

***trnL* İntron ve *trnL-F* Bölgeleri ile Van İlinde Bulunan Orkide (Orchidaceae) Türlerinin Filogenetik İlişkisinin Belirlenmesi**

Ayten Dizkirici¹, Sinan Isler², Oktay Yigit¹

¹Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, 65080, Van

²Eğitim Fakültesi, Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Bölümü, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, 65080, Van

aytendizkirici@gmail.com

Özet: Van ilinde doğal olarak yayılış gösteren Orkide (*Orchis*) cinsine ait dokuz türün filogenetik ilişkisi kloroplast DNA'sında bulunan *trnL* intron ve *trnL-F* IGS bölgeleri kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Aynı cinsde ait diğer türlerle olan evrimsel ilişkileri de göstermek için farklı türlerin DNA sekansları NCBI veri tabanından alınarak analize dahil edilmiştir. Her bir tür için ikili okuma yapılarak en doğru DNA sekansı alınmış ve bunlar hizalanarak Maximum Likelihood (ML) methodu ile filogenetik ağaçlar çizdirilmiştir. *trnL-F* bölgesinde varyasyon çok daha az olmasına rağmen elde edilen ağaç topolojileri oldukça benzerdir. Heriki ağaçta da altcinsler (*Orchis*, *Anacamptis* ve *Neotinea*) farklı kladlarda yer almış ve alt seksiyon seviyesinde tür ayrımı yapılabilmektedir. Çalışma sonunda *Anacamptis* ve *Neotinea* altcinslerinde bulunan türlerin taksonomik pozisyonunun değiştirilerek cins seviyesine çıkarılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Anacamptis*, filogeni, *Neotinea*, *Orchis*, *trnL* intron, *trnL-F* IGS

Determining Phylogenetic Relationships among *Orchis* Species in Van Province Using *trnL* Intron and *trnL-F* Regions

Abstract: Phylogenetic relationships among nine Turkish *Orchis* species were inferred using *trnL* intron and *trnL-F* IGS regions located in chloroplast DNA. New sequences were also retrieved from NCBI database to indicate evolutionary relationships between native and foreign species. To get correct sequence, two sequences were taken for each studied species and they were aligned for analysis. The sequence data was analyzed using the Maximum Likelihood (ML) method. The topology of *trnL-F* tree was broadly congruent to that shown in *trnL* intron tree even though *trnL-F* region carried less variable sites. In both trees, each subgenus (*Orchis*, *Anacamptis* or *Neotinea*) located in a different clade. At the end of the study we concluded that the position of *Anacamptis* and *Neotinea* should be changed from subgenus to genus.

Key words: *Anacamptis*, phylogeny, *Neotinea*, *Orchis*, *trnL* intron, *trnL-F* IGS

Giriş

Orchidaceae ailesi, genellikle tropikal bölgelerde yayılış gösteren yaklaşık 800 cins ve 25000 türü kapsamaktadır (Atwood, 1986). *Orchis* L., Orchidaceae familyasında bulunan ve ülkemizde 25 tür ile temsil edilen bir cinstir (Güler, 2012). Ülkemizde yaklaşık 20 milyon *Orchis* soğanı toplanmakta ve sıcak içecek olan salep ve/veya dondurma yapımında sıkça kullanılmaktadır. Bahsi geçen nedenden dolayı Orkide türlerinin topraklarımızda yayılımı giderek azalmaktadır (Özhatay, 2000).

Şu ana kadar *Orchis* cinsinin morfolojik karakterleri, anatomisi, ekolojik ve karyolojik özellikleri çalışılmasına rağmen (Sgarbi ve Del Prete, 2005; Altundag ve Sevgi, 2010; Aybeke ve ark., 2010; Sevgi ve ark., 2012; Durmuskahya ve ark., 2014; Durmuşkahya ve ark., 2015) moleküler seviyedeki çalışmaları oldukça azdır. Son zamanlarda, DNA üzerinde bulunan farklı bölgelerin nükleotid dizileri (sekans) kullanılarak, *Orchis* türlerinin filogenetik ilişkisi çalışılmıştır (Pridgeon ve ark., 1997; Aceto ve ark., 1999; Aceto ve ark., 2000; Cozzolino ve ark., 1998; Cozzolino ve ark., 2001; Sramko ve ark., 2014). Bu çalışmada, Van şehrinde doğal olarak yayılış gösteren dokuz *Orchis* türünün filogenetik ilişkisi kloroplast DNA'sında bulunan iki bölgedeki (*trnL* intron ve *trnL*-F IGS) nükleotid dizi varyasyonları kullanılarak anlaşılmaaya çalışılmıştır.

Çalışmanın amacı (i) Van şehrinde bulunan dokuz *Orchis* türünün evrimsel ve sistematik ilişkisini *trnL* intron ve *trnL*-F IGS kloroplast DNA bölgeleri kullanarak göstermek (ii) farklı altcins, seksiyon ve alt seksiyonlar arasındaki filogenetik ilişkiyi saptamak (iii) kullanılan bölgelerin amaç için uygun olup olmadığını anlamaktır.

Materyal ve Yöntem

Bitki örnekleri

Çalışmada *Orchis* türlerinin filogenetik ilişkisini belirlemek için dokuz türden toplamda 18 bireyin *trnL* intron ve *trnL*-F IGS bölge dizileri kullanılmıştır. Türler üç farklı altcins içinde yer almaktadır; *Orchis* L., *Neotinea* (Reichb. f.) P. Quentin ve *Anacamptis* (Rich.) P. Quentin (Tablo 1). Örnekler Dr. İşler tarafından Van ili sınırları içerisinde toplanmış ve aynı araştırmacı tarafından Türkiye Florasında (Hedge, 1982) bulunan morfolojik karakterler kullanılarak teşhis edilmiştir. Arazi çalışmaları esnasında her bir tür için iki örnek toplanmış ve silika jel içeren plastik poşetlerde koruma altına alınmıştır. Çalışılan türlerin sayısını artırmak ve altcins, seksiyon, alt seksiyonlar arasındaki evrimsel ilişkileri daha iyi görebilmek için yabancı türlere ait DNA dizileri NCBI veri tabanından alınmış ve analize dahil edilmiştir (Ek 1). Filogenetik ağaçların çizdirilmesi esnasında *Disa* cinsine ait türler dış grup olarak tercih edilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *Orchis* türlerinin altcins / seksiyon / alt seksiyon isimleri ve lokasyonları

Tür	Altcins/Seksiyon/Altseksiyon ^a	Yer
<i>O. collina Banks & Solander</i>	<i>Orchis/ Orchis/Patentes</i>	Van
<i>O. simia Lamarck</i>	<i>Orchis/ Orchis/Orchis</i>	Van
<i>O. anatolica Boissier</i>	<i>Orchis/ Orchis/Pusillae</i>	Van
<i>O. pinetorum Boissier & Kotsch.</i>	<i>Orchis/ Orchis/Masculae</i>	Van
<i>O. spitzelii Sauter Ex W.D.J. Koch</i>	<i>Orchis/ Orchis/Patentes</i>	Van
<i>O. tridentata Scopoli</i>	<i>Neotinea/</i>	Van
<i>O. coriophora L.</i>	<i>Anacamptis/Coriophorae/</i>	Van
<i>O. pseudolaxiflora Czerniakovska</i>	<i>Anacamptis/Platycheilae/Laxiflorae</i>	Van
<i>O. palustris Jacq.</i>	<i>Anacamptis/Platycheilae/Laxiflorae</i>	Van

^a Altains, Seksiyon ve Alt seksiyon Quentin P. (2000) göre belirlenmiştir

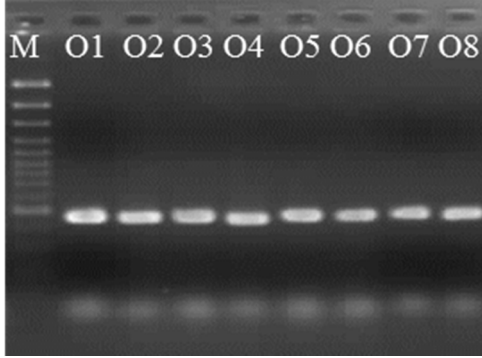
DNA izolasyonu, PZR, Sekanslama ve Filogenetik Analiz

Total DNA izolasyonu taze yapraklardan cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) methodu kullanılarak yapılmıştır (Doyle ve Doyle, 1987). DNA temizliği ve miktarı NanoDrop 2000c UV-Vis Spektrofotometre ve % 0.8'lik agaroz jel kullanılarak saptanmaya çalışılmıştır. İzole edilen stok DNA, daha sonra yapılacak olan PZR çalışmaları için -20 °C'de korunmuştur. Hedeflenen bölgelerin çoğaltılabilmesi için spesifik primer çiftleri kullanılmıştır; *trnL* intron bölgesi için *trnc* (F) 5' CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG 3', *trnd* (R) 5' GGG GAT AGA GG ACT TGA AC 3', *trnL-F* IGS bölgesini çoğaltmak için ise *trne* (F) 5' GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC 3', *trnf* (R) 5' ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG 3' primer çiftleri kullanılmıştır (Taberlet ve ark., 1991).

Bölgelerin çoğaltılması işlemi 25 µl'lik karışımlarda yapılmıştır. Herbir karışım içerisinde total DNA (10 ng/µl), 10X PZR Tampon, MgCl₂ (25 mM), dNTP miks (10 mM), seçilen primer çiftleri (10 µM), Taq polimeraz (5u/µl) enzimi ve arınık su bulunmaktadır. Her iki bölge için aynı miktar tampon (2.5 µl), MgCl₂ (2 µl), dNTP (0.5 µl), seyreltilmiş DNA (1 µl), ve Taq polimeraz (0.25µl) kullanılmıştır. Her bir primerden

trnL intron bölgesi için 2 µl, *trnL-F* bölgesi için ise 0.5 µl ilave edilmiştir. Optimize edilen PZR koşulu; 94 °C de 5 dakika başlangıç denatürasyonu, 94 °C de 30 saniye denatürasyon, 51 °C de 30 saniye birleşme (annealing) ve 72 °C de 30 saniye uzama şeklindedir ve 30 döngüde işlem tamamlanmıştır. Döngü tamamlandıktan sonra 10 dakika 72 °C de bekleme basamağında bulunmaktadır. PZR sonunda bölgelerin çoğaltıldığından emin olmak için PZR ürünleri % 1.5 agaroz jelde yürütülmüş ve UV altında bantlar gözlenmiştir (Şekil 1). Hedef bantların varlığından emin olduktan sonra, PZR fragmentleri QIAquick PZR purifikasyon kiti (Qiagen) ile fazla primer ve dNTP'lerden temizlenmiştir. Temizleme işleminden sonra, DNA dizilerinin alınması için PZR ürünleri özel bir firmaya gönderilmiştir (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Alınan DNA dizileri Finch TV (<http://www.geospiza.com/finchtv/>) programı ile açılmış ve GeneBee web sitesindeki(www.genebee.msu.su/genebee.html) Alibee Multiple Alignment 3.0 software programı ile bir birey için komplement olan iki dizi (Forward ve Reverse) karşılaştırılarak en doğru DNA dizisi elde edilmiştir. Kesin olmayan nükleotidlerde, her iki sekans kontrol edilmiş ve doğruluğu en fazla olan baza

karar verilmiştir. Elde edilen dizilerin doğruluğundan emin olmak için, NCBI veri tabanında BLAST edilerek *Oxytropis* cinsinde hedef bölgeye bağlandığından emin olunmuştur.



Şekil 1. PZR yöntemiyle çoğaltılan *trnL*-F bölgesinin agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 100 bp plus O1-8: *Oxytropis* türleri)

Total nükleotid uzunluğu (baz çifti, bç), GC miktarı (%), indel sayısı, varyasyon ve parsimoni informatif bölge sayısı her iki bölge içinde MEGA 7.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır (Kumar ve ark 2015). Çalışma sonunda elde edilen DNA dizileri NCBI veri tabanından alınan DNA dizileri ile kombine edilerek analizler yapılmıştır. Filogenetik ağacın çizilmesi esnasında Tamura-Nei (Tamura ve Nei, 1993) modelini kullanan Maximum Likelihood (ML) methodu kullanılmıştır. Elde edilen ağacın güvenilirliğini artırmak için ise 500 replikasyonlu bootstrap analizi tercih edilmiştir (Felsenstein, 1985). Dizide bulunan nükleotit boşlukları veya bilinmeyen kısımlar analiz dışı bırakılmıştır.

Sonuç

Van ilinde doğal olarak yetişen dokuz türün *trnL* intron ve *trnL*-F IGS bölgelerinin DNA dizileri elde edilmiştir. *trnL* intron bölgesi 9 türe ait 18 DNA dizisi ve NCBI veri tabanından alınan 7 *Orchis* DNA dizisinden oluşmuştur. *trnL* intron bölgesinin uzunluğu 575 bç (*O. colina*) ile 662 bç (*O. pinetorum*)

arasında değişmektedir. NCBI'dan alınan örneklerde dahil edildiğinde elde edilen uzunluk 709 bç ve ortalama GC miktarı %29.6'dır (Tablo 2). Yabancı bireylerde dahil, tüm bireyler analiz edildiğinde 78 tanesi parsimoni informatif olan 96 polimorfik bölge ve 190 tane indel pozisyonu saptanmıştır (Tablo 2). İndellerin sayısı oldukça fazladır bazıları sadece bir baz çiftinden oluşurken, birkaç tanesi oldukça uzun (yaklaşık 45 bç) indellerdir. *trnL* intron bölgesinde bulunan yaklaşık 45 bç indelin olduğu kısım (506. – 553. bazlar arası) incelendiğinde, *Anacamptis* altcinsine ait olan türlerde baz silinmesinin olduğu veya tam tersi *Orchis* altcinsine ait türlerde baz ilavesi olduğu görülmüştür. Bu durumda indeller analize ilave edildiğinde de altcins seviyesinde türlerin ayrıldığı görülmüştür. Sadece ülkemizde bulunan örnekler dikkate alındığında bölge uzunluğu 704 bç olarak saptanmıştır ve 83 polimorfik bölge (47 parsimoni informatif) vardır. Daha önceden bahsedildiği gibi, her tür için iki tane birey kullanılmıştır. Bu bireylerden elde edilen DNA dizileri aynı olduğundan, filogenetik ağaçlarda karışıklığı azaltmak için bir tür için sadece bir bireyin DNA sekansı analize dahil edilmiştir.

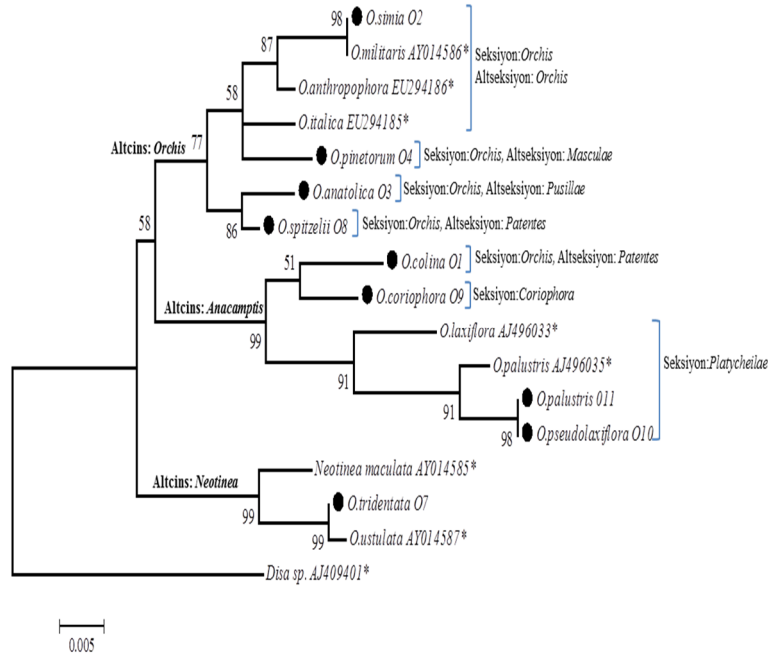
Tablo 2. *trnL* intron ve *trnL*-F IGS bölgeleri için hesaplanan moleküler çeşitlilik parametreleri. Bütün hesaplamalar NCBI'dan alınan DNA sekansları dahil edilerek yapılmıştır

	<i>trnL</i> intron	<i>trnL</i> -F IGS
Takson sayısı	15	11
Sekans sayısı	25	11
Total uzunluk (bç)	709	283
Varyasyon sayısı	96	34
Parsimoni informatif sayısı	78	33
İndel sayısı (bç)	190	27
G/C miktarı (%)	29.6	31.2
Ortalama uzaklık	0.037	0.043

NCBI'dan çalışılan türlerden sadece *O. palustris*'in *trnL* intron bölgesine ait sekansı bulunmuş ve sekanslar arasında varyasyon olmasından dolayı Şekil 2 de görüldüğü gibi aynı grupta olmasına rağmen yan yana çıkmamışlardır. NCBI'dan alınan tüm örnekler iki ana grup oluşturacak şekilde bir araya gelmiştir (Şekil 2). *Orchis tridentata* türü hariç çalışığımız tüm türler birinci ana grup içinde yer almıştır. Aynı şekilde veri tabanından alınan örneklerin büyük kısmında bu grupta yer almıştır. Birinci ana grup iki ayrı klad'dan oluşmuştur; ağacın üst kısmında bulunan klad *Orchis* altcinsine ait türlerden (*O. spitzelii*, *O. anatolica*, *O. pinetorum*, *O. simia*), ikinci klad ise *Anacamptis* altcinsine ait türlerden (*O. palustris*, *O. pseudolaxiflora*, *O. collina*, *O. coriophora*) oluşmuştur. Tablo 1 de

görüldüğü gibi *O. collina*, *Orchis* altcinsinde gösterilse de bazı araştırmacılar tarafından bu türün *Anacamptis* altcinsine ait olduğu iddia edilmektedir (Haider ve ark, 2012).

Birinci klad kendi içerisinde küçük gruplara ayrılmıştır ve genelde her bir grup farklı bir seksiyonu işaret etmektedir. Örneğin *O. anthropophora**, *O. militaris* L.*, ve *O. simia* (*NCBI veritabanından alınan yabancı örnekleri göstermektedir) bir arada konumlanmıştır ve bu türler seksiyon: *Orchis*, altseksiyon: *Orchis* sınıflandırmasını temsil etmektedir. Benzer durumlar her bir tür için Şekil 2'de gösterilmiştir. İkinci ana klad filogenetik ağacın altında konumlanmıştır ve *Neotinea* altcinsinde bulunan türleri kapsamaktadır (*O. tridentata*, *O. ustulata** ve *Neotinea maculata**).



Şekil 2. *trnL* intron bölgesi kullanılarak çizilen filogenetik ağaç. Uzantıların üstünde veya altında bulunan rakamlar bootstrap değerleri. (*Disa* sp. dış grup, siyah yuvarlaklar Türkiye'de yaşayan türler)

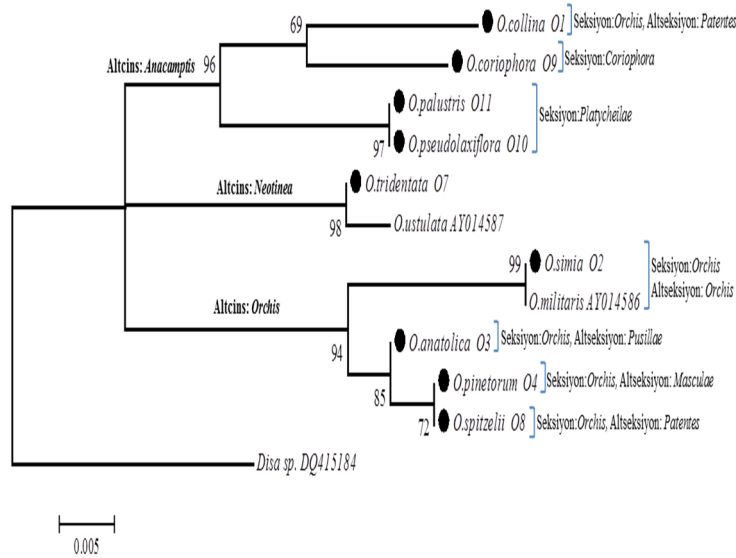
trnL-F IGS bölgesi için çalışmamızda kullandığımız ülkemizde bulunan 9 türe ait 18 örneğe ek olarak iki

tane tür NCBI veri tabanından alınabilmiştir. Tüm sekanslarda hizalama yapıldığında 283 bç uzunluğunda data

elde edilmiştir (Tablo 2). *O. spitzelii* ve *O. anatolica* türlerinde 153. bazdan sonra “CTTCTTAAAGC” dizisi sekansa ilave olduğundan en uzun dizi bu türlerde bulunur. Ortalama GC oranı %31.2 olup *trnL* intron bölgesinden hesaplanan orana oldukça yakındır. Yabancı bireylerde dahil tüm bireyler analiz edildiğinde 33’ü parsimoni informatif olan 34 polimorfik bölge ve 27 baz indel pozisyonu saptanmıştır. Ortalama uzaklık 0.043 olarak hesaplanmıştır (Tablo 2) ve birbirlerine en uzak türler *O. collina* ile *O. simia*’dır.

trnL intron ve *trnL-F* bölge sekansları ile çizdirilen filogenetik ağaçlarda türler arası evrimsel ilişkiler

birbirleri ile tutarlı çıkmıştır (Şekil 2 ve Şekil 3). Her iki ağaçta da üç altcins (*Orchis*, *Anacamptis* ve *Neotinea*) ait olan bireyler farklı gruplarda (klad) yer almıştır. Örneğin *Orchis* altcinsinde yer alan türler (*O. spitzelii*, *O. anatolica*, *O. pinetorum*, *O. simia*) diğer altcinslerde bulunan türlerden ayrılarak farklı bir evrimsel grup oluşturmuştur (Şekil 2 ve Şekil 3). *trnL* intron ağacında olduğu gibi NCBI veri tabanından alınan *O. ustulata** türü *Neotinea* grubunda yer alan *O. tridentata* ile yakın konumlanmıştır. Benzer durum *Orchis* grubundaki *O. simia* ve *O. militaris** arasında da görülmektedir.



Şekil 3. *trnL-F* bölgesi kullanılarak çizilen filogenetik ağaç. Uzantıların üstünde veya altında bulunan rakamlar bootstrap değerleri. (*Disa sp.* dış grup, siyah yuvarlaklar Türkiye’de yaşayan türler)

Tartışma

trnL intron ve *trnL-F* IGS bölgeleri *Orchis* türleri arasındaki evrimsel ilişkiyi anlamak için kullanılabilirliği olan bölgelerdir. Her iki bölgede altcins, seksiyon ve alt seksiyon seviyesinde tür ayrımı yapabilmektedir ki bu sonuç daha sonra yapılacak olan geniş kapsamlı çalışmalara ışık tutacaktır. Genetik varyasyon *trnL-F* bölgesinde *trnL* introna

oranla çok daha az olmasına rağmen filogenetik ayrımı göstermesinde yeterlidir.

Her iki ağaçta da *O. collina* hariç *Orchis* altcinsine ait olan tüm türler yüksek sayılabilecek bootstrap değerleriyle (%77 ve 94) tek bir kladda toplanmıştır. *Orchis collina* türü *Orchis* altcinsinde kabul edilmesine rağmen her iki filogenetik ağaçta da bu kladdan ayrılarak *Anacamptis* kladında yer

almıştır. Bu ayırım daha önceden Haider ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmayla da gösterilmiş ve *O. collina* türü *Anacamptis* cinsine kaydırılmıştır. Bu sonuç, *O. collina* türünün Şekil 2 ve 3'deki filogenetik ağaçlarda *Anacamptis* kladında (altcins) yer almasıyla da ispatlanmıştır. *O. collina*'nın evrimsel pozisyonu göz önüne alındığında, türün altcins olarak değilde yeni bir cins olarak düşünülüp *Anacamptis* cinsine kaydırılması mantıklıdır. *trnL* intron bölgesinde yer alan ve yaklaşık 45 bç uzunluğunda olan indel bölgesi *Anacamptis* altcinsinde yer alan *O. palustris*, *O. pseudolaxiflora* ve *O. coriophora* türlerinde ve *Orchis* altcinsinde olduğu kabul edilen *O. collina* türünde var olması bu türlerin evrimsel süreç içerisinde benzer filogenetik ilişkiler gösterdiğinin de bir ispatı olarak kabul edilebilir. Benzer indel yapısı NCBI veri tabanından alınan ve *Anacamptis* altcinsinde yer alan *O. laxiflora** (AJ496033) ve *O. palustris** (AJ496035) türlerinde de görülmüş ve yukarıda ifade edilen yorum ispatlanmıştır. Ana kladlar içerisinde küçük gruplar bulunmaktadır ve her bir grup farklı bir seksiyon\ alt seksiyona karşılık gelmektedir. Fakat bazı alt seksiyonların birbirleriyle olan evrimsel yakınlıkları, bölgeye göre farklılık göstermiştir. Alt seksiyon seviyesinde daha güvenilir sonuçlar almak için tür sayısının ve her türe ait tekrar sayısının artırılması gereklidir.

1999 yılında Aceto ve arkadaşları, 2001 yılında ise Cozzolino ve arkadaşları *O. tridentata*, *O. ustulata** ve *Neotinea maculata** türleri arasında yakın evrimsel ilişkiyi saptamışlardır. O yıllarda Bateman ve arkadaşları (1997; 2003) ITS bölgesini kullanarak *O. tridentata* türünü, *Neotinea tridentata* (Scop.) R. M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase türüyle, *O. ustulata* türünü ise *Neotinea*

ustulata L. türüyle sinonim kabul etmişlerdir. Daha sonra Haider ve arkadaşları (2012) ISSRs yöntemiyle Orchidaceae türlerinin ilişkisini çalışmış ve *O. tridentata*'nın genetiksel olarak diğer türlerden uzak olduğu sonucuna varmıştır. *O. tridentata* Kew Garden tarafından yeniden sınıflandırılarak *Neotinea tridentata* olarak isimlendirilmiştir. Bütün elde edilen veriler göz önüne alındığında *O. tridentata* ve *O. ustulata* türlerinin *Neotinea* altcinsi olarak değilde *Neotinea* cinsi olarak kabul edilmesi mantıklıdır.

Çalışmamızda elde edilen her iki ağaçta da *O. coriophora*, *O. palustris*, *O. pseudolaxiflora* ve *O. collina* evrimsel olarak *Orchis* ve *Neotinea* kladlarından ayrılmıştır. Bu sonuç beklenebilir çünkü Bateman ve arkadaşları (2003) bu türleri *Anacamptis* cinsi içinde değerlendirip *O. coriophora* türünü *Anacamptis coriophora* (L.) ile, *O. palustris*'i *Anacamptis palustris* (Jacquin) R.M.Bateman. ile ve *O. pseudolaxiflora* türünü *Anacamptis laxiflora* (Lam.) R.M. Bateman ile sinonim kabul etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen verilerde önceki sonuçları desteklediğinden yukarıda bahsi geçen dört türün *Anacamptis* cinsine kaydırılması mümkündür.

Ek 1: NCBI veri tabanından alınan DNA dizileri

***trnL* intron bölgesi:** *O.laxiflora* AJ496033, *O.palustris* AJ496035, *O.anthropophora* EU294186, *O.italica* EU294185, *O.militaris* AY014586, *O.ustulata* AY014587, *Neotinea maculata* AY014585

***trnL-F* IGS bölgesi:** *O.militaris* AY014586, *O.ustulata* AY014587

Teşekkür

Çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri) birimi tarafından desteklenmiştir. Proje no: 2015-FEN-B170

Kaynaklar

- Aceto, S., Caputo, P., Cozzolino, S., Gaudio, L., and Moretti, A., 1999. Phylogeny and evolution of *Orchis* and allied genera based on ITS DNA variation: morphological gaps and molecular continuity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 13: 67-76.
- Aceto, S., Caputo, P., Gaudio, L., Nazzaro, R., and Cozzolino, S., 2000. Molecular approach to the identification and characterization of natural hybrids between *Orchis pauciflora* and *Orchis quadripunctata* (Orchidaceae). *Botanica Helvetica*. 110: 31-39.
- Altundag, E., and Sevgi, E., 2010. Vegetative anatomy of *Orchis italica* Poiret. (Orchidaceae) in Turkey. XIII OPTIMA Meeting Proceedings, 22-26.
- Atwood, J.T., 1986. The size of the *Orchidaceae* and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana*. 9: 171-186.
- Aybeke, M., Sezik, E., and Olgun, G., 2010. Vegetative anatomy of some *Ophrys*, *Orchis* and *Dactylorhiza* (Orchidaceae) taxa in Thrace region of Turkey. *Flora*. 205: 73-89.
- Bateman, R.M., Pridgeon, A.M., and Chase, M.W., 1997. Phylogenetics of subtribe Orchidine (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 1. Infrageneric relationships and reclassification to achieve monophyly of *Orchis* sensu stricto. *Lindleyana*. 12: 113-141.
- Bateman, R.M., Hollingsworth, P.M., Preston, J., Luo, Y.B., Pridgeon, A.M., and Chase, M.W., 2003. Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 142: 1-40.
- Cozzolino, S., Aceto, S., Caputo, P., Nazzaro, R., and Gaudio, L., 1998. Phylogenetic relationships in *Orchis* and some related genera: an approach using chloroplast DNA. *Nordic Journal of Botany*. 18: 79-87.
- Cozzolino, S., Aceto, S., Caputo, P., Widmer, A., and Dafni, A., 2001. Speciation processes in eastern Mediterranean *Orchis* s.l. species: molecular evidence and the role of pollination biology. *Israel Journal of Plant Sciences*. 49: 91-103.
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.
- Durmuskahya, C., Akyol, Y., and Özdemir, C., 2015. Ecology, anatomy and morphology of *Orchis spitzelii* in Turkey. *Journal of Environmental Biology*. 36: 177-184.
- Durmuskahya, C., Ozdemir, C., Bozdog, B., and Ozturk, M., 2014. Studies on the Morphology, Anatomy and Ecology of *Ophrys lutea* Cav. Subsp. Minor (Guss.) O. Danesch & E. Danesch ex Golz & H.R. Reinhard (Orchidaceae) in Turkey. *Pakistan Journal of Botany*. 46: 81-88.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.
- Güler, N., 2012. *Orchis*. In: Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., and Babac, M.T., (eds) A Checklist of the Flora of Turkey (Vascular Plants). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul.

- Haider, N., Nabulsi, I., and Kamary, Y., 2012. Phylogeny of Orchidaceae species in northwest Syria based on ISSRs. *Journal of Plant Biology Research*. 1;2: 36-50.
- Hedge, I.C., 1982. In: Davis, P.H., (ed), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands: Orchis L.*, vol 7. University of Edinburgh Press, Edinburgh.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., (2015) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* (Submitted)
- Özhatay, N., 2000. Europe's Medicinal and Aromatic Plants: Their Use, Trade and Conservation. A TRAFFIC Network Report, TRAFFIC International: Cambridge, UK.
- Pridgeon, A.M., Bateman, R.M., Cox, A.V., Hapeman, J.R., and Chase, M.W., 1997. Phylogenetics of subtribe Orchidine (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis* sensu lato. *Lindleyana*. 12: 89-109.
- Quentin, P., 2000. Proposition de revision des genres *Orchis*, *Aceras*, *Anacamptis* et *Neotinea*. *Orchidophile*. 31;143: 179-182.
- Sevgi, E., Altundag, E., Kara, O., Sevgi, O., Tecimen, H.B., and Bolat, I., 2012. Morphological and Ecological studies on some *Orchis* (Orchidaceae) taxa of Mediterranean region, Turkey. *Journal of Environmental Biology*. 33: 343-353.
- Sgarbi, E., and Del Prete, C., 2005. Histo-anatomical observations on some *Orchis* species (Orchidaceae) from the eastern Mediterranean. *Flora Mediterranea*. 15: 321-329.
- Sramko, G., Molnar, V.A., Hawkins, J.A., and Bateman, R.M., 2014. Molecular phylogeny and evolutionary history of the Eurasian orchid genus *Himantoglossum* s.l. (Orchidaceae). *Annals of Botany*. 114: 1609-1626.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA, *Plant Mol. Biol.* 17: 1105-1109
- Tamura, K., and Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10: 512-526.