

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORCHIS LAXIFLORA VE
ORCHIS PUNCTULATA (ORCHIDACEAE)
TAKSONLARININ DNA SEKANS YÖNTEMİYLE
MOLEKÜLER FİLOGENETİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

CUMHUR DEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

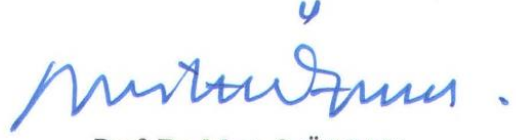
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Necmettin GÜLER

II. Danışman : Prof. Dr. Metin TUNA

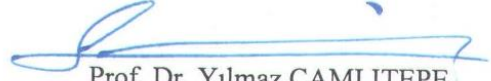
EDİRNE-2014

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylıyorum.




Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca (tarafımızca) okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Metin TUNA
İkinci Tez Danışmanı



Yrd. Doç. Necmettin GÜLER
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

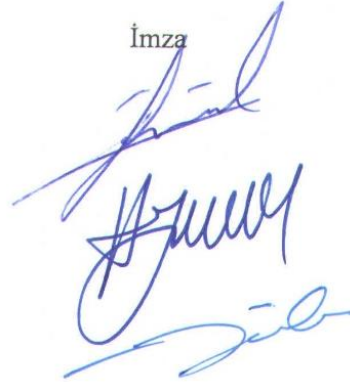
Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR

Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA

Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER

İmza



Tarih: 26/09/2014

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.



26/09/2014

CUMHUR DEMİR

Yüksek Lisans Tezi
CUMHUR DEMİR
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu tez çalışmasında Orchidaceae familyasına ait *Orchis laxiflora* ve *Orchis punctulata* taksonlarının, sistematik ve moleküler filogenetik özellikleri sahip oldukları genomik DNA'larının 18S ve ITS1 bölgeleri sekanslanarak ortaya konulmuştur.

Slika – jel yöntemiyle kurutulmuş bitki örneklerinin basal yaprak hücrelerinden genomik DNA'ları izole edilmiş ve 18S rDNA ve ITS1 bölgeleri önceden hazırlanmış primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. Bu çoğaltılmış bölgelerin DNA sekanslaması yapılarak elde edilen veriler, bazı biyoinformatik ve filogeni programları ile çalışılarak bu bitkilerin moleküler düzeyde sınıflandırılmaları ilk kez ortaya koyulmuştur. CLUSTALW2 yazılımı kullanılarak üzerinde çalışılan bitkilerin diğer Orchidaceae üyeleri ile olan hizalamaları tespit edilirken MEGA 4,0 (STABLE) yazılımının Neighbour – Joining (Saitou ve Nei, 1987) metoduyla da filogenetik ağaçları oluşturulmuştur. Hizalama sonucu oluşan matrix – join tablosu ve filogenetik ağaç oluşturma işlemi sonucu elde edilen veriler klasik taksonomi verileri ile karşılaştırılmıştır.

Bu tez çalışması ile *O. laxiflora* ve *O. palustris*'in *A. coriophora*, *A. morio*, *A. champagneuxii* ve *A. pyramidalis* ile ayrı bir grup oluşturduğu, *O. punctulata*'nın ise *O. italica*, *O. mascula*, *O. militaris*, ve *O. purpurea* ile ayrı bir grup oluşturduğu, ayrıca *O. punctulata*'nın *Orchis* cinsi içinde kalmaya devam etmesinin, *O. laxiflora* ve *O. palustris*'in ise *Anacamptis* cinsine aktarılmasının doğru olacağı sonuçlarına varılmıştır.

Yıl : 2014

Sayfa Sayısı : 73+xi

Anahtar Kelimeler : *Orchis laxiflora*, *Orchis punctulata*, Internal Transcribed Spacer, moleküler filogeni, taksonomi

Master's Thesis

CUMHUR DEMİR

Trakya University Institute of Natural Sciences

DETERMINATION OF MOLECULAR PHYLOGENETIC PROPERTIES OF ORCHIS LAXIFLORA AND ORCHIS PUNCTULATA (ORCHIDACEAE) TAXA USING THE TECHNIQUE OF DNA SEQUENCING

ABSTRACT

In this study systematic and phylogenetic properties of the taxons of *Orchis laxiflora* and *Orchis punctulata* from the *Orchidaceae* family were determined by sequencing 18S rDNA and ITS2 regions of their genomic DNA.

Genomic DNA's were isolated from basal leaf cells of plant samples which were dessicated by silica-gel method. The 18S rDNA an ITS1 regions were amplified by previously prepared primers. The classification of these orchid species at the molecular level was accomplished for the first time, by applying bioinfomation and phylogenesis programs on the data obtained from the DNA sequences of these amplified regions. CLUSTALW2 program was used to determine the leveling of the species in question, with the other *Orchidaceae* species. Their phylogenetic trees were built by using the Neighbour-Joining (Saitou and Nei, 1987) method of MEGA 4,0 (STABLE) program. The data obtained from the matrix-join table and phylogenetic trees were compared with the classical taxonomical data.

In conclusion, *O. laxiflora* and *O. palustris* were grouped together with *A. coriophora*, *A. morio*, *A. champagneuxii* and *A. pyramidalis*, in the same group, whereas

O. punctulata was grouped with *O. italica*, *O. mascula*, *O. militaris*, and *O. purpurea*. Therefore it was proposed to keep *O. punctulata* to belong to the genera *Orchis*, but *O. laxiflora* and *O. palustris* to be transferred to the genus *Anacamptis*

Year : 2014

Number of Pages :73+xi

Keywords : *Orchis laxiflora*, *Orchis punctulata*, Internal Transcribed Spacer, Molecular phylogeny, Taxonomy.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesini paylaşan, bana yol gösteren Tez Danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER ve II. Danışmanım Prof. Dr. Metin TUNA'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında başta Kaan HÜRKAN ve Vildan SALIK olmak üzere yardımlarını esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamın laboratuvar çalışmalarını üstlenen TUTAGEM'e teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi çalışmalarım süresince de bana destek olan çok kıymetli, sevgili anneme, babama ve eşime teşekkür ederim.

Bu çalışma Trakya Üniversitesi bilimsel araştırma proje birimi 2012/62 nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xi
BÖLÜM 1.....	1
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Orchidaceae familyasının genel özellikleri	2
1.1.2. <i>Orchis</i> L. Cinsinin Genel özellikleri ve Trakya’da bulunan türlerinin tayin anahtarı	7
1.1.3. Orkidelerin tıbbi ve ekonomik önemi	8
1.2 Barkodlama, moleküler taksonomi ve filogeni	10
1.2.1. Barkodlama hakkında genel bilgiler	10
1.2.2. Moleküler taksonomi ve filogeni	13
1.2.3. Nükleer ribozomal internal transcribed spacer (nrITS) bölgesi	14
1.3. Biyoinformatik	15
1.4. Çalışmanın amacı	17
BÖLÜM 2.....	19
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	19
2.1. Morfolojik çalışmalar ve Türkiye’de Orchidaceae familyası.....	19
2.2. Moleküler çalışmalar	23

BÖLÜM 3	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM	28
3.1. Materyal	28
3.2. Yöntem	29
3.1. Morfolojik yöntemler	29
3.2 Moleküler yöntemler	30
3.2.1. Bitki örneklerinin homojenizasyonu ve DNA izolasyonu	30
3.2.3. RAPD (Random amplified primer design) PCR (Polimeraz zincir reaksiyonları).....	31
3.2.4. Genomik DNA'ların 18S ve ITS gen bölgelerinin PCR'ı.....	32
3.2.5. Agaroz jel elektroforezi.....	33
3.2.6. PCR Saflaştırma	34
3.2.7. DNA dizileme	35
3.2.8. Biyoinformatik çalışmalar	36
BÖLÜM 4	37
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	37
4.1. Morfolojik bulgular	37
4.1.1. <i>O. punctulata</i> Steven ex Lindley	38
4.1.2. <i>O. laxiflora</i> Lam. Fl. Fr.ed. 1, 3:504 (1779).	40
4.2. Moleküler bulgular	45
4.2.1. RAPD (random amplified primer design) bulguları	45
4.2.2. 18S Sekans bulguları	48
4.2.3. 18S Sekans bulgularının NCBI sitesindeki verilerle karşılaştırılması ve Blast analizi.....	52
4.2.4. ITS sekans bulguları.....	53
4.2.5. ITS sekans bulgularının NCBI sitesindeki verilerle karşılaştırılması ve Blast analizi.....	56
4.3. Tartışma.....	58
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

bp;	Baz çifti
cm;	Santimetre
dk;	Dakika
DNA;	Deoksiribonükleik asit
EU;	European Norm
gr;	Gram
ITS;	Intenal Transcribed Spacer
IUCN;	International Union for Conservation of Nature
km;	Kilometre
mg;	Miligram
ml;	Mililitre
µl;	Mikrolitre
mm;	Milimetre
NCBI;	National Center for Biotechnology Information
ng;	Nanogram
PCR;	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol;	Pikomol

RNA;	Ribonükleik asit
rpm;	Revolution per minute
sn;	Saniye
TUTAGEM;	Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma Geliştirme Merkezi
U.V;	Ultraviole
V;	Volt

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Türkiye Florası'nda orkidelerin bulunduğu alanlar [8,75].....	21
Şekil 4.1. <i>O. punctulata</i> : A. Bitkinin genel görünüşü, B. Spika.	37
Şekil 4.2. <i>O. punctulata</i> araştırma bölgesindeki yayılışı.....	39
Şekil 4.3. <i>O. punctulata</i> 'nın Türkiye'deki yayılışı [8].....	39
Şekil 4.4. <i>O. laxiflora</i> : A. Bitkinin genel görünüşü, B. Spika.	40
Şekil 4.5. <i>O. laxiflora</i> araştırma bölgesindeki yayılışı.	44
Şekil 4.6. <i>O. laxiflora</i> Türkiye'deki yayılışı.	45
Şekil 4.7. 18S DNA bölgesinin farklı primerlerle PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü: M Markır, 1,2 <i>O. punctulata</i> , 3. <i>O. laxiflora</i> , 4. <i>O. palustris</i> ve 5. <i>F. sribnyi</i>	46
Şekil 4.8. Çalışılan türlerin filogenetik ağacı.	48
Şekil 4.9. Çalışılan türlerin 18S bölgesine göre NCBI sitesinden elde edilen verilerle elde edilen maksimum benzerlik prensibine göre filogenetik ağacı.....	53
Şekil 4.10. Çalışılan türlerin ITS bölgesine göre NCBI sitesinden elde edilen verilerle elde edilen maksimum benzerlik prensibine göre filogenetik ağacı.....	58

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1. Orchidaceae familyasının Dünyada'ki dağılışı [7].	1
Tablo 1.2. Dünya genelinde orkidelerin kullanım alanları [19].	9
Tablo 1.3. Türkiye'de salep elde edilen orkide cins ve türleri [11,26,27,28].	10
Tablo 2.1. Türkiye (Tr) ve Trakya (T)'da yayılış gösteren <i>Orchidaceae</i> üyeleri ve tür sayıları [76].	22
Tablo 3.1. PCR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri	31
Tablo 3.2. RAPD için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) protokolü	32
Tablo 3.3. 18S ve ITS gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) protokolü	33
Tablo 3.4. DNA dizisinin cycle sekans kit protokolü	35
Tablo 4.1. 18S DNA bölgesinin farklı primerlerle PCR'da oluşan bant sayıları ve baz çiftleri: M Markır, 1,2 <i>O. punctulata</i> , 3. <i>O. laxiflora</i> , 4. <i>O. palustris</i> ve 5. <i>F. sribnyi</i> .	47
Tablo 4.2. Çalışılan taksonlarının 18S hizalama (alignment) sonucu	49
Tablo 4.3. Karakter değişiklikleri listesi	50
Tablo 4.4. Apomorfi listesi	51
Tablo 4.5. Çalışılan türlerin kendi arasındaki distance matrix tablosu	52
Tablo 4.6. Çalışılan taksonlarının NCBI sitesinde elde edilen verilerle oluşturulan 18S bölgesine göre türlerin distance matrix tablosu	52
Tablo 4.7. Çalışılan taksonlarının ITS1 hizalama (alignment) sonucu	54
Tablo 4.8. Çalışılan taksonlarının NCBI hizalama (alignment) sonucu elde edilen distance matrix tablosu	57

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

Orchidaceae familyası ismini Tip cinsi olan *Orchis* cinsinden almıştır. Cezb edici, gizemli, egzotik görünüşleriyle insanların kalbinde ayrı bir yere sahip olan Orchidaceae familyasına ait taksonların tamamı orkide ismiyle bilinmektedir. Orkideler sadece insanların kalbinde değil sergiledikleri çeşitlilik sayesinde botanik dünyasında da dikkat çeken bir noktadadır. Yeryüzünde Orchidaceae familyasının içerdiği tür sayıları ile ilgili farklı bilgiler vardır; Arditti'ye göre, bitkiler aleminin en zengin familyası olan Orchidaceae; Sezik'e göre yaklaşık 450 cins ve 18.000-20.000 tür, Cullen'e göre 700 cins ve 22.000-25.000 tür ve Allaby'e göre yaklaşık 800 cins ve 18.000-22.000 tür içermektedir. Govaerts tarafından yapılan son bir çalışmaya göre yaklaşık 25.000 ismin işlem gördüğü ve bu sayının 30.000'i bulabileceği, çünkü her yıl yeni türlerin hızlı bir şekilde artarak yayımlanmaya devam ettiği ifade edilmektedir. KEW Garden kayıtlarına göre ise bu sayı 26.000'in üzerindedir ve her yıl 100 – 200 yeni tür bu sayıya eklenmektedir [1,2,3,4,5].

En sert koşullara sahip soğuk veya kurak iklimler hariç kuzeyde Alaska ve İsveç'den güneyde Tierra del Fuego ve Macquarie Adaları'na kadar Dünya'nın her yerinde orkidelere rastlamak mümkündür [6].

Tablo 1.1. Orchidaceae familyasının dünyadaki dağılışı [7].

Yayıllık Alanı	Cins Sayısı (adet)	Toplam Cins Sayısı
<i>Tropik Amerika</i>	250-270	740-840
<i>Tropik Asya</i>	260-300	
<i>Tropik Afrika</i>	230-270	
<i>Okyanusya</i>	50-70	50-70
<i>Avrupa ve Ilıman Asya</i>	40-60	60-85
<i>Kuzey Amerika</i>	20-25	
<i>Genel Toplam</i>		850-995

1.1. Orchidaceae familyasının genel özellikleri

Orkideler çok yıllık otsu bitkilerdir. Genellikle ototrofikler, bazen heterotrofik olabilirler, hatta bazen endotrofik mikorizalarla simbiyotik olarak hayatlarını devam ettirirler. Orkidelerin yaklaşık %70'i epifit, %25'i toprakta ve %5'i ise toprak altında, kayalar üzerinde, çürümekte olan bitkiler üzerinde, vb. şekilde yaşamını sürdürmektedirler [2,8,9].

Ekvatorial kuşağın “*Jungle*” denilen, çok sık ağaçlı veya yüksek yoğun otlu tropikal ormanlarında, ağaçların meydana getirdiği koyu gölge nedeniyle, zeminde bitki çok azdır. Bu yüzden bitkilerin büyük bir kısmı epifittir. Epifitizmin en çok bilinen karakteristik örneklerinden biri *Orchidaceae* familyasıdır. Dünyanın epifit florasının büyük bir kısmını- yaklaşık 2/3'ünü- orkideler oluşturmaktadır. Kültürü en fazla yapılan bitkilerin başında, gösterişli çiçekleri ile epifit orkideler gelmektedir. Ülkemizde de bunları bazı çiçekçilerde görmek mümkündür [1,2].

Orkidelerde boyları birkaç milimetreden metreye, ağırlıkları 1-2 gramdan birkaç tona kadar olabilen türlere rastlanmaktadır. Üstelik bu çeşitlilik bitkinin tüm kısımlarında kendini göstermektedir [10].

Toprakta yaşayan orta kuşak orkidelerinin, morfolojik olarak, toprak altı ve toprak üstü organlar taşıdığı görülmektedir. Toprak altı organları olarak, kök ve depo organları (yumru veya rizom) bulunmaktadır. Toprak altında rizom veya yumru olması, toprak üstü organları (gövde, yaprak ve çiçek durumu) tek yıllık otsu olan bu bitkilere, çok yıllık olma özelliği kazandırmaktadır.

Kökler *Listera*'da olduğu gibi saçak şeklinde, indirgenmiş lifli veya *Epipogium*'daki gibi korolloit, *Spiranthes spiralis*'daki gibi etli veya tuber (yumru) şeklinde olabilmektedir. Yumru bulunduran cinslerde, yumrunun şekli, sayısı ve büyüklüğü ayırt edici varyasyonlar gösterebilir. Yumrular elipsoit (*Himantoglossum*, *Orchis*,...), parçalanmış (*Dactylorhiza*, *Gymnadenia*,...) veya *Anacamptis*, *Neotinea*, *Orchis*, *Ophrys*, *Serapias* cinslerinde olduğu gibi yuvarlak ya da *Platanthera*'daki gibi uzamış olabilir. Yumrulu orkidelerde, genellikle her bitkinin iki yumru taşıdığı görülür. Bir önceki yılın yumrusuyla kışı toprak altında geçiren bitki bahar aylarına doğru ek köklerinden birinin kalınlaşmaya başlamasıyla ucunda bir yumru daha meydana getirir. Yeni yumrunun gelişmesiyle birlikte de yeni yılın sürgün sistemi oluşur. Bitki geliştikçe

oluşan yeni yumru da besin depolar ve gelişir. Eski yumru da kış aylarında besin deposunu tükettiği için içi boşalmış ve buruşmuş olarak yeni yumrunun yanında, ona yapışık bir halde bulunur [2,8].

Gövdeler toprak üzerinde dik, ince veya kalın, genellikle dallanmamış, üzerinde yaprak bulunduran bir görünümde ve uçta bir çiçek durumunu taşır. Toprak altı gövdeleri ise *Cephalanthera*, *Epipactis*, *Limodorum*, *Listera* cinslerinin bazı Tür'lerinde olduğu gibi metamorfoza uğramış ve besin depo eden rizom şeklini almıştır [1,2,8].

Yapraklar ince veya az çok kalın ve etli, basit ve tam, sapsız ve paralel damarlıdır ve ayrıca yaprakların şekilleri de linear, lanseolat, oblong, ovat veya orbikular gibi çeşitli şekillerde görülebilir. Yaprakların üst yüzeyleri genellikle parlak, alt yüzeyleri ise mattır. Yapraklar dizilişleri tabanda veya gövde üzerinde sarmal veya karşılıklıdır (*Listera*), nadiren de bulunmaz. Tabanda olanlarda yapraklar ise *Ophrys*, *Orchis* cinslerinde olduğu gibi gövdenin etrafında rozet oluşturacak şekilde, bir araya toplanmış ve toprağın üzerine yayılmış olarak bulunur veya *Orchis*, *Dactylorhiza*'da olduğu gibi gövde ile değişik açılar teşkil edecek şekilde yukarı doğru dizilmişlerdir. Gövde üzerinde sarmal dizilişli olanlar ise, çiçek durumuna kadar olan kısımda, ya *Orchis*, *Limodorum*, *Neottia*'daki gibi gövdeyi sararak bir kın meydana getirmişler ya da belirli aralıklarla düzgün şekilde, gövde üzerine aralıklı olarak dizilmişlerdir (*Cephalanthera*, *Epipactis*,...) [1,2,8,11].

Çiçek durumu, rasemus (salkım) olabildiği gibi birkaç veya çok çiçekli bir spika (başak) veya şeklinde de görülebilir. Çiçekler bir braktenin koltuğunda konumlanmıştır ve zigomorfik, boy, şekil ve renkleri çok değişken, genellikle resupinat (bükülmüş, burulmuş) şekillerde bulunurlar. Brakteler genellikle pulsu, zarsı, otsu veya yapraksı bir yapıya sahiptir. *Dactylorhiza*'da otsu *Orchis*'de ise zarsı braktelerin bulunması *Dactylorhiza* ve *Orchis* cinslerini ayıran temel özelliklerden biridir. Ovaryumdan daha uzun brakteler olabildiği gibi çok kısa pulsu bir yapıya indirgenmiş brakteler de görülebilir. Bazı türlerde ise bir kın gibi ovaryumun üzerinde sarıdır [2,8].

Orkidelerin çiçek yapılarında, pek çok bitkide olduğu gibi kaliks, korolla, erkek ve dişi organlar gibi kısımlar bulunur. Diğer Monokotillerde görülen üçlü gruplar halindeki çiçek yapıları orkidelerde de görülmektedir ancak birçok türde açıkça görülebilen 3 sepal ve 3 petal bazı türlerde değişikliğe uğradıkları için kolayca ayırt edilmezler. Periant yapısı iki halkadan oluşmaktadır. Birinci halkada üçü de birbirine benzeyen parçalı "sepal", içteki halkada ise ikisi eşit boydaki "petal" ve boyutları bu

ikisinden farklı olan “labellum” bulunur. Labellum genellikle renk, şekil ve yapı bakımından ileri derecede farklılaşma göstermektedir. Sepaller bir üçgen meydana getirecek şekilde dizilmiştir. Ortada veya üst tarafta bulunan sepallere “dorsal sepal”, yanlarda bulunan iki sepale ise “lateral sepal” adı verilir. Orkidelerin teşhisinde sepal ve petal yapılarının; renk, şekil, yapı, büyüklük ölçüleri, birbirlerine olan oranları ve yönleri (dik, iki yana açılmış, geriye kıvrılmış, öne bükülmüş) gibi özellikleri önemli ölçütlerdir. Sepallerin kolumna ve labellumun tabanını, bazen tamamını örtmesiyle miğfer”(başlık = galea, hood) adı verilen özel bir yapı oluşur. Miğfer üç sepalin birleşmesiyle veya yalnızca dorsal sepalin iki petalle birlikte ileriye doğru eğilerek birbirlerine yaklaşmasıyla meydana gelir. *O. morio* ve *O. pinetorum*’da miğfer gevşek yapılı veya *O. simia* ve *O. coriophora*’daki gibi bitişmiş olabilmektedir. Labellumlar diğer parçalardan daha büyük, orkide çiçeğinin en göz alıcı kısmıdır. Tamamı aynı renkte olabildiği gibi cins ve türlere göre çok değişik şekiller almıştır. Pek çok türde şekil ve renk bakımından çok büyük farklılaşmalar gösteren labellumlar canlı, çeşit çeşit renklerle bezenmiş çizgiler, benekler, lekeler veya kendine has desenler sergilemektedir. Labellum, *Orchis*, *Platanthera* cinslerinde basit, parçalanmamış (tam), *Anacamptis*, *Dactylorhiza*, *Orchis* gibi cinslerde parçalı olabildiği gibi *Ophrys* cinsinde de loblu veya karşı döllenmede böcekleri çekmek için belirli böceklere aşırı derecede benzeyen, özel şekiller almış olabilir. *Serapias*, *Epipactis*, *Cephalanthera* gibi loblu olan cinslerde labellum ortadan iki kısma ayrılmıştır. Bu iki kısımdan tabandaki parçaya “hipokil”, uçtakine de “epikil” denir. Çoğu türde görüldüğü üzere labellumun alt tarafı ters yönde uzamasıyla “mahmuz” adı verilen bir uzantı meydana gelir. Mahmuz, kısa veya uzun; ince veya kalın; konik, filiform veya genişlemiş; torba şeklinde, silindirik, uçta daralmış veya genişlemiş olabilir, değişik yönlerde uzayabilir ve genellikle iç kısmında nektar taşır [2,8].

Orkidelerin genelinde görüldüğü gibi gelişme devresinde üstte bulunması gereken labellum her çiçeğin kendi etrafında 180⁰ dönmesiyle çiçeğin alt kısmında konumlanır. Bu değişime “resupinasyon” (bükülme, burulma) denir. Orkidelerin büyük bir kısmında meydana gelen bu olay sonrasında ovaryum veya sapı halat gibi burulur. *Epipogium* gibi bazı cinslerde resupinasyon görülmez ve labellum çiçeğin üst kısmında normal halinde kalır [2].

Üreme organları, birlikte uzayarak kaynaşmış stigma, kolumna, anter ve iki kabul organının birleşmesiyle oluşan stigmalardan oluşur. Kolumna; stamenlerden oluşan

(ginostemiyum veya ginandriyum) bir organken, anter; merkezinde etli bir organ içeren (rostellum) iki lokuluslu, lokulusları bir dokuyla (konnektif) kaynaşmış, bazen uzamış gagamsı veya subulat şekilde, kolumna tabanının yakınlarında, her iki tarafta staminodlara indirgenmiş bir haldedir. Bir steril stigma rostellum şeklindedir ve bu rostellum anter ve fertil stigmaları birbirinden ayırır. Bazı cinslerde fertil 2 stigma, rostellum ve labellumun tabanı arasında meydana gelen “stigmatik oyuk” adı verilen bir oyuk içersine konumlanmıştır [2,8].

Polen tanelerinin birbirine yapışarak daha büyük bir kütle oluşturmuş haline monat adı verilir. Monat yapılarına *Apostasideae*, *Cypripedioideae* ve *Neottioideae*’de görülebilir. Diğer orkidelerde polen taneleri tetrat adı verilen dördü hücre gruplarından oluşur. Tetratlar ise sayısı iki sekiz arasında değişen poliniya olarak bilinen büyük kütlelerden oluşur. Poliniya 2 tane ve 2 veya 4 parçalıdır ve poliniyadaki polenler yapışma özelliği olan maddeler aracılığı ile bir arada tutulur. Poliniya ve polen tanelerinin özellikleri de taksonomik teşhislerde büyük öneme sahiptir. Poliniya, 1 veya 2 tane olabilen, yapışkan disk şeklinde olan ve viskidiyum adı verilen bir yapıya bağlanır. Poliniyanın viskidiyuma bağlandığı sap da kavdikula olarak bilinir. Bu yapıya “polinariyum” denir. Viskidiyum, polinariyumun olgunlaşmadan kurummasını engelleyen kapak şeklinde sarkık bir doku ile örtülüdür. Bu yapı rostellumun bir parçasıdır ve bursikula adını almıştır. Bazı orkide türlerinde iki (diandrous), bazılarında (sadece iki genusta) 3 fertil stamen bulunsa da çoğu orkide türü bir fertil stamene sahiptir (monandrous) ve stamenler daima çiçeğin bir tarafında yerleşmiştir [2,8,12].

Tozlaşma, özellikle arı, örümcek, sinek, eşek arısı, pervane gibi böceklerin vasıtasıyla (entomofil veya entomogam) olabildiği gibi arıkuşları da tozlaşmayı sağlar. Bu canlıları, genellikle mahmuzda bulunan nektar ve diğer salgılar cezp etmektedir. Tozlaşma aracısı canlı, mahmuzdaki nektara ulaşmak için labelluma konduğunda bursikula yerinden oynar, açılır. Viskidiyum ve dolayısıyla polinariyum böceğin baş veya toraksına yapışır. Viskidiyum tabanındaki yapışkan sıvı yaklaşık 30 saniye içinde kuruyup sertleşir ve bu yüzden polinariyum yapıştığı yerden kolayca ayrılmaz. Bu olayın hemen ardından polinariyum stigmaya temas edebilmek için kendi eksenini etrafında 90° kıvrılır ve öne doğru eğilir. Böylece böcek başka bir orkideyi ziyaret ettiğinde polinariyum sapı kuruyup 90° döndüğü için, stigma çukuruna temas edecek ve polenler stigmaya taşınmış olacaktır [2,13,14].

Ovaryum inferiyor (alt durumlu), sapsız veya nadiren saplı, kıvrılmış veya düz, plasentasyon parietal, olgun meyve kapsüldür [8].

Orkide tohumları minimum ağırlıkta maksimum hacme sahiptir ve içinde oval bir embriyo bulunduran genellikle şeffaf, çoğu kez fusiform şeklinde bir testadan meydana gelmektedir. Tohumlar sayılamayacak kadar çok sayıda, küçük, şeffaf, endospermasız ve fusiform şekildedir. Farklı orkide cinslerinde ve türlerde testa ve embriyo renk, şekil ve boyut açısından çeşitlilik gösterirler. Testa hücrelerinin duvarları düz olabildiği gibi kalınlaşmalar, retikülasyonlar veya katlanmalar da görülebilir. Tohumların göstermiş olduğu bu varyasyonlar orkidelerin taksonomisinde ayırt edici kıstaslar olarak kullanılmaktadır [15].

Tohum sadece testa ve embriyodan ibarettir yani embriyoda besidoku gelişmemiştir. Bu sayede besidokunun bulunması gereken yerde bir hava boşluğu oluşmuş ve tohumun rüzgârla uçuşması, havada daha uzun süre kalması, daha geniş coğrafyalara yayılması kolaylaştırılmış olur. Orkide tohumları su kaybından dolayı hacminin küçülmesini engellemek ve böylece minimum ağırlıkta maksimum hacimde kalabilmek için periklinal ve antiklinal yüzeylerinde kalınlaşmalar ve retikülasyonlar meydana getirmişlerdir [1,16,17,18].

Orkide tohumlarının çimlenebilmesi için düştüğü yerin ikliminin uygun ısı, ışık, oksijen, nem ve toprak şartlarına sahip olması gerekmektedir. Ayrıca orkide tohumları besidoku bulundurmadığı için tohumların düştüğü yerde embriyoya çimlenebilmesi için gerekli besini temin edecek mikrofungusların bulunması ve tohumun bunlarla infekte olması gerekir. Mikrofungus ortamdaki organik humusun parçalanmasıyla oluşan nişasta ve benzeri bileşikler, suda çözünen maddeler haline çevirerek genç orkide bitkisine gönderir. Başlangıçta orkide tohumuna parazit olarak infekte olan mikrofungus tohum tarafından asimile edilir ve sonraki süreçte tohum ile mikrofungus arasında mutualist bir ilişki başlar. Tohum çimlenmesinde önemli bir aşama da yumru veya köklerin ve toprak yüzeyine çıkmaya başlayan sürgün sisteminde ilk yaprakların oluşmasıdır. Yumru ve yapraklar ortalama 2-4 yıl gibi uzun yıllar sonunda meydana gelirler. Çiçeklenme için ise ortalama süre ise 9-12 yıldır. Bazı orkide türleri mikrofungustan ayrılırken bazıları ömür boyu ortak yaşama devam ederler [2, 11].

1.1.2. *Orchis* L. Cinsinin Genel özellikleri ve Trakya’da bulunan türlerinin tayin anahtarı

Parçalanmamış, küremsi veya elipsoit yumrulu çok yıllık dik, otsu bitkilerdir. Yapraklar beneksiz veya benekli, ± tabana yakın dizilmiştir. Spika brakte benzeri yapraklar tarafından sarılır, çok çiçekli, ± silindirik. Çiçekler sarı, mor ve kırmızının çeşitli tonlarında, nadiren beyazdır. Brakteler zarsıdır. Lateral sepaller yayılmış veya geriye doğru kıvrılmış veya bütün sepaller petallerle birlikte bir başlık (miğfer) şeklinde birbirine yaklaşmıştır. Labellum ± aşağı doğru yönelmiş, parçalanmamış (tam kenarlı) veya 3 loblu; orta lob parçalanmamış veya parçalanmış, tüysüz veya yukarıya doğru ± papillos, sakkat ve filiform şekilleri arasında bir mahmuz taşır. Anter ovaryuma bağlı kısa dik columna şeklinde, anter hücreleri (lokulus) rostellumun katlanmış orta parçasının arasına paralel yerleşmiştir. Polinarium 2 tane, topuz biçiminde kavdikula’ya doğru daralmış, yalnız bir kese içinde sarılmış olarak (bursikula) bulunur. Ovaryum silindirik, sesil, kıvrılmış, tüsüzdür.

Araştırma bölgesinde tespit edilen 13 *Orchis* türünün tayin anahtarı Türkiye Florası’ndan değiştirilerek hazırlanmıştır [8]:

1. Mahmuz kıvrılmış ve yukarıya doğru veya düz ve yukarı doğru yönelmiş, bazen ± yatay (nadiren aşağıya yönelir ama ucu daima yukarıya yönelmiştir: *O. anatolica*)
2. Çiçekler sarı veya sarımsı beyaz.....**11. provincialis**
2. Çiçekler kırmızıdan pembeye kadar, nadiren beyaz
3. Sepaller ve petaller birbirine gevşek bir miğfer şeklinde birbirine yaklaşmış
.....**7. morio** subsp. *morio*
3. Sepaller yayılmış, lateraller dik veya geriye doğru
4. Yapraklar rozette, oblong-lanseolat, ±obtuz veya akuminat, orman bitkisi
.....**10. pinetorum**
4. Yapraklar rozette değil, lanseolattan lineara kadar, uca doğru sivrilir, bataklık bitkileri
5. Labellum 3 loblu, daima beneksiz, lateral loblar belirgin şekilde geriye kıvrılmış, orta lob çok kısa, emerginat, bazen yoktur.....**13. laxiflora**
5. Labellum ± yassı, 3 loblu veya bazen tam, koyu mor benekli, orta lob lateral loblar kadar uzun**12. palustris**
1. Mahmuz belirgin şekilde aşağıya doğru yönelmiş
6. Labellum tam, bazen ön tarafında hafifçe emerginat

7. Labellum kenarı tam, mahmuz kısa konikten sakkata kadar **9. collina**
7. Labellumun kenarı krenat-undulat, mahmuz silindirik **8. papilionacea**
6. Labellum 3 loblu, orta lob \pm parçalanmış
8. Labellumun orta lobu oldukça küçük, üçgenimsi, akut **1. coriophora**
8. Labellumun orta lobu genişlemiş, iki lobüllü veya derin emerginat
9. Brakteler belirgin, göze çarpıcı, ovaryuma eşit uzunlukta, labellumun orta lobu \pm emerginat, bazen çentik dar sivri dişli **2. tridentata**
9. Brakteler ovaryumdan çok kısa, labellumun orta lobu derin bilobat, lobüller arasındaki diş belirgin
10. Labellumun orta lobunun parçaları lateral loblara benzer
11. Labellumun bütün lobülleri linear-obtus, hafifçe içe kıvrık **5. simia**
11. Labellumun bütün lobülleri lanseolat, akut, bazen zigzaglı veya \pm kıvrılmış
..... **6. italica**
10. Labellumun orta lobunun parçaları \pm eliptikten oblonga kadar veya geniş kuneat, lateral loblardan farklı
12. Labellumun lobları düzensiz krenulat veya dentat kenarlı, sepal miğferi koyu kahverengimsi mor **4. purpurea**
12. Labellumun lobları düz kenarlı, sepal miğferi kül grisi veya sarımsı yeşil
..... **3. punctulata**

1.1.3. Orkidelerin tıbbi ve ekonomik önemi

Dünyada orkideler gıda alanında, parfüm eldesinde ve tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Ayrıca süs bitkisi olarak da orkideler sektörde değerli bir yere sahiptir. Ülkemizde ise orkide türlerinden elde edilen salep asıl kullanım alanını oluşturmakta ve çok eski devirlerden beri bilinen özellikle afrodizyak amaçlı kullanılan bir ilaç olarak tanınmaktadır.

Orkide yumrularından salep ismi verilen sıcak bir içecek yapılır. Ayrıca dondurma vb. gıda maddelerinin yapımında ve süs çiçekçiliğinde de kullanılır. Son derece nadir ve pahalı bir bitki olan orkideler çok yüksek ekonomik değerlere sahiptir. Türkiye’de bulunan orkidelerin yaklaşık % 85’i yumruludur. Bu orkidelerin ise yaklaşık % 90’ı salep elde edilmekte kullanılır. Her yıl 100 den fazla taksona ait yumrular salep elde edilmek

üzere toplanmakta ve 40 tona yakın salep elde edilmektedir. Yapılan araştırmalara göre ortalama iki salep yumrusunun kuru ağırlığının yaklaşık 1 gr olduğu belirlenmiştir. Buna göre her yıl yaklaşık 80 milyon orkide bitkisinin salep elde edilmek üzere doğadan toplandığı bilinmektedir. Diğer taraftan şehirleşme, aşırı otlatma ve ormanların tarım arazisine dönüştürülmesi ve diğer tarımsal faaliyetler ile de orkidelere zarar verilmektedir. Bu durum bazı orkide türlerini nesillerinin yok olmasıyla karşı karşıya bırakmaktadır. Bu nedenlerle, Türkiye orkideleriyle yapılan çalışmalara önderlik yapan Ekrem Sezik, ülkemizdeki bütün yumrulu orkidelerin IUCN risk kategorilerine göre EN kategorisine alınmasını ve salep elde edilmesinin yasaklanmasını önermektedir. Ülkemizde ticari salep elde edilen 6 ana bölge belirlenmiştir. Bunlar; Kuzey Anadolu (Kastamonu), Güney Batı Anadolu (Muğla), Güney Anadolu (Antalya, Silifke), Güney Doğu Anadolu (Maraş Salebi, Çayır Salebi), Doğu Anadolu (Dağ Salebi, Çayır Salebi) ve İç Anadolu (Akdağ Madeni Salebi)'dir [20,21,22,23,24].

Tablo 1.2. Dünya genelinde orkidelerin kullanım alanları [19].

Sıra	Kullanım Alanı	Önemli Bazı Türler	Açıklama
1	Gıda	<i>Aceras, Anacamptis, Cephalanthera, Barlia, Dactylorhiza, Comperia, Coeloglossum, Epipactis, Goodyear, Gymnadenia, Himantaglossum, Limodorum, Listera, Neotinea, Neottia, Ophrys, Orchis, Platanthera, Serapias, Spiranthes, Traunsteinera</i>	vanilya, salep, dondurma, yoğurt, pasta yapımı
2	Parfüm-Koku	<i>Orchis punctulata</i>	-----
3	Tıbbi	<i>Vanda parviflora</i>	antikanserojen ve antiviral
4	Süs Bitkisi	<i>Dendrobium, Phalaenopsis, Vanda, Cymbidium, Paphiopedilum, Oncidium Phalaenopsis, Cattleya</i>	kesme çiçek, saksı bitkisi

Salebin gıda ve ilaç sanayinde kullanılması, ekonomik değerini artırmakta, bu durum ise orkideler üzerindeki baskıyı artırmaktadır. Türkiye’de yılda 120 milyon orkide sökülmektedir. Bu bitkilerin iki yumrusu vardır. Bunlardan birisi diğerinden daha küçük, kahverengi ve büzüşmüş yapılıdır. Diğer yumru ise daha büyük, şişkin ve parlak görünümlü olup, salep üretimi için bu yumru kullanılmaktadır. Sert ve şeffaf görünümlü olan yumrular 5-30 mm genişlik ve 10-40 mm uzunluğunda yumurta şeklindedir. Salep

orkideleri yaklaşık olarak % 50 bitki müsilağı, % 24 nişasta, % 1 şeker ve % 10 protein içerirler. Bu bileşenler salep olarak kullanımda önem taşımakla birlikte, salep nişastanın suda çözülen değişik bir türü olarak nitelendirilmektedir. Ancak salebin kimyasal yapısı tam belirlenememiştir. Sertliğı sağlayan glikomannan maddesi orkideler dışındaki bitkilerde de bulunabilmektedir. Türkiye’de bulunan 9 cinse ait 30 orkide türünden salep elde edilmektedir [25,26,27].

Tablo 1.3. Türkiye’de salep elde edilen orkide cins ve türleri [11,26,27,28].

Cins	Türler
1 <i>Aceras</i>	<i>A. anthropophorum</i>
2 <i>Anacamptis</i>	<i>A. pyramidalis</i>
3 <i>Barlia</i>	<i>B. robertiana</i>
4 <i>Dactylorhiza</i>	<i>D. iberica, D. osmanica</i>
5 <i>Himantoglossum</i>	<i>H. affine</i>
6 <i>Neotinea</i>	<i>N. maculata</i>
7 <i>Ophrys</i>	<i>O. bombyliflora, O. ferrumequinum, O. fusca</i>
8 <i>Orchis</i>	<i>O. anatolica, O. coriophora, O. italica, O. laxiflora, O. morio, O. pallens, O. palustris, O. pinetorum, O. provincialis, O. purpurea, O. sancta, O. simia, O. spitzelii, O. tridentata</i>
9 <i>Serapias</i>	<i>S. vomeracea</i>

1.2 Barkodlama, moleküler taksonomi ve filogeni

1.2.1. Barkodlama hakkında genel bilgiler

DNA barkodlama terimi, literatürde yaygın olarak kullanılmaya başlanan bir ifadedir. Bu yöntem temelde mitokondriyal DNA’nın 600-700 baz çifti uzunluğundaki standart bir bölgesinin hızlı, doğru ve otomatik bir şekilde tür tanımlamada kullanılmasına dayanmaktadır [29]. Fakat DNA barkodlamanın, incelendiğinde çok da yeni bir kavram olmadığı görülmektedir. “DNA barkodu” terimi ilk kez 1993 yılında, bilimsel çevrelerin çok da dikkatini çekmeyen bir çalışmada (Arnot DE, Roper C, Bayoumi RA. 1993) kullanılmıştır. Hatta moleküler araçlar kullanılarak tür tanımlamalarının gerçekleştirilmesi ifadesi, bundan da eski bir kavram olarak, Sanger dizileme tekniğinden de önce ortaya çıkmıştır. Fakat DNA barkodlamanın gerçek “altın

çağı” 2003 yılında başlamış ve konuyla ilgili yayınların sayısı hızla artarak, günümüzde bu konuda yayınlanmış makale sayısı 1000’i aşmıştır [30]. DNA barkodlamanın potansiyel kullanıcıları sadece taksonomistler değildir. Bu yöntem adli bilimler, biyoteknoloji, gıda endüstrisi, hayvan besleme, genetik çeşitlilik ve tür ayrımı gibi birçok alanda kullanılabilir bir araç olarak literatürdeki yerini almıştır [31].

Türlere özgü DNA profillerini ortaya çıkaran DNA barkodlama yöntemi, temelde basit bir önermeye dayanmaktadır. Bu önerme, organizmaların genomlarının küçük parçalarındaki DNA dizisi farklılıklarının herhangi bir canlının tür seviyesinde tanımlanmasını sağlayacak biyolojik barkodlar olarak kullanılabiliridir. Böylece, tanımlanamayan türlerin DNA dizileri ile DNA barkod veri tabanlarındaki DNA dizilerinin eşleştirilmesi yöntemiyle bu türlerin tanımlanmasını sağlayacak evrensel bir tür teşhis anahtarı oluşturulması mümkün olmaktadır. Kısa DNA dizilerinin kullanılmasının temelinde, dizinin tür içerisindeki farklılık seviyesinin türler arasındaki farklılık seviyesinden daha düşük olduğu varsayımı bulunmaktadır. Yöntem, canlılardan elde edilen doku örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmesi, bu DNA’nın PCR ile hedeflenen bölgenin çoğaltılmasında kullanılması ve çoğaltılan bölgenin DNA dizi analizinin gerçekleştirilmesi aşamalarından oluşmaktadır. Bu işlemler sonucunda elde edilen DNA dizileri türlerin tanımlanmasında kullanılan barkodlar olarak veri bankalarına kayıt edilmektedir [31].

DNA dizisi verilerinin işin içine girmesiyle filogenetik çalışmalarda son yirmi yılda çok önemli bir gelişme yaşanmış ve farklı canlı gruplarına yönelik geniş ölçekli projelerin sayısında artış görülmüştür. Moleküler filogeni temelli bir projede öncelikle analiz edilecek hedef grubun ölçeğinin (örneğin familya) belirlenmesi, hedef grubu temsil edecek taksonların belirlenmesi, DNA dizisi bilgilerinin elde edilmesi ve filogenetik ağaçların oluşturulmasında en uygun yöntemin belirlenmesi (*Maximum Likelihood*, *Maximum Parsimony*, *Bayesian analizi vb.*) gerekmektedir. Bu işlemler detaylı olarak farklı çalışmalarda anlatılmakla beraber güçlü bir şekilde desteklenebilen filogenetik ağaçların oluşturulmasında lokusların ve hedef grubu temsil edecek taksonların seçimi çok önemlidir. Kısa bir zaman öncesine kadar hedef gen seçiminde dizi analizinde sıkıntı yaratmayan özellikte dizilere sahip olan ve evrensel primerler ile çoğaltılabilen ribozomal genler tercih edilmekteydi. Fakat günümüzde, mevcut teknolojik gelişmeler ışığında daha stratejik gen seçimleri mümkün hale gelmiştir. Dolayısıyla, son zamanlarda

gerçekleştirilen çalışmalardaki filogenetik analizlerde farklı genomik kısımlardan (örneğin nükleus, mitokondri veya kloroplast), birden fazla lokustan, toplamda birkaç kilobaz uzunluğunda DNA dizileri elde edilmektedir. Böylece farklı taksonomik seviyelerden elde edilen filogenetik çözünürlüğün artırılması sağlanmaktadır [32].

- i. Bir gen bölgesinin DNA barkodu kadar kullanışlı olabilmesi için üç özelliğe sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler;
- ii. tür seviyesinde belirgin bir genetik varyasyon ve ayırım gücüne sahip olması,
- iii. geniş bir taksonomik ölçekten canlılar için uygun evrensel primerler ile çoğaltılabilen, korunmuş uç bölgelerine sahip olması,
- iv. DNA ekstraksiyonu ve PCR sırasında sorun yaratmayacak kısa dizi uzunluğuna sahip olması şeklinde sıralanabilir [33].

Geniş veri dijitalleştirme projeleri sayesinde, tüm dünyada biyoçeşitlilik çalışan araştırmacılar taksonomik literatüre rahatlıkla ulaşabilmektedir. İnternet erişimi tabanlı veri bankaları ile geçerli taksonomik isimlendirmeler ve sinonimlerinin de takip edilmesi kolaylaşmış durumdadır. Tüm bunlar çevrimiçi tür tayin anahtarları ve yüksek çözünürlükte dijital görüntüler ile birlikte değerlendirildiğinde taksonomik bilgi hiç olmadığı kadar kolay ulaşılabilir hale gelmektedir. Tüm bu gelişmelere rağmen morfolojik analizler halen ayırımı zor türlerin, larvaların, yavruların ve vücut parçalarının tür seviyesinde tanımlanmasına yetecek kadar olanak sağlamamaktadır. Türlerin daha iyi karakterize edilmesi ve tanımlanmasında, morfolojik tanımlanması gerçekleştirilmiş örneklerden elde edilen standart, referans DNA dizilerinden yararlanılabilir. Çok geniş taksonomik ölçekteki örnekler arasından elde edilen belirli standartta DNA dizileri herkesin ulaşabileceği ortak bir veri tabanı altında toplanabilir. Bilinmeyen türlerin tanımlanması için bu şekilde bir veri tabanının oluşturulması ve kullanılması zorunludur [34].

Barkodlama yolu ile tür tanımlanması genel olarak, incelenen örnekten elde edilen genomun standart bir kısmından elde edilmiş ve DNA barkodu adı verilen kısa DNA dizisinin kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Bilinmeyen tür örneklerinden elde edilen bu barkod dizileri, tanımlanması gerçekleştirilmiş ve veri tabanına kaydedilmiş barkodlar ile karşılaştırılır. Veri tabanında kayıtlı barkodlardan biri ile eşleşirse tür tanımlaması gerçekleşir. Eşleşme gerçekleşmediği takdirde, benzerlik oranlarına göre, kayıtlı türlere

ilişkin yeni bir barkod kaydı olarak (haplotip veya coğrafik varyete) veya potansiyel yeni bir tür olarak değerlendirilir [32].

Barkodlama çalışmaları genel olarak belirli taksonomik gruplardan örneklerin elde edilmesi (mümkünse morfolojik karakterler gibi klasik taksonomik yöntemler kullanılarak tanımlanması), DNA barkod dizilerinin (COI geninin 655 baz çiftlik kısmı) elde edilmesi ve diğer bilgiler ile bir araya getirilerek kataloglanması şeklinde yapılmaktadır. DNA barkod verilerinin analiz aşaması ise elde edilen nükleotid dizilerinin hizalanması ile başlar. Hizalanan diziler, kontrol amacı ile kodon analizinden geçirilir ve herhangi bir delesyon, insersiyon veya stop kodon oluşumu olup olmadığı tespit edilir. Ardından Kimura 2-parameter (K2P) modeline göre genetik uzaklık matrisi oluşturulur ve karşılaştırılan diğer türler ile ilişkisi neighbor-joining (NJ) yöntemine göre çizilen ağaçlar ile gösterilerek tür içi ve türler arası sonuçları değerlendirilebilmektedir [33].

1.2.2. Moleküler taksonomi ve filogeni

Canlıların taksonomik yerlerinin kesin olarak belirlenebilmesi için kimi zaman değişik türler arasında morfolojik ve anatomik özelliklerin farklılıkları yeterli olmamaktadır. Ayrıca canlıların yaşadıkları farklı habitatlar da morfolojik ve anatomik yapılarında farklı değişimler meydana gelmesine neden olacağından, aynı türlere ait bireyler morfolojik ve anatomik olarak birbirinden farklılıklar gösterebilirler. Taksonomik çalışmalarda bizi genetik yapıdan faydalanmaya iten en önemli neden de genotipin fenotipten daha üstün, kararlı bir yapıya sahip olmasıdır. Bir karakteri birden fazla lokusun belirlemesi, bir genin birden fazla karakteri etkilemesi ve genotip-çevre etkileşimi gibi ilişkiler morfoloji yoluyla elde edilen bilgilerin tek başına yeterli olmasını engellemektedir [35].

Delforge'e göre; günümüzde moleküler taksonomi büyük hızla gelişen ve en çok tercih edilen sistematik metodu olarak gösterilmektedir. Bunun sebepleri ise: klasik sınıflandırma yöntemlerinin karmaşık bitki gruplarının tayininde yetersiz kalması, melez türleri tanımlamada morfolojik, anatomik, vb yöntemlerin yetersizliğinden dolayı hataların yaşanması, yeni keşfedilen canlıların mevcut sistematik birimlere dahil edilmesinde yaşanan sıkıntılar ve moleküler biyoloji tekniklerinin hızlı gelişimi olarak belirtilmiştir [36].

Bitkiler aleminin geniş taksonlarında habitat farklılıkları, iklimik faktörler, kozmopolit yayılış, sık hibritleşme potansiyeli, toprak yapısının değişkenliği gibi çeşitli sebeplerden dolayı genotipik ve fenotipik varyasyonlar ortaya çıkmaktadır. Klasik taksonomi yöntemleri bu çeşitlilikleri yorumlamakta yetersiz kalıp aynı türün varyasyonlarını farklı türlermiş gibi teşhis ederek sistematik hatalara yol açmaktadırlar. Genetik karakterizasyon ve klasik sistematik yöntemlerinin birleştirilmesi sonucu ise canlıların adlandırılması doğru yapılmakta ve filogenetik ağaçlara doğru olarak yerleştirilerek akrabalık ilişkileri hatasız olarak belirlenmektedir. En kesin ve kaliteli sınıflandırma, evrimsel sürecin işler halde olduğunu göstermekte ve bununla birlikte canlıların tarihsel ilişkilerine ışık tutmaktadır [36]

Günümüzde, taksonomik özellikleri ve filogenisi araştırılan bir canlının farklı bir anatomik, fizyolojik ve morfolojik özellik göstermesi farklı bir tür veya alttür olarak teşhisinde yeterli bulunmamaktadır. Çünkü bir türe ait bireyler içinde buldukları farklı ekolojik uyarlardan dolayı farklı fenotipik ve genotipik varyasyonlar geliştirebilirler. Jens Causen, David Kech ve William Heisey (1958)' in kayıtlarına göre canlıların özellikleri sadece genetik faktörler tarafından değil, buldukları ekolojik çevre tarafından da belirlenebilmektedir [37].

Filogenetik sistematik; hem nesli tükenmiş hem de yaşayan canlı türleri arasındaki evrimsel ilişkileri tanımlayan ve anlamaya çalışan, biyolojinin bir çalışma alanıdır. Bir türün evrim tarihini, dolayısıyla onun filogenisi, soy veya onların organ ve parçalarını ve genetiksel ilişkilerini açıklar. Moleküler filogeni ise DNA ve proteinlerdeki değişimlerin oranlarını ve şeklini belirleyerek, genlerin ve organizmaların evrimsel tarihini yeniden düzenlemeye çalışır [38]. Bu ifadeden de anlaşıldığı gibi moleküler filogeni; geçmişte yeryüzünde yaşadığı bilinen ancak çeşitli sebeplerden dolayı seleksiyona uğramış türlerin günümüzde yaşayan hangi canlılarla ne derecede akrabalık ilişkilerinin bulunduğu, bir türün yeryüzünde ortaya çıktığı günden itibaren genotipik, fenotipik, morfolojik vb özellikler bakımından ne gibi değişimler gösterip geçmişte hangi canlıdan köken almış olabileceği gibi sorulara cevap aramaktadır.

1.2.3. Nükleer ribozomal internal transcribed spacer (nrITS) bölgesi

Kodlanmayan iki değişken bölgeden meydana gelen ITS bölgesi, oldukça korunmuş küçük alt birim (SSU) ile 5.8S alt birimi arasında (ITS1 bölgesi) ve de büyük

alt birim (LSU) rRNA genleri ile 5.8S alt birimi arasındaki bölgede (ITS2) yer almaktadır. ITS bölgesi 4 temel nedenle moleküler karakterizasyon çalışmaları için özellikle kullanışlıdır [40,41,42]: (i) ITS bölgesi nisbeten küçüktür (500-800 bp) ve evrensel tek bir primer çifti (rRNA alt birimleri içindeki korunmuş bölgelerin komplementeri) kullanılarak PCR ile kolaylıkla çoğaltılabilir (ii) rDNA birimlerinin çok sayıda tekrarlarının olması nedeniyle, seyreklik ya da oldukça degrade olmuş DNA örneklerinden bile ITS bölgesi kolaylıkla çoğaltılabilir (iii) morfolojik açıdan farklı türler arasında ITS bölgesi yeterince değişken olabilir ve bundan dolayı ITS-RFLP restriksiyon verileri genetik uzaklığı tahmin etmek için kullanılabilir böylece filogenetik ve sistematik analizler için karakterler sağlayabilir (iv) ITS türe özgü problemleri, bir kromozomal kütüphane oluşturmaya gerek kalmaksızın hızlı bir şekilde PCR ile üretilebilir. Bir çok araştırmacı dizilerin tekrarlayan birimler şeklinde olması ve türler arasında değişken, tür içinde benzer olma eğiliminde olmasından dolayı, türe özgü problemleri geliştirmek için dizileri ITS bölgesinden seçmektedir.

Gernandt ve Liston'a göre ITS bölgesi angiosperm üyelerinde yaklaşık 565 – 700bp uzunluğunda iken, gymnosperm üyelerinde ise daha uzundur (1550 – 3125bp) [42]. Yüksek bitkilerde nükleer ribozomal RNA (*nrDNA*) genleri art arda gelen uzun tekrarlar oluşturur ve her biri 18S, 5.8S, 28S *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 [43].

1.3 Biyoinformatik

Biyoinformatik terimi ilk defa 1990'larda kullanılmıştır. Biyoloji ve enformasyon teknolojilerinin birleşimi olarak doğan biyoinformatik çok sayıda verinin bilgisayar programları ile analiz edilip birbiriyle ilişkilendirildiği bilim dalı haline gelmiştir. Bunun yanı sıra önceki bilimsel araştırmalardan elde edilen sonuçların arşivlenip veritabanları oluşturulması, taranması ve kayıt edilmesi işleri de biyoinformatik biliminin dahilindedir.

Günümüzde biyoinformatik terimi birçok farklı biyolojik veri ile ilişkili olarak kullanılmaktadır ve özellikle DNA, RNA ve proteinlerin analizleri ve yönetimlerinin yeni

nesil ismi olmuştur. 1960'lardan beri hesaplamaya dayalı sekans analiz araçları kullanılmaktadır ancak sekans tekniklerinin gelişimi, sekans verilerine ulaşılabilecek veritabanlarının kuruluşu ile birlikte hızlı bir gelişim göstermiştir.

Biyoinformatik sadece bilgisayar teknolojisine bağlı bir bilim olmamakla birlikte; (i) birçok biyoinformatik probleminin milyonlarca defa tekrar edilmesi gereken durumların varlığı. Örneğin; her yeni bir sekansı, veritabanında var olan sekanslarla karşılaştırmak için, (ii) bilgisayarlara problem çözme güçleri için ihtiyaç vardır. Örneğin; amino asit sekansı verilmiş bir protein için katlama yollarının oluşturulması gibi iki sebepten dolayı bilgisayarlar biyoinformatik bilimi için önemlidir [44,45].

İnternet 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

Elde edilen veriler bilgisayar programları tarafından işlenip analiz edileceği için söz konusu veriler metin dosyası haline getirilmelidir. Bu şekilde verilerin bilgisayar ve insanlar tarafından görülüp okunmasındaki sorunlar engellenmiş olacaktır. Biyoinformatik veritabanlarına gönderilecek sonuçları içeren sekans bilgileri de pek çok veritabanında kullanılan standart bir düzende hazırlanmalıdır. Bu formatlardan; FASTA, GDE ve NBRF/PIR en yaygın olarak kullanılanlarıdır. Veritabanlarında kullanılan bu formatlar aynı zamanda hizalama (alignment) işlemi için de kullanılabilir ancak MSF, PHYLIP ve CLUSTALW/X yazılımının ALN formatı gibi hizalama için tasarlanmış başka özel formatlar da bulunmaktadır [45].

1.4. Çalışmanın amacı

Çalışmamızın amacı, klasik sistematik yöntemler kullanılarak tanımlanan *Orchidaceae* familyasının iki üyesini (*Orchis laxiflora* ve *Orchis punctulata*) moleküler sistematik yöntemleri kullanarak yeniden teşhis etmektir. Çünkü günümüz taksonomi biliminde canlıların türlerinin ve diğer canlılarla olan akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde, filogenetik ağaçlardaki yerinin hatasız ve kesin bir şekilde tespitinde klasik sistematik yöntemlerin yetersiz kaldığı görülmektedir. *Orchidaceae* familyasının yeryüzünde en geniş yayılış gösteren bitki taksonlarından biri olması, çok sayıda hibrit örneğinin bulunması, tıbbi alanda kullanılan türlere sahip olması, bazı ticari girişimlerde ekonomik gelir sağlaması ve estetik açıdan pek çok insanda ayrıcalıklı bir yere konulması bu familya üyelerinin tek tek taksonomik tespitlerinin yapıp filogenetik ağaçlarının çıkarılması, veritabanlarının oluşturulması için geçerli sebeplerdir. Gelişmiş ülkelere bakıldığında gerek siyasi otoritelerden gerek sivil toplum örgütlerinden gerekse şahsi girişimlerden aktarılan kaynaklar ile ülke coğrafyasının sahip olduğu biyolojik çeşitliliği araştırıp tüm yönleriyle açığa çıkarmak için yoğun çalışmalar olduğu görülmektedir. Ülkemizde ise bu yöndeki çalışmaların önemi henüz anlaşılmaya başladığından, sahip olduğumuz canlı çeşitliliğinin araştırılması, tespiti ve insanlara tanıtılması için daha donanımlı bilim insanları yetiştirilmekte ve bilim insanlarına daha fazla kaynak ve olanak sağlanmaktadır. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda yaptığımız çalışmanın ülkemizdeki *Orchidaceae* familyasının çeşitliliğinin ortaya çıkarılmasında büyük yarar sağlayacağı görülmektedir. Ayrıca araştırma sonucu elde ettiğimiz bilgilerin dünya literatürlerinde ilk kez yayımlanacak sonuçlar içermesi çalışmamızın önemini daha da arttırmaktadır.

Trakya Bölgesinde Gelibolu Yarımadası'ndan, Yıldız Dağları ve çevresinden, Saroz Körfezi civarından topladığımız, klasik taksonomi sonuçlarına göre aynı türe ait olduğu düşünülen bitki örneklerinin moleküler taksonomi yöntemleri ile tür tespitlerinin yapıldığı bu tez çalışmasında yaşadığımız yakın çevremizdeki orkide çeşitliliğini ortaya çıkarmak da amaçlanmıştır. Farklı coğrafyalarda yaşayan ve klasik tasonomiye göre aynı tür olan canlıların moleküler genetik düzeyinde de aynı olup olmadığının araştırıldığı çalışmalar sayesinde daha kesin sonuçlar elde edileceği ve daha güvenilir veritabanları oluşturulacağı aşikardır. Zira yakın geçmişte icat edilip çeşitli yöntemlerle geliştirilen, bilimsel çalışmalarda daha hızlı ve kolay sonuç alınmasını sağlayan barkodlama tekniği

moleküler sistematik çalışmalarının en güçlü destekleyici elemanı olarak göze çarpmaktadır. Barkodlama tekniğinin moleküler sistematığe hız, kolaylık ve kesinlik kazandırmasının yanı sıra tehlike altındaki türlerin tahrip edilmeden teşhis edilebilmesine olanak sağlaması da önemli bir özellik olarak gösterilebilir. Araştırılacak bitkinin tam olarak elde edilemediği durumlarda bile sadece kök, yaprak gibi küçük bir parçası kullanılarak bile teşhisine imkan veren moleküler taksonomi ve barkodlama tekniğinin morfolojik ve anatomik içerik açısından büyük benzerlik gösterdiklerinden dolayı karıştırılan taksonların daha doğru ve kesin teşhislerinin yapılabilmesi, hibritleşmiş orkide türlerinin ne derecede hibritlik gösterdiklerinin tespiti, kökenlerinin hangi taksonlara dayandığının saptanmasında güvenilir sonuçlar vermesi bu yöntemin yakın gelecekte daha da geniş alanlarda kullanılacağıının habercisi olarak nitelendirilebilir.

Bu amaçla bu çalışmada *O. laxiflora*, *O. punctulata* türlerine ilave olarak, karşılaştırma amacı ile *O. laxiflora* ile aynı ortamları paylaşan *O. palustris* türü ve dış grup olarak orkidelere yakın olan Liliaceae familyasından *Fritillaria sribnyi* Velen türü seçilmiştir. Bu şekilde aralarındaki farklılıkların daha iyi anlaşılacağı düşünülmüştür.

BÖLÜM 2

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Morfolojik çalışmalar ve Türkiye’de Orchidaceae familyası

Ülkemiz orkideleri hakkındaki en geniş çalışmalar; J. Renz ve G. Taubenheim’in Flora of Turkey’de yazdığı Orchidaceae familyası, Sezik’in yazdığı Orkidelerimiz ve en son olarak Kreutz’un Almanca ve Türkçe olarak yazdığı Türkiye Orkideleri adlı eserlerinde verilmektedir. Kreutz’un bu eserinde ülkemizde doğal yayılış gösteren 170 orkide taksonu renkli resimleri ile birlikte yayılış alanları Türkiye haritası üzerinde işaretlenerek gösterilmiştir. Ayrıca bu eserde Türkiye orkidelerinin, botanik özellikleri, ekolojik istekleri, doğal yayılış alanları, yaşam tehditleri ve koruma önlemleri oldukça ayrıntılı bir şekilde verilmiştir [2,8,46,47].

Türkiye’de doğal yayılış gösteren orkideler de orta kuşak orkideleridir. Bu orkideler toprakta yaşar, yaşadıkları bölge ve yer göz önüne alınarak orta kuşak orkideleri veya toprak orkideleri olarak adlandırılırlar. Orta kuşak orkideleri, morfolojik olarak toprak altı ve toprak üstü organlar taşımaktadır. Toprak altı organı olarak kök ve depo organ (yumru veya rizom) bulunmaktadır. Toprak altında yumru veya rizom bulundurmaları, toprak üstü organları (gövde, yaprak, çiçek) tek yıllık otsu olan bu bitkilere çok yıllık olma özelliği kazandırmaktadır. Ülkemizde doğal yayılış gösteren orkidelerin büyük çoğunluğu ototrof, az bir kısmı saprofittir. Anadolu orijin merkezi olarak adlandırılan gen merkezlerinden Küçük Asya ve Akdeniz gen merkezlerinin sınırları içinde yer almasından ve sahip olduğu iklim, toprak, fitocoğrafik bölge ve jeolojik yapı özelliklerinden dolayı çok zengin bir floraya sahiptir. Doğal olarak genel floradaki bu zenginlik orkide zenginliğine de yansımaktadır.

Türkiye orkide bakımından Avrupa ve Ortadoğu’nun en zengin coğrafyalarından biridir. Ülkemizin hemen her yerinde değişik orkide türlerine rastlanabilir. Ülkemiz

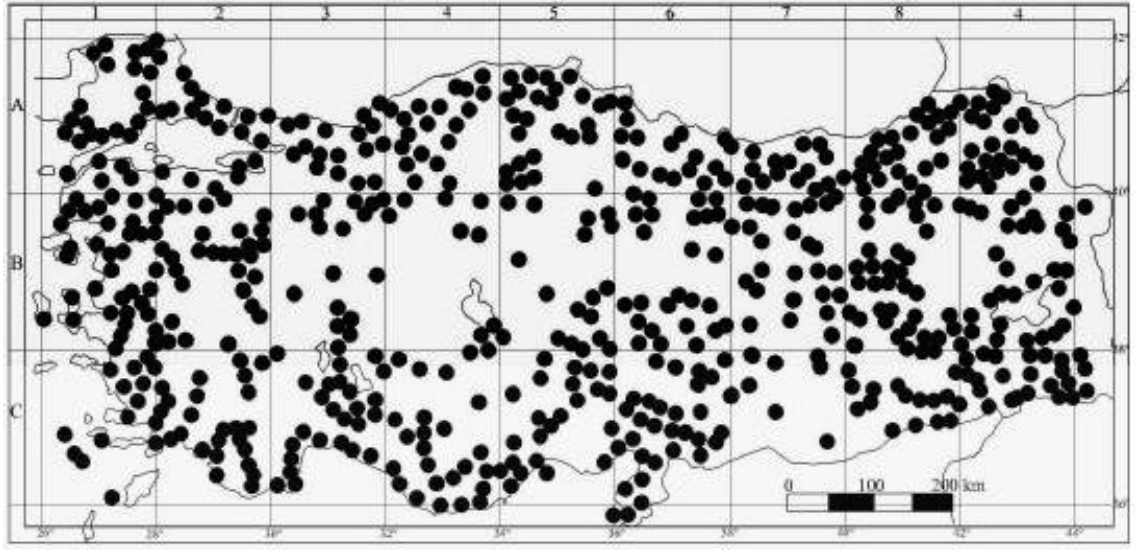
orkideleri ile ilgili ilk bilgi Boissier tarafından verilmiştir. Bu çalışmada Türkiye’de 15 cinse ait 60 türün yayılış gösterdiği bildirilmiştir [48].

Daha sonra çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında Türkiye orkidelerinin cins, tür, varyete sayıları ile yayılışları verilmiş, bazılarında ise orkidelerle ilgili anatomik, morfolojik ve korolojik bilgiler verilmiştir. Orkidelere özel bu çalışmaların dışında ülkemizde yapılan çok sayıdaki floristik çalışmayla da Türkiye orkideleri ile ilgili önemli veriler elde edilmiştir. Söz konusu bu çalışmaların dışında, orkidelerin ekonomik, moleküler, eczacılık, ekolojik, korolojik, etnobotanik, doku kültürü, anatomik ve morfolojik açıdan incelendiği bazı çalışmalarda gerçekleştirilmiştir [49-61].

En son literatür bilgilerine göre; ülkemizde Orchidaceae familyası, 24 cinse ait 170 takson ile temsil edilmektedir. Bu taksonlardan 146’sı tür, 32’si alttür ve 10’u varyete kategorisindedir. Türkiye’nin Tehdit Altındaki Nadir Tür ve Endemik Bitkilerini risk kategorilerine göre sınıflandıran Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı’nda sadece endemik olan 14, endemik olmayan 10 orkide taksonunun tehlike kategorileri belirtilmiştir. Diğer taraftan, CITES (*The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*)’in listesinde ise Türkiye orkidelerinden 55 takson yer aldığı görülmektedir [62,63]

Trakya orkideleri üzerinde yapılan ayrıntılı çalışmalar ise azdır. Yapılan literatür araştırmalarında Trakya Bölgesi’nde *Orchidaceae* Familyası ile ilgili bilgi veren en eski kaynaklardan biri Trakya Florası Webb tarafından yapılmış ve bu çalışmada Trakya’da 31 taksonun bulunduğu belirtilmiştir [64]. Trakya Bölgesinde orkidelerle ilgili ilk ayrıntılı çalışma Ertem tarafından *Ophrys bombyliflora* Link. üzerinde yapılmış morfolojik çalışmadır [66]. Türkiye Florası ile ilgili en önemli floristik çalışmalardan biri olan Flora of Turkey and East Aegean Island adlı eserin 8. cildinde Trakya bölgesinde 30 taksonun varlığı belirtilmektedir [8]. Türkiye orkideleri ile ilgili bir başka önemli eser olan Orkidelerimiz 22 takson bulunmaktadır [2]. Edirne ili *Ophrys* L. türleri ile ilgili (*O. sphegodes*, *O. mammosa*, *O. oestrifera* subsp. *oestrifera*, *O. apifera*) Dane ve Aybeke [67], Olgun ve Aybeke [68], Aybeke [69,70,71], Aybeke ve ark. [72], tarafından yapılmış karyolojik, morfolojik ve tohum morfolojisi üzerine araştırmalar bulunmaktadır. Edirne ili *Orchis* L. türlerinin (*O. morio*, *O. laxiflora*, *O. mascula*, *O. purpurea*, *O. tridentata*, *O. simia*) Güler ve Başak [73] ve Güler [74] tarafından morfolojik, korolojik, palinolojik

ve karyolojik araştırmalar yapılmıştır. Bölgede orkidelerle ilgili olarak yapılan en detaylı çalışmalardan biri Olgun, Sezik ve Aybeke [72], tarafından yapılan ve T.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenen (TÜBAP-396) proje ile 40 taksonun incelendiği “Trakya Orkideleri Üzerinde Anatomik Araştırmalar” başlıklı çalışmadır. Bu alışma bölge orkideleri ile ilgili çok önemli bir çalışma olmasına rağmen sadece anatomik çalışma olması nedeniyle yetersiz kalmaktadır. Trakya Bölgesi orkidelerinin ayrıntılı morfolojik özellikleri ve dağılımları ortaya konulmamıştır.



şekil 2.1. Türkiye florasında orkidelerin bulunduğu alanlar [8,75].

Tablo 2.1. Türkiye (Tr) ve Trakya (T)'da yayılış gösteren *Orchidaceae* üyeleri ve tür sayıları [76].

Genera	Species		Subspecies		Varyete		Takson	
	Tr	T	Tr	T	Tr	T	Tr	T
1. <i>Aceras</i>	1						1	
2. <i>Anacamptis</i>	1	1					1	1
3. <i>Barlia</i>	1						1	
4. <i>Cephalanthera</i>	6	4					6	4
5. <i>Coeloglossum</i>	1						1	
6. <i>Comperia</i>	1						1	
7. <i>Corollarhiza</i>	1						1	
8. <i>Dactylorhiza</i>	12	2	2	1	4		15	2
9. <i>Epipactis</i>	9	4					9	4
10. <i>Epipogium</i>	1						1	
11. <i>Goodyera</i>	1						1	
12. <i>Gymnadenia</i>	1						1	
13. <i>Himantoglossum</i>	3	1					3	1
14. <i>Limodorum</i>	1	1			2	1	2	1
15. <i>Listera</i>	2	1					2	1
16. <i>Neotinea</i>	1	1					1	1
17. <i>Neottia</i>	1	1					1	1
18. <i>Ophrys</i>	64	10	20	6			74	14
19. <i>Orchis</i>	26	12	7	5	3	2	33	14
20. <i>Platanthera</i>	3	2	2				4	2
21. <i>Serapias</i>	6	2	3	2	1		9	2
22. <i>Spiranthes</i>	1	1					1	1
23. <i>Stenisiella</i>	1						1	
24. <i>Traunsteinera</i>	1						1	
Total	146	42	32	14	10	3	171	46

2.2. Moleküler çalışmalar

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

Coks ve ark. [77] yaptıkları çalışmada Orchidaceae familyasından 100'e yakın orkide türü incelenmiştir. 150 – 170 türü bulunan Cyripedioideae (Orchidaceae) taksonunda klasik yöntemlerle filogenetik sınıflandırma yapmak pek çok yanlış yanlış sonuca sebep olduğu için bu çalışmada kullanılan orkide türlerinin ITS sekansları çıkarılmış ve 5 cinsi bulunan Cyripedioideae taksonunda her cinsin monofiletik olduğu tespit edilmiştir.

Aceto ve ark. [78] *Aceras*, *Anacamptis*, *Neotinea*, *Ophrys*, *Platanthera*, *Serapias*, cinslerinin temsilcileri kullanılmıştır. *ITS* bölgeleri sekanslanan ve bu bölgelerde varyasyonlar tespit edilen bu orkide türlerinde varyasyonların sebep olduğu filogenetik ilişkiler araştırılmıştır. Çalışma sonucunda floral morfolojinin değişkenlik gösterdiği, günümüzde bu cinsler için yapılan morfolojik genellemelerin yapay(güvenilmez mi) yargısına ulaşılmıştır.

Cameron ve ark. [79] *Orchideaceae* familyasından 171 taksonun *rbcL* nükleotid sekans analizi metoduyla kladistik parsinomi analizleri incelenmiştir. Analizlere göre; *Orchidaceae* familyası *apostasioid*, *cyripedioid*, *epidendroid*, *orchidoid* ve *vanilloid* kladodlarına bölünmüştür.

Douzery ve ark. [80], *Orchidaceae* familyasından *Diseae* tribusunun ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 sekansları çıkarılmış, moleküler filogeni teknikleri kullanılarak *Cranichideae*, *Diseae*, *Diurideae*, *Orchideae* familyaları arasındaki ilişkiler ilk defa yayımlanmıştır. Klasik taksonomi sonucu tespit edilen karakterlerin ITS filogenisi sonuçları ile örtüştüğü gösterilmiştir.

Berg ve ark. [81] *Laeniilae* (Orchidaceae) subtribusundan 295 aksesyon ve çok sayıda dış grup için nükleer ribozomlarından ITS1 ve ITS2 DNA sekansları filogenetik çalışmalar için kullanılmıştır. Çalışmanın ardından *Arpophyllum*' un diğer *Laeliinae* üyeleri ile kardeş olduğu sonucuna varılmıştır.

Gravendeel B. [82] çalışmasında matK plastid bölgesinin ve nrDNA'larının ITS1, 5.8S r DNA ve ITS2 bölgelerinin sekanslandığı *Coelogyne* taksonunun filogenisi araştırmıştır.

Pellegrino ve ark. [83] *Orchis x colemanii*, *O. mascula* ve *P. pauciflora* türlerinin doğal hibritidir. Bu bitki türlerinin rDNA'larından ITS1, 5.8S r DNA ve ITS2 bölgeleri PCR ile çoğaltılıp sekansları çıkarılmıştır. Bu çalışma sonucunda hibrit türde hangi atasal bireyden ne oranda genetik materyal bulunduğu tespit edilmiştir.

Kores ve ark. [84] Diurideae taksonunun filogenetik analizi amaçlanmıştır. *MatK* ve *trnL-F* plastid bölgelerinin DNA sekanslamaları yapılmıştır. Bu analiz sonuçlarına göre; oluşturulan filogenide daha önce klasik taksonomi sonucu elde edilen bazı morfolojik karakterlerin de yer aldığı görülmüş ancak gelecekte yapılacak yeni çalışmalar ile tekrar değerlendirme yapılması tavsiye edilmiştir.

Pridgeon ve ark. [85] Orchidaceae familyasının Pleurothallidinae subtribusundan 185 taksonun nükleer ribozomal DNA'larından ITS1 ve ITS2 bölgeleri ve 5.8S geni sekansları yapılmıştır. Ayrıca elde edilen sonuçların kesinliğini arttırmak için *matK*, *trnL intron* ve *trnL-F intergenic spacer* bölgeleri de çalışılmıştır. Sonuç olarak da Pleurothallidinae taksonunun monofiletik bir grup olduğu tespit edilmiştir.

Soliva ve ark. [86] bu çalışmada alt taksonlarının teşhisinde sorunlar çıkan *Ophrys* (*Orchidaceae*) taksonunun filogenetik analizi yapılmıştır. Analiz için ribozomal DNA'dan *ITS (internal spacer region)* bölümü ve kloroplast DNA'sından *trnL-trnL-F* bölümleri sekanslanmıştır. Çalışma sonucunda *Ophrys* cinsi *Euophrys* ve *Pseudoophrys* ana gruplarına ayrılmıştır.

Alvarez ve Wendel [87] filogenetik ifadenin cins ve cins ötesi seviyelerde ortaya çıkarılabilmesi için en sık kullanılan sekans dizileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda; nükleer ribozomal sistronun 18S-5.8S-26S bölgesinde bulunan *Internal Transcribed Spacer (ITS)* bölgesinin filogenetik çalışmalarda en sık kullanılan sekans dizilerinden biri olduğu belirtilmiştir. Buna rağmen bu sekans dizilerinin moleküler filogeni çalışmalarında tam anlamıyla güvenilir olmadığı tespit edilmiştir.

Salazar ve ark. [88] Cranichideae ve Spiranthirae taksonlarının birbirleriyle olan filogenetik ilişkileri araştırılmıştır. Araştırmada nükleer ribozomal DNA'nın ITS bölgelerinin sekans analizi sonuçlarından ve plastid DNA'larının *trnL-F* bölgesinin ile *rbcL* ve *matK* genlerinin sekans analizi sonuçlarından faydalanılmıştır. Ayrıca bu

sonuçlara göre Pachyplectroninae, Goodyerinae, Galeottiellinae, Manniellinae ve Prescottiinae taksonlarına olan filogenetik konumları da belirlenmiştir.

Tsai ve ark. [89] nrDNA'ların ITS bölgelerinin sekanslanmasıyla 12 *Dendrobium* türünün filogenetik ilişkilerini belirlemektedir. Çalışma sonucuna göre; *D. aurantiacum* grubunun *D. falconeri*, *D. leptoclandum*, *D. linawianum*, *D. moniliforme* ve *D. tosaense* türlerini barındırdığı, *D. equitans* grubunun *D. crumenatum* türünü barındırdığı ve *D. chameleon* türünün de *D. miyakei* grubuna ait olduğu tespit edilmiştir.

Chase ve ark. [90] bitkilerde barkodlamada kullanılan DNA bölgeleri az sayıda varyasyon göstermektedir. Bu çalışmada bitki filogenisinde yüksek varyasyon özelliği gösteren başka DNA bölgeleri araştırılmış ve plastid DNA'sının *ITS* ve *psbA – trnH* bölgelerinin bitkilerin moleküler filogenisinde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Devos ve ark. [91] *Dactylorhiza fuchsii* ve *Dactylorhiza maculata* türlerinin DNA polimorfizmleri çıkarılmıştır. Ayrıca *Dactylorhiza fuchsii* ve *Dactylorhiza maculata* ile birlikte *Dactylorhiza saccifera*, *Dactylorhiza foliosa* türlerinin de nrDNA'larının *ITS* (*Internal transcribed spacers*) ve *ETS* (*External transcribed spacers*) bölgeleri sekanslanmıştır.

Gulyas ve ark. [92] moleküler filogeni kanıtları olmamasına rağmen *Ophrys holubyana Andrasovszkiy* (*Orchidaceae*) türü Carpatho – Pannonian bölgesinde hibrit kökenli bir bitki türü olarak bilinir. Bu bölgedeki türlerin tamamına yakını örneklenip *Ophrys holubyana*, *Ophrys fuciflora* ve *Ophrys bicornis* türlerinin nükleer ribozomal DNA'larının *ITS* bölgeleri sekanslanmıştır. Çalışma sonucuna göre; *Ophrys holubyana* türünden elde edilen nrDNA *ITS* bölgesinin *Ophrys* taksonomisinde kullanılabileceği yargısına varılmıştır.

Kress ve ark. [93] DNA barkodlama tekniğinden hangi alanlarda yararlandığı bilgilerine yer verilmiştir. Ayrıca bitki ve hayvanlarda doğru ve kesin sonuç için hangi DNA dizilerinin barkodlamada kullanışlı olabileceği araştırılmıştır.

Williams ve ark. [94] *Orchidaceae* familyasının *Ornithocephalus* ve *Telipogon* taksonlarının 30 temsilcisiyle çalışmışlardır. Araştırmalarında nrDNA'larının *ITS* bölgeleri ve plastidlerinin *matK*, *trnL-F* genleri ile *atpB-rbcL* bölgeleri sekanslanarak bu iki taksonun taksonomik ilişkileri tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre Hofmeisterella ve *Stellilabium* *Telipogon* taksonuna dahil edilmiştir.

Whitten ve ark. [95] Zygotepetalinae (Orchidaceae) taksonundan *Dichaea*, *Huntleya*, *Chaubardia* ve *Chondrorhyncha* cinsleri arasındaki filogenetik ilişki nrDNA'larının ve plastid genomunun trnL ve trnL-F bölgeleri ile matK genleri sekanslanarak ortaya çıkarılmıştır.

Carlswald ve ark. [96] Vandeeae (Orchidaceae) taksonunun moleküler filogenisi üzerine bir çalışma yapılmıştır. nrDNA'dan ITS bölgeleri, plastid DNA'sından trnL-F bölgeleri ve matK genleri sekanslanarak Angroecinae ile Aerongidinae taksonlarının filogenetik ağaçları oluşturulmuştur.

Hollingsworth ve ark. [97] *Epipactis youngiana* ve *Epipactis helleborine* türlerinin kloroplast DNA'ları RFLPs yöntemi ile analiz edilmiş ve endemik bir tür olan *E. youngiana* ve teşhislerinde çok sık karıştırılan *E. helleborine* bitkilerinin tamamen ayrı türler oldukları tespit edilmiştir.

Sass ve ark. [98] *Cycadales* taksonu üyelerinin, nükleer *ribozomal internal transcribed spacer (nrITS)* bölgeleri ve kloroplast *psbA – trnH* bölgeleri çoğaltılarak analiz edilmiştir. Bu tip çalışmalarda kullanılması tavsiye edilen hiçbir marker analiz edilen türlerin hiçbiri için kusursuz bir tamamlayıcı oluşturamamıştır. *nrITS* bölgesinin dizilemede zorluklar yaşatmasına rağmen değişkenlik bakımından filogenetik çalışmalarda kullanıma uygun olduğu belirtilmiştir.

Barret ve ark. [99] bu çalışmada *Corallorhiza* taksonundan sekiz tür *rbcL* genleri sekanslanarak elde edilen sonuçlar analiz edilmiştir. *rbcL* geninin bitki filogenisi çalışmalarında sıklıkla kullanıldığı 400'ü aşkın çalışmayla desteklendiği belirtilmiştir.

Kress ve Erickson [100] DNA barkodu olarak kullanılacak bölgenin taşıması gereken özellikler tanımlanmıştır. Buna göre; i) tür seviyesinde genetik varyabilite ve farklılaşma içermesi, ii) universal primerlerin bağlanabileceği bölgeler içermesi, iii) DNA izolasyonu ve çoğaltılması için elverişli ve kısa olması bir DNA barkodlama bölgesinde bulunması gereken özellikler olarak belirtilmiştir. Asıl amaçlanan husus ise DNA barkodlamanın sadece birkaç çalışmada şans eseri sonuç alınan bir yöntem olmadığını aksine tüm dünyada bütün moleküler analizlerde kullanılabilineceğinin ispatlanmasıdır.

Lahaye ve ark. [101] DNA barkodlama yöntemi hakkında genel bilgilere yer verilmiştir. 1000'in üzerinde taksona sahip *Mesoamerican* orkidelerinin matK genleri barkodlanmış, elde edilen analiz sonuçlarına göre de çiçekli bitkilerin barkodlanmasında *matK* geninin kullanılabilineceği belirtilmiştir.

Salazar G. [102] DNA analizi ile taksonomik ilişki belirlemenin klasik yöntemlerle ortaya konan taksonomik ilişkilerden daha kesin ve güvenilir olduğu belirtilmiştir. Ayrıca *Galeoglossum thysanochilum* ve *Galeoglossum tubolosum* türlerinin nrDNA bölgeleri sekanslanmış ve aralarındaki filogenetik ilişkiler araştırılmıştır.

Neubig ve ark. [103] *Sobralia* taksonu ve yakın akrabalarının ilk defa moleküler filogenisi çıkarılmıştır. 200'ü aşkın üyesi ile neotropik florada baskın bir yere sahip *Sobralia* taksonunun *Elleanthus*, *Epilyna*, *Sertifera* ve *Sobralia* cinslerini içerdiği ve DNA sekans sonuçlarına göre *Elleanthus*, *Epilyna* ve *Sertifera*'nın monofilik olduğu ancak *Sobralia*'nın bu özelliği göstermediği belirtilmiştir. Buna ilaveten daha kesin sonuçlar için daha geniş kapsamlı ve çok sayıda bilimsel çalışmanın yapılması da vurgulanmıştır.

Schuiteman A. [104] orkidelerin en geniş soyağaçlarından birine sahip *Dendrobium* taksonu hakkında farklı bilim adamlarının moleküler düzeyde yaptığı çok sayıda analize yer verilmiştir. 1580'in üzerinde üyesi bulunan bu taksonun daha küçük filogenetik ağaçlara ayrıştırılarak yeni bir filogenetik ağaç oluşturulup oluşturulmama tartışmalarının yapıldığı belirtilmektedir.

Hürkan K. [45] tarafından yapılan çalışmada *Orchis anatolica* ve *Orchis tridentata* (Orchidaceae) taksonlarının, genomik DNA'larının ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgeleri sekanslanarak bu iki türün ilk kez moleküler düzeyde filogenetik ve taksonomik ilişkileri incelenmiştir.

Rakotoarivelo ve ark. [105] *Jumellea* (Orchidaceae) taksonunun moleküler sistematik yöntemler kullanılarak evrimsel gelişimi incelenmiştir. *Jumellea*'nın 47 üyesi kloroplastlarının matK genleri, trnL-F, rps16, ycf1 bölgeleri ile nrDNA'larının ITS sekansları çıkarılarak filogenetik ilişkileri çıkarılmıştır.

BÖLÜM 3

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırma materyalini oluşturan orkidelere ve ters laleye ait örnekler 2011 – 2014 yılları arasında Trakya Bölgesi'nden toplanmıştır. Araştırma gezileri bitkilerin çiçek açma ve meyve verme zamanı olan Mart-Eylül aylarında yapılmıştır. Arazi çalışmaları sırasında önce canlı örnekler incelenmiş, resimleri çekilmiş ve toplanan materyalin büyük bir kısmı herbiye kurallarına uygun olarak, kurutulup herbaryum örneği haline getirilmiştir. Bu örnekler Edirne Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Herbaryumu (EDTU)'nda saklanmaktadır. Araziden toplanan örneklerin bir kısmı saksı içersine alınmış ve morfolojik çalışmalar için botanik bahçesine saksı içinde konulmuştur. Türlerin tayininde canlı materyalin, çiçek rengi ve özellikle çiçek yapısının önemli olması nedeniyle, arazide örneklerin fotoğrafları çekilmiş, bir kısmı %70 alkol içine alınarak saklanmıştır. Araziden toplanan örnekler, Edirne Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu (EDTU) ve İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (ISTE)'ndaki örnekler araştırma materyalimizi oluşturmuştur.

Moleküler çalışmada iki yöntem denenmiştir: Birincisinde DNA çalışması yapılacak materyaller arazide toplandıktan sonra silika-jel yöntemi ile kurutulmuş ve izolasyonuna kadar muhafaza edilmiştir. Birinci yöntemde taze örneklerden kesilen yeşil gövde yaprakları kurutma kâğıdından yapılmış zarfların içersine 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.

Yapılan incelemelerde bu yöntem başarısı istenen sonucu vermeyince ikinci denemede olarak araziden canlı getirilen materyal moleküler çalışmalarda kullanılmıştır. Bu denemede elde edilen sonuçlar daha başarılı olmuş ve bu çalışmada değerlendirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.1. Morfolojik yöntemler

Toplanan örneklerin teşhisinde; Flora of Turkey and the East Aegean Islands vol. 8 [8], vol 11 [53], Orkidelerimiz [2], Orchids of Britain and Europe [106,107] ve Die Orchideen der Turkei [46] ve Türkiye Orkideleri [47], Orchideen [108], Flora Europaea [109] adlı eserler kaynak olarak kullanılmıştır. Türlerin tanımları araziden toplanan ve Herbaryumlarda bulunan örneklerle karşılaştırılmıştır. Bu amaca uygun olarak araziden farklı populasyonlardan çok sayıda örnek toplanmış, bitkinin genel görünüşü ile birlikte habitatı ve çiçek yapısını göstermek amacıyla fotoğrafları çekilmiş, ölçümleri yapılmıştır. Araziden canlı olarak getirilen örnekler laboratuvar altında ayrıntılı olarak incelenmiş ve türlerin morfolojik özellikleri hakkında daha detaylı bilgiler elde edilmiştir. Teşhis edilen örnekler Edirne Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Herbaryumu (EDTU), İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (ISTE) ve İ.Ü. Fen Fakültesi Herbaryumu (ISTF)'ndeki örneklerle karşılaştırılmıştır.

Morfolojik çalışmalar sonucunda araştırma bölgesinde *O. laxiflora* ve *O. punctulata* aşağıdaki düzende incelenmiştir: Türlerin sinonimleri, genel özellikleri, çiçeklenme zamanı, yetişme ortamı, tip örneğinin tanımlandığı yer, araştırma bölgesindeki, Türkiye'deki ve Dünyadaki yayılışı verilmiştir. Türlerin sinonimleri yazılırken Floranın 8 ve 11. ciltlerine ek olarak "Check list of the Iberian and Balearic orchids. 2. *Ophrys* L.–*Spiranthes* Rich." [110], "Kompndium der Europaischen Orchideen. - Catalogue of European Orchids" [111,112], Jay Renz Herbaryumu Sinonim Listesi [114], IPNI [115], Kew Checklist [116] ve Güler [117] gibi checklistler, kaynaklar ve uluslararası indeksler kullanılmıştır. Türlerin morfolojik özelliklerini belirtmek amacıyla bazı türlerin araziden çekilmiş genel görünüşü ve spika fotoğrafları renkli olarak konulmuştur. Şekil numaraları sinonimlerin hemen arkasında belirtilmiştir. Türlerin

araştırma bölgesindeki yayılışları harita üzerinde gösterilmiştir. Her türün Dünya üzerindeki ve Türkiye'deki yayılışları da ilgili kaynaklara göre verilmiştir. Yazımında Türk Dil Kurumu İmlâ Kılavuzu [118] ve botanik terimlerinin yazımında İngilizce-Türkçe Botanik Kılavuzu [119] kullanılmıştır.

3.2. Moleküler yöntemler

Moleküler analizler TUTAGEM'de aşağıdaki yönergelere göre yaptırılmıştır.

3.2.1. Bitki örneklerinin homojenizasyonu ve DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için DNeasy Plant Mini Kit Qiagen (Cat: 69106) kullanılmış ve aşağıdaki kit yönergeleri uygulanmıştır:

- 1) Doku parçalama için 100 mg ölçülen örnekler ependorfa alındı ve içlerine 5-6 bead (Dnase free, ZrOBZO) eklendi. Örnekler -150°C de 5-10 dk bekletildi ve doku parçalayıcıda en yüksek devirde 2 dakika boyunca parçalandı. 400µl AP1 buffer ve 4 µl RNase A(100mg/ml) eklendi ve 65°C'de 10 dk çalkalayıcıda tutuldu.
- 2) 130µl AP2 buffer eklendi. 5 dk 0°C de bekletildi.
- 3) 20,000 x g (14,000 rpm) de 5 dk santrifüj edildi.
- 4) Supernatant kısmı QIAshredder Mini spin kolonlara alındı.
- 5) 20,000 x g (14,000 rpm) de 5 dk santrifüj edildi.
- 6) Spin kolonun altında kalan sıvıdan 400µl ependorf tüplerine alındı. Üzerine 600 µl AP3/E buffer eklendi ve karıştırıldı. Bundan 650µl alınıp DNeasy mini spin kolona alındı. 6000g de 1 dk santrifüj edildi.
- 7) Alttaki sıvı atıldı kalan miktar tekrar spin kolona uygulandı. Tekrar santrifüj edildi. DNeasy mini spin kolon yeni koleksiyon tüpüne alındı.
- 8) 500 µl AW buffer eklendi. 6000g de 1 dk santrifüj edildi.
- 9) Alttaki sıvı atıldı. Tekrar 500 µl AW buffer eklendi ve 20.000g de 2 dk santrifüj edildi.
- 10) Spin kolon yeni bir ependorfa alındı ve üzerine 80 µl AE buffer eklenerek 6000g de 1 dk santrifüj edildi ve elde edilen DNA'lar ölçülerek -20°C ye kaldırıldı.

3.2.2. DNA saflık kontrolü ve miktar ölçümü

Elde edilen DNA'ların saflık kontrolü nanodrop (Thermo, Multiscan Go) ile A₂₆₀/A₂₈₀ oranı ölçülerek belirlendi. DNA miktarları ise Qubit cihazı ile Qubit protokolü ile belirlendi. Bunun için, 199 µl Qubit buffer ve 1 µl Qubit reagent eklenip mix hazırlanarak Qubit ölçüm tüplerine 198 µl paylaştırılmış ve 2 µl DNA eklenerek 2 dk oda

sıcaklığında ve karanlıkta bekletilen örnekler cihazda okunmuş değerler ng/ µl olarak cihaz tarafından hesaplanmıştır.

3.2.3 RAPD (Random Amplified Primer Design) PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonları)

Çalışmada kullanılan örneklerin RAPD PCR analizleri yapıldı. Bu örneklerin çoğaltılmasında Life Tech Firması tarafından sentezlenen sırasıyla 2 OPA 02, 3 OPA 07, 24 OPC 20, 18 OPC 13, 26 OPN 02, 23 OPC 19, 14 OPC 09, 1 OPA 01 primerleri ve ayrıca Taq Polimeraz Mix olarak AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems) kullanıldı.

Tablo 3.1. PCR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri

Primer Adı	Dizi
2 OPC 02 (10 baz)	5'-ACCAGGGGCA- 3'
3 OPA 07 (11 baz)	5'-GAAACGGGGTG- 3'
24 OPC 20 (10 baz)	5'-ACTTCGCCAC- 3'
18 OPC 13 (10 baz)	5'-AAGCCTCGTC- 3'

Her bir RAPD PCR reaksiyonu için gerekli olan sarflar ve miktarları aşağıdaki gibidir:

0,5µl	Primer
12,5µl	AmpliTağ Gold 360 Master Mix
11µl	dH ₂ O
1µl	Genomik DNA

RAPD PCR reaksiyonu Applied Biosystems'in Veriti 96 Well Thermal Cycler Modeli olan PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Kullanılan protokol aşağıda Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. RAPD için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) protokolü

İşlem	Sıcaklık Değeri	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95 °C	3 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	
Bağlanma	37 °C	30 dakika	40
Uzama	72 °C	1.5 dakika	
Son Uzama	72 °C	30 dakika	1
Saklama	+4 °C	∞	-

3.2.4 Genomik DNA'ların 18S ve ITS bölgesinin PCR'ı

Orkide örneklerinden izole edilmiş 45 adet Genomik DNA örneğinin 18S ve ITS gen bölgesinin PCR'ı yapıldı. 18S bölgesi için 18S ve 18SV4 (Life Tech) primerleri (Carmen ve ark. 1992, White ve ark. 1990), ITS bölgesi için ITS F ve ITS R primerleri (Campbell et al. 2000) kullanıldı. Kullanılan primerler aşağıda verilmiştir.

18S rDNA 18S: 5'-TGG TTG ATC CTG CCA GTA G-3'

18SV4: 5'-CRT HYT YGG CAA ATG CTT TCG C-3'

ITS F: 5'-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG3'

ITS R: 5'-CTTTTCCTCCGCTTATTGATATG-3'

Reaksiyonun gerçekleşebilmesi için kullanılan biyolojik sarflar ve miktarları aşağıda belirtilmiştir:

0,25µl 18S primeri

0,25µl 18SV4 primeri

12,5µl AmpliTaq Gold 360 Master Mix

10µl dH₂O

2µl Genomik DNA

PCR reaksiyonu Applied Biosystems'in Veriti 96 Well Thermal Cycler modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan PCR Protokolü Tablo 3.3'de verilmiştir.

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

Tablo 3.3. 18S ve ITS gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) protokolü

İşlem	Sıcaklık Değeri	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	96 °C	1 dakika	1
Denatürasyon	96 °C	30 saniye	35
Bağlanma	55 °C	30 dakika	
Uzama	72 °C	1.5 dakika	
Son Uzama	72 °C	30 dakika	1
Saklama	+4 °C	∞	-

Toplam 35 döngüden oluşan PCR süresi yaklaşık 1 saat 45 dakika olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonrası örnekler saflaştırmaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5 Agaroz jel elektroforezi

DNA izolatları ve PCR ürünleri %1' lik agaroz jel (Prona – HS8012) elektroforezi ile ayrılmış ve DNA'ların jelde yürütülmesi işlemi bittikten sonra bantlar UV görüntüleme sistemi ile (BioRAAd chemoluminesans) görüntülenerek ve cihaz yazılımı ile analiz edildi.

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 tepsinine 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 100pb 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 BİORAD Chemi Doc MP Universal hood3 fotoğraf makinesi ile U.V. filtre kullanarak fotoğraflanmıştır.

3.2.6. PCR Saflaştırma

Sekans öncesi PCR örnekleri Purelink Quick PCR purification (Invitrogen) kiti ile temizlendi. Temizleme işlemi için aşağıdaki kit yönergeleri uygulandı:

- 1) Bir hacim örneğine 4 hacim Binding Buffer B2 eklendi
- 2) Örnek koleksiyon tüpü içinde, PureLink Spin Column'a pipetlendi
- 3) 10.000g'de 1 dk. santrifüj edildi
- 4) Koleksiyon tüpü içindeki sıvıyı atıldı
- 5) Kolon tekrar koleksiyon tüpüne alındı, 650µl WASH BUFFER (etanollü) eklendi, kolon 10.000g'de 1 dk santrifüj edildi
- 6) Koleksiyon tüpü içindeki sıvıyı atıldı, kolon aynı koleksiyon tüpüne alındı
- 7) Maksimum hızda (~20.000g) 2-3 dk santrifüj edildi
- 8) Kolon elution tüpüne alındı, 50 µl elution buffer eklendi
- 9) Kolon oda sıcaklığında 1 dk. bekletildi
- 10) Maksimum hızda 2 dk santrifüj edildi

3.2.7 DNA dizileme

DNA dizisinin cycle sekans aşaması için Big Dye v3.1 cycle sequencing kit kullanıldı ve Tablo 3.4’de verilen protokol uygulandı:

Tablo 3.4. DNA dizisinin cycle sekans kit protokolü

	Konsatrasyon	Volume
Ready Reaksiyon mix	2.5x	4 µl
Big dye sequencing buffer	5x	2 µl
Primer		3.2 µl (1 pmol/ µl)
DNA		1 µl (5-20ng)
DNA		20 µl ye tamamlandı

Cycle Sekans Protokolü:

Başlangıç denatürasyonu: 96 °C de 1 dk

96 °C 10 sn
50 °C 5sn
60 °C 4 dk
4 °C ∞

} 25 döngü

Sekans sonrası temizleme aşaması Bigdye X terminator purification kit kullanıldı.

Aşağıda ki kit yönergeleri uygulandı:

20 µl reaksiyon hacmi için;

SAM solüsyonu: 90 µl

XTerminator solüsyonu: 20 µl

30 dk vorteksledi ve 1000g de 2 dk santrifüj edildi. Örnekler sekans cihazına yüklendi.

3.2.8 Biyoinformatik alışmalar

Genetic Analyzer'dan gelen gen dizileri öncelikle DNAMAN 3,1 (Lynnon Corporation, Pointe-Claire, Quebec, Canada) ile toplu halde düzenlenmiş ve tüm türlerde ortak başlangıç ve bitiş noktaları tespit edilmiştir. Elde edilen bu türler toplu halde MEGA 6 [121] ile açılmış ve öncelikle ClustalW kullanılarak (Open gap penalty = 15,0, extend gap penalty = 6.66) düzenlenmiştir. Elde edilen genel dizi görünümü manuel olarak kontrol edilmiştir. Gen dizileri tablolarla gösterilmiştir.

Filogenetik analizlerin tümünde PAUP 4,0.b10 (Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Mass.) kullanılmıştır. Filogeni ve aa oluşturulurken, neighbour joining, maximum parsimony ve maximum likelihood yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemle filogenetik aa ve tür farklılıkları ortaya konulmuştur. Kullanılacak en iyi yöntem tayini Modeltest 3,7 ile yapılmıştır. Bu program ile Aikake Information Criterion çıktısına göre belirlenen model kullanılmıştır. Kullanılan model doğrultusunda elde edilen ağaçlar içinde fiologeniye en doğru açıklayan aa, morfolojik özelliklerinde desteği ile TBR branch swapping (Heuristic search, random=1000, PAUP 4,0.b10) analizi ile belirlenmiştir.

BÖLÜM 4

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Morfolojik Bulgular



A



B

Şekil 4.1. *O. punctulata*: A. Bitkinin genel görünüşü, B. Spika.

4.1.1. *O. punctulata* Steven ex Lindley

Gen. Sp. Orchid. 273 (1835). Syn: *O. sepulchralis* Boiss. & Heldr. in Boiss., Diagn. ser. 1(13):10 (1854)! *O. schelkownikowii* Woronow in Izv. Kavkaz. Muz. 4:266 (1909)! Ic: Sunderm., Europ. Medit. Orchid. ed. 2:130, f. 7. 6 (1975); Renz in Rech. fil., Fl. Iranica 126: t. 4f (1978). Şekil 68-69.

Genel Özellikleri: Bitki oldukça gürbüz, 20-70 cm. yumrular 2, oblong-ovat. Gövde tabanda toplanmış dik-hafif yayık 4-6 yapraklı; yapraklar parlak yeşil, oblong-lanseolat veya geniş lanseolat, kenarları hafif undulat, tabanda 3-6x7-25 cm, üstte kın yapraklar 1-4 küçük. Spika silindirik, ± yoğun veya gevşek, zayıf vanilya kokulu 20-70 çiçekli; brakteler zarsı, pulsusu, oldukça küçük, sarımsı veya şeffaf-yeşilimsi; sepaller obtus gevşek ovoit miğferde birbirine yaklaşmış, dış kısmı daha mat sarımsı-yeşil, benekli ve daha açık damarlı, iç kısmında daha koyu ve canlı renkte, ovalden lanseolata kadar, ucu obustan akuta kadar, 3-5x8-15 mm; petaller linear, miğferin içinde, 1-2x8-12 mm; labellum derin 3 parçalı, 7-15 mm uzunluğunda, sarı, bazen yeşilimsi sarı, merkezinde çok az kırmızı-kahverengi papillalı; loblar sarı, kahverengimsi-kırmızı veya zeytin yeşili-yeşil, uçlara doğru daha koyu, hafifçe yukarıya doğru ykırılmış; lateral loblar ± linear, obtus, falkat; orta lob elongat, 2 oblong, trunkat birbirinden uzaklaşan lobülere ayrılmış, aralarında bir akut dişli; mahmuz aşağıya bükük, 3-6 mm, silindirik ovaryumunun yarısına eşit. Ovaryum tüysüz kıvrılmış, 7-13 mm.

Çiçeklenme Zamanı: Nisan-Mayıs.

Yetiştirme Ortamı: Çalılık açıklıkları, orman kenarları, R. 20-1350 m.

Tip Örneği: Kırım'dan tanımlanmıştır.

Araştırma Bölgesindeki Yayılışı: Araştırma bölgesinde 4 lokalitede az yoğun olarak bulunur.

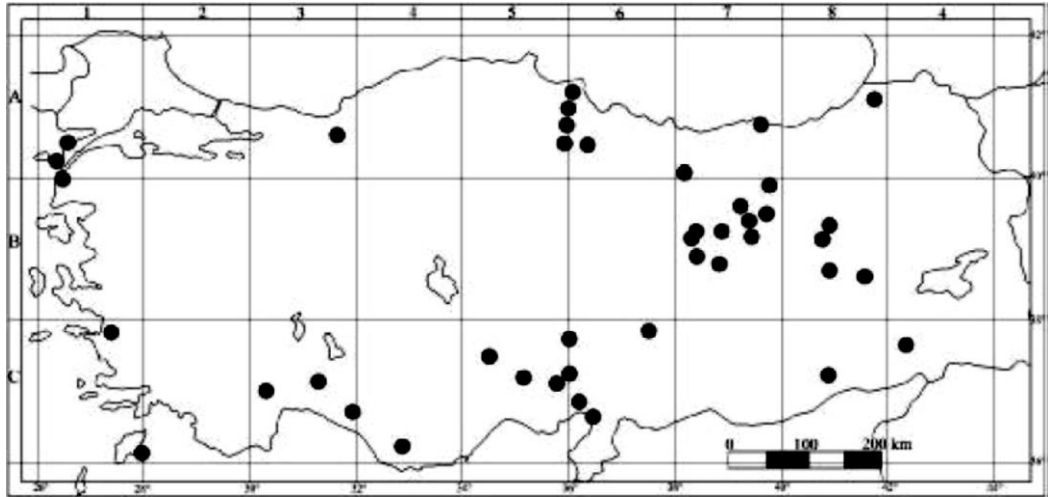
A1/E Edirne, Keşan: Mecidiye, İbrice limanı yolu, İtalyan koyuna doğru 2,4 km'de, yolun solu, sırtlarda, patika yolda, 18.05.2002, M.Aybeke, Teş. M.Aybeke (EDTU 8368); Mecidiye köyü, İtalyan koyu, sahile 1,5 km, sık makilik alan, taşlık eğimli arazi, 03.05.2007, N.Güler, H.Ersoy, Teş. N.Güler (EDTU 10448).

A1/E Çanakkale, Eceabat: Kilitbahir-Abide 15. km yolun solunda, *Pinus*'lar altında, 07.04.2001, M.Aybeke, Teş. M.Aybeke (EDTU 8188); Abide civarı, 28.03.2008, N.Güler, Teş. N.Güler (EDTU 10495).



Şekil 4.2. *O. punctulata* araştırma bölgesindeki yayılışı.

Türkiye'deki Yayılışı: Genelde Anadolu'nun dış kısımları ve ona bitişik doğu Anadolu; dağınık. A1(A) Çanakkale, A3 Bolu, A5 Amasya, A6 Samsun, Tokat, A7 Trabzon, A8 Artvin, B1 Çanakkale, B7 Tunceli, B8 Bingöl, C1 Aydın, C3 Antalya, C4 Konya, C5 İçel, C6 Adana, C9 Siirt.



Şekil 4.3. *O. punctulata*'nın Türkiye'deki yayılışı [8].

Dünya'daki Yayılışı: Yunanistan, Kıbrıs, Filistin, Gürcistan, Kafkasya, Kuzeybatı İran. Doğu Akdeniz Elementi.



A



B

Şekil 4.4. *O. laxiflora*: A. Bitkinin genel görünüşü, B. Spika.

4.1.2. *O. laxiflora* Lam. Fl. Fr.ed. 1, 3:504 (1779).

Syn: *O. platychila* C. Koch in Linnaea 19:13 (1846).

İc: Reichb. fil., Ic. Fl. Germ. 13/14: t. 41 f. I (1850); Danesch, Orch. Eur., Südeur. 204 (1969). Şekil 91-92.

Genel Özellikleri: Bitki 25-62 cm, dik bazen hafif zigzaglı; yumru 2-1.8x1.5-2.5 cm, yarı küresel veya elipsoit. Gövde boyunca dizilmiş 5-9 yapraklı; yapraklar 1-2x11-28 cm, linear veya lanseolat, yaklaşık 45°'lik bir açıyla gövdeye bağlanır. Spika 2.5-5.5x4-23 cm, silindirik, gevşek, 5-28 çiçekli; brakteler 3-6x9-26 mm, lanseolat, boyu ovaryumdan kısa ya da uzun olabilir; çiçekler menekşe-mor renkli; dorsal sepal 3-6x7-10 mm, oval, geriye doğru uzanır, lateral sepaller 3.5-6x7.5-12.5 mm, oblong, obtus, ± dik, petaller 3-5x6.5-10 mm, oblik-oblong; labellum 10-18x8-17 mm, suborbikular, obovat veya triangular-obovat, tabanda kuneat; lateral loblar oblong veya oblong orbikular, çiçeklenmeden sonra bükülür; orta lob tam gelişmemiş veya yüzeysel iki loblu; mahmuz 1.5-3x9-18 mm, silindirik, ucunda genişlemiş. Ovaryum 1-2x12-25 mm, silindirik, kıvrılmış, tüysüz, kolumna 3-5.5 mm.

Çiçeklenme Zamanı: Nisan-Mayıs.

Yetiştirme Ortamı: Nemli çayırlar ve bataklıklar. R. 250-850 m.

Tip Örneği: Fransa'dan tanımlanmıştır.

Araştırma Bölgesindeki Yayılışı: Araştırma bölgesinde 49 lokalitede çok yoğun olarak görülür.

A1/E Kırklareli, Kofçaz: Kocatarla-Devliagaç arası, köprünün sol tarafı, ağaçlıklar arasındaki otlu alanlar, 24.05.2008, N.Güler, H.Ersoy, Teş. N.Güler (EDTU 10560).

Merkez: Dereköy-hudut arası 4. km, yol kenarı otlu alanlar, 23.05.2009, N.Güler, H.Ersoy, Teş. N.Güler (EDTU 10604).

Demirköy: İğneada-Demirköy 3. km, 16.06.1987, G.Olgun, A.Aydın, Teş. N.Güler (EDTU 1388); İğneada, Mert gölü civarı, 17.06.1987, G.Olgun, H.Arda, Teş. N.Güler (EDTU 1428); İğneada burnu çevresi, bataklık, 03.06.1988, F.Dane, G.Dalgıç, Teş. N.Güler (EDTU 2793).

Lüleburgaz: Ağaçkakan mevki, 04.05.1992, G.Dalgıç, Teş. N.Güler (EDTU 5185).

A1/E Edirne, Lalapaşa: Küçünlü köyü, Yayla mevki, sulak çayır, 285 m, 16.05.1995, N.Güler, Teş. N.Güler (EDTU 6073).

Keşan: Beytepe-Erikli çıkışı, petrol ofisinin karşısı, sulak çayır, 11.05.1996, N.Güler, M.Aybeke, Teş. N.Güler (EDTU 6133); Mecidiye, 17.05.1987, F.Dane, Teş. N.Güler (EDTU 2797); Mecidiye, sahil, 01.05.1988, G.Dalgıç, Teş. N.Güler (EDTU 1975); 17.04.1992, G.Dalgıç, Teş. E.Sezik (EDTU 5903); ıslak çayır, 06.05.1995, N.Güler, M.Aybeke, Teş. N.Güler (EDTU 6074).

İpsala: İpsala-hudut arası, 25.05.1973, G.Ertem, Teş. G.Ertem (ISTE 25048).

Enez: Enez-Yeniceköy arası, 26.05.1973, G.Ertem, Teş. G.Ertem (ISTE 25028); Enez, Keşan çıkışı, nemli çayır, göl kenarı, 02.06.1995, N.Güler, Teş. N.Güler (EDTU 6072); *Juncus* sp. arasında, 0 m, 25.05.1996, N.Güler, M.Aybeke, Teş. N.Güler (EDTU 6134); Abdürrahim köyü civarı, 26.05.1973, G.Ertem, Teş. G.Ertem (ISTE 25033).

A1/E Tekirdağ, Çorlu: Çorlu civarı, 20.05.1969, G.Ertem, Teş. A.Baytop (ISTE 15180).

Hayrabolu, Tekirdağ-Hayrabolu arası, Tekirdağ'dan 26 km ileride, 21.05.1971, A.Baytop, N.Özhatay, Teş. G.Ertem (ISTE 19837).

Merkez: Tekirdağ 14 km doğusu, 13.05.1968, T.Gözler, Teş. G.Ertem (ISTE 12680); Tekirdağ çıkışı, yol kenarı, 08.05.1989, F.Dane, Teş. N.Güler (EDTU 3173); Kumbağ, Sütlüce Manastırı civarı, dere kenarı, 22.05.1974, N. ve E.Özhatay, Teş. G.Ertem (ISTE 28361); Tekirdağ-İncik yolu, çeşme kenarındaki çayırdaki, 04.05.1971, A.Baytop, G.Ertem, N.Özhatay, Teş. A.Baytop (ISTE 19533); Tekirdağ-Malkara arası, tarla kenarı, 15.05.1987, G.Dalgıç, N.Başak, Teş. N.Güler (EDTU 772).

Malkara: Malkara-İncik arası, bataklık, 22.05.1973, G.Ertem, Teş. G.Ertem (ISTE 25113); Malkara'nın doğusu, kesif bataklık, 25.05.1973, G.Ertem, Teş. G.Ertem (ISTE 25008); Malkara-Keşan arası, Malkara yakını, 17.05.1970, A.Baytop, F.Öktem, Teş. A.Baytop (ISTE 17814).

Şarköy: Şarköy, sahil, 18.05.1989, F.Dane, Teş. N.Güler (EDTU 4140).

A1/E Çanakkale, Eceabat: K. Anafartalar göl civarı, nemli çayır, 18.05.2008, N.Güler, H.Ersoy, Teş. N.Güler (EDTU 10542).

Gelibolu: Eceabat-Gelibolu yolu, Gelibolu'ya 1 km, nemli otluk çayır, 06.05.2007, N.Güler, H.Ersoy, Teş. N.Güler (EDTU 10468); Bolayır-Gelibolu arası, 26.05.1973, G.Ertem, Teş. G.Ertem (ISTE 25066).

A2/E İstanbul, Sarıyer: Kilyos batı tarafı, kumulların üstü nemli çayır, 11.05.1970, A.Baytop, F.Öktem, Teş. G.Ertem (ISTE 17738); Kilyos, sol taraftaki sahil tepeleri, 22.05.1992, Ş.Şiraneci, E.Akalın, Teş. Ş.Şiraneci (ISTE 63931); Kilyos tepeleri, 29.04.1971, G.Ertem, F.Öktem, N. ve E.Özhatay, Teş. G.Ertem (ISTE 19432); Belgrad ormanı, odun deposu, nemli çayırlar, 16.05.1974, G.Ertem, N.Özhatay, Teş. G.Taub. 1979 (ISTE 28150).

Eyüp: Kemberburgaz yolu, Atış Sahası karşısı, 13.05.1967, M. ve N. Tanker, Teş. A.Baytop (ISTE 11223); sırtlar, 29.04.1971, G.Ertem, F.Öktem, N. ve E.Özhatay, Teş. G.Ertem (ISTE 19415).

Çatalca: Binkılıç, Çilingöz mevkii, orman kenarı, nemli yerler, 24.04.1999, N.Güler, Teş. N.Güler (EDTU 7892); 06.06.2000, N.Güler, Teş. N.Güler (EDTU 8134); Terkos üstü, nemli çayır, 10.04.1972, A.Baytop, Teş. G.Ertem (ISTE 21394a); Terkos gölü, 24.05.1973, E.Özhatay, Teş. G.Ertem (ISTE 24997); Terkos, 15.05.1973, G.Ertem, Teş. G.Ertem (ISTE 24565); Terkos köyü çayırı, nemli yerler, 03.05.1971, A.Baytop, G.Ertem, N.Özhatay, Teş. A.Baytop (ISTE 19456); 01.05.1967, A. ve T.Baytop, Teş. A.Baytop (ISTE 10928); Karaburun-Terkos, 24.05.1972, N.Özhatay, E.Tuzlacı, Teş.

N.Özhatay (ISTE 21895); İhsaniye-Terkos arası, 01.05.1967, A. ve T.Baytop, Teş. A.Baytop (ISTE 10916); Çatalca-Subaşı köyü çevresi, buğday tarlası kenarı, 24.05.1972, N.Özhatay, E.Tuzlacı, Teş. G.Ertem (ISTE 21879); Kısırmandıra-İhsaniye arası yol kenarı, 15.05.1973, G.Ertem, Teş. G.Ertem (ISTE 24567).

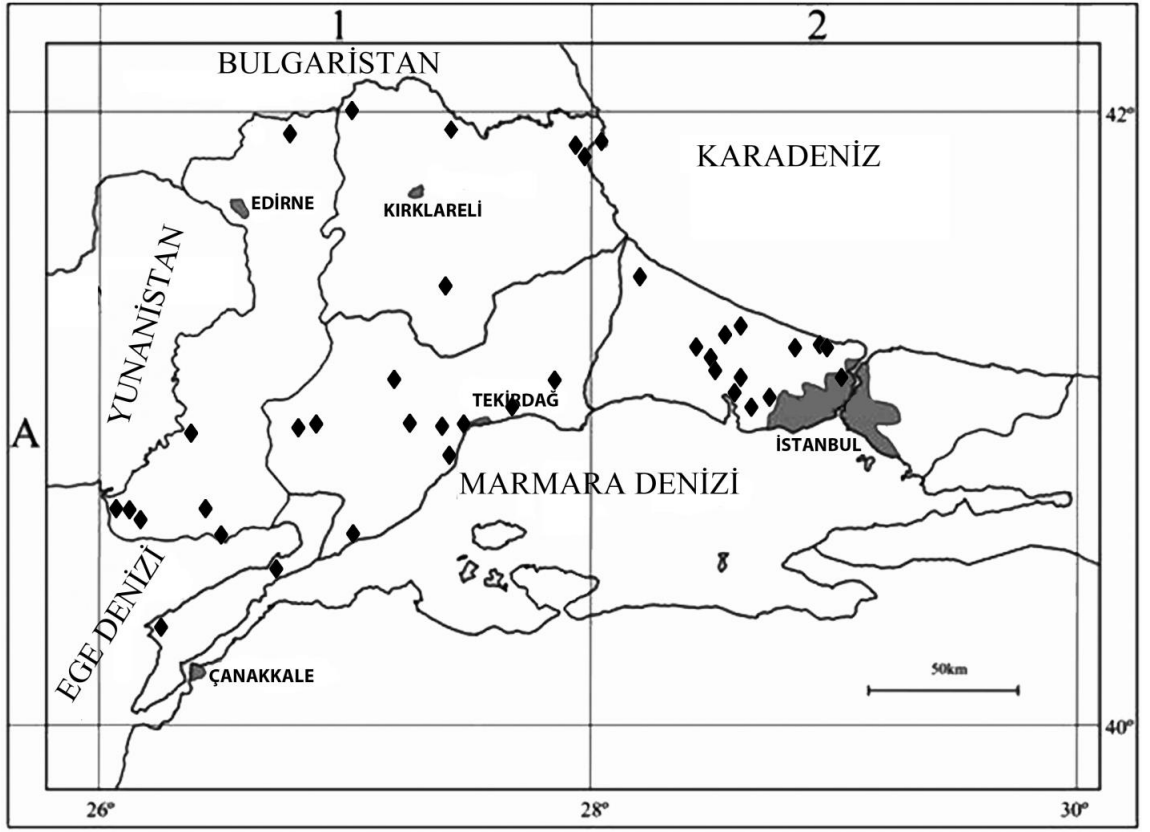
Arnavutköy: Tayakadın köyü çıkışı, yolun solunda büyük meralık alanın sol alt yamaçlarında meşe altı, 14.04.2001, M.Aybeke, Teş. M.Aybeke (EDTU 8200); Hadımköy, 23.04.1961, A. ve T.Baytop, Teş. A.Baytop (ISTE 6344).

Silivri: Bizimköy, 24.05.1971, G.Ertem, Teş. G.Ertem (ISTE 18003).

Büyükçekmece: Çatalca'dan Hadımköy'e gidişte B.Çekmece gölü kenarında, Hezarfen havaalanına gelirken otoban köprüsüne 300 m kala göl kenarı, 14.04.2001, M.Aybeke, Teş. M.Aybeke (EDTU 8201).

Avcılar: İstanbul-B. Çekmece yolu, Ambarlı yol ayrımından 1 km, 18.05.1975, N. ve E.Özhatay, Teş. G.Taub. 1979 (ISTE 31629).

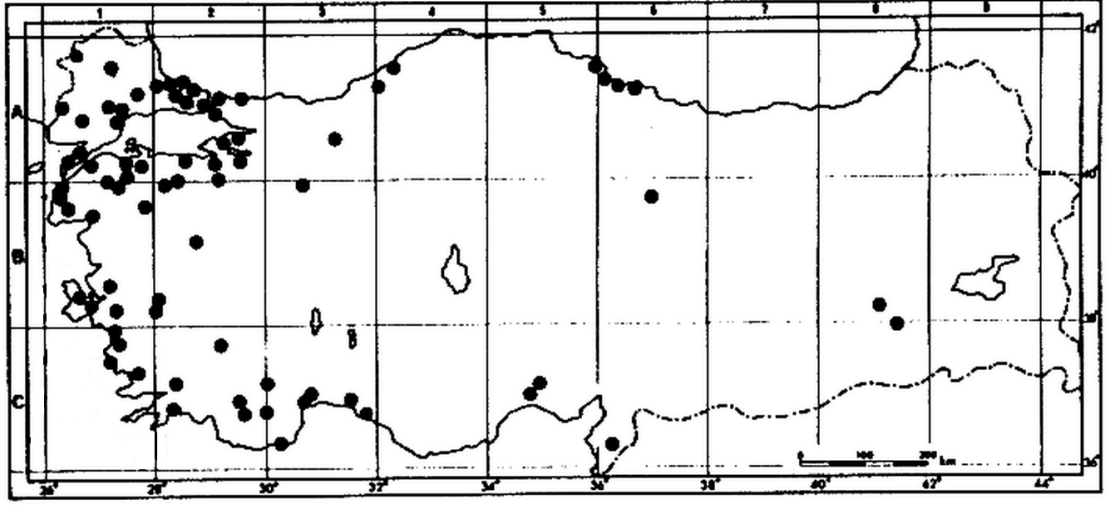
Küçükçekmece: Halkalı, 24.05.1965, A.Baytop, Teş. A.Baytop (ISTE 8191); Halkalı Tren İstasyonu karşısındaki sırtlar, 17.04.1973, G.Ertem, Teş. G.Ertem (ISTE 24179).



Şekil 4.5. *O. laxiflora* araştırma bölgesindeki yayılışı.

Türkiye'deki yayılışı: Anadolu'nun dış kısımları, Ege Adaları. A1(E) Tekirdağ, A1(A) Balıkesir, A2(E) İstanbul, A2(A) İstanbul, A3 Zonguldak, A4 Zonguldak, A5 Samsun, A6 Samsun, B1 İzmir, B2 İzmir, B3 Eskişehir, B6 Sivas, B8 Diyarbakır, C1 Muğla, C2 Denizli, C3 Antalya, C5 İçel, C6 Hatay, C8 Siirt

Dünya'daki yayılışı: Batı ve Orta Avrupa, Akdeniz Bölgesi. Akdeniz elementi.

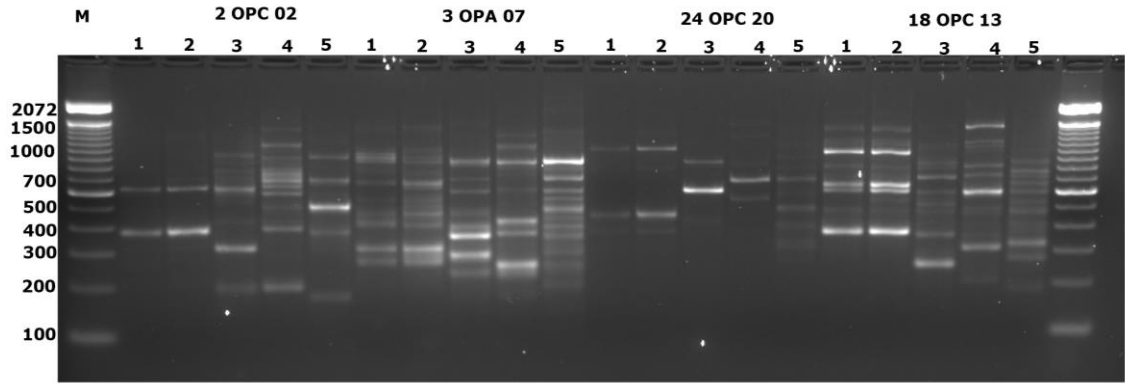


Şekil 4.6. *O. laxiflora* Türkiye'deki yayılışı.

4.2. Moleküler Bulgular

4.2.1. RAPD (Random Amplified Primer Design) bulguları

İzolasyonu yapılan DNA'ların saflıkları nanodrop (Thermo, Multiscan Go) ile miktarları ise Qubit ile ölçülmüş ve yeterli saflıkta olduğu görülmüştür. Şekil 4,7'de, izolasyonu yapılan DNA'ların % 0,8'lik agaroz jel üzerindeki görünüşleri verilmektedir. Spektrofotometre verileri ve Agaroz jel görüntüleri değerlendirilerek, genotiplere ait DNA'ların RAPD-PCR uygulamaları için yeterli miktar ve saflıkta olduğuna karar verilmiştir. Uygulanan 4 primerle elde edilen verilerin jel görünümü Şekil 4,7'de, bant sayıları ve baz çiftleri Tablo 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.7. 18S DNA bölgesinin farklı primerlerle PCR’da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü: M Markır, 1,2 *O. punctulata*, 3. *O. laxiflora*, 4. *O. palustris* ve 5. *F. stribnyi*.

2 OPC 02 primeri ile 18S DNA bölgesinde yapılan incelemede *O. punctulata* 4 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 319,74 ile 742,14 arasında; *O. laxiflora* 7 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 184,23 ile 970,32 arasında, *O. palustris* 12 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 193,50 ile 1.357,89 arasında, *F. stribnyi* 7 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 171,48 ile 1.150,03 arasında değiştiği görülmüştür.

3 OPC 07 primeri ile 18S DNA bölgesinde yapılan incelemede *O. punctulata* 12 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 268,94 ile 1.357,89 arasında; *O. laxiflora* 11 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 223,80 ile 1.437,04 arasında, *O. palustris* 12 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 177,22 ile 1.253,62 arasında, *F. stribnyi* 14 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 199,15 ile 1.275,60 arasında değiştiği görülmüştür.

24 OPC 20 primeri ile 18S DNA bölgesinde yapılan incelemede *O. punctulata* 5 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 390,29 ile 1.256,74 arasında; *O. laxiflora* 5 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 443,84 ile 935,54 arasında, *O. palustris* 7 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 319,46 ile 1.496,82 arasında, *F. stribnyi* 10 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 335,49 ile 1.407,61 arasında değiştiği görülmüştür.

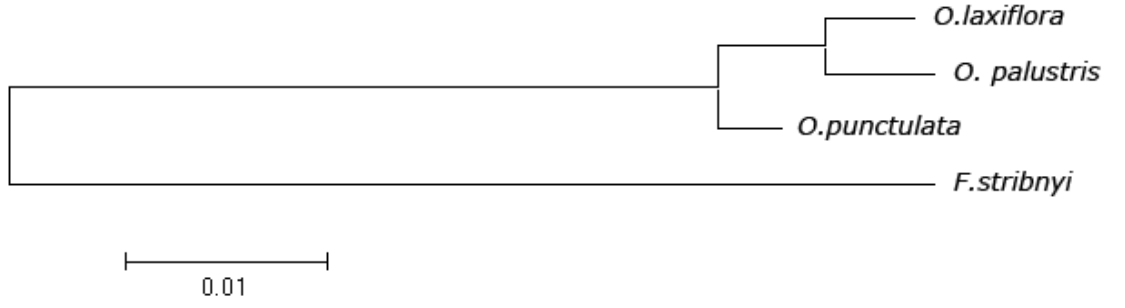
18 OPC 13 primeri ile 18S DNA bölgesinde yapılan incelemede *O. punctulata* 12 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 398,42 ile 1.686,93 arasında; *O. laxiflora* 12 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 275,23 ile 1.486,17 arasında, *O. palustris* 13 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 227,28 ile 1.514,82 arasında, *F. stribnyi* 12 bant oluşturmuş ve baz çifti sayısı 201,64 ile 1.001,45 arasında değiştiği görülmüştür.

Tablo 4.1. 18S DNA bölgesinin farklı primerlerle PCR’da oluşan bant sayıları ve baz çiftleri: M Markır, 1,2 *O. punctulata*,3. *O. laxiflora*, 4. *O. palustris* ve 5. *F. sribnyi*.

Primerler Band No.	2 OPC 02						3 OPA 07					24 OPC 20					18 OPC 13				
	M	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	2.072,00	742,14	742,14	970,32	1.357,89	1.150,03	1.357,89	1.353,92	1.437,04	1.253,62	1.275,60	1.256,74	1.253,62	935,54	1.496,82	1.407,61	1.686,93	1.685,81	1.486,17	1.514,82	1.001,45
2	1.500,00	681,53	647,81	812,53	1.111,60	948,58	1.026,20	1.053,63	1.225,92	1.072,11	896,61	1.072,11	1.072,11	890,07	1.282,61	1.134,29	1.438,33	1.427,74	1.181,78	1.268,31	882,71
3	1.400,00	386,18	401,53	650,26	948,58	711,94	954,73	966,54	1.038,05	898,84	828,13	842,65	842,65	784,53	904,97	978,44	1.261,49	1.264,79	1.103,26	1.190,85	823,24
4	1.300,00	323,03	319,74	557,00	831,15	607,53	907,71	910,07	881,16	848,91	740,59	473,69	473,69	640,65	734,11	868,17	1.186,31	1.184,04	1.010,47	1.122,39	760,63
5	1.200,00			432,50	776,54	512,60	791,94	784,11	720,64	780,23	634,93	390,29	390,29	443,84	593,53	743,93	1.075,58	1.078,27	953,38	936,16	689,21
6	1.100,00			318,53	738,19	377,53	692,57	689,14	633,36	638,09	574,91				520,55	672,26	896,00	901,07	897,64	830,03	616,78
7	1.000,00			184,23	688,37	171,48	565,00	565,00	477,23	523,15	506,53				319,46	618,69	802,98	806,59	808,13	671,47	541,72
8	900,00				614,77		541,72	536,34	409,15	432,12	455,24					524,89	726,80	727,55	672,76	556,86	461,12
9	800,00				522,37		482,00	476,05	358,70	380,72	414,26					420,17	667,81	671,47	574,14	516,89	422,27
10	700,00				442,41		416,32	416,32	283,33	326,41	369,55					335,49	591,56	593,09	520,86	460,75	374,43
11	600,00				393,54		311,37	304,49	223,80	251,50	300,73						532,70	534,97	391,86	395,96	309,03
12	500,00				193,50		274,78	268,94		177,22	263,00						398,42	401,71	275,23	336,57	201,64
13	400,00										242,91									227,28	
14	300,00										199,15										
15	200,00																				
16	100,00																				

4.2.2. 18S Sekans bulguları

O. laxiflora, *O. punctulata*, *O. palustris* ve *F. sribnyi* türlerinin rDNA 18S bölge sekansı 607 baz alınarak yapılmış, DNAMAN 3.1 (Lynnon Corporation, Pointe-Claire, Quebec, Canada) ile toplu halde düzenlenmiş ve tüm türlerde ortak başlangıç ve bitiş noktaları tespit edilmiştir. Elde edilen bu türler toplu halde MEGA 6 ile açılmış ve öncelikle ClustalW kullanılarak (Open gap penalty = 15,0, extend gap penalty = 6.66) düzenlenmiştir. Elde edilen genel dizi görünümü manuel olarak kontrol edilmiştir. Gen dizileri Tablo 4,2’de verilmiştir. Maksimum benzerlik prensibine göre oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 4,8’de görülen farklılıklar Tablo 4,3 ve 4,4’de verilmiştir.



Şekil 4.8. Çalışılan türlerin filogenetik ağacı.

Tablo 4.2. Çalışılan taksonlarının 18S hizalama (alignment) sonucu

<i>F. stribnyi</i>	GGC	TTG	CTT	TGA	GCA	CTC	TAA	TTT	CTT	CAA	AGT	AAC	GGC	GCC	GGA	GGA	ACG	ACC	CGG	CCA	GTG	AAG	GCC	AGG	AGC	GCA
<i>O. punctulata</i>	A..	A.TA.	...
<i>O. laxiflora</i>	A..	A.TTA.	...
<i>O. palustris</i>	A..	A.TTA.	...
<i>F. stribnyi</i>	TCG	CCG	GCA	GAA	GGG	ACG	GGA	CGG	CCG	GTA	CAT	GCT	TTT	GAG	GGC	CGA	CCG	GCC	GGC	CCA	ACC	CAA	GAT	CCA	ACT	ACG
<i>O. punctulata</i>	A..TA	..C	ACA	G..	..G	..C	A.C	G.-	-GA	...	G..	...	A..	.A.	AG.
<i>O. laxiflora</i>	T..TA	..C	ACA	G..	..G	..C	A.C	G.-	-GA	...	G..	...	A..	.A.	AG.
<i>O. palustris</i>	T..TA	..C	ACA	G..	..G	..C	A.C	G.-	-GA	...	G..	...	A..	.A.	AG.
<i>F. stribnyi</i>	AGC	TTT	TTA	ACT	GCA	ACA	ACT	TAA	ATA	TAC	GCT	ATT	GGA	GCT	GGA	ATT	ACC	GCG	GCT	GCT	GGC	ACC	AGA	CTT	GCC	CTC
<i>O. punctulata</i>
<i>O. laxiflora</i>
<i>O. palustris</i>
<i>F. stribnyi</i>	CAA	TGG	ATC	CTC	GTT	AAG	GGA	TTT	AGA	TTG	TAC	TCA	TTC	CAA	TTA	CCA	GAC	TCG	AAG	AGC	CCG	GTA	TTG	TTA	TTT	ATT
<i>O. punctulata</i>AA
<i>O. laxiflora</i>N	.NNAA
<i>O. palustris</i>AA
<i>F. stribnyi</i>	GTC	ACT	ACC	TCC	CCG	TGT	CAG	GAT	TGG	GTA	ATT	TGC	GCG	CCT	GCT	GCC	TTC	CTT	GGA	TGT	GGT	AGC	CGT	TTC	TCA	GGC
<i>O. punctulata</i>	C..
<i>O. laxiflora</i>	C..
<i>O. palustris</i>	C..
<i>F. stribnyi</i>	TCC	CTC	TCC	GGA	ATC	GAA	CCC	TAA	TTC	TCC	GTC	ACC	CGT	CAA	TAC	CAT	GGT	AGG	CCC	CTA	TCC	TAC	CAT	CGA	AAG	TTG
<i>O. punctulata</i>C	C..A
<i>O. laxiflora</i>C	C..A
<i>O. palustris</i>C	C..A
<i>F. stribnyi</i>	ATA	GGG	CAG	ATA	TTT	GAA	TGA	TGC	GTC	GCC	GGC	ACA	AG-	GGC	CGT	GCG	ATC	CGT	CGA	GTT	ATC	ATG	AAT	CAT	CAG	AGC
<i>O. punctulata</i>C	A..AAA.A	.A.	G..
<i>O. laxiflora</i>C	A..AAA.A	.A.A	G..
<i>O. palustris</i>C	A..AAA.A	.A.A	G..
<i>F. stribnyi</i>	ACC	GGG	CAA	A-G	CCC	GTG	TTG	GCC	TTT	TAT	CTA	ATA	AAT	GCA	TCC	CTT	CCG	GAA	GTC	GGG	G					
<i>O. punctulata</i>	.A.	A..-A	..T	.C.	.C.	A..CGA	N..
<i>O. laxiflora</i>	.A.	AA.A.	..TT	.C.	...	A..CGA	A..	..T
<i>O. palustris</i>	.G.	A..	..TG	..-	..T	.C.	.C.	A..CGA	A..	..T

Tablo 4.3. Karakter değişiklikleri listesi

Karakter	CI	Steps	Changes
37	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
61	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
63	1.000	1	node_6 T ==> G <i>F.stribnyi</i>
69	1.000	1	node_6 C ==> T node_5
74	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
88	1.000	1	node_6 A --> G <i>F.stribnyi</i>
		1	node_6 A --> T node_5
95	1.000	1	node_6 T ==> C <i>F.stribnyi</i>
96	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
99	1.000	1	node_6 C ==> A <i>F.stribnyi</i>
100	1.000	1	node_6 A ==> C <i>F.stribnyi</i>
101	1.000	1	node_6 C ==> G <i>F.stribnyi</i>
102	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
103	1.000	1	node_6 G ==> C <i>F.stribnyi</i>
108	1.000	1	node_6 G ==> A <i>F.stribnyi</i>
111	1.000	1	node_6 C ==> T <i>F.stribnyi</i>
112	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
114	1.000	1	node_6 C ==> T <i>F.stribnyi</i>
115	1.000	1	node_6 G ==> T <i>F.stribnyi</i>
119	1.000	1	node_6 G ==> A <i>F.stribnyi</i>
120	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
124	1.000	1	node_6 G ==> C <i>F.stribnyi</i>
130	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
134	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
145	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
146	1.000	1	node_6 G ==> A <i>F.stribnyi</i>
288	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
297	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
382	1.000	1	node_6 C ==> T <i>F.stribnyi</i>
432	1.000	1	node_6 C ==> A <i>F.stribnyi</i>
433	1.000	1	node_6 C ==> T <i>F.stribnyi</i>
447	1.000	1	node_6 A ==> C <i>F.stribnyi</i>
483	1.000	1	node_6 C ==> T <i>F.stribnyi</i>
493	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
506	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
512	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
522	1.000	1	node_6 A ==> T <i>F.stribnyi</i>
524	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
543	1.000	1	node_6 G ==> A node_5
544	1.000	1	node_6 G ==> A <i>F.stribnyi</i>
548	1.000	1	node_6 A ==> C <i>F.stribnyi</i>
		1	node_5 A ==> G <i>O.palustris</i>
550	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
551	1.000	1	node_5 G ==> A <i>O.laxiflora</i>
554	1.000	1	node_5 A ==> T <i>O.palustris</i>
555	1.000	1	node_5 A ==> G <i>O.palustris</i>
558	1.000	1	node_6 G ==> A <i>O.punctulata</i>
560	1.000	1	node_5 C ==> T <i>O.laxiflora</i>
561	1.000	1	node_6 T ==> C <i>F.stribnyi</i>
563	1.000	1	node_6 C ==> T <i>F.stribnyi</i>
566	0.500	1	node_6 C --> T <i>F.stribnyi</i>
		1	node_5 C --> T <i>O.laxiflora</i>
568	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
576	1.000	1	node_6 C ==> T <i>F.stribnyi</i>
588	1.000	1	node_6 G ==> A <i>F.stribnyi</i>
597	1.000	1	node_6 A ==> G <i>F.stribnyi</i>
598	1.000	1	node_6 A --> G <i>F.stribnyi</i>
603	1.000	1	node_6 C ==> T node_5

Tablo 4.4. Apomorfi listesi

Branch	Character	Steps	CI	Change	
node_6 --> <i>F.stribnyi</i>	37	1	1.000	A ==> G	
	61	1	1.000	A ==> G	
	63	1	1.000	T ==> G	
	74	1	1.000	A ==> G	
	88	1	1.000	A --> G	
	95	1	1.000	T ==> C	
	96	1	1.000	A ==> G	
	99	1	1.000	C ==> A	
	100	1	1.000	A ==> C	
	101	1	1.000	C ==> G	
	102	1	1.000	A ==> G	
	103	1	1.000	G ==> C	
	108	1	1.000	G ==> A	
	111	1	1.000	C ==> T	
	112	1	1.000	A ==> G	
	114	1	1.000	C ==> T	
	115	1	1.000	G ==> T	
	119	1	1.000	G ==> A	
	120	1	1.000	A ==> G	
	124	1	1.000	G ==> C	
	130	1	1.000	A ==> G	
	134	1	1.000	A ==> G	
	145	1	1.000	A ==> G	
	146	1	1.000	G ==> A	
	288	1	1.000	A ==> G	
	297	1	1.000	A ==> G	
	382	1	1.000	C ==> T	
	432	1	1.000	C ==> A	
	433	1	1.000	C ==> T	
	447	1	1.000	A ==> C	
	483	1	1.000	C ==> T	
	493	1	1.000	A ==> G	
	506	1	1.000	A ==> G	
	512	1	1.000	A ==> G	
	522	1	1.000	A ==> T	
	524	1	1.000	A ==> G	
	544	1	1.000	G ==> A	
	548	1	1.000	A ==> C	
	550	1	1.000	A ==> G	
	561	1	1.000	T ==> C	
	563	1	1.000	C ==> T	
	566	1	0.500	C --> T	
	568	1	1.000	A ==> G	
	576	1	1.000	C ==> T	
	588	1	1.000	G ==> A	
	597	1	1.000	A ==> G	
	598	1	1.000	A --> G	
	node_6 --> <i>O.punctulata</i>	558	1	1.000	G ==> A
	node_6 --> node_5	69	1	1.000	C ==> T
		88	1	1.000	A --> T
	543	1	1.000	G ==> A	
	603	1	1.000	C ==> T	
node_5 --> <i>O.laxiflora</i>	551	1	1.000	G ==> A	
	560	1	1.000	C ==> T	
	566	1	0.500	C --> T	
node_5 --> <i>O.palustris</i>	548	1	1.000	A ==> G	
	554	1	1.000	A ==> T	
	555	1	1.000	A ==> G	

Tablo 4.5. Çalışılan türlerin kendi arasındaki distance matrix tablosu

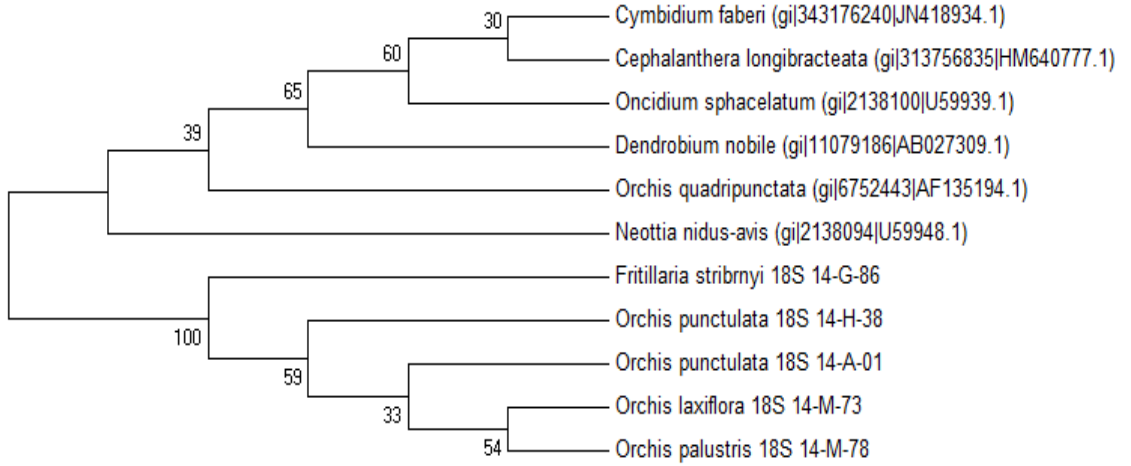
	<i>O. punctulata</i>	<i>O. laxiflora</i>	<i>O. palustris</i>	<i>F. sribnyi</i>
<i>O. punctulata</i>				
<i>O. laxiflora</i>	0.0845			
<i>O. palustris</i>	0.0905	0.0135		
<i>F. sribnyi</i>	0.926	0.0135	0.0101	

4.2.3. 18S Sekans bulgularının NCBI sitesindeki verilerle karşılaştırılması ve Blast Analizi

O. punctulata ve *O. laxiflora* türlerine ait 18S verileri MEGA 6 programında değerlendirilmiş ve online olarak <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> sitesine girilmiş ve blast analizi yapılarak en yakın türlerin dizi analizleri alınarak MEGA 6 programına girilmiştir. Bunların içinden seçilen 6 türün sekans verileri ile yeniden analize tabi tutulmuş ve elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir. Veriler analiz edilerek distance matrix tablosu oluşturulmuş (Tablo 4.6) ve maksimum benzerlik prensibine göre filogenetik ağacı çıkarılmıştır (Şekil 4.9). Seçilen türler ve accession numaraları şunlardır: *Orchis quadripunctata* (accession number gi|6752443|AF135194.1), *Oncidium sphacelatum* (accession number gi|2138100|U59939.1), *Cymbidium faberi* (accession number gi|343176240|JN418934.1), *Cephalanthera longibracteata* (accession number gi|313756835|HM640777.1), *Neottia nidus-avis* (accession number gi|2138094|U59948.1) ve *Dendrobium nobile* (accession number gi|11079186|AB027309.1)

Tablo 4.6. Çalışılan taksonlarının NCBI sitesinde elde edilen verilerle oluşturulan 18S bölgesine göre türlerin distance matrix tablosu.

No	Takson	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	<i>Fritillaria sribnyi</i> (14-G-86)											
2	<i>Orchis punctulata</i> (14-H-38)	0,035										
3	<i>Orchis punctulata</i> (14-A-01)	0,073	0,035									
4	<i>Orchis laxiflora</i> (14-M-73)	0,046	0,011	0,041								
5	<i>Orchis palustris</i> (14-M-78)	0,041	0,008	0,041	0,012							
6	<i>Orchis quadripunctata</i>	0,642	0,638	0,665	0,638	0,626						
7	<i>Oncidium sphacelatum</i>	0,641	0,637	0,664	0,635	0,625	0,011					
8	<i>Cymbidium faberi</i>	0,641	0,637	0,664	0,635	0,625	0,010	0,002				
9	<i>Cephalanthera longibracteata</i>	0,650	0,646	0,673	0,644	0,633	0,011	0,004	0,004			
10	<i>Neottia nidus-avis</i>	0,640	0,640	0,667	0,638	0,628	0,015	0,010	0,010	0,013		
11	<i>Dendrobium nobile</i>	0,639	0,634	0,661	0,633	0,622	0,009	0,003	0,002	0,004	0,009	



Şekil 4.9. Çalışılan türlerin 18S bölgesine göre NCBI sitesinden elde edilen verilerle elde edilen maksimum benzerlik prensibine göre filogenetik ağacı.

4.2.4. ITS Sekans bulguları

O. laxiflora, *O. punctulata*, *O. palustris* ve *F. sribnyi* türlerinin rDNA ITS bölgesine ait 680 bazlık sekans verileri DNAMAN 3.1 (Lynnon Corporation, Pointe-Claire, Quebec, Canada) ile toplu halde düzenlenmiş ve tüm türlerde ortak başlangıç ve bitiş noktaları tespit edilmiştir. Okunmayan baştaki ve sondaki bölgeler atıldıktan sonra elde edilen bu türler toplu halde MEGA 6 ile açılmış ve öncelikle Clustal W kullanılarak (Open gap penalty = 15.0, extend gap penalty = 6.66) düzenlenmiştir. Elde edilen genel dizi görünümü manuel olarak kontrol edilmiştir. Gen dizileri Tablo 4.7’de verilmiştir. Türlerin distance matrix değerleri (Tablo 4.8) ve maksimum benzerlik prensibine göre oluşturulan filogenetik ağacı (Şekil 4.10) internette yapılan araştırmada bulunan türle birlikte verilmiştir.

Tablo 4.7. Çalışılan taksonlarının ITS1 hizalama (alignment) sonucu

F. stribrnyi ITS9	CCGTATGRRRTGTATRAGGTTAATCATCCGTGGCCTAGCGCCCCGATAACGATC-----TGACTGGGACTTATTACAACCTTCGC-CTTCCCTGCGCC
O. laxiflora ITS60	AA.GCA.GTGC.GKGCAC.CGT.....TA.T..A.GASTAA.TTA..GTT.A.--ATGTTA.AGG...AGGAG.GAT...T.CG..G.AG.A.....
O. palustris ITS65	--.A.A.ACGY.GAGCMC.CTTCAGS.TA.C..A.CA.AAA.TT...GTT.C.--TTGTTA.ASA...TGGAS.AAT...T.CG..G.AG.AT.....
O. punctulata ITS46	A---.A.GTGCCGCGCACCCGTC....T.CT..A.GAACAA..C...GG..A.--ATGTTG.AGGG.-A.GGG.GAT...T.CG..G.AG.TT....T.
O. punctulata ITS22	T.ACC.ACTGAA..GCAC.CGTC.T..TCCCT..CCA-CAA..C...GG..A.--ATGTTG.AGGG.-A.GGG.GAT...T.CG..G.AG.TT....T.
F. stribrnyi ITS9	AAGGAACAT-AATGGCAGGACGGA-----CGCACGTCAACGC----CTCGGCGGGCGCGCGGC-GCCCGCTCTCTA-----TCTA
O. laxiflora ITS60T.A..-T..A...T..GCAT--CTTCAAC--CAT--C.T..AAG.GGTTT---GT..T.A..A.TT.TT.T---TT....C.A.--AGAG-.-.G
O. palustris ITS65T.A..-T..A.T.T..GCTT--CTTCAAC--CAT--C.T..AAG.GGTTTTTTGT.TTTR.RAKTT.TT.T---TT....C.A.--RAAGT.G..
O. punctulata ITS46T.A..ATG.A...T..GC..ATTTTCAACCATATATCTT..AAA...TTT---GT.TT.T..A.TT.TT.T---TT....CTA.--AGAG-.-.T
O. punctulata ITS22T.A..ATG.A...T..GC..ATTTTCAACCATATATCTT..AAA...TTT---GT.TT.T..A.TT.TT.T---TT....CTA.--AGAG-.-.T
F. stribrnyi ITS9	TACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAG
O. laxiflora ITS60	..T.G.....T.....T.....G..C.....G.....C.....
O. palustris ITS65	..T.G...C.RA...G.R.....G.....C.....R..A..A.G..C.S.....GG.KG.C.....RA.....R..
O. punctulata ITS46	..G.G.....T.....T.....G..C.....G.....C.....K..
O. punctulata ITS22	..G.G.....T.....T.....G..C.....G.....C.....
F. stribrnyi ITS9	TCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTTTCGGTTCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACGCCTTGTTTCGCTCC-----GTTCCCATTTGCCCTT
O. laxiflora ITS60	.T.....T.....AGCT..C.A.....T.C.....A..A...G.....-ATAGAACC.T.GC..TTATGCG
O. palustris ITS65	.T.....R.....S..G.....ASYT..C.A...SM...T.C...G..S.....A.MT...G..S...-ATAGGACCAT.G...TTATGCR
O. punctulata ITS46	.T.....M.W.....T.....AGCT..C.A.....T.C.....A..A..AA.....-ATAAGACCTT.GA..ATATGCG
O. punctulata ITS22	.T.....T.....AGCT..C.A.....T.C.....A..A..AA.....-ATAAGACCTT.GA..ATATGCG

Tablo 4.7. Devam

F. stribnyi ITS9 CGGGGGC--TGTCACGGATGCGGAGACTGGCCCTCCGTGC-CTCGTGTGCGGCGGGCTTAAGCGCGGG----CTGTCGGCGTCGGGATGGGCACGACGA

O. laxiflora ITS60 ATC.TCT--.A..TA.....A.....TGT.A...G..AA...T...T....G...A.A...-ATGA.T.TCT.C.G.CA.C--.AT...TT.

O. palustris ITS65 ACC.TCT--.A..TA.....A.A.A.....GGT.A...C..AA...T.STT..T.G..AARA...-ATGA.T.TCT.T.GSMA...-.GY.A.TT.

O. punctulata ITS46 GT..TCT--.A.TTA.....G..A....TTGT.A..TG..AA...T...A....G...A.T...-ATGA.T.TCT.T.G.CA.C--.AT...TT.

O. punctulata ITS22 GT..TCT--.A.TTA.....G..A....TTGT.A..TG..AA...T...A....G...A.T...-ATGA.T.TCT.T.G.CA.C--.AT...TT.

F. stribnyi ITS9 GTGGT--GGACGGA-GCACCAGCTGGATGTCGTGGCC-CCCCGTCGCCTTAAGGGGGCTCAAGAGGCCCGGACCA-GGCGAGCCGTGCTCCGTAYGAGG

O. laxiflora ITS60 AC..GTG.T.T...A.TC.....ATTCC..T.CAT.GTTTG..T..T..G..AAA...GTGC.TATTTTAG.T.--A.CCAA.ACAA.TGTC.TCGCA

O. palustris ITS65 AC..KGG.TTT.R.A..T..RS..AATCC..T.CAT.KY.GG..T..T..G.RAAA...GKGC.TATT.CAS.T.--A.CCAA.ACAA.TGTA.TC.CA

O. punctulata ITS46 A...GTG...T.A.A..CT.G.T..ATCC.-A.CAT.GT.AG..T..G..G..AAA...GTGC.TAT..C.GG.T-AA.CTAA.TCA..TGTCTTG.A

O. punctulata ITS22 A...GTG...T.A.A..CT.G.T..ATCC.-A.CAT.GT.AG..T..G..G..AAA...GTGC.TAT..C.GG.T-AA.CTAA.TCA..TGTCTTG.A

F. stribnyi ITS9 AGGGCGTGCCGTCTCGCAACGCGACCCAGGTCAGGCGGGGACACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAAGG--

O. laxiflora ITS60 T.ACAA-----T.AC.T.....ATG.....ATG.....AA

O. palustris ITS65 RAATAA-----T.AC.T..R.....ATG.S...RATG...SY.A.K..W..S.W.....T...S..AR...---

O. punctulata ITS46 ..ACAA-----CT.AT.T.....ATG.....TG.....A-----

O. punctulata ITS22 ..ACAA-----CT.AT.T.....ATG.....TG.....G.A-----

4.2.5 ITS Sekans bulgularının NCBI sitesindeki verilerle karşılaştırılması ve Blast Analizi

O. punctulata ve *O. laxiflora* türlerine ait 18S verileri MEGA 6 programında değerlendirilmiş ve online olarak <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> sitesine girilmiş ve blast analizi yapılarak en yakın türlerin dizi analizleri alınarak MEGA 6 programına girilmiştir. Bunların içinden seçilen 6 türün sekans verileri ile yeniden analize tabi tutulmuş ve elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir. Seçilen türler ve accession numaraları şunlardır:

Anacamptis champagneuxii (accession number gi|34333976|AY364879.1)

A. coriophora subsp. *coriophora* (accession number gi|34493779|AY369086.1)

A. laxiflora (accession number gi|148879895|AM711747.1)

A. morio (accession number gi|148879861|AM711713.1)

A. pyramidalis (accession number gi|34333967|AY364870.1)

Dactylorhiza romana (accession number gi|66275687|DQ022873.1)

D. viridis (accession number gi|66275695|DQ022881.1)

Gymnadenia conopsea (accession number gi|148879895|AM711747.1)

Himantoglossum caprinum (accession number gi|327360344|FR750402.1)

Ophrys apifera (accession number gi|28865898|AJ539529.1)

Op. sicula (accession number gi|148879883|AM711735.1)

Orchis anthropophora (accession number gi|34333966|AY364869.1)

O. italica (accession number gi|545599946|KF499511.1)

O. mascula (accession number gi|33772624|AY351379.1)

O. militaris (accession number gi|51872527|AY699977.1)

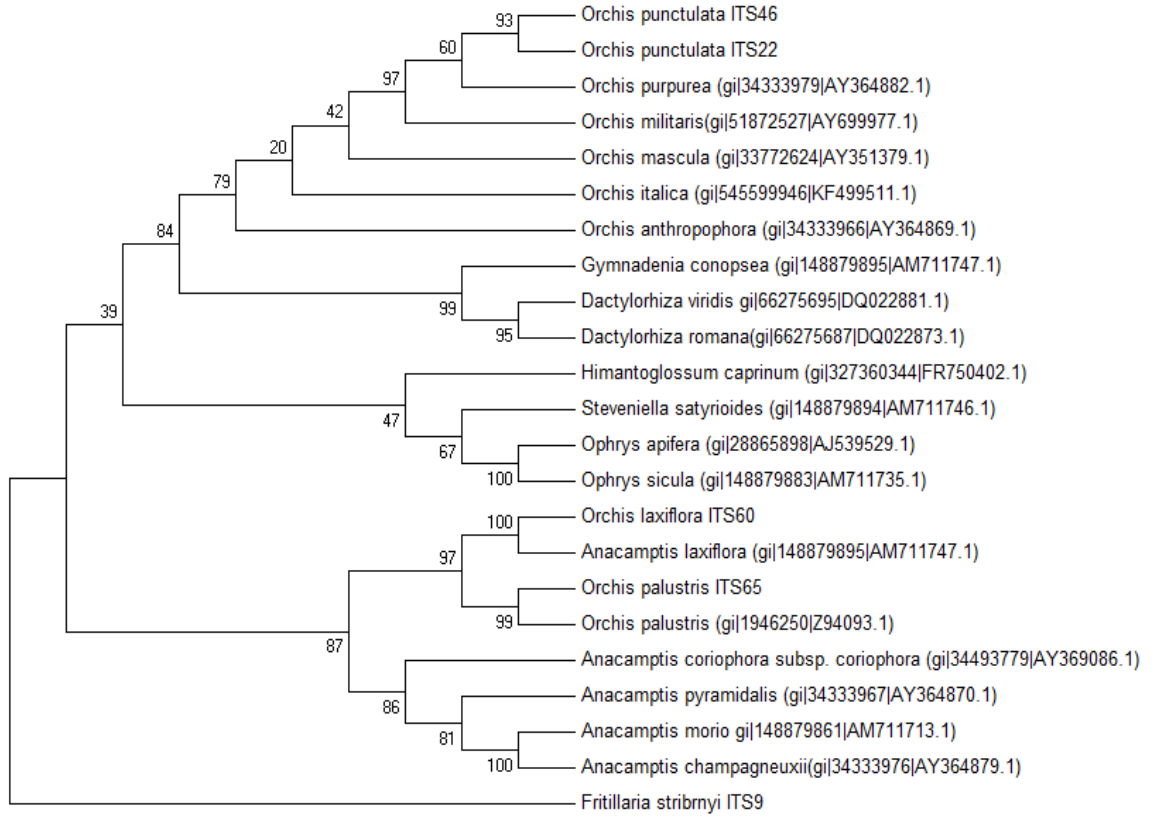
O. palustris (accession number gi|1946250|Z94093.1)

O. purpurea (accession number gi|34333979|AY364882.1)

Stenipedium satyrioides (accession number gi|148879894|AM711746.1)

Tablo 4.8. Çalışılan taksonlarının NCBI hizalama (alignment) sonucu elde edilen distance matrix tablosu

No	Takson	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	<i>Fritillaria stribrnyi ITS9</i>																							
2	<i>Orchis laxiflora ITS60</i>	0,853																						
3	<i>Orchis palustris ITS65</i>	0,909	0,128																					
4	<i>Orchis punctulata ITS46</i>	0,822	0,189	0,257																				
5	<i>Orchis punctulata ITS22</i>	0,822	0,189	0,257	0,000																			
6	<i>Anacamptis laxiflora</i>	0,853	0,000	0,128	0,189	0,189																		
7	<i>Anacamptis coriophora subsp. coriophora</i>	0,780	0,169	0,192	0,253	0,253	0,169																	
8	<i>Steveniella satyrioides</i>	0,732	0,189	0,207	0,148	0,148	0,189	0,202																
9	<i>Orchis italica</i>	0,711	0,168	0,212	0,050	0,050	0,168	0,201	0,097															
10	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	0,822	0,175	0,218	0,234	0,234	0,175	0,130	0,184	0,205														
11	<i>Orchis palustris</i>	0,818	0,079	0,056	0,206	0,206	0,079	0,151	0,165	0,170	0,169													
12	<i>Gymnadenia conopsea</i>	0,793	0,190	0,251	0,110	0,110	0,190	0,214	0,123	0,080	0,228	0,206												
13	<i>Orchis anthropophora</i>	0,727	0,188	0,235	0,056	0,056	0,188	0,201	0,104	0,016	0,206	0,192	0,074											
14	<i>Anacamptis morio</i>	0,787	0,203	0,237	0,269	0,269	0,203	0,152	0,203	0,216	0,124	0,185	0,248	0,224										
15	<i>Anacamptis champagneuxii</i>	0,787	0,203	0,237	0,269	0,269	0,203	0,152	0,203	0,216	0,124	0,185	0,248	0,224	0,000									
16	<i>Orchis militaris</i>	0,850	0,182	0,243	0,033	0,033	0,182	0,245	0,141	0,062	0,241	0,192	0,116	0,067	0,246	0,246								
17	<i>Orchis mascula</i>	0,774	0,223	0,279	0,085	0,085	0,223	0,253	0,149	0,056	0,241	0,234	0,116	0,056	0,227	0,227	0,098							
18	<i>Orchis purpurea</i>	0,816	0,196	0,264	0,016	0,016	0,196	0,244	0,147	0,056	0,233	0,213	0,103	0,050	0,268	0,268	0,039	0,085						
19	<i>Himantoglossum caprinum</i>	0,762	0,259	0,281	0,198	0,198	0,259	0,272	0,138	0,164	0,248	0,234	0,186	0,172	0,282	0,282	0,206	0,229	0,185					
20	<i>Dactylorhiza viridis</i>	0,777	0,199	0,276	0,130	0,130	0,199	0,230	0,137	0,105	0,244	0,230	0,062	0,098	0,289	0,289	0,142	0,149	0,116	0,201				
21	<i>Dactylorhiza romana</i>	0,799	0,183	0,258	0,104	0,104	0,183	0,231	0,130	0,086	0,221	0,214	0,050	0,080	0,264	0,264	0,117	0,130	0,098	0,194	0,028			
22	<i>Ophrys apifera</i>	0,849	0,255	0,292	0,209	0,209	0,255	0,287	0,123	0,149	0,259	0,245	0,190	0,163	0,266	0,266	0,196	0,203	0,209	0,222	0,213	0,191		
23	<i>Ophrys sicula</i>	0,833	0,240	0,284	0,195	0,195	0,240	0,293	0,116	0,136	0,266	0,237	0,176	0,149	0,264	0,264	0,182	0,189	0,195	0,215	0,205	0,184	0,016	



Şekil 4.10. Çalışılan türlerin ITS bölgesine göre NCBI sitesinden elde edilen verilerle elde edilen maksimum benzerlik prensibine göre filogenetik ağacı.

4.3. Tartışma

Çalışmamızda toplanan materyalin tayininde, herbaryum örneği, alkol materyali, araziden çekilen resimler kullanılmıştır. Monograflar hazırlanırken değişik yerlerden toplanmış numunelerin kısımlarının ölçümleri yapılmıştır. Böylece elde edilen bilgiler kullanılarak orkide monografları hazırlanmıştır. Bunlarla ilgili ayrıntılı dağılış listeleri ve dağılım haritaları monografların sonunda verilmiştir.

Kaynaklarda, Türkiye’de hangi orkidelerin bulunduğu, verilen bilimsel isimler, takson seviyeleri (tür veya alt tür) hakkında farklı bilgiler bulunmaktadır. Çalışmamızda bu farklı bilgiler gözden geçirilmiş, Flora of Turkey 8 [8] cildinde kabul edilenler esas olarak alınmıştır. Buna göre iki türün morfoljik olarak birbirlerinden oldukça farklıdır. *O. punctulata*’nın mahmuzu aşağıya doğru yönelik ve braktelerinin ovaryumdan çok kısa,

labellumun orta lobu derin bilobat, lobüller arasındaki belirgin diş taşınması ve sarı renkli labelluma sahip olması ile ayrılmaktadır. *O. laxiflora* ve *O. palustris* ise mahmuz aşığıya doğru ve mor renklidir. *O. laxiflora*'nın labellumu 3 loblu, daima beneksiz, lateral loblar belirgin şekilde geriye kıvrılmış, orta lob çok kısa, emerginat, bazen tamamen eksik olması ile iç grup olarak seçilen *O. palustris* az çok yassı labellum, 3 loblu veya bazen tam, koyu mor benekli, orta lob lateral loblar kadar uzun olması ile ayrılır. Dağılım olarak baktığımızda *O. laxiflora* Trakya genelinde yaygın olarak bulunmakta ve nemli veya hafif bataklık habitatları tercih ederken, *O. punctulata* ise Gelibolu Yarımadası ve Edirne Keşan Mecidiye civarında bulunmakta, kızılçam ve makilik alanlarda yayılış göstermektedir.

Moleküler çalışmamızda *Orchis* cinsine ait 2 tür *O. punctulata* ve *O. laxiflora* hedef olarak seçilmiş, dış grup olarak Liliaceae familyasına ait *Fritillaria sribnyi*, iç grup olarak ise *Orchis palustris* taksonu seçilmiştir. Moleküler çalışmalarda kullanılan örnekler *O. punctulata* Çanakkale Abide civarı (14-H-38) ve Edirne Keşan Mecidiye İtalyan koyu (14-H-001), *O. laxiflora* (14-M-73) ve *O. palustris* (14-M-78) Kırklareli Demirköy İğneada ve *F. sribnyi* ise Kırklareli Lüleburgaz Karaağaç (14-G-86) köyünden toplanmıştır.

RAPD (Random Amplified Primer Design) PCR'ında izalasyonu yapılan ve yeterli saflığa sahip olduğu görülen 18S bölgesine ait DNA'ların jelde yürütülmesiyle oluşan bantların (Şekil 4.7) kullanılan 4 primerde de farklı bantların oluştuğu görülmüş ve bu bantların değerleri karşılaştırıldığında (Tablo 4.1) 4 türün de oluşturdukları bantların birbirinden farklı özelliklere sahip olduğu görülmektedir. RAPD tekniği daha çok aynı türün farklı popülasyonları arasında ki genetik çeşitliliği saptamak için kullanılan ucuz, kolay ve kullanışlı bir yöntemdir. Fakat bu çalışmada kullanılan türler arasındaki belirgin olan genetik farklılığı da açıkça ortaya koymaktadır. Bu özellikle 1 ve 2 numaralı örnek olan *O. punctulata*'nın iki lokasyondan alınan örneklerinde görülebilir. Dış grup olarak seçilen *F. sribnyi* ise bariz olarak diğer 4 örnekten farklıdır.

18S ve ITS bölgeleri filogenetik analiz için kullanılmıştır. 18S bölgesi daha yavaş değişen ve evrimsel süreçte daha uzak akrabalar arasındaki ilişkiyi ortaya koyan bir bölgedir. ITS bölgesi ise daha hızlı değişen ve yakın akrabalar arasındaki ilişkiyi ortaya koymak açısından son derece önemlidir. Özellikle tür ve cins seviyesi için daha kullanışlı

olduğu söylenebilir. Yapılan çalışmada da elde edilen sonuçların bunu doğruladığı görülmektedir.

18S bölgesi ile yapılan çalışmada türlerin sekans analizi sonucu elde edilen hizalama sonuçları (Tablo 4.2), karakter değişikliklerinin listesi (Tablo 4.3), apomorfi listesi (Tablo 4.4) ve distance matrix (Tablo 4.5) tablosu ile türler arasındaki farklılıklar ortaya konulmuştur. Elde edilen bu verilerle türler arasındaki filogenetik ilişkiler ortaya konulmuş ve maksimum benzerlik prensibine göre filogenetik ağaçları oluşturulmuştur (Şekil 4.8).

O. punctulata ve *O. laxiflora* türlerine ait 18S verileri NCBI sitesine girilerek alınan geçici numara ile karşılaştırıldığında yüksek benzerlik gösteren türler seçilmiş ve bunlar arasında *O. quadripunctata* en yakın tür olduğu bunun dışında *Oncidium*, *Cymbidium* ve *Dendrobium* gibi tropikal orkilerin yanısıra *Cephalanthera* ve *Neottia* gibi karasal türlerle olan akrabalık ilişkileri de ortaya konulmuştur (Tablo 4.6, Şekil 4.9).

Bu 4 türün ITS çalışmaları ise yakın türlerde bu bölgenin kullanışlı olduğu fikrini desteklemektedir. Bu bölge ile yapılan çalışmalarda ve NCBI sitesinden elde edilen verilerle türler arasında ve yakın türlerle olan ilişkileri daha detaylı olarak ortaya konmuştur. Bu bölge ile yapılan çalışmaların da fazlalığı filogenetik ilişkilerin daha detaylı olarak ortaya konmasını sağlamıştır.

Orchis cinsi son zamanlarda sistematik açıdan oldukça değişen cinslerin başında gelmektedir. Yapılan DNA çalışmaları ve kromozom sayıları da dikkate alınarak *Orchis* türlerinin bazıları *Neotinea* cinsine, bazıları ise *Anacamptis* cinsine Bateman, Pridgeon & Chase 1997 tarafından nakledilmiştir [122]. Kreutz'un ilk kez 1998 yılında Almanca olarak basılan [46] ve daha sonra Çolak tarafından 2009 yılında Türkçe olarak yayınlanan "Türkiye Orkideleri" kitabında da bu sistematik temel alınmıştır [47]. Bateman, Pridgeon & Chase'e göre Trakyada bulunan ve Türkiye Florasında *Orchis* olarak adlandırılan türler: *Anacamptis collina* (*O. collina*), *A. coriophora* (*O. coriophora*), *A. laxiflora* (*O. laxiflora*), *A. morio* subsp. *morio* (*O. morio* subsp. *morio*), *A. morio* subsp. *picta* (*O. morio* subsp. *picta*), *A. palustris* (*O. palustris*), *A. papilionacea* var. *papilionacea* (*O. papilionacea* var. *papilionacea*), *A. papilionacea* var. *rubra* (*O. papilionacea* var. *rubra*), *Neotinea tridentata* (*O. tridentata*), *O. italica*, *O. pinetorum*, *O. provincialis*, *O. punctulata*, *O. purpurea* ve *O. simia*.

Buna karşılık bazı araştırmacılar ise bu nakillerin olamayacağını belirtip, buna karşılık *Aceras* ve *Neotinea* cinslerini de *Orchis* içine dahil etmektedirler [107]. Tyteca ve Klein [128]'e göre ise nakledilmenin doğru olmayacağı konusunda hem fikirler fakat *Orchis* cinsinin ise bu karmaşık yapısının farklı cinslere bölünerek çözülmesi gerektiğini belirtmekte ve bu cinsi *Herorchis*, *Androrchis*, *Orchis* ve *Odontorchis* olmak üzere 4 ayrı cinse ayırmaktadırlar: buna göre ise araştırma bölgesindeki *Orchis* türleri şu şekildedir: *Androorchis pinetorum* (*O. pinetorum*), *A. provincialis* (*O. provincialis*), *Herorchis collina* (*O. collina*), *H. coriophora* (*O. coriophora*), *H. laxiflora* (*O. laxiflora*), *H. morio* (*O. morio*), *H. palustris* (*O. palustris*), *H. papilionacea* (*O. papilionacea*), *Odontorchis tridentata* (*O. tridentata*), *O. italica*, *O. punctulata*, *O. purpurea* ve *O. simia*.

Buna göre yapılan ITS çalışmaları ve NCBI sitesinden elde edilen verilerle yapılan filogenetik analizlerde *O. laxiflora* ve *O. palustris*'in Bateman, Pridgeon & Chase tarafından belirtildiği gibi *A. coriophora*, *A. morio*, *A. champagneuxii* ve *A. pyramidalis* ile ayrı bir grup oluşturduğu, *O. punctulata*'nın ise *O. italica*, *O. mascula*, *O. militaris*, ve *O. purpurea* ile ayrı bir grup oluşturduğu ve yakın grup olarak *Gymnadenia* ve *Dactylorhiza* cinslerinin oluşturduğu grup yer almaktadır. Bunların dışında ise *Anacamptis* grubu ile arada kalan *Hmantoglossum*, *Steveniella* ve *Ophrys* cinslerinin oluşturduğu grup yer almaktadır.

2012 yılında yayınlanan "Türkiye Bitkileri Listesi" kitabında, Türkiye Florası temel alınmış ve türler *Orchis* cinsi içerisinde bırakılmıştır [117]. Moleküler çalışmalar sonucunda; *O. punctulata*, *Orchis* cinsi içinde kalmaya devam ederken, *O. laxiflora* ve *O. palustris*'in *Anacamptis* cinsine aktarılmasının doğru olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. **Arditti, J., 1979.** Aspect of the Physiology of Orchids, Advances in Botanical Research (H.W. Woolhouse, editor) 7:421-665, Academic Press, Londra.
2. **Sezik, E., 1984.** Orkidelerimiz, Türkiye'nin Orkideleri, Sandoz Kültür Yayınları, no: 6, İstanbul.
3. **Cullen, J., 1992.** The Orchid Book, Cambridge University Press, England.
4. **Allaby, M., 2001.** Plants and Plant Life, Vol. 9. Flowering Plants The Monocotyledons, Danbury, Connecticut Grolier.
5. **Govaerts, R., 2010.** World Orchid Checklist, Royal Botanical Gardens, Kew, <http://www.kew.org/science/orchids/research.html#world>, 13.01.2014.
6. **Baskin, C.C. & Baskin, J.M., 1998.** Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press, San Diego.
7. **Anonim, 2009;** www.en.wikipedia.org/wiki/Taxonomy_of_the_orchidaceae.
8. **Renz, J. & 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, 1984.
9. **Güler, N., E. Sezik, and G. Olgun, 2008.** "Morphological and Chorological Studies on Orchids (Orchidaceae) of the Ida Mountains (NW-Turkey): I" Journal Europäischer Orchideen, 40 (2): 501-548.
10. **Nicholls, W.H., 1969.** Ref.: in Arditti 1979, Aspect of the Physiology of Orchids, Advances in Botanical Research (H.W. Woolhouse, editor), 7:421, 1969.
11. **Sezik, E., 1967.** Türkiye'nin Salepgilleri, Ticari Salep Çeşitleri ve Özellikle Muğla Salebi Üzerinde Araştırmalar (Doktora Tezi), İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 1967.
12. **Arditti, J., 1977.** Orchid Biology, Reviews and Perspectives: I, Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca, 1977.
13. **Nilsson, A.L., 1992a.** "Animal pollinators Adjust Plant Gender in Relation to floral display: Evidence from Orchismorio (Orchidaceae)". Evolutionary Trends in Plants, 6(1): 33-40, 1992a.
14. **Nilsson, L.A., 1992b.** "Orchid Pollination Biology". Trends. Ecol. Evol., 7 (8): 255-259, 1992b.

15. **Güler, N., 2005.** Kazdağları'nda Yetişen Orchidaceae Familyası Bitkileri Üzerinde Morfolojik ve Korolojik Araştırmalar, (Doktora Tezi), T. Ü. Fen Bil. Ens., Edirne.
16. **Arditti, J., 1967.** Factors Effecting the Germination of Orchid Seeds, The Botanical Review, 33:1, 1967.
17. **Chase, M.W. & Phippen J.S., 1988.** "Seed morphology in the Oncidiinae and related subtribes (Orchidaceae)". Systematic Botany, 13(3): 313-323,1988.
18. **Healey, P.L., Arditti, J., Michaud, J.D., 1980.** "Morphometry of Orchid seeds III. Native California and Related species of Goodyera, Piperia, Platanthera and Spiranthes". Amer. J. Botany, 67(4): 508-518, 1980.
19. **Kaiser, R., 1993.** The Scents of Orchids, Elsevier, Amsterdam.
20. **Ocak, A. and Tokur, S., 2000.** The Flora of Gülümbe Dağı (Bilecik-Turkey)
21. **Türker, A.U. and Güner A., 2003.** Plant Diversity in Abant Nature Park (Bolu), Turkey
22. **Sezik, E., İşler, S., Güler, N., Orhan, Ç., Aybeke, M., Deniz, İ.G., ve Üstün, O., 2007.** Salep ve Orkidelerin Tahribi, TÜBİTAK Araştırma Projesi Raporu, TBAG-Ç-SEK/23 (103T008), Ankara.
23. **İkinci, N., Güner, A., 2007.** Flora of the Gölcük Area (Bolu, Turkey), Turkish Journal of Botany, 31: 87-107.
24. **Arslan, N., 2010.** Ankara ve Civarı Orkidelerinin Sistemik ve Korolojik Yönden İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
25. **Kasperek, M. Grimm, U. 1999.** European Trade in Turkish Salep with Special Reference to Germany. Economic Botany 53 (4): 396-406
26. **Sezik E. ve Özer, B., 1983.** Kastamonu Salebinin Menşei ve Kastamonu Civarının Orkideleri. Tübitak Research Project, Temel Bilimler Araştırma Grubu Projesi, TBAG 424, Ankara/Turkey.
27. **Sezik, E. ve Baykal, T., 1991.** Maraş Salebinin Menşei. Tübitak Doğa-Tr.J.of Pharmacy 1. S. 10-16.
28. **Buttler, K., 1986.** Orchideen. Die Wirldwachsenden Arten und Unterarten Europas, Vorderasiens und Nordafrikas. Gesamtherstellung Mohndruck Graphische Betriebe GmbH, Gütersloh, Germany. 287p.

- 29. Hebert PDN, Gregory TR., 2005.** The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy
Department of Integrative Biology, Biodiversity Institute of Ontario,
University of Guelph, Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada;
- 30. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR., 2003.** Biological identifications
through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B 270:313–321.
- 31. Aravind K., G. Ravikanth, R. Uma Shaanker, K. Chandrashekara, A.R.V Kumar,
and K.N. Ganeshaiyah., 2007** DNA barcoding: An exercise in futility or utility
Current Science. 92(9):1213-1216.
- 32. Mehrdad Hajibabaei, M. Alex Smith, Daniel H. Janzen, Josephine J. Rodriguez,
James B. Whitfield and Paul D. N. Hebert, 2006.** Blackwell Publishing Ltd
Barcoding a minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is
degraded. Molecular Ecology Notes (2006)6, 959–964
- 33. Folmer. O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek. R., 1994.** DNA primers for
amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse
metazoan invertebrates. Center for Theoretical and Applied Genetics, and
Institute of Marine and Coastal Science, Rutgers University, New Brunswick,
New Jersey 08903-231
- 34. T. D. Kocher, W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Paabo, F. X. Villablanca,
and A. C. Wilson, 1989.** Dynamics of mitochondrial DNA evolution in
animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Nati.
Acad. Sci. USA Vol. 86, pp. 6196-6200, August 1989 Evolution
- 35. Klug ve Cummings 2000.** Genetik. Öner, C. (eds.), Palme Yayıncılık, Ankara, 816 s.
- 36. Delforge, P., 2006.** Orchids of Britain and Europe, Harper Collins Publisher, London,
2006
- 37. Lewontin, R. 2007.** Üçlü sarmal: gen, organizma ve çevre. Çeviren Ergi Deniz Özsoy.
TÜBİTAK, 2007
- 38. Tezcan, M. 2009.** Kaz Dağı (Çanakkale) Endemik Bitkilerinden Bazılarının DNA
Barkodlaması (YL Tezi). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri
Enstitüsü, Çanakkale.
- 39. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990.** Amplification and direct sequencing
of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H.
Gelfand, J. J. Snisky, and T. J. White [eds.], PCR protocols, a guide to

- methods and applications, chapt. 38, 315–322. Academic Press, San Diego, CA.
- 40. Bruns, T.D., Gardes, M., White, T.J., Fortin, J.A., Taylor, J.W., 1991.** Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22, 525-564.
- 41. Steven B. Lee and John W. Taylor, 1992.** Phylogeny of Five Fungus-like Protoctistan Phytophthora Species, Inferred from the Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA Steven B. Lee and John W. Taylor Department of Plant Biology, University of California, Berkeley
- 42. Gernandt DS & A. Liston, 1999.** Internal transcribed spacer region evolution in *Larix* and *Pseudotsuga* (Pinaceae). *AmJ Bot* 86: 711–723.
- 43. M A Hershkovitz and L A Lewis, 1996.** Deep level diagnostic value of the rDNA-ITS region. *Molec. Biol. Evol.* 13: 1276-1295.
- 44. Westhead, DR, JH Parish, RM Twyman, 2002.** *Instant Notes: Bioinformatics.* BIOS Scientific Publishers, Oxford, 2002.
- 45. Hürkan, K., 2011.** *Orchis anatolica* Boiss. ve *Orchis tridentata* Scopoli (Orchidaceae) taksonlarının DNA sekans yöntemiyle moleküler filogenetik özelliklerinin belirlenmesi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- 46. Kreutz, (C.A.J.), K., 1998.** *Die Orchideen der Türkei: Beschreibung, Ökologie, Verbreitung, Gefährdung, Schutz,* C.A.J. Kreutz, Landgraaf, Netherlands.
- 47. Kreutz, K. & A.H. Çolak, 2009.** *Türkiye Orkideleri (Botanik Özellikleri, Ekolojik İstekleri, Doğal Yayılış Alanları, Yaşam Tehditleri, Koruma Önlemleri).*- Rota Yayınları. İstanbul.
- 48. Boissier, E. 1884.** *Flora Orientalis sive enumeratio plantarum in oriente a Graecia et Aegyptia and Indiae. Fines Hucusque Observatorum Auctore,* *Monocotyledonearum,* 5: 74-80, Cenevre.
- 49. Sezik, E., 1982.** *Türkiye’de Orchidaceae familyası”. IV. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı kitapçığı, s. 77-83, Eskişehir, 1982.*
- 50. Sezik, E., 2002.** *Türkiyenin Orkideleri ve Salep”. Acta Pharmaceutica Turcica, 44: 151-157, 2002*

51. **Güler, N., 1997.** Edirne Çevresindeki Orchis L. (Orchidaceae) Türleri üzerinde Morfolojik, Sistematik, Korolojik, Karyolojik ve Palinolojik araştırmalar (Yüksek Lisans Tezi), Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 1997.
52. **Ertuğ, F., 2000.** Reply to Kaspary and Grimm's Article, Orchid Trade for Salep, Economic Botany, 54: 421-422.
53. **Kreutz, (C.A.J.), K., 2000.** Orchidaceae. in Flora of Turkey and The East Aegean Islands (Edit. Güner et al.), University Press, 11:275-305, Edinburgh, 2000
54. **Tamer, C.E., Karaman, B. and Çopur, O.U. 2006.** A Traditional Turkish Beverage: Salep, Food Reviews International, 22: 43-50.
55. **Aybeke, M., 2007.** Pollen and Seed Morphology of Some *Ophrys* L. (Orchidaceae) Taxa, Journal of Plant Biology, 50(4), 387-395.
56. **Daşkın, R., Yılmaz, Özer and Kaynak, G., 2007.** A New Record for The Flora of Turkey: *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae), Journal Biology. Environment Science, 1:1, 11-14.
57. **Sezik, E., İşler, S., Güler, N., Orhan, Ç., Aybeke, M., Deniz, İ.G., ve Üstün, O., 2007.** Salep ve Orkidelerin Tahribi, TÜBİTAK Araştırma Projesi Raporu, TBAG-Ç-SEK/23 (103T008), Ankara.
58. **Deniz, İ.G., 2009.** Antalya İlinde Yayılış Gösteren *Ophrys* L. (Orchidaceae) Cinslerine Ait Türler Üzerinde Taksonomik Bir Araştırma, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Antalya.
59. **Arslan, N., 2010.** Ankara ve Civarı Orkidelerinin Sistematik ve Korolojik Yönden İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
60. **Aybeke, M., Sezik, E., Olgun, G., 2010.** Vegetative Anatomy of Some *Ophrys*, *Orchis* and *Dactylorhiza* (Orchidaceae) Taxa in Trakya Region of Turkey, Flora 205, 73-89.
61. **Tekinşen, K.K., and Güner, A., 2010.** Chemical Composition and Physicochemical Properties of Tubera Salep Produced From Some Orchidaceae Species, Food Chemistry, Vol: 121, Issue: 2, 468-471.

62. **Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., 2000.** Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı, Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Yüzüncü Yıl Üniversitesi Yayınları, Barışcan Ofset, Ankara.
63. **Anonim, 2011.** CITES (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) <http://www.cites.org/eng/resources/species.html>
64. **Webb, D.A., 1966.** The Flora European Turkey, Proceeding of the Royal Irish Academy, 65, Section B., No.1, s.84-86, Dublin.
65. **Webb, D.A., 1966.** The Flora European Turkey, Proceeding of the Royal Irish Academy, 65, Section B., No.1, s.84-86, Dublin.
66. **Ertem, G., 1977.** “Trakya Florası İçin Yeni Olan *Ophrys bombyliflora* Link. Üzerinde Çalışmalar”. *Biyoloji Dergisi*, 27 (1): 39-44.
67. **Dane, F. & Aybeke, M., 1995.** “Edirne Çevresi *Ophrys* L. (Orchidaceae) Türlerinin Polen Morfolojisi (SEM)”. Ulusal Palinoloji Kongresi (İ.Ü. Orman Fak.), Bildiriler Kitabı, s. 44-56, İstanbul.
68. **Olgun, G. & Aybeke, M., 1996.** “Edirne Çevresi *Ophrys* L. (Orchidaceae) Türlerinin Tohum yüzeylerinin SEM Tekniği İle İncelenmesi” I. XIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, Botanik Seksiyonu Bildiri ve Poster Özetleri Kitapçığı, s. 421-430, İstanbul
69. **Aybeke, M., 1997.** Edirne Çevresindeki *Ophrys* L. (Orchidaceae) Türleri Üzerinde Morfolojik, Karyolojik ve Palinolojik Araştırmalar (Yüksek Lisans Tezi), Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 1997.
70. **Aybeke, M., 2000.** “Edirne Çevresindeki *Ophrys* L. (Orchidaceae) Türleri Üzerinde Karyolojik Araştırmalar”. *Ot Sistematik Botanik Dergisi*, 7 (1): 187-196.
71. **Aybeke M., 2012.** Comparative anatomy of selected rhizomatous and tuberous taxa of subfamilies Orchidoideae and Epidendroideae (Orchidaceae) as an aid to identification. *Plant Sys Evol.* 298 (9) :1643–1658, 2012.
72. **Aybeke M., Sezik E., Olgun, G., 2010.** Vegetative anatomy of some *Ophrys*, *Orchis* and *Dactylorhiza* (Orchidaceae) taxa in Trakya region of Turkey. *Flora*, vol. 205, issue 2, 73-89, 2010

73. **Güler, N. & Başak, N., 1997.** "Cytotaxonomical notes on the genus *Orchis* L. (Orchidaceae) in Edirne". First Balkan Botanical Congress, Abstracts, 18/35, Thessaloniki, Greece, 1997.
74. **Güler, N., 1997.** Edirne Çevresindeki *Orchis* L. (Orchidaceae) Türleri üzerinde Morfolojik, Sistemik, Korolojik, Karyolojik ve Palinolojik araştırmalar (Yüksek Lisans Tezi), Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 1997.
75. **Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. & Başer K.H.C, 2000.** Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edingburg *University Pres. Vol: 11. S.656.*
76. **Güler, N., Arda, H. ve Meriç, Ç., 2010.** Trakya Bölgesinde Yetişen Orchidaceae Familyası Bitkileri Üzerinde Morfolojik ve Korolojik Araştırmalar, T.Ü. Araştırma Fonu Projesi, (TÜBAP-799).
77. **Cox, A. V., Pridgeon, A. M., Albert, V. A., Chase, M. W., 1997.** "Phylogenetics of the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae): nuclear rDNA ITS sequences". *Plant Systematics and Evolution* 208: 197–223.
78. **Aceto, S., Caputo, P., Cozzolino, S., Gaudio, L. & Moretti, A., 1999.** Phylogeny and evolution of *Orchis* and allied genera based on ITS DNA variation: morphological gaps and molecular continuity. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13, 67–76.
79. **Cameron, K. M., Chase, M. W., Whitten, W. M., Kores, P. J., Jarrell, D. C., Albert, V.A., Yukawa, T., Hills H. G., Goldman, D. H., 1999.** A Phylogenetic Analysis of the Orchidaceae: Evidence From rbcL Nucleotide Sequences. *American Journal of Botany* 86(2): 208 – 224. 1999
80. **Douzery EJ, Pridgeon AM, Kores P, Linder HP, Kurzweil H, Chase MW., 1999.** Molecular phylogenetics of *Diseae* (Orchidaceae): a contribution from nuclear ribosomal ITS sequences. *Am J Bot.* 1999 Jun;86(6):887-99.
81. **Berg, C.V.D., W.E. Higgins, R.L. Dressler, W.M. Whitten, M.A. Soto Arenas, A. Culham and M.W. Chase., 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

- 82. Gravendeel, B., 2000.** Reorganising the orchid genus *Coelogyne*: A phylogenetic classification based on morphology and molecules. Nationaal Herbarium Nederland
- 83. Pellegrino G, Caputo P, Cozzolino S, Menale B, Musacchio A., 2000.** Molecular characterization of a hybrid zone between *Orchis mascula* and *Orchis pauciflora* in Southern Italy. *Biol.Plant.* 43, 13–18
- 84. Kores, P.J., M. Molvray, S.D. Hopper, P.H. Weston, A.P. Brown, K.M. Cameron and M.W. Chase., 2001.** A phylogenetic analysis of Diurideae (Orchidaceae) based on plastid DNA sequence data. *Am. J. Bot.* 88, 1903–1914
- 85. Pridgeon, A.M., Solano-Gomez, R. & Chase, M.W., 2001.** Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* 88: 2286–2308.
- 86. Soliva, M., Kocyan, A., Widmer, A., 2001.** Molecular phylogenetics of the sexually deceptive orchid genus *Ophrys* (Orchidaceae) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 20, 78–88.
- 87. Álvarez I. and Wendel J. F., 2003.** Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 435–455.
- 88. Gerardo A. Salazar, Mark W. Chase, Miguel A. Soto Arenas, and Martin Ingrouille, 2003.** Phylogenetics of cranichideae with emphasis on spiranthinae (orchidaceae, orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 90(5): 777–795. 2003.
- 89. Wen-Chieh Tsai, Chang-Sheng Kuoh, Ming-Hsiang Chuang, Wen-Huei Chen and Hong-Hwa Chen, 2004.** Four DEF-like MADS box genes displayed distinct floral morphogenetic roles in *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Physiol.* 45, 831–844
- 90. Chase, M.W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J.M., Kesanakurthi, R.P., Haider, N. & Savolainen, V., 2005.** Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos. Trans., Ser. B* 360: 1889–1895.
- 91. Devos NI, Oh SH, Raspé O, Jacquemart AL, Manos PS., 2005.** Nuclear ribosomal DNA sequence variation and evolution of spotted marsh-orchids (*Dactylorhiza maculata* group). *Mol Phylogenet Evol.* 36 (3):568-80.

- 92. Gulyás G, Sramkó G, Molnár VA, Rudnóy Sz, 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(2): 61-67.
- 93. Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A. & Janzen, D.H., 2005.** Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 8369–8374.
- 94. Norris H. Williams, W. Mark Whitten, and Robert L. Dressler, 2005.** Molecular Systematics of *Telopogon* (orchidaceae: oncidinae) and ITS Allies: Nuclear and Plastid DNA Sequence Data. *Lankesteriana* 5(3):163-184. 2005.
- 95. Whitten, M. W., N. H. Williams, R. L. Dressler, G. Gerlach, and F. Pupulin, 2005.** Generic relationships of Zygopetalinae (Orchidaceae: Cymbideae): Combined molecular evidence. *Lankesteriana* 5:87-107. 2005.
- 96. Carlsward, B. S. , W. L. Stern , and B. Bytebier, 2006a.** Comparative vegetative anatomy and systematics of the angraecoids (Vandaeae, Orchidaceae) with an emphasis on the leafless habit. *Bot. J. Linn. Soc.* 151, 165-218 (2006).
- 97. Hollingsworth, P. M., Squirell, J., Hollingsworth, M. L., Richards, A. J. & Bateman, R. M., 2006.** Taxonomic complexity, conservation and recurrent origins of self-pollination in *Epipactis* (Orchidaceae). In: *Contributions to taxonomic research on the British and European Flora* (ed. Bailey JP). BSBI, London. (2006)
- 98. Chodon Sass, Damon P. Little, Dennis Wm. Stevenson, Chelsea D. Specht, 2007.** DNA barcoding in the cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0011154> November 07, 2007
- 99. Rowan D. H. Barrett , Sean M. Rogers, Dolph Schluter, 2008.** New insights on heterostyly: Comparative biology, ecology and genetics. In: *Self-Incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity and Mechanisms*. (Ed. V. Franklin-Tong). Springer-Verlag, Berlin. pp. 3–32. (2008).

100. **W. John Kress and David L. Erickson, 2008.** DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8): 2761-2762. 2008.
101. **Lahaye , R. M. Van der Bank, D. Bogarin, J. Warner, F. Pupulin, G. Gigot, O. Maurin, S. Duthoit, T. G. Barraclough , and V. Savolainen., 2008 .** DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 105, 2923–2928 (2008)
102. **Salazar, G., 2009.** DNA, morphology, and systematics of *Galeoglossum* (Orchidaceae, Cranichidinae). In: Pridgeon A M, Suarez JP (eds) *Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids*. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador, pp 161-172.
103. **Graham Neubig , Taro Watanabe , Eiichiro Sumita , Shinsuke Mori , Tatsuya Kawahara, 2011.** Preliminary molecular phylogenetics of sobralia and relatives (orchidaceae: sobraleae). *Lankesteriana* 11(3): 307—317. 2011.
104. **Schuiteman, A., 2011.** *Dendrobium* (Orchidaceae): To split or not to split? *Gardens' Bulletin Singapore* 63(1 & 2): 245–257. 2011
105. **Fanny P. Rakotoarivelo, Sylvain G. Razafimandimbison, Bertrand Mallet, Lucien Faliniaina & Thierry Paillet, 2012.** Molecular systematics and evolutionary trends and relationships in the genus *Jumellea* (Orchidaceae): Implications for its species limits. June 2012: 534–544
106. **Delforge, P., 1995.** *Orchids of Britain and Europe*. London: Harper Collins.
107. **Delforge, P., 2006.** *Orchids of Britain and Europe*, Harper Collins Publisher, London.
108. **Butler, K.P., 1986.** *Orchideen*, Mosaik Verlag GmbH, Mönih.
109. **Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A.; Moore, D. M., Valiente, D. H., Walters, S. M. & Webb, D. A., 1964–1980.** *Flora Europea*. Vol. 1-5. Cambridge: Cambridge University Press.
110. **Polunin, O., 1987.** “Flowers of Greece and the Balkans, University Press, s. 510-521, Oxford.
111. **Galán Cela, P. & Gamarra, R., 2003.** “Check list of the Iberian and Balearic orchids. 2. *Ophrys* L.–*Spiranthes* Rich.” *Anales Jard. Bot. Madrid* 60(2): 309-329.

112. **Kreutz, (C.A.J.), K., 2004.** Kompendium der Europäischen Orchideen. - Catalogue of European Orchids, Kreutz Publishers, Landgraaf, 2004
113. **Kreutz, (C.A.J.), K., 2005.** “Korrekturen und Ergänzungen zum Kompendium der Europäischen Orchideen/Catalogue of European Orchids” Eurorchis no.17: 97-128, 2005.
114. **Jay Renz Herbariyumu Sinonim Listesi, 2010.** (List of Synonyms, Swiss Orchid Foundation at the Herbarium Jany Renz) - <http://orchid.unibas.ch/site.synonyms.php>, 22.03.2010.
115. **IPNI, 2010.** International Plant Name Indeks, <http://www.ipni.org/>, 22.03.2010.
116. **Kew Checklist, 2010.** World Checklist of Selected Plant Families, <http://apps.kew.org/wcsp/home.do>, 22.03.2010.
117. **Güler, N., 2012.** *Orchis* L. in GÜNER, A. ve ark. (Eds.) Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gök Yiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul.
118. **Anonim, 2000.** Türk Dil Kurumu İmlâ Kılavuzu
119. **Baytop, T., 1998.** İngilizce-Türkçe Botanik Kılavuzu
120. **White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, san Diego, pp. 315-322.
121. **Tamura, K., Stecher, G., Peterson, A., Filipksi, D. and Kumar, S., 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*:30 2725-2729.
122. **Bateman, R.M., Pridgeon, A.M. & Chase, M.W., 1997.** “Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. Infrageneric relationships and reclassification to achieve monophyly of *Orchis* sensu stricto”. *Lindleyana* 2. 12:113–141.
123. **Tyteca, D. & Klein, E., 2008.** “Genes, morphology and biology – The systematics of *Orchidinae* revisited”. *J. Eur. Orch.* 40: 501-544, 2008.

ÖZGEÇMİŞ

Cumhur DEMİR 22-07-1983 tarihinde Edirne'nin Uzunköprü ilçesinde doğdu. Uzunköprü'ye bağlı Balaban Köy'de İlköğrenimini, Uzunköprü Süper Lisesi'nde ortaöğrenimini tamamladıktan sonra Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2007 yılında mezun oldu. Mezuniyetinden bu yana da özel eğitim öğretim kurumunda öğretmenlik yapmaktadır.