

Available at: <http://journal.weedturk.com>
Turkish Journal of Weed Science
© Turkish Weed Science Society



Araştırma Makalesi / Research Article

Ordu İli *Rubus* Türlerinin Moleküler Tanısı ve Filogenisi

Onur KOLÖREN¹, Seçil EKER^{2*}

¹Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ordu

²Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ordu

*Sorumlu yazar E-mail: secileker@odu.edu.tr Tel: +90 452 2345010 - 6269

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, Doğu Karadeniz Bölgesi Ordu ilinin fındık ve boş alanlarında yaygın olarak bulunan yabancı ot türlerinden biri olan *Rubus* spp.'nin filogenetik farklılıklarını Ribozomal RNA (rRNA) Internal Transcribed Spacer (ITS) gen bölgelerini kullanarak belirlemektir. Çalışma için, Ordu ilinden 30 *Rubus* spp. örnekleri toplanmıştır. DNA izolasyon prosedürü olan Haymes (1996) CTAB (hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide) protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır. Ribozomal RNA (rRNA) ITS gen bölgesi için, GenBankasından temin edilen referans sekans dizileri ile çalışmada elde edilen sekans sonuçları karşılaştırılmıştır. Dizilerin genetik uzaklıkları MEGA6 paket programı kullanılarak hesaplanmış ve bu veri setleri ile filogeni ağaçlarının çizimi yapılmıştır. Örnekler arasında (Fatsa 3-F3, Fatsa 6-F6, Perşembe 2-P2, Perşembe 5-P5, Çamaş 3-CM3, Ordu 1-O1, Saraycık 1-S1, Çatalpınar 1-CT1, Çatalpınar 2-CT2 ve Çatalpınar 3-CT3) on *Rubus* türü tespit edilmiştir. Örneklerimizden 6 tane haplotip sonucu çıkmıştır. Bunlardan; Haplotip 1 (F3), Haplotip 3 (P2), Haplotip 4 (P5), Haplotip 5 (CM3, S1) ve Haplotip 6 (O1, CT1, CT2, CT3) %100 nükleotid dizisi benzerliği bakımından sırasıyla *R. sanctus* (KM037599), *Rubus* sp. (KM037207), *R. divaricatus* (KM037293), *R. conothyrsoides* (KM037285) ve *R. capricollensis* (KM037256) ile yakın akraba olarak belirlenmiştir. Haplotip 2 (F6) ise, %99,8 nükleotid dizisi benzerliği bakımından *R. silvativus* (KM037557) ile yakın akraba olarak görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Doğu Karadeniz Bölgesi, ITS (internal transcribed spacer), PZR (polimeraz zincir reaksiyonu), *Rubus* spp., Yabancı Ot

Molecular Diagnosis and Phylogeny of the *Rubus* Species of Ordu Province

ABSTRACT

The aim of this study; identify phylogenetic differences of *Rubus* spp., which are one of the most common weed species in the hazelnut and untreated areas of Ordu province in the Eastern Black Sea Region of Turkey, by ITS intergenic spacer. For this study, 30 population samples were collected from the hazelnut gardens and untreated areas in the Ordu province. DNA extraction was made by modifying the CTAB (hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide) protocol as described by Haymes (1996). The sequence results in this study were compared with reference sequences from GenBank for the ribosomal RNA ITS intergenic spacer. Genetic distances for sequences were calculated using MEGA6 packet program and phylogeny trees were drawn using this date sets. We determined ten *Rubus* species among our samples (Fatsa 3-F3, Fatsa 6-F6, Perşembe 2-P2, Perşembe 5-P5, Camas 3-CM3, Ordu 1-O1, Saraycık 1-S1, Catalpınar 1-CT1, Catalpınar 2-CT2 ve Catalpınar 3-CT3). Six haplotype were determined. Haplotype I (F3), Haplotype III (P2), Haplotype IV (P5), Haplotype V (CM3, S1) ve Haplotype VI (O1, CT1, CT2, CT3) appeared as sister *R. sanctus* (KM037599), *Rubus* sp. (KM037207), *R. divaricatus* (KM037293), *R. conothyrsoides* (KM037285) and *R. capricollensis* (KM037256) with 100% nucleotide sequence similarity. The nucleotide sequence similarity between Haplotype II (F6) with *R. capricollensis* (KM037256) were 100%.

Key words: Eastern Black Sea Region, ITS (internal transcribed spacer), PCR (polymerase chain reaction), *Rubus* spp., Weed

GİRİŞ

Rosales takımının Rosaceae familyası, Rosoideae alt familyası, *Rubus* cinsi ve *Eubautus* alt cinsinde yer alan böğürtlen, zengin vitamin ve mineral madde içerikleri, yine zengin antioksidan kapasitesi ile son yıllarda özel bir önem kazanan meyve türlerinden biridir (Karakoç, 2011). Bu bitkiler iki yıldan fazla yaşayan çalı formundaki bitkilerdir ve herdem yeşil bitkiler değillerdir. Sürgünleri iki, kökleri ise çok yıllıktır. Kök boğazında bulunan adventif tomurcuklardan sürerler, önce otsu karakterde gelişirler, daha sonra odunlaşır. Bunların gelişimi ilkbahardan sonbahara kadar devam eder. Çeşide bağlı olarak sürgünler ve yapraklar üzerinde az veya çok kalın ve değişik uzunlukta dikensi tüyler bulunmaktadır (Ağaoğlu, 1986). Ülkemiz böğürtlen meyve türünün anavatanıdır. Halen bir çok bölgemizin doğal florasında özellikle Karadeniz sahil ve geçiş bölgelerinde yaygın olarak yetişmektedir. Bu türün yabani formlarının ülkemizin diğer bölgelerinde de geniş alanlarda ve yoğun olarak bulunmaları, bunların değerlendirilmelerini kolaylaştırmış, bu nedenle çeşit ıslahı çalışmaları diğer birçok meyve türüne göre daha geç başlamıştır (Onur, 2006). Böylesine yaygın olan bu türlerle yapılacak olan genetik karakterizasyon çalışmaları genetik materyallerin değerlendirilmesi açısından son derece önem taşımaktadır. Çeşitli bitki gruplarındaki filogenetik ilişkilerin tespit edilmesinde iki gen bölgesi (Kloroplast trnL-F ve ITS) çok sık olarak kullanılmaktadır (Brouat ve ark., 2001; Soejima ve Nagamasu, 2004).

Bu çalışmanın amacı; Doğu Karadeniz Bölgesi Ordu ilinin fındık ve boş alanlarında en yaygın yabancı ot türlerinden biri olan *Rubus* spp.'nin filogenetik farklılıklarını Ribozomal RNA (rRNA) Internal Transcribed Spacer (ITS) gen bölgelerini kullanarak belirlemektir. Türkiye'de başta Karadeniz Bölgesi olmak üzere tarla, yol ve orman kıyılarında en çok rastlanan yabancı ot türlerinden biri olan *Rubus* türleri ile ilgili ITS gen bölgeleri kullanılarak yapılan bu moleküler çalışma, morfolojik olarak çok benzer görülen türler arasında farklı türler olabilir mi sorusunun cevabını verecektir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bitki Materyali

Ordu ilinde sıklıkla bulunan *Rubus* türlerinin genetik farklılıklarının PZR tekniği kullanılarak belirlenmesi amaçlanan bu çalışma için, Ordu ili ve ilçelerinin fındık bahçeleri ve boş alanlarından 30 adet *Rubus* cinsine ait bitki örneği toplanmıştır. Toplanan bitki örneklerinin genç yaprakları DNA izolasyonu için küçük poşetlere alınarak buz kapları yardımıyla laboratuvara taşınmış ve -80°C'de muhafaza edilmiştir. Bitki örneklerinin alındığı konumlar GPS cihazı ile kaydedilmiştir (Çizelge 1).

DNA İzolasyonu ve PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Aşamaları

DNA izolasyonu Haymes, (1996) CTAB (hexadecyltrimethyl-ammonium bromide) protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır. Laboratuvarda -80°de muhafaza edilen bitki örneklerinden DNA elde etmek için sıvı azot ile öğütme işlemi yapılmıştır. Bitkiyi bir havan yardımıyla ezme işleminin hemen ardından Haymes'in CTAB protokolünde olduğu gibi ekstraksiyon çözeltisi, kloroform/izoamil alkol (24/1) ve etil alkol/asetat (96/4) kimyasalları uygulanmıştır. Bu aşamalardan sonra elde edilen DNA -20°C'de muhafaza edilmiştir. PZR reaksiyon hacmi 25µl ve içindeki maddeler şu şekildedir; 16.6 µl NFW, 2.5 µl 1×PZR buffer, 0,4 µl 10 mM dNTPs, 3 µl 2.5 mM MgCl₂, 0,5'er µl 10 mM ITS1 ve 10 mM ITS4 primeri (Çizelge 2), 0,5 µl 5U Taq polimeraz (Thermo Scientific, Maxima Hot Start) ve 1 µl DNA. PZR döngü parametreleri ise; 95°C'de 15 dk, sonrasında 35 döngü; 94°C'de 1 dk, 51°C'de 1dk ve 72°C'de 2 dk ve en sonunda ise reaksiyon 72°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. PZR çalışmalarında kullanılan ITS1 ve ITS4 primerlerine ait bilgiler Çizelge 2'de verilmiştir. PZR ürünlerinden pozitif bant görüntülerini elde edebilmek için ürünler %1,5'lik agaroz jel TAE tampon çözeltisinde (0.04 M Tris-asetate, 1Mm EDTA, Ph=8) 100 V'da 60 dk elektroforez ile yürütülmüştür. Jelde oluşan DNA bantları Quantum ST5 (Vilber Lourmat) jel dokümantasyon sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

Çizelge 1. *Rubus* spp. örneklerinin Ordu ilinden toplandığı yerlere ait coğrafik bilgileri

Populasyon No	Yer	Enlem	Boylam
1	Çatalpınar 1	40° ,52', 56"	37° , 27', 21"
2	Çatalpınar 2	40° , 53', 30"	37° , 27', 35"
3	Çatalpınar 3	40° , 53', 08"	37° , 29', 09"
4	Çatalpınar 4	40° , 53', 06"	37° , 29', 10"
5	Ünye 1	41° , 10', 22"	37° , 39', 54"
6	Ünye 2	41° , 14', 25"	37° , 16', 46"
7	Çamaş 1	40° , 54', 47"	37° , 28', 28"
8	Çamaş 2	40° , 56', 08"	37° , 29', 11"
9	Çamaş 3	40° , 56', 47"	37° , 29', 47"
10	Fatsa 1	40° , 57', 34"	37° , 30', 09"
11	Fatsa 2	40° , 58', 13"	37° , 30', 19"
12	Fatsa 3	40° , 57', 59"	37° , 30', 16"
13	Fatsa4	40° , 58', 39"	37° , 29', 42"
14	Fatsa5	40° , 59', 42"	37° , 30', 10"
15	Fatsa 6	40° , 58', 26"	37° , 28', 31"
16	Perşembe 1	41° , 01', 14"	37° , 49', 34"
17	Perşembe 2	41° , 01', 15"	37° , 49', 35"
18	Perşembe 3	41° , 03', 09"	37° , 47', 01"
19	Perşembe 4	41° , 06', 51"	37° , 46', 50"
20	Perşembe 5	41° , 06', 49"	37° , 42', 15"
21	Ordu 1	40° , 58', 17"	37° , 57', 17"
22	Ordu 2	40° , 56', 35"	37° , 53', 22"
23	Ordu 3	40° , 54', 18"	37° , 49', 42"
24	Ordu 4	40° , 55', 37"	37° , 52', 58"
25	Ulubey 1	40° , 52', 29"	37° , 49', 05"
26	Ulubey 2	40° , 50', 14"	37° , 49', 22"
27	Gülyalı 1	40° , 58', 36"	37° , 59', 27"
28	Gülyalı 2	40° , 57', 05"	38° , 00', 23"
29	Gülyalı 3	40° , 58', 04"	38° , 03', 04"
30	Saraycık 1	40° , 93', 23"	37° , 97', 68"

Çizelge 2. PZR çalışmalarında kullanılan ITS primerlerine ait bilgiler

Primer	Baz dizisi	pmol/µl
ITS1	5' AATGCGTGTTT 3'	100 pmol/µl
ITS4	5' GTCTAGTTCAG 3'	100 pmol/µl

Sekans Analizi ve Filogeni Ağacının Çizimi

Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesinin Ordu ilinden toplanan *Rubus* spp. örneklerinin PZR ürünleri ile ITS1 ve ITS4 primerleri sekans analizi için MacroGen'e (Amsterdam, Hollanda) gönderilmiştir. Sekans analizine gönderilen ITS gen bölgesi PZR ürünlerinin nükleotid verileri, BioEdit (Hall, 1999) programı kullanılarak ham diziler hizalanmıştır. ITS gen bölgesi için GenBankasından temin edilen referans türlerin (Çizelge 3) sekans dizileri ile çalışmada elde edilen sekans sonuçları ClustalW (Thompson ve ark., 1997) modülü kullanılarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen baz dizileri MEGA6 versiyon (Tamura ve ark., 2013) paket programı kullanılarak, Neighbor-Joining (NJ; Saitou ve Nei, 1987), Maximum-Parsimony (MP; Eck ve Dayhoff, 1966; Fitch, 1977) ve Maximum-Likelihood (ML) algoritmalarından oluşan filogeni ağaçlarının çizimi yapılmıştır. Tüm sekans dizilerinin % nükleotid benzerlik oranları ve evrimsel genetik uzaklıkları da hesaplanmıştır.

Çizelge 3. Gen Bankasından elde edilen *Rubus* spp.'nin referans numaraları

Referans No	Tür Adı
KM037285	<i>Rubus conothyrsoides</i>
KM037207	<i>Rubus</i> sp.
KM037557	<i>Rubus silvaticus</i>
KM037599	<i>Rubus sanctus</i>
KM037293	<i>Rubus divaricatus</i>
KM037256	<i>Rubus capricollensis</i>

BULGULAR ve TARTIŞMA

Sonuç olarak Jel görüntülerine bakıldığında 3. (Fatsa 3-F3), 6. (Fatsa 6-F6), 8. (Perşembe 2-P2), 9. (Perşembe 3-P3), 10. (Perşembe 4-P4), 11. (Perşembe 5-P5), 13. (Çamaş 2-CM2), 14. (Çamaş 3-CM3), 16. (Ünye 2-U2), 17. (Ordu 1-O1), 21. (Saraycık 1-S1), 24. (Çatalpınar 1-CT1), 25. (Çatalpınar 2-CT2) ve 26. (Çatalpınar 3-CT3) nolu örneklerin *Rubus* türü olduğu tespit edilmiştir. Agaroz jelde görüntülenen 14 örneğin 10'u sekans analizinde sonuç vermiştir. Bu veriler yardımı ile bitkilere ait soy ağaçları oluşturulmuştur. Örneklerden 6 tane haplotip sonuç çıkmıştır.

Bunlardan; Haplotip 1 (F3) %100 nükleotid dizisi benzerliği bakımından *R. sanctus*'un (KM037599) yakın akrabası olarak varsayılmıştır. Bu

ilişkiler sırasıyla NJ, MP ve ML ağaçlarında yer alan %90, %89 ve %91 algoritma değerleri ile desteklenmiştir. Haplotip 2 (F6) %99,8 nükleotid dizisi benzerliği bakımından *R. silvaticus*'un (KM037557) yakın akrabası olarak varsayılmıştır. Bu ilişkiler sırasıyla NJ, MP ve ML ağaçlarında yer alan %87, %86 ve %88 algoritma değerleri ile desteklenmiştir. Haplotip 3 (P2) %100 nükleotid dizisi benzerliği bakımından *Rubus* sp.'nin (KM037207) yakın akrabası olarak varsayılmıştır. Bu ilişkiler sırasıyla NJ, MP ve ML ağaçlarında yer alan %64, %69 ve %68 algoritma değerleri ile desteklenmiştir. Haplotip 4 (P5) %100 nükleotid dizisi benzerliği bakımından *R. divaricatus*'un (KM037293) yakın akrabası olarak varsayılmıştır. Bu ilişkiler sırasıyla NJ, MP ve ML ağaçlarında yer alan %61, %69 ve %66 algoritma değerleri ile desteklenmiştir. Haplotip 5 (CM3, S1) %100 nükleotid dizisi benzerliği bakımından *R. conothyrsoides*'in (KM037285) yakın akrabası olarak varsayılmıştır. Bu ilişkiler sırasıyla NJ, MP ve ML ağaçlarında yer alan %72, %0 ve %0 algoritma değerleri ile desteklenmiştir. Haplotip 6 (O1, CT1, CT2, CT3) %100 nükleotid dizisi benzerliği bakımından *R. capricollensis*'in (KM037256) yakın akrabası olarak varsayılmıştır. Bu ilişkiler sırasıyla NJ, MP ve ML ağaçlarında yer alan %64, %71 ve %68 algoritma değerleri ile desteklenmiştir. GenBankasında yer alan referans *Rubus* türleri ile çalışmada elde edilen haplotipler arasındaki filogenetik ilişki (Çizelge 4) ve genetik mesafeler (Şekil 2) verilmiştir.

Rubus spp. büyük bir taksondur. Bu yüzden, taksonomistler hala pek çok farklı türün sınıflandırılmasında olduğu gibi *Rubus* türlerinin de sınıflandırılması ile ilgili problemlerle karşı karşıya kalmaktadırlar. Sadece morfolojik yöntemlerin yeterli olmadığı böyle zor durumlar karşısında moleküler yöntemler farklı türler arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemede bizlere destekleyici verilerle yardımcı olmaktadır. Bothmer ve ark. (1991); doğadaki yabani tür ve varyetelerin toplanması ve moleküler düzeyde tanımlanması ekonomik değeri olan çeşitlere yeni ve üstün özellikler kazandırılması açısından önemli olduğunu bildirmiştir.

Ericksson ve ark. (1998); *Potentilla* (Parmakotu) ve ilgili türlerin filogenetik ilişkilerini nükleer ribozomal internal transcribed spacer (ITS) DNA dizilerini kullanarak belirlemişlerdir. *Prunus*'u dış grup olarak kullanmışlardır, çalıştıkları 14 türü *Potentilla* türüne dahil etmişlerdir. Çeşitli morfolojik özellikler, şişen hazne (çilek) ve tematik yapraklar da dahil olmak üzere ortaya çıkmış şekilde görünmektedir. Daha önceki çalışmalarda *Duchesnea*, *Horkelia* ve *Ivesia* gibi diğer tanınmış türler *Potentilla*'ya dahil edilirken aslında birkaç cinse ayrılması gerektiğini düşünmektedirler. Aynı çalışmada, yeni bir filogenetik isimlendirmenin daha iyi bir çözüm olabileceğini bildirmişlerdir.

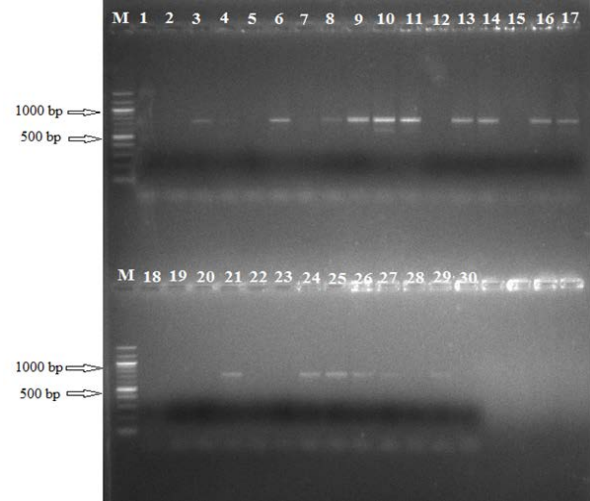
Ericksson ve ark. (2003); Rosoideae filogenisini trnL-F ve ITS gen bölgelerini kullanarak, 44 bitki örneği ile araştırmışlardır. Kullanılan *Duchesnea* (*Potentilla indica*), *Horkelia* ve *Ivesia*'nın, *Potentilla* içinde bulunduğu kuvvetle desteklenmiştir. Ericksson ve arkadaşlarına göre; *Rubus*'un pozisyonu hala güvenli bir şekilde çözümlenmemiştir.

Potter ve ark. (2007); Rosaceae cinsinden 88 örneğin filogenetik ilişkilerini 18S, gbss1, gbss2, ITS, pgip, ppo, matK, ndhF, rbcL ve trnL-trnF gen bölgelerini kullanarak araştırmışlardır. Rosaceae'yı üç alt familya şeklinde bildirmişlerdir: Rosoideae, Dryadoideae ve Spiraeoideae.

Longhi ve ark. (2014); Rosoideae, yumuşak meyveler de dahil olmak üzere bir dizi ekonomik öneme sahip olan Rosaceae'nın bir alt familyasıdır. Bu türler; çilek (*Fragaria*), kırmızı ahududu (*Rubus idaeus*) ve siyah ahududu (*Rubus occidentalis*), böğürtlen (*Rubus* spp.) ve ekonomik açıdan en önemli kesme çiçek cinslerinden biri olan güllerdir (*Rosa* spp.). Moleküler genetik ve genomik kaynak çalışmaları Rosoideae alt familyası için, son yirmi yılda hızla gelişmiştir, bir dizi gelişim ve uygulamanın başlangıcı olarak restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmleri (RFLP), amplifiye fragment uzunluk polimorfizmleri (AFLP) ve mikrosatellitler örnek verilebilir. Bu araçlar, ekonomik öneme sahip özellikleri kontrol eden genleri ve diğer fonksiyonel öğeleri tanımlamak için kullanılmıştır. Aynı çalışmada son 20 yılda moleküler genetik alanında meydana gelen gelişmelerin, Rosoideae içinde kazanılan yapısal genomik bilginin etkinliğini nasıl artıracaklarını açıklamaktadır.

Sochor ve ark. (2015); Rosaideae familyasına ait olan *Rubus* türlerinin Avrupa'daki dağılımını ITS

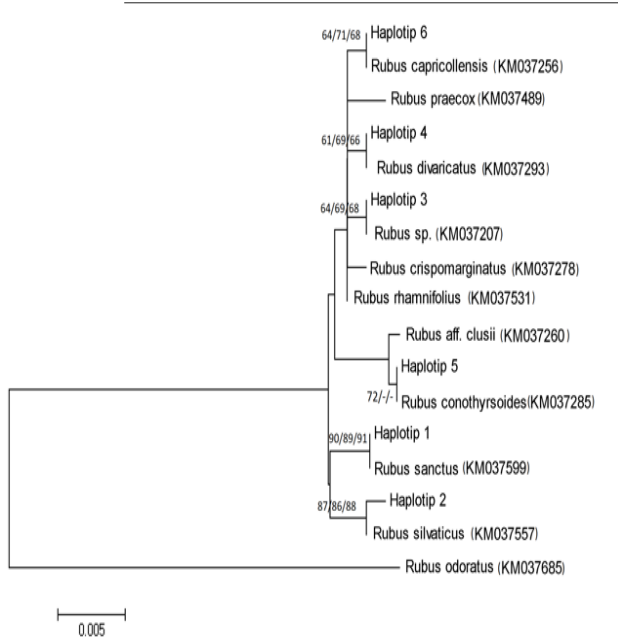
(internal transcribed spacer) ve cpDNA (kloroplast DNA) gen bölgelerini kullanarak belirlemişlerdir. Bu türlerin Avrupa'da görülen geniş dağılımlarına iklim dalgalanmalarının sebep olabileceğini bildirmişlerdir.



Şekil 1. Ordu ilinden toplanan *Rubus* spp. örneklerinin ITS gen bölgesinin agaroz jel içindeki görüntüsü. M: 100bp (Base Pair) ladder, 1: Fatsa 1, 2: Fatsa 2, 3: Fatsa 3, 4: Fatsa 4, 5: Fatsa 5, 6: Fatsa 6, 7: Perşembe 1, 8: Perşembe 2, 9: Perşembe 3, 10: Perşembe 4, 11: Perşembe 5, 12: Çamaş 1, 13: Çamaş 2, 14: Çamaş 3, 15: Ünye 1, 16: Ünye 2, 17: Ordu 1, 18: Ordu 2, 19: Ordu 3, 20: Ordu 4, 21: Saraycık 1, 22: Ulubey 1, 23: Ulubey 2, 24: Çatalpınar 1, 25: Çatalpınar 2, 26: Çatalpınar 3, 27: Çatalpınar 4, 28: Gülyalı 1, 29: Gülyalı 2, 30: Gülyalı 3

Doğu Karadeniz Bölgesi Ordu ilinden toplanan 30 adet *Rubus* spp. örneklerinin ITS gen bölgelerinin agaroz jel içindeki görüntüsüne bakıldığında; 3, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 21, 24, 25 ve 26. kuyucuklarda pozitif bantlar görülmektedir. Bunlar; 3. Fatsa 3, 6. Fatsa 6, 8. Perşembe 2, 9. Perşembe 3, 10. Perşembe 4, 11. Perşembe 5, 13. Çamaş 2, 14. Çamaş 3, 16. Ünye 2, 17. Ordu 1, 21. Saraycık 1, 24. Çatalpınar 1, 25. Çatalpınar 2 ve 26. Çatalpınar 3 DNA'sıdır. Jel görüntüsü şunu ifade etmektedir; Çalışmamızda kullanılan *Rubus* spp. örneklerinin elde edilen DNA'ları ITS gen bölgeleri yardımı ile çoğaltılabilmektedir (Şekil 1). Jel görüntüsünde de görüldüğü üzere pozitif bant elde ettiğimiz 14 tane örneğin *Rubus* türleri ile arasındaki DNA dizilerinin yüzde (%) nükleotit benzerlikleri ve tahmini evrimsel genetik uzaklıkları Çizelge 4'de verilmiştir. GenBankasından referans olarak alınan *Rubus* türleri ile çalışmada elde edilen haplotipler (Fatsa 3-F3, Fatsa

6-F6, Perşembe 2-P2, Perşembe 5-P5, Çamaş 3-CM3, Ordu 1-O1, Saraycık 1-S1, Çatalpınar 1-CT1, Çatalpınar 2-CT2 ve Çatalpınar 3-CT3) arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren NJ, ML, MP filogeni ağacı Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. GenBankasından referans alınan *Rubus* türleri ile çalışmada elde edilen haplotipler (Fatsa 3-F3, Fatsa 6-F6, Perşembe 2-P2, Perşembe 5-P5, Çamaş 3-CM3, Ordu 1-O1, Saraycık 1-S1, Çatalpınar 1-CT1, Çatalpınar 2-CT2 ve Çatalpınar 3-CT3) arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren NJ, ML, MP filogeni ağacı

SONUÇ

Çalışmanın sonucunda örneklerimizden 6 adet haplotip sonucu çıkmıştır. Bunlardan; Haplotip 1 (F3) %100 nükleotid dizisi benzerliği bakımından *R. sanctus*'un (KM037599) yakın akrabası olarak görülmüştür. Bu ilişkiler sırasıyla NJ, MP ve ML ağaçlarında yer alan %90, %89 ve %91 algoritma değerleri ile desteklenmiştir. Haplotip 2 (F6) %99,8 nükleotid dizisi benzerliği bakımından *R. silvaticus*'un (KM037557) yakın akrabası olarak görülmüştür. Bu ilişkiler sırasıyla NJ, MP ve ML ağaçlarında yer alan

%87, %86 ve %88 algoritma değerleri ile desteklenmiştir. Haplotip 3 (P2) %100 nükleotid dizisi benzerliği bakımından *Rubus. sp.*'nin (KM037207) yakın akrabası olarak görülmüştür. Bu ilişkiler sırasıyla NJ, MP ve ML ağaçlarında yer alan %64, %69 ve %68 algoritma değerleri ile desteklenmiştir. Haplotip 4 (P5) %100 nükleotid dizisi benzerliği bakımından *R. divaricatus*'un (KM037293) yakın akrabası olarak görülmüştür. Bu ilişkiler sırasıyla NJ, MP ve ML ağaçlarında yer alan %61, %69 ve %66 algoritma değerleri ile desteklenmiştir. Haplotip 5 (CM3, S1) %100 nükleotid dizisi benzerliği bakımından *R. conothyrsoides*'in (KM037285) yakın akrabası olarak görülmüştür. Bu ilişkiler sırasıyla NJ, MP ve ML ağaçlarında yer alan %72, %0 ve %0 algoritma değerleri ile desteklenmiştir. Haplotip 6 (O1, CT1, CT2, CT3) %100 nükleotid dizisi benzerliği bakımından *R. capricollensis*'in (KM037256) yakın akrabası olarak görülmüştür. Bu ilişkiler sırasıyla NJ, MP ve ML ağaçlarında yer alan %64, %71 ve %68 algoritma değerleri ile desteklenmiştir (Şekil 2).

Netice olarak bu çalışma ile Doğu Karadeniz Bölgesi Ordu ilinde bulunan *Rubus* türlerinin ribozomal RNA ITS gen bölgeleri kullanılarak genetik çeşitlilikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Örneklerimiz arasından 6 adet *Rubus* haplotipi belirlenmiştir. Türkiye'de başta Karadeniz Bölgesi olmak üzere tarla, yol ve orman kıyılarında en çok rastlanan yabancı ot türlerinden biri olan *Rubus* türleri ile ilgili ITS gen bölgeleri kullanılarak yapılan bu moleküler çalışma morfolojik olarak çok benzer görülen türler arasında farklı türler olabilir mi sorusunun cevabını bize vermiştir. Daha önceki yapılan çalışmalara nazaran çalışmamızda farklı *Rubus* türleri bulunmuştur (*Rubus aff. clusii* (KM037260) gibi). Türler arasındaki akrabalıkları belirlemek genetik karakterizasyon çalışmalarına ve bu genetik materyallerin değerlendirilmesine büyük oranda katkı sağlamaktadır. Bu çalışmanın; *Rubus* spp.'ye ait ileride yapılacak olan filogenetik çalışmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Ağaoğlu YS. (1986). Üzümsü Meyveler. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 984 Ders Kitabı No: 290, 377s.
- Bothmer RV., Jacobsen N., Baden C., Jbrgensen RB., Linde-Laursen I. (1991). An ecogeographical study of the genus *Hordeum*. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Gene-pools 7, IBPGR, Rome, 126 pp.
- Brouat C., Gielly L., Mckey D. (2001). Phylogenetic relationships in the genus *Leonardoxa* (Leguminosae: Caesalpinioideae) inferred from chloroplast trnL intron and trnL-trnF intergenic spacer sequences. American Journal of Botany, 88: 143-149.
- Eck RV., Dayhoff MO. (1966). Atlas of protein sequence and structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring.
- Eriksson T., Hibbs MS., Donoghues MJ. (1998). Phylogenetic analysis of *Potentilla* using DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacers (ITS), and implications for the classification of Rosoideae (Rosaceae). Plant Systematics and Evolution, 211: 155-179.
- Eriksson T., Hibbs MS., Yoder AD., Delwiche CF., Donoghues MJ. (2003). The Phylogeny of Rosoideae (Rosaceae) based on sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA and the trnL/F region of chloroplast DNA. International Journal of Plant Sciences, 164(2): 197-211.
- Fitch W. (1977). On the problem of discovering the most parsimonious tree. American Naturalist, 111: 223-257.
- Hall TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95-98.
- Haymes KM. (1996). Mini-prep method suitable for a plant breeding program. Plant Molecular Biology Reporter, 14 (3): 280-284.
- Karakoç D. (2011). Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi Doğal Florasındaki Böğürtlen Genotipleri Arasındaki Biyoçeşitliliğin Moleküler Belirteçlerle Saptanması. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Tokat.
- Longhi S., Giongo L., Buti M., Surbanovski N., Viola R., Velasco R., Ward JA., Sargent DJ. (2014). Molecular genetics and genomics of the Rosoideae: state of the art and future perspectives. Horticulture Research, 1, 2052-7276/14.
- Onur C. (2006). Üzümsü meyveler ıslah programından sempozyumlara. II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, 14-16 Eylül 2006, Tokat.
- Potter D., Eriksson T., Evans RC., Oh S., Smedmark JEE., Morgan DR., Kerr M., Robertson KR., Arsenault M., Dickinson TA., Campbell, CS. (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. Plant Systematics and Evolution, 266: 5-43.
- Saitou N., Nei M. (1987). The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology Evolution, 4: 406-425.
- Sochor M., Vasut RJ., Sharbel TF., Travnicek B. (2015). How just a few makes a lot: speciation via reticulation and *Apomixis* on example of European Brambles (*Rubus* subgen. *Rubus*, Rosaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 89: 13-27.
- Soejima A., Nagamasu H. (2004). Phylogenetic analysis of Asian *Symplocos* (Symplocaceae) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. Journal of Plant Research, 117(3):199-207.
- Tamura K., Stecher G., Peterson, D. Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology Evolution, 30: 2725-2729.
- Thompson JD., Gibson TJ., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins DG. (1997). The clustal x-windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25: 4876-4882.

©Türkiye Herboloji Derneği, 2018

Geliş Tarihi/ Received: Ağustos/Agust, 2018
Kabul Tarihi/ Accepted: Kasım/November, 2018

To Cite: Koloren O. and Eker S. (2018). Molecular Diagnosis and Phylogeny of the *Rubus* Species of Ordu Province (In Turkish with English Abstract). Turk J Weed Sci, 21(2):39-45.

Alıntı için: Kolören O. ve Eker S. (2018). Ordu İli *Rubus* Türlerinin Moleküler Tanısı ve Filogenisi. Turk J Weed Sci, 21(2):39-45.