013. Niche Modelling can help to understand parentage of an orchid hybrid. 31st New Phytologist Symposium. Orchid Symbioses: models for evolutionary ecology. 14-16 May 2013, Calabria, Italy. Abstracts Book p 35.

Hürkan, K., Gönüz, A., 2012. Molecular Phylogenetic Affinity of *Orchis anatolica* and *Neotinea tridentata* (Orchidaceae) Taxa Using Dna Sequencing. 15th European Orchid Congress and Show 12-15th of April, Budapest. Abstracts Book.

Acar, O., Görkem, H. N., Hürkan, K., Bozyel, E., 2012. Domates Bitkisinin (*Solanum lycopersicum*, Solanaceae) Peroksidaz Aktivitesi ve Malondialdehid Miktarı Üzerine UV-C Uygulamasının Etkisi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül 2012, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye. Özet Kitabı. s 504.

Gönüz, A., Yağan, B. D., Hürkan, K., 2011. Preliminary Report on Potential of Hypericum L. Taxa From Ida Mountain (Kazdağı) in Bayramiç, Turkey. International Symposium on Kazdağları (Mount Ida) and Edremit. Proceedings and Abstracts. p 188-193.

Döver, E., Gönüz, E., Yağan, B. D., Hürkan, K., 2011. Çanakkale (Türkiye) Bayramiç Barajı ve Barajı Besleyen Akarsuların Kirlilik Yükleri ile Çevresel Etkileşimleri Üzerine Bir Araştırma. X. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı. s 467.

Hürkan, K., Gönüz, A., Güler, N., Yağan, B. D., 2009. Çanakkale İlinde Doğal Yayılışlı Bazı Orchidaceae Taksonları Üzerine Gözlemler. IX. Ulusal Ekoloji Ve Çevre Kongresi Özet Kitabı. s 243.

Gönüz, A., Yağan, B. D., Hürkan, K., Kaplan, M. E., 2009. Hava Kirliliğinin Bazı Peyzaj Bitkilerinin Pigment İçerikleri Üzerine Etkileri. IX. Ulusal Ekoloji Ve Çevre Kongresi Özet Kitabı. s 136.

Yağan, B. D., Hürkan, K., 2009. Orman Yangınları Ve Orman Biyoçeşitliliği Üzerine Etkileri 2008 Eceabat - Yalova Köyü (Çanakkale) Yangın Örneği. IX. Ulusal Ekoloji Ve Çevre Kongresi Özet Kitabı. s 79.

Gönüz, A., Demirbaş, S., Hürkan, K., Döver, E., Kaplan, M.E., 2008. the Investigation of Wetland Ecosystem in the Araplar Gorge and its Surroundings. Third International Conference BALWOIS, Ohrid. Abstracts p 303.

Güler, N., Gönüz, A., Hürkan, K., Döver, E., 2008. Çan (Çanakkale-Türkiye) İlçesi Doğal Yayılışlı Bazı Orchidaceae Taksonları Üzerine Gözlemler. Çanakkale İli Değerleri Sempozyumu, Çan Değerleri Sempozyumu Bildiriler Kitabı. s 143.

Gönüz, A., Yağan, B.D., Hürkan, K., Döver, E., 2008. Kolza Üretimi ve Biyokütle İle Enerji Arasındaki İlişkiler. Yenka-2008. (Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu) Çanakkale.

Gönüz, A., Tunç, İ., Hürkan, K., 2008. Çan (Çanakkale-Türkiye) Yöresi Orman Ağaçlarının Ekonomik Potansiyeli Üzerine Bir Araştırma. Çanakkale İli Değerleri Sempozyumu, Çan Değerleri Sempozyumu Bildiriler Kitabı. s 107.

Gönüz, A., Yağan, B. D., Hürkan, K., Ataş, S., Döver, E., 2008. Çan (Çanakkale-Türkiye) İlçesi Bitkisel Değerleri. Çanakkale İli Değerleri Sempozyumu, Çan Değerleri Sempozyumu Bildiriler Kitabı. s 85.

c) Katıldığı Projeler

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Collecting Comprehensive Orchid Herbarium Data for Conservation	Synthesys	15000	01.01.2014-31.05.2014	Yürütücü	Uluslararası
Collecting Comprehensive Data for the Conservation of Turkish Orchids	The Rufford Foundation	18357.95	23.08.2013-01.01.2015	Yürütücü	Uluslararası
Zeytin'de E Vitamini Biyosentez Genlerinin Moleküler Karakterizasyonu	TÜBİTAK	29684	15.08.2013-15.08.2014	Bursiyer	Ulusal
Orchidaceae Familyasına Ait <i>Orchis anatolica</i> Boiss., <i>Orchis pinetorum</i> Boiss. & Kotschy ve <i>Orchis tridentata</i> Scopoli Taksonlarının DNA Sekans Yöntemiyle Moleküler Filogenetik Özelliklerinin Belirlenmesi	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	6460	01.01.2010-01.01.2012	Araştırmacı/Uzman	Ulusal

İLETİŞİM

E-posta Adresi: kaanhurkan@orchidologist.com