

## Anadolu Orkidesi'nde (*Orchis anatolica* Boiss.) Ribozomal DNA'nın Transkripsiyonu Yapılan İç Ara Bölgelerinin (ITS) Özellikleri

Kaan HÜRKAN<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Orkideler (Orchidaceae), yeryüzünün neredeyse tamamında yayılış gösteren ve çiçekli bitkiler içerisinde en çok tür içeren ikinci familyadır. Bu kalabalık bitki grubunun sınıflandırılması ve filogenetiğinin ortaya çıkarılmasında sadece morfolojiye dayalı yöntemler yetersiz kalmaktadır. Bu çalışmada *Orchis anatolica* Boiss. türünün çekirdek DNA'sının ITS bölgesi dizilenecek DNA barkodu ortaya çıkarılmış ve bu veri analiz edilerek *Pseudorchis albida* subsp. *straminea* (Fernald) Á.Löve & D.Löve, *Orchis italica* Poir., *Orchis anthropophora* All., *Orchis simia* Lam., *Orchis purpurea* Huds., *Orchis militaris* Sm., *Orchis adenocheila* Czerniak, *Orchis pallens* L., *Orchis mascula* Crantz, *Orchis mascula* subsp. *pinetorum* Boiss. & Kotschy ve *Orchis spitzelii* Saut. ex W.D.J.Koch türleri ile filogenetik ilişkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda ITS dizisinin tamamının çalışılan *Orchis* türleri arasında yeterli seviyede ayırım yapabildiği ve bu cins içerisinde yapılacak daha detaylı çalışmalar için kullanılmaya elverişli olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Orchidaceae, DNA barkodlama, Transkripsiyonu yapılan iç ara bölgeler (ITS), moleküler filogenetik.

### Properties of the Internal Transcribed Spacer Region of the Nuclear Ribosomal DNA on *Orchis anatolica* Boiss.

**ABSTRACT:** Orchid family (Orchidaceae) is the second largest group of flowering plants and it spreads almost every location in the world. Taxonomic and phylogenetic studies depending only on morphologic characters are not sufficient to discriminate the family. Therefore, in this study we sequenced the whole nuclear ribosomal ITS region and evaluated the discrimination performance of the ITS region on the phylogeny within *Pseudorchis albida* subsp. *straminea* (Fernald) Á.Löve & D.Löve, *Orchis italica* Poir., *Orchis anthropophora* All., *Orchis simia* Lam., *Orchis purpurea* Huds., *Orchis militaris* Sm., *Orchis adenocheila* Czerniak, *Orchis pallens* L., *Orchis mascula* Crantz, *Orchis mascula* subsp. *pinetorum* Boiss. & Kotschy and *Orchis spitzelii* Saut. ex W.D.J.Koch species. The results of the study showed that the resolution power of the ITS is enough to discriminate studied *Orchis* spp. at species level.

**Keywords:** Orchidaceae, DNA Barcoding, Internal Transcribed Spacer (ITS), molecular phylogenetic.

<sup>1</sup> Kaan HÜRKAN (Orcid ID: 0000-0001-5330-7442), Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Iğdır, Türkiye

\*Sorumlu Yazar: Kaan HÜRKAN, E-posta: [kaan.hurkan@igdir.edu.tr](mailto:kaan.hurkan@igdir.edu.tr), [kaanhurkan@hotmail.com](mailto:kaanhurkan@hotmail.com)

## GİRİŞ

Kutup bölgeleri haricinde dünyanın her yerinde yayılış gösteren Salepgiller veya Orkideler (Orchidaceae), Papatyagiller (Asteraceae) familyasından sonra ikinci en çok tür içeren çiçekli bitki ailesidir ve 899 cinsle ait yaklaşık 27801 tür barındırmaktadır (The Plant List, 2013). Türkiye'de yapılan temel orkide florası araştırmalarında bu familyanın 1984 yılında 24 cins ve 90 tür ile (Sezik, 1984), 2009 yılında ise 24 cins ve 170 takson (Kreutz, 2009) ile temsil edildiği belirlenmiştir. Her yeni flora ve sistematik araştırması sonrasında orkidelere yeni üyeler dâhil olmakta, farklı taksonomik görüşlere göre türler bir cinsten farklı bir cins içerisine taşınmakta veya yeni cinsler oluşturulmaktadır. Sürekli bir değişim içinde olan orkide taksonomisini moleküler markörler ile düzenlemek, 1990'lı yılların başından günümüze kadar moleküler taksonomistler için vazgeçilemeyen bir amaç olmuştur ve orkide moleküler filogenetiği üzerindeki çalışmalar her geçen gün artmıştır.

Bilinen birçok DNA barkod bölgesi, orkide sistematini düzenlemek ve filogenetik ilişkileri belirlemek amacıyla onlarca yıldır kullanılmaktadır (Zimmer ve Wen, 2012). Çekirdek ribozomal DNA'nın (Nuclear Ribosomal DNA veya nrDNA), transkripsiyonu yapılan iç aralayıcı bölgeleri (Internal Transcribed Spacer, nrITS veya ITS) rDNA sistronunun parçalarıdır ve 18S, 5.8S, 26S kodlanan bölgeler ile bu bölgeleri bölen ITS1 ve ITS2 bölgelerinden oluşurken çekirdek genomunda yüzlerce kopyası bulunur (Felinier ve Rosselló, 2007). ITS bölgesi, şüphesiz orkide moleküler filogenisinde en çok kullanılan bölgedir (Baldwin ve ark., 1995; Pridgeon ve ark., 1997; Álvarez, 2003; Bateman ve ark., 2003; Shipunov ve ark., 2004; Gulyás ve ark., 2005; Sramko ve ark., 2014; Dizkırıncı ve ark., 2017).

Bu çalışmadaki amacımız; Türkiye'de yaygın olarak bulunan *O. anatolica* türünün ITS bölgesinin nükleotit dizisini ortaya çıkararak türe ait bir moleküler barkod elde etmek, bu barkod bölgesinin özelliklerini detaylı olarak incelemek ve filogenetik açıdan yakın akrabaları ile ilişkisini belirlemektir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Bitki materyali

Çalışmada bitki materyali olarak kullanılan *O. anatolica* türüne ait yeşil yaprak örnekleri 29.04.2010 tarihinde Çanakkale'nin Bayramiç İlçesi'nden, (*Pinus nigra* ormanı, koordinatlar: 39°45'00.5"K 26°50'05.6"D, yükseklik: 615m), toplanmış ve silika jel içeren kilitli poşetlerde oda sıcaklığında saklanmıştır (Şekil 1).

### DNA ekstraksiyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

DNA ekstraksiyonu için cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Doyle ve Doyle, 1987) yöntemi değiştirilerek kullanılmıştır. Yaklaşık 10 mg yaprak dokusu sıvı azot ile toz haline getirilmiş ve üzerine %2 CTAB, 20 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM Tris – HCl (pH 8.0) ve 1.4 mM NaCl içeren parçalama tamponu eklenmiştir. Homojenat 65°C'de 60 dakika boyunca inkübe edilmiş ve 3 dakika boyunca 14000 g'de santrifüj edilmiştir. Oluşan üst faza eşit hacimde kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenmiş, 60 dakika boyunca karıştırılmış ve 14000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. DNA -20°C'deki etanol ile çöktürülmüş ve -20°C'de bir gece bekletilmiştir. Örnek 14000 g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş, çöken DNA %70'lik etanol ile 2 defa yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. DNA 50 µl 10 mM Tris (pH 8.0) ile çözdürülmüş ve -20°C'de saklanmıştır.

ITS bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması için ITS1A ve ITS4 primerleri kullanılmıştır (Çizelge 1).



Şekil 1. Çalışmada bitki materyali olarak kullanılan *O. anatolica* (Çanakkale – Bayramiç).

Çizelge 1. ITS bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılabilmesi için kullanılan primerler.

Primer adı	Primer dizisi	Kaynak
ITS1A	5'-GACGTCGCGAGAAGTCCA-3'	(Gulyas ve ark., 2005)
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	(White ve ark., 1990)

25 µl PZR karışımı için 0.1 hacimde 10x Tampon (Fermentas, USA), 0.5 µl 10 mM dNTP (Fermentas, USA), 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, USA), 1.25 µl 20 mg/ml BSA, 0.5 µl 10 µM primer (Thermo Scientific, USA), 0.1 µl 5 Unit High-Fidelity polimeraz (Fermentas, USA), 16.65 µl nükleaz içermeyen ultra saf su ve 1 µl (~5 ng µl<sup>-1</sup>) genomic DNA kullanılmıştır.

PZR işlemi BIO-RAD PTC-200 model cihazda, 94°C 2 dakika ilk denatürasyonu takiben, 33 döngü 94°C 20 saniye denatürasyon, 51°C 30 saniye bağlanma ve 72°C 1 dakika uzama adımları uygulanmıştır. Reaksiyon 72°C 10 dakika son uzama ile tamamlanmıştır. PZR ürünleri PCR Purification Kit (Fermentas, USA) ile üreticinin sağladığı protokole göre

saflaştırıldıktan sonra dizileme işlemi için Marogen Inc. (Hollanda) firmasına gönderilmiş ve diziler ABI 3100 Genetic Analyzer cihazında, ITS1A ve ITS4 primerleri kullanılarak çift yönlü olarak elde edilmiştir.

### Biyoenformatik ve filogenetik çalışmalar

Çalışmada ITS nükleotit dizileri için biyoenformatik çalışmalar Geneious R8 (Kearse ve ark., 2012) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Primer bağlanma bölgeleri kesilmiş, her iki yöndeki okuma birleştirilmiştir ve karar dizisi GenBank veri tabanına HQ657131 erişim numarası ile kaydedilmiştir. NCBI nükleotit veri tabanında Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) yapılmış ve doğru bölgenin çoğaltıldığı ve dizilendiği onaylanmıştır. Aynı yazılım kullanılarak DNA dizisinin ITS1, 5.8s ve ITS2 bölgeleri, homolog diziler ile karşılaştırılarak tespit edilmiş ve etiketlenmiştir. ITS1 dizisinin ikincil yapı tahmini Geneious R8 yazılımı içerisinde gerçekleştirilmiştir. *O. anatolica* ITS dizisinde tekrar dizileri Phobos 3.3 (Mayer, 2010) yazılımı ile hesaplanmıştır.

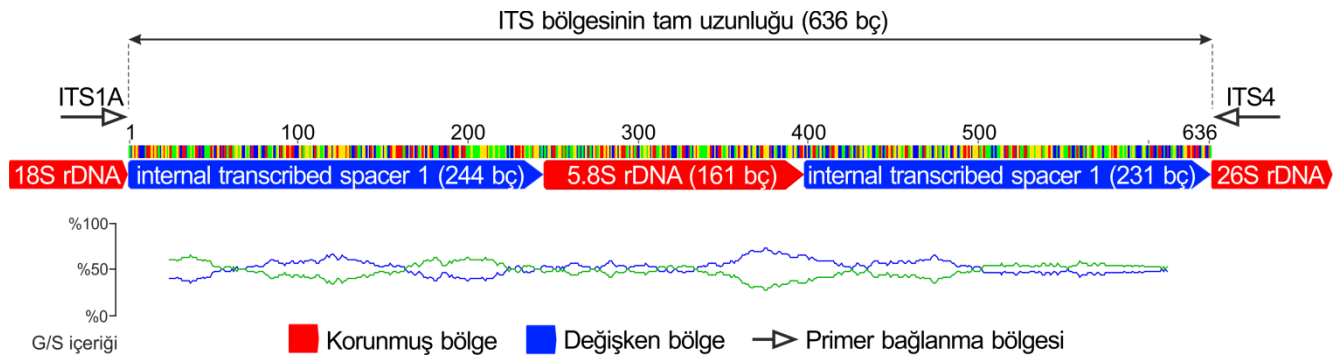
Filogenetik çalışmalar için BLAST sonuçlarında %90 ve üzerinde benzerlik gösteren *Orchis* spp. dizileri (GenBank erişim numaraları: AY704975, KU697373, KU697369, AY364882, KT318277, AY699977, KU931686, KU697371, KF499511, KU931698, AY364869, KU931697)

ve filogenetik çalışmalarda dış grup olarak kullanılmak üzere bir adet dizi (DQ022894) NCBI veri tabanından indirilmiştir. Dizilerin hizalanması ClustalW algoritması (Larkin ve ark., 2007) varsayılan ayarları ile yapılmıştır. Filogenetik ağaçlar PAUP 4.0a164 (Swofford, 2003) yazılımında Maximum Parsimony (MP) sezgisel arama (Heuristic Search: 1000 rastgele tekrar edilerek, her bir adımda bir ağaç tutularak, boşluklar göz ardı edilerek) yöntemi ile elde edilmiştir. Tree-bisection-reconnection (TBR) yöntemi, dalların yeniden düzenlenmesi için kullanılmıştır.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### Biyoenformatik bulgular

*O. anatolica* türüne ait ITS bölgesi için PZR ürünlerinin boyutunun yaklaşık 820 bp olduğu tespit edilmiştir. Diziler Geneious R8 yazılımı içerisinde alınarak primer bağlanma noktaları kesilmiş, üst üste bindirilmiş ve karar dizisi uzunluğunun 636 bp olduğu belirlenmiştir ve GenBank veri tabanına HQ657131 erişim numarası ile kaydedilmiştir. Aynı veri tabanından alınan diğer diziler ile birlikte yapılan etiketleme işleminden sonra ITS1, 5.8S ve ITS2 bölgelerinin uzunlukları sırasıyla 244 bp, 161 bp, 231 bp olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2).



**Şekil 2.** *O. anatolica* türünde ITS bölgesine ait özelliklerin DNA dizisi üzerinde gösterilmesi. G/S içeriği: Dizi boyunca Guanin (mavi) / Sitozin (yeşil) içeriği oranının değişimi.

Hizalama işleminden sonra tüm dizilerin uzunlukları indel (insersiyon ve delesyon) alanları ile birlikte toplam 645 bç olmuştur. *O. anatolica* ITS dizisinde korunmuş alan sayısı 517, parsimoni bilgilendirici alan sayısı ITS1 için 30, 5.8S için 2 ve ITS2 için 33 olarak MEGA X (Kumar ve ark., 2018) yazılımında belirlenmiştir. ITS bölgesinin grup içi (*Orchis*

spp. içerisinde) ve grup içi – grup dışı (*Orchis* spp. ile dış grup olarak seçilen *Platanthera* sp. arasında) değişkenlik sayısı ve oranları hesaplanmış, grup içi değişimi 103 nükleotit (%16), grup içi – grup dışı değişimi ise 126 nükleotit (%19.5) olarak belirlenmiştir (Çizelge 2).

**Çizelge 2.** *O. anatolica* türünde ITS bölgesine ait bazı bilgiler

Uzunluk	Hizalanan Uzunluk	Toplam Korunmuş Alan Sayısı	Parsimoni Alan Sayısı					Değişkenlik	
			ITS1	5.8S	ITS2	Grup İçi – Dışı	Grup İçi		
636 bç	645 bç	517	30	2	33	126 / %19.5	103 / %16.0		

ITS bölgesi orkidelerde tür seviyesinde ayırt edebilme çözünürlüğüne sahiptir (Hollingsworth ve ark., 2009; Hürkan, 2017; Rudall ve Bateman, 2003; Sramko ve ark., 2014). Özellikle ITS1 ve ITS2 bölgeleri genler arası bölge olmasından dolayı hem tek nokta mutasyonları hem de indel mutasyonları açısından yüksek bir değişkenliğe sahiptir (Won ve Renner, 2005). Analizlerde *Orchis* türlerinde ITS1 ve ITS2 bölgelerinin grup içerisinde toplamda 63 parsimoni alana sahip olduğu görülmektedir. Mutasyonların çok az görüldüğü RNA genini kodlayan ve korunmuş bölge olan 5.8S bölgesinde *O. anatolica* ve *O. mascula* türlerinde 371 ve 377. pozisyonlardaki Sitozin, Timin ile *P. chlorantha* türünde ise 378.

pozisyonadaki Adenin, Guanin ile yer değiştirerek birer transisyon mutasyona neden olmuştur (Şekil 3). ITS barkod bölgesinde nükleotit değişimleri ile transisyon durumları ile karşılaşıldığı bilinmektedir (Alvarez-Molina ve Cameron, 2009). ITS bölgesinin çift ebeveynli (biparental) kalıtım göstermesi, her iki ebeveynden gelen ITS nükleotit dizilerinin de genom boyunca tekrar etmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, tek nükleotit değişimleri, diğer ITS kopyalarından gelen sinyal nedeniyle gerçekleşmiş olabilir. Özellikle 5.8S bölgesindeki bu değişimler, ITS bölgesine tür üstü sistematik kategorilerde ayırt edebilme kabiliyetini kazandırmaktadır.

*Orchis cf. anatolica* AG 2769

A G C T G G C T A A  
5.8S rRNA

*Orchis anatolica*

A G C T G G C T A A  
5.8S rRNA

*Orchis mascula*

A G T T G G C C A A  
5.8S rRNA

*Orchis mascula* subsp. *pinetorum*

A G T T G G C C A A  
5.8S rRNA

*Platanthera chlorantha*

A G C T G G C C G A  
5.8S rRNA

**Şekil 3.** 5.8S bölgesinde transisyon mutasyonları.

Phobos 3.3 ile *O. anatolica* ITS dizisi taranmış ve ITS1 bölgesinde 211-220 pozisyonu arasında 3 defa tekrar eden üçlü nükleotit dizisi GTT bulunmuştur (GTTGTTGTT) (Şekil 4). Tekrar dizilerinin varlığı ITS dizilerinde uzunluk varyasyonlarına yol açmaktadır (Campbell ve

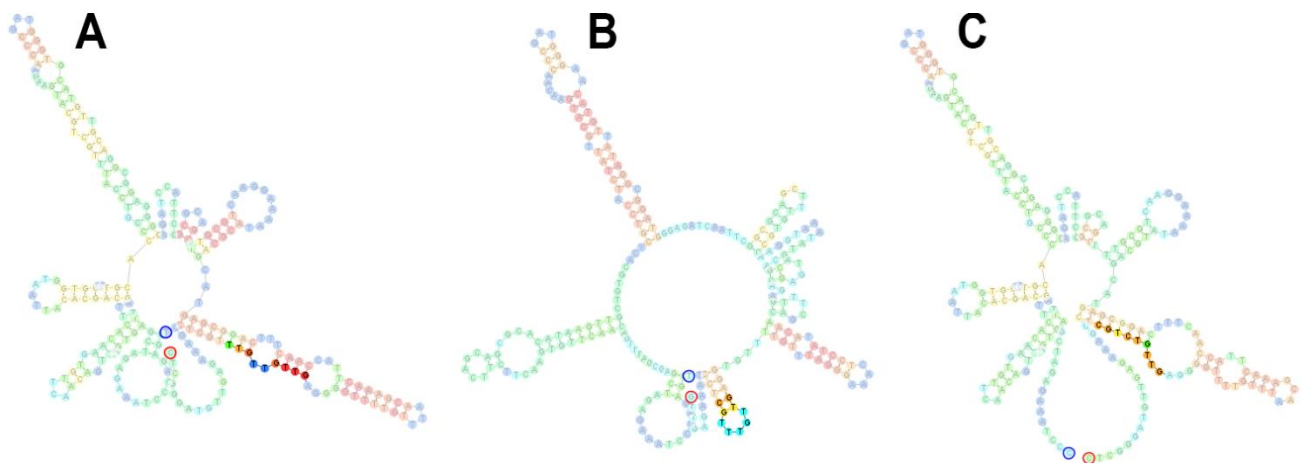
ark., 2005). Analiz ettiğimiz türlerde *O. spitzelii* ve *P. chlorantha* hariç tüm ITS1 dizilerinde bu tekrar dizisi bulunmakta, bu iki türde ise tekrar dizisinde 3 nükleotitlik bir delesyon ve bir transisyon mutasyonu olmuştur (GTTG---TC).

	218		220						226
1. <i>Orchis italica</i>	G	T	T	G	T	T	G	T	T
2. <i>Orchis anthropophora</i>	G	T	T	G	T	T	G	T	T
3. <i>Orchis cf. anatolica</i> AG 2769	G	T	T	G	T	T	G	T	T
4. <i>Orchis anatolica</i>	G	T	T	G	T	T	G	T	T
5. <i>Orchis spitzelii</i>	G	T	T	G	-	-	-	T	C
6. <i>Orchis mascula</i>	G	T	T	G	T	T	G	T	T
7. <i>Orchis mascula</i> subsp. <i>pinetorum</i>	G	T	T	G	T	T	G	T	T
8. <i>Orchis pallens</i>	G	T	T	G	T	T	G	T	T
9. <i>Orchis simia</i>	G	T	T	G	T	T	G	T	T
10. <i>Orchis purpurea</i>	G	T	T	G	T	T	G	T	T
11. <i>Orchis militaris</i>	G	T	T	G	T	T	G	T	T
12. <i>Orchis adenocheila</i>	G	T	T	G	T	T	G	T	T
13. <i>Pseudorchis albida</i> subsp. <i>straminea</i>	G	T	T	G	T	T	G	T	T
14. <i>Platanthera chlorantha</i>	G	T	T	G	-	-	-	T	T

Şekil 4. ITS bölgesinde tekrar dizileri, delesyon (kırmızı) ve transisyon (mor) mutasyonları.

*O. anatolica*, *P. chlorantha* ve *O. spitzelii* türlerine ait ITS1 dizilerinin sekonder yapısı incelendiğinde ITS1 dizisindeki varyasyonlardan kaynaklanan sekonder yapı farklılıkları görülmektedir (Şekil 5). *O. anatolica* dizisinde motif tam olarak mevcutken, *P. chlorantha* dizisindeki delesyon ve *O. spitzelii* dizisindeki

transisyon görülmektedir. ITS1 bölgesi kapalı tohumlularda hem nükleotit hem de uzunluk bakımından oldukça değişken bir bölgedir (Won ve Renner, 2005). Orchidaceae familyası içerisinde bu denli değişimler tür seviyesinde ayırt ediciliğe katkıda bulunmaktadır.



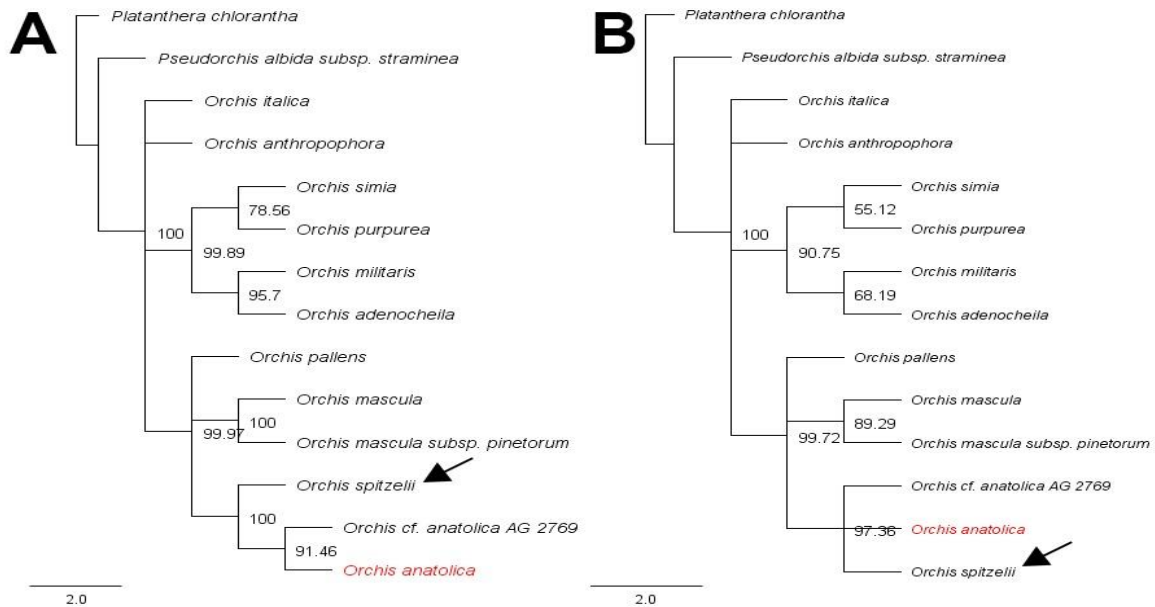
Şekil 5. ITS1 dizilerine ait sekonder yapı tahminleri ve motif farklılıkları. A) *O. anatolica*, B) *P. chlorantha* ve C) *O. spitzelii*. Motifler belirginleştirilmiştir.

## Filogenetik bulgular

Çalışmada ITS bölgesi elemanlarının filogenetik açıdan ne derece bilgi verici olduğunu göstermek için ITS bölgesini oluşturan her bir parça için ve ITS bölgesinin tamamı için filogenetik ağaçlar çizilmiş ve karşılaştırılmıştır (Şekil 6-7-8). *P. chlorantha*, ITS'nin tamamı, ITS1 ve ITS2 dizileri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlarda doğal dış grup olarak konumlanırken, 5.8S dizisi kullanılarak çizilen filogenetik ağaçta dış grup olarak konumlanmamıştır (Şekil 8). 5.8S bölgesinin rDNA genini kodlayan korunmuş bir bölge olduğu ve nükleotit değişimlerinin çok daha az olduğu bilinmektedir (Bailey, 2003). Filogeni öncesi yaptığımız biyoenformatik karşılaştırma analizinde de bu bölgenin parsimoni alan sayısının (3) diğer ITS elemanlarına göre çok daha az olduğu (30 ve 33) görülmüştür (Çizelge 2). Bu nedenle bu korunmuş bölgenin *Platanthera*, *Orchis* ve *Pseudorchis* cinsleri için ayırt edici özelliği bulunmamaktadır.

ITS dizisinin tamamı kullanılarak çizilen filogenetik ağaç üç ana kladdan oluşmaktadır

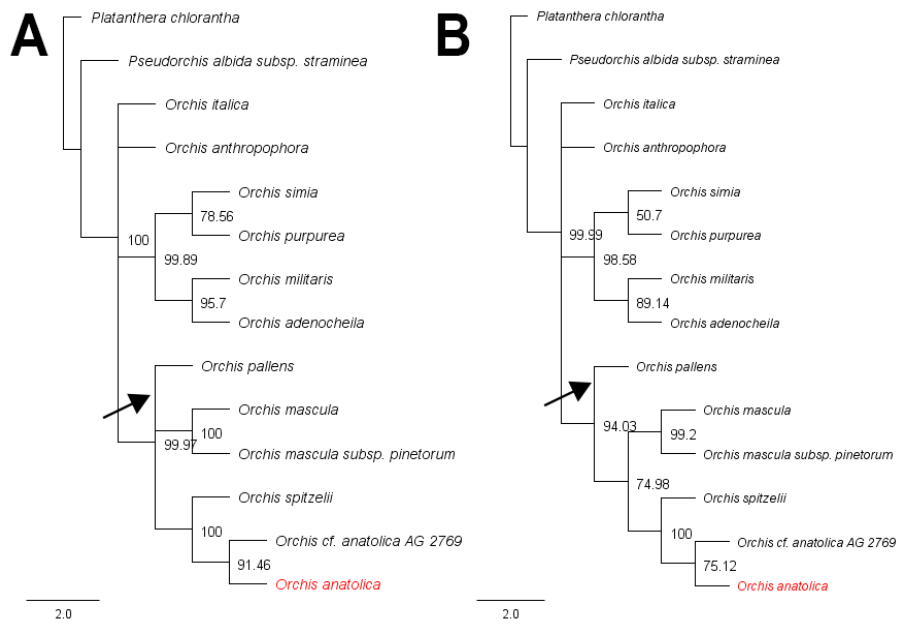
(*Platanthera*, *Pseudorchis* ve *Orchis*) ve ağaç topolojisi Bootstrap istatistik değerleri açısından yüksek oranda desteklenmiştir (Şekil 6). GenBank veri tabanından elde edilen *Orchis* cf. *anatolica* ve tarafımızdan dizilenen *O. anatolica* ağaç üzerinde aynı dal üzerine yerleşmiştir fakat iki örnek arasındaki tek nükleotit polimorfizmleri (SNP) bulunduğundan Bootstrap destek değeri %91.46 olarak hesaplanmıştır. *O. anatolica* türüne kardeş olan *O. spitzelii* ağaç üzerinde kardeş grup olarak doğru bir şekilde konumlanmıştır. Ağaçta ayrıca *Pseudorchis* cinsinin, *Orchis* cinsine kardeş olduğu görülmektedir ve Orchidinae alt oymağı filogenisini desteklemektedir (Jin ve ark., 2017). Sadece ITS1 dizisinin kullanıldığı filogenetik ağacın, ITS dizisinin tamamı kullanılarak çizilen ağaca son derece benzer olduğu görülmüştür (Şekil 6). Her iki ağaç arasında tek fark *O. spitzelii* türünün ITS1 ağacında *O. anatolica* grubunun içine dâhil olmasıdır. ITS1'deki 30 adet parsimoni alanının bu ayrımı yapmaya yeterli olmadığı görülmektedir.



**Şekil 6.** ITS dizisinin tamamı (A) ve sadece ITS1 dizisi (B) kullanılarak çizilen kladogramların karşılaştırılması. Ağaç topografisi arasındaki farklar ok işaretleri ile belirtilmiştir. Dallar üzerinde Bootstrap destek değerleri yüzde cinsinden verilmiştir.

ITS2 dizisi ile çizilen filogenetik ağacın topolojisi incelendiğinde, yine ITS dizisinin tamamı ile çizilen filogenetik ağaçla çok benzer olduğu görülmüştür (Şekil 7). İki ağaç arasındaki önemli fark ITS2 ile çizilen ağaçta *O. pallens* türünün *O. mascula*, *O. spitzelii* ve *O. anatolica* grubunun ortak ataları olarak görünmesidir. ITS ağacında *O. pallens* kardeş grup olarak görülmektedir. Filogeni açısından *O. pallens*

türünün *O. mascula* ile kardeş grup olduğu bilinmektedir (Aceto ve ark., 1999; Bateman, 2009). Bu nedenle ITS ağacının daha doğru bir filogenetik yaklaşım verdiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca ITS2 dizisinde Parsimoni alan sayısının (33) daha az olması *Orchis simia* ve *Orchis purpurea* türleri arasındaki ayrımın Bootstrap tarafından orta derecede (%50.7) desteklenmesine neden olmuştur

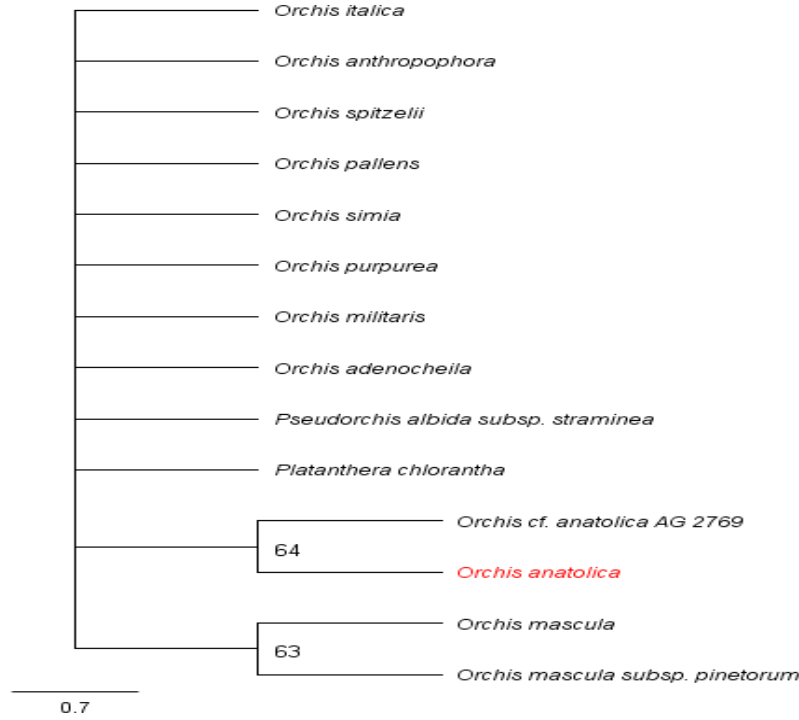


**Şekil 7.** ITS dizisinin tamamı (A) ve sadece ITS2 dizisi (B) kullanılarak çizilen kladogramların karşılaştırılması. Ağaç topografisi arasındaki farklar ok işaretleri ile belirtilmiştir. Dallar üzerinde Bootstrap destek değerleri yüzde cinsinden verilmiştir.

5.8S bölgesine ait filogenetik ağaç, filogeni açısından en az bilgi verici olandır ve tek kladdan oluşmaktadır (Şekil 8). Dış grup ana kladdan ayırlamamıştır. SNP bölgeleri aynı

türler arasında orta derecede desteklenen dalları oluşturmuştur. Bu bölgenin korunmuş bölge olması, ağacın çözünürlüğünün düşük olmasını açıklamaktadır.





**Şekil 8.** Sadece 5.8S dizisi kullanılarak çizilen kladogram. Dallar üzerinde Bootstrap destek değerleri yüzde cinsinden verilmiştir.

## SONUÇ

*O. anatolica* türünde ITS bölgesinin detaylı olarak incelendiği bu çalışmada, ITS bölgesinin tamamının *Orchis* cinsi içerisinde tür seviyesinde ayırt edebilme gücüne sahip olduğu, ITS elemanları içerisinde en fazla bilgi verici alanın ITS2, en az bilgi verici alanın ise 5.8S bölgesi olduğu görülmüştür. Bu bilgiler ışığında ITS bölgesinin, *Orchis* cinsi için yapılacak daha geniş kapsamlı filogeni çalışmaları için kullanımının uygun olabileceği sonucuna varılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Çalışmanın gerçekleştirilmesine katkıda bulunan Prof. Dr. Ahmet Gönüz, Prof. Dr. Kemal M. Taşkın, Dr. Öğr. Üyesi Necmettin Güler ve Dr. Fatih Sezer'e, değerli yorumları ile çalışmanın geliştirilmesine katkıda bulunan anonim hakemlere teşekkür ederiz. Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2010/05 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Aceto 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*, 13(1), 67–76. doi:10.1006/mpev.1999.0628
- Alvarez-Molina A ve Cameron KM, 2009. Molecular Phylogenetics of *Prescottiiinae* S.L. and Their Close Allies (Orchidaceae, Cranichideae) Inferred From Plastid and Nuclear Ribosomal DNA Sequences. *American Journal of Botany*, 96(5), 1020–1040. doi:10.3732/ajb.0800219
- Álvarez I, 2003. Ribosomal ITS Sequences and Plant Phylogenetic Inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 417–434. doi:10.1016/S1055-7903(03)00208-2
- Bailey C, 2003. Characterization of Angiosperm nrDNA Polymorphism, Paralogy, and Pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 435–455. doi:10.1016/j.ympcv.2003.08.021

- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS ve Donoghue MJ, 1995. The its Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82(2), 247–277.
- Bateman RM, 2009. Evolutionary Classification of European Orchids: The Crucial Importance of Maximising Explicit Evidence and Minimising Authoritarian Speculation. *Journal Europäischer Orchideen*, 41(2), 243–318.
- Bateman RM, Hollingsworth PM, Preston J, Yi-Bo L, Pridgeon AM ve Chase MW, 2003. Molecular Phylogenetics and Evolution of *Orchidinae* and Selected *Habenariinae* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 142(1), 1–40. doi:10.1046/j.1095-8339.2003.00157.x
- Campbell CS, Wright W, Cox M, Vining TF, Major CS ve Arsenault MP, 2005. Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) in *Picea* (Pinaceae): Sequence Divergence and Structure. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35(1), 165–185. doi:10.1016/J.YMPEV.2004.11.010
- Dizkırıncı A, İşler S ve Yiğit O, 2017. Molecular Phylogenetics of Some *Orchis* Species (Orchidaceae) Native To Turkey Using Nuclear and Chloroplast DNA Sequences. *Gazi University Gazi University*, 30(2), 35–43.
- Doyle ve Doyle JL, 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 15–87. doi:10.2307/4119796
- Feliner GN ve Rosselló JA, 2007. Better the Devil You Know? Guidelines for Insightful Utilization of nrDNA ITS in Species-Level Evolutionary Studies in Plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(2), 911–919. doi:10.1016/j.ympev.2007.01.013
- Gulyás G, Sramkó G, Molnár VA, Rudnóy S, Illyés Z, Balázs T, Bratek Z, 2005. Nuclear Ribosomal DNA ITS Paralogs as Evidence of Recent Interspecific Hybridization in The Genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47, 61–67.
- Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, Hajibabaei M, Ratnasingham S, van der Bank M, Little DP, 2009. A DNA Barcode for Land Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794–12797. doi:10.1073/pnas.0905845106
- Hürkan K, 2017. Karasal Bitkilerde DNA Barkodlama: Bazı DNA Barkod Bölgelerinin İncelenmesi. *International Journal of Innovative Approaches in Science Research*, 1(1), 57–67. doi:10.29329/ijiasr.2017.99.6
- Jin W-T, Schuiteman A, Chase MW, Li J-W, Chung S-W, Hsu T-C ve Jin X-H, 2017. Phylogenetics of Subtribe *Orchidinae* s.l. (Orchidaceae; Orchidoideae) Based on Seven Markers (plastid matK, psaB, rbcL, trnL-F, trnH-psba, and nuclear nrITS, Xdh): implications for Generic Delimitation. *BMC Plant Biology*, 17(1), 222. doi:10.1186/s12870-017-1160-x
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Drummond A, 2012. Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199
- Kreutz CAJ, 2009. Türkiye Orkideleri (Botanik Özellikleri, Ekolojik Özellikleri, Doğal Yayılış Alanları, Yaşam Tehditleri, Koruma Önlemleri). Rota Yayınları, İstanbul-Türkiye. ISBN: 9786054015078

- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C ve Tamura K, 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Higgins DG, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
- Mayer, Christoph, Phobos 3.3.11, 2006-2010.
- Pridgeon AM, Bateman RM, Cox A V, Hapeman JR ve Chase MW, 1997. Phylogenetics of Subtribe *Orchidinae* (Orchidoideae, Orchidaceae) Based on Nuclear ITS Sequences. 1. Intergeneric Relationships and Polyphyly of *Orchis sensu lato*. *Lindleyana*, 12(3), 89–109.
- Rudall PJ ve Bateman RM, 2003. Evolutionary Change in Flowers and Inflorescences: Evidence From Naturally Occurring Terata. *Trends in Plant Science*, 8(2), 76–82. doi:10.1016/S1360-1385(02)00026-2
- Sezik E, 1984. Orkidelerimiz Türkiye'nin Orkideleri. İstanbul-Türkiye. Sandoz Kültür Yayınları.
- Shipunov AB, Fay MF, Pillon Y, Bateman RM ve Chase MW, 2004. *Dactylorhiza* (Orchidaceae) in European Russia: Combined Molecular and Morphological Analysis. *American Journal of Botany*, 91(9), 1419–1426.
- Sramko G, Attila M V., Hawkins JA. ve Bateman RM, 2014. Molecular Phylogeny and Evolutionary History of the Eurasiatic Orchid genus *Himantoglossum s.l.* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 114(8), 1609–1626. doi:10.1093/aob/mcu179
- Swofford DL, 2003. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- The Plant List (2013). Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (Erişim tarihi 10.10.2018).
- White TJ, Bruns TD, Lee S ve Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky ve T. J. White (Ed.), PCR protocols: A guide to methods and applications içinde (ss. 315–322). San-Diego: Academic Press.
- Won H ve Renner SS, 2005. The Internal Transcribed Spacer of Nuclear Ribosomal DNA in the Gymnosperm Gnetum. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36(3), 581–597. doi:10.1016/j.ympev.2005.03.011
- Zimmer EA ve Wen J, 2012. Using Nuclear Gene Data for Plant Phylogenetics: Progress and Prospects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65(2), 774–785. doi:10.1016/j.ympev.2012.07.015