

Karasal Bitkilerde DNA Barkodlama: Bazı DNA Barkod Bölgelerinin İncelenmesi

Kaan Hürkan¹

Özet: DNA barkodlama son 30 yıldır bitki türlerinin tayininde ve filogenetik çalışmalarında kullanılan ve popülerliği her geçen gün artan etkili bir tekniktir. Bu teknikte çekirdekten veya plastidlerden elde edilen kısa DNA dizileri analiz edilerek canlılar tür seviyesinde ayırt edilmeye çalışılmaktadır. Çekirdek kökenli barkod bölgeleri, plastid kökenli barkod bölgelerine göre çok daha fazla bilgi içermesine rağmen, tek lokus kullanılarak barkodlama yapıldığında, farklı bitki gruplarını karşılaştırabilmek için yeterli bilgiye sahip olamamaktadır. Tüm bitki türlerinde kullanılabilir tek bir barkod bölgesi henüz mevcut değildir ve bu nedenle farklı barkod bölgelerinin birlikte kullanılması, türlerin ayırt edilebilme gücünü arttırabilmektedir. Kısa DNA dizilerinin moleküler barkod bölgeleri olarak kullanılması günümüzde doyum seviyesine ulaşmış ve yeni teknikler aranmaya başlanmıştır. Tüm bu kısa barkod bölgelerinden çok daha fazla bilgi içeren ve evrensel olabilecek en güçlü barkod bölgesi adayı tüm kloroplast genomudur. Çok hızlı bir şekilde gelişmeye devam eden ve maliyeti düşen yeni nesil dizileme ile elde edilecek genom verileri, bitkilerde evrensel olarak kullanılabilir barkod bölgelerinden biridir.

Anahtar Kelimeler: *DNA Barkodlama, Moleküler markörler, Moleküler taksonomi.*

DNA Barcoding in Terrestrial Plants: Investigation of Some DNA Barcode Regions

Abstract: DNA barcoding is a technique that has been widely used to identify species and discover phylogenetic utilities of species for last 30 years. The main goal of this technique is to discriminate organisms at species level by short DNA fragments originated from nucleus or plastids. Although nucleus originated barcoding regions provide more data for species identification rather than plastid regions, none of the single-locus regions is adequate for universality and provides enough data for comparing plant groups. There is no barcoding region available to be used for all plant groups. Therefore, combining more than one barcoding regions could improve resolution. Using short DNA fragments as barcoding region is achieved to top saturation and new techniques are being studied by researchers. The whole chloroplast genome has enormous data and this data could provide enough specificity for universal barcoding for land plants.

Keywords: *DNA Barcoding, Molecular markers, Molecular taxonomy.*

¹ Dr., Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü.
kaanhurkan@hotmail.com

GİRİŞ

Yeryüzünde yaklaşık olarak 300000 bitki türü olduğu tahmin edilmektedir (IUCN, 2017) ve klasik taksonomik yöntemler kullanılarak bu bitkilerin çok azı doğru bir şekilde tanımlanabilmektedir (P. M. Hollingsworth ve diğerleri, 2009; X. Li ve diğerleri, 2015). Günümüzde kullanılan klasik taksonomik sistem ve bu sistemin 250 yıl boyunca gelişimi; “bireyler morfolojik açıdan birbirlerine ne kadar çok benziyorsa o kadar yakın akrabadır” temeline dayanmaktadır. Bu nedenle “morfolojik tür” tanımı oldukça görelidir. Taksonomik sistemler tasarlanırken doğanın hiçbir zaman tür üretmediği, bunun yerine bireyler ve popülasyonlar ürettiği çoğu zaman göz ardı edilmektedir. Bitkilerde popülasyonlar arası gen akışının oldukça yoğun olması, bireyler üzerine melezlenmenin, genetik sürüklenmenin, ekolojik farklılıkların ve epigenetiğin uyguladığı değişimler, türlerin morfolojik açıdan sabit olamamasına neden olmakta ve Dobzhansky, (1940) tarafından tanımlanan “biyolojik tür” kavramının özellikle karmaşık ve kalabalık bitki gruplarına (Orchidaceae gibi) uygulanmasını zorlaştırmaktadır.

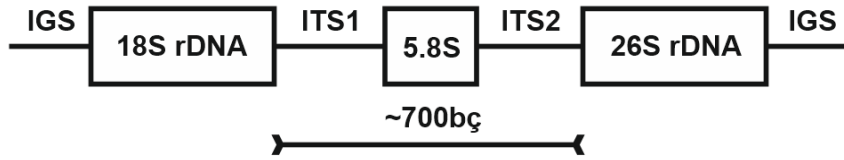
DNA barkodlama, genomda daha önceden belirlenmiş bölgelerde bulunan kısa (600-1500bp) DNA dizilerinin ortaya çıkarılarak türlerin tanımlanmasını amaçlayan bir tanımlama tekniğidir (Lahaye ve diğerleri, 2008). Bu teknikle aynı zamanda canlı grupları arasındaki filogenetik ilişkiler de ortaya çıkarılabilmektedir. Tüm canlı alemlerinin tek bir DNA barkod bölgesi ile tanımlanabilmesi, farklı canlı gruplarının genomlarında her barkodlama bölgesinin farklı nükleotid değişim oranına sahip olması nedeniyle günümüzde mümkün değildir. Bu durum, özelleşmiş barkodlama bölgelerinin sürekli olarak araştırılması ve keşfedilmesini ihtiyacı doğurmaktadır. Örnek olarak mitokondri kökenli *sitokrom oksidaz-1 (COI)* geni, birçok hayvan grubunu doğru bir şekilde tanımlayabilmek için yeterli nükleotid farklılaşma hızına sahipken ve yeni türlerin tanımlanmasında rutin olarak kullanılırken, bu hız bitkilerde oldukça düşüktür ve bu nedenle alternatif barkod bölgelerinin taranması gerekmektedir (P. M. Hollingsworth ve diğerleri, 2009). Son yıllarda tüm türlerde evrensel çapta başarılı olabilecek bir barkod bölgesi aramak için birçok çalışma yapılsa da, henüz böyle bir barkod bölgesi bulunamamıştır (Chase ve Fay, 2009).

DNA barkodlama, canlıların sınıflandırılması ve filogenetik yaklaşımlar haricinde kriptik türlerin ortaya çıkarılması (Hebert, Penton, Burns, Janzen ve Hallwachs, 2004), adli tıpta biyolojik örneklerin suçlular ile eşleştirilmesi (Mildenhall, 2006), gıda güvenliği ve gıda ürünlerinin saflığının belirlenmesi (Huxley-Jones, Shaw, Fletcher, Parnell ve Watts, 2012) gibi birçok farklı alanda da araştırmacılara hizmet vermektedir.

Bu derlemede, günümüzde en yaygın olarak kullanılan bazı DNA barkodlama bölgeleri incelenmiş ve karasal bitkilerde DNA barkodlama hakkında yapılan araştırmalar değerlendirilmiştir.

ITS

Internal Transcribed Spacer bölgesi (ITS) bölgesi, çekirdek ribozomal sistronların 18S-5.8S-26S bölgesinde bulunur. Kendi içerisinde gen kodlamayan ITS1 ve ITS2 bölgeleri ile gen kodlayan 5.8S bölgelerinden oluşmaktadır (Şekil 1). ITS, son 20 yıldan daha fazla bir süredir farklı bitki gruplarının evrimsel ve sistematik çalışmalarında kullanılan en popüler DNA barkod bölgesidir (Álvarez, 2003; Baldwin ve diğerleri, 1995; Sramko, Attila, Hawkins ve Bateman, 2014; Gábor Sramkó, 2008). ITS bölgesinin popülerliğinin ve son 20 yılda yapılan DNA barkodlama çalışmalarının %70'inden fazlasında kullanılmasının sebepleri arasında; (i) çekirdek genomunda birçok kopyasının bulunması ve bu nedenle oldukça eski herbaryum örneklerinden bile bu bölgenin PZR ile kolay bir şekilde çoğaltılabilmesi, (ii) hazır olan evrensel primerler ve bunların farklı kombinasyonları ile çoğaltılabilmeleri (White, Bruns, Lee ve Taylor, 1990), (iii) PZR ile çoğaltılan bölgeye ait ürün boyutunun DNA dizileme işlemi için oldukça uygun uzunlukta olması (700bç'den daha kısa) ve çoğu zaman tek yönlü DNA dizilemesinin yeterli olması, (iv) nükleotid dizi değişikliklerini içeren (ITS1 ve ITS2) ve içermeyen (5.8S) bölgelerin birlikte bulundurulması, (v) plastid DNA barkod bölgelerine göre türler arası ayırt edebilme gücünün daha fazla olması (Kress, Wurdack, Zimmer, Weigt ve Janzen, 2005) gösterilebilir. Bu bölge ayrıca çift ebeveynli kalıtım gösterdiğinden dolayı melez türlerin belirlenmesinde de kullanılabilir.



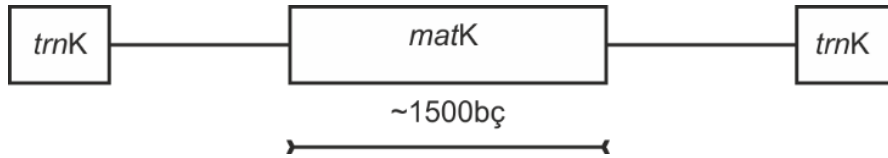
Şekil 1. Internal Transcribed Spacer (ITS) barkod bölgesinin şematik gösterimi. IGS: Intergenic Spaces (Genler arası bölge).

ITS bölgesini oluşturan parçalardan olan ITS2 bölgesi, tüm ökaryotlar arasında, tür ve familya bazında gerçekleştirilen filogenetik çalışmalarda kullanılan en verimli bölgelerden biridir (Álvarez, 2003; Bailey, 2003). ITS2'nin bulunduğu lokus, 5.8S RNA geni ve RNA'nın büyük alt ünitesi arasında bulunur. ITS1 ise RNA'nın küçük alt ünitesi ile 5.8S RNA geni arasında bulunur fakat bu bölgedeki nükleotid değişimleri, ITS2 bölgesindekilere oranla daha azdır ve bu nedenle bu bölge ITS2 bölgesine göre filogenetik açıdan daha az bilgilendiricidir. 5.8S bölgesi gen kodlayan bölge olduğundan tür ve familya kategorisinde neredeyse hiç nükleotid değişikliği göstermez. ITS bölgesi birçok araştırmacı tarafından Salepgiller (Orchidaceae) familyasına ait türlerin filogenetik ilişkilerinin belirlenmesinde ve tür tayinlerinin yapılmasında kullanılan oldukça popüler bir markördür (Richard M. Bateman ve diğerleri, 2009; RICHARD M. Bateman ve diğerleri, 2011; Chase ve Fay, 2009; Gulyás ve diğerleri, 2005; Shipunov, Fay, Pillon, Bateman ve Chase, 2004; Gábor Sramkó, 2008; Gábor Sramkó, Gulyás ve Attila Molnár, 2011; G Sramkó, Molnár V., Hawkins ve Bateman, 2011).

Tüm bu avantajlarına rağmen, ITS bölgesinin evrensel bir barkod bölgesi olmasını engelleyen bazı nedenler söz konusudur. ITS bölgesinin organizmanın genomunda farklı nükleotid dizilerine sahip paralog genler bulundurması ve bu nedenle PZR çoğaltımında bu paralog genlerin de çoğalması, elde edilen DNA dizilerinde bazı bölgelerde kararsızlıklara neden olabilmektedir (Tamamlanmamış birlikte evrim) (Yamaguchi, Kawamura ve Horiguchi, 2006). Bu nedenle ITS2 bölgesinin de PZR ile çoğaltılacak bölgeye dahil edilmesi daha doğru sonuçlar alınması yararına olacağını belirtilmiştir (D.-Z. Li ve diğerleri, 2011). Bununla birlikte ITS bölgesi tek başına barkodlama bölgesi olarak kullanılacaksa, çalışılacak organizma genomunda bulunan ITS kopyaları klonlama ile tespit edilebilir ve bu kopyalarda ayrı ayrı DNA dizilemesi yapılabilir. Ayrıca ITS bölgesi mantarlarda da bulunmaktadır ve eğer Angiosperm grubuna özgü primer kullanılmadan PZR yapılırsa, PZR ürünleri arasında mantar türlerine ait DNA dizilerinin de kontaminasyonu olabilmektedir (Peter M Hollingsworth, Graham ve Little, 2011). Bu nedenle ITS bölgesi PZR ile çoğaltılırken evrensel bir primerin yanında çalışılacak bitki grubuna özgü bir primer de kullanılmalıdır.

matK

MaturaseK (matK), bitkilerde yaklaşık ~1500bp uzunluğunda olan, *trnK* intronları arasında bulunan ve hem yeterli miktarda korunmuş bölge hem de sistematik açıdan gerekli miktarda nükleotid değişimi içeren bir kloroplast genidir (Hilu ve Liang, 1997) (Şekil 2).



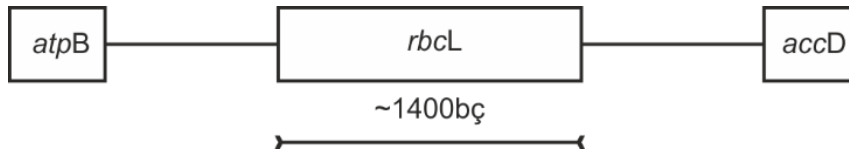
Şekil 2. *MaturaseK (matK)* barkod bölgesinin şematik gösterimi.

ITS bölgesinden yaklaşık olarak iki kat daha uzun olan bu bölge, barkodlama için uygun uzunlukta bir bölge olmakla birlikte, düşük transisyon / transversiyon oranına sahiptir (Min ve Hickey, 2007). *matK* diğer kloroplast kökenli barkodlama bölgeleri ile karşılaştırıldığında çok daha hızlı evrim geçiren bir bölgedir (Chase ve diğerleri, 2007). CBOL Plant Working Group (2009), bu bölgenin PZR ile çoğaltma başarısının kapalı tohumlularda %90 oranında, açık tohumlularda %83 oranında ve çiçeksiz bitkilerde ise sadece %10 oranında olduğunu belirtmiştir. Lahaye ve ark. (2008) tarafından bu barkodlama bölgesinin tek bir çift primer ile %100 oranında başarılı bir şekilde PZR ile çoğaltıldığı belirtilirken diğer çalışma grupları tarafından bu başarı teyit edilmemiştir (P M Hollingsworth, 2008). Bu araştırmacılar Cuenoud ve ark., (2002) tarafından tasarlanan ve bölgeyi ortadan ikiye bölen primerlerin kullanılmasını önermişlerdir. Bu bölgenin Salepgiller (Orchidaceae) familyasına ait türlerin %90'ını birbirinden ayırabileceği bazı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Kress ve Erickson, 2007). Buna karşı farklı araştırmacılar 32 cinse ait 92 tür ile gerçekleştirdikleri çalışmada bu barkod bölgesinin türleri tayin

edebilme oranını %56 olarak belirlemişlerdir ve bu bölgenin evrensel barkod bölgesi olamayacağını vurgulamışlardır (Fazekas ve diğerleri, 2009; Newmaster, Fazekas, Steeves ve Janovec, 2008).

rbcL

rbcL kloroplast kökenlidir ve ribulose-1,5-bis-phosphate carboxylase / oxygenase (RuBisCO) genini kodlamaktadır (Chase ve diğerleri, 1993). Nükleotid değişimleri açısından çekirdek kökenli barkod bölgelerine göre daha yavaş olduğundan özellikle tür seviyesindeki filogenetik ve taksonomik çalışmalar için uygun değilken, cinsten daha yüksek taksonomik seviyelerdeki filogenetik ve taksonomik çalışmalar açısından uygun bir gen dir (Hasebe ve diğerleri, 1994; X. Li ve diğerleri, 2015) (Şekil 3).



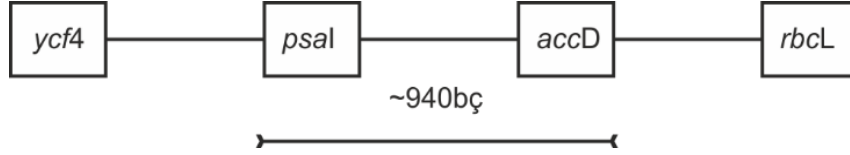
Şekil 3. *rbcL* barkod bölgesinin şematik gösterimi.

rbcL filogenetik araştırmalarda oldukça yaygın olarak kullanılır ve Genbank veri tabanında yaklaşık 173000 dizi bulunmaktadır. Gen kodlayan bir bölge olmasından dolayı PZR ile çoğaltılması ve nükleotid dizilerinin hizalanması oldukça kolay bir bölgedir. Kloroplast genomunda *atpB* ve *accD* genleri arasında bulunan *rbcL* geninin uzunluğu yaklaşık 1400bç'dir ve uzun bir bölge olduğundan DNA dizilemesi için iki primer çifti kullanılması gerekmektedir (Chase ve diğerleri, 1993; X. Li ve diğerleri, 2015). Bazı dezavantajlarının yanı sıra bu bölgenin bitkilerde kullanılabilecek en uygun barkod bölgelerinden biri olduğu ve Genbank veri tabanında oldukça fazla miktarda dizi arşivinin olmasından dolayı ileriki çalışmalarda kullanılabileceği belirtilmektedir (CBOL Plant Working Group, 2009; Li et al., 2015).

accD-psaI

Kloroplast kökenli olan bu bölge, iki gen bölgesi ve bir genler arası bölgeden oluşmaktadır. Bölgenin 3' ucunda *accD* genini kodlayan, 5' ucunda ise *psaI* genini kodlayan bölgeler bulunmaktadır ve bölgenin toplam ortalama uzunluğu 940bç'dir (Şekil 4). Bu bölge protein kodlayan ve kodlamayan bölgelerden oluştuğundan dolayı DNA dizileme sonrasında yapılan hizalama aşamasında oldukça sorunsuzdur. Bu bölgenin PZR ile çoğaltılmasında kullanılacak primerler, temel bitki gruplarında önceden denenmelidir (Dong, Liu, Yu, Wang ve Zhou, 2012). Bu bölgenin çoğaltılmasında kullanılabilecek örnek primer çifti Dong ve ark., (2012) tarafından verilmiştir. Bu bölgenin tek başına evrensel DNA barkod bölgesi olarak kullanılabilmesi, bölgenin bazı bitki gruplarında var olmaması veya oldukça farklılaşmış olması nedeniyle mümkün değildir (Dong ve diğerleri, 2012). Öte yandan bu bölgenin, bir çekirdek kökenli başka bir bölge ile birlikte kullanılarak (ITS ve *accD-psaI* gibi)

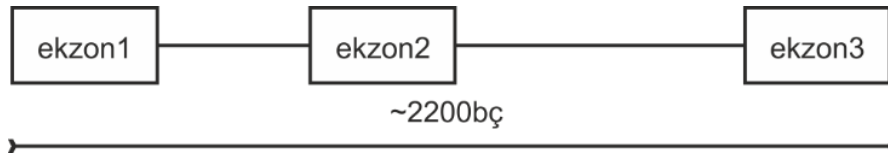
filogenetik ağaç topografilerinin karşılaştırılması veya bu iki bölgeye ait nükleotid dizilerinin birleştirilmesi özellikle melez türlerin belirlenmesinde ve tür seviyesinde tayin yapılmasında oldukça önemli veriler sağlamaktadır (G Sramkó ve diğerleri, 2011).



Şekil 4. *accD-psaI* barkod bölgesinin şematik gösterimi.

LEAFY

Çekirdek genomunda bulunan *LEAFY*, anatomik yapıların gelişiminden sorumlu olan genler (homeotik genler) arasındadır. Bu gen *Arabidopsis* türlerinde floral meristem gelişiminde etkilidir ve çiçeklenme zamanını kontrol etmektedir (Blázquez, Soowal, Lee ve Weigel, 1997). Bu genin *Pinus radiata* D. Don türündeki paralogları, *PRFLL* ve *NEEDLY* genleridir ve bu genler bu ağacın kozalaklarında cinsiyet tayininde kullanılmaktadır (Mellerowicz, Horgan, Walden, Coker ve Walter, 1998). Çeşitli bitkilerde gerçekleştirilen *LEAFY* filogenetik analizlerinde bu genin tohumlu bitkilerde duplike olduğu fakat diploit kapalı tohumlularda bu kopyanın kaybolduğu ve tek kopya gen olarak çalıştığı ortaya çıkarılmıştır. *LEAFY*, tohumlu bitkilerde oldukça korunmuş olan bu gen, üç ekzon ve iki intron bölgesinden oluşmaktadır (Frohlich ve Parker, 2000) (Şekil 5).

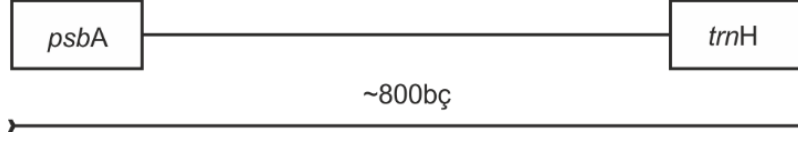


Şekil 5. *LEAFY* barkod bölgesinin şematik gösterimi.

Bu bölgenin düşük taksonomik kategorilerdeki filogenetik özellikleri ve özellikle Avrupa orkidelerinde kullanılabilecek evrensel primer çiftleri Schlüter ve ark., (2007) tarafından tanımlanmıştır. *LEAFY* genin orta kısmında bulunan intron bölgesi polimorfik alanlar içerebilmektedir ve bu nedenle örneklerin tıpkı ITS bölgesinde olduğu gibi klonlanması gerekebilmektedir (Sramko ve diğerleri, 2014). Bu barkodlama bölgesinin özellikle yakın ilişkili bitki gruplarına uygulanacak filogenetik çalışmalarda kullanışlı olabileceği belirtilmiştir (Frohlich ve Meyerowitz, 1997). ITS, kloroplast DNA barkod bölgeleri ve *LEAFY* ile birlikte yapılan bir çalışmada *LEAFY* bölgesinin en fazla nükleotid değişimi içeren bölge olduğu ve bu nedenle filogenetik açıdan en fazla bilgilendirici bölge olduğu ortaya çıkarılmıştır (Oh ve Potter, 2003).

trnH-psbA

trnH-psbA güncel çalışmalarda en çok kullanılan kloroplast kökenli barkod bölgesidir. Genin her iki ucunda bulunan ve yüksek oranda korunmuş olan ekzonlar, bitkiler için evrensel primer çiftlerinin tasarlanmasını oldukça kolaylaştırmaktadır (Shaw ve diğerleri, 2005) (Şekil 6).



Şekil 6. *trnH-psbA* barkod bölgesinin şematik gösterimi.

Kodlama yapmayan genler arası bölge en fazla nükleotid dizi farklılığı içeren bölgedir ve bu farklılıklar çoğunlukla insersiyon / delesyon şeklindedir (Kress ve Erickson, 2007). Tüm bu özellikleri ile *trnH-psbA* bölgesinin, bitki türlerinin barkodlanması için uygun bir bölge olduğu belirtilmiştir (Kress ve Erickson, 2007; Shaw, Lickey, Schilling ve Small, 2007). Tüm bu avantajlarına rağmen, bu bölgenin kullanımında bazı güçlükler vardır. Özellikle geniş bitki gruplarında, intron bölgesinde bulunan uzunluk değişkenliği ve karmaşık moleküler evrim, bu bölgeye ait nükleotid dizilerinin hizalanmasını zorlaştırmaktadır (Chang ve diğerleri, 2006; Chase ve diğerleri, 2007). Buna ek olarak duplike olmuş lokus nedeniyle *trnH-psbA* dizisi bazı kozalaklı bitkiler ve monokotiledon gruplarında oldukça uzun olabilmektedir (>1000bç) (P. M. Hollingsworth ve diğerleri, 2009). Kress ve ark. (2005) ile Chase ve ark. (2007), bu bölgenin iki veya üç lokuslu DNA barkodlama çalışmalarında kullanıma uygun olduğunu, tek başına kullanıldığında evrensel bir boyutta barkodlama bölgesi olma niteliklerine sahip olmadığını belirtmişlerdir.

SONUÇLAR

Bu derlemede, günümüzde karasal bitkilerin moleküler barkodlama çalışmalarında en çok tercih edilen bazı DNA barkod bölgeleri incelenmiştir ve şu sonuçlara varılmıştır;

(1) Genomda bulunan kısa DNA dizileri kullanılarak yapılan DNA barkodlama, tüm canlıları birbirinden ayırabilecek çözünürlüğe sahip olmalıdır. Fakat bu zamana kadar yapılan çalışmalardan ve bulunan DNA barkod bölgelerinden hiçbiri tek başlarına kullanıldıklarında bu başarıyı gösterememişlerdir. Bu başarısızlığın diğer nedenleri ise bazı DNA barkod bölgelerinin yetersiz bilgi içermesi ve bazılarının ise PZR ile çoğaltılmalarının zor olmasıdır (özellikle primer bağlanma bölgelerinde meydana gelen nükleotid değişimleri).

(2) İdeal bir DNA barkod bölgesi, tek bir primer çifti ile PZR tekniği kullanılarak optimizasyona gerek duyulmadan kolayca çoğaltılabilir ve DNA dizileme aşamasında tek veya çift yönlü okumanın yeterli olması gerekmektedir.

(3) Birden fazla DNA barkod bölgesinin kullanılması tür tayin gücünü oldukça artırmaktadır. Fakat bu kullanımın getirdiği olumsuz sonuç ise tür tayin gücü artarken, evrensel çapta kullanımın kısıtlanmasıdır.

(4) Günümüzde yeni nesil dizileme yöntemlerinin rekabetçi bir şekilde çok hızlı olarak gelişmesi, maliyetinin düşmesi ve standartlaşması, tüm plastid genomunun dizilenmesini daha kolay hale getirmekte ve daha fazla araştırmacının bu teknolojiye yararlanmasını sağlamaktadır. Plastidlerin tüm bitki gruplarında bulunması, bu genom barkodlama veya süper barkod tekniğinin evrenselliğini kesinleştirmiş olacaktır.

(5) DNA barkodlamanın asıl amacının türleri birbirinden ayırt etmek olduğu ve ayırt edilen bitki gruplarının birbirleri ile filogenetik ilişkileri hakkında aydınlatıcı olması gerektiği göz önünde tutulmalıdır.

Teşekkür

Bu çalışmanın değerlendirilmesinde ve geliştirilmesinde katkısı olan hakemlere ve editörlere teşekkür ederiz.

KAYNAKÇA

- Álvarez, I. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 417–434. doi:10.1016/S1055-7903(03)00208-2
- Bailey, C. (2003). Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 435–455. doi:10.1016/j.ympev.2003.08.021
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S. ve Donoghue, M. J. (1995). The its Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82(2), 247–277. <http://www.jstor.org/stable/2399880> adresinden erişildi.
- Bateman, R. M., Bradshaw, E., Devey, D. S., Glover, B. J., Malmgren, S., SRAMKÓ, G., Rudall, P. J. (2011). Species arguments: clarifying competing concepts of species delimitation in the pseudo-copulatory orchid genus *Ophrys*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165(4), 336–347. doi:10.1111/j.1095-8339.2011.01121.x
- Bateman, R. M., James, K. E., Luo, Y. B., Lauri, R. K., Fulcher, T., Cribb, P. J. ve Chase, M. W. (2009). Molecular phylogenetics and morphological reappraisal of the *Platanthera* clade (Orchidaceae: Orchidinae) prompts expansion of the generic limits of *Galearis* and *Platanthera*. *Annals of Botany*, 104(3), 431–445. doi:10.1093/aob/mcp089
- Blázquez, M. A., Soowal, L. N., Lee, I. ve Weigel, D. (1997). LEAFY expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development*, 124(19), 3835–3844.
- Chang, C. C., Lin, H. C., Lin, I. P., Chow, T. Y., Chen, H. H., Chen, W. H., Chaw, S. M. (2006). The chloroplast genome of *Phalaenopsis aphrodite* (Orchidaceae): Comparative analysis of evolutionary rate with that of grasses and its phylogenetic implications. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2), 279–291. doi:10.1093/molbev/msj029

- Chase, M. W., Cowan, R. S., Hollingsworth, P. M., van den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., ... others. (2007). A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*, 56(2), 295–299.
- Chase, M. W. ve Fay, M. F. (2009). Barcoding of plants and fungi. *Science*, 325(5941), 682–683.
- Chase, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G., Morgan, D., Les, D. H., Mishler, B. D., Albert, V. A. (1993). Phylogenetics of Seed Plants: An Analysis of Nucleotide Sequences from the Plastid Gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80(3), 528–580. <http://www.jstor.org/stable/2399846> adresinden erişildi.
- Cuenoud, P., Savolainen, V., Chatrou, L. W., Powell, M., Grayer, R. J. ve Chase, M. W. (2002). Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *American Journal of Botany*, 89(1), 132–144. doi:10.3732/ajb.89.1.132
- Dobzhansky, T. (1940). Speciation as a stage in evolutionary divergence. *The American Naturalist*, 74(753), 312–321.
- Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L. ve Zhou, S. (2012). Highly Variable Chloroplast Markers for Evaluating Plant Phylogeny at Low Taxonomic Levels and for DNA Barcoding. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0035071
- Fazekas, A. J., Kesanakurti, P. R., Burgess, K. S., Percy, D. M., Graham, S. W., Barrett, S. C. H., Husband, B. C. (2009). Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? *Molecular ecology resources*, 9 Suppl s1, 130–139. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02652.x
- Frohlich, M. W. ve Meyerowitz, E. M. (1997). The Search for Flower Homeotic Gene Homologs in Basal Angiosperms and Gnetales: A Potential New Source of Data on the Evolutionary Origin of Flowers. *International Journal of Plant Sciences*, 158(6), S131–S142. <http://www.jstor.org/stable/2475173> adresinden erişildi.
- Frohlich, M. W. ve Parker, D. S. (2000). The Mostly Male Theory of Flower Evolutionary Origins: From Genes to Fossils. *Systematic Botany*, 25(2), 155–170. <http://www.jstor.org/stable/2666635> adresinden erişildi.
- CBOL Plant Working Group (2009). Plant barcode protocol *matK* and *rbcL*, 599.
- Gulyás, G., Sramkó, G., Molnár, V. A., Rudnóy, S., Illyés, Z., Balázs, T., Bratek, Z. (2005). Nuclear ribosomal DNA ITS paralogs as evidence of recent interspecific hybridization in the genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47, 61–67.
- Hasebe, M., Omori, T., Nakazawa, M., Sano, T., Kato, M. ve Iwatsuki, K. (1994). *rbcL* gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5730–5734. doi:10.1073/pnas.91.12.5730
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. ve Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812–14817. doi:10.1073/pnas.0406166101
- Hilu, K. W. ve Liang, H. (1997). The *matK* Gene: Sequence Variation and Application in Plant Systematics. *American Journal of Botany*, 84(6), 830. doi:10.2307/2445819
- Hollingsworth, P. M. (2008). DNA barcoding plants in biodiversity hot spots: progress and outstanding questions. *Heredity*, 101(1), 1–2. doi:10.1038/hdy.2008.16

- Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794–12797. doi:10.1073/pnas.0905845106
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W. ve Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE*, 6(5), e19254. doi:10.1371/journal.pone.0019254
- Huxley-Jones, E., Shaw, J. L. A., Fletcher, C., Parnell, J. ve Watts, P. C. (2012). El Uso de Código de Barras de ADN para Identificar la Composición de Especies de Mariscos de Preparación Rápida. *Conservation Biology*, 26(2), 367–371. doi:10.1111/j.1523-1739.2011.01813.x
- Kress, W. J. ve Erickson, D. L. (2007). A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding rbcL Gene Complements the Non-Coding trnH-psbA Spacer Region. *PLoS ONE*, 2(6), e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A. ve Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23), 8369–8374. <http://www.pnas.org/content/102/23/8369.abstract> adresinden erişildi.
- Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2923–2928. doi:10.1073/pnas.0709936105
- Li, D.-Z., Gao, L.-M., Li, H.-T., Wang, H., Ge, X.-J., Liu, J.-Q., Duan, G.-W. (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19641–19646. doi:10.1073/pnas.1104551108
- Li, X., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y. ve Chen, S. (2015). Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews*, 90(1), 157–166. doi:10.1111/brv.12104
- Mellerowicz, E. J., Horgan, K., Walden, A., Coker, A. ve Walter, C. (1998). PRFLL - a *Pinus radiata* homologue of FLORICAULA and LEAFY is expressed in buds containing vegetative shoot and undifferentiated male cone primordia. *Planta*, 206(4), 619–629. doi:10.1007/s004250050440
- Mildenhall, D. C. (2006). *Hypericum* pollen determines the presence of burglars at the scene of a crime: An example of forensic palynology. *Forensic Science International*, 163(3), 231–235. doi:10.1016/j.forsciint.2005.11.028
- Min, X. J. ve Hickey, D. A. (2007). BARCODING: Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 365–373. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01698.x
- Newmaster, S. G., Fazekas, A. J., Steeves, R. A. D. ve Janovec, J. (2008). Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Molecular ecology resources*, 8(3), 480–490.
- Oh, S. H. ve Potter, D. (2003). Phylogenetic utility of the second intron of LEAFY in *Neillia* and *Stephanandra* (Rosaceae) and implications for the origin of *Stephanandra*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 203–215. doi:10.1016/S1055-7903(03)00093-9
- Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B., Liu, W. S., Miller, J., Small, R. L. (2005). The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92(1), 142–166.

- Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E. ve Small, R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94(3), 275–288.
- Shipunov, A. B., Fay, M. F., Pillon, Y., Bateman, R. M. ve Chase, M. W. (2004). Dactylorhiza (Orchidaceae) in European Russia: Combined molecular and morphological analysis. *American Journal of Botany*, 91(9), 1419–1426.
- Sramkó, G. (2008). *Sequence variability of the nrITS in the Ophrys fuciflora species-complex of the Mediterranean bee-orchid (Ophrys L.) genus. Department of Botany. University of Debrecen, Debrecen.*
- Sramko, G., Attila, M. V., Hawkins, J. a. ve Bateman, R. M. (2014). Molecular phylogeny and evolutionary history of the Eurasiatic orchid genus Himantoglossum s.l. (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 114(8), 1609–1626. doi:10.1093/aob/mcu179
- Sramkó, G., Gulyás, G. ve Attila Molnár, V. (2011). (Orchidaceae) Revisited: A Study using nrITS and cpIGS Sequences. *Annales Botanici Fennici*, 48, 97–106. doi:10.5735/085.048.0201
- Sramkó, G., Molnár V., A., Hawkins, J. A. ve Bateman, R. M. (2011). Evolution of the Eurasiatic genus Himantoglossum(Orchideae, Orchidoideae): an integrativephylogenetic approach. *In: Abstracts of the XVIII International Botanical Congress* içinde (ss. 286–287). Melbourne: Committee of the XVIII IBC 2011.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. ve Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky ve T. J. White (Ed.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* içinde (ss. 315–322). San-Diego: Academic Press.
- Yamaguchi, A., Kawamura, H. ve Horiguchi, T. (2006). A further phylogenetic study of the heterotrophic dinoflagellate genus, Protoperidinium (Dinophyceae) based on small and large subunit ribosomal RNA gene sequences. *Phycological Research*, 54(4), 317–329. doi:10.1111/j.1440-1835.2006.00438.x