

**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***ORCHIS ANATOLICA* BOISS. VE *ORCHIS TRIDENTATA*  
SCOPOLI (ORCHIDACEAE) TAKSONLARININ  
DNA SEKANS YÖNTEMİYLE  
MOLEKÜLER FİLOGENETİK  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Kaan HÜRKAN**  
**Biyoloji Anabilim Dalı**  
Tezin Sunulduğu Tarih: **06.01.2011**

**Tez Danışmanı:**  
**Prof. Dr. Ahmet GÖNÜZ**

**ÇANAKKALE**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

**Kaan HÜRKAN** tarafından, **Prof. Dr. Ahmet GÖNÜZ** yönetiminde hazırlanan, “*ORCHIS ANATOLICA* BOISS. VE *ORCHIS TRIDENTATA* SCOPOLI (ORCHIDACEAE) TAKSONLARININ DNA SEKANS YÖNTEMİYLE MOLEKÜLER FİLOGENETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı tez, tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet GÖNÜZ

\_\_\_\_\_  
Danışman

Yrd. Doç. Dr. K. Melih TAŞKIN

Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER

\_\_\_\_\_  
Jüri Üyesi

\_\_\_\_\_  
Jüri Üyesi

Sıra No:.....

Tez Savunma Tarihi: 06/01/2011

Prof. Dr. İsmail TARHAN

\_\_\_\_\_  
Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu Yüksek Lisans BAP tarafından 2010/05 no' lu projeden desteklenmiştir.

## 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 çalışmam boyunca sahip olduğu benzersiz deneyimini, bilgi ve desteğini benimle paylaşmasının yanı sıra gerek lisans öğrenimim gerekse üniversite dışındaki yaşamımda bana her zaman yanımda olduğunu hissettiren değerli Hocam ve danışmanım Sn. Prof. Dr. Ahmet GÖNÜZ' e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarımda, moleküler biyoloji teknikleri konusunda tecrübelerini ve bilgilerini benimle her zaman paylaşan değerli Hocam Sn. Yrd. Doç Dr. Kemal Melih TAŞKIN' a çok teşekkür ederim.

Arazi çalışmalarımda bana orkideleri tanıtan, tür teşhislerimde yardımcı olan değerli Hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER' e çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda gerektiğinde yardımlarını esirgemeyen, bilgilerini paylaşan değerli meslektaşım Fatih SEZER' e, manevi desteklerini yanımda hissettiğim değerli çalışma arkadaşlarım Ercan DÖVER, Serkan Ali ÇİFTÇİ, İbrahim UYSAL ve Arş. Gör. Berrak Damla YAĞAN' a çok teşekkür ederim.

Bütün öğrenim hayatımda maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Kaan HÜRKAN

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

µl	Mikrolitre
bç / bp	Baz çifti
BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
ITS	Internal Transcribed Spacer
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nrDNA	Nükleer Ribozomal DNA
° C	Santigrat derece
PCR / PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA	Ribozomal DNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TAE	Tris – Acetate – EDTA tampon çözeltisi
TE	Tris – EDTA tampon çözeltisi
UV	Ultra viyole

## ÖZET

### ***ORCHIS ANATOLICA* BOISS. VE *ORCHIS TRIDENTATA* SCOPOLI (ORCHIDACEAE) TAKSONLARININ DNA SEKANS YÖNTEMİYLE MOLEKÜLER FİLOGENETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Kaan HÜRKAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ahmet GÖNÜZ

06.01.2011, 83

Bu tez çalışmasında *Orchis anatolica* BOISS. ve *Orchis tridentata* SCOPOLI (Orchidaceae) taksonlarının, genomik DNA' larının ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgeleri sekanslanarak, moleküler filogenetik ve taksonomik özellikleri ortaya koyulmuştur.

Silika – jel yöntemiyle kurutulan bitki rozet yaprağı (basal yaprak) dokularından genomik DNA izolasyonu yapılmış, ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgesine özel primerlerle PCR işlemi uygulanarak bölge çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bölgenin DNA sekanslaması yapılmıştır. Sekanslama işleminden elde edilen veriler, çeşitli biyoinformatik ve filogeni programları ile işlenerek bu taksonların moleküler sınıflandırılmaları ilk kez ortaya koyulmuştur. Çalışmada obje olarak seçilen taksonların, diğer Orchidaceae üyeleriyle olan hizalamaları CLUSTALW2 yazılımı ile, filogenetik ağaç oluşturma işlemi ise MEGA 4.0 (Stable) yazılımı altında Neighbour – Join (Saitou ve Nei, 1987) metoduyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen distance matrix tablosu ve oluşturulan filogenetik ağaç verileri klasik taksonomi verileri ile karşılaştırılmış, ayrıca *O.anatolica* ve *O.tridentata* taksonlarının, seçilen 17 Orchidaceae türü ile ilişkileri incelenmiştir.

Bu tez çalışması ile birlikte, *O.anatolica* ve *O.tridentata* taksonlarının, nükleer DNA' larının ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgesinden elde edilen sekans verileriyle oluşturulan filogenetik ağaçtaki yerleşimlerinin, klasik taksonomi verilerine benzerlik gösterdiği, fakat *O.anatolica* taksonu için ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgelerinin moleküler taksonomisi ve filogenisi çalışmalarında kullanılabilirken, *O.tridentata* taksonunun teşhisi için yeterli bilgiyi içermediği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Orchis anatolica*, *Orchis tridentata*, Internal Transcribed Spacer, moleküler filogeni, taksonomi.

## ABSTRACT

### **DETERMINATION OF MOLECULAR PHYLOGENETIC PROPERTIES OF *ORCHIS ANATOLICA* BOISS. AND *ORCHIS TRIDENTATA* SCOPOLI (ORCHIDACEAE) TAXA USING THE TECHNIQUE OF DNA SEQUENCING**

Kaan HÜRKAN

Çanakkale Onsekiz Mart University  
Graduate School of Science and Engineering  
Chair for Biology Thesis of Master of Science

Advisor: Prof. Dr. Ahmet GÖNÜZ

06.01.2011, 83

In this research, molecular phylogenetic and taxonomic properties of *Orchis anatolica* BOISS. and *Orchis tridentata* SCOPOLI (Orchidaceae) taxa were investigated using the technique of sequencing of ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 regions of genomic DNA.

Genomic DNA isolation was performed from silica – gel dried basal leaves and PCR technique was applied using with customized oligonucleotide primers for ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 regions and also DNA sequencing process was completed with same primers. The data acquired from DNA sequencing were processed with some bioinformatic and phylogeny software and thus molecular taxonomy of these taxa were firstly became public. Alignment processes were performed with CLUSTALW2 software and constructing phylogenetic tree processes were performed with MEGA 4.0 (Stable) software using the methods of Neighbour – Join (Saitou ve Nei, 1987).

The data acquired from distance matrix table and phylogenetic tree were compared with classical taxonomic data and also phylogenetic relationships of *O.anatolica* and *O.tridentata* were discussed with other 17 Orchid taxa. With this thesis of master of science, it was observed that the phylogenetic tree which constructed with data acquired from ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 regions of genomic DNA of *O.anatolica* and *O.tridentata*



was compatible with classical taxonomy records. Whereas it was accomplished that ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 regions were useful for molecular phylogeny and taxonomy studies with *O.anatolica* the ITS region doesn't provide efficient data for *O.tridentata* taxa.

**Keywords:** *Orchis anatolica*, *Orchis tridentata*, Internal Transcribed Spacer, molecular phylogeny, taxonomy.

TEZ SINAVI SONUÇ BELGESİ.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT.....	viii
<b>BÖLÜM 1 - GİRİŞ.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Orchidaceae Familyası.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1 Genel Özellikleri.....</b>	<b>2</b>
a) <i>Orchis anatolica</i> BOISS. ....	4
b) <i>Orchis tridentata</i> SCOPOLI .....	5
<b>1.1.2 Türkiye’ de Orchidaceae familyası.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.3 Orkidelerin tıbbi ve ekonomik önemleri.....</b>	<b>8</b>
Salep .....	9
<b>1.2 Barkodlama, Moleküler Taksonomi ve Filogeni .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.1 Barkodlama hakkında genel bilgiler .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.2 Moleküler taksonomi ve filogeni.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.3 Nükleer ribozomal Internal transcribed spacer (nrITS) bölgesi.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Biyoinformatik.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4 Çalışmanın Amacı .....</b>	<b>17</b>
<b>BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>20</b>
<b>BÖLÜM 3 – MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Materyal ve Laboratuvar Donanımları .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.1 Laboratuvar donanımları.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.2 Kimyasal malzemeler, sarf malzemeler ve kitler .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.3 Bitki materyali .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1.3.1 <i>Orchis anatolica</i> BOISSIER .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1.3.2 <i>Orchis tridentata</i> SCOPOLI.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Yöntem .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.1 Bitki materyallerinin toplanması, teşhisi ve DNA izolasyonuna kadar muhafazası .....</b>	<b>32</b>

3.2.2 Bitki örneklerinin homojenizasyonu ve DNA izolasyonu.....	33
3.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	33
3.2.4 Agaroz jel elektroforezi .....	35
3.2.5 DNA dizileme.....	36
3.2.6 Biyoinformatik çalışmalar.....	37
3.2.6.1 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).....	37
3.2.6.2 Alignment (Hizalama).....	37
3.2.6.3 MEGA 4 (Stable) (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) .....	38
<b>BÖLÜM 4 – ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>40</b>
4.1 Araştırma Bulguları.....	40
4.1.1 DNA izolasyonu bulgularına ilişkin elektroforez görüntüleri .....	40
4.1.2 PCR bulgularına ilişkin elektroforez görüntüleri.....	41
4.1.3 DNA dizileme.....	41
4.1.3.1 BLAST ve ALIGNMENT bulguları .....	42
4.1.3.2 <i>Orchis anatolica</i> türüne ait bulgular.....	42
4.1.3.3 <i>Orchis tridentata</i> türüne ait bulgular .....	44
4.1.3.3 Filogenetik ve taksonomik bulgular .....	47
4.2 Tartışma .....	52
<b>BÖLÜM 5 – SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>56</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>59</b>
Çizelgeler.. .....	I
Şekiller.....	II
Özgeçmiş .....	III

**BÖLÜM 1****GİRİŞ****1.1 Orchidaceae Familyası****1.1.1 Genel Özellikleri**

Orchidaceae, çok değişken habitatlarda yaşıyan ve dünyanın hemen her tarafına yayılmış kozmopolit bir familyadır. Orkidelerin yaklaşık %70'i epifit, %25'i toprakta ve %5'i ise toprak altında, kayalar üzerinde, çürümekte olan bitkiler üzerinde, vb. şekilde yaşamını sürdüren bitkilerdir (Güler ve ark., 2008). Orchidaceae familyasının yaklaşık 450 cins ve 18.000 – 20.000 türle çiçekli bitkilerin en geniş familyalarından biri olduğu belirtilmektedir (Sezik, 1967). Ayrıca bu familyanın bitkiler aleminin en zengin familyası olduğu ifade edilmektedir (Arditti, 1979). Orchidaceae familyasının bitkiler alemindeki yeri Çizelge 1' de şematize edilmiştir. KEW Garden kayıtlarına göre ise bu sayı 26.000' in üzerindedir ve her yıl 100 – 200 yeni tür bu sayıya eklenmektedir.

Seçmen ve ark. (2004)'na göre bu familya üyeleri; yumrulu veya rizomlu, bazıları epifit, saprofit veya klorofilsiz çok yıllık otsular. Gövde yapraklı veya skapos. Skapos ise yapraklar kaidede ve rozet şeklinde. Yapraklar alternat nadiren karşılıklı veya dairesel, basit, nadiren pul şeklinde indirgenmiş, genellikle linear, nadiren ovat veya orbikular. Çiçekler spika, rasemus veya panikula durumunda, erdişi, zigomorf. Periant 2 seride 6 parçalı. Dıştaki serideki 3 tanesi petale benzer, yeşil veya değişik renklerde. İçteki 3 tanesinin ortasındaki labellum şeklinde ve çoğunlukla mahmuzlu. Stamen 1 veya 2, stilus ve stigma ile beraber birleşmiş (ginostemyum). Ovaryum alt durumlu 1 veya nadiren 3 lokuslu ve 3 karpelli, ovüller çok sayıda ve anatrop, 1 lokuluslu ise plasentasyon parietal, 3 lokuluslu ise plasentasyon eksensel. Meyva çok küçük ve bol tohumlu bir kapsüla şeklinde tanımlanmıştır.

Bu gruba ait bitkilerin büyük bir kısmı epifittir. Bu epifitlerin de önemli bir kısmı orkidelerden meydana gelmiştir. Epifit orkideler tropikal ormanların bitkileridir. Jungle denen bu ormanlarda, ağaçların meydana getirdiği koyu gölge dolayısıyla, zeminde pek az

bitki yetişir. Bu orkidelerin gövdeleri yalancı bir soğan halinde şişmiş ve şerit şeklinde hava kökleri oluşmuştur. Bu hava köklerinin üzeri, su emebilen bir tabaka ile kaplıdır. Bütün bu değişikliklerin sebebi, bitkinin su ihtiyacını karşılamaktır. Tropikal yağmurlar sırasında yalancı soğan ve hava kökleri, üzerine düşen suyu emer ve bir sonraki yağmura kadar bitki bu suyu kullanır (Sezik, 1984). Bütün orkideler çok yıllıklardır. Ortam şartlarının uygun olması halinde uzun yıllar yaşamaya ve her yıl çiçeklenme kabiliyetine sahiptirler. Orkideler, yaşamlarının çoğunu toprak altında sürdürürler. Genellikle çiçeklenme ve meyvelenme birkaç haftada gerçekleşir ve bu yapılar kaybolur (Delforge, 2006).

Epifit olarak bilinen *Liparis* ve *Malaxis* cinsleri dışında Avrupa’ da bulunan bütün orkideler geofit (karasal) orkidelerdir. Avrupa orkidelerinde (ortakuşak orkideleri) kökler, 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 *Epipogon* 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).

Yumrulu orkidelerde, her bitki genellikle 2 yumru taşır. Kışı bir önceki sene meydana gelen yumrunun aracılığıyla geçiren bitkinin, bahara doğru ek köklerinden biri kalınlaşmaya başlar ve ucundan bir yumru daha meydana gelir. Bu yumru gelişirken diğer taraftan yukarıya doğru da bir tomurcuk vasıtasıyla, yeni yılın gövdesi meydana gelmeye başlar. Bitkinin gelişmesi ilerledikçe yeni yumru da gelişir. Eski yumru ise buruşur, yeni yumrunun yanında ona yapışık ve içi boşalmış halde bulunur (Sezik, 1984).

Çoğu monokotiledon üyelerinde olduğu gibi Avrupa orkidelerinde de sap kısmı; dallanmamış, her zaman dik, enine kesitte dairesel, boşluklu veya boşluksuz ve tüylü veya tüysüzdür.

Yapraklar, diğer monokotiledonlardaki gibi tam, bileşik veya bölünmemiş, boylamasına paralel damarlı, bazen (*Goodyera* cinsindeki gibi) enine yan damarlıdır (Delforge, 2006). Tabandaki yapraklar, sapın etrafında rozet şeklinde dizilmişlerdir. Ya

toprağın yüzeyine yapışmış yani yayık olarak bulunurlar (özellikle *Ophrys* türleri), ya da gövde ile değişik açılar yapacak şekilde yukarıya doğru yönelmişlerdir (*Orchis* ve *Dactylorhiza* türlerindeki gibi). Çiçek durumuna kadar olan kısımda ya sapı saran bir kın meydana getirmişlerdir (*Orchis* ve *Ophrys* türleri), ya da belirli aralıklarla düzgün bir şekilde sap üzerinde dizilmişlerdir (*Cephalanthera* ve *Epipactis* türleri). Yapraklar cins ve türlere bağlı olarak linear, lanseolat, oblong, ovat veya orbikulat gibi değişik şekillerde olabilirler. Aynı bitkinin taban yaprakları ile gövde yaprakları arasında şekil farklılıkları bulunabilir. Yaprakların üst yüzeyi genellikle parlak, alt yüzeyi ise mattır. Üst yüzeyde, bazı cins ve türlerde, mor renkli benek ve lekelere rastlanır (Ör: *Neotinea maculata*). Yaprakların kenarları hemen hepsinde düzdür, *Orchis italica* türünde ise undulat yapıdadır (Sezik, 1984).

Orkide çiçekleri genelde bilateral simetri gösterir ve bu özellik orkideleri *Iris* türlerinden ayıran özelliklerden biridir fakat birçok monokotil ve dikotil bitkiler de bilateral simetridir. Orkidelerde ovaryum, *Amaryllidaceae* ve diğer birçok familyada olduğu gibi alt durumdadır (Dressler, 1993). Çiçekler her zaman brakteye sahiptir. Orkide çiçeğinde, diğer bitkilerin çoğunda bulunan kaliks, korolla, erkek ve dişi organlar gibi kısımlar mevcuttur; fakat bu tabakalar değişikliğe uğradıkları için kolayca ayırt edilemezler. Erkek ve dişi organlar birleşerek özel yapılı bir organ olan *ginostemiyum* yapısını meydana getirmişlerdir. Bir orkide çiçeğinde periant parçaları dış ve iç olmak üzere 2 halka meydana getirecek şekilde dizilmişlerdir. Dış periant parçalarına *sepal*, içte olanlara ise *petal* adı verilir. Her iki tabaka da üçer parçadan meydana gelmiştir. Dış periant parçaları hemen hemen bir üçgen meydana getirecek şekilde dizilmişlerdir. İki yanda (lateral sepaller), diğeri ortada (dorsal sepal) bulunmaktadır. İç periant parçalarından iki yandaki, birbirine benzer (*petal*); ortadaki ise genellikle şekil, renk ve yapı bakımından ileri derecede farklılaşmıştır. Bu petale *labellum* (dudak) adı verilir. *Labellum* dışında kalan periant parçalarının yapısı, rengi, şekli, ölçüleri ve birbirleri ile olan oranları bir orkidinin tanımlanması için önemli olan özelliklerden bir kısmını meydana getirir.

Orkidelerin tozlaşmaları böcekler vasıtasıyla olur (entemofil veya entemogam tozlaşma). Tozlaşmayı özellikle arı, örümcek, sinek, eşekarası, pervaneler ve diğer böceklerin yanında bazen arıkuşları da sağlar. Bu böcekleri orkidelere çeken yiyecek, genellikle mahmuzda bulunan nektar veya diğer salgılardır. Orkidelerde klayistogami

denilen; çiçek açmadan, yani periant kapalı iken, polen taşıyıcılara ihtiyaç olmadan, kendi kendini dölleme özelliği mevcuttur (Sezik, 1984).

Uygun havalanma ve sıcaklık koşullarında dormant durumda olmayan orkide tohumlarının çimlenmeye başlaması için ortamda su bulunması yeterlidir, fakat bitki heterotrofik ise ortamdan su haricinde diğer bazı maddeleri de alması gerekmektedir. Bu heterotrofik türler doğada çimlenebilmek için endofitlerle veya bazı mantarlarla ilişkili olmak zorundadırlar (Rasmussen, 1995). Son derece küçük olan ve endosperma taşımayan orkide tohumlarının düştüğü yerde çimlenmesinin gerçekleşebilmesi için gerekli olan funguslar genellikle *Rhizoctonia* cinsinin değişik türleridir ve türe has değildir. Fungus, bulunduğu ortamdaki organik humusun parçalanmasıyla ortaya çıkan nişasta ve benzeri bileşikler, suda çözünen bileşikler haline çevirerek, genç orkide bitkisine gönderir. Genç bitki, henüz çimlenmeyi sağlayacak endosperma taşımadığı için, mikorizomun (orkide tohumu ve fungusun oluşturduğu yapı) büyümesi çok yavaştır. Mikorizom fungusları, daha çok humuslu topraklarda bulunurlar ve *Fagus* sp, *Quercus* sp., *Betula* sp, *Pinus* sp. gibi pek çok ağacın ve fundalıkların köklerinde yaşarlar. Tohumun çimlenmesinde ikinci kademe, yumru veya köklerin oluşması, yaprak taşıyan bir sapın toprak yüzeyine doğru meydana gelmeye başlamasıdır. Bu kademedeki mikorizom kurur, yerini bitkinin ergin formuna terkeder. Yumrulu cinsler, fungustan ayrılıp bağımsız yaşamaya meyillidirler ve hayatlarının ileri devrelerinde genellikle fungusa rastlanmaz. *Cephalanthera* türleri ve *Goodyera repens* gibi, humuslu topraklarda yaşayan, şişkin kök sistemine sahip orkidelerin köklerinde mikorizom fungusuna ömürleri boyunca rastlanır (Sezik, 1984).

#### **a) *Orchis anatolica* BOISS.**

##### **Botanik özellikleri**

İnce ve ortadan boyluya kadar bir bitkidir. Gövde genellikle kırmızımsı renkte hafif boyanmış gibidir. Yapraklar mızrağımsı, ucu sivri, hafiften belirgin kadar lekeli ve alt tarafta rozet oluştururlar. Yukarıdaki yapraklar ise, ayrılmış gövde yapraklarına geçiş yaparlar. Çiçek kurulu çok gevşek ve boyuna uzamıştır. Çiçek tabanı yaprakçığı (brakte) sivri ve yumurtalıkta (ovaryum) olduğu gibi kısadır. Çiçekler oldukça büyük, pembeden erguvani kırmızımsıya kadar renklidir. Çanak yapraklar genellikle belirgin yeşil damarlı, yandaki çanak yapraklar yumurta formu – mızrağımsı, yataydan hafif geriye doğru bel

vermişe kadar, ortadaki ise, her iki taç yaprağın üzerine eğilmiştir. Taç yapraklar dar – mızrağımsı ve küt uçludur. Dudak eni, boyundan daha geniş, üç loplulu, her iki yan lop az veya çok belirgin geriye doğru bel vermiş; (açık) pembeden erguvani kırmızıya kadar renkli ve tabanda beyazımsıdır. Açık dudak tabanında, koyu kırmızı şeritler veya erguvani noktalar bulunur. Mahmuz düz veya bükülmüş, genellikle dik olarak yukarıya doğru yönelmiş ve hemen hemen yumurtalık (ovaryum) kadar uzunluktadır.

### **Benzer türlerden ayrılması**

*Orchis sezikiana* ile *Orchis anatolica* ve *Orchis quadripunctata* arasındaki hibritlerle karıştırılması olanaklıdır. *Orchis sezikiana* ilk olarak 1991 yılında B. & H. Baumann (Baumann, 1991) tarafından tanımlanmıştır.

### **b) *Orchis tridentata* SCOPOLI**

#### **Botanik özellikleri**

Orta büyüklükte, gürbüz ve genellikle bodur büyüme yapan bir bitkidir. Yapraklar mızrağımsıdan dar – mızrağımsıya kadar formlu, mavimsi yeşil renkli, lekesiz, alt kısımda taban rozeti oluşturur. Yukarıdakiler ise, kılıç kımı şeklinde gövde yapraklarına geçiş yapar. Çiçek kurulu küremsi, ender olarak silindirik, sık ve çok çiçeklidir. Çiçek tabanı yaprakçığı (brakte) dar ve sivri uçlu ve yaklaşık yumurtalık (ovaryum) kadar uzunluktadır. Çiçekler orta büyüklüktedir. Çiçek örtüsü gevşek bir miğfer oluşturur. Miğfer uzun bir sivri uçla sonlanır ve geriye doğru bükük, (açık) pembeden hemen hemen saf beyaz veya açık menekşeye kadar renklidir. Çanak yapraklar yumurta formlu – mızrağımsı olup, genellikle menekşe renkli damarlıdır. Taç yapraklar dar – mızrağımsı, çanak yapraklardan daha kısadır. Dudak derin üç loplulu 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.



**Benzer türlerden ayrılması**

*Orchis tridentata*, *Orchis lactea* ile karıştırılabilir. *Orchis tridentata* ince boylu ve genellikle boylanan bir bitki olup, çiçek kurulu küremsi, çanak yaprakları genellikle koyu erguvani veya menekşe renkli damarlıdır. Ayrıca çiçekler biraz daha küçüktür ve pembeden menekşeye kadar renklidir. Bu tür, *Orchis lactea* türünden bir ay daha geç çiçeklenir.

**Çizelge 1: Avrupa orkidelerinin sistematikleri (Delforge, 2006)**

- Kingdom:** Plantae  
**Division:** Spermatophyta  
**Subdivision:** Angiospermae  
**Class:** Monocotyledonae  
**Order:** Orchidales  
**Family 1:** *Orchidaceae*  
**Family 2:** *Apostasiaceae*  
**Family 3:** *Cypripediaceae*  
**Subfamily A:** *Neottioideae*  
**Tribe 1:** *Neottieae*  
**Subtribe a:** *Limodorinae*  
**Subtribe b:** *Listerinae*  
**Tribe 2:** *Chranichideae*  
**Subtribe a:** *Spirantinae*  
**Subtribe b:** *Goodyerinae*  
**Subfamily B:** *Epidendroideae*  
**Tribe 1:** *Maxillarieae*  
**Subtribe a:** *Corallorhizinae*  
**Tribe 2:** *Malaxideae*  
**Subtribe a:** *Liparinae*  
**Subfamily C:** *Orchidoideae*  
**Tribe 1:** *Orchideae*

**Subtribe a:** *Gymnadeniinae*

**Subtribe b:** *Serapiadinae*

### 1.1.2 Türkiye’ de Orchidaceae familyası

Türkiye, orta kuşak orkideleri bakımından, çevre ülkelere göre oldukça zengindir. Tropikal kuşak ile kutupları içine alan arktik kuşak arasında kalan bölge “Orta Kuşak” olarak adlandırılır. Orta kuşak orkidelerinin büyük bir kısmı toprakta yaşamaktadır. Ülkemiz orkideleri de bu grupta yer alır (Güler ve ark., 2008). Sezik tarafından 2002 yılında yayınlanan “*Turkish Orchids and Salep* (Türkiye’nin Orkideleri ve Salep)” adlı yayında Türkiye’ de 24 cinse ait 148 türün var olduğu belirtilmektedir (Sezik, 2002).

Kreutz (2009)’ a göre; Türkiye floristik anlamda Avrupa ile Yakın Doğu arasında bir geçiş bölgesinde bulunup, Afrika, Asya ve Avrupa kıtalarının ortak etkisini yansıtır. Bunun sonucu olarak burada zengin ve farklı bir bitki dünyası gelişmiştir. Türkiye, bitki türü çeşitliliği açısından dünyadaki en zengin ve önemli bölgeler arasında yer alır. Bu gurur verici zenginliğin içinde, göz kamaştırıcı renkleri ve insanın içini ürperten nadirlikleriyle Orkidelerin çok özel bir yeri vardır. Orkideler genellikle tropikal bitkiler olarak bilinse de, bu kanı doğru değildir. Anadolu, sahip olduğu toprak ve iklim çeşitliliği nedeniyle bu bitkiler için mükemmel yaşam koşulları hazırlar. Bu verimlilik, Türkiye doğasında yetişen 170 doğal Orkide taksonu ile sonuçlanmaktadır.

Çalışma objelerimizden olan *Orchis anatolica* türünü topladığımız, yaklaşık 800 taksonun kayıtlı olduğu Kazdağı florasında 23’ ü yalnızca bu Dağa özgü olmak üzere en az 68 ülke çapında nadir bitki yer alır. Bu özellikleri ile bu önemli bitki alanı, yalnız Türkiye’ nin değil tüm Avrupa kıtasının en önemli bitki alanlarından biridir (Özhatay ve ark., 2005).

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

### 1.1.3 Orkidelerin tıbbi ve ekonomik önemleri

Yurdumuzdan yıllardan beri ihracatı yapılan “yabani çiçek soğanları” adı altında toplanan geofitler (soğanlı, rizomlu, yumrulu bitkiler), özellikle 1970’ lerden sonra bu işle uğraşan, ticaretini yapan resmi kuruluşlarla özel firmaların daha fazla dikkatlerini çekmeye başlamıştır. Yaklaşık bir asırdan beri yurt dışına satılan çeşitli yabani çiçek soğanları, bir yandan yurt ekonomisine belirli bir oranda katkı sağlarken diğer yandan yurdumuz tabiatında da değişikliklere, tahriplere sebep olmuştur. Yurdumuz florasının zenginliği yabancıların dikkatini bizden önce çekmiş, bu zengin flora içerisinde gösterişli çiçekleri ile hemen göze çarpan geofitlere özel bir önem vermişlerdir. Önceleri genellikle botanik bahçelerini veya meraklı kişilerin özel bahçelerini zenginleştirmek amacıyla toplanan örnekler daha sonra yerini geniş çapta sökümlere ve nihayet bu işin ticaretine terk etmiştir. Özellikle 1960’ lı yıllardan sonra bu ticaret oldukça büyük miktarlara ulaşmıştır (Ekim, 1991).

Gönüz (2001), Orchidaceae familyasının ekonomik özelliklerine değinerek, Ege Bölgesi Spil, Nif ve Bozdağ’ ların farklı yükseltilerinde yayılış gösteren *Orchis anatolica* türünün gövde ve yaprak dokularında ultrastrüktürel yapıları incelemiş, dağların yüksek bölgelerindeki taksonların yumrularının daha iyi gelişme gösterdiğini, mitokondrium ve kloroplast yapılarında farklılaşmalar olduğunu rapor etmiş ve bu bitkilerimizin korunması gereğini vurgulamıştır.

**Çizelge 2:** Karasal orkidelerin Avrupa’ daki kullanımları (Bullpit, 2005’ ten değiştirilerek)

Yazar	Yıl	Kullanımı	
		Hazırlanışı	Endikasyonu ve Kullanım Alanları
Turner W	1568	Taze tüber ve süt	Afrodizyak.
		Kuru tüber	Antiafrodizyak, Antiseptik, gastrointestinal problemler.
Langham W	1579	Tüber	İltihap sökücü, tüberkiloz ve ishali tedavi edici.
Parkinson J	1640	Tüber (Salep)	Afrodizyak, Dondurma, Balkanlarda içecek ve İran’ da parfüm.

## **Salep**

Salep; toz haline getirilmiş orkide yumrularının süt ile karıştırılmasıyla hazırlanan sıcak bir içecektir. Bitki çiçek haldeyken toprak altındaki yumruları toplanmaktadır. Yalnızca yan yumru alınmakta, gövdeyi taşıyan ana yumru kullanılmamaktadır. Yumrular yuvarlak veya dallı 0,7-3,6 cm çapında veya 0,3-1,2 cm eninde, 0,2 g ile 1,6 g arasında değişen ağırlıkta, yarı şeffaf, kirli sarı, pürüzlü, sert, kokusuz ve lezzetsizdir. Toplanan yumrular suyla yıkanarak temizlenmekte, ipe dizilerek ve su, süt ya da ayran içinde kaynatılarak enzimatik aktivite durdurulmakta, ardından açık havada kurutulmaktadır. Kurutulan yumrular dövülerek toz hale getirilmekte ve böylece kullanıma hazır haldeki salep tozu elde edilmektedir (Tamer ve ark., 2009).

Piyasada bulunan ticari saleplerin yapısında glikomannanlar (%11-44), nişasta (%8-19), redüktör ozlar (%2-3) ve proteik yapıdaki maddeler (%1) bulunur. Etkili madde glikomannanlardır. Bu maddeler su ile (süt ile de) şişer ve viskoz bir çözelti meydana getirir. Kalitesi iyi olan bir salep numunesi %40 civarında glikomannan taşır. Bu madde, 3 molekül mannozun 1 molekül glikoz il $\beta$  (1 -4) bağıyla bağlanıp, polimerleşmesi sonucu meydana gelen heterojen yapıda bir poliholozittir. İçtiğimiz salebe kıvam veya yediğimiz maraş dondurmasına geç erime ve sertlik sağlayan, salepteki glikomannanlardır. Yapıda bulunan az miktardaki nişasta da, şişme özelliği dolayısıyla, glikomannanlara yardımcı olur. Salep eldesinde *Orchis*, *Anacamptis*, *Ophrys*, *Serapias*, *Himantoglossum*, *Barlia* gibi ovoit yumrulu olan orkidelerle, *Dactylorhiza* gibi parçalı yumruya sahip orkidelerin değişik türleri kullanılmaktadır (Sezik, 1984).

Türkiye’ de yetişen orkidelerin yumrularından yıllarca salep elde edilmiş, bunlar hem yurt içerisinde kullanılmış hem de yurt dışına ihraç edilmiştir. Salep veya bilimsel ismi ile *Tubera salep* eczacılıkta yakın zamana kadar değişik preparatlar halinde göğüs yumuşatıcı ve balgam söktürücü olarak kullanılmıştır. Salep 1947 Alman, 1948 Türk, 1951 Yugoslav, 1969 Avusturya ve 1961 Rus kodeks ve farmakopelerinde *Tubera salep* olarak kayıtlıdır (Sezik, 1967). 2007 Çin yayınlarında da gıda ve faydalı drog olarak kullanıldığı, beş *Dendrobium* türünün Çin farmakopesinde yer aldığı bildirilmiştir. Çin literatürlerinde belirtildiği üzere orkideler günümüzde sindirim güçlüğü, su kayıpları, ateş düşürücü, lenfosit arttırıcı, huzursuzluk giderici olarak kullanılmakta, ayrıca mide ve karaciğer kanserlerinde kullanılmakta olup, pıhtılaşma engelleyici ajan özelliği bulunmaktadır

(Bulpitt, 2005). Bu özelliklerinin yanı sıra *Orchis* türlerinin yumrularından elde edilen salep, afrodizyak olarak, çocuk ishallerini kesici, gıda olarak ve halen Orta Anadolu’ da dondurma yapımında kıvam verici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca Almanya’ dan ithal edilen suni salebin, eczacılık sanayinde stabilizatör olarak kullanıldığı bilinmektedir (Sezik, 1967).

Orkide yumrularının doğadan direkt olarak sökülmeleri ile salep üretimi ve ihracatı kritik düzeylere (1955 ve 1963 yılları) ulaştığından dolayı Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı bu yumruların ihracatı ile ilgili bazı önlemler almıştır. Bu önlemler dahilinde doğadan direkt sökülerek toplanan orkide yumrularının ihracatı Tarım ve Köy İşleri Bakanlığının “Doğal Çiçek Soğanlarının Sökümü, Üretimi ve İhracatına Ait Yönetmeliği (1995)” gereğince yasaklanmış durumdadır. İstanbul Ticaret Odası ve Antalya Ticaret ve Sanayi Odası ile yaptığımız telefon konuşmaları ile de bu yasağın yürürlükte olduğunu öğrenmiş bulunmaktayız. 1955 yılında ihracatın 15.386 kg’ a kadar çıktığı durumda doğadan ortalama 30 milyon civarında orkide yumrusunun söküldüğü ortaya çıkmaktadır. Ayrıca ülke içinde kullandığımız orkide yumrularının sayısının da en az ihracatta kullandığımız orkide sayısı kadar olduğunu da unutulmamalıdır Kaya (2009).

## **1.2 Barkodlama, Moleküler Taksonomi ve Filogeni**

### **1.2.1 Barkodlama hakkında genel bilgiler**

DNA barkodlama, geleneksel taksonomik tanımlamaların yetersiz olduğu geniş çapta ekolojik ve koruma çalışmalarında, genomun kısa fragmentlerinden elde edilen DNA sekansları kullanılarak tür tanımlanması yapılabilen bir tekniktir. DNA barkodlamada standarda bağlanmış DNA bölgeleri kullanılır, bununla birlikte geniş bir kategoride kullanıma uygun bir DNA bölgesi bulmak için çabalar halen sürmektedir. Gerçekte DNA barkodlarının çalışabilmesi için; sekans varyasyonları, türler arası düzeyinde tanımlamaların yapılabilmesi için yeteri kadar yüksek varyasyona, tür içi düzeyde tanımlamaların yapılabilmesi için de yeteri kadar düşük varyasyona sahip olması gerekmektedir. Barkodlama için kullanılacak DNA bölgesinin seçimi, prokaryotlara oranla ökaryotlarda bir daha fazla araştırılmıştır. rRNA genleri, tanımlamalar için favori olmuştur. Bununla birlikte, bitkiler arasında, özellikle angiosperm üyelerinde, DNA tabanlı tanımlama tam anlamıyla yapılmamakla beraber, DNA barkodlama; herbivor canlıların

beslenme şekillerini ortaya çıkarmada, odun türlerinin belirlenmesinde ve bitkisel destek ürünlerinin tanımlanmalarında kullanılmaktadır. Bu tanımlamaların bazılarında da, tür bazında bazen başarısız olabilmektedir. DNA barkodlarının bitkilerde uygulanamamasının başlıca nedenleri, mitokondrial genlerin düşük oranlı sekans değişimleri nedeniyle tür düzeyinde tanımlamalar için yetersiz oluşudur (Kress ve ark., 2005).

DNA barkodlamanın amacı bir veya birkaç gen bölgesi kullanarak tüm canlıları tanımlamak iken genomikler, barkodların aksine bir veya seçilmiş birkaç türün genlerin bütün genlerle olan etkileşimlerini ve fonksiyonlarını için kullanılmaktadır.

DNA barkodlarının pratikte kullanışlı olabilmeleri üç kritere bağlıdır; (i) tür düzeyinde genetik varyabilite ve farklılaşma göstermeli, (ii) geniş taksonomik uygulamalar için barkodlamada kullanılan universal PCR primerleri uygun pozisyonlara bağlanabilmeli ve (iii) DNA izolasyonu ile çoğaltımı gerçekleştirilebilecek kısalıkta bir sekans olmalıdır.

DNA barkodları, biyoçeşitliliğin korunmasındaki önemli noktalarda, uluslar arası düzeyde tehlike altındaki orkide türlerinin izlenmesi çalışmalarına değer katabilme çalışmalarında teorik olarak uygulanabilmektedir (Kress ve Erickson, 2008).

Tür düzeyindeki bitkisel moleküler sistematik araştırmalarında, nükleer ribozomal sistrunun internal transcribed spacer (ITS) bölgeleri (18S – 5.8S – 26S) en çok sekanslanan bölgedir. Bu bölge eğrelti otları dışında ökaryotlarda ve mantarlarda geniş fayda sağlayan ve muhtemel bitki barkodu bölgesi olarak tanımlanmaktadır (Kress ve ark., 2005).

### **1.2.2 Moleküler taksonomi ve filogeni**

Moleküler biyolojide kullanılan tekniklerin hızlı bir şekilde ve ara vermeksizin gelişimi, araştırmalar sonucu bulunan yeni taksonların var olan sınıflandırmalara dahil edilmesindeki güçlükler ve sistematikte kullanılan anatomik, morfolojik, karyolojik v.b. klasik yöntemlerin karmaşık bitki gruplarını sınıflandırmada yetersiz kalması ve melez türleri tanımlamadaki hatalarından dolayı, moleküler sistematik günümüzde hızlı bir şekilde gelişim gösteren ve popüler olan bir sistematik metodudur.

Geniş bitki gruplarının kozmopolit yayılışlı türleri, habitat farklılıkları, iklimik faktörler, polinatörlerin farklılıkları ve sık hibritleşme potansiyelleri ile toprak yapısının ve

türünün değişkenliği gibi faktörlere maruz kaldıklarında genotipik ve fenotipik varyasyonlara uğrarlar. Bu varyasyonların oluşturduğu yeni yapılanmalar, klasik sınıflandırma yöntemleri ile doğru olarak isimlendirilememekte ve aynı türün varyasyonlarının farklı tür olarak algılanmasına, sistematikte bu şekilde hatalı olarak yer almasına neden olmaktadır. Bu klasik taksonomi tekniklerinin, genetik karakterizasyonunun belirlenmesi tekniği ile birleştirilmesi, türlerin gerçek anlamda doğru olarak adlandırılmalarını, filogenetik ağaçlara doğru olarak yerleştirilmelerini ve akrabalık ilişkilerinin hatasız olarak belirlenmesini sağlamaktadır. En kesin ve kaliteli sınıflandırma, evrimsel sürecin işler halde olduğunu göstermekte ve bununla birlikte canlıların tarihsel ilişkilerine ışık tutmaktadır (Delforge, 2006).

Taksonomik sistemimizin temelleri ve son 250 yılı aşkın süredeki gelişimi, morfoloji bazından çok benzer olan ve birbirleri ile ilişkili olan tür tanımlamalarını oluşturmada sadece bir ipucu ortaya koymaktadır. Morfolojik tür kategorisi günümüzde halen uzaktan izlenen bir kavramdır. Doğa, tür üretmekten ziyade, evrimsel değişimin elemanları olan bireyleri, popülasyonları ve nesilleri sağlamaktadır. Sınıflandırma ilkesine örnek bir yaklaşım, Dobzhansky (1940) ve çalışma arkadaşlarının yaklaşık 50 yıl önce biyolojik tür tanımında vurguladıkları gibi bireylerin, birbirlerine yakın olan ırkları kaynaştırma konusundaki becerisidir. Bu araştırmacıların vurguladıkları, ırkların kaynaşmaları sırasında meydana gelebilecek bir engelin, ırkların sonsuza kadar genetik açıdan birbirlerinden ayrı olmalarına yol açabileceğidir. Bu tanımdan yola çıkılarak, bazı ideal taksonomik dünyaların “tek bir morfoloji = tek bir melezlenebilen grup = tek bir tür” şeklinde, morfolojik olarak tek tip ve üreme açısından diğer ırklardan izole olmuş bir varoluş gibi düşünülmekte olduğu düşüncesi ortaya çıkmaktadır. Birçok bireysel popülasyon ve ırk, günümüzde gerçekten de morfolojik açıdan tek tip, melezlenme potansiyeli olan fakat diğer ırklarla çaprazlanamayan özelliklere sahiptir. Fakat diğer birçok ırk içinse morfolojik tek tiplilik, bir morfolojik grubun bütün bireyleri için aynı olarak tanımlanamadıklarından, araştırmacıları morfoloji dışında başka kriterler aramaya yöneltmiştir (Coleman, 2009).

Yeryüzünde bir milyondan fazla hayvan ve 325 binden fazla bitki türü bilinmektedir. Bu çok geniş organik çeşitlilik ile çalışmak için türleri mantıklı ve anlamlı olarak sınıflandırabilecek bir sisteme ihtiyaç vardır (Gönüz ve diğ., 2009; Demirsoy ve Türkan, 1999).

Bildiğimiz ve öncelikli olan morfoloji tabanlı taksonomik sistemin aksaklıklarının olması, DNA dizileme tekniğinin gelişiyile birlikte taksonomistlere, türleşme süreçlerinin ortaya koyulması bakımından yeni umutlar vermektedir (Coleman, 2009).

Jens Causen, David Kech ve William Heisey (1958)' in farklı çevrelerden alınan bitkiler üzerine yaptıkları ünlü deneyleri ile “organizmanın sadece kendi genleri tarafından belirlenmediği, tersine, içinde olduğu çevreler dizisinin etkinliğine bağımlı bir ontogenetik sürecin eşsiz bir ürünü olduğu” ortaya konmuştur (Lewontin, 2007). Ekolojik, çevresel etkileşim vb. farklılıkların, morfolojik ve anatomik gözlemlere dayalı incelemeler sonucunda özellikle orkidelerde bireylerin farklı tür veya alttür olarak algılanmalarına neden olan değişiklikler yarattığı ve bu sebeple sistematikte hatalı pozisyonlara yerleştirilmelerine yol açtığı bilinmektedir. Fakat moleküler sistematik sonucunda ortaya çıkarılan veriler, türlerin genetik yapılarındaki varyasyonları ortaya koyacağından bu tür hataları ortadan kaldırmaktadır.

Filogenetik sistematik; hem nesli tükenmiş hem de yaşayan canlı türleri arasındaki evrimsel ilişkileri tanımlayan ve anlamaya çalışan, biyolojinin bir çalışma alanıdır. Evrim teorisi; bireyler veya türler arasındaki benzerlikleri ve ortak bir ataya sahip oldukları şeklinde nitelendirilebilir. Böylece filogenetik sistematik, bir türün evrim tarihini, dolayısıyla onun filogenisi, soy veya onların organ ve parçalarını ve genetiksel ilişkilerini açıklar. Sistematikçiler, türler arası ilişkileri modellendirerek bütün yaşam tarihini anlatmaya çalışırlar. Fakat bu yaşam tarihi bir zamanlar sadece bir kez gerçekleşmiş ve şimdiki zamana sadece ipuçları bırakmışlardır. Bilim adamları yaşam tarihini bu ipuçlarını kullanarak oluşturdukları hipotezler veya modellemelerle ortaya çıkarmaya çalışmaktadırlar ve filogenetik çalışmalarda, filogenetik ilişkilerin izlenebilir hale getirilmesindeki en etkili yolun, organizmalar arasındaki ilişkileri temsil eden filogenetik ağaçların oluşturulması olduğu ifade edilmektedir. Moleküler filogeni; DNA ve proteinlerdeki değişimlerin oranlarını ve şeklini belirleyerek, genlerin ve organizmaların evrimsel tarihini yeniden düzenlemeye çalışır.

Son 20 yılda dizi verilerinin kaynaşması filogenetiği tamamen değiştirmiştir (Pagel, 1999) ve artan sayıdaki geniş kapsamlı projeler hayat ağacının (Tree of Life) farklı dallarının çözümlenmesi için devam etmektedir. Tipik bir moleküler filogenetik çalışması; analiz için hedef grupla (örn. aile) ilişkili ana kararı, temsil edici taksonun toplanmasını,



dizi bilgisinin edinimini ve filogenetik ağacın optimum kriterler kullanılarak yapılandırılmasını (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony veya Bayesian analizleri gibi) içerir. İyi bir filogenetik ağacın şekillenmesini optimize etmek için hem lokusların seçimi, hem de temsilci taksonun seçimi dikkatli bir şekilde yapılmalıdır (Tezcan, 2009).

### **1.2.3 Nükleer ribozomal Internal transcribed spacer (nrITS) bölgesi**

Nükleer ribozomal DNA (nrDNA)'nın internal transcribed spacer (ITS) bölgesi, baz değişimi açısından daha az fonksiyonel olması, cins ve cins altı bitki filogenisinin yeniden oluşturulmasında geniş bir kullanım alanı olmasıyla bilinir (Baldwin ve ark., 1995). ITS bölgesi angiosperm üyelerinde yaklaşık 565 – 700bp uzunluğunda iken, gymnosperm üyelerinde ise daha uzundur (1550 – 3125bp) (Gernandt ve Liston, 1999). Yüksek bitkilerde nükleer ribozomal RNA (nrDNA) genleri art arda gelen uzun tekrarlar oluşturur ve her biri 18S, 5.8S, 26S *single transcribed* bölgesi içerir. Bunlardan ikisi kısa internal transcribed spacer (ITS1 ve ITS2), biri ise uzun *external nontranscribed intergenic spacer* bölgesidir. ITS1 ve ITS2 ara halkaları, aile ve cins düzeyinde bitki filogenisinin yeniden düzenlenmesinde değer bir kaynak oluştururken, 5.8S ve ITS2 sekansları daha derin filogenetik düzeylerde bilgi sağlayabilir (Hershkovitz ve Lewis, 1996). ITS – 5.8S rDNA – ITS2 lokusu daha önceden farklı Orchidaceae gruplarındaki çalışmalarda kullanılmıştır; Cyripedioids (Cox ve ark., 1997), Orchideae (bateman ve ark., 1997; Pridgeon ve ark., 1997) ve *Platanthera* cinsi (Hapeman ve Inoue, 1997).

ITS bölgesi tabanlı filogenetik analizlerin Baldwin ve ark., (1995)' dan itibaren 2003 yılına kadar ne kadar popüler olduğunu göstermek amacıyla Alvarez ve Wendel, (2003) tarafından gerçekleştirilen sörvey çalışmasında, belirtilen yıllar arasında bitki filogenisi ile ilgili yayımlanan toplam 244 makalenin cins ve cins altı kategori çalışıldığı %66' lık kısmının tamamında ITS bölgesinin kullanıldığı ortaya çıkarılmıştır.

ITS bölgesinin çalışmalarda bu kadar yoğun kullanılmasının nedenlerinden en önemlileri şu şekilde sıralanabilir;

Her iki ebeveynden de gelen kalıtım; ITS sekanslarını her iki ebeveynden de gelen kalıtım bilgileri oluşturur, bu nedenle cpDNA' lara göre daha zengin içeriklidir. Daha

önceden yapılmış çalışmalar bu özelliğin hibrit belirlenmesinde ve poliploidilerde ebeveynlik hesaplamalarında ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (Baldwin, 1992; Baldwin ve ark., 1995; Kim ve Jensen, 1994; Rieseberg ve ark., 1990; Rieseberg ve Soltis, 1991; Rieseberg ve Wendel, 1993; Wendel ve ark., 1995).

Evrensellik; White ve ark., (1990) tarafından birçok bitki ve mantardan ITS bölgesinin çoğaltımı için kullanılabilen primer setleri yayımlanmıştır.

Basitlik; nükleer ribozomal genler, 18S – 5.8S – 26S bölgeleri içinde yaklaşık 10kb boyunca tekrar eden diziler şeklindedir. Bu tekrarlar bir veya birden fazla haploid kromozomda tekrar eder ve böylece bitki genomunda yüzlerce ve hatta binlerce rDNA tekrarları bulunur. Bunun sonucunda az bir tecrübe ile az örnekten kolay bir şekilde izolasyon yapılabilinmektedir. ITS bölgesinin kısa dizilerden oluşan sekansı bu bölgelerin PCR ile çoğaltılmasını kolaylaştırmaktadır (Alvarez ve Wendel, 2003).

### **1.3 Biyoinformatik**

Biyoloji ve enformasyon teknolojilerinin kombinasyonu olan biyoinformatik, büyük veri gruplarının bilgisayar analizleri ile ilişkilendirildiği bir bilim dalıdır. Ayrıca biyoinformatik, biyolojik veri gruplarının aralarındaki ilişkilerin analiz edilip belirlenmesi, istatistiksel araçların ve çözümlerin bulunması, veritabanı gelişimi ile veri taranması ve kaydedilmesi konularını da içermektedir.

Biyoinformatik terimi ilk defa 1990' larda kullanılmıştır ve DNA, RNA ile proteinlerin analizleri ve yönetimlerinin yeni nesil ismi olmuştur. Hesaplamaya dayalı sekans analiz araçları 1960' lardan beri kullanılabilmekteydi fakat sekans tekniklerinin gelişimi, sekans verilerine ulaşılabilecek veritabanlarının kurulumu ile birlikte hızlı bir gelişim göstermiştir. Günümüzde biyoinformatik terimi birçok farklı biyolojik veri ile ilişkili olarak kullanılmaktadır (Ör: gen ekspresyonu, protein etkileşimleri, protein yapılar).

Biyoinformatik sadece bilgisayar tabanlı bir bilim değildir fakat bilgisayarlar biyoinformatik bilimi için iki nedenle önemlidir; (i) birçok biyoinformatik probleminin milyonlarca defa tekrar edilmesi gereken durumların varlığı. Örneğin; her yeni bir sekansı,

veritabanında varolan sekanslarla karşılaştırmak için, (ii) bilgisayarlara problem çözme güçleri için ihtiyaç vardır. Örneğin; amino asit sekansı verilmiş bir protein için katlama yollarının oluşturulması gibi (Westhead ve ark., 2002).

Internet üzerindeki bazı biyoinformatik siteleri ve veritabanları:

<http://www.ebi.ac.uk> - The EMBL European Bioinformatics Institute

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> - National Center for Biotechnology Information

<http://www.expasy.ch> - Expert Protein Analysis System

<http://www.ddbj.nig.ac.jp> – DNA Data Bank of Japan

<http://www.embl-heidelberg.de> - European Molecular Biology Laboratory

<http://www.barcodinglife.org> – The Barcode Life Data Systems

<http://www.gmd.de/welcome.en.html> - German National Centre For Information Technology

<http://www.links.bmn.com> - The BioMedNet gateway

<http://hiv-weblanl.gov> – HIV Veritabanı

<http://www.sanger.ac.uk/pfam> - Protein Family Database

<http://www.rcsb.org/pdb> - Protein Data Bank

Eğer biyolojik veri bilgisayar programları tarafından kullanılacaksa, bu veriler bilgisayar tarafından okunabilen standart bir formatta sunulmalıdır. Verileri metin dosyalarının içine koymak oldukça yaygın bir yöntemdir bu şekilde veriler bilgisayar tarafından okunabildiği gibi insanlar tarafından da okunabilmektedir.

Birçok biyoinformatik veritabanı ve yazılımları sekans verileriyle çalışmak için tasarlanmıştır bu nedenle nükleik asit ve protein sekans bilgilerinin standart bir formatta girilmesi gerekmektedir. En yaygın olarak kullanılan üç sekans formatı; NBRF/PIR (National Biomedical Research Foundation/Protein Information Resource), FASTA ve

GDE' dir. Bu üç formatın herbiri sadece sekans verisini barındırmakla kalmaz, aynı zamanda sekans tiplerini tanımlamak ve ilave bilgiler girmek için imkan sunar (Örneğin: sekans analizi gerçekleştirilen canlı hakkında bilgiler, erişim numarası vb.). Hizalanmış (aligned) dosyaların formatları birçok farklı şekilde olabilmektedir. Yukarıda bahsedilen formatlar bu tür dosyalar için uygundur. Fakat hizalama işlemi için tasarlanmış başka özel formatlar da bulunmaktadır. MSF (multiple sequence format) birçok yazılımda kullanılmaktadır. PHYLIP (phylogenetic inference package), PHYLIP yazılımının hizalama formatıdır ayrıca CLUSTALW/X yazılımının da kendine özel ALN formatı bulunmaktadır (Westhead ve ark., 2002).

#### **1.4 Çalışmanın Amacı**

Çalışmamızın amacı, çok yönlü içeriğe sahip farklı disiplinlerin ortak bir sonuç oluşturmasının yanı sıra Kazdağı gibi dünya mirası bir biyolojik çeşitlilik kaynağının taşıdığı zenginliklerin açığa çıkarılmasını kapsamaktadır. Analiz edildiğinde Orchidaceae familyasının ve salep elde edilen üyelerinin dünya ülkeleri temelinde gerek tıbbi kullanımları gerek ekonomik getirileri gerek bitki taksonomisi açısından hibritleşmenin yoğun olduğu taksonları içermeleri, ayrıca yeryüzünde "Orkide Sevenler Derneği" gibi toplulukları kurducak ölçüde güzel çiçeklere sahip olmaları, üzerlerinde araştırma yapılacak değerleri taşıdıklarını ortaya koymaktadır. Keza, bu familya üyelerinin yeryüzünde yayılış alanlarının da çok geniş olması, insanoğlunun faydalanması açısından ayrıca bir önem oluşturmaktadır. Bu özelliklerin toplamı göz önüne alındığında yaşam çevremizi oluşturan Çanakkale – Kazdağı gibi üç farklı fitocoğrafik bölgenin kesişme ortamı olan, gerek stratejik ve gerek biyoçeşitlilik yönlerinden büyük öneme sahip olan bu alanda, bu bitkilerin özelliklerinin ortaya çıkarılmasının bir zorunluluk haline geldiği gerçeğine ulaşmaktayız. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızın amacı, araştırma sonuçlarımızın dünya literatüründe ilk kez yayınlanacak olması gibi başka bir ayrıcalık daha taşımaktadır. Kaldı ki bilimde ilerlemiş ülkelerin veri bankalarında bu familya üyelerinin filogenetik ağaçları oluşturulmakta ve sistematik kategorileri sürekli güncellenmektedir. Araştırma sonuçlarımızın bu kolektif çalışma sürecinde yararlı fonksiyonlara katkı sağlaması söz konusudur. Gelişmiş ülkelerin ekonomik aktivite işlemlerinde doğal kaynaklarından yararlanma yüzdeleri, gelişmekte olan ülkelere oranla

daha yüksek seviyelerdedir. Bunun sebeplerinden birisi, kendi ülkelerindeki biyolojik çeşitlilik elemanlarının envanterlerinin çıkarılmış olmasıdır. Ülkemizde henüz yeterli potansiyele ulaşmamış olan bitkisel biyolojik çeşitlilik envanterinin oluşturulmasında da çalışmamızın pozitif yönde katkıları olması açıkça ortaya çıkmaktadır. Tüm bunların yanı sıra çalışma objemizi oluşturan taksonların, ülkemiz yetkili kurumlarınca toplanması henüz yasak kapsamındadır. Ülkemizde Mart 2010 tarihli National Geographic dergisinden “Türkiye’ nin Nadir Çiçekleri Tehlike Altında” başlıklı yazıda, bu konu mercek altına alınmış ve Prof. Dr. Tuna EKİM’ in danışmanlığında birçok bilim adamının oluşturduğu bir komisyon tarafından hazırlanan “İnsan Tehidi Altındaki Nadir Çiçekler” adlı haritada *Orchis anatolica* 99, *Orchis tridentata* 101 kod numaraları ile insan tehidi altındaki nadir çiçekler kategorisi içerisinde gösterilmiştir (Bat ve diğ., 2010). Bu olgu da bu taksonların özenle korunması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Özet olarak vurgulamak gerekirse, ülkeler arası öneme sahip, biyolojik olarak da farklı taksonların bir arada görülebildiği, bitkisel açıdan bakıldığında da yeryüzünde büyük öneme sahip bir bitki grubunun üyelerinin ve de ülkemizde geleceği tehlike altında olan taksonların hemen hemen en son modern moleküler biyolojik teknikler ile araştırılıp orijinal verilerin sadece ülkemiz literatürüne değil tüm dünya literatürüne katkı sağlayacak bir araştırmanın gerçekleştirilmesi amacımızın özünü oluşturmaktadır.

Günümüz taksonomik çalışmaları genel anlamda dış morfolojik özelliklere dayanılarak gerçekleştirilmekte, ancak bu çalışmaların sitotaksonomi, kemotaksonomi ve moleküler taksonomi yöntemleri ile desteklenmesi düşüncesi yüksek oranda kabul görmektedir. Çok yakın bir geçmişte bilimsel araştırmalarda kullanılmaya başlanan ve günümüzde de gittikçe farklı canlılar üzerinde farklı yöntemler ile sonuç alınmasını kolaylaştıran barkodlama tekniği, taksonomi çalışmalarını en sağlam şekilde destekleyen bir yöntem olarak görülmektedir. Barkodlama tekniğinin faydaları irdelendiğinde; sistematikte hızlı, kesin ve kolay bir şekilde ve bitkinin (botanik çalışmalarında) tamamının elde edilemediği durumlarda tohum, kök, yaprak v.b. çok küçük bir parçasının kullanılarak (özellikle endemik ve tehlike altında olan türlerin tahrip edilmeden teşhisleri) tür düzeyinde teşhise olanak vermesi, morfoloji ve anatomi açısından benzer ve kolayca karıştırılabilen taksonların hataları tanımlamalarının düzeltilmesi ve filogenetik ağaçlarının yeniden oluşturulmasına imkan tanınması, yüksek oranda hibritleşme potansiyeline sahip olan orkide üyelerinin hibritlik derecelerinin belirlenmesi ve ebeveyn türlerinin

saptanmasında kullanılması ve gün geçtikçe daha fazla alanlarda kullanılabilir olduğu açıkça görülmektedir.

**BÖLÜM 2****ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Orchidaceae familyası üyeleri ile ilgili daha önceden yapılmış ve tez çalışması ile ilişkilendirilebilecek moleküler filogenetik, barkodlama ve moleküler taksonomik çalışmalarından bazılarına bu bölümde yer verilmiştir.

Cox ve ark. (1997), *Cypripedioideae* (Orchidaceae), 5 cinse ait 150 – 170 türün ilişkileri bakımından birçok taksonomik probleme konu olmuştur. Bu çalışmada 100' e yakın orkide türünün ribozomal ITS bölgesi sekanslanarak, parsinomi analizleri ile birlikte kendi içlerindeki ilişkiler araştırılmıştır. Çalışmanın sonucu her cinsin monofiletik olduğunu göstermiştir. *rbcL* verileri gibi, ITS sekansları da *Mexipedium* cinsinin *Phragmipedium* cinsi ile kardeş olduğunu ortaya koymuştur.

Aceto ve ark. (1999), bu çalışmada; *Orchis* ve bununla ilişkili *Aceras*, *Anacamptis*, *Neotinea*, *Ophrys*, *Platanthera* ve *Serapias* cinslerinin *ITS* bölgelerindeki varyasyonlar ve neden oldukları filogenetik ilişkiler karşılaştırılmıştır. Çalışma ile birlikte floral morfolojinin yüksek derecede değişken olduğu, şu anki genelleyici limitlerin oldukça yapay olduğu ortaya konulmuştur.

Cameron ve ark. (1999), Orchidaceae familyasının yaklaşık olarak tüm tribus ve subtribus kategorilerinden toplam 171 taksonun kladistik parsinomi analizleri, *rbcL* nükleotid sekans analizi ile incelenmiştir. Bu analizler sonucunda Orchidaceae familyası beş ana monofiletik klada bölünmüştür; *apostasioid*, *cypripedioid*, *vanilloid*, *orchidoid* ve *epidendroid* orkideler. Gelecekte yapılması muhtemel morfolojik ve moleküler çalışmalarda standart oluşturulabilmesi için kladogramlar bu çalışmada verilmiştir.

Douzery ve ark. (1999), bu çalışmada; Orchidaceae familyasının bir tribusu olan *Diseae* (Orchidoideae: Orchidaceae) ilk defa moleküler filogeni çalışması ile sunulmuştur. Nüklear ribozomun *ITS1*, *5.8S rDNA* ve *ITS2* sekansları, 30 *Diseae*, 20 *Orchideae*, 4

*Cranichideae* ve *Diurideae* grupları arasında karşılaştırılmıştır. Morfolojik karakterlerin, *ITS* filogenisi ile tanımlanan ve desteklenen gruplarla uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

Berg ve ark. (2000), bu çalışmada; Laeniidae (Orchidaceae) subtribusunun en iyi bilinen cinslerinden 295 aksesyon ile Pleurothallidinae, Coeliinae, Meiracylliinae, Blettiinae ve diğer dış gruplar için nükleer ribozomal ITS1 ve ITS2 DNA sekansları, filogenetik çalışmalar için kullanılmıştır. Çalışma sonucunda *Arpophyllum*, geriye kalan Laeliinae üyelerinin kardeşi olarak tanımlanmış, ayrıca *Meiracyllium* (Meiracylliinae), *Euchile* üyelerine yakın bir pozisyona yerleştirilmiştir.

Pellegrino ve ark. (2000), İtalya’ da, Sassano’ ya yakın bir bölgeden toplanan 16 bireylik küçük bir *Orchis x colemanii* popülasyonu, *O.mascula* ve *O.pauciflora* türlerinin doğal hibritidir. *O.x colemanii*, *O.mascula* ve *O.pauciflora* türlerinin, rDNA fragmentinin 18S ve 25S bölgelerini de içeren ITS1, 5.8s rDNA ve ITS2 bölgeleri PCR tekniği ile çoğaltılıp ribozomal fragmentleri sekanslanmıştır ve dot blot analizi yapılmıştır. Böylece hibrit türde, atasal bireylere ait genetik materyalin hangi oranlarda bulunduğu ortaya çıkarılmıştır.

Kores ve ark. (2001), çalışmada *matK* ve *trnL-F* plastid bölgelerinin DNA sekanslaması sonucunda elde edilen veriler *Diurideae* grubunun filogenetik analizinde kullanılmıştır ve *Diurideae* grubunun günümüzde bilinen sınırlar dahilinde monofiletik olmadığı sonucuna varılmıştır. Sekans bazlı veriler eşliğinde oluşturulan filogenetik ağaçlar, bazı morfolojik karakterlerin daha önce sınıflandırmada kullanıldığını göstermektedir (Ör: depo organları, anter pozisyonları, yetiştirme alışkanlıkları, fungal simbiyozları, polinasyonları v.b.). Çalışmanın sonucunda, gelecekte yapılacak olan moleküler çalışmalar ile filogenetik ilişkilerin tekrar değerlendirilebileceği vurgulanmıştır.

Pridgeon ve ark. (2001), bu çalışmada; Pleurothallidinae (Epidendreae: Orchidaceae) subtribusunun evrimsel ilişkilerini incelemek amacıyla 18 taksonun nükleer ribozomal DNA’ larının internal transcribed spacer (ITS1 ve ITS2) ayrıca 5.8S geni sekanslanmıştır. Çalışmada doğruluğu arttırmak için ayrıca *matK*, *trnL* intronu, ve *trnL-F* intergenic spacer bölgeleri de sekanslanmıştır. Çalışmanın sonucunda Pleurothallidinae subtribusunun monofiletik bir grup olduğu önemle vurgulanmıştır.



Soliva ve ark. (2001), bu çalışmada cinsiyet ayrımı bakımından aldatıcı olan *Ophrys* (Orchidaceae) taksonlarının ana soylarının filogenetik analizleri yapılmıştır. Bu analizlerde yol gösterici olarak ribozomal DNA' sının *ITS* (Internal transcribed spacer region) bölümü ile kloroplast DNA' sının *trnL – trnF* bölümleri sekanslanmıştır. Çalışma, *Ophrys* cinsinin *Euophrys* ve *Pseudoophrys* olarak iki ana gruba ayrıldığını desteklemiştir.

Alvarez ve Wendel (2003), çalışmada; bitkilerde cins ve cins ötesi seviyelerde filogenetik ifade için en popüler sekans dizilerinden birinin, nükleer ribozomal sistrunun 18S-5.8S-26S bölgesinde bulunan Internal Transcribed Spacer (ITS) 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.

Sonnate (2003), bu çalışmada *Lens culinalis* subsp. *culinaris* taksonunun ve ayrıca yabancı akrabalarının nrDNA' sının ITS bölgesi, çoğaltılmış, nükleotid sekans varyasyonları bakımından analiz edilmiştir. Filogenetik analizler desteklemiştir ki; *L. nigricans*, , diğer türlerden ayrılmıştır. Bu çalışmaya göre, sıklıkla çalışılan iki tür olan *L. lamottei* ve *L. tomentosus* türleri, diğer türlerden ayrılmıştır.

Tsai ve ark. (2004), bu çalışmada Tayvan' da bulunan 12 *Dendrobium* türünün genetik ilişkileri, nrDNA' nın 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.

Chase ve ark. (2005), karasal bitki formlarında DNA barkodlama problemlidir; çünkü alglerde, hayvanlarda ve mantarlarda kullanılan DNA bölgeleri, bitkilerde düşük derecede varyasyon özelliğine sahiptir. Barkodlama tekniğinin sistematikte kullanılabilmesi için, sekanslanacak genin yüksek varyasyon özelliğine sahip olması

gerekmektedir. Bu çalışmada plastid DNA' sının *psbA – trnH* ve *ITS* bölgelerinin sekanslamada kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Devos ve ark. (2005), bu çalışmada *Dactylorhiza fuchsii*, *D.saccifera*, *D.foliosa* ve *D.maculata* türlerinin nuklear ribozomal DNA' larının *ITS* (*Internal transcribed spacers*) ve *ETS* (*External transcribed spacers*) bölgeleri sekanslanmıştır. *Diploid* olan *D.fuchsii* ve *otopoliploid* olan *D.maculata* türlerinin DNA *polimorfizmleri* bu çalışma ile açığa çıkarılmıştır. Filogenetik ağaçların tekrar oluşturulabilmeleri için parsinomi ve Bayesian analizleri yapılmıştır.

Gulyas ve ark. (2005), Carpatho – Pannonian bölgesinde *Ophrys holubyana* Andrasovzskiy (Orchidaceae) türünün hibrit kökenli olduğuna inanılır. Türün hibrit kökenli olduğu birçok araştırmacı tarafından kabul edilmesine karşın bu hipotezi destekleyecek herhangi bir moleküler kanıt bulunamamıştır. Bu çalışmada *Ophrys holubyana* türü ile birlikte *Ophrys fuciflora* (Cr.) Rchb. ve *Ophrys bicornis* Sadler ex. Nendtvich türlerinin de nrDNA ITS bölgeleri sekanslanmıştır. Carpatho – Pannonian bölgesindeki hemen hemen bütün türler örneklenmiş ve *Ophrys holubyana*, *Ophrys fuciflora* ve *Ophrys bicornis* türlerinin nrDNA ITS sekansları verilmiştir. Çalışmanın sonucunda *Ophrys holubyana* türünün nrDNA ITS bölgesinin, *Ophrys* sistematigi ve filogenisi ayrıca hibrit bölgeleri ve derecelerinin belirlenmesinde kullanışlı olduğu belirtilmiştir.

Kress ve ark. (2005), DNA barkodlaması; biyoçeşitlilik çalışmaları, juvenil bireylerin teşhisleri, cinsiyet belirlenmesi ve adli tıp uygulamalarında kullanılmaktadır. 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 nuklear *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.

Sass ve ark. (2007), bu çalışmada kloroplast bölgeleri, kloroplast *psbA – trnH* ve nuklear ribozomal internal transcribed spacer (nrITS) bölgeleri, *Cycadales* üyelerinin araştırılması için çoğaltılmıştır. Amplifikasyonun kolaylığını, evrensel primerlerle dizi

üretimini ve reaksiyon şartlarını, önerilen her yedi marker için belirtilmiştir. Buna karşın önerilen hiçbir marker, test edilen hiçbir tür için eşsiz bir tamamlayıcı sağlamamıştır. Dizileme zorlukları nrITS için bir dezavantaj olsa da, nrITS bölgesi, değişkenliği bakımından en umut verici tanımlayıcı olarak belirtilmiştir.

Barret ve ark. (2008), *rbcL*; birçok bitkinin filogenetik çalışmalarında ve parazitik bitkilerin evrimsel gelişim çalışmalarında sıklıkla kullanılan geniş bir alt ünite genidir. Bu çalışmada sekiz *Corallorhiza* türünün *rbcL* geni sekanslanmıştır. *rbcL* geninin filogenetik çalışmalarda kullanılabilirliğinin, 400' den fazla çalışma ile desteklendiği, bu çalışmada ortaya konmuştur.

Kress ve Erickson (2008), araştırmacılar bu çalışmada DNA barkodlama tekniğinin, genomik tabanlı araştırmalarda kullanılmalarının bir tesadüf olmadığını, DNA barkodlarının ve genomiklerin, geleneksel disiplinlerin ötesinde yeni sorulara cevap verebildiğini belirtmektedir. Standartlaştırılmış kısa DNA sekanslarından oluşan DNA barkodlarının, gezegen üzerinde bütün türlerde karakterize olabileceği, araştırmacılar tarafından göz önüne serilmektedir. Araştırmacılara göre DNA barkodunu oluşturacak bölgenin (1) tür seviyesinde genetik varyabilite ve farklılaşma içermesi, (2) universal primerlerin bağlanabileceği bölgeler içermesi, (3) DNA izolasyonu ve çoğaltılması için elverişli ve kısa olması gerektiği vurgulanmaktadır.

Lahaye ve ark. (2008), Genetik materyalin kısa fragmentlerinin sekansı, DNA barkodlaması olarak adlandırılmaktadır. 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 kullanılabilmesi belirtilmiştir. Bu çalışmada, 1000' den fazla takson içeren Mesoamerican orkidelerinin *matK* genlerinin barkodlanması yer almıştır.

**BÖLÜM 3****MATERYAL VE YÖNTEM****3.1. Materyal ve Laboratuvar Donanımları****3.1.1 Laboratuvar donanımları**

Tez çalışmasında kullanılan laboratuvar donanımları Çizelge 3' te verildiği gibidir.

**Çizelge 3:** Tez çalışmasında kullanılan laboratuvar donanımları listesi

<b>Donanım</b>	<b>Marka / Model</b>
Mikrosantrifüj	Eppendorf Minispin Plus
Manyetik karıştırıcı	Yellowline MST Basic TC1
UV Transilluminator	UVP
Elektroforez	Atto AE-6125 Agarose EP Kit + Atto AE-8150 Mypower 500 Güç kaynağı
Su banyosu	Memmert W14
Mikropipetler	1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl Thermo Scientific, Finnpiette F1
PCR Cihazı	Bio-Rad PTC-200 DNA Engine Cycler
Hassas terazi	Denver TP2014
Otoklav	MLS-2420U
Fotoğraf makinesi	Olympus Camedia C5060 + UV Filter
Derin Dondurucu	Arçelik 2031D
Sekans analiz cihazı	ABI 3130

**3.1.2 Kimyasal malzemeler, sarf malzemeler ve kitler**

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler, sarf malzemeler ve kitler Çizelge 4’ te verildiği gibidir. DNA izolasyonunda 1X TE, elektroforezde ve agaroz jel hazırlanması sırasında 1X TAE tampon çözeltileri kullanılmıştır.

Liyofilize durumdaki primerlerden çalışma çözeltisi (working solution) hazırlanması için; primer sertifikalarında belirtilen yoğunluk değerlerinin 10 katı kadar saf su eklenerek 10X’ lik stok primer çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra 10µl 10X’ lik stok primer çözeltisine 90µl saf su eklenerek 100µl 1X çalışma çözeltisi (working solution) hazırlanmıştır.

**Çizelge 4:** Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler, sarf malzemeler ve kitler

<b>Malzeme</b>	<b>Marka / Model</b>
Genomik DNA izolasyon kiti	Fermentas – K0512
High Fidelity PCR enzim karışımı	Fermentas – K0192
dNTP set	Fermentas – R0181
Agaroz	Prona – HS8012
PCR saflaştırma kiti	Fermentas – K0701
Jel izolasyon kiti	Fermentas – K0691
DNA Marker (1kb)	Fermentas – SM0313
Tris	Applichem – A5097.0250
EDTA	Applichem – A5097.0250
PCR tüpleri	Clp – 3423.S.X, 0.2ml
Mikropipet uçları	Thermo Finnpiptette 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl
Ethidium Bromide	Applichem – A1151.0005
Primerler	Thermo – 0.2mmol

### **3.1.3 Bitki materyali**

#### **3.1.3.1 *Orchis anatolica* BOISSIER**

**Sinonimleri:** *Orchis anatolica* var. *taurica* REICHENBACH fil., *Orchis anatolica* var. *kochii* BOISSIER, *Orchis rariflora* K. KOCH.

##### **a) Yetiştirme ortamı**

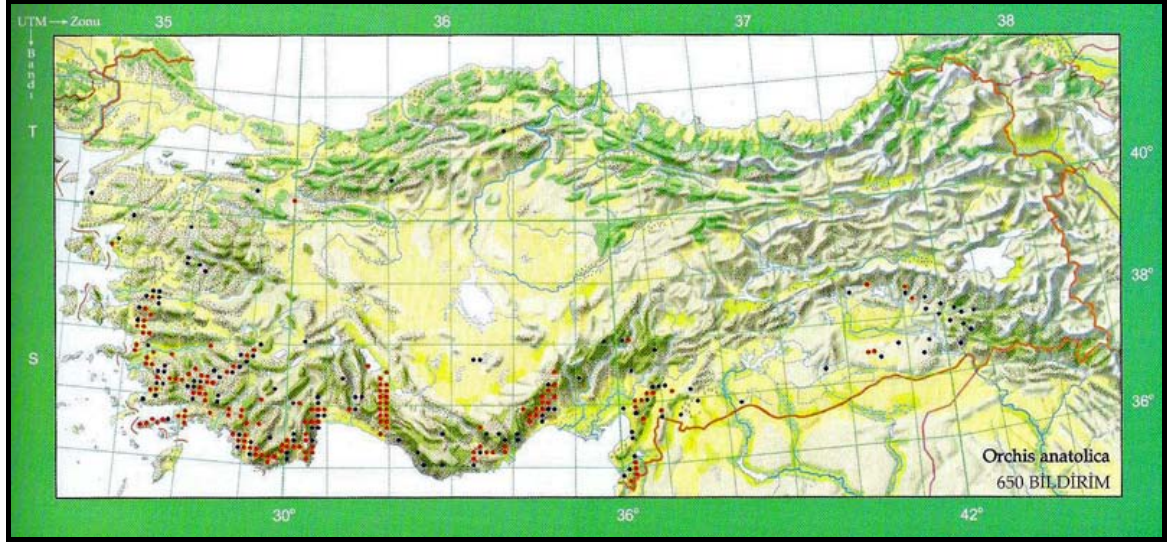
*Orchis anatolica* seyrek Çam ormanları, çorak araziler, çalılıklar ve makilikler içerisindeki gölgeli yetiştirme ortamlarını tercih ederler. Genellikle buralarda kuru, alkali veya hafif asidik topraklarda bulunur. Düz alanlardan alçak montan yükselti basamağına (1600m) kadar dikey yayılım gösterebilmektedir. Yatay yayılımı ise Girit Adası'ndan, Ege Adaları ve Türkiye üzerinden İran, Suriye, Lübnan ve Kuzey İsrail'e kadardır. Kıbrıs'ta da bulunur. Türkiye'de Ege, Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgesi'nde bulunur. Yerel adı "damartarlık, dildamak, diliçikrık" olarak bilinmektedir

##### **b) Çiçeklenme zamanı**

Yükseltiye göre Mart ayının sonundan, Mayıs ayının sonuna kadardır.

##### **c) Hibritleri**

*Orchis mascula* subsp. *mascula* ile olanaklıdır (Kreutz, 2009).



**Şekil 1:** Türkiye’ de *Orchis anatolica* Boiss. türünün yayılışı (Kreutz, 2009).



**Şekil 2:** *Orchis anatolica* Boiss (özgün).

**3.1.3.2 *Orchis tridentata* SCOPOLI**

**Sinonimleri:** *Neotinea tridentata* (SCOPOLI) R.M. BATEMAN, PRIDGEON & M.W. CHASE, *Orchis variegata* ALLIONI, *Orchis tridentata* subsp. *variegata* (ALLIONI) REICHENBACH fil..

**a) Yetiştirme ortamı**

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

Yükseltiye bağlı (dikey yayılışı) kıyından 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.

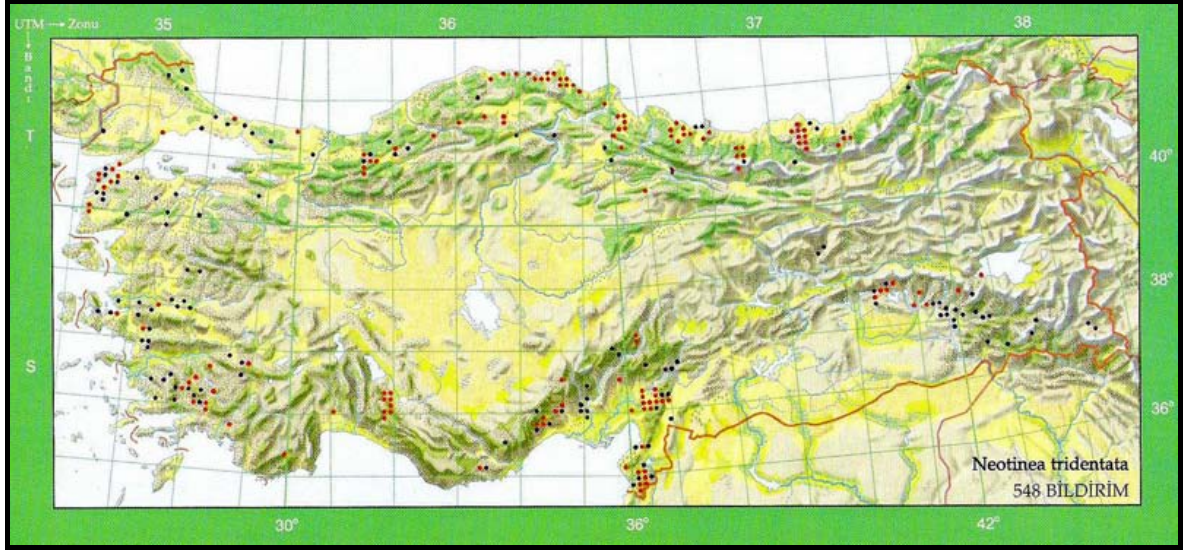
**b) Çiçeklenme zamanı**

Deniz seviyesinde Nisan ayının başından Karadeniz' de dağlık alanlarda Haziran ayının ortasına kadardır.

**c) Hibritleri**

Ortaya konamamıştır (Kreutz, 2009).



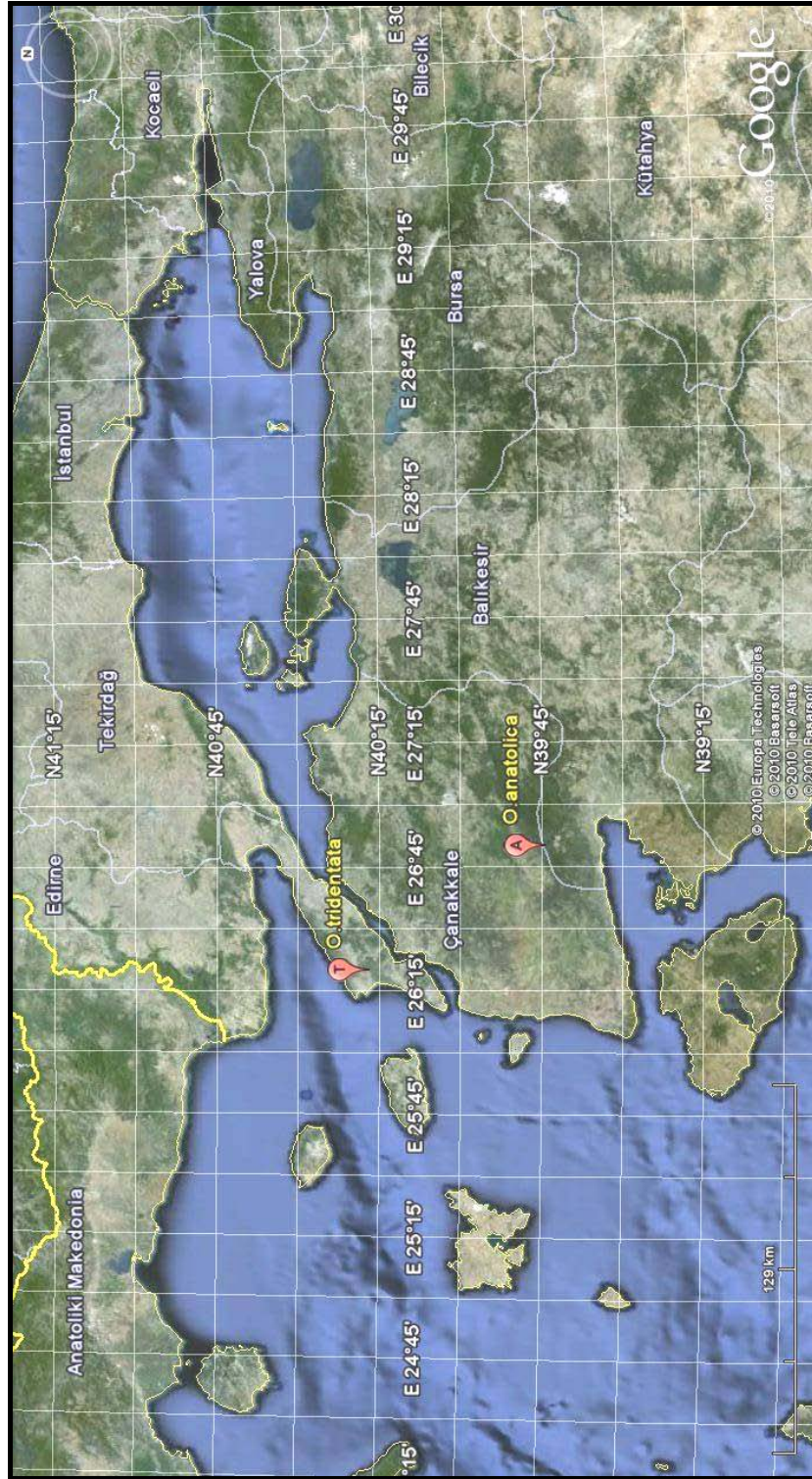


**Şekil 3:** Türkiye’ de *Orchis tridentata* Scopoli. türünün yayılışı (Kreutz, 2009).



**Şekil 4:** *Orchis tridentata* Scopoli (özgün).





Şekil 5: Tez çalışmasında kullanılan *Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* taksonlarının toplandıkları lokasyonlar.

### 3.2 Yöntem

#### 3.2.1 Bitki materyallerinin toplanması, teşhisi ve DNA izolasyonuna kadar muhafazası

*Orchis anatolica* türü için daha önceden türün yayılışını belirlediğimiz Kazdağı – Ayazma (Çanakkale) lokasyonuna arazi çalışması düzenlenmiştir ve bitki 29-04-2010 tarihinde, 39°44'37.40"N - 26°50'30.30"E koordinatlarından, 527m yükseklikte toplanmıştır. Habitat özellikleri bakımından bölge, seyrek *Pinus nigra* ormanı içerisinde yarı gölgeli ve kayaçlı olarak tanımlanmıştır. Bitkinin bulunduğu bölgede *Cistus creticus* ve *Thymus serpyllum* türlerinin de bulunduğu gözlenmiştir.

*Orchis tridentata* türü için Gelibolu Yarımadası Büyükanafarta Köyü (Çanakkale) girişinde, 40°17'0.54"N - 26°20'10.16"E koordinatlarından, 85m yükseklikten toplanmıştır. Bitkinin bulunduğu bölge kayaçlı, tam güneş gören, *Quercus coccifera*, *Thymus serpyllum* ve *Cistus cinensis* türlerinin yoğun bir şekilde yayılış gösterdiği bir bölgedir. Ayrıca bu orkide türünün Kazdağı – Ayazma lokasyonunda, *Orchis anatolica* türü ile birlikte bulunduğu tarafımızca gözlenmiştir.

Türlerin teşhisi, ilgili flora ve monograflar kullanılarak yapılmıştır (Komarov ve diğ., 1968; Tutin ve diğ., 1980; Renz, 1984; Renz ve Taubenheim, 1984; Sezik, 1984; Delforge, 1995, 2006; Kreutz, 1998, 2000; Kreutz, 2009; Buttler, 2007).

Teşhis edilen bitkilerden *Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* türlerinin DNA izolasyonuna kadar muhafazaları silika – jel yöntemi ile yapılmıştır. Taze örneklerden kesilen yeşil gövde yaprakları kurutma kağıdından yapılmış zarfların içerisine konularak plastik poşetlere konulmuş ve bu poşetlere toplam yaprak ağırlığının 10 katı kadar silika – jel ilave edilerek hava almayacak şekilde ağzı kapatılmıştır. Böylece hızlı ve etkin bir şekilde kurutma sağlanarak bitki yapraklarındaki DNA yapısı bozulmadan izolasyon sürecine kadar saklanmıştır.

### **3.2.2 Bitki örneklerinin homojenizasyonu ve DNA izolasyonu**

Bitki örneklerinin homojenizasyonu sıvı azot ile şok dondurma ve daha sonra steril porselen havanlarda mekanik ezme yoluyla yapılmıştır. Toz haline getirilen bitki örnekleri eppendorf tüplerine alınarak üzerlerine 200µl 1X TE tampon çözeltisi eklenmiştir.

Toz haline getirilerek homojenize edilmiş bitki örneklerinin DNA izolasyonu Fermentas firmasının “Genomic DNA Isolation Kit (Fermentas – K0512)” isimli ürünü ile üretici firmanın yayımladığı protokole göre gerçekleştirilmiştir. İki bitki türü için üç tekrarlı olarak toplam altı izolasyon yapılmıştır. İzole edilmiş DNA örnekleri eppendorf tüplerinde +4° C’ de muhafaza edilmiştir. İzolasyon sonrası yapılan elektroforez fotoğrafına bulgular bölümünde verilmiştir.

### **3.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

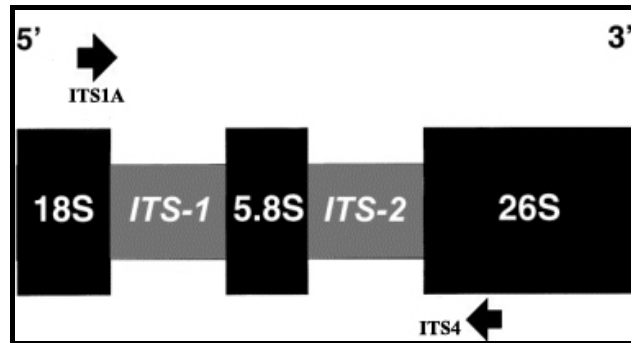
PCR uygulamaları Bio-Rad marka thermal cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon bileşenleri ve miktarları Çizelge 5’ te verildiği gibidir. PCR reaksiyonu Fermentas marka “High Fidelity PCR Enzym Mix” (Fermentas – K0192) ile kurulmuştur. PCR doğruluğunu arttırmak için reaksiyon iki tekrarlı olarak hazırlanmıştır. Kullanılan bitkilerin genomik DNA’ larındaki ITS1, 5.8s rDNA ve ITS2 bölgelerinin çoğaltılması için White ve diğ., 1990 tarafından tasarlanan ITS1A (ileri) ve ITS4 (geri) primerleri kullanılmıştır. ITS1 ve ITS2 bölgeleri herhangi bir protein kodlamazken, 5.8S bölgesi protein kodlayan bir bölgedir. Primer dizileri Çizelge 6’ da verilmiştir. Primerlerin ilgili DNA bölgesindeki yerleşimi Şekil 6’ da şematize edilmiştir.

**Çizelge 5:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu için hazırlanan karışım miktarları

Standart Miktarlar (25 µl' lik karışım)	3 Tekrarlı 2 Bitki Örneği (6X karışım + 1X yedek)
2,5µl dNTP	17,5µl dNTP
2,5µl PCR Master Mix (MgCl <sub>2</sub> )	17,5µl PCR Master Mix (MgCl <sub>2</sub> )
1,0µl İleri Primer (ITS1A)	7µl İleri Primer (ITS1A)
1,0µl Geri Primer (ITS4)	7µl Geri Primer (ITS4)
0,25µl Enzim (Her bir reaksiyon için)	1,75µl Enzim
2,5µl kalıp DNA	17,5µl kalıp DNA (toplam)
15,25µl saf su	106,75µl saf su
Toplam hacim 25µl	Toplam hacim 175µl

**Çizelge 6:** PCR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri

Primer Adı	Dizi
ITS1A (18 baz)	5'-GACGTCGCGAGAAGTCCA- 3'
ITS4 (20 baz)	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3'

**Şekil 6:** PCR uygulamasında kullanılan primerlerin genomik DNA' da ilgili bölgelere yerleşimi (<http://pisum.bionet.nsc.ru/pg/32/42.htm> adresinden değiştirilerek).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu karışımının hazırlanması sırasında reaksiyonun istem dışı başlamasını engellemek için PCR tüpleri buza gömülmüş ve enzim, karışıma en son eklenmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için oluşturulan PCR profili Çizelge 7' de verilmiştir.

**Çizelge 7:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu profili

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

Toplam 35 döngüden oluşan PCR süresi yaklaşık 2 saat 35 dakika olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonrası örnekler elektroforez işlemine kadar -20° C' de muhafaza edilmiştir. PCR sonrası yapılan elektroforez sonuçlarına bulgular bölümünde yer verilmiştir.

### 3.2.4 Agaroz jel elektroforezi

DNA izolatları ve PCR ürünleri %1' lik agaroz jel (Prona – HS8012) elektroforezi ile ayrılmış ve UVP marka ultraviolet transilluminator tablasında görüntülenerek Olympus Camedia C5060 fotoğraf makinesi ile fotoğraflanmıştır.

DNA izolatlarının agaroz jel elektroforezinde küçük elektroforez tankı kullanılmıştır. 0,5g agaroz jel, 50ml 1X TAE tampon çözeltisi içerisinde, 150° C' de eritilmiştir. Jel sıcaklığı yaklaşık 50° C seviyelerindeyken 4µl Ethidium Bromide eklenmiştir. Jel

katılaşmadan, içine tarak yerleştirilmiş olan jel tepsisine dökülmüştür. Jel oda sıcaklığında katılaştıktan sonra içerisinden tarak çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirilmiştir ve üzerine jel seviyesini geçecek kadar 1X TAE tampon çözeltisi ile doldurulmuştur.

PCR ürünlerinin yürütüldüğü büyük elektroforez tankı için 2g agaroz jel, 200ml 1X TAE tampon çözeltisinde 150° C’ de eritilmiştir. Yaklaşık 50° C’ ye soğuyan jele 8µl Ethidium Bromide eklenmiştir. Jel katılaşmadan, içine tarak yerleştirilmiş olan jel tepsisine dökülmüştür. Jel oda sıcaklığında katılaştıktan sonra içerisinden tarak çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirilmiştir ve üzerine jel seviyesini aşacak kadar 1X TAE tampon çözeltisi ile doldurulmuştur.

DNA izolatları ve PCR ürünleri kuyucuklara yüklenirken 5µl örnek, 1µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılmıştır. Elektroforezde marker olarak 5µl 1kb DNA ladder (Fermentas – SM0313) kullanılmıştır.

DNA izolatlarının yürütüldüğü küçük tank için 110V / 30dk., PCR ürünlerinin yürütüldüğü büyük tank için 130V / 60dk. elektroforez şartları sağlanmıştır.

Elektroforez sonuçları U.V. tablasında Olympus Camedia C5060 fotoğraf makinesi ile U.V. filtre kullanarak fotoğraflanmıştır.

### **3.2.5 DNA dizileme**

DNA dizileme işlemi için örnekler saflaştırma yapılmaya gerek duyulmadan, PCR tüplerinde REFGEN firmasına gönderilmiştir. ABI 3130 model sekans cihazının kullanıldığı dizileme işlemi için PCR’ da kullanılan primerler ile çift yönlü okuma yapılmıştır.

Dizileme sonucunda elde edilen çift yönlü diziler üst üste bindirilip başta ve sonraki fazlalıklar kesmiş ve herhangi bir hata olup olmadığı kontrol edilmiştir.

### **3.2.6 Biyoinformatik çalışmalar**

#### **3.2.6.1 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)**

Bir gen veya protein sekanslandıktan sonra, çoğu zaman homolog veya benzer olanlarını bulma yoluna gidilir. 1990 yılında Altschul ve çalışma arkadaşları tarafından BLAST: Basic Local Alignment Search Tool geliştirilmiştir. BLAST algoritması, sekans sorgusunu küçük fragmentlere veya kelimelere böler ve veritabanındaki sekanslarla yakınlık eşleştirmesi yapar. Eğer bu kısa fragmentlere uygun eşleşme bulunursa, iki yönlü olarak uzatılarak tam bir alignment (hizalama) yapılır (Salemi ve Vandamme, 2004). Bu tekniklerle BLAST, herhangi bir protein veya gen sekansını, kendisine en yakın örnekle eşleştirme yoluna giderek bir liste oluşturur.

Tez çalışmasında elde edilen *Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* türlerinin sekans verileri ayrı ayrı olarak NCBI internet sitesindeki BLAST uygulaması kullanılarak, en yakın eşleşme olan Orkide türleri bulunmuş, bu listeden seçilen Orkide türleri ile birlikte filogenetik ağaç oluşturma yoluna gidilmiştir.

BLAST parametreleri olarak “Nucleotide collection” veritabanı, optimizasyon olarak “Highly similar sequences (Megablast)” seçeneği işaretlenmiştir.

#### **3.2.6.2 Alignment (Hizalama)**

BLAST sonucunda elde edilen, sekans açısından birbirine yakın olan türlerin benzerliklerinin karşılaştırılabilmesi ve demonstre edilebilmesi için çeşitli tekniklerin kullanıldığı bir hizalama programı gerekmektedir (Multiple Alignment Tool). Tez çalışmasında kullanılmak üzere EBI (European Bioinformatics Institute) internet sitesindeki CLUSTALW2 adlı yazılımdan yararlanılmıştır. Alignment sırasında standart (default) ayarlar kullanılmıştır ve sonuçlar CLUSTAL formatında kaydedilmiştir.



### 3.2.6.3 MEGA 4 (Stable) (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

MEGA programının birçok beta sürümü bulunmasına karşın, bu sürümlerde oluşturulan filogenetik ağaçların makalelerde kullanılmaması gerektiği, uygulamanın internet sitesinde belirtilmektedir. Bu sebeple bu tez çalışmasında MEGA 4 (Stable) sürümü kullanılmıştır.

CLUSTAL formatındaki hizalama dosyası MEGA 4 uygulaması ile açılıp, bu dosya MEGA formatına dönüştürülerek, filogenetik ağaç oluşturabilmek için uygun duruma getirilmiştir.

*Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* türleri ile birlikte, 16 Orkide taksonunun daha hizalandığı dosya, MEGA 4 ile açılıp öncelikle “distance matrix” hesaplanmıştır. Distance matrix parametreleri şu şekildedir;

Data type:	Nucleotide
Analysis:	Pairwise distance calculation
Compute:	Distance only
Model:	Maximum Composite Likelihood (Tamura ve Kumar, 2004)
Pattern among lineages:	Homogenous
Rates among sites:	Uniform rates
Gaps / Missing data:	Complete deletion
Substitution to include:	Transition + Transversions

Daha sonra *Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* türlerini içeren toplam 18 Orkide taksonunu içeren bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik ağaç parametreleri şu şekildedir;

Data type:	Nucleotide
Analysis:	Phylogeny reconstruction
Tree inference method:	Neighbour – Join (Saitou ve Nei, 1987)
Test:	Bootstrap (500 replications, 24054 seeds) (Felsenstein, 1985)

Gaps / Missing data: Complete deletion

Model: Maximum Composite Likelihood (Tamura ve Kumar, 2004)

Substitution to include: Transition + Transversions

Pattern among lineages: Homogenous

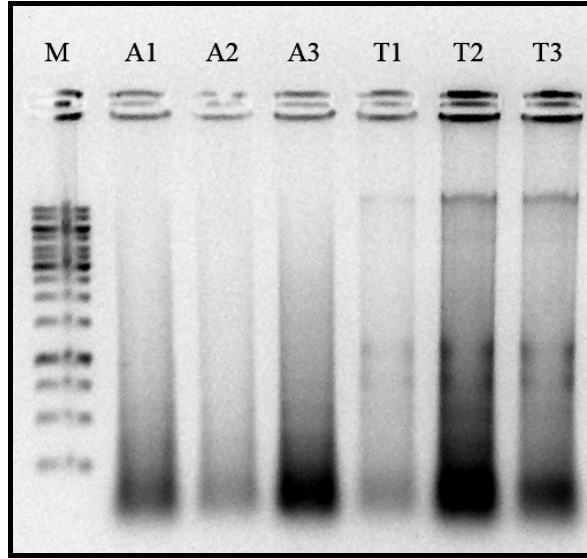
Rates among sites: Uniform rates

## BÖLÜM 4

## ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

## 4.1 Araştırma Bulguları

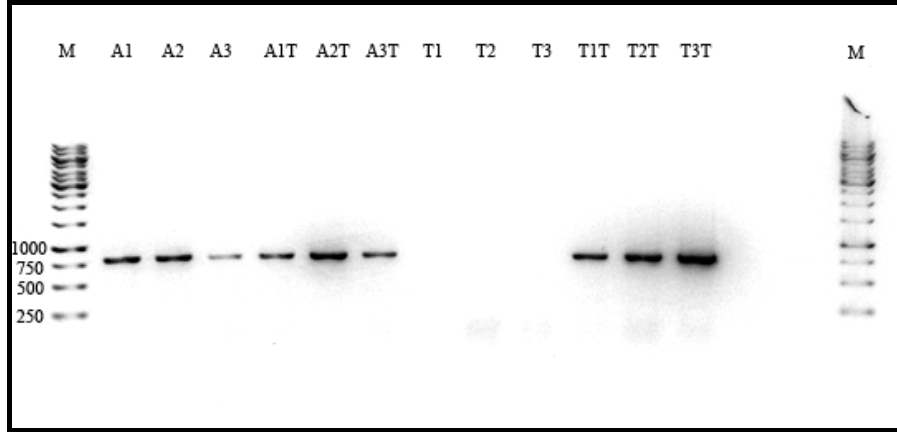
## 4.1.1 DNA izolasyonu bulgularına ilişkin elektroforez görüntüleri



**Şekil 7:** *Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* taksonlarının DNA izolasyonu bulguları (A1, A2 ve A3: *Orchis anatolica*, T1, T2 ve T3: *Orchis tridentata*, M: 1kb Marker).

DNA izolasyonu sonucunda uygulanan elektroforez görüntüsünde; ilk kuyucukta DNA marker, devamında ise sırayla *Orchis anatolica* (A1, A2 ve A3 olmak üzere 3 tekrarlı) ve *Orchis tridentata* (T1, T2 ve T3 olmak üzere 3 tekrarlı) bulunmaktadır. Elde edilen görüntüde, DNA kalite ve miktarının çalışmanın devamı için yeterli miktarda olduğunu göstermiştir.

#### 4.1.2 PCR bulgularına ilişkin elektroforez görüntüleri



**Şekil 8:** *Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* taksonlarının PCR bulguları (A1, A2 ve A3: *Orchis anatolica* birinci tekrar, A1T, A2T ve A3T: *Orchis anatolica* ikinci tekrarı, T1, T2 ve T3: *Orchis tridentata* birinci tekrarı, T1T, T2T ve T3T: *Orchis tridentata* ikinci tekrarı, M: 1kb Marker).

Her iki bitki türünden elde edilen 3' er tekrarlı DNA izolasyon sonuçlarına göre yapılan PCR sonucunda elde edilen elektroforez görüntüsünde, DNA dizileme için en uygun olan sonuçların A2T ve T3T etiketli kuyucuklar olduğu gözlemlenmiştir. PCR sonucunda çoğaltılan bölge ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgelerinin yanı sıra kısmen 18S ve 26S bölgelerini de içermektedir. Bu nedenle çoğaltılmış olan PCR ürününün büyüklüğünün yaklaşık 760bp olduğu görülmektedir.

#### 4.1.3 DNA dizileme

PCR ürünlerinden elde edilen elektroforez görüntüsüne herhangi bir saflaştırmaya gerek duyulmadan REFGEN firmasına gönderilerek dizilenmiştir. Çift yönlü okunan dizileme sonuçları SEQUENCHER 4.1.4 programı ile üst üste bindirilerek hem başta ve sondaki okunmayan bölgeler atılmış hem de dizilemenin doğruluğu kontrol edilmiştir. Bitkilerde varyasyon gösterebilen ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgesinin uzunluğu *Orchis*

*anatolica* türünde 636bç, *Orchis tridentata* türünde ise 629bç olarak belirlenmiştir. *Orchis anatolica* taksonuna ait G+C içeriği istatistiksel anlam değeri 0,5126, *Orchis tridentata* için ise G+C içeriği istatistiksel anlam değeri 0,4642 olarak hesaplanmıştır.

#### 4.1.3.1 BLAST ve ALIGNMENT bulguları

#### 4.1.3.2 *Orchis anatolica* türüne ait bulgular

*Orchis anatolica* türünün ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölge sekansı National Center for Biotechnology Information (NCBI) kurumuna gönderilerek, “HQ657131” benzersiz erişim numarası (accession number) alınmıştır.

NCBI sitesinde BLAST (BLASTN 2.2.24+) (Zhang ve ark., 2000) işlemi uygulandığında, *Orchis mascula* türü ile en yakın benzerlik gösterdiği izlenmiştir. Benzerlik değerleri ve hizalama karşılaştırması Şekil 9’ da verilmiştir. Benzerlik yüzdesi 604 / 644 (%94), oluşan gap sayısı 9 (%1) ve toplam puan 959 olarak hesaplanmıştır.

```

Score = 959 bits (519), Expect = 0.0
Identities = 604/644 (94%), Gaps = 9/644 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   TCGAGACCCCTAAAGAGATCGAGTGATTGGACAACCTTTGTAACACTTTTAGCAGCACATTA 60
Sbjct 1   TCGAGACCCCTAAAGAGATTGAGCGATTGGACAACCTTTGTAACACTTTTAGCAGCACATTA 60

Query 61  ATGGTGCCGTGCACCCGTCCATTTGCTGCATGAAGAACCCTGATGGGTGCATGTTGCAGGC 120
Sbjct 61  AAGGTGCCGCACACCCGTCCATTTGCTGCATGAAGAACCCTGATGGGTACATGTTGCAGGG 120

Query 121 GGAGGGGAGATCCATTTCGGCGCAGCTTTGCGTCAAGGAAATACGCAGCATGAGCGGACT 180
Sbjct 121 GGAGGGGAGATCAATTTCGGCGCAGCTTTGCGTCAAGGTAATACGCAGCATGAGCGGACT 180

Query 181 TTCAACC---A--TTCAAAGCAATTTGTTTGGGGAGTTGTTGTTTGC.TCCGAAAGAGT 234
Sbjct 181 TTCAACCATATATCTCAAAGCAATTTGTTTGGGGAGTTGTTGTTTGC.TCCGAAAGAGT 240

Query 235 TGTAGGGCTCTCGGCAATGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGAGCGAAATG 294
Sbjct 241 TGTAGGGCTCTCGGCAATGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGAGCGAAATG 300

Query 295 CGATACGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGTGAACATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCG 354
Sbjct 301 CGATACGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGTGAACATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCG 360

Query 355 CCTGAGGCCAGCTGGCTAAGGGCACGTCCGCCCTGGGCGTCAAGCGCTGAATCGCTCCATA 414
Sbjct 361 CCTGAGGCCAGTTGGCCAAGGGCACGTCCGCCCTGGGCGTCAAGCATTGAATCGCTCCATA 420

Query 415 AGGCC TTC-CATGCTATGCGGTGGCC TTATCTAGGATGCGGTTGAATGGCCCGTCATGTGC 473
Sbjct 421 AGATCTTCGC-TGCTATGCGATGGCTTTATCTAGGACGCGGGGAATGGCCCGTCATGTGC 479

Query 474 TGATGCGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGGATGATTTCTCTTGGCAATGAACGATTAATGGGT 533
Sbjct 480 TTATGCGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGGATGATTTCTCTTGGCAATGAACGATTAATGGGT 539

Query 534 GGGATGGAAGCCTCGGTTTATCCATATCATCGTTAGGTTGCTTTGAGAAGTT-GTGC GTGT 592
Sbjct 540 GGGATGGAAGCCTCGGTTTATCCATATCATCGTCAAGTTGCTTTGAGAATCAGTGCAAT 599

Query 593 CCCTGTCTAACCTAACCTCACTTGTCACTGGAAGACAACATGACAT 636
Sbjct 600 CCCGGGCTAACCTAACCTCACTTGTCACTGGAAGACAGCTGACAT 643

```

**Şekil 9:** *Orchis anatolica* ve *Orchis mascula* taksonlarının hizalama (alignment) sonucu (Query: *Orchis anatolica*, Sbjct: *Orchis mascula*).



#### 4.1.3.3 *Orchis tridentata* türüne ait bulgular

*Orchis tridentata* türünün ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölge sekansı National Center for Biotechnology Information (NCBI) kurumuna gönderilerek, “HQ657132” benzersiz erişim numarası (accession number) alınmıştır.

NCBI sitesinde BLAST (BLASTN 2.2.24+) (Zhang ve ark., 2000) işlemi uygulandığında, *Orchis tridentata* türünün, aralarında doğal olarak hibritleşebilen *Neotinea ustulata* türü ile benzerlik değerleri ve hizalama karşılaştırması Şekil 11’ de verilmiştir. Benzerlik yüzdesi 629 / 629 (%100), oluşan gap sayısı 0 (%0) ve toplam puan 1162 olarak hesaplanmıştır.

```

Score = 1162 bits (629), Expect = 0.0
Identities = 629/629 (100%), Gaps = 0/629 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      TCGAGACCCCTAAAAGATCGAGCGATTTGACAACTTGTGAACCTATTCAGCATCTTATAG 60
Sbjct 1      TCGAGACCCCTAAAAGATCGAGCGATTTGACAACTTGTGAACCTATTCAGCATCTTATAG 60

Query 61     ATGTTGTTGTGCACCCATTTCGTCTCCTGCATGAAAAACCCGATGGGAACATGTAATAGGC 120
Sbjct 61     ATGTTGTTGTGCACCCATTTCGTCTCCTGCATGAAAAACCCGATGGGAACATGTAATAGGC 120

Query 121    TGATGGGAGATCAATTCGGCGCAGATTTGCGCCAAGGTATATATGTAGCATGAGCAGAGT 180
Sbjct 121    TGATGGGAGATCAATTCGGCGCAGATTTGCGCCAAGGTATATATGTAGCATGAGCAGAGT 180

Query 181    TTCAACAACATTTCTCAAAGCAATTTGTTTTATGGAGTTGTTCTTTGCTCTTAAGTTGT 240
Sbjct 181    TTCAACAACATTTCTCAAAGCAATTTGTTTTATGGAGTTGTTCTTTGCTCTTAAGTTGT 240

Query 241    ATGGCTCTCGGCAATGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGA 300
Sbjct 241    ATGGCTCTCGGCAATGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGA 300

Query 301    TACGTGGTGCGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCT 360
Sbjct 301    TACGTGGTGCGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCT 360

Query 361    GAGGCCAGCCGGTCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGAATCGCTCCATAATA 420
Sbjct 361    GAGGCCAGCCGGTCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGAATCGCTCCATAATA 420

Query 421    CCTTCGATGTTATGTCGTGGTCTTATTTAGGATGCGGAGAATGGCCCGTCATGCGATGAT 480
Sbjct 421    CCTTCGATGTTATGTCGTGGTCTTATTTAGGATGCGGAGAATGGCCCGTCATGCGATGAT 480

Query 481    GTGTGGCAGGCTGAAGAGTGGGATGATTTTCTCTTTGCAAATGATCGATTAATGGGTGGG 540
Sbjct 481    GTGTGGCAGGCTGAAGAGTGGGATGATTTTCTCTTTGCAAATGATCGATTAATGGGTGGG 540

Query 541    ATGGAAGCCCCAGTTGATTCATCGTCAGGTTGCTTGAGAAAGCTATGCATTCCCCAGTTA 600
Sbjct 541    ATGGAAGCCCCAGTTGATTCATCGTCAGGTTGCTTGAGAAAGCTATGCATTCCCCAGTTA 600

Query 601    ACCCAACTCACATTGGAAGAAATTGACAT 629
Sbjct 601    ACCCAACTCACATTGGAAGAAATTGACAT 629

```

Şekil 11: *Orchis tridentata* ve *Neotinea ustulata* taksonlarının hizalama (alignment) sonucu (Query: *Orchis tridentata*, Sbjct: *Neotinea ustulata*).



NCBI sitesinde BLAST (BLASTN 2.2.24+) (Zhang ve ark., 2000) işlemi uygulandıktan sonra elde edilen diğer bir bulgu ise *Orchis conica* türüne olan benzerliği olmuştur. *Orchis tridentata* türünün doğal allopatrik türü olan *Neotinea conica* türü ile benzerlik değerleri ve hizalama karşılaştırması Şekil 12’ de verilmiştir. Benzerlik yüzdesi 618 / 630 (%99), oluşan gap sayısı 5 (%0) ve toplam puan 1092 olarak hesaplanmıştır.

```

Score = 1092 bits (591), Expect = 0.0
Identities = 618/630 (99%), Gaps = 5/630 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      TCGAGACCCTTAAAAGATCGAGCGATTTGACAACTTGTGAACTTATTCAGCATCTTATAG 60
            |||
Sbjct 1      TCGAGACCCTTAAAAGATCGAGCGATTTGACAACTTGTGAACTTATTCAGCATCTTATAG 60

Query 61     ATGTTGTTGTGCACCCATTTCGTCCTCCTGCATGAAAAACCCGATGGGAACATGTAATAGGC 120
            |||
Sbjct 61     ATGTTGTTGCGCACCATTTCGTCCTCCTACATGAAAAATCCGATGGGAACATGTAATAGGC 120

Query 121    TGATGGGAGATCAATTTCGGCGCAGATTTGCGCCAAGGTATATATGTAGCATGAGCAGAGT 180
            |||
Sbjct 121    TGATGGGAGATCAATTTCGGCGCAGATTTGCGCCAAGGTATATATGTAGCATGAGCAGAGT 180

Query 181    TTCAACAACATTTCTCTCAAAGCAATTTGTTTTATGGAGTTGTTCTTTGCTCTT-AAAGTTG 239
            |||
Sbjct 181    TTCAACAACATTTCTCTCAAAGCAATTTGTTTTATGGAGTTGTTCTTTGCTCTTAAAGTTG 240

Query 240    TATGGCTCTCGGCAATGGATACTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCG 299
            |||
Sbjct 241    TATGGCTCTCGGCAATGGATACTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCG 300

Query 300    ATACGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCC 359
            |||
Sbjct 301    ATACGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCC 360

Query 360    TGAGGCCAGCCGGTCAAGGGCACGTCGGCTGGGCGTCAAGCATTGAATCGCTCCATAAT 419
            |||
Sbjct 361    TGAGGCCAGCCGGTCAAGGGCACGTCGGCTGGGCGTCAAGCATTGAATCGCTCCATAAT 420

Query 420    ACCTTCGATGTTATGTCGTTGCTTATTTAGGATGCGGAGAATGGCCCGTCATGCGATGA 479
            |||
Sbjct 421    TCCTTCGATGTTATGTCGTTGCTTATTTAGGATGCGGAGAATGGCCCGTCATGCGATGA 480

Query 480    TGTGTGGCAGGCTGAAGAGTGGGATGATTTTCTCTTTGCAAATGATCGATTAATGGGTGG 539
            |||
Sbjct 481    TGTGTGGCAGGCTGAAGAGTGGGATGATTTTCTCTTTGCAAATGATCGATTAATGGGTGG 540

Query 540    GATGGAAGCCCAGTTGATTCATCGTCAGGTTGCTTGAGAAAGCTATGCAATCCCCAGTT 599
            |||
Sbjct 541    GATGGAAGCCCAGTTGATTCATCGTCAGGTTGCTTGAGAAAGCTAT---T-CCCCAGTT 596

Query 600    AACCCAACCTCACATTGGAAGAAATTGACAT 629
            |||
Sbjct 597    AACCCAACCTCATATTGAAAGAAATTGACAT 626

```

Şekil 12: *Orchis tridentata* ve *Neotinea conica* taksonlarının hizalama (alignment) sonucu (Query: *Orchis tridentata*, Sbjct *Neotinea conica*).



NCBI sitesinde BLAST menüsü altında “Align two or more sequences” seçeneği altında hizalanan *Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* taksonlarından elde edilen veriler Şekil 13’ te verilmiştir. Benzerlik yüzdesi 540 / 632 (%86), oluşan gap sayısı 34 (%5) ve toplam puan 627 olarak hesaplanmıştır

Score = 627 bits (339), Expect = 0.0	
Identities = 540/632 (86%), Gaps = 34/632 (5%)	
Strand=Plus/Plus	
Query 1	TCGAGACCC-TAAAGAGATCGAGTGTATTGACAACCTTGTGAACACTT-TTAGCAGCA-CA 57
Sbjct 1	TCGAGACCCCTTAAA-AGATCGAGCGATTGACAACCTTGTG-A-ACTTATT--CAGCATCT 55
Query 58	T-TA-ATGGTGCCTGCACCCGTCATTGCTGCATGAAGAACCCGATGGGTGCATGTTG 115
Sbjct 56	TATAGATGTTGTTGTCACCCATTTCGTCTCCTGCATGAAAAACCCGATGGGAACATGTAA 115
Query 116	CAGGCGGAGGGGAGATCCATTTCGGCGCAGCTTTGCGTCAAGGAAAATACGAGCATGAGC 175
Sbjct 116	TAGGCTGATGGGAGATCAATTTCGGCGCAGATTTCGCGCAAGTATATATGTAGCATGAGC 175
Query 176	GGACTTTCAAC--CA--T--TCAAAGCAATTTGTTTGGGGAGTTGTTGTTGCTCCGAA 229
Sbjct 176	AGAGTTTCAACAACATTTCCTCAAAGCAATTTGTTTATGGAGTTGTTCTTGTCT-C-TT 233
Query 230	AGAGTTGTAGGGCTCTCGGCAATGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCG 289
Sbjct 234	A-AGTTGTATGGCTCTCGGCAATGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCG 292
Query 290	AAATGCGATACGTGGTGCGAATTCGAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAG 349
Sbjct 293	AAATGCGATACGTGGTGCGAATTCGAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAG 352
Query 350	TTGCGCCTGAGGCCAGCTGG-CTAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCGCTGAATCGC 408
Sbjct 353	TTGCGCCTGAGGCCAGCCGGTC-AAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGAATCGC 411
Query 409	TCCATAAGGCCTTCCATGCTATG-CGGTGGCCTTATCTAGGATGCGGTGAATGGCCCGTC 467
Sbjct 412	TCCATAATACCTTCGATGTTATGTCG-TGGTCTTATTAGGATGCGGAGAATGGCCCGTC 470
Query 468	ATGTGCTGATGCGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTTGCCAA-TGAACGATT 526
Sbjct 471	ATGCGATGATGTGTGGCAGGCTGAAGAGTGGGATGATTTTCTCTTTGCAAAATGATCGATT 530
Query 527	AATGGGTGGGATGGAAGCCTCGGTTTATCTATCATCGTTAGGTTGCTTTGAGAA-GTTG 585
Sbjct 531	AATGGGTGGGATGGAAGCCCGGTTGAT--T--CATCGTCAGGTTGCTT-GAGAAAAGCTA 585
Query 586	TGCGTGTCCCT-GTCTAACCTAACTCAC-TTG 615
Sbjct 586	TGCAT-TCCCCAGT-TAACCCAACTCACATTG 615

Şekil 13: *Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* taksonlarının hizalama (alignment) sonucu (Query: *Orchis anatolica*, Sbjct: *Orchis tridentata*).

Tez çalışmasında kullanılan her iki taksonun NCBI sitesindeki BLAST işleminden sonra distance matrix hesaplanması ve filogenetik ağaç oluşturulması için AY351379 (*Orchis mascula*), AY369085 (*Dactylorhiza markusii*), AY364869 (*Orchis anthropophora*), AM711745 (*Orchis italica*), AY364882 (*Orchis purpurea*), AY364880

(*Neotinea conica*), AY364883 (*Neotinea ustulata*), AY699977 (*Orchis militaris*), DQ303382 (*Dactylorhiza ochroleuca*), AY699510 (*Dactylorhiza incarnata*), DQ074228 (*Dactylorhiza traunsteineri*), AY364871 (*Dactylorhiza sambucina*), AY704975 (*Platanthera chlorantha*), AY699507 (*Dactylorhiza saccifera*), AY699441 (*Dactylorhiza fuchsii*), AY699509 (*Gymnadenia conopsea*), AY699487 (*Dactylorhiza foliosa*) erişim numaralı (accession number) 17 Orchidaceae üyesi seçilmiştir.

#### **4.1.3.3 Filogenetik ve taksonomik bulgular**

*Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* türleri ile birlikte, Orchidaceae familyasına ait toplam 19 taksonun hizalanmasıyla oluşturulan CLUSTAL formatındaki dosya, MEGA formatına çevrilerek filogenetik ağaç oluşturulma yoluna gidilmiştir.

Distance matrix işlemi, Maximum Composite Likelihood (Tamura ve Kumar, 2004) ve filogenetik ağaç ise Neighbour – Join (Saitou ve Nei, 1987) yöntemine göre yapılmış olup ilgili parametreler Materyal ve Yöntem bölümünde verilmiştir. İlgili parametrelerde oluşturulan distance matrix Çizelge 8’ de, filogenetik ağaç ise Çizelge 9’ da gösterilmiştir.

DNA sekans verilerine göre oluşturulmuş filogenetik ağaca (Çizelge 9) genel olarak bakıldığında; *Dactylorhiza* türlerinin ve *Orchis* türlerinin bulunduğu iki ana kolun varlığı açıkça görülmektedir.

Filogenetik ağaç bulgularına göre *Orchis tridentata* türü, *Neotinea conica* ve *Neotinea ustulata* türleri ile aynı ortak atadan evrildikleri, birbirlerine çok yakın oldukları ve aynı kladin içinde yerleştikleri görülmektedir. Sekans hizalama sonuçları incelendiğinde, *Orchis tridentata* ve *Neotinea ustulata* taksonlarının ITS1, 5.8s rDNA ve ITS2 bölgelerinin dizilerinin tamamen aynı olduğu görülmekte ve kardeş türler olarak filogenetik ağaçta yer almışlardır. Sekans verilerine göre bu iki türdeki ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgelerinin tamamen korunduğu sonucuna varılmaktadır. Bu iki tür doğal olarak hibritleşmeleri ile bilinmektedir ve *Orchis x dietrichiana* hibrit türünü vermektedirler. Ayrıca bu iki tür, tek nükleotid değişimiyle *Neotinea conica* türünden ayrılmaktadır ve bu ayrılık filogenetik ağaçta *Neotinea conica* türünün bir alt kladda yer alması ile şematize

edilmiştir. *Orchis tridentata* türünün yakın benzerlik gösterdiği diğer türler; *Platanthera chlorantha* ve *Gymnadenia conopsea* türleridir.

Klasik taksonomik sınıflandırma ilkelerine göre verilen isimlendirmeler incelendiğinde; NCBI sitesi taksonomik sınıflandırma veritabanına göre *Neotinea conica* türünün sinonim isminin *Neotinea tridentata* subsp. *conica* olduğu görülmektedir. Fakat Royal Botanic Garden, KEW sitesindeki “world checklist” verilerine göre ise bu türün günümüzde kabul edilen adının *Neotinea tridentata* subsp. *conica* olduğu bilgisine ulaşılmıştır. Ayrıca aynı kaynaktan *Orchis tridentata* türünün sinonim isminin, *Neotinea tridentata* olduğu görülmektedir. Hem klasik taksonomi verilerine göre, hem de tez çalışmasında elde edilen filogenetik ağaç görüntüsüne göre *Orchis tridentata* türünün, *Neotinea tridentata* subsp. *conica* (filogenetik ağaçtaki adı: *Neotinea conica*) türü ile çok yakın benzerlik gösterdiği görülmektedir. Literatürde *Orchis tridentata* ve *Neotinea conica* türlerinin, birbirleri ile karıştırılmaya açık türler olduğu ve aynı zamanda *Neotinea conica* türünün, *Orchis tridentata* türünün allopatrik bir türü olduğu belirtilmektedir (Delforge, 2006). Bu bilgiler ışığında, *Orchis tridentata* türünün, DNA sekans verileri tarafından oluşturulan filogenetik ağaçtaki yerinin ve klasik taksonomideki yerleşiminin çift taraflı olarak birbirini desteklediği fakat *Neotinea ustulata* türü ile %100 benzerlik yüzdesi gösterdiğinden dolayı taksonomik olarak iki türün birbirinden sadece bu bölgenin sekanslanması ile ayrılamadığı görülmektedir. Distance matrix tablosuna (Çizelge 8) bu türlerin birbirlerine olan uzaklıkları sayısal veriler eşliğinde sunulmuştur.

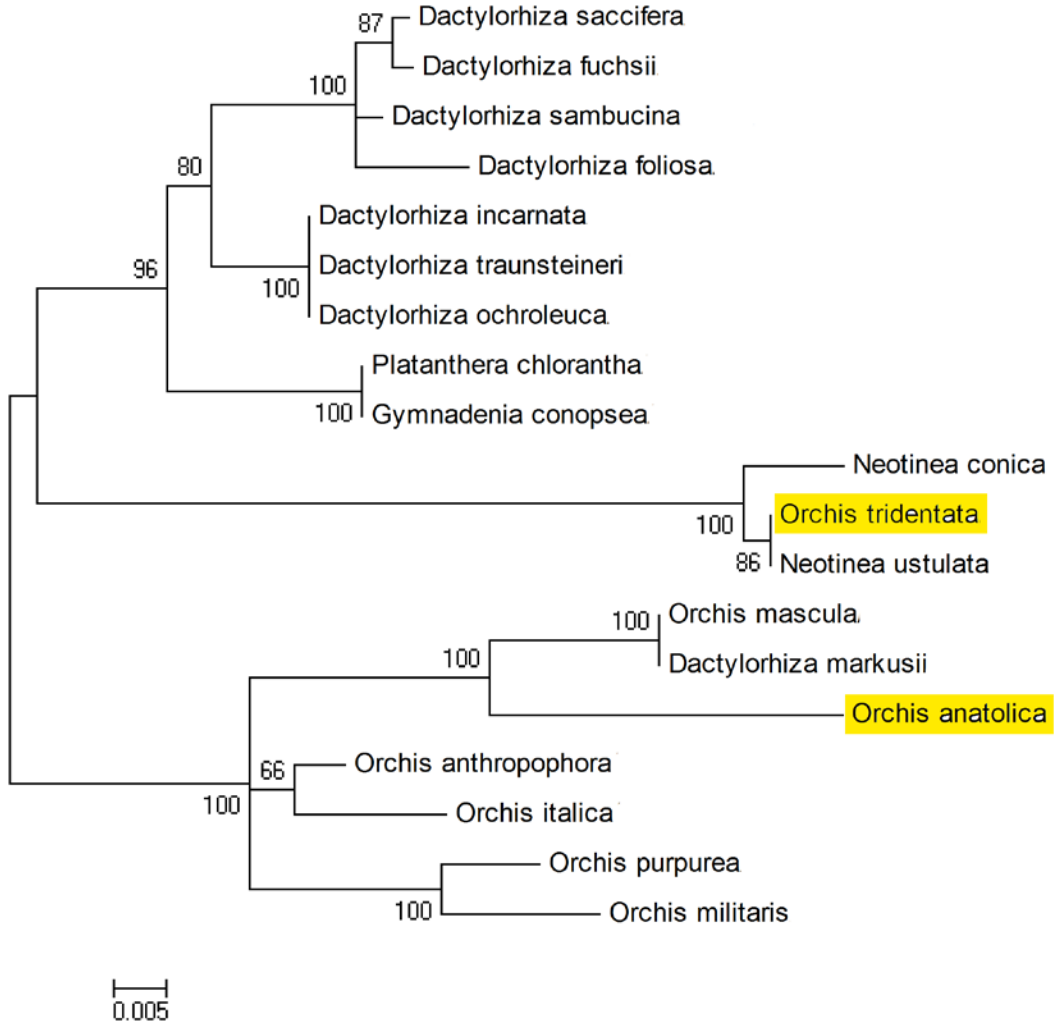
*Orchis anatolica* türünün filogenetik ağaçtaki yerleşimine bakılacak olursa; *Orchis mascula* ve *Dactylorhiza markusii* türleri ile yakın yerleşimi görülmektedir ve aynı ortak atadan evrildikleri şematize edilmiştir. Doğada *Orchis anatolica* ve *Orchis mascula* taksonlarının hibritleşebildikleri, ilgili literatürde belirtilmektedir (Kreutz, 2009). NCBI sitesi taksonomik sınıflandırma veritabanından elde edilen verilere göre adı *Dactylorhiza markusii* olan türün, Royal Botanic Garden, KEW sitesindeki “world checklist” literatüründe kabul edilen adının *Dactylorhiza romana* subsp. *romana* olduğu görülmektedir. Bu türün her ne kadar floral karakteristik özellikler bakımından *Orchis anatolica* türüne benzediği görülse de, yumrularındaki morfolojik farklılıklar ve diğer anatomik ve morfolojik özellikler bakımından cins bazında birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Bu nedenle *Orchis anatolica* türünün, *Orchis mascula* türüne yakın, *Dactylorhiza markusii*

türüne de görece daha uzak olduğu sonucuna varılmaktadır. Filogenetik ağaç ve distance matrix verilerine göre *Orchis anatolica* türünün, *Orchis mascula* ve *Dactylorhiza markusii* türlerine olan uzaklığının aynı olduğu görüntüsünden, ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgesinin bu iki türde aynı derecede korunduğu sonucuna varılmaktadır. Filogenetik ağacın üst bölgelerinde yer alan *Platanthera chlorantha* ve *Gymnadenia conopsea* türleri ile *Dactylorhiza saccifera*, *Dactylorhiza fuchsii*, *Dactylorhiza sambucina*, *Dactylorhiza foliosa*, *Dactylorhiza incarnata*, *Dactylorhiza traunsteineri*, *Dactylorhiza ochroleuca* türlerinin aynı atadan farklılaştıkları görülmektedir.

Çizelge 8: *Orchis tridentata* ve *Orchis anatolica* taksonlarının de dahil olduğu toplam 19 türün distance matrix tablosu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. <i>Dactylophiza foliosa</i> .																			
2. <i>Dactylophiza sambucina</i> .	0.014																		
3. <i>Dactylophiza saccifera</i> .	0.016	0.009																	
4. <i>Dactylophiza fuchsii</i> .	0.016	0.007	0.003																
5. <i>Dactylophiza incarnata</i> .	0.034	0.026	0.028	0.028															
6. <i>Dactylophiza traunsteineri</i> .	0.034	0.026	0.028	0.028	0.000														
7. <i>Dactylophiza ochroleuca</i> .	0.034	0.026	0.028	0.028	0.000	0.000													
8. <i>Platanthera chlorantha</i> .	0.045	0.037	0.043	0.041	0.034	0.034	0.034												
9. <i>Gymnadenia conopsea</i> .	0.045	0.037	0.043	0.041	0.034	0.034	0.034	0.000											
10. <i>Orchis tridentata</i> .	0.113	0.107	0.109	0.109	0.096	0.096	0.096	0.094	0.094										
11. <i>Neotinea ustulata</i> .	0.113	0.107	0.109	0.109	0.096	0.096	0.096	0.094	0.094	0.000									
12. <i>Neotinea conica</i> .	0.119	0.113	0.115	0.115	0.102	0.102	0.102	0.104	0.104	0.012	0.012								
13. <i>Orchis mascula</i> .	0.102	0.094	0.096	0.098	0.090	0.090	0.090	0.098	0.098	0.141	0.141	0.147							
14. <i>Dactylophiza maikusi</i> .	0.102	0.094	0.096	0.098	0.090	0.090	0.090	0.098	0.098	0.141	0.141	0.147	0.000						
15. <i>Orchis anatolica</i> .	0.124	0.114	0.114	0.116	0.108	0.108	0.108	0.116	0.116	0.147	0.147	0.156	0.050	0.050					
16. <i>Orchis anthropophora</i> .	0.078	0.067	0.071	0.071	0.059	0.059	0.059	0.065	0.065	0.100	0.100	0.106	0.050	0.050	0.073				
17. <i>Orchis italica</i> .	0.084	0.076	0.078	0.080	0.069	0.069	0.069	0.078	0.078	0.120	0.120	0.126	0.054	0.054	0.073	0.019			
18. <i>Orchis purpurea</i> .	0.098	0.086	0.088	0.090	0.078	0.078	0.078	0.088	0.088	0.120	0.120	0.127	0.065	0.065	0.088	0.039	0.044		
19. <i>Orchis militaris</i> .	0.104	0.092	0.094	0.096	0.086	0.086	0.086	0.094	0.094	0.123	0.123	0.129	0.070	0.070	0.094	0.046	0.048	0.025	

**Çizelge 9:** *Orchis tridentata* ve *Orchis anatolica* taksonlarının da dahil olduğu toplam 19 Orkide türünün, ITS1, 5.8s rDNA ve ITS2 bölgelerinin dizi analizlerine göre oluşturulmuş filogenetik ağacı.



## 4.2 Tartışma

DNA barkodlama tekniği ile filogenetik ağaçlar oluşturulması ve taksonomik sınıflandırma yöntemleri, Sitokrom C Oksidaz 1 (CO1) sekans analizlerinin, barkod olarak kullanıldığı hayvan sistematigi çalışmalarında net ve başarılı sonuçlar vermektedir. Fakat bu bölgenin yüksek bitkilerde kullanılmaya uygun olmayacak düzeyde yavaş evrildiği bilinmektedir (Kress ve ark., 2005). Literatür özeti incelendiğinde bitkilere uygun bir DNA barkod bölgesinin aranması 90' lı yılların sonlarında başlamaktadır. Bu aşamada birçok gen bölgesi (ITS, trnH – psbA, matK, CO1 v.b.) tür düzeyinde tanımlamaların yapılabilmesine uyumluluğu açısından araştırılmıştır. Bu yıllardan itibaren başlanan denemelerde DNA barkodlama, DNA sekans verileri ile elde edilen filogenetik incelemeler ve taksonomik çalışmaların, çok farklı alanlarda kullanılabilirliği ve kesin sonuçlar verebileceği, konuyla ilgili birçok makalenin sonuç cümlelerini oluşturmuştur.

Bitki filogenetiği ve taksonomisi konularında kullanılacak evrensel bir DNA bölgesinin bulunması için gerçekleştirilen çalışmaların büyük bir bölümünde, tez çalışmamızda kullanılan ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgelerinin kullanıldığı, Alvarez ve Wendel (2003) tarafından yazılmış olan makalede açıkça görülmektedir. Bu çalışmaya göre 2003 yılına kadar yayımlanmış olan DNA barkodlama ile ilgili 244 makalenin %66' sının ITS bölgesi çalışmalarını içerdiği görülmektedir. Bu araştırmalar arasındaki başarısız sonuçlar irdelenerek aynı araştırmacılar elde edilen verilere göre ITS bölgesinin, bitki sistematiginde henüz tamamen güvenilir olmadığı yönünde görüş belirtmişlerdir.

Günümüz araştırmacılarından Kress ve Erickson (2008)' yaptıkları çalışmada, üzerinde önemle durdukları konu olarak belirledikleri, barkodlama için kullanılacak bölgedeki özellikleri olan (1) tür seviyesinde genetik varyabilite ve farklılaşma içermesi, (2) universal primerlerin bağlanabileceği bölgeler içermesi, (3) DNA izolasyonu ve çoğaltılması için elverişli ve kısa olması gerektiği gibi özellikler, nedeniyle çalışmamızda kullandığımız ITS bölgesinin filogenetik ağaçta iyi sonuç vermesi sonraki çalışmalar için de bu bölgenin umut verici olduğunu rapor etmişlerdir.

Yakın geçmişten günümüze bu konuda pozitif sonuç alan araştırmacılar incelendiğinde ise azımsanmayacak kadar fazla oldukları görülmektedir. Örneğin; Cox ve ark. (1997) tarafından yapılan çalışmada yaklaşık 100 orkide türünün parsinomi analiziyle ilişkileri

araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler eşliğinde ITS bölgesinde meydana gelen inversion / deletion (indel) aktivitesinin, evrimsel değişimler olduğunu ve bunun, iki türün üçüncü bir türle olan ilişkisini göstermede açık bir bilgi sağladığı sonucuna varılmıştır. Tez çalışmamızda kullandığımız ITS bölgesinin, tür bazında işleyişini destekleyen bu çalışmada, daha önceden yapılmış olan sistematik çalışmalarla kısmi anlamda hemfikir olduğu açıklanmaktadır.

Aceto ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmada *Orchis* ve bağlantılı *Aceras*, *Anacamptis*, *Neotinea*, *Ophrys*, *Platanthera* ve *Serapias* cinslerinin filogenetik ilişkileri, nükleer ribozomal DNA' nın Internal Transcribed Spacer bölgesi incelenerek ortaya koyulmuştur. Çalışmada oluşturulan filogenetik ağacın, daha önceki vejetatif ve floral morfolojik verileri desteklemediği fakat izoenzim, karyolojik ve kloroplast DNA verileri ile uyumlu olduğu açıklanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, bazı floral karakteristik özelliklerin moleküler verilerle uyumluluk gösterse de, çoğu filogenetik yeniden düzenlemelere uyumsuz olduğu, floral morfolojinin birçok etkileyici nedenden ötürü değişiklik gösterebileceği, ekolojik yakınlama özelliklerinin ve / veya palinatör etkileşimlerinin, cins bazında değişikliklere neden olabileceği vurgulanmaktadır. Bu sonuçlar ışığında morfolojik özelliklerin her an, herhangi bir nedenle değişebileceği ve bunun, morfolojiye dayanan sınıflandırma yöntemlerini yanıltabileceğini ve moleküler veriler kullanılarak oluşturulacak yeniden düzenlemelerin üzerinde daha fazla durulması gerektiği düşüncesini ortaya atmışlardır. Bu olumlu yaklaşımın, tez çalışmamızın amacıyla bağdaştırılabileceği kanısını taşımaktayız.

Orkidelerin hibritleşme potansiyellerinin ne kadar yüksek olduğundan ve bunun somut örneklerinden “Bitki materyali” ve “Bulgular” başlıkları altında bahsedilmişti. Tez çalışmamızda kullanılan her iki Orkide türünün de doğada hibritlerinin bulunduğu bilinmektedir. ITS bölgesinin, hibrit türlerin belirlenmesinde de ne kadar etkili bir yöntem olduğu Pellegrino ve ark. (2000) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ortaya koyulmuştur. Ribozomal fragmentlerin PCR ile çoğaltıldığı ve dot blot analizlerinin yapıldığı bu çalışmada, *Orchis x colemanii*, *Orchis mascula* ve *Orchis pauciflora* türlerinin hibritleşme dereceleri belirlenmiştir. Bu çalışmayla nükleer ribozomal fragmentlerin, hibrit türlerin belirlenmesi ve hibritleşme dereceleri konusunda fikir edinimi açısından ne kadar etkili



olabileceği, blot analizlerinin sekans analizleri ile desteklenerek kesin ve tatmin edici netlikte sonuçlar alınabileceği ortaya çıkmaktadır.

Pleurothallidinae (Epidendreae: Orchidaceae) subtribusunun monofilik oluşunu değerlendirmek ve filogenetik ilişkilerini belirlemek için Pridgeon ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada 185 Orkide taksonunun ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgesi sekanslanmıştır. Ayrıca ITS bölgesinin yanı sıra matK, trnL intron, ve trnL-F bölgeleri de sekanslanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen bütün verilerin birbirleri ile uyumlu olduğunu belirten araştırmacılar, yalnızca floral karakterler başta olmak üzere morfolojik özellik benzeşimlerinin (homoplasy), subtribus düzeyinde filogenetik ağaçlar oluşturulmasında kullanışsız olduğunu bildirmişlerdir.

Daha önce Pridgeon ve ark. (2001)' nın işaret ettikleri floral karakterler açısından yaşanan olumsuzlukların bu araştırmacılar tarafından da yaşanması ancak diğer karakter ve sekans incelemesi yapılan bölgelerin sonuçlarının uyumlu olması bizlerde floral karakterlerin çevresel faktörlerden fazlaca etkilendiklerini ve bu konuda gerçekleştirilecek çalışmalarda özellikle floral morfolojik karakterlerin incelenmesinde dikkatli olunması gerektiğini göstermektedir. Tez çalışmamızın amacında da bahsedildiği gibi morfolojik verilerin, moleküler verilerle desteklenmesine (*Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* türlerinde) yardımcı olacak olan sekans verilerimizle, Orchidaceae sistematğinde yapılacak olan yeni taksonomik ve filogenetik çalışmalara veri sağlamış bulunmaktayız. Çünkü morfolojik-taksonomik verilere göre, sekans analizi ile elde edilen verilerin sürekli bir şekilde tekrarlanabilmesi ve karşılaştırılabilmesi olanağı çok daha yüksek güvenilirlik ve kesinlik sağlamaktadır.

Tsai ve ark. (2004)' nın gerçekleştirdikleri çalışmada, ribozomal DNA' daki internal transcribed spacer bölgesinin sekans analizine dayanılarak 12 *Dendrobium* (Orchidaceae) türünün genetik ilişkileri incelenerek bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Çalışmanın sonucunda *Dendrobium* (Orchidaceae) türlerinin tanımlanmasının ve genetik ilişkilerinin belirlenmesinin, ITS bölge sekansı ile kolayca yapılabildiği yargısına ulaşılmıştır. Böylece Orchidaceae üyelerinde ITS bölgesinin filogenetik ve taksonomik işlevlilik özelliği desteklenmektedir.

Tez çalışmasında kullandığımız ITS bölgesinin, tür tanımlamalarında kullanılabilir düzeyde yeterli değişime sahip olduğu sonucuna Chase ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışma ile varılmıştır. Alglerde, hayvanlarda ve mantarlarda kullanılan DNA bölgelerinin, bitkilerde kullanılmayacak kadar düşük varyasyona sahip olması, bitkiler için farklı bir DNA bölgesinin sekanslanması gerekliliğini doğurmuştur. Araştırmacılar plastid DNA' sının psbA – trnH ile rbcL bölgeleri ve genomik DNA' nın ITS bölgesinin, karasal bitkilerde kullanılabilir olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda Gulyas ve ark. (2005) tarafından da, nrITS bölgesinin *Ophrys* sistematığı ve filogenisi, ayrıca hibrit bölgeleri ve derecelerinin belirlenmesinde kullanışlı olduğu belirtilmiştir.

Çalışma objemiz olarak seçtiğimiz *Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* taksonlarının ilk defa ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgelerinin tamamen sekanslandığı göz önüne alındığında, önceki çalışmalarla bu iki türün kıyaslanması ve tartışılması söz konusu olamamaktadır. Hizalama bulguları incelendiğinde *Orchis tridentata* ve *Neotinea ustulata* taksonlarının, çalıştığımız bölge dizilerinin tamamen aynı olması, sadece ITS bölgesi kullanılarak güvenli ve başarılı bir taksonomik sonuç elde edilmesi yönünde şüphe uyandırmakta, ITS bölgesi ile birlikte başka gen ve / veya genler arası bölgelerin de sekanslanarak daha güvenli sonuçlar elde edilip edilmeyeceği düşüncesini ortaya çıkarmaktadır. Bu noktada, Chase ve ark. (2005) ve Gulyas ve ark. (2005) adlı araştırmacıların önerdikleri plastid DNA' sının psbA – trnH ile rbcL bölgeleri ve genomik DNA' sının ile bizim uygulama yaptığımız ITS bölgelerinin birlikte analiz edilerek daha başarılı sonuçlara ulaşılabileceği düşüncesini taşımaktayız.

**BÖLÜM 5****SONUÇLAR VE ÖNERİLER**

1990' lı yılların başından itibaren gün geçtikçe önemi ve güvenilirliği artan, yanı sıra diğer yöntemlere oranla daha kısa zamanda sonuç veren moleküler biyoloji tekniklerinden birisi olan DNA dizileme yöntemi ile elde edilen verilerle canlıların teşhisleri ve evrimsel yollarının yeniden çizilmesi, günümüzde birçok araştırmacı tarafından kabul gören bir tekniktir. Birçok hayvanın teşhisinde başarılı ve güven verici sonuçlar elde edilen Sitokrom Oksidaz 1 (CO1) geninin bitkiler aleminde kullanılamayacak kadar yavaş evrilmesi, araştırmacıları güvenilir sonuçlar elde edebilecekleri yeni genler ve genler arası bölgeler aramaya yöneltmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda tüm bitki gruplarında kesin sonuç olarak kullanılabilir bir DNA bölgesi henüz ortaya konulamamış olmakla birlikte bazı bitki grupları için bazı bölgelerin kesin ve güvenilir sonuç verdiği, yakın geçmişte gerçekleştirilen çalışmalarda rapor edilmiştir. Araştırmacılarca önem taşıyan ve sıkça inceleme objesi olarak değerlendirilen Orchidaceae familyası için birçok moleküler filogenetik ve taksonomi çalışmalarında ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgelerinin kullanıldığı ve büyük bir oranla da başarılı sonuçlar verdiği görülmektedir. Bu nedenle tez çalışmamızda genomik DNA' nın ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgelerinin sekans analizleri gerçekleştirilerek, *Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* taksonlarında moleküler filogeni ve taksonomik yerlerinin belirlenmesinde başarılı sonuç verip veremeyeceği araştırılmıştır. Daha önceden sekans veritabanlarında kaydı bulunmayan bu iki orkide taksonunun aynı zamanda Kazdağı gibi üç floristik bölgenin etkisi altında bulunmasından dolayı Türkiye' nin en önemli bitkisel zenginlik bölgelerinden birinde var olması, tıbbi ve ekonomik önemini ön plana çıkaracak ölçüde salep elde edilmesi ve ayrıca bu bitkilerin soğanlarının yurtdışına çıkarılma yasağı konularak koruma altına alınmış olması çalışma objemizin de çalışma konumuz kadar önem teşkil ettiğini göstermektedir.

Çalışmamızda elde edilen *Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* taksonlarına ait ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgelerinin tamamının oluşturduğu sekans verileri başarılı olarak elde edilmiştir. Bununla birlikte Angiosperm üyelerinde ITS bölgelerinin çok küçük boyut farklılıklarıyla varyasyon göstermesi, *Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata*

taksonları ile birlikte toplam 19 taksonun hizalanması sırasında herhangi bir sorunun yaşanmaması sonucunu doğurmuş, hizalama sonucu oluşan boşluk (GAP) sayısı, filogenetik ağaç oluşturulmasını engellemeyecek düzeyde sınırlı kalmıştır. Elde edilen veriler bilim dünyasında orijinal olarak ilk defa ortaya koyulduğundan, Amerika’ da bulunan NCBI veritabanına gönderilmiştir. Merkez tarafından verilerimizin doğruluğu onaylanmış ve 26.12.2010 tarihi itibarıyla NCBI (National Center for Biotechnology Information), EBI (European Bioinformatics Institute) ve DDBJ (DNA Databank of Japan) veritabanlarında erişime açılmıştır.

*Orchis anatolica* taksonundan elde edilen sekanslama verileri ile yapılan hizalama sonucunda ve filogenetik ağaçtaki yerleşimi dikkate alındığında pozisyonun doğru ve genel olarak *Orchis* türleri ile birlikte gruplandığı görülmüştür.

Diğer bir açıdan, hizalama sonucunda *Orchis tridentata* ve *Neotinea ustulata* taksonlarının %100 benzerlik göstermesi, klasik taksonomide de birbirlerine benzer olan bu taksonların her ikisinde de ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgelerinin korunmuş olduğunu göstermektedir. Bu gözlemlerle birlikte yalnızca ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgelerinin sekanslamasıyla elde edilen verilerin, *Orchis tridentata* ve *Neotinea ustulata* türlerinin ayırt edilmesinde yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu konuda kesinlik ve yeterliliğin elde edilebilmesi için bu taksonların kloroplast ve mitokondrial genomlarında matK, trnL-F ve trnH – psbA v.b. bölgelerinin araştırılması gereği ortaya çıkmaktadır. Bu konu da, fazladan zaman ve işlem gerektirdiğinden, keza ayrıca yeni bir yüksek lisans tezi olabilecek kapasiteye sahip olduğu için daha ileri bir dönemde serbest çalışma yada yüksek lisans çalışması olarak gerçekleştirilmesi sonucuna ulaşılmıştır.

Hızlı, kolay ve dijital tanımlama olanaklarının yanı sıra, her seviyedeki araştırmacının ücretsiz erişime sahip olduğu veritabanlarından aldıkları sekanslar ile gerçekleştirebilecekleri taksonomik ve filogenetik çalışmaları destekleyen farklı organellerde moleküler tekniklerin kullanılabilirdiği barkodlama yönteminin gün geçtikçe artan önemi ve kesinliği, ileride yaygın olarak kullanılacak ve arazi çalışmalarında büyük bir kolaylık sağlayacak elektronik el tipi tanımlama cihazlarının tasarlanma sürecinde olduğu günümüzde, bu tekniğin üzerinde önemle durulması ve geliştirilmesinin bir gereklilik olduğu düşüncesini taşımaktayız. Bilindiği gibi gerek eczacılık gerek tıp alanlarında yada ticari meta olarak kullanılan birçok kimyasal, biyolojik çeşitlilik

üyelerinden elde edilmektedir. Örneğin antibiyotiklerin yaklaşık %25' i bitkisel özdeklere üretilmektedir. Canlılar dünyasında hibritleşme oranının yüksekliğinin yanı sıra değişkenlik gösteren fiziksel ve ekolojik faktörler neticesinde, ortama uyum gösterme potansiyeline sahip taksonların birincil aşamada sekonder metabolit üretmeleri, daha sonraki aşamalarda ise genomik yapılarında yeni genler oluşturdukları bir gerçektir. Birçok mikroorganizmanın kendi genomunun yanı sıra birden fazla sayıda plazmid oluşturması da bu konuya örnek olarak verilebilir. Bu noktalardan hareketle yeni tür olarak değerlendirilen veya varlığı daha önce bilinmeyen ancak günümüzde yeni tanımlanan taksonların barkodlama yöntemi ile akrabalık ilişkilerinden yola çıkılarak sentezledikleri maddelere ulaşılması keza doğru taksondan doğru maddenin üretilebilmesi olasılığı ortaya çıkmaktadır. Bilimsel gerçeklerin yanı sıra günümüz dünyası, ekonomik ilişkilerin başat olarak yaşandığı bir sosyal yapılanma içerisine girmiştir. Tüm bu özellikler göz önüne alındığında barkodlama çalışmalarının çok yönlü faydaları olduğu ve insanlık aleminin yaşam kalitesine katkıları sağlayabileceği açıkça görülmektedir.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında; Orchidaceae familyasına dahil *Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* taksonları için ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgelerinin genel anlamda doğruya yakın sonuçlar verdiğini, fakat kesin ve tam anlamıyla güvenilir filogenetik ve taksonomik sonuçların eldesi için birden fazla gen ve / veya genler arası bölgenin sekanslanarak elde edilen veriler eşliğinde gözlemlenen sonuçların değerlendirilmesi gerektiği, tarafımızca önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Aceto S., Caputo P., Cozzolino S., Gaudio L. ve Moretti A., 1999. Phylogeny and Evolution of *Orchis* and Allied Genera Based on ITS DNA Variation: Morphological Gaps and Molecular Continuity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 12, No. 1, October, 67-76.
- Alvarez I. ve Wendel J. F., 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29 (2003) 417–434.
- Arditti J., 1979. *Aspect of the Physiology of Orchids, Advances in Botanical Research* (H.W. Woolhouse, editor) 7: 421-665, Academic Press, Londra.
- Baldwin B. G., 1992. *Phylogenetic Utility Of The Internal Transcribed Spacers Of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: An Example From The Compositae*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1, 3–16.
- Baldwin B. G. M., Sanderson J. M., Porter M. F., Wojciechowski C. S., Campell ve Donoghue M. J., 1995. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247 – 277.
- Barret C. F. ve Freudenstein J. V., 2008. Molecular Evolution of rbcL In the Mycoheterotropic Coralroot Orchids (*Corallorhiza* Gagnebin, Orchidaceae. *Molecular Phylogenetics And Evolution* 47 (2008) 665 – 679.
- Bat N., Nuraydın K., Ayman O. ve Altıncaba Z., 2010. National Geographic – Türkiye. Mart 2010 No 107. İnsan Tehtidi Altındaki Nadir Çiçekler Haritası.
- Bateman R. M., Pridgeon A. M., ve Chase M. W., 1997. Phylogenetics of Subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) Based On Nuclear ITS Sequences. 2. Infrageneric Relationships and Reclasification to Achieve Monophyly of *Orchis sensu stricto*. *Lindleyana* 12: 113 – 141.
- Berg C. V. D., Higgins W. E., Dressler R. L., Whitten W. M., Arenas M. A. S., Culham A., ve Chase M., 2000. A Phylogenetic Analysis Of Laeliinae (Orchidaceae) Based

- On Sequence Data From Internal Transcribed Spacers (ITS) Of Nuclear Ribosomal DNA. *Lindleyana* 15(2): 96–114.
- Bulpitt C. J., 2005. The Uses and Misuses of Orchids in Medicine. Occasional Paper. *Q J Med* 2005; 98: 625 – 631.
- Buttler K.P., 2007, *Orchideen*, Mosaik Verlag GmbH, Münih.
- Cameron K. M., Chase M. W., Whitten W. M., Kores P. J., Jarrell D. C., Albert V. A., Yukawa T., Hills H. G. ve Goldman D. H., 1999. A Phylogenetic Analysis of the Orchidaceae: Evidence From rbcL Nucleotide Sequences. *American Journal of Botany* 86(2): 208 – 224.
- Chase M. W., Salamin N., Wilkinson M., Dunwell J. M., Kesanakurthi R. P., Haidar N. ve Savolainen V., 2005. DNA Barcoding the Floras of Biodiversity Hotspots. *Phil. Trans. R. Soc. B*(2005) 360, 1889 – 1895.
- Clausen J., Keck D. D. ve Heisey W. W., 1958. *Experimental Studies On The Nature Of Species, Cilt 3: Environmental Responses Of Climatic Races Of Achillea*. Carnegia Institution of Washington Publication 581. 1-129.
- Clegg M. T., 1993. Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 363–367.
- Coleman A. W., 2009. Is there a Molecular Key to the Level of “Biological Species” in Eukaryotes? A DNA Guide. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50 (2009) 197 – 203.
- Cox A. V., Pridgeon A. M., Albert V. A. ve Chase M. W., 1997. Phylogenetics of the slipper orchids (*Cypripedioideae, Orchidaceae*): nuclear rDNA ITS sequences. *Pl. Syst. Evol.* 208, 197-223.
- Çolak A. H. ve Sorger F., 2004. *Türkiye Çiçekleri*. İkinci baskı, İstanbul. ISBN: 97598699-0-X. s 5.
- Delforge P., 1995. *Orchids of Britain and Europe*, Harper Collins Publisher, London.
- Delforge P., 2006. *Orchids of Europe, North Africa and the Middle East*. Timber Press, Inc., USA. 7-8.

- Demirsoy A. ve Türkan İ., 1999. *Genel Biyoloji*. Palme Yayınları No: 152. ISBN: 975-7477-59-1 (cilt 1) 322-337.
- Deonier R. C., Tavare S. ve Waterman M. S., 2005. *Computational Genom Analysis: An Introduction*. Springer Science-Business Media Inc. NY-USA. p 13.
- Devos N., Oh S. N., Raspè O., Jackuemart A. L. ve Manos P. S., 2005. Nuclear ribosomal DNA sequence variation and evolution of spotted marsh-orchids (*Dactylorhiza maculata* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36 (2005) 568–580.
- Doolittle W. F. ve Sapienza C., 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution, *Nature* 284: 601–603.
- Douzery E. J. P., Pridgeon A. M., Kores P., Linder H. P., Kurzweil H. ve Chase M. W., 1999. Molecular Phylogenetics of Diseae (Orchidaceae): A Contribution From Nuclear Ribosomal ITS Sequences. *American Journal of Botany* 86(6): 887 – 899.
- Dressler R. L., 1993. *Phylogeny And Clasification Of The Orchid Family*. Cambridge University Press. 27-28.
- Ekim T., Koyuncu M., Güner A., Erik S., Yıldız B. ve Vural M., 1991. *Türkiye' nin Ekonomik Değer Taşıyan Geofitleri Üzerine Taksonomik Ve Ekolojik Araştırmalar*. T.C. Tarım Orman Ve Köyişleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü. Ankara. 5-11.
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Gernandt D. S. ve Liston A., 1999. Internal Transcribed Spacer Region Evolution in *Larix* and *Pseudotsuga* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 86(5): 711 – 723.
- Gönüz A, 2001. Ultrastructural Studies On Stem And Leaf of *Orchis anatolica* Boiss. And *Cyclamen hederifolium* Aiton. Growing And Different Altitudes In West Anatolia. Hacettepe Bulletin of Natural Sciences And Engineering. Vol:30 Serie A *Biology And Chemistery*. ISSN: 0072-9221. 47 – 71.



- Gönüz A., Kesercioğlu T. ve Akı C., 2009. *Sitotaksonomide Temel İlkeler*. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Yayınları No: 93. ISBN: 978-975-8100-99-6 s 7.
- Graur D. ve Li W. H., 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*, 2nd Edition, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Gulyas G., Sramko G., Molnar V. A., Rudnoy S., Illyes Z., Balazs T. ve Bratek Z., 2005. Nuclear DNA ITS Paralogs As Evidence of Recent Interspecific Hybridization In The Genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47/2: 61–67.
- Güler N., 2005. Kazdağları' nda Yetişen Orchidaceae Familyası Bitkileri Üzerinde Morfolojik ve Korolojik Araştırmalar, (Doktora Tezi), Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Güler N., Gönüz A., Hürkan K. ve Döver E., 2008. Çan (Çanakkale-Türkiye) İlçesi Doğal Yayılışlı Bazı Orchidaceae Taksonları Üzerine Gözlemler. Çanakkale İli Değerleri Sempozyumu 2008, Çan Değerleri Sempozyumu Bildiriler Kitabı, 143 – 168.
- Hapeman J. R. ve Inoue K., 1997. Plant-pollinator Interactions and Floral Radiation in *Platanthera* (Orchidaceae). In T. J. Givnish and K. J. Sytsma [eds.], *Molecular Evolution and Adaptive Radiation* p 433 – 454. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hershkovitz M. A. ve Lewis L. A., 1996. Deep-level Diagnostic Value of the rDNA-ITS Region. *Molecular Biology and Evolution* 13: 1276 – 1295.
- Kaya Ö. N., (27.05.2009). <http://www.gezeganimiz.com/NewsDetail.asp?idHaber=5567>.
- Kim K. J. ve Jansen R. K., 1994. Comparisons Of Phylogenetic Hypothesis Among Different Data Sets In Dwarf Dandelions (*Krigia*): Additional Information From Internal Transcribed Spacer Sequences Of Nuclear Ribosomal DNA. *Plant Syst. Evol.* 190, 157–185.

- Knoop V., Unseld M., Marienfeld J., Brandt P., Sünkel S., Ullrich H. ve Brennicke A., 1996. copia-, gypsy- and LINE-like retrotransposon fragments in the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana*, *Genetics* 142: 579–585.
- Komarov V. L., 1968. Flora of the USSR, *Liliflorae* and *Microspermae*, 4: 514-546, *Israel Program for Scientific Translations*, Jerusalem.
- Kores P. J., Molvray M., Weston P. H., Hopper S. D., Brown A. P., Cameron K. M. ve Chase M. W., 2001. A Phylogenetic Analysis on Diurideae (Orchidaceae) Based On Plastid DNA Sequence Data. *American Journal of Botany* 88(10): 1903 – 1914. 2001.
- Kress W. J. ve Erickson D. L., 2008. DNA Barcodes: Genes, Genomics, and Bioinformatics. *PNAS* vol.105, No: 8 2761 – 2762.
- Kress W. J., Wurdack K. J., Zimmer E. A., Weigt L. A. ve Janzen D. H., 2005. Use of DNA Barcodes To Identify Flowering Plants. *PNAS* vol. 102, no. 23, 8369 – 8374.
- Kreutz C. A. J., 1998. *Die Orchideen der Türkei: Beschreibung, Ökologie, Verbreitung, Gefährdung, Schutz*, C.A.J. Kreutz, Landgraaf, Netherlands.
- Kreutz C. A. J., 2000. *Orchidaceae. in Flora of Turkey and The East Aegean Islands* (Edit. Güner et al.), University Press, 11:275-305, Edinburgh.
- Kreutz C. A. J., 2009. *Türkiye Orkideleri (Botanik Özellikleri, Ekolojik Özellikleri, Doğal Yayılış Alanları, Yaşam Tehditleri, Koruma Önlemleri)*. Rota Yayınları. 1 – 800.
- Kubo T., Nishizawa S., Sugawara A., Itchoda N., Estiati A. ve Mikami T., 2000. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNACys (GCA), *Nucleic Acids Res.* 28: 2571–2576.
- Lahaye R., Bank M., Bogarin D., Warner J., Pupulin F., Gigot G., Maurin O., Duthoit S., Barraclough T. G. ve Savolainen V., 2008. DNA Barcoding the Floras of Biodiversity Hotspots. *PNAS*, Feb 26, Vol. 105, No. 8, 2923 – 2928.

- Lewontin R., 2007. *Üçlü Sarmal. Gen, Organizma Ve Çevre*. TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları. Ankara. s 17.
- Notsu Y., Masood S., Nishikawa T., Kobo N., Akiduki G., Nakazono M., Hirai A. ve Kadowaki K., 2002. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants, *Mol. Genet. Genomics* 268: 434–445.
- Orgel L. E. ve Crick F. H. C., 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite, *Nature* 284: 604–607.
- Özhatay N., Byfield A. ve Atay S., 2005. *Türkiye' nin 122 Önemli Bitki Alanı*. WWF Türkiye Doğal Hayatı Koruma Vakfı. ISBN: 97592433-7-7. s 73.
- Öztekin S., Başçetinçelik A. ve Soysal Y., 2001. *Dış Satım Potansiyeli Yüksek bazı Tarım Ürünlerinin İşlenmesi Ve Sektöre Genel Bir Bakış*. İstanbul Ticaret Odası Yayın No: 2001-38. s 89.
- Pagel M., 1999. Inferring the Historical Patterns of Biological Evolution. *Nature*, 401: 877 - 884
- Pellegrino G., Caputo P., Cozzolina S., Menale B. ve Musacchio A., 2000. Molecular Characterization of A Hybrid Zone Between *Orchis mascula* and *O. pauciflora* in Southern Italy. *Biologia Plantarum* 43 (1): 13 – 18, 2000.
- Pridgeon A. M., Solano R. ve Chase, M. W., 2001. Phylogenetic Relationships In Pleurothallidinae (Orchidaceae): Combined Evidence From Nuclear And Plastid DNA Sequences. *American Journal Of Botany* 88(12): 2286–2308.
- Rasmussen H. N., 1995. *Terrestrial Orchids From Seeds To Mycotrophic Plant*. Cambridge University Press, Cambridge. p: 39.
- Ravi V., Khurana J. P., Tyagi A. K. ve Khurana P., 2008. An Update on Chloroplast Genomes. *P 1 Syst. Evol.*, 217: 101 – 122.
- Rieseberg L. H., Beckstrom-Sternberg S. ve Doan K., 1990. *Helianthus annuus* ssp. *texanus* Has Chloroplast DNA and Nuclear Ribosomal RNA Genes of *Helianthus debilis* ssp. *Cucumerifolius*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 593 – 597.

- Rieseberg L. H. ve Soltis D. E., 1991. Phylogenetic Consequences of Cytoplasmic Gene Flow in Plants. *Evol. Trends Plant* 5, 65 – 84.
- Rieseberg L. H. ve Wendel J. F., 1993. *Introgression and its Consequences in Plants*. In: Harrison, R. (Ed.), *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, Oxford, 70 – 109.
- Renz J., 1984. *Orchidaceae*. in *Flora Iranica (Flora des Iranischen Hochlands und der Umrahmenden Gebirge)*[Edit. Rechinger, K.H.], Akademische Druck- u Verlagsanstalt Graz-Austria, 126: 94-118, Basel.
- Renz J. ve Taubenheim G., 1984. *Orchidaceae*. in *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Edit. Davis, P.H. et al.), University Press, 8: 450-552, Edinburg.
- Saar D. E. ve Polans N. O., alıntı zamanı 15 Kasım 2010. <http://pisum.bionet.nsc.ru/pg/32/42.htm>
- Salemi M. ve Vandamme A. M., 2004. *The Phylogenetic Handbook. A Practical Approach to DNA And Protein Phylogeny*. Cambridge University Press.
- Sass C., Little D. P., Stevenson D. Wm. ve Specht D., 2007. DNA Barcoding in the *Cycadales*: Testing the Potential of Proposed Barcoding Markers for Species Identification of Cycads. *PLoS ONE*, 2(11): e1154.
- Sato S., Nakamura Y., Kaneko T., Asamizu E. ve Tabata S., 1999. *Complete structure of the chloroplast genome of Arabidopsis thaliana*, DNA Res. 6: 283–290.
- Seçmen Ö., Gemici Y., Görk G., Bekat L. ve Leblebici E., 2004. *Tohumlu Bitkiler Sistematigi* (Genişletilmiş 7. Baskı). Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No:16. İzmir. s 330.
- Sezik E., 1967. Türkiye'nin Salepgilleri, Ticari Salep Çeşitleri ve Özellikle Muğla Salebi Üzerinde Araştırmalar (Doktora Tezi), İstanbul Üniversitesi.
- Sezik E., 1984. *Orkidelerimiz, Türkiye' nin Orkideleri*. Sandoz Kültür Yayınları No: 6. 1-166.

- Sezik E., 2002. Türkiyenin Orkideleri ve Salep, *Acta Pharmaceutica Turcica*, 44: 151-157.
- Saitou N. ve Nei M., 1987. The neighbor-joining method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Soliva M., Kocyan A. ve Widmer A., 2001. Molecular Phylogenetics of the Sexually Deceptive Orchid Genus *Ophrys* (Orchidaceae) Based on Nuclear and Chloroplast DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 20. No. 1 July, 78-88, 2001.
- Sonnate G., Galasso I. ve Pignone D., 2003. ITS Sequence Analysis and Phylogenetic Inference in the Genus *Lens* Mill. *Annals of Botany* 91: 49-54, 2003.
- Tamer C. E., Karaman B., Aydoğan N. ve Çopur Ö. U., 2009. Geleneksel Bir İçeceğimiz: Salep. II. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu Kitabı (27-29 Mayıs 2009), Van. 1-4.
- Tamura K, Nei M. ve Kumar S., 2004. Prospects for Inferring Very Large Phylogenies by Using the Neighbor-Joining Method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101: 11030-11035.
- Tezcan M., 2009. Kaz Dağı (Çanakkale, Türkiye) Endemik Bitkilerinden Bazılarının DNA Barkodlaması (Yüksek Lisans Tezi). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale.
- Tsai C. C., Peng C. I., Huang S. C., Huang P. L. ve Chou C. H., 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 (2004) 315–325.
- Turner P. C., McLennan A. G., Bates A. D. ve White M. R. H., 2004. *Moleküler Biyoloji: Önemli Notlar* (2. Baskıdan Çeviri). Nobel Yayınları No: 613. 30-35.
- Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M. ve Webb D. A., 1980. *Flora Europaea, Alismataceae to Orchidaceae* (Monocotyledones), University Press, 5: 337-342, Cambridge.

- Unseld M., Marienfeld J. R., Brandt P. ve Brennicke A., 1997. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides, *Nat. Genet.* 15: 57–61.
- Wendel J. F., Schnabel A. ve Seelanan T., 1995. Bidirectional Interlocus Concerted Evolution Following Allopolyploid Speciation in Cotton (*Gossypium*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 280 – 284.
- Westhead D. R., Paris J. H. ve Twyman R. M., 2002. Bioinformatics. Instant Notes. *BIOS Scientific*, Oxford, UK. 1-257.
- White T. J., Bruns T. D., Lee S. ve Taylor J. W., 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ [eds.], *PCR protocols: A guide to methods and applications*, 315–322. Academic Press Inc., San-Diego.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., ve Miller W., 2000. "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2): 203-14.

<http://apps.kew.org/wcsp/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>

## ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa No

<b>Çizelge 1.</b> Avrupa orkidelerinin sistematikleri.....	6
<b>Çizelge 2.</b> Karasal orkidelerin Avrupa’ daki kullanımları .....	8
<b>Çizelge 3.</b> Tez çalışmasında kullanılan laboratuvar donanımları listesi .....	25
<b>Çizelge 4.</b> Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler, sarf malzemeler ve kitler ..	26
<b>Çizelge 5.</b> Polimeraz Zincir Reaksiyonu için hazırlanan karışım miktarları.....	34
<b>Çizelge 6.</b> PCR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri .....	34
<b>Çizelge 7.</b> Polimeraz Zincir Reaksiyonu profili .....	35
<b>Çizelge 8.</b> <i>Orchis tridentata</i> ve <i>Orchis anatolica</i> taksonlarının de dahil olduğu toplam 19 türün distance matrix tablosu .....	50
<b>Çizelge 9.</b> <i>Orchis tridentata</i> ve <i>Orchis anatolica</i> taksonlarının da dahil olduğu toplam 19 Orkide türünün, ITS1, 5.8s rDNA ve ITS2 bölgelerinin dizi analizlerine göre oluşturulmuş filogenetik ağacı.....	51

<b>Şekil 1.</b> Türkiye’ de <i>Orchis anatolica</i> Boiss. türünün yayılışı .....	28
<b>Şekil 2.</b> <i>Orchis anatolica</i> Boiss .....	28
<b>Şekil 3.</b> Türkiye’ de <i>Orchis tridentata</i> Scopoli. türünün yayılışı .....	30
<b>Şekil 4.</b> <i>Orchis tridentata</i> Scopoli .....	30
<b>Şekil 5.</b> Tez çalışmasında kullanılan <i>Orchis anatolica</i> ve <i>Orchis tridentata</i> taksonlarının toplandıkları lokasyonlar .....	31
<b>Şekil 6.</b> PCR uygulamasında kullanılan primerlerin genomik DNA’ da ilgili bölgelere yerleşimi.....	34
<b>Şekil 7.</b> <i>Orchis anatolica</i> ve <i>Orchis tridentata</i> taksonlarının DNA izolasyonu bulguları ..	40
<b>Şekil 8.</b> <i>Orchis anatolica</i> ve <i>Orchis tridentata</i> taksonlarının PCR bulguları.....	41
<b>Şekil 9.</b> <i>Orchis anatolica</i> ve <i>Orchis mascula</i> taksonlarının hizalama (alignment) sonucu.	42
<b>Şekil 10.</b> <i>Orchis anatolica</i> ve <i>Dactylorhiza markusii</i> taksonlarının hizalama (alignment) sonucu .....	43
<b>Şekil 11.</b> <i>Orchis tridentata</i> ve <i>Neotinea ustulata</i> taksonlarının hizalama sonucu.....	44
<b>Şekil 12.</b> <i>Orchis tridentata</i> ve <i>Neotinea conica</i> taksonlarının hizalama sonucu.....	45
<b>Şekil 13.</b> <i>Orchis anatolica</i> ve <i>Orchis tridentata</i> taksonlarının hizalama sonucu.....	46



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Kaan HÜRKAN

Doğum Yeri: İstanbul

Doğum Tarihi: 24.05.1984

### EĞİTİM DURUMU

Önlisans Öğrenimi: Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, Laborant ve Veteriner Sağlık Programı

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce (ileri seviye)

### BİLİMSEL FAALİYETLER

#### a) Yayınlar – SCI - Diğer

Güler, N., **Hürkan, K.**, Gönüz, A. 2008. Report 48: Orchidaceae: Neotinea maculata (Desf.) Stearn. In Vladimirov, V. & al. (ed.) New floristic records in the Balkans: 9, Phytologia Balcanica 14 (3): 438-439.

#### b) Bildiriler – Uluslar arası - Ulusal

**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 Sympozyumu) 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.

### **Kitaplar**

- Gönüz, A., Dülger, Yağan, B. D., **Hürkan, K.**, 2010. Sitoloji Laboratuvarı Uygulama Kitabı. ISBN: 978-605-61660-0-6.

### c) Katıldığı Projeler

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev
Orchidaceae Familyasına Ait <i>Orchis anatolica</i> Boiss., ve <i>Orchis tridentata</i> Scopoli Taksonlarının DNA Sekans Yöntemiyle Moleküler Filogenetik Özelliklerinin Belirlenmesi	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	4000 TL	01.01.2010- 01.01.2011	Araştırmacı

### ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
Onur Belgesi	Anadolu Üniversitesi	2009

### İLETİŞİM

orchidologist@hotmail.com.tr

kaanhurkan@hotmail.com