

**T. C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN *SERRATULA* L. (ASTERACEAE) CİNSİNE AİT
TAKSONLARIN ITS nrDNA VE *TRNL-F* cpDNA DİZİLERİYLE
MOLEKÜLER SİSTEMATİK ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Necla ŞAHİN

Balıkesir, Temmuz-2011

**T. C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN *SERRATULA* L. (ASTERACEAE) CİNSİNE AİT
TAKSONLARIN ITS nrDNA VE *TRNL-F* cpDNA DİZİLERİYLE
MOLEKÜLER SİSTEMATİK ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Necla ŞAHİN

Balıkesir, Temmuz-2011

T. C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TÜRKİYE'DE YETİŞEN *SERRATULA* L. (ASTERACEAE) CİNSİNE AİT
TAKSONLARIN ITS nrDNA VE *TRNL-F* cpDNA DİZİLERİYLE
MOLEKÜLER SİSTEMATİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Necla ŞAHİN

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fatih COŞKUN

Sınav Tarihi : 04.08.2011

Juri Üyeleri : Doç.Dr.Fatih SATIL (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Fatih COŞKUN (Danışman-BAÜ)

Yrd.Doç.Dr.İsmet BAŞARAN (BAÜ)

Enstitü Yönetim Kurulunun tarih sayılı oturumunun
nolu kararı ile Mezun olmuştur.

Balıkesir, Temmuz-2011

Bu yüksek lisans çalışması TÜBİTAK 109T243 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

TÜRKİYE'DE YETİŞEN *SERRATULA* L. (*Asteraceae*) CİNSİNE AİT TAKSONLARIN ITS nrDNA VE *trnL-F* cpDNA DİZİLERİYLE MOLEKÜLER SİSTEMATİK ANALİZİ

Necla ŞAHİN

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Fatih COŞKUN

Balıkesir, 2011

Yapılan çalışmalar neticesinde Türkiye'de *Serratula* L. (*Asteraceae*) cinsine ait 18 takson belirlenmiştir.

Serratula L. türleri ile birçok alanda çalışma yapılmış olmasına rağmen, filogenetik ilişkileri için henüz moleküler genetik verilere dayalı bir analiz yapılmamıştır. Bu çalışmada; Türkiye'de yayılış gösteren *Serratula* cinsinin taksonlarının moleküler sistematik analizi yapılmıştır. Çalışmada çekirdek DNA'sının (nrDNA) ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi ve kloroplast DNA'sının *trnL-F* kullanılmıştır. Herbaryum bitki materyallerinden genomik DNA'lar, fenol-kloroform-izoamilalkol ve SIGMA ticari kiti kullanılarak elde edilmiştir. İzolasyonu yapılan gDNA'ların ITS bölgeleri ITS5A ve ITS4 primerleri kullanılarak *trnL-F* bölgeleri ise *trnL-e* ve *trnL-Ff* primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. DNA dizileme reaksiyonları sonucu elde edilen DNA dizilerinin işlenmesinde SEQUENCHER programı kullanılmıştır. DNA dizilerinin hizalanmasında CLUSTAL W programı ve filogenetik analiz için ise PAUP*4.0b10 programı kullanılmıştır.

Çalışmaya göre, ITS bölgesinin analizi ile oluşturulan ağaçların *trnL-F* bölgelerine göre oluşturulan ağaçlardan sistematik açıdan, morfolojik verilerle karşılaştırınca daha güvenilir sonuçlar verdiği ortaya çıkmıştır. Fakat her iki bölge de derin filogenetik ilişkileri çözmekte yetersiz kalmıştır. Sonuç olarak, dış grup olarak kullanılan taksonların yüksek düzeyde bootstrap değerleriyle iç gruptan ayrıldığı ve iç grubun monofiletik olduğu görülmüştür. Ayrıca iç gruptan sekiz takson diğer iç grup taksonlarından yakın zamanda net bir şekilde ayrılmıştır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: *Serratula*, nrDNA, ITS, Filogenetik Analiz, PAUP, *Asteraceae*, *trnL-F*, cpDNA

ABSTRACT

MOLECULAR SYSTEMATIC ANALYSIS OF THE GENUS *SERRATULA* L. (Asteraceae) DISTRIBUTED IN TURKEY USING ITS nrDNA, *trnL-F* cpDNA

Necla ŞAHİN

Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology

(Msc. Thesis / Supervisor: Assist. Prof. Dr. Fatih COŞKUN)

Balıkesir-Turkey, 2011

The genus *Serratula* L. (Asteraceae) comprises 18 taxa according to our literature research.

Although many investigations have been done with *Serratula* species, an analysis based on molecular genetics data has not been done for the phylogenetic relationships yet. For this study; molecular systematic analysis of the *Serratula* taxa distributed in Turkey was performed. In the study, ITS nrDNA region of the nuclear genome and *trnL-F* region of the cpDNA used. Genomic DNAs from silica gel dried fresh leaf tissues and from herbarium materials were extracted using phenol-chloroform-isoamyl alcohol method and SIGMA company's plant DNA isolation kit. ITS region of the genomic DNAs using ITS5A and ITS4 primers and *trnL-F* region of the genomic DNAs using *trnL-e* and *trnF-f* primers were used to amplify regarding regions. SEQUENCHER software were used to edit DNAs obtained via DNA sequencing reactions. CLUSTAL W software for alignment of DNA sequences and PAUP*4.0b10 software for phylogenetic analysis were utilized.

Phylogenetic trees based on ITS region were founded to be more reliable than phylogenetic trees based on *trnL-F* regions. Nevertheless ITS and *trnL-F* region data don't solve phylogenetic relationships problems for *Serratula* taxa. In conclusion, outgroup of taxa that used, separated from ingroups with high degree of bootstrap outcome and because of this reason in group were found to be monophyletic. Besides, The eight taxa of ingroup separated from the other interior groups recently.

KEYWORDS: *Serratula*, nrDNA, ITS, Phylogenetic Analysis, *trnL-F*, PAUP, cpDNA, Asteraceae

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
KEYWORDS	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Asteraceae Familyasının Morfolojik Özellikleri	2
1.2 <i>Serratula</i> L. Cinsinin Morfolojik Özellikleri	2
1.2.1 <i>Serratula</i> L. Cinsinin Sistematikteki Yeri	3
1.2.2 <i>Serratula</i> L. Cinsinin Ükümüzde ve Dünya Üzerindeki Yayılışı	3
1.2.3 <i>Serratula</i> Türleri Üzerine Yapılan Çalışmalar	5
1.3 Moleküler Filogeni	6
1.3.1 Moleküler Sistematikte Kullanılan Yöntemlerden Bazıları	7
1.3.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi	7
1.3.1.2 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA	8
1.3.1.3 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi	9
1.3.1.4 Minisatellitler (SSR) Mikrosatellitler (VNTR)	9
1.3.1.5 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) Basit İç Dizi Tekrarları	9
1.3.1.6 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Polimorfik Diziler	10
1.3.1.7 CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence) Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler	10
1.3.1.8 ESTs (Expressed Sequence Tags) İşaretli İfade Edilen Diziler	11
1.3.1.9 ASAP (Allele Specific Associated Primers) Allele Özgü Birleşen Primerler	11
1.3.1.10 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Tek Nükleotit Polimorfizmi	11
1.3.2 ITS (Internal Transcribed Spacer) ve rDNA	12
1.3.2.1 ITS Bölgesi ve Genel Özellikleri	12

1.3.2.2 rDNA ve ITS Bölgeleri Arasındaki İlişki	13
1.3.2.3 rDNA Bölgeleri	14
1.3.2.3.1 Küçük Alt Birim rDNA (18S)	14
1.3.2.3.2 5.8S rDNA	14
1.3.2.3.3 Büyük Alt Birim rDNA (28S)	15
1.3.3 Moleküler Filogenide Kullanılan DNA Çesitleri	15
1.3.3.1 Kloroplast Genomu	15
1.3.3.3 Çekirdek DNA'sı	17
1.3.4 DNA Dizileme	17
1.3.4.1 Maxam ve Gilbert'in Kimyasal Kırılma Yöntemi	18
1.3.4.2 Sanger DNA Dizileme Yöntemi	19
1.3.4.3 Otomatik DNA Dizileme Yöntemi	20
1.3.5 Çoklu Dizi Hizalama ve Clustal W Programı	21
1.3.6 Filogenetik Analiz ve Filogenetik Ağaç	21
1.3.6.1 Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler	22
1.3.6.1.1 Karakter Temelli Yöntemler	23
1.3.6.1.1.1 MP (Maximum Parsimony) Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi	23
1.3.6.1.1.2 ML (Maximum Likelihood) En Yüksek İhtimal Metodu	24
1.3.6.1.1.3 Bayes Metodu	24
1.3.6.1.2 Mesafe Temelli Yöntemler	24
1.3.6.1.2.1 UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu	25
1.3.6.1.2.2 Neighbour Joining Komşu Birleştirme Metodu	25
1.3.7 Filogenetik Ağaçların Oluşturulmasında Kullanılan Programlar	25
2. MATERYAL VE YÖNTEM	27
2.1 Materyal	27
2.1.1 Bitki Materyallerinin Toplanması	27
2.1.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması	29
2.1.3 Kullanılan Kimyasallar	29
2.1.3.1 Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar	29
2.1.3.1.1 Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Metoduyla Yapılan DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar	29
2.1.3.1.2 SIGMA Kiti ile Yapılan İzolasyonda Kullanılan Kimyasallar	30
2.1.4 PCR' de Kullanılan Primerler ve Özellikleri	31
2.1.5 Agaroz Jel Elektroförezinde Kullanılan Kimyasallar	32
2.2 Yöntem	32

2.2.1 Bitkilerden Genomik DNA İzolasyonu	32
2.2.1.1 Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Protokolü	32
2.2.1.2 SIGMA Kiti ile DNA İzolasyonu	33
2.2.2 PCR Uygulamaları	34
2.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi	35
2.2.4 Dizileme ve Dizi Analizi	36
2.2.5 Filogenetik Analiz	36
3. BULGULAR	37
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	40
4.1 ITS Bölgesi Kullanılarak Yapılan Filogenetik Analiz	41
4.2 trnL-F bölgesi kullanılarak yapılan fiogenetik analiz;	53
5. KAYNAKLAR	63
6. EKLER	72
6.1 ClustalW’da hizalanmış ITS5A nrDNA dizisinin Veri Matrisi	72
6.2 ClustalW’da hizalanmış trnL-f cpDNA dizisinin Veri Matrisi	76

KISALTMALAR

<u>Kısaltma Adı</u>	<u>Tanımı</u>
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
AFLP	: Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
SSR	: Basit Dizi Tekrarları
VNTRs	: Çeşitli Sayıda Ardışık Tekrarlar
ISSR	: Basit İç Dizi Tekrarları
SCAR	: Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Polimorfik Diziler
CAPS	: Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler
ESTs	: İşaretli İfade Edilen Diziler
ASAP	: Allele Özgü Birleşen Primerler
SNP	: Tek Nükleotit Polimorfizmi
SSCP	: Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizm
STS	: Dizisi Etiketlenmiş Alanlar
SPAR	: Tek Primerle Çoğaltılmış Reaksiyon
SRAP	: Diziye İlişkin Çoğaltılmış Polimorfizm
ITS	: Internal Transcribed Spacer
cDNA	: Complementary DNA (Komplementer DNA)
dNTP	: Deoksiribonükleosid trifosfat
ddNTP	: Dideoksiribonükleosid trifosfat
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
mtDNA	: Mitokondri DNA'sı
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
gDNA	: Genomik DNA
TE	: Tris-EDTA
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
MP	: Maximum Parsimony

ML	: Maximum Likelihood
PAUP	: Phylogenetic Analysis Using Parsimony
PHYLIP	: The Phylogeny Inference Package
bp	: Baz çifti
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ETS	: External Transcribed Spacer
IGS	: Intergenic Spacer
mat K	: Maturase K geni
cpDNA	: Kloroplast DNA
NOR	: Nükleolar Organizer Region
nrDNA	: Nüklear ribozomal DNA
NTS	: Non Transcribed Spacer
SSU	: Small Subunit
ETOH	: Etil alkol/etanol
rpm	: Dakikadaki Döngü Sayısı
TBE	: Tris-Borikası- EDTA
UPGMA	: Unweighted Pair-Group Metod of Arithmetic Avarage
NJ	: Neighbour Joining
MEGA	: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
dH₂O	: Distile Su
NaCl	: Sodyum Klorür
NaAc	: Sodyum Asetat
L	: Linne
T_m	: Erime sıcaklıkları
NCBI	: National Center For Biotechnology Information
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
LSU	: Large Sub Unit
SSU	: Small Sub Unit

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1	<i>Serratula</i> Taksonlarının Türkiye'deki Yayılışı	4
Şekil 2	<i>Serratula</i> Taksonlarının Türkiye'deki Yayılışı	4
Şekil 3	ITS bölgesi ve Kullanılan Primerlerin Pozisyonları	12
Şekil 4	Çekirdek Ribozomal DNA'sının Tekrarlı Üniteleri	13
Şekil 5	Kloroplast Genomu	16
Şekil 6	trnL-F Bölgesi	16
Şekil 7	DNA Dizileme Sonucu Oluşan Piklerin Görüntüsü	20
Şekil 8	Bazı <i>Serratula</i> Taksonlarının gDNA Görüntüsü	37
Şekil 9	Bazı <i>Serratula</i> Taksonlarının ITS Primerleriyle Yapılan PCR Görüntüsü	38
Şekil 10	Bazı <i>Serratula</i> Taksonlarının trnL-f Primerleriyle Yapılan PCR Görüntüsü	38
Şekil 11	ITS Bölgesinin Parsimoni Analizi Sonucu Oluşan 1 Numaralı Ağaç	41
Şekil 12	ITS Bölgesinin Parsimoni Analizi Sonucu Oluşan 500 Numaralı Ağaç	42
Şekil 13	ITS bölgesinin Parsimoni Analizi Sonucu Oluşan 1000 Numaralı Ağaç	43
Şekil 14	ITS bölgesinin Bootstrap Analizi Sonucu Oluşan Parsimoni Ağacı	45
Şekil 15	ITS bölgesinin Üzerine Bootstrap değerleri işlenmiş 1 numaralı Parsimoni Ağacı	48
Şekil 16	ITS bölgesinin Parsimoni Sonucu Oluşan 1000 Ağacın Strict Konsensus Ağacı	49
Şekil 17	ITS bölgesinin UPGMA Analizi Sonucu Oluşan Ağaç	50
Şekil 18	ITS bölgesinin Neighbor-Joining (NJ) Analizi Sonucu Oluşan Ağaç	51
Şekil 19	trnL-F bölgesinin Parsimoni Analizi Sonucu Oluşan 1 Numaralı Ağaç	53
Şekil 20	trnL-F bölgesinin Parsimoni Analizi Sonucu oluşan 500 Numaralı Ağaç	54
Şekil 21	trnL-F bölgesinin Parsimoni Analizi Sonucun Elde Edilen 1000 Numaralı Ağaç	55
Şekil 22	trnL-F Bölgesinin Bootstrap Analizi Sonucu Oluşan Parsimoni Ağacı	57
Şekil 23	trnL-F Bölgesinin Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş 1 Numaralı Parsimoni Ağacı	58
Şekil 24	trnL-F bölgesinin Parsimoni Sonucu Oluşan 1000 Ağacın Strict Konsensus Ağacı	59
Şekil 25	trnL-F bölgesinin UPGMA Analizi Sonucu Oluşan Ağaç	60
Şekil 26	trnL-F bölgesinin Neighbor-Joining (NJ) Analizi Sonucu Oluşan Ağaç	61

TABLO LİSTESİ

<u>Cizelge Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1	Kimyasal Kırılma Yönteminde Kullanılan Kimyasallar	18
Tablo 2	Çalışılan Taksonlar ve Toplandığı Lokaliteler	27
Tablo 3	Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	30
Tablo 4	PCR'de (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Kullanılan Kimyasallar	30
Tablo 5	ITS PCR' de Kullanılan Primerler	31
Tablo 6	<i>trnL</i> -F PCR' de Kullanılan Primerler	31
Tablo 7	5X TBE Tamponu Hazırlama	32
Tablo 8	Kullanılan PCR Programı	34

ÖNSÖZ

Bu çalışmada Türkiye’de yayılış gösteren *Serratula* taksonlarının gDNA ve cpDNA dizilerine dayalı moleküler sistematik analizi dış gruplar kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada izlenen yol şöyledir; herbaryum bitki materyallerinden DNA izolasyonu yapılmış, DNA’ların ITS ve *trnL-F* bölgeleri uygun primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmış, DNA dizilerinin belirlenmesi için dizileme reaksiyonları yapıldı. Bu verilerin ışığında filogenetik analizler yapılarak taksonlar arasındaki filogenetik ilişkiler aydınlatılmıştır.

Yüksek Lisans Tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren, yönlendiren, gelişmeye katkıda bulunan hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatih COŞKUN ’a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Kullanılan bitki materyallerini temin eden Selçuk Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Bekir DOĞAN’a teşekkür ederim.

109T243 numaralı projeye, gerekli teçhizatı, kimyasalları ve malzemeleri temin etmemizi sağlayan TÜBİTAK’a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam için gerekli laboratuvar imkanlarını sağlayan BÜTAM Müdürlüğü’ne, bu merkezde çalışan Ferit KARANFİL’e ve Mehmet UÇKUN’a ve diğer çalışanlarına teşekkür ederim.

Ders ve laboratuvar aşamasında deneyimlerimden ve bilgilerimden yararlandığım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR’a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım, Fatoş YAMAÇLI, Nur Gökçe ÇETİNER, Gülsüm GÖREN, Şakir AKGÜN, Öznur SUAKAR, Görkem DENİZ, Zeynep KARABAŞ, Gülçin ÇETİN ve Şenay SÜNGÜ’ye teşekkür ederim.

Çalışmalarımda bana yol gösteren, bilgilerini paylaşan, her türlü yardımı esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Cüneyt TEZ ve Emre SEVİNDİK’e teşekkür ederim.

Yaşamımın her anında yanımda olan iyi niyetini benden esirgemeyen canım anneme ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz-2011

Necla ŞAHİN

1. GİRİŞ

Serratula L. cinsi bitkiler aleminde oldukça geniş yayılış alanına sahip familyalarından olan Asteraceae familyasında yer alır. Ülkemizde 18 taksonla temsil edilir.

Günümüze kadar, *Serratula* taksonları üyeleri ile ilgili birçok sistematik çalışma yapılmıştır. Ancak, *Serratula* cinsinin sınıflandırılmasında taksonomik açıdan bazı problemler bulunmaktadır. Günümüzde bu tür sistematik problemlerin çözümünde moleküler çalışmaların önemli katkılar sağladığı bilinmektedir. Bitki türlerinin morfolojik karakterlerine dayalı yapılan taksonomik sınıflandırma, bitkinin yaşına, fizyolojik durumuna ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermekte ve bazen yeterli olmamaktadır [1]. Ayrıca, morfolojik özellikleri birbirine çok yakın olarak görülen gruplar genetik olarak birbirinden çok farklı da olabilmektedir. Bu olumsuzlukları gidermek için geliştirilen moleküler genetik markırlar bitkilerdeki genetik çeşitliliğinin ortaya konmasında, bitki türleri arasındaki taksonomik ve filogenetik ilişkilerin doğru bir şekilde belirlenmesinde başarıyla kullanılmaktadır [2]. nrDNA bölgesi üzerinde bulunan ITS (Internal Transcribed Spacers) ve cpDNA üzerinde bulunan *trnL-F* bölgeleri de bu amaçlarla sıkça kullanılan moleküler markırlardandır.

ITS ve *trnL-f* bölgeleri bitkilerdeki moleküler sistematik çalışmalarında son yıllarda çok sık kullanılan bir bölgedir [3]. ITS bölgeleri ile yapılan çalışmalarda taksonların nrDNA ITS bölgeleri pcr yöntemleri ile çoğaltılıp baz polimorfizmine bakılarak taksonlar arasındaki filogenetik ilişkiler belirlenebilmektedir. *trnL-F* bölgesi ile yapılan çalışmalarda ise cpDNA *trnL-F* bölgeleri ise aynı şekilde PCR yöntemi ile çoğaltılıp baz polimorfizmine bakılarak filogenetik ilişkiler belirlenebilir. Bu çalışma ile ITS ve *trnL-F* PCR yöntemini kullanarak, *Serratula* cinsinin Türkiye’de yayılış gösteren taksonlarının akrabalık ilişkileri belirlenecektir. Daha sonra bu veriler morfolojik verilerle karşılaştırılarak, morfolojik verilerin güvenilir olup olmadığı teyit edilecektir.

1.1 Asteraceae Familyasının Morfolojik Özellikleri

Otsu, iki veya çok yıllık, ağaçcık, ağaç, sarılıcı gövdeli, ya da kaktüs ya da yastık şeklinde bitkilerdir. Yapraklar basit veya birleşik stipulsuz, genellikle alternat nadiren karşılıklı durumludur. Temel çiçek durumu az çok çiçekli bir kapitulum bazen tek çiçekli (*Echinops*'da), çok kısalmış durumdadır. Kapitulum genellikle rasemöz veya simöz şeklinde gruplar halindedir. Kapitulum bazen basık bir başcık şeklinde olabilir (pseudokapitulum) ve buradaki çiçeklerin genç olanları ortada, yaşlı olanları ise bunların çevresinde olacak biçimde sarmal şekilde yerleşim gösterirler. Tipik kapitulum şekilleri koni veya kozalak şeklindedir. Fakat kapitulum hafif konveks, düz, konkav veya vazo şeklinde de olabilir. Kapitulumda iki çeşit brakte bulunur. Bunlardan birincisi kapitulumu çevreleyen involukruma dönüşen dış braktelerdir. Bunların her birine fillari denir. İkincisi çiçeklerin brakteleridir. Asteraceae'de üç tip çiçek görülür. Bunlar; tubular çiçek, iki dudaklı (bilabiat) çiçekler, ligulat (dilsiz- iplikli) çiçekler. Kapitulumdaki tüm çiçekler tüpsü veya tamamı dilsiz olabilir (homogam). Ayrıca burada iki dudaklı korollalar da bulunabilir. Heterogam kapitulumda ise tubular çiçekler ve dilsiz çiçekler bir arada bulunur. Ayrıca çiçekler ayrı eşeylidir. Kaliks kıl ya da pul şeklinde indirgenmiştir. Kaliks döllenmeden sonra (tüpsü ve ipeksi) bir yapı olan papusa dönüşür. Korolla genellikle gamopetal pentamerdir. Nadiren değişiklik gösterebilir. Androceum eşit beş stamenden meydana gelir. Stamenerler alternipetaldirler ve anterleriyle birleşip tüp ya da boru şeklini alarak stilusu sararlar. Gineceum birbirine yapışık iki karpelden meydana gelir. Ovaryum alt durumlu ve tek bölmelidir. Ayrıca ovaryum genellikle tek, dik bir tohum taslağı bulundurur. Nadiren 1-2 tohum taslağı bulunur (*Serratula* ve *Cirsium*) [4-5].

1.2 *Serratula* L. Cinsinin Morfolojik Özellikleri

Serratula türleri dallanmayan çok yıllık, otsu bitkiler şeklindedir. Kapitulum discoid (ender olarak dioik) homogamdır. Fillariler; genellikle imbrikat, 4-8 serili, bütün veya uçta sivri, bazen uzun sivri, saman renginde ya da nadiren morumsudur.

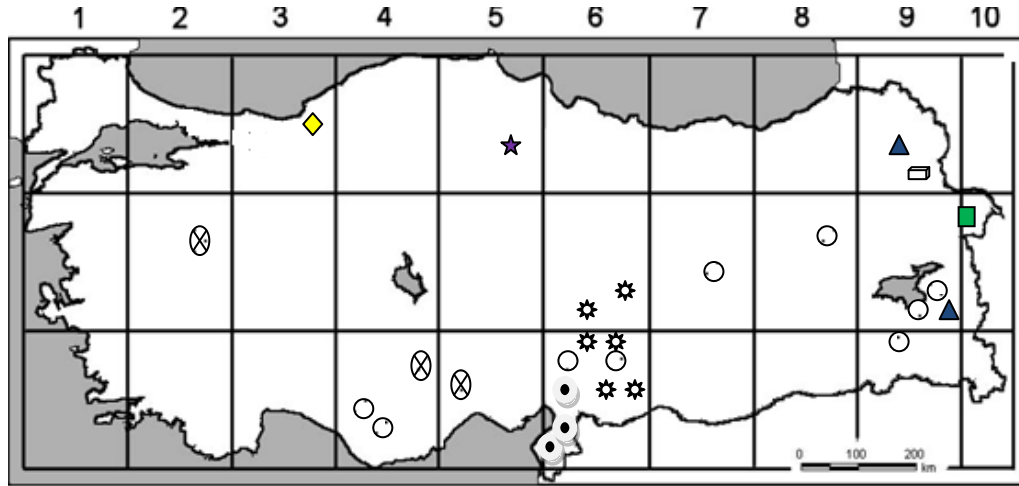
Çiçek tablası uzun ve sık tüylerle kaplıdır. Çiçekler beyaz, sarı, mavi mor renklerde olabilir. Akenler obovoidtir. Papus çok serili şekildedir.

1.2.1 *Serratula* L. Cinsinin Sistematikteki Yeri

Regnum	:	Plantae
Divisio	:	Spermatophyta
Subdivisio	:	Angiospermae
Classis	:	Magnalopsida
Ordo	:	Asterales
Familia	:	Asteraceae
Genus	:	<i>Serratula</i>

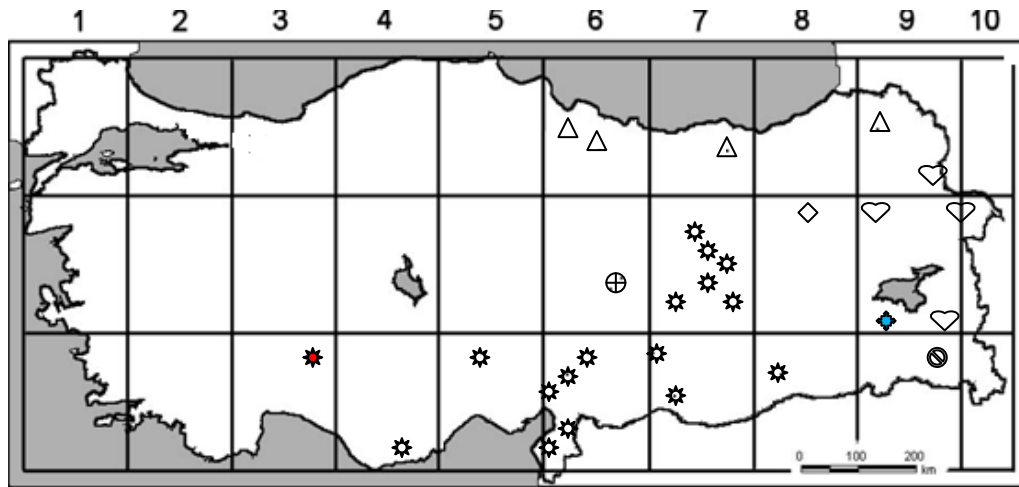
1.2.2 *Serratula* L. Cinsinin Ülkemizde ve Dünya Üzerindeki Yayılışı

Serratula cinsi oldukça kozmopolit bir familya olan *Asteraceae* familyasında yer alır. Kozmopolit olan bu familya dünyada 1000 civarında cins ve 13.000'den fazla tür içerir [5]. Türkiye'de ise 130 cins ve 1130 tür ile temsil edilir. Cinsler arasında en yaygın olanı *Centaurea*'dır [5]. Ülkemizde ise *Serratula* cinsi, 18 taksonla ile temsil edilmektedir. Bu taksonlardan *Serratula aznavouriana*'nın nesli tükenmiştir. Araştırmacılar tarafından yayılış alanından en son 1905 yılında toplanmıştır [4]. Ülkemizde bulunan *Serratula* cinsinin taksonlarının yayılış alanları aşağıdaki haritalarda belirtilmiştir;



- *S. erucifolia* ◆ *S. tinctoria* ▲ *S. haussknechtii*
 ★ *S. aznavouriana* ⊗ *S. lasiocephala* ◻ *S. coriacea*
 * *S. oligocephala* ● *S. kurdica* ○ *S. serratuloides*

Şekil 1 *Serratula* Taksonlarının Türkiye'deki Yayılışı



- * *S. cerinthifolia* ♡ *S. radiata* subsp. *biebersteiniana* ⊕ *S. bornmuelleri*
 ◆ *Serratula kotschy* △ *Serratula quinquefolia* ♡ *S. radiata*
 * *S. radiata* subsp. *radiata* ◇ *S. grandifolia* ⊙ *Serratula hakkarica*

Şekil 2 *Serratula* Taksonlarının Türkiye'deki Yayılışı

1.2.3 *Serratula* Türleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

Serratula türleri üzerine çok sayıda kimyasal araştırma mevcut olup, çalışmalar özellikle ecdysteroid, gliserolipit ve flavonoidler üzerinde yoğunlaşmıştır [6,7,8]. Kimyasal çalışmalar yanında, *Serratula* türleri üzerinde yapılmış farmakolojik araştırma da vardır. Son zamanlarda biyolojik aktivite çalışmalarına ilave olarak, antimikrobiyal ve antioksidan etkileri de araştırmacılar tarafından araştırılmıştır [9].

Ülkemizde yetişen *Serratula* türleri üzerine morfolojik ve anatomik araştırmalar yapılmıştır [10]. Fakat *Serratula* türleri ile ilgili moleküler sistematik alanda çalışmalar mevcut değildir.

Yapılan morfolojik anatomik çalışmalar neticesinde ülkemizde yetişen yeni türlerin varlığı keşfedilmiştir. Bunlardan; *Serratula radiata*. subsp. *biebersteiniana* Waldstein ve Kitaibel (1999) tarafından ülkemiz florasına dahil edilmiştir [11].

Serratula türleriyle ilgili dünya çapında da birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar genellikle morfolojik ve biyokimyasal çalışmalardır [12,13,14]. Moleküler filogenetik alanında yapılan çalışmalara bakıldığında ise pek fazla çalışmanın bulunmadığı görülmektedir [15,16]. Dünya üzerinde yapılan bazı çalışmalar aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Delbecque ve Beydon (1995), yaptıkları çalışmada *S.tinctoria*'nın köklerinden ecdysteroid elde etmişlerdir. .

Dai ve Las (2001), *S.strangulata*'nın bitki özütlerinden flavonoid ve gliserolipit izole etmişlerdir.

Odinokova ve Galyautdinova (2001), *S.coronata*'nın bitki özütünden Phytoecdysteroids elde etmişlerdir.

Martins ve Hellwig (2005), *Serratula* ve *Klasea* cinsleri arasındaki filogenetik ilişkileri ETS ve ITS bölgelerindeki polimorfizimlere bakarak açıklamışlardır.

Dedaldechamp ve Ragai (2003), *S. tinctoria*'dan Flavonol 3-O-metil transferaz enzimini izole edip daha sonra bu enzimin aminoasit sekanslarını incelemişlerdir.

Seman ve Haber yaptıkları çalışmada *S. oligocephala* taksonunun Lübnan'da yetiştiğini keşfetmişler ve bu taksonu Lübnan florasına yeni bir kayıt olarak eklemişlerdir [17].

1.3 Moleküler Filogeni

Son yıllarda bitkilerin tanımlanmasında morfolojik karakterlerin yanı sıra moleküler verilerin kullanılması hız kazanmıştır [18,19,20]. Yüksek yapılı bitkiler çekirdek genomu ve organel genomuna (kloroplast ve mitokondri) sahiptirler. Çekirdek genomu lineer yapıdadır ve eşeyli kalıtımlanır. Fakat kloroplast ve mitokondri genomu eşeysiz olarak kalıtımlanır ve halkasal yapıdadır.

Moleküler sistematik çalışmalarda hem çekirdeğe ait hem de organellere ait genom veri kaynağı olarak kullanılabilir. Mitokondri DNA'sı oldukça değişken bir yapı gösterir. Bu nedenle bitki sistematğinde daha çok çekirdek genomundaki ve kloroplast genomundaki özel bölgeler kullanılır. Moleküler veriler önceden bilinen klasik taksomik yöntemlerle tam olarak aydınlatılmayan sistematik problemleri etkin bir şekilde çözmektedir. Bu amaçla kullanılan moleküler yöntemlerden birisi de nrDNA bölgesi üzerinde bulunan ITS bölgeleri'dir [21]. Bu bölge sistematik çalışmalarda son yıllarda sıklıkla kullanılan bir bölge haline gelmiştir [22,23]. Bu tür çalışmalarda, taksonların nrDNA ITS bölgeleri çoğaltılıp baz polimorfizmine bakılarak taksonlar arasındaki filogenetik ilişkiler belirlenmektedir.

Moleküler sistematikte; DNA–DNA hibridizasyonu, Protein markırları ve PCR'ye dayalı yöntemler kullanılmaktadır. Son zamanlarda PCR'ye dayalı tekniklerin kullanımı sistematik çalışmalarda oldukça yaygınlaşmıştır. Bunlardan bazıları; RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphisms) ve Mikrosatellit DNA'dır. PCR yardımıyla genomik DNA üzerinde bulunan ETS (External Transcribed Spacer), IGS (Intergenic Spacer), ITS ve cpDNA üzerinde bulunan *matK*, *trnT-trnL* bölgelerinin çoğaltılıp daha sonra bu bölgelerin dizi analizlerinin yapılması da sistematik çalışmalarda sıkça kullanılan yöntemler arasındadır.

1.3.1 Moleküler Sistematikte Kullanılan Yöntemlerden Bazıları

1.3.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

RFLP, DNA işaretleyicileri (markırları/belirteçleri) arasında ilk keşfedilenidir [24]. RFLP'de genomik DNA, 4-6 nükleotid bölgeden tanıyan restriksiyon enzimleriyle kesilir, böylece farklı uzunluklarda DNA fragmentleri oluşur [25]. Bu oluşan DNA fragmentleri elektroforezde büyüklüklerine göre ayrılır. Kesim bölgelerinde tek bir nükleotidin bile sebep olduğu mutasyonlardan restriksiyon fragmentlerinin uzunluğundaki varyasyon saptanır [26]. Southern Blot tekniği ile uygun bir membrana aktarılan DNA'lar, biyotinyasyonla işaretlenmiş problarla hibritleştirilir. Hibritler otoradyografi tekniğiyle gözlenir. Böylece bitkilerin tür ve çeşidine özgü restriksiyon bantları belirlenir. Karşılaştırmada eğer DNA'ların uzunluklarında bir farklılık varsa polimorfizm elde edilmiş olur. Tekniğin en kritik aşaması uygun problemlerin seçimidir. Prob olarak, genellikle 200-2000 bp uzunluğunda DNA parçaları kullanılmaktadır. Probun en önemli özelliği genomda az sayıda kopyasının bulunmasıdır [27].

Yapılan araştırmalar; RFLP'nin filocografya, hibrit bölgeler, ve angiospermiler ile ilgili çalışmalarda güvenle kullanılabileceğini göstermiştir [28,29].

RFLP tekniği güvenilir bir tekniktir. Ayrıca önceden haritalanmış bir RFLP belirteci daha sonradan da akraba türleri belirlemede kullanılabilir. RFLP belirteçleri, heterozigot bireylerin de belirlenmesinde de kullanılabilir [30].

Teknikte radyoizotop problemlerinin kullanılması ve tekniğin uzun zaman alması RFLP analizlerinin en önemli dezavantajlarıdır. Diğer bir dezavantajı ise teknik için büyük miktarlarda saf DNA'ya gereksinim duyulmasıdır. Laboratuvar ve materyal masraflarının fazla olması RFLP nin kullanımını sınırlandırmaktadır [27]. Ayrıca bu belirteçlere dayalı haritalarda yaygın olarak büyük boşluklar görülebilir [31].

1.3.1.2 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA

RAPD tekniği, 9-10 baz çifti uzunluğundaki rastgele oligonükleotitlerin (primerlerin), DNA'nın iki iplikçiği üzerinde, birbirine zıt iki farklı noktada tamamlayıcılarını bulması ve bu ara bölgenin çoğaltılması prensibine dayanmaktadır [32]. Diğer PCR yöntemlerinden farklı olarak iki primer değil tek primer kullanılır [32]. Primer, kalıp DNA üzerinde komplementeri olan, birbirine yakın iki bölgeye bağlanarak arada kalan DNA bölgesini çoğaltır. Çoğaltılan DNA dizileri elektroforez ile agaroz veya poliakrilamid jel üzerinde ayrılıp etidyum bromür ya da gümüş boyama ile boyanır [33,34]. Primer bağlanma noktalarındaki amplifikasyon bantlarının varlığı ya da yokluğuna bakılarak polimorfizm tespit edilir [35]. Primerdeki tek bir nükleotidin yer değişimi RAPD'de tamamen farklı bir sonuca yol açabilir. Bu da sistemin duyarlılığının göstergesidir. Bu teknikte başarılı sonuçlar almak için uygun primerin seçimi oldukça önemlidir.

RAPD yönteminin en önemli dezavantajı, belirteçlerinin dominant olması nedeniyle heterozigotları teşhis etmenin g olmasıdır [36,37].

RAPD markırları; genom haritalama, gen etiketleme, genetik parmakizi belirleme, klon tanımlama ve filogenetik çalışmalarda kullanılabilirler [38].

1.3.1.3 AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) oğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi

Zabeau ve Vos tarafından 1993'te geliştirilen bir tekniktir. [39]. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) tekniği RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek için geliştirilmiştir [27]. Restirüksiyon enzimleri ile kesilen DNA parçalarının selektif amplifikasyonuna dayanmaktadır. AFLP; PCR ile RFLP tekniğinin birleşimidir. Primerler diziye zđü veya rastgele olabilir [24].

AFLP'nin avantajları; polimorfizm fazladır, RFLP'ye göre daha hızlıdır, minimum primer testi kullanılarak çok sayıda markır oluşturulur, parmak izi analizleri için oldukça uygundur. Tekniğin dezavantajları ise; saf ve yüksek moleküler ağırlıkta DNA'ya ihtiyaç duyulması ve ekonomik olmamasıdır.

1.3.1.4 Minisatellitler (SSR) Mikrosatellitler (VNTR)

Mikrosatellitler, kısa tekrarlı diziler olup tüm ökaryot genomlarında bulunur ve genellikle 1-6 b'nden oluşur. Mendel kurallarına uymaları mikrosatellitlerin aranılan moleküler markırlar olmalarını sağlamıştır [40].

Mini-satellitler genellikle 9-100 baz çiftinden oluşur [41]. VNTR'ler adli tıpta suçluların teşhis edilmesinde kullanılmaktadır.

1.3.1.5 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) Basit İ Dizi Tekrarları

ISSR tekniği 5' ve 3' sonda güçlendirilen kısa, tekrarlanan DNA zincirlerinin primer olarak kullanılarak, PCR rnlerinin jel elektroforezinde büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra jel üzerinde DNA'ların tespitini içerir. Primer olarak, 2-4 nükleotit tekrarlı, basit DNA tekrar dizileri kullanılır.

RAPD ile maliyeti yaklaşık aynı olan ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) [42,43] tekniği RAPD'den daha güvenli, tekrarlanabilirlik oranı yüksek bir tekniktir. Bu teknik genetik çeşitlilik, sınıflandırma, moleküler markır bulma ve evrimsel çalışmalarda kullanılmaktadır [44]. Primerlerin bağlanma sıcaklıklarının farklı olması ve benzer büyüklükteki bantların aynı olmaması tekniğin kullanımını güçleştirmektedir [32].

1.3.1.6 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions)

Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Polimorfik Diziler

Bir polimorfik RFLP veya RAPD ürünü kopyalanır. Ardından dizi analizi yapılır. Bu özel fragmentlere uygun 2-24 nukleotitlik PCR primeri sentezlenir. Primerler PCR ile çoğaltılır. Çoğaltılmış primerler bir kesim enzimleri ile kesilir. Sonuç olarak DNA'daki büyüklük değişimi tespit edilir [45]. RAPD ve ISSR gibi belirteç spesifitesi düşük olan belirteçlerin gücü, bu yöntemle artırılır. PCR metodu olduğundan, yüksek kalitede ve miktarda DNA'ya ihtiyaç yoktur. Tekrarlanabilme kapasitesi oldukça yüksektir.

1.3.1.7 CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence) Kesilip

Çoğaltılmış Polimorfik Diziler

PCR ürünleri restriksiyon enzimleriyle kesilerek, kesilen ürünlerin elektroforezi yapılır. Daha sonra bu fragmentlerin tespiti yapılır. CAPS primerleri cDNA veya genomik DNA klonlarından, klonlanan ve DNA zincirleri tespit edilmiş RAPD bantlarından veya ISSR bantlarından elde edilmektedir. Bu yöntem için çok az miktarda kalıp DNA gerekir, fakat primer seçimi için DNA bilgisi gerektirmektedir.

RAPD, ISSR ve AFLP gibi spesifitesi düşük belirteçlerin spesifitesini arttırmak için kullanılmaktadır.

1.3.1.8 ESTs (Expressed Sequence Tags) İşaretli İfade Edilen Diziler

EST belirteçler mRNA'ların tamamı ya da bir kısmına karşılık gelen cDNA klonlarının dizi analizi sonucu oluşturulmuş DNA belirteçleridir. Etkinliği çok yüksek bir tekniktir.

EST'ler genomik sekansı açıklamak için bir dayanak teşkil eder ve spesifik dokulardaki yada büyüme koşullarıyla ilişkili gen ifadesini analiz etmeyi sağlarlar. İnsanda gen ifadesinin tanımlanması kodlanmayan intronların varlığından dolayı zordur.

1.3.1.9 ASAP (Allele Specific Associated Primers) Allele Özgü Birleşen Primerler

Bu metod belli bir bağlanma sıcaklığında tek bir DNA parçası oluşturan allel-spesifik bağlantılı primerlerin kullanılmasıyla alkali DNA ekstraksiyonunu takiben mikrotiter tabakalar içerisinde DNA'nın çoğaltılmasına dayanmaktadır [29]. DNA parçası yalnızca uygun allel bulunan bireylerde oluşmaktadır. Bu yöntem DNA ekstraksiyonu kısaltmak ve geniş çaplı araştırmalarda PCR reaksiyonunun güvenilirliğini arttırmak amacıyla geliştirilmiştir.

1.3.1.10 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Tek Nükleotit Polimorfizmi

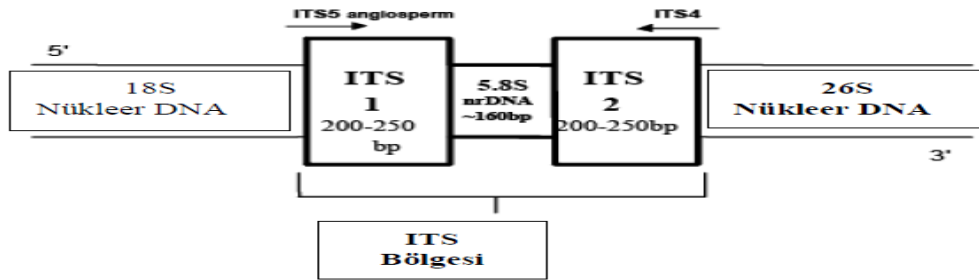
SNP'ler transisyonlar (bir pürin bazının bir pürin bazına değişmesi ya da bir pirimidin bazının bir pirimidin bazına dönüşmesi) ve transversiyonlar (bir pürin bazının bir pirimidin bazına dönüşmesi veya tersi) gibi baz değişimlerini içerir. Bir popülasyondaki tek baz değişiminin frekansı %1'den büyükse SNP, %1'den küçük ise mutasyon olarak nitelendirilmektedir. SNP'ler hastalığa katkısı bulunan genlerin bulunması için kullanışlıdır.

1.3.2 ITS (Internal Transcribed Spacer) ve rDNA

1.3.2.1 ITS Bölgesi ve Genel Özellikleri

İki kopya bölgesi (ITS1 ve ITS2), yakın akraba olan taksonların karşılaştırılmasında oldukça kullanışlıdır. Bu nedenle 1990'lı yıllardan itibaren bu bölge angiospermilerin sistematğinde kullanılmaya başlanmıştır.

ITS1 ve ITS2'de bölgelerinin varyasyon dereceleri bitki gruplarına göre farklılık göstermektedir. Araştırmalarda ITS dizinlerinin, cpDNA baz dizinlerinden çok daha fazla değişkenlik gösterdiği ve daha bilgilendirici olduğu sonucuna varılmıştır [46]. ITS bölgesi ribozomal DNA'nın intergenik boşluk ve dış transkibe olan boşluk bölgelerine göre nispeten daha fazla korunmuştur [47,48].



Şekil 3 ITS bölgesi ve Kullanılan Primerlerin Pozisyonları [49].

Filogenetik çalışmalarda ITS bölgesinin kullanılmasının nedenleri şunlardır;

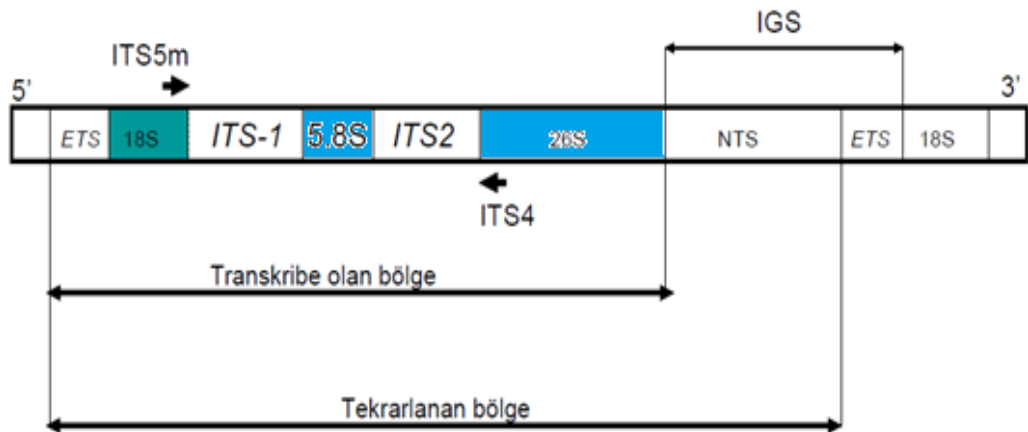
- Filogenetik çalışmalarda sağlıklı bilgiler verebilecek uzunluktadır. (600–700bp).
- Yüksek kopya sayısına sahiptirler.
- Cins ve tür içi seviyelerde ileri derecede korunmuş olan rDNA gen bölgelerine komşu pozisyonda bulunmaktadırlar.
- Cins ve tür seviyesinde açıklayıcı bilgiler sunmaktadır.
- rDNA gen bölgelerine göre daha hızlı varyasyon gösterirler.
- ITS1 ve ITS2 bölgelerine dayalı analizlerde ITS1 verileri, ITS2'ye göre daha güvenilir sonuçlar vermektedir.
- rDNA'nın olgun 18S, 5.8S ve 28S alt birimlerinin oluşumu sürecinde görevlidir.

- ITS bölgeleri genellikle ökaryot canlılarda 5.8S gen bölgesi, ile birlikte değerlendirilmektedir.
- ITS bölgesinin amplifikasyonu ve dizilenmesi için evrensel primerler kullanılabilir. Primerler mantar (*Sacharomyces*), böcek (*Drosophila*), ve bitki (*Oryza sativa* ve *Hordeum vulgare*) dizilerinden köken almıştır [47].

1.3.2.2 rDNA ve ITS Bölgeleri Arasındaki İlişki

Genomik DNA üzerindeki rDNA bölgeleri, çoklu genlerden oluşur ve ardışık sıralanmış tekrarlı diziler şeklindedir. rDNA tekrarları; genomik DNA'nın NOR (Nükleolar Organizer Region) bölgelerinde yerleşmiştir. 18S küçük alt birim, 5.8S ve 28S büyük alt birim rDNA'ları kodlayan genlerden meydana gelmiştir. ITS bölgeleri, rDNA tekrarları içinde yerleşmiştir. ITS bölgeleri, rDNA'nın alt birimleri ile transkribe edilir ve korunmuş bölgeleri (18S, 5.8S ve 28S) birbirinden ayıran iki kısımdan (ITS1 ve ITS2) oluşur [13]. ITS bölgeleri, evrensel primerler kullanılarak PCR çalışmalarıyla kolayca elde edilebilir.

ITS bölgesi türlerin teşhis edilmesinde morfolojik verilere oranla büyük kolaylık sağlamaktadır ve filogenetik çalışmalarda çok tercih edilmektedir [50,51].



Şekil 4 Çekirdek Ribozomal DNA'sının Tekrarlı Üniteleri [53].

rDNA genleri, kopya edilmeyen bölgeler (IGS) ve ITS bölgeleri ile birbirinden ayrılmıştır. IGS bölgeleri (ETS ve NTS), komşu rDNA tekrar birimleri arasında bulunur. ETS, ribozomal mRNA ile kodlanan dış kopya bölgesidir. NTS (Non Transcribed Spacer) ise, tekrar birimleri arasında yerleşmiş kodlanmayan bölgelerdir [47]. ITS1, 18S (SSU) ile 5.8S arasında yerleşmiştir. ITS2 bölgesi ise, 5.8S ile 28S (LSU) genlerini ayıran bölgedir. Bu gen yapılarını içeren rDNA tekrarlarının ökaryotik organizmalardaki kopya sayısı, 200–30.000 arasında değişmektedir.

1.3.2.3 rDNA Bölgeleri

1.3.2.3.1 Küçük Alt Birim rDNA (18S)

Küçük alt birim rDNA'sı yüksek derecede korunmuş bir bölgedir. Alem, şube ve sınıf seviyesindeki filogenetik çalışmaların yeniden inşası için sıklıkla kullanılmaktadır [53].

Küçük alt birim rDNA baz sıraları, fungal soyların sistematüğinde, Angiospermlerin sistematüğinde ve hayvanların sistematüğünde farklı taksonomik seviyelerde filogeninin yeniden inşasında kullanılmaktadır [54].

1.3.2.3.2 5.8S rDNA

5.8S rDNA tekrar birimleri içinde en küçük uzunluğa sahip olanıdır. Nükleotit içeriği ileri derecede korunmuş olan 5.8S rDNA büyük alt birimin bir parçasıdır. Bu bölgenin baz uzunluğu (163–164 bp) yeterince uzun olmadığından filogenetik çalışmalarda tek başına kullanılmamaktadır. Bu nedenle filogenetik analizlerde, ITS bölgeleriyle birlikte değerlendirilmektedir [54].

1.3.2.3.3 Büyük Alt Birim rDNA (28S)

Büyük alt birim rDNA, küçük alt birim rDNA'ya göre daha uzundur ve baz içeriği açısından daha fazla varyasyon göstermektedir.

rDNA genlerinin gösterdiği varyasyonlar akraba türlerin teşhisinde yeterli bilgi sunmamaktadır. Bu nedenle rDNA genlerinin gösterdiği varyasyonlardan, aile ve daha yukarı seviyelerde faydalanılmaktadır [53].

rDNA tekrarlarının ITS ve IGS bölgeleri, yüksek oranda varyasyon gösterdiğinden cinsler arasında, tür seviyesinde ve populasyon çalışmalarında karşılaşılan taksonomik problemleri çözmeye kullanılmaktadır. Ancak IGS (4–5kb) bölgelerinin ITS bölgelerine göre daha uzun parçalara sahip olması ve dizi analizindeki zorluk nedeniyle, filogenetik çalışmalarda çoğunlukla ITS bölgeleri kullanılmaktadır [54].

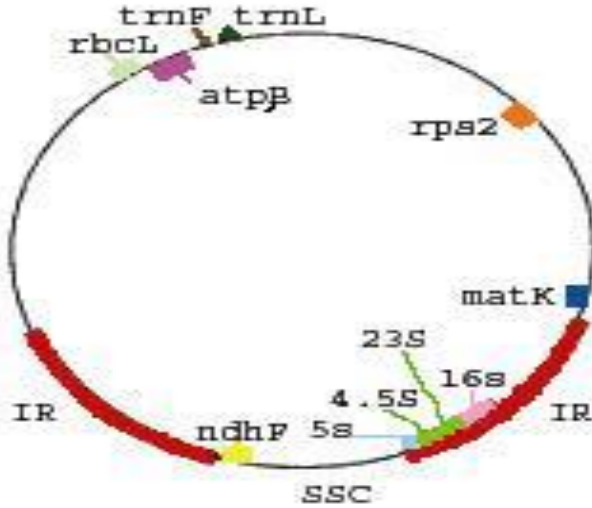
1.3.3 Moleküler Filogenide Kullanılan DNA Çesitleri

1.3.3.1 Kloroplast Genomu

Kloroplast bitkilerde fotosentezden sorumlu olan organeldir. Kloroplast genomu çift iplikli halkasal yapıdadır. Kloroplast DNA'sı yarı korunumludur ve kendine özgü protein sentezi yapılarına sahiptir. Kloroplast yapı olarak prokaryotik hücre yapısına benzemektedir.

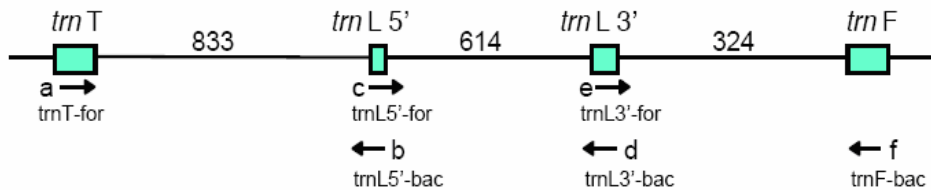
Kloroplast DNA' sını boyut olarak mitokondri DNA'sından daha büyüktür. Bu boyut farklılığı; kloroplastlarda mitokondrilere göre taşınan gen sayısının fazlalığı, genler arasında ve içinde oldukça uzun kodlama yapmayan nükleotit dizisini taşıması, DNA dizisindeki duplikasyonlu bölgeleri içermesi gibi özelliklerle açıklanabilir. Kloroplast genomu çok fazla kodlanmayan bölge içermediğinden nükleer genoma göre daha yavaş evrimleşir [55,56]. Birçok türde genom küçük ve büyük essiz dizi bölgeleri içerir ve bunlar bir çift ters tekrarla birbirinden ayrılmaktadır [57].

Kloroplast genomunda bulunan bölgeler de çekirdek genomunda olduğu gibi sistematik problemlerin çözümüne ışık tutmaktadır. *trnL-F* ve *ndhF* bölgeleri bu bölgelerden bazılarıdır. Kloroplast genomunda bulunan bölgelerden biri olan *ndhF* bölgesinin dizileri filogenetik problemlere familya düzeyinde çok daha başarılı çözümler üretmektedir [58].



Şekil 5 Kloroplast Genomu [59].

trnL-F ve *ndhF* bölgeleri özel primerler vasıtasıyla PCR tekniği ile çoğaltılarak baz polimorfizimine bakılır. Daha sonra baz polimorfizimlerine göre taksonlar arası filogenetik ilişkilere karar verilir [60,61].



Şekil 6 *trnL-F* Bölgesi [58]

Mitokondriyal DNA (mtDNA) mitokondri içerisinde bulunan, halkasal DNA molekülüdür [62]. Canlılarda Mitokondriyal DNA çoğunlukla maternal kalıtmalıdır.

İnsanda mtDNA anne tarafından kalıtılır. Spermin mtDNA'nın kalıtımıyla bir ilgisi bulunmamıştır [63]. Mitokondrilerin sayısı hücrenin enerji ihtiyacına göre farklılık göstermektedir. mtDNA'ların boyutunun küçük olması ve yüksek oranda korunmuş yapısının olması gibi özellikleri nedeniyle populasyonlar, türler ve daha üst taksonomik seviyelerin evrimsel ilişkilerini belirlemede oldukça sık tercih edilirler [64].

1.3.3.3 Çekirdek DNA'sı

Çekirdek genomunun büyüklüğü organizmalar arasında çeşitlilik gösterir. Bu durum, çekirdek genomunun filogenetik anlamda bilgi verebileceğini gösterir. Kromozom sayısı ve karyotipteki varyasyonlar bitkilerin gelişiminin incelenmesi açısından oldukça önemli verilerdir [65].

1.3.4 DNA Dizileme

DNA dizileme DNA'nın birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz dizisinin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. DNA dizileme sıklıkla gen mutasyonlarının tespiti ya da rekombinant DNA oluşum yapılarının tayininde, gen regülasyonunda yer alan genetik kontrol bölgelerini belirlemede, konsensus dizileri, epistatik genler ve bu genlerin etkilerini belirlemede, preimplantasyon tanısında ve kalıtsal hastalık tayininde yaygın olarak kullanılır.

Nükleotit dizilerinin belirlenmesinde iki temel teknik ucuz olduğu için yaygın olarak kullanılmaktadır:

- Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi [66].
- Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi [67].

Her iki teknik de üç aşamada gerçekleşmektedir. Bu aşamalar; DNA'nın hazırlanması, reaksiyonlar ve yüksek voltajlı jel elektroforezidir. Bu iki tekniklerin

dışında; pyrosequencing, nanopore sequencing gibi hızlı fakat pahalı yöntemler de günümüzde kullanılmaktadır.

1.3.4.1 Maxam ve Gilbert'in Kimyasal Kırılma Yöntemi

Kimyasal kırılma yöntemin temel prensibi hidrazin, dimetilsülfat ya da formik asit'in, DNA'da bulunan bazları özgül olarak değiştirmesine ve daha sonra eklenen piperidinin değişikliğe uğramış nükleotitlerin bulunduğu noktalardan zinciri kırmasına dayanmaktadır.

Kimyasal kırılma yönteminde özgül bazlar ile DNA zincirlerin kırılmasında kullanılan kimyasallar aşağıda verilmiştir [68].

Tablo 1 Kimyasal Kırılma Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

Özgül Baz	Baza özgül kimyasal	Baz ayırmada kullanılan kimyasal	Zincir kırmada kullanılan kimyasal
G	Dimetil sülfat	Piperidin	Piperidin
A + G	Asit	Asit	Piperidin
C + T	Hidrazin	Piperidin	Piperidin
C	Hidrazin + Baz	Piperidin	Piperidin
A > C	Baz	Piperidin	Piperidin

Nükleotit dizisi saptanacak olan DNA önce 5' ucundan ³²P ile ya da floresan bir boya ile işaretlenir. DNA'nın iki iplikçigi birbirinden ayrılarak ya da DNA uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilerek DNA'nın yalnızca bir ucundan işaretlenmesi sağlanır. Daha sonra DNA molekülleri dört tüpe ayrılarak A, C, G ya da T nükleotitlerini değiştirmek ve kırmak için gerekli tepkimeler gerçekleştirilir. Bu sayede tüplerde farklı pozisyonlardaki hedef nükleotitlerden kırılmış DNA parçaları elde edilir. Sonuçta kırılmanın olduğu pozisyona göre hepsi 5' pozisyonlarından

işaretli ancak boyları birbirinden farklı bir dizi DNA fragmenti elde edilmiş olur. Elde edilen boyları gittikçe kısalan DNA fragmentleri, jel elektroforezinde birbirlerinden büyüklüklerine göre ayrılır. Otoradyografi uygulanarak bantlar görüntülenir.

Pürinlerin kırılmasında dimetilsülfat kullanılır. Dimetil sülfat ile metillenen DNA'ya bazik ortamda piperidin uygulanırsa DNA guanin bazından kırılır. Bazik ortam yerine asidik ortam tercih edilirse bu sefer de DNA guanin yerine adenin bazından kırılır [69].

Pirimidin bazlarının kırılmasında ise hidrazin kullanılır. Hidrazin, DNA'yı hem sitozin hem de timin bazından kırar. Bu iki reaksiyonu ayırmak için ise yüksek tuz derişimi (2M NaCl) ve bazik ortam kullanılır. Yüksek tuz derişimi ile bazik ortamda DNA sitozin bazından kırılır.

1.3.4.2 Sanger DNA Dizileme Yöntemi

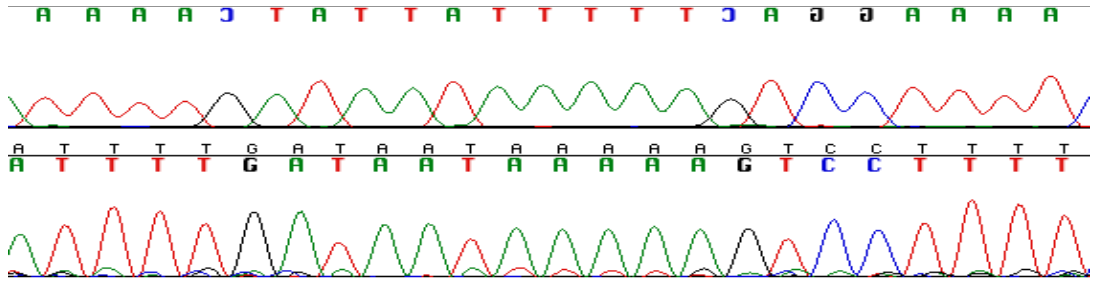
Sanger yöntemi enzimatik DNA sentezine dayanır. Tehlikeli kimyasallardan uzak ve daha hızlı bir yöntem olduğundan Maxam-Gilbert yöntemine tercih edilir. Bu yöntem için: Tek zincirli kalıp DNA'ya, dNTP'lere, ddNTP'ye, DNA polimeraza ve serbest OH grubu içeren primere ihtiyaç vardır. Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP'lerin (deoksiribonükleozittrifosfat) yanısıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de (dideoksiribonükleozittrifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanır. Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılmasıyla, ddNTP'nin 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur. Dizileme reaksiyonları için dört ayrı tüpte reaksiyon karışımı hazırlanır.

Reaksiyonlar sonucu elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde yan yana yürütülür. Uygulanan elektriksel alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısası en önde olmak üzere jel üzerinde bir merdiven görüntüsü oluşturur. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon

karışımına konulan ddNTP' nin tipine göre okunur. Otoradyogramdaki bu bant verilerinden yararlanılarak 5'-3'yönüne doğru olan baz dizilimi saptanmış olur [69].

1.3.4.3 Otomatik DNA Dizileme Yöntemi

Otomatik dizileme yönteminde de Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemden tek farkı radyoaktif izotop yerine floresan boyaların kullanılmasıdır. Yöntemde dört farklı renkte boya kullanılır. Sonuçta, dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkte piklerin oluştuğu Şekil 7'teki gibi bir görüntü (kromatogram) ortaya çıkar. Timin bazı kırmızı renkle Guanin bazı siyah renkle, Adenin bazı yeşil renkle ve Sitozin bazı mavi renkle gösterilir.



Şekil 7 DNA Dizileme Sonucu Oluşan Piklerin Görüntüsü

Otomatik DNA dizileme cihazları, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sisteminden meydana gelmektedir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık meydana getirilir. DNA'nın bulunduğu jel matrisi bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez boyunca DNA'ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılmaktadır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar yazılımlarıyla değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır.

Otomatik dizileme yöntemleri manual yöntemlere göre daha güvenilir sonuçlar verir. Ayrıca zamandan da tasarruf sağlamaktadır. [68].

1.3.5 Çoklu Dizi Hizalama ve Clustal W Programı

Çoklu dizi hizalama, ikili dizi hizalamadan daha fazla bilgi verir. Çoklu dizi hizalamada en çok kullanılan yöntem aşamalı hizalama yöntemidir. Bu yöntemi kullanan yazılımların en yaygını CLUSTAL W'dir [70]. Bu metotta dizilerin ikili benzerlikleri kullanılarak tahmini bir filogenetik ağaç oluşturulur. Daha sonra bu bilgilerin ışığında, aşamalı olarak diziler hizalanır. Bu yöntemin en önemli dezavantajları, yerel minimuma takılması ve problemi doğru şekilde açıklayacak parametrelerin belirlenmesinin zor olmasıdır. Çoklu dizi hizalama problemlerini çözmek için kullanılan diğer bir ana yaklaşımsa genetik algoritmalarıdır. En çok bilinen örneklerden biri SAGA (Sequence Alignment by Genetic Algorithm)'dır [71]. SAGA ClustalW'ya yakın hizalamalar bulmuştur ama daha başarılı sonuçlar da vermemiştir.

1.3.6 Filogenetik Analiz ve Filogenetik Ağaç

Filogeni kısaca; evrimsel akrabalık ilişkisi olarak tanımlanabilir. Filogenetik analiz ise; mevcut olan karakterlerin değişik kriterler kullanılarak değerlendirilmesi sonucu taksonlar arasındaki akrabalık ilişkilerinin ortaya çıkarılmasıyla soy ağaçlarının oluşturulmasıdır [72]. Filogenetik ağaç bir grubun evrimsel tarihinin grafiksel özetidir.

Filogenetik ağaç;

- Dallanma olaylarının modelini, bazı durumlarda zamanını ve zaman aralığını tanımlar,
- Türleşme sırasını kaydeder,
- Hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını gösterir.

Filogenetik bir ağaçta; Dallar; türlerin atasal popülasyonlarının zaman içerisindeki durumlarını gösterir. Düğümler; bir popülasyonun (taksonun) iki veya daha fazla türev popülasyona ayrıldığı noktalara denir [54]. Dal uçları ise; soyu tükenmiş veya bugün yaşayan türleri ifade eder. Filogenetik ağaçlar köklü veya köksüz olabilir. Köklü Ağaçlar; inceleme altındaki soy hattını nereden köklendiğini tanımladığı için ayrılma olaylarının açığa çıkma sırasını da ortaya koyarlar. [54]. Köksüz ağaçlar ise; köklü ağaçların tersine, türler arasındaki ilişkiyi ortaya koyar. Fakat, hangi düğüm ya da dalların tarihte önce veya sonra açığa çıktığına işaret etmez [73]. Ağaçlardaki dal uzunluğu genellikle dalda oluşmuş değişikliklerin (basamakların) sayısını belirler [74].

1.3.6.1 Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler

Günümüzde kullanılmakta olan yöntemler temel olarak iki ana başlık altında incelenir:

Karakter temelli yöntemler;

- Maximum parsimony
- Maximum likelihood
- Mr. Bayes

Mesafe temelli yöntemler;

- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)
- Neighbour joining
- Minimum evrim metodu
- En az kareler metodu

1.3.6.1.1 Karakter Temelli Yöntemler

Üzerinde çalışılan taksonlar arasındaki değişken, kalıtsal ve biri diğerinden bağımsız her bir özellik ya da karakter hangi taksonun hangisiyle yakın akraba olduğu konusunda bize yardım eder.

Bu karakterler;

- DNA dizisi,
- Belli iskelet elementleri,
- Çiçek kısımlarının varlığı yada yokluğu,
- Embriyonik veya larval gelişmenin şekli gibi özellikler olabilir.

1.3.6.1.1.1 MP (Maximum Parsimony) Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi

Parsimoni metodu, olası birçok filogenetik ağaçlar arasından hangi dallanma modelinin evrimsel tarihi en doğru biçimde yansıttığını tanımlamada bir yol göstericidir.

Parsimoniye göre olması en muhtemel ağaç, açığa çıkmış olan evrimsel değişimin toplam miktarını en aza indirgeyen ağaçtır [73]. Yani en az farklı olan birimler, birbirine çok yakın ve en çok benzeyen birimlerdir. Bu nedenle; Parsimoni (MP), Minimum Evrimsel Metod (parsimoni = tutumluluk) olarak tanımlanabilir.

Maksimum parsimoni yönteminin dezavantajları:

- Yüksek seviye homoplasilerde yanılabılırler.
- İncelenen diziler ya da genetik uzaklıklar ile uyumlu bir ağaç elde etmek için gerekli en az mutasyonların saptanmasına dayanan bir yöntemdir.
- MP analizi ile en iyi sonuçlar dizi çiftleri arasındaki benzerliklerin çok güçlü olduğu ve az sayıda dizinin olduğu durumlarda alınır.

1.3.6.1.1.2 ML (Maximum Likelihood) En Yüksek İhtimal Metodu

En yüksek ihtimal metodunda, tüm ağaç topolojileri değerlendirilir. Neticede, yarışan ağaç topolojilerinden en yüksek gerçekleşme olasılığı olan ağaç seçilir.

Maximum likelihood yönteminin avantajları :

- Mevcut metodların içinde genelde en tutarlı olanıdır.
- Karakter ve oran analizlerinde kullanılabilirler.
- Sönmüş (hipotetik) ataların sekanslarını tahmin etmede kullanılabilir.
- Nükleotid, aminoasit sekansları ve diğer data tiplerine uygulanabilir.

Bütün bu avantajlarının yanında Maximum Likelihood metodu, basit ve sezgisel olmayışı, parsimonide olduğu gibi yüksek seviye homoplasilerde yanılabilmesi ve parsimoni metoduna göre daha yavaş olması gibi dezavantajlara sahiptir [73].

1.3.6.1.1.3 Bayes Metodu

Bayes metodu, temelde maximum likelihood metoduna benzemektedir, ancak sonraki (posterior) olasılık kullanımı nedeniyle bu yöntemden ayrılır. Mevcut gözlemlere dayanarak gözlenmeyen bir durum hakkında sonuç çıkarma prensibine dayanır. Bu metodta baz alınan “önceki olasılık” kavramı analiz öncesinde tüm olası ağaç topolojileri için geçerli olan olasılığı ifade eder. Bu metod günümüzde çok yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.3.6.1.2 Mesafe Temelli Yöntemler

Mesafe temelli yöntemler; dizi hizlanması sonucu elde edilen evrimsel mesafelerle bir veri matrisi oluşturularak daha sonra matristeki mesafe skorlarına göre tüm taksonlar için bir filogenetik ağaç oluşturma esasına dayanmaktadır [75]. Ağacın dalları boyunca ortaya çıkan değişiklik sayısı diziler arasındaki uzaklığı

gösterir [73]. Tercih edilen ağaçlar, taksonlar arasındaki mesafeyi en aza indirgeyen ağaçlardır [74].

Bu yöntemde kullanılan algoritmalar, kümelenebilir temelli veya en iyi durum (optimum durum) temelli algoritmalar olarak iki'ye ayrılırlar. Mesafe temelli yöntemlerden bazıları; UPGMA ve Neighbour joining yöntemleridir.

1.3.6.1.2.1 UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu

Bir takson için uzaklık matrisi gözden geçirilirken, en küçük uzaklık matrisi baz alınır. Hızlı bir yöntemdir ve geniş data setlerini çabukca analiz edebilir fakat karakter analizinde kullanılamazlar. Bir atanın iki yavrusunun aynı miktarda değişime uğradığını (dalların eşit uzunlukta olduğunu) savunması gerçekçi değildir.

1.3.6.1.2.2 Neighbour Joining Komşu Birleştirme Metodu

Bu metod içerik olarak “cluster” analizle alakalıdır. Ancak, dallar boyunca moleküler değişikliklerin eşit olmayan oranları için metod izin verir. Analizin her adımında uzaklık matrisi, düğümlerin her çifti arasında ayarlanan dal uzunluklarının net etkisine sahiptir. Bunun anlamı; tüm diğer düğümlerden farklıdır. Bu yöntemde bir tane ağaç oluşturulur ve geniş veri kümelerinin analizi yapılabilir. Fakat tüm olası ağaç topolojileri değerlendirilemez.

1.3.7 Filogenetik Ağaçların Oluşturulmasında Kullanılan Programlar

Filogenetik alanında çalışan akademisyenler ve bu alanda program geliştirenler genellikle MAC (Apple Macintosh) bilgisayarlar kullanmaktadırlar. Her

ne kadar programların PC versiyonları mevcut ise de MAC versiyonları daha ileri düzeyde sürümdürler.

Filogenetik ağaçların eldesinde yaygın olarak kullanılan programlar PAUP, PHYLIP, MRBAYES'dır [77].

Ancak bu programların önerdikleri ağaçların bilgisayarda görüntülenmesini sağlayan başka programlar da vardır. Bunlardan yaygın olarak kullanılanlardan birisi Treeview programıdır [76].

PAUP programı parsimony ve maximum likelihood metotları dahil pek çok metodu kullanarak populasyon verilerini detaylı araştıran ücretli bir programdır [78-79].

MRBAYES programı ise Bayes metodunun prensibi ile çalışan bir programdır. Programda amaç tek bir "doğru" filogeniyi bulmayı değil, bütün muhtemel filogenilerin sonraki (posterior) olasılık dağılımlarını hesaplamaktır [80].

PHYLIP programı da soy ağaçları oluşturulan ve internetten ücretsiz olarak indirilip kullanılabilen bir programdır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Bitki Materyallerinin Toplanması

Çalışmada kullanılan bitki materyalleri Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç.Dr. Bekir DOĞAN tarafından taksonların yayılış alanlarından toplanmıştır. Taze bitki materyalleri araziden toplandıktan sonra kurutularak silika jel içerisinde saklanmıştır.

Tablo 2 Çalışılan Taksonlar ve Toplandığı Lokaliteler

Herbaryum numarası	Türü	Toplandığı Lokalite	Toplandığı Yükseklik	Toplayan	Toplandığı Tarih
BD 2223	<i>Serratula cerinthifolia</i>	Kahramanmaraş: Ahir Dağı, yamaçlar	990 m	Bekir Doğan	15.06.2010
BD 2243	<i>Serratula coriacea</i>	Kars: Kağızman-Tuzluca arası, Kağızman'a 38 km kala, yamaçlar	1055 m	Bekir Doğan	16.07.2010
BD 2282	<i>Serratula erucifolia</i>	Erzurum: Köprüköy, Eğirmez köyü, markar mevki, tarla kenarı	1635 m	Bekir Doğan A.Duran, E.Martin.	06.08.2010
BD 2259	<i>Serratula grandifolia</i>	Antalya: Akseki, Süleymanlı Köyü civarı, meşe açıklığı	1425 m	Bekir Doğan A.Duran, E.Martin.	06.08.2010
BD 2268	<i>Serratula kotschy</i>	Bitlis: Tatvan, Sapur köyü, dere yatağı yamaçları	1965 m	Bekir Doğan A.Duran, E.Martin.	04.08.2010
BD 2217	<i>Serratula kurdica</i>	Osmaniye: Yarpuz, Yarpuz-Avıak mevki arası, meşe açıklığı	1465 m	Bekir Doğan A.Duran, E.Martin.	15.06.2010
BD 2262	<i>Serratula lasiocephala</i>	Antalya: Gazipaşa, Çayır yakası yaylası	1730 m	Bekir Doğan A.Duran, E.Martin.	24.07.2010,

Tablo 2'nin Devamı

BD 2227	<i>Serratula oligocephala</i>	Malatya: Darende, Darende-Akçadağ arası, Akçadağ'a 18 km kala, kalker kayalık yamaçlar	1512 m	Bekir Doğan A.Duran, E.Martin.	17.06.2010
BD 2285	<i>Serratula quinquefolia</i>	Artvin: Ardanuç-Kutul arası, meşe ve kızılğaç açıklıkları	1210 m	Bekir Doğan A.Duran, E.Martin.	07.08.2010,
BD 2283	<i>Serratula radiata</i> subsp. <i>radiata</i>	Kars: Arpaçay, Kardeşköy-Dağköy arası	2190 m	Bekir Doğan A.Duran, E.Martin.	06.08.2010
BD 2247	<i>Serratula radiata</i> subsp. <i>biebersteiniana</i>	Kars: Kağızman, Akçay-Cumaçay arası, yamaçlar	1830 m	Bekir Doğan A.Duran, E.Martin.	16.07.2010
BD 2238	<i>Serratula serratuloides</i>	Van: Gürpınar'a 15 km kala, yol kenarındaki yamaçlar	2125 m	Bekir Doğan A.Duran, E.Martin.	15.07.2010,
BD 2275	<i>Serratula hakkiarica</i>	Hakkari: Cilo dağları, Kırıkdağ, Dez deresi üstleri	2210 m	Bekir Doğan A.Duran, E.Martin.	05.08.2010,
BD 2234	<i>Serratula haussknechtii</i>	Muş: Malazgirt, Karıncalı köyü, tarla kenarları	1840 m,	Bekir Doğan A.Duran, E.Martin.	14.07.2010
BD 2230	<i>Serratula bornmuelleri</i>	Malatya: Darende, Akçatoprak yol ayrımı civarı, kurumuş dere yatağı kenarları	1010 m,	Bekir Doğan A.Duran, E.Martin.	17.06.2010,
BD 2290	<i>Serratula tinctoria</i>	Bolu: Bolu-Gerede arası, Bolu'ya 28 km. kala, yol kenarındaki çayırhıklar	1105 m	Bekir Doğan A.Duran, E.Martin.	09.08.2010,
BD 1029	<i>J. cataonica</i>	Erzincan: Eski çayırly yolu, 10 km, yol kenarındaki yamaçlar,	1105 m	Bekir Doğan A.Duran, E.Martin.	07.08.2005

Tablo 2'nin Devamı

	<i>Acroptilon repens</i>	Kars: Kağızman, Akçay yamaçlar	1200 m	Bekir Doğan	
	<i>Rhaponticum serratuloides</i>	Ankara: İbrala vadisi, Akköprü kuzeyi,	1100 m	Bekir Doğan	
	<i>Rhaponticoides iconiensis</i>	Siirt: Herakol	1725 m	Bekir Doğan	

2.1.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan pipet uçları, mikropipetler, ependorf tüpleri, PCR tüpleri, çözeltiler, cam malzemeler ve ısıya dayanıklı diğer malzemeler çalışmaya başlamadan önce 121 °C de 20 dakika süreyle 1 atmosfer basınçta otoklavlanıp sterilize edilerek kontaminatlardan temizlendi.

2.1.3 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Merck ve Sigma Aldrich firmalarından satın alınmıştır. Ayrıca PCR reaksiyonlarında kullanılan enzim ve diğer solüsyonlar, AppliChem, Biolabs, Stratagene ve Fermentas firmalarından temin edilmiştir.

2.1.3.1 Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar

2.1.3.1.1 Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Metoduyla Yapılan DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan bitki materyallerinin bir kısmının genomik DNA'sı Dellaporta ve arkadaşları [119] tarafından geliştirilen ve modifiye edilen Fenol-

Kloroform-İzoamilalkol yöntemiyle izole edilmiştir. Fenol-Kloroform-İzoamilalkol yöntemi için kullanılan tüm kimyasallar Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3 Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

Solusyonlar	Kompozisyonu
Ekstraksiyon tamponu (1L)	33,6 gr. Üre 0,5 M EDTA (pH: 8) 1 M. Tris-HCl (pH:8) 5 M NaCl %10 SDS
Fenol/Kloroform/İzoamil alkol	25 : 24 : 1
NaAc	3 M pH : 5,2
İzopropil alkol	%100
TE	10mM
RNaz A	10 mg/mL
EtOH	% 70 ve % 100 lük

2.1.3.1.2 SIGMA Kiti ile Yapılan İzolasyonda Kullanılan Kimyasallar

Bitki materyallerinin yarısından fazlasının genomik DNA'sı SIGMA G2N70 Plant Genomic DNA Miniprep Kit ile izole edildi. Kitteki solusyonlar şunlardır: Lysis Solution Part A, Lysis Solution Part B, Precipitation Solution, Binding Solution, Column Preparation Solution, Wash Solution Concentrate, Elution Solution (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH yaklaşık 8.0)

Tablo 4 PCR'de (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Adı	Miktarı	Konsantrasyon
dH ₂ O	10.8 µL	-
Tampon	2.5 µL	10 X
DMSO	2.5 µL	-

Tablo 4'ün Devamı

ITS4/trnL-e	2.5 µL	pmol / ml
ITS5A/trnL-ff	2.5 µL	pmol / ml
MgCl ₂	1.5 µL	25 mM
dNTP	0.4 µL	10 mM
Taq DNA Polimeraz	0.3 µL	5 ünite
gDNA	2 µL	
Toplam	25 µL	

2.1.4 PCR' de Kullanılan Primerler ve Özellikleri

PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler Integrated DNA Technologies (IDT A.B.D.) firmasından temin edildi. Primerlerden stok hazırlamak için yaklaşık 15 sn 12.000 rpm'de satrifüj yapılarak kuru çökeltinin tüpün dibinde toplanması sağlandı. Daha sonra 1000 µL dH₂O ile çökelti çözülerek primer stoklarımız hazırlanmış oldu. Her bir primerin son konsantrasyonu 5 nmol/µL olacak şekilde sulandırıldı. Hazırlanan primerler -20°C saklanarak muhafaza edildi.

Tablo 5 ITS PCR' de Kullanılan Primerler

	Primer	Nükleotid Dizisi (5'- 3')	Tm Degeri
Reverse	ITS 4	CCTTATCATTAGAGGAAGGAG	52.1 °C
Forward	ITS 5A	TCCTCCGCTTATTGATATGC	49.9 °C

Tablo 6 *trnL*-F PCR' de Kullanılan Primerler

	Primer	Nükleotid Dizisi (5'- 3')	Tm Degeri
Reverse	trnL-e	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	54.4 °C
Forward	trnL-f	ATTTGAACTGGTGACACGAG	52.8 °C

2.1.5 Agaroz Jel Elektroferezinde Kullanılan Kimyasallar

Agaroz jel elektroferezinde 0.5X'lik TBE kullanılır. 0.5X'lik TBE hazırlamak için ise hazırlanan 5X TBE seyreltilir. 5 X TBE' nin hazırlanışı ise Tablo 6'daki gibidir.

Tablo 7 5X TBE Tamponu Hazırlama

Tris - Bas	54 g
Borik Asit	27.5 g
0.5 M EDTA	20ml
Saf su	1 L'ye tamamlanır

2.2 Yöntem

2.2.1 Bitkilerden Genomik DNA İzolasyonu

2.2.1.1 Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Protokolü

Yöntemin aşamaları şu şekilde gerçekleştirildi;

Silika jel içerisinde bulunan herbaryum örnekleri 100 mg alınarak sıvı azotla havanda ezilerek toz haline getirildi. Örnekler havandan ependorf tüplere aktararak üzerine 600 µL izolasyon tamponu eklendi ve vorteks yapıldı. Tüpe 500 µL fenol kloroform-izoamil alkol eklendi. 5 dakika alt-üst edildi. 5dk 12000 rpm'de santrifüj yapılarak proteinlerin dibine çöküp DNA'nın tüpün üst kısmında kalması sağlandı. Tüpteki süpernatant alınarak temiz bir tüpe aktarıldı. Süpernatant hacminin %10'u kadar (50 µL) 3M NaAc (ph 5.2) eklendi ve alt-üst edildi. Süpernatant hacmi kadar (500 µL civarında) izopropanol eklendi. Bu işlemden sonra DNA çıplak gözle görüldü. 2 dk 12000 rpm'de santrifüj yapılarak DNA çöktürüldü. Dipte DNA pelleti oluştu ve üstteki çözelti de mikro pipetle çekilerek atıldı. Oluşan pellete 500 µL TE (10mM, pH=8) eklendi. Pellete dokunmadan pipetaj yaparak pelletin çözülmesi sağlandı. 5 µL RNaz A (10mg/ml) pipetaj yapılarak eklendi ve RNaz A'nın homojen dağılması için tüp alt-üst edildi. 30 dk 37 °C' de inkübasyon yapılarak RNA'nın uzaklaştırılması sağlandı. 50 µl NaAc (3M) eklendi ve alt-üst edildi. 1 ml %90' lık

ETOH eklendi alt-üst edildi. -80 °C'de 10 dk bekletildi. 10 dk 13000 rpm' de santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Etanol boşaltıldı. Üstteki süpernatant çöpe atıldı, altta pellet kaldı. Kalan çökelti %70' lik ETOH ile pipetaj yapılarak yıkandı. 2 dk 12000 rpm'de santrifüj yapıldı. Oluşan çökeltiden etanol dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra 20-30 sn 12000 rpm' de santrifüj yapıldı. Ependorf tüpler kağıt üzerine yan yatırıldı ve etanol kalıntılarının uçması beklendi. Oluşan genomik DNA çökeltisi, 50 µL TE veya 200 µL saf su eklenerek pellet kayboluncaya kadar çözüldü ve DNA kullanıma hazır hale geldi.

2.2.1.2 SIGMA Kiti ile DNA İzolasyonu

Yöntemin aşamaları;

1. Bitki materyallerinden 100 mg alındı ve havanda sıvı azotla ezilerek toz haline getirildi.
2. 350 µL Lysis Solution (Part A) ve 50µL Lysis Solution (Part B) eklendi ve vortex yapıldı.
3. 4µL RNaz pipetaj yapılarak eklendi. 65 °C'de 10 dk su banyosunda bekletildi.
4. 130µl Precipitation Solution eklendi. 5dk buzda bekletildi.
5. 5dk maksimum hızda (16000g) santrifüj yapıldı. Sıvı kısım alınıp ve mavi filtrelili tüpe aktarıldı. Çökelti atıldı.
6. 1 dk maksimum hızda santrifüj yapıldı. Kolon atıldı. Collection tüp alındı.
7. 700µl Binding Solution eklendi. Toplam sıvı 1000µL civarında tutuldu.
8. Binding kolonu hazırlama: Kırmızı kolonlu tüpler alındı. Her birine 500µL Column Preparation Solution eklenir. 1 dk 12000g'de santrifüj yapıldı. Sıvı atılarak, kolon hazır hale gelmiş oldu.
9. 7.basamaktaki karışımın bir kısmı kırmızı kolonlu tüpe aktarıldı.(örn: 700µL)
10. Maksimum hızda 1dk santrifüj yapıldı. Sıvı kısım atıldı, collection tüp alındı.
11. Kırmızı kolon collection tüpe yeniden konuldu.
12. 7.basamaktan geriye kalan karışım (örn:300µL) kolondan geçirildi.
13. Maksimum hızda 1dk santrifüj yapıldı. Sıvı ve collection tüp atıldı.
14. Kolon yıkanması için yeni bir collection tüpün içine yerleştirildi.

15. 500µL Wash Solution eklenerek ve maksimum hızda 1dk santrifüj yapıldı. Sıvı atıldı, collection tüp alındı.
16. 500µl Wash Solution eklendi ve maksimum hızda 3dk santrifüj yapıldı. Sıvı, kolona temas ettirilmeden atıldı.
17. Yeni 2ml'lik collection tüp çıkarılıp ve içine kolon yerleştirildi.
18. 100µl Elution Solution (Kullanmadan önce 65°C' de ısıtılır) eklendi.
19. Max hızda 1dk santrifüj yapıldı. Kolon sıvıya temas etmeden çıkarıldı. Böylelikle 1.elüsyon hazır hale gelmiş oldu.
20. Yeni 2ml'lik tüp hazırlandı. Kolon bu tüpe yerleştirildi.
21. 100µL Elution Solution (Kullanmadan önce 65°C' de ısıtılır) eklendi.
22. Maksimum hızda 1dk santrifüj yapıldı. Kolon sıvıya temas etmeden çıkarılır ve atıldı.
23. 2.elüsyon da hazır hale geldi.

2.2.2 PCR Uygulamaları

İzole edilmiş genomik DNA'ların ITS bölgelerinin çoğaltılmasında ITS4, ITS5A ve *trnL-e*, *trnL-Ff* primerleri kullanılmıştır. Bu primerler yardımıyla, rDNA gen tekrarları arasında kalan ITS1, 5.8S ve ITS2 bölgeleri PCR yoluyla çoğaltılmıştır. DNA üzerinden bu bölgelerin çoğaltılması 200 µL'lik tüplerde; 10X'lik reaksiyon tamponundan 2.5 µL, 25 mM MgCl₂'den 2.5 µL, 10 mM dNTP' den 0.4 µL, 50 pmol/µL'lik primerlerden 2.5 µL, Taq DNA Polimeraz' dan 0.3 µL, DMSO'dan 2.5 µL, kalıp DNA'dan 2 µL, dH₂O' dan 10.8 µL alınarak toplam hacim 25 µL olarak ayarlanmıştır. PCR uygulamalarında olası bir kontaminasyonun olup olmadığını anlayabilmek amacıyla her uygulamada, genomik DNA içermeyen negatif kontroller kullanılmıştır.

Tablo 8 Kullanılan PCR Programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94°C	5dk	1 döngü

Tablo 8'nin Devamı

Denatürasyon	94°C	30sn	35 döngü
Annealing	51°C	45sn	
Extension	72°C	1dk	
Final Extension	72°C	10dk	1 döngü
Final Hold	4°C	25sa	

2.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonucunda oluşan bantları gözlemek ve genomik DNA izolasyonu sonuçlarına bakmak amacıyla %0,8'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. İşlem için ilk olarak 0,8 gr agaroz tartıldı ve 100 ml 0,5 X TBE tamponu içinde, mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Karışım 50°C'ye soğutulurken içerisine 1 µL Etidyum Bromür boyası ilave edildi. Tampon, tarakları önceden yerleştirilmiş jel kasetine döküldü ve polimerleşmesi için 15 dk bekletilerek jelin donması sağlandı. Jel polimerleştikten sonra kasetten taraklar çekilerek çıkartıldı. Hazırlanan jel, elektroforez tankına yerleştirilip üzerine jelin üzerini örtecek kadar 0.5 X TBE tamponu ilave edildi.

2 µL PCR ürünü, 2 µL yükleme boyası ve 2 µL dH₂O karıştırılarak (6X DNA loading dye) kuyucuklara pipet yardımıyla yüklendi. PCR ürününün büyüklüğünü belirleyebilmek amacıyla 5 µL DNA büyüklük belirleyici (1kb DNA ladder) boş bir kuyucuğa yüklendi. Örnekler 100 voltta 40 dk yürütüldü. Daha sonra jel, jel görüntüleme cihazına alındı. UV ışığı altında bantlar gözlemlendi ve bilgisayar programı yardımıyla fotoğrafları çekilip, veriler kaydedildi.

Genomik DNA izolasyonu sonuçlarına bakmak için 2 µL PCR ürünü, 2 µL yükleme boyası ve 2 µL dH₂O karıştırılarak kuyucuklara yüklenip aynı işlemler sırası ile tekrar edildi.

2.2.4 Dizileme ve Dizi Analizi

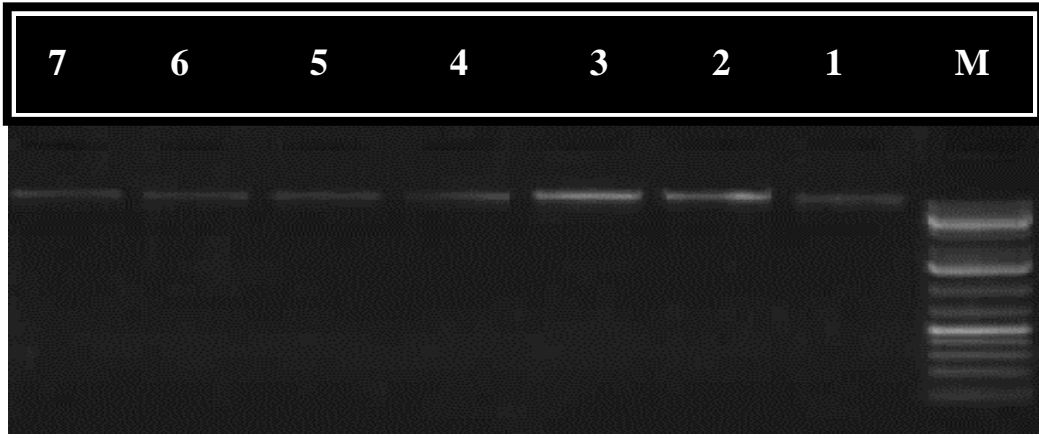
Çoğaltılan ITS bölgelerinin DNA dizileme reaksiyonlarının yapılması için PCR ürünleri Ankara’da bulunan Refgen firması ve İzmir’de bulunan İYTE biyoteknoloji laboratuvarına gönderildi. DNA dizilerinin görsel olarak gözden geçirilmesi için ücretli profesyonel bir bilgisayar yazılımı olan Sequencher’ın Mac versiyonu kullanıldı. DNA dizilerinin kirlilik düzeyine bakılarak istenilen saflık düzeyinde olan dizilerde gerekli analiz işlemleri yapılarak diziler işlendi. Daha sonra bu dizilerden konsensus dizileri oluşturuldu. Oluşturulan konsensus dizileri Microsoft’e kopyalandı ve dizi hizalaması için kullanıma hazır hale getirildi. Dizi hizalaması için internet üzerinden ücretsiz olarak kullanılabilen ClustalW programı kullanıldı. Word’e kopyalanan diziler Clustal W programına yapıştırıldı ve “Execute Alignments” komutlu verilerek dizi hizalaması gerçekleştirildi.

2.2.5 Filogenetik Analiz

Dizileri hizalanmış olan *Serratula* cinsine ait türlerin akrabalık derecelerini öğrenebilmek için yaygın olarak kullanılan PAUP filogenetik analiz programı tercih edildi. Nexus formatındaki verilerin “execute” komutu ile analizine başlandı. Daha sonra açılan pencerede “help” komutu ile seçilecek ağaç kriterlerinin olduğu pencere açıldı. Açılan pencerede oluşturulmak istenilen ağaç kriterleri seçilerek filogenetik ağaçlar elde edildi. Filogenetik ağaç oluşturmada karakter temelli yöntemlerden Maksimum Parsimony Metodu kullanılarak, bootstrap ve branch and bound analizleri yapıldı. Bu analizlerin yanı sıra UPGMA ve NJ metotlarıyla filogenetik ağaçlar oluşturuldu.

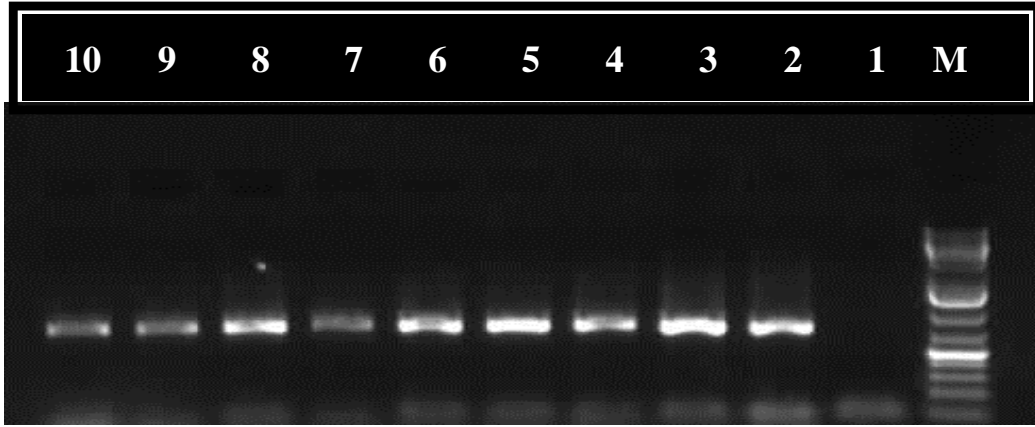
3. BULGULAR

Çalışmada kullanılan *Serratula* L. cinsine ait 17 takson Tablo 2’de belirtilen bölgelerden toplanmıştır. Çalışmada dış grup olarak *A.repens*, *R.iconiensis*, *R.serratuloides*, *J.cataonica* türleri kullanıldı. Bitki örneklerinin genomik DNA’ları Sigma gDNA izolasyon kiti ve Fenol-Kloroform-İzoamilalkol izolasyon protokolü takip edilerek izole edilmiştir. Bazı *Serratula* taksonlarına ait gDNA’larının agaroz jel görüntüsü Şekil 8’deki gibidir. İzole edilen gDNA’ların ITS bölgeleri ITS4 ve ITS5A primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR sonucunda elde edilen ITS bantlarının bir kısmı Şekil 9’daki gibi görüntülenmiştir. İzole edilen gDNA’ların *trnL-F* bölgeleri ise *trnL-Ff* ve *trnLe* primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR sonucunda elde edilen *trnL-F* bantlarının bir kısmı Şekil 10’daki gibi görüntülenmiştir.

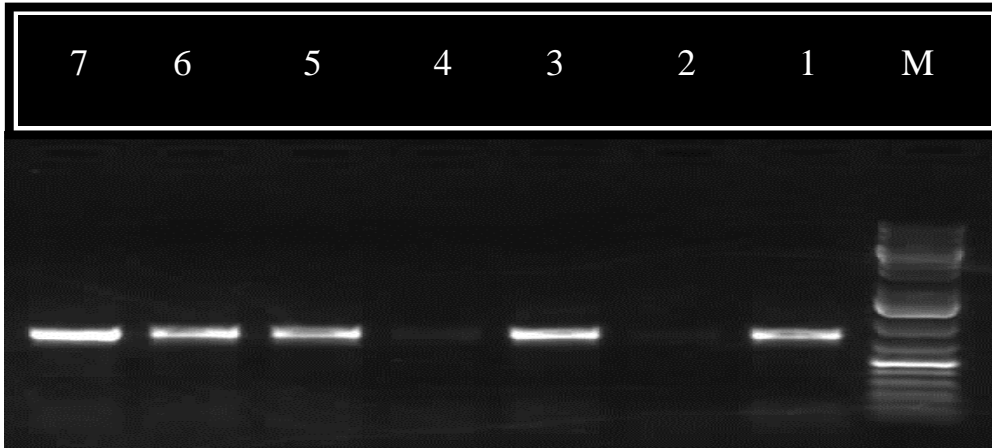


Şekil 8 Bazı *Serratula* Taksonlarının gDNA Görüntüsü

M: Markır, 1: *S. tinctoria*, 2: *S. erucifolia*, 3: *S. haussknechtii*, 4: *S. serratuloides*, 5: *S. cerinthifolia*, 6: *S. radiata*, 7: *S. radita subsp. radiata*



Şekil 9 Bazı *Serratula* Taksonlarının ITS Primerleriyle Yapılan PCR Görüntüsü
M: Markır, 1: *S. tinctoria*, 2: *S. erucifolia*, 3: *S. haussknechtii*, 4: *S. serratuloides*,
5: *S. cerinthifolia*, 6: *S. radiata*, 7: *S. radita subsp. radiata*,
8: *S. kurdica*, 9: *A. repens*, 10: *S. coriacea*



Şekil 10 Bazı *Serratula* Taksonlarının *trnL-f* Primerleriyle Yapılan PCR Görüntüsü
M: Markır, 1: *S. tinctoria*, 2: *S. erucifolia*, 3: *S. haussknechtii*, 4: *S. serratuloides*,
5: *S. cerinthifolia*, 6: *S. radiata*, 7: *S. radita subsp. radiata*

ITS bölgesinin tamamı elde edildikten sonra PCR ürünleri dizileme için Refgen firmasına ve İzmir’de bulunan İYTE biyoteknoloji laboratuvarına gönderildi. Firmadan gelen diziler, Sequencher 4.10.1 programıyla manuel olarak analiz edildi. Çalışılan bütün taksonlara ait ITS bölgelerinin DNA baz sıraları ClustalW programı kullanılarak hizalandı ve türler arasındaki baz farklılıkları tespit edildi. ClustalW programında

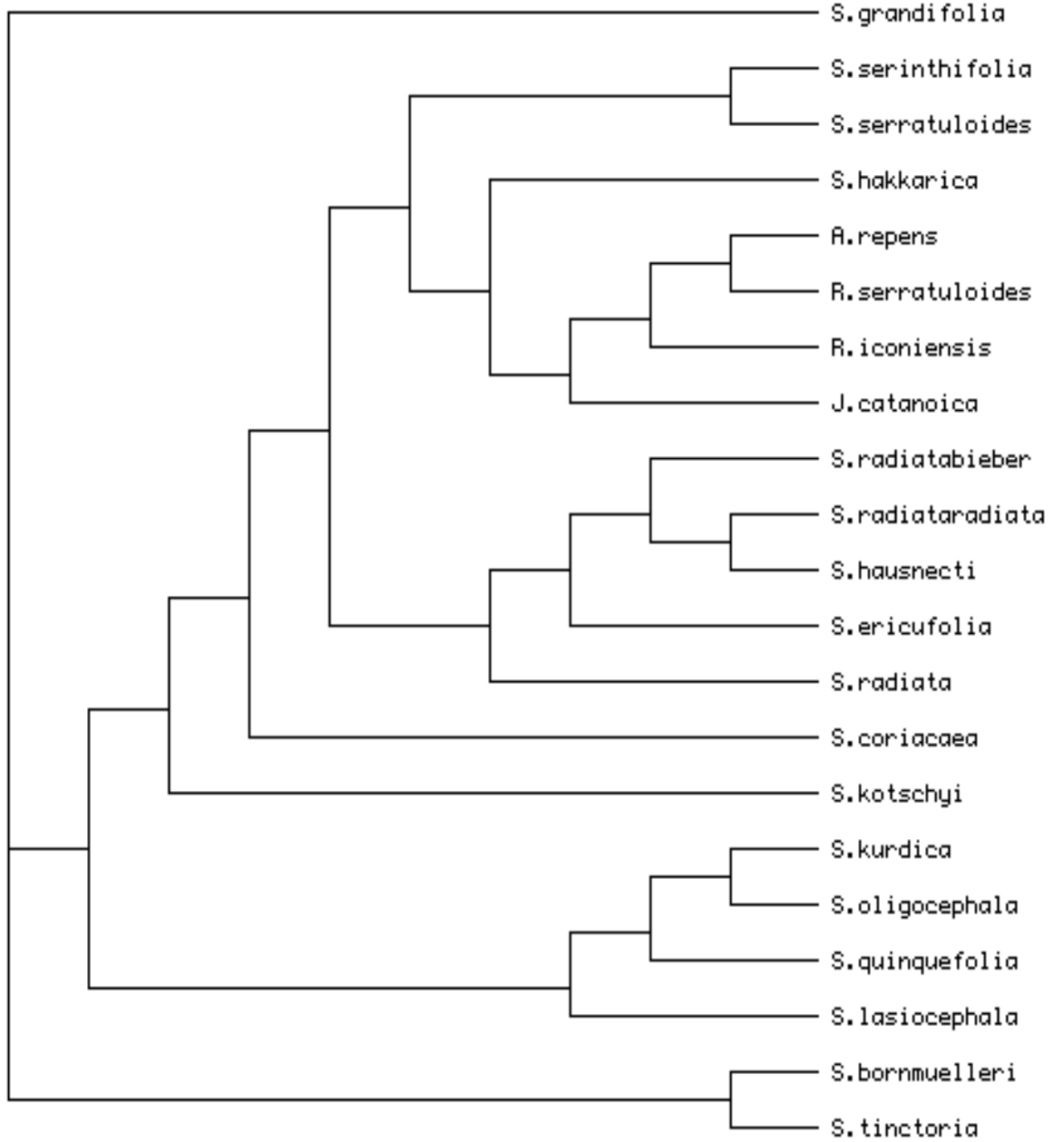
hizalanan diziler #Nexus formatına çevirilerek PAUP*4.0b10 programında filogenetik analize hazır hale getirilmiştir. Maksimum parsimony metodunda; Bootstrap ve Branch and Bound parametreleri kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturuldu. Genetik uzaklık ağaçları ise UPGMA ve NJ parametreleri ile elde edildi

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

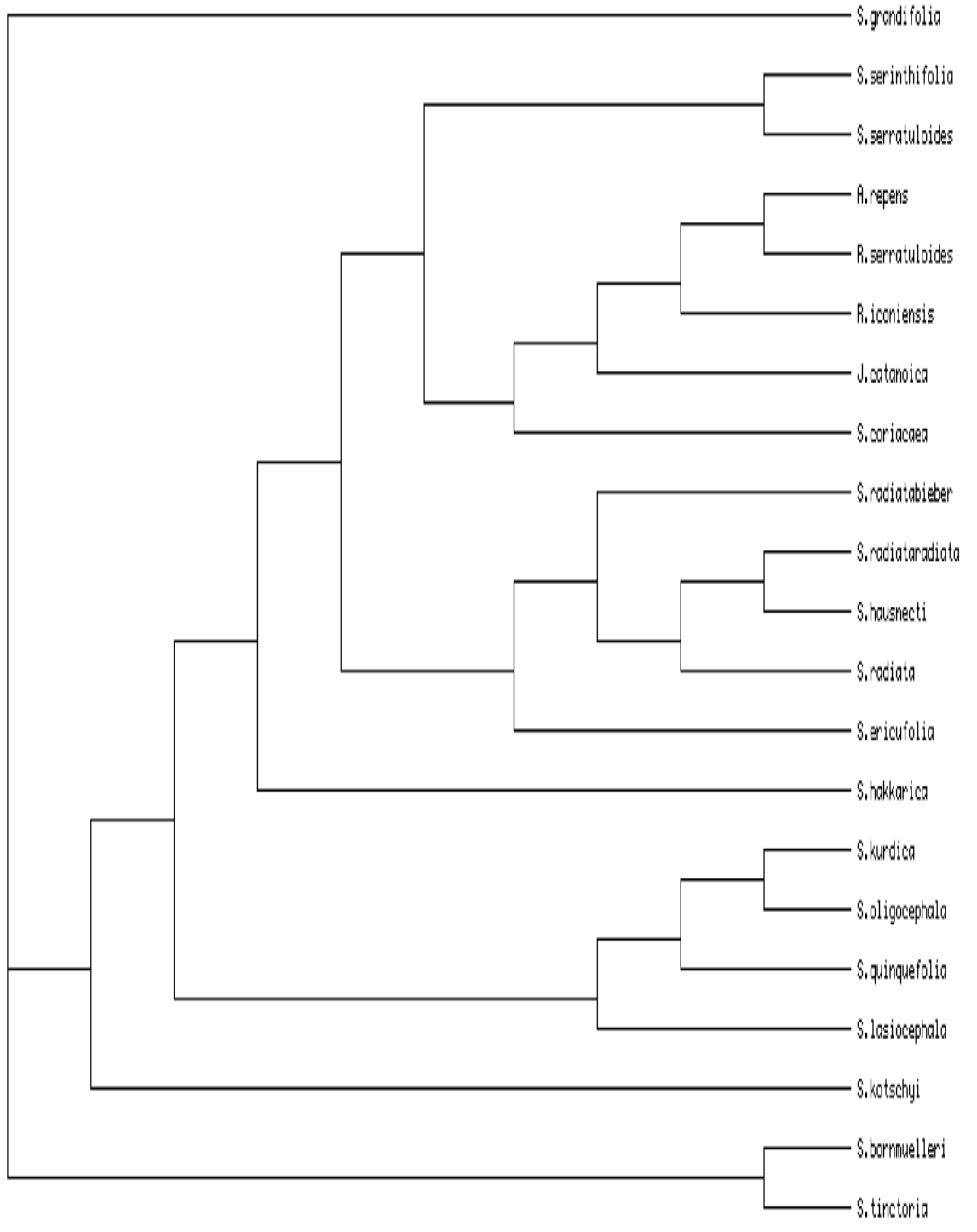
Bu çalışmada Türkiye’de yayılış gösteren *Serratula L.* cinsinin taksonlarının akrabalık ilişkilerini ortaya koymak amacıyla nrDNA’nın ITS ve cpDNA’nın *trnL-F* bölgeleri çalışıldı. Literatüre göre ülkemizde yetişen *Serratula* cinsinin taksonlarına ait daha önce yapılmış böyle bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada ilk olarak *Serratula* taksonlarından gDNA’lar izole edildi, daha sonra gDNA’nın ITS ve cpDNA’nın da *trnL-F* bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Çalışma sonucunda *Serratula* cinsinin taksonlarının ITS ve *trnL-F* bölgelerinin DNA dizi analizleri ve filogenetik analizler yapılarak ilk kez DNA dizilerine dayalı akrabalık dereceleri belirlenmiş oldu.

Çalışılan taksonların ITS nrDNA ve *trnL-F* bölgeleri bir bütün olarak kullanıldı. ITS bölgesinin baz uzunluğunun 640-698 baz çifti (bç/bp) *trnL-F* bölgesinin de 400-430 baz çifti uzunluğu arasında değişim gösterdiği gözlemlendi. Çalışılan türlerin ITS ve *trnL-F* bölgesine ait verilerin filogenetik analizi PAUP*4.0b10 programı kullanılarak yapıldı. Analiz için parsimoni ve genetik uzaklık kriterleri kullanıldı. Parsimoni en sık çalışılan ve kullanılan filogenetik ağaç oluşturma metotlarından birisidir. Bu metot olası bütün ağaçları değerlendiren ve farklı ağaçlar arasından seçim yapan, her biri için bir kriter ya da bir skor veren bir yazılımdır. Maksimum Parsimoni’de temel kriter, evrimsel değişimlerin sayısıdır. Basamak sayısı en düşük olan ağaç, bu kritere göre en tutumlu olan yani genetik ilişkiyi en iyi biçimde yansıtan ağaçtır [40].

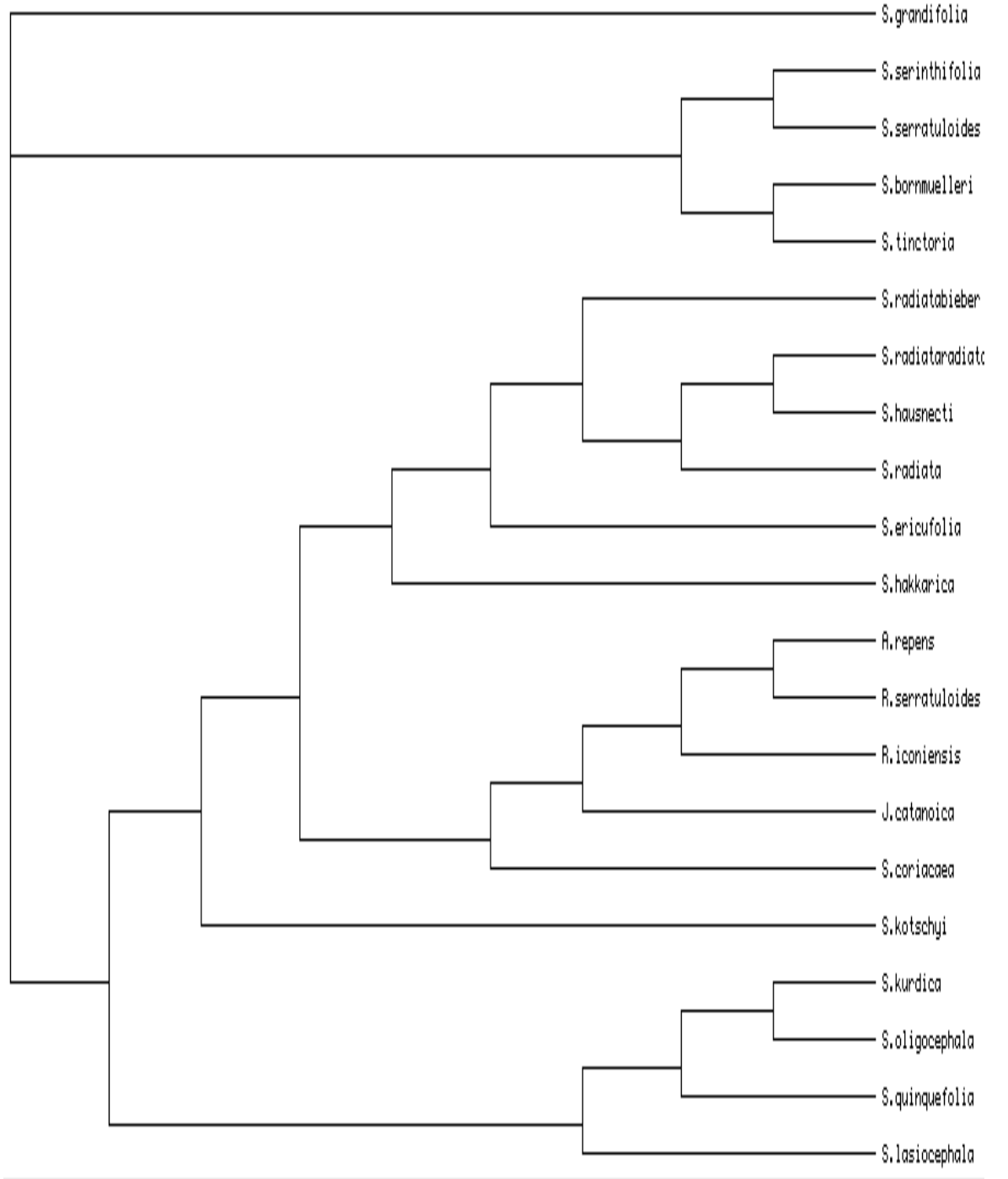
4.1 ITS Bölgesi Kullanılarak Yapılan Filogenetik Analiz



Şekil 11 ITS Bölgesinin Parsimoni Analizi Sonucu Oluşan 1 Numaralı Ağaç



Şekil 12 ITS Bölgesinin Parsimoni Analizi Sonucu Oluşan 500 Numaralı Ağaç



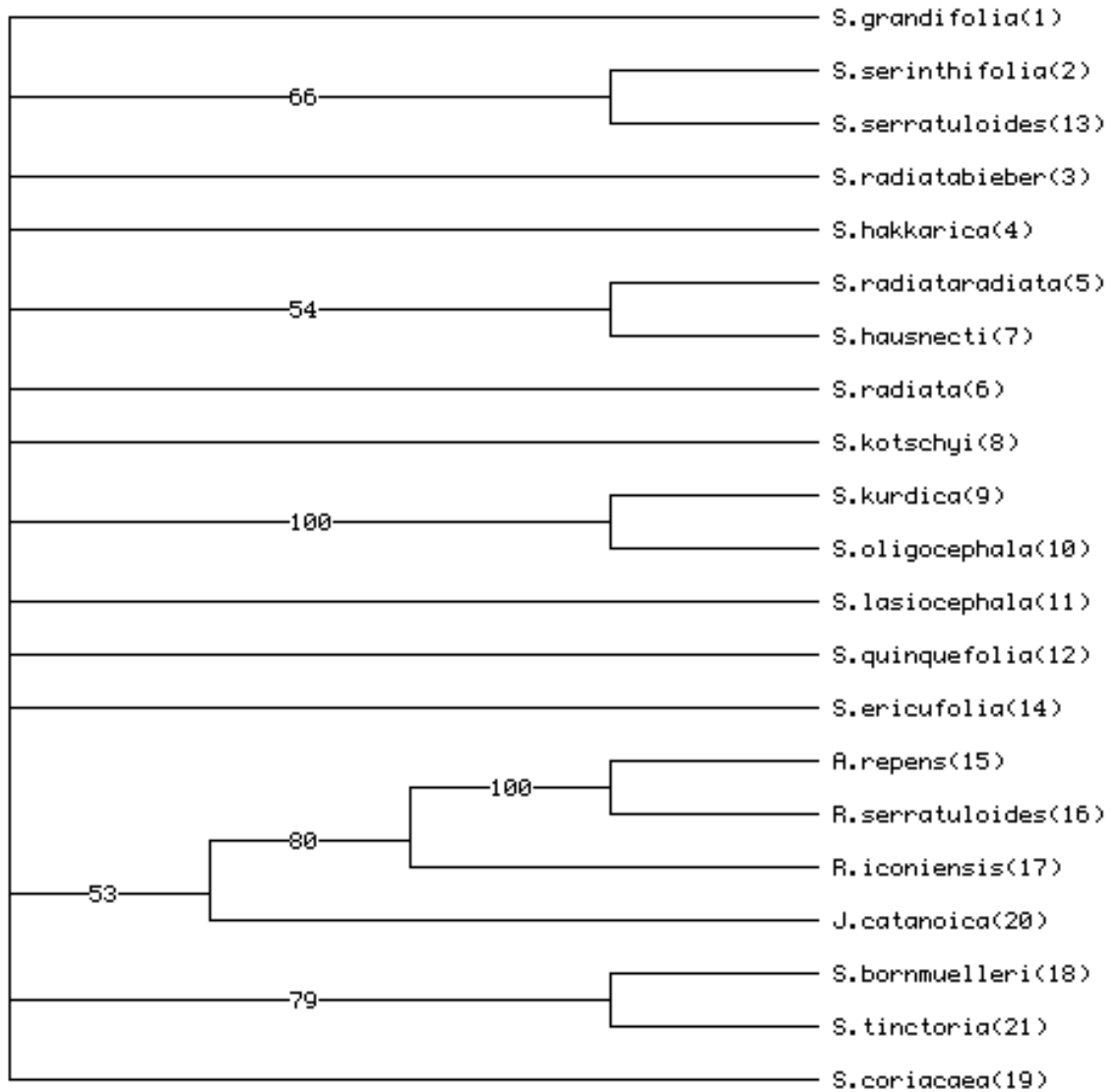
Şekil 13 ITS bölgesinin Parsimoni Analizi Sonucu Oluşan 1000 Numaralı Ağaç

Karakter temelli yöntemlerden Maksimum Parsimoni kriteri kullanılarak Branch and Bound algoritmasıyla araştırma yapıldı. Bu analiz için oluşturulacak maksimum ağaç sayısı 1000 olarak seçildi. Yapılan analiz sonucunda 1000 ağaç elde edildi. Arama sonucunda oluşan 1000 ağaçtan 1 numaralı ağaç, 500 numaralı ağaç ve

1000 numaralı ağaç olmak üzere toplam 3 tane ağaç seçildi. Şekil 11’de 1 numaralı ağaç, Şekil 12’de 500 numaralı ağaç ve Şekil 13’te 1000 numaralı ağaç verilmiştir.

Yapılan analizde toplam 804 karakter incelenmiş ve bunlardan 537 karakter sabit(constant) karakterli, 168 karakter değişken çıkmıştır. Parsimonik bilgi içeren karakter sayısı ise 99 adettir. Şekil 10, Şekil 11 ve Şekil 12’deki ağaçlarda dış grup olarak seçilen taksonların *Serratula* cinsinin taksonlarından tam olarak ayrıldığını görmekteyiz. Bu durum da bize Türkiye’deki *Serratula* taksonlarının monofiletik olduğunu göstermektedir. Dış gruplardan *A. Repens* ve *R. serratuloides* taksonları kardeş taksonlardır. *J.cataonica* ve *R.iconiensis* bunlardan ayrılmıştır. Elde edilen 500 ve 1000 numaralı ağaçlara baktığımızda dış grupların *S. coriacea*’nin dış gruplarla akraba olduğunu 1 numaralı ağaca baktığımızda da *S. hakkarica*’nın akraba olduğunu görmekteyiz.

1 numaralı ağaca baktığımızda (Şekil 12) *S. tinctoria* ve *S. bornmuelleri*’nin monofiletik grup olduğunu görmekteyiz. *S. radiata* ve bu türün alt türleri olan *S. radiata subsp. radiata* ve *S. radiata subsp. bornmuelleri* ile monofiletik olduğunu görmekteyiz. *S.radiata subsp. radiata* ve *S. haussknectii* kardeş taksonlar olarak gözükmektedir.



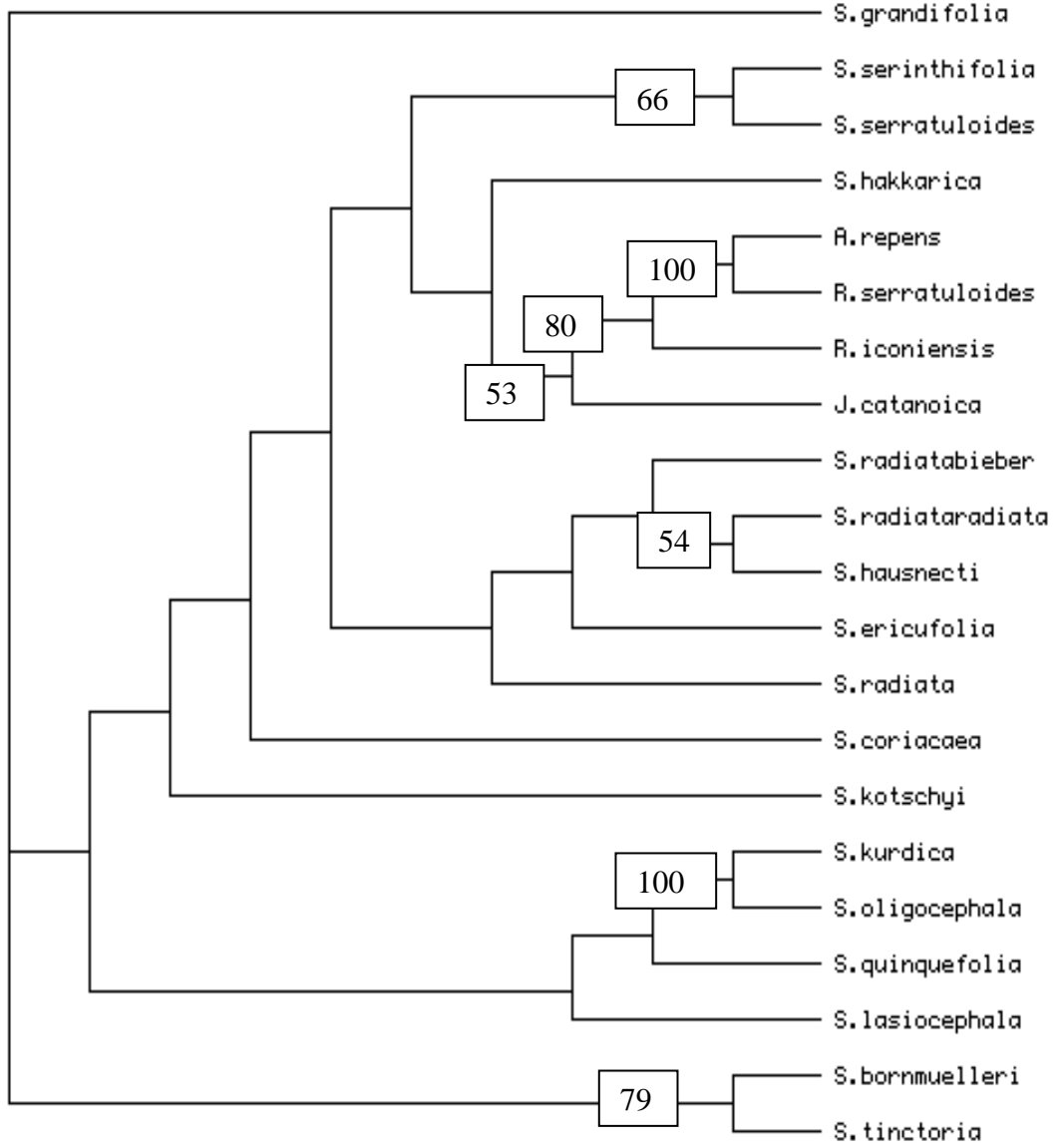
Şekil 14 ITS bölgesinin Bootstrap Analizi Sonucu Oluşan Parsimoni Ağacı

Bootstrap yöntemiyle köksüz ağaçlar elde edilir. Ağaçların dallarının üzerindeki değerler parsimoni kriteri kullanılarak istatistiksel yönden en güvenilir olan dalları belirlemede kullanılır. Her bir dalın yüzdelik oranı o dalın ne oranda desteklendiğini gösterir. Eğer dalın güvenilirlik oranı %50'nin altında ise program bu dalı çok zayıf olarak nitelendirir ve o dalı çökertir, çöken dal sonucunda oluşan boş dallanma ise politomi olarak adlandırılır. Şekil 14'te oluşturulan bootstrap ağacı, maksimum ağaç sayısı 1000 seçilerek ve 100 tekrar yapılarak elde edilmiştir. Tekrar sayısını ve maksimum ağaç sayısını arttırdığımızda bilgisayarın kapasitesi analiz için yetersiz kaldığından işlem çok yavaş gerçekleşmekte veya çok uzun sürmektedir.

Şekil 14'te görüldüğü gibi bootstrap analizi sonucunda oluşan ağaçta bazı dallar çökmüştür. Bunun nedeni giriş bölümünde bahsedildiği gibi; o dal için güvenilirlik değerinin % 50'nin altında kalmasıdır. Çöken dallarda dallanma modeli belirlenemediğinden taksonlar arası ilişki hakkında yorum yapılamaz. Sadece bu dal politomi oluşturmuştur denilebilir.

Elde edilen ağaca göre dış gruplardan *A.repens* ve *R. serratuloides* taksonlarının bulunduğu dal % 100 desteklenmiştir ve bu taksonların monofiletik taksonlar olduğu görülmektedir. Buradan da bu iki farklı cinsin çok yakın olduğu ortaya çıkmaktadır. Dış grup olarak kullanılan 4 takson kendi içinde grup oluşturmuş ve *serratula* türlerinden ayrılmışlardır. Dış grupları *Serratula* taksonlarından ayıran dal % 53 desteklenmiştir. *Serratula* taksonlarından *S. kurdica*, *S. oligocephala*'nın bulunduğu dal % 100 desteklenmiştir ve bu taksonların monofiletik olduğu görülmektedir. Bu iki taksonun morfolojik özellikleri dikkate alındığında; her iki taksonda da fillarilerinin 6 serili olması, yaprakların derimsi ve parçalı olması, papusların barbellate saçlı olması ve kapitulanın pedunkulat olması nedeniyle bu iki takson birbirine benzemektedir. *S. kurdica*'nın korollalarının sarı olması, yaprakların dar olması, gövdenin oldukça zayıf ve seyrek yapraklı olması, involukrumun çanak biçiminde olması ve papus saçlarının 9 mm olması gibi özellikleri ile *S. oligocephala*'dan farklıdır. *S. oligocephala*'da korollalarının mor olması, yaprakların geniş olması, gövdenin nispeten kalın ve yapraklı olması, involukrumun, bitki tam olarak gelişmeden önce küresel, bitki büyüyünce çanak biçiminde olması ve papus saçlarının 7 mm olması gibi özellikleri ile *S. kurdica*'dan farklıdır. Bu farklı morfoljiler iki taksonun tür seviyesinde farklılaşmasına neden olmuştur. *S. cerinthifolia* ve *S. serratuloides*'in bulunduğu dal % 66 desteklenmiştir. Bu taksonlar da monofiletik takson çıkmışlardır. *S. cerinthifolia*'nın fillarileri 5-6 serili ve ovat-lanseolat şeklindedir, papusları barbellate saçlıdır, korollaları sarı renktedir, yapraklar liyrat-pinnat şeklindedir ve çiçek sapına halkasal olarak dizilmiştir. *S. serratuloides*'in fillarileri 8 serilidir ve ovat-aküminat şeklindedir, korollaları beyazımsı veya leylak rengindedir. Morfolojik olarak bu kadar farklı olmalarına rağmen her iki takson da *Pinus brutia* ormanlarında yüksek ve engebeli çayırlarda veya kireçli ve kalkerli taşların üzerinde yetişmektedir. *S. tinctoria* ve *S. bornmuelleri*'nin bulunduğu dal da %79 desteklenmiştir. Bu iki takson da monofiletik taksonlar olarak gözükmektedir.

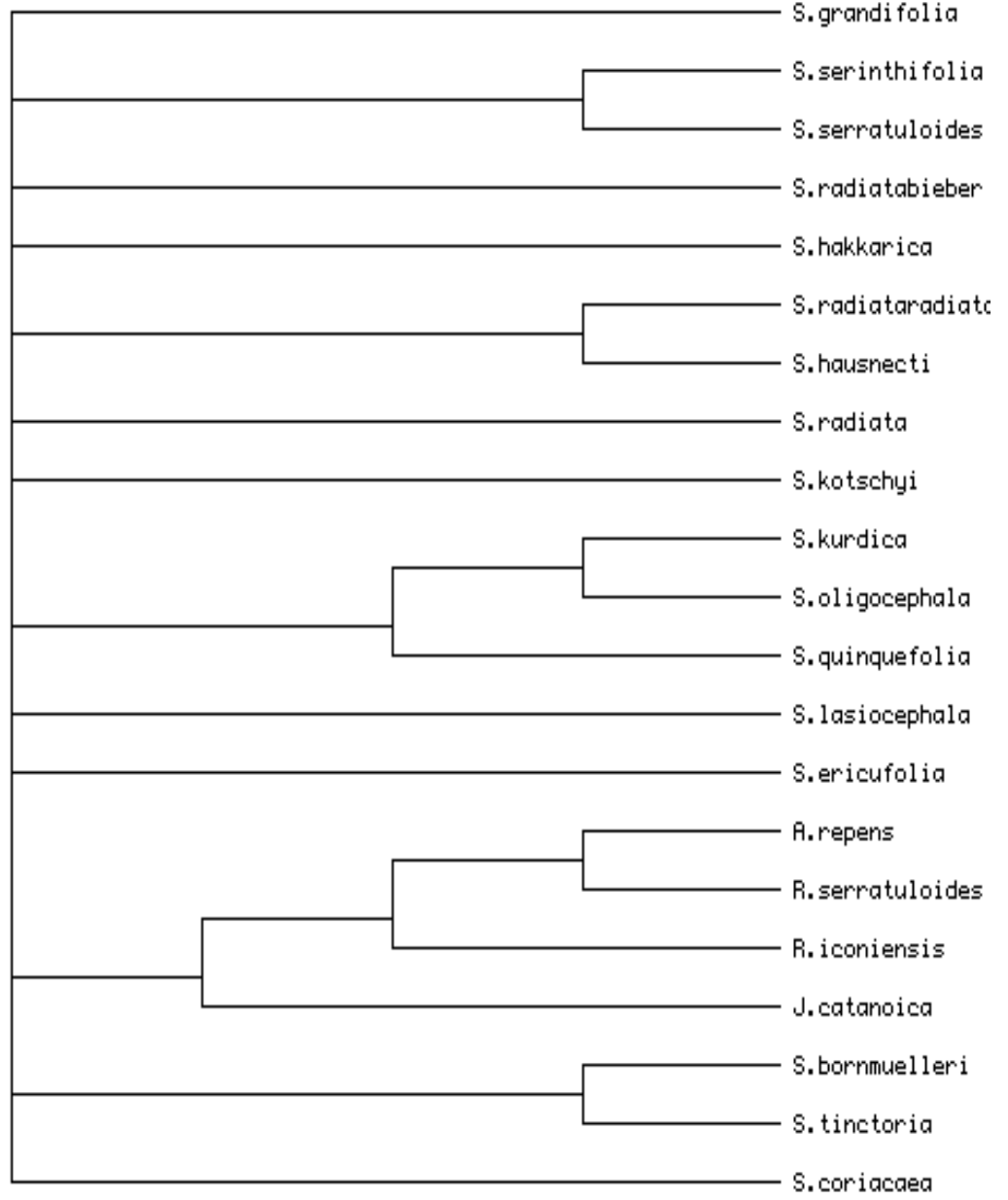
Bu iki taksonun morfolojik özelliklerine bakıldığında her iki taksonun da fillarilerinin 5 serili olması, papuslarının barbellate saçlı olması ve korollalarının mor renkte olması gibi özellikleriyle morfolojik olarak da birbirlerine benzedikleri görülmektedir. *S. radiata subsp. radiata* ve *S. haussknechtii* taksonlarının bulunduğu dal % 54 desteklenmiştir. Bu iki takson da monofiletik taksonlar olarak gözükmemektedir. *S. radiata subsp. radiata*'da fillariler 8 serli, Papus saçları düz, involukrum ovoid ve çiçekler mor renklidir. *S. haussknechtii*'de fillariler 5 serili, papus barbellate saçlı, involukrum fusiform ve çiçekler leylağimsı pembedir. Morfolojik olarak bu kadar farklı olan iki takson moleküler anlamda birbirine yakın gözükmemektedir. Fakat Bootstrap değeri % 54 gibi düşük bir değer olduğundan bu iki taksonun ilişkisi hakkında net bir yorum yapılamaz. Diğer taksonların bulunduğu dallarda daha öncede belirttiği gibi güvenilirlik değeri % 50'nin altında olduğundan politomi gözlenmiştir.



Şekil 15 ITS bölgesinin Üzerine Bootstrap değerleri işlenmiş 1 numaralı Parsimoni Ağacı

Elde edilen 1 numaralı Maksimum Parsimoni ağacının üzerine Şekil 15'te görüldüğü gibi bootstrap yüzdeleri işlendi. Dış gruplardan *A. Repens* ve *R.serratuloides* türlerinin kardeş taksonlar olduğu görülmektedir ve bu dal % 100 desteklenmiştir. *J. cataonica* ve *R. İconiensis* bunlardan ayrılmıştır. Elde edilen ağaca baktığımızda *S. hakkarica*'nın dış gruplarla akraba olduğunu görmekteyiz. *S. tinctoria* ve *S. bornmuelleri*'nin monofiletik grup olduğunu ve bu dalın güvenilirliğinin % 79 olduğunu görmekteyiz. *S. kurdica* ve *S. oligocephala*'nın

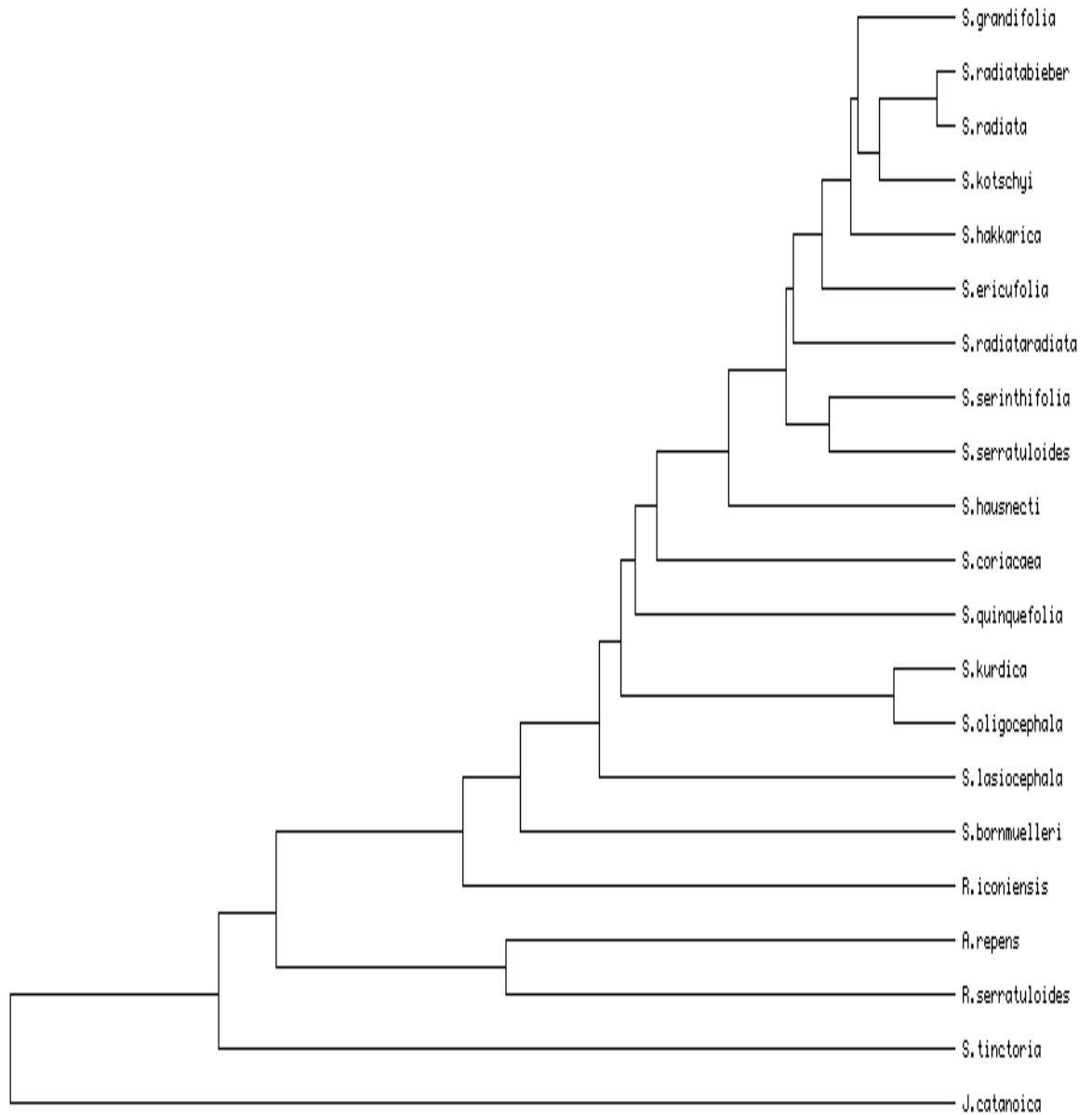
bulunduğu dal % 100 desteklenmiştir. Bu taksonları da monofiletik taksonlardır. *S. radiata* spp. *radiata* ve *S.haussknechtii* de monofiletik gruplardır. Bu iki taksonun bulunduğu dal da % 54 desteklenmiştir.



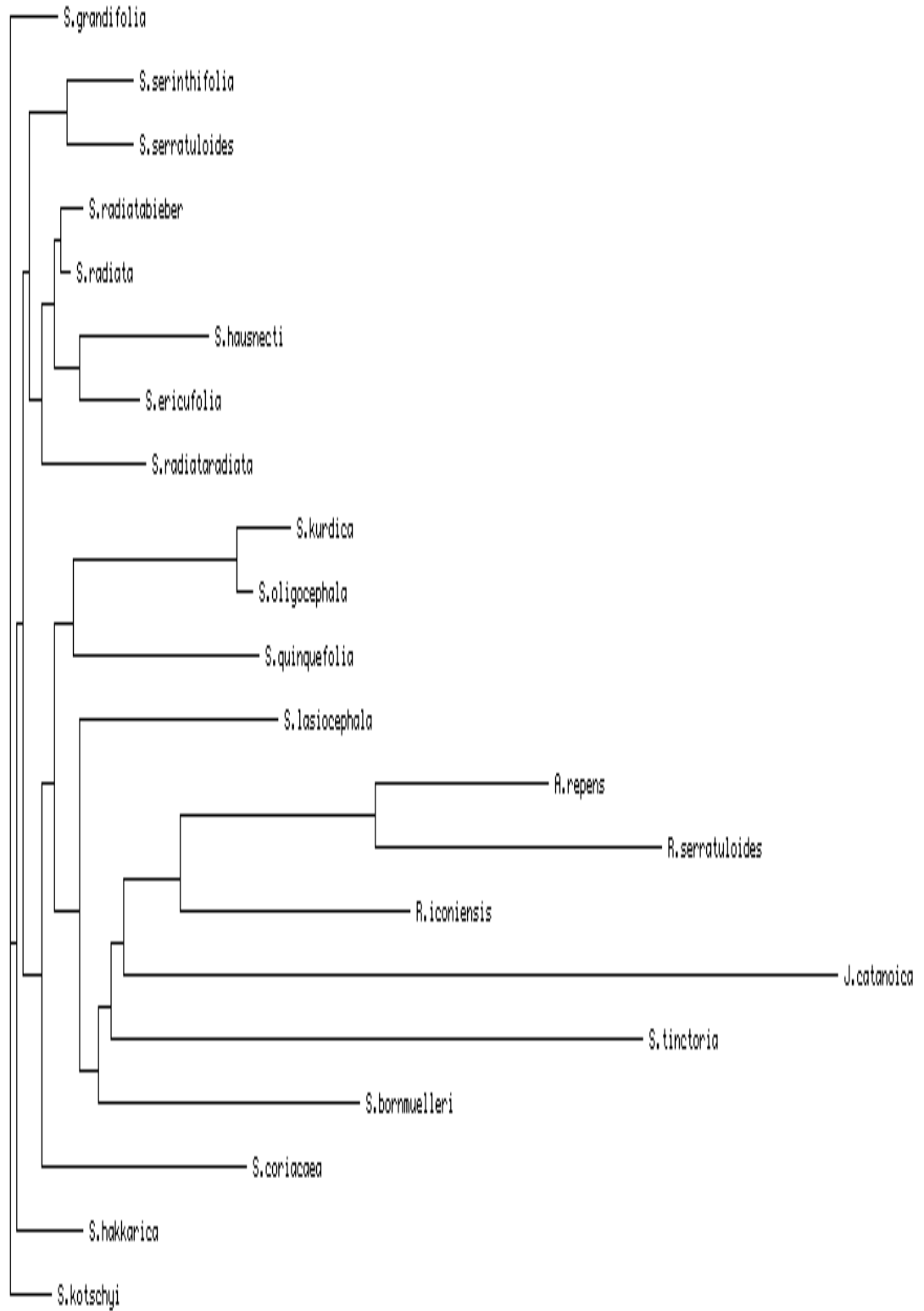
Şekil 16 ITS bölgesinin Parsimoni Sonucu Oluşan 1000 Ağacın Strict Konsensus Ağacı

Strict Konsensus Ağacı da (Şekil 16) parsimony ağaçlarında elde ettiğimiz verileri destekler niteliktedir. Ancak ITS verilerine göre derin filogeniler

çözülemedi. Parsimoni ağaçlarında olduğu gibi dış gruplardan *A. repens* ve *R. serratulooides* kardeş takson olarak çıkmıştır. Ayrıca dış gruplar kendi içinde gruplar oluşturmuşlardır. *S. tinctoria* ve *S. bornmuelleri* de eski verileri destekler nitelikte monofiletik grup çıkmışlardır. *S. kurdica* ve *S. oligocephala* taksonları da monofiletik olarak gözükmektedir. *S. quinquefolia*'nın da bu iki taksonla monofiletik olduğu gözükmektedir. Morfolojik veriler de bu durumu destekler niteliktedir. Çünkü *S. quinquefolia*'nın da *S. kurdica* ve *S. oligocephala*'da olduğu gibi barbellate saçlı papuslara ve pedunkulat kapituluma sahip olduğu gözlenmektedir.



Şekil 17 ITS bölgesinin UPGMA Analizi Sonucu Oluşan Ağaç



Şekil 18 ITS bölgesinin Neighbor-Joining (NJ) Analizi Sonucu Oluşan Ağaç

Maksimum Parsimoni yöntemine ek olarak mesafe temelli yöntemlerden UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) ve NJ (neighbor joining) analizleri yapılmıştır.

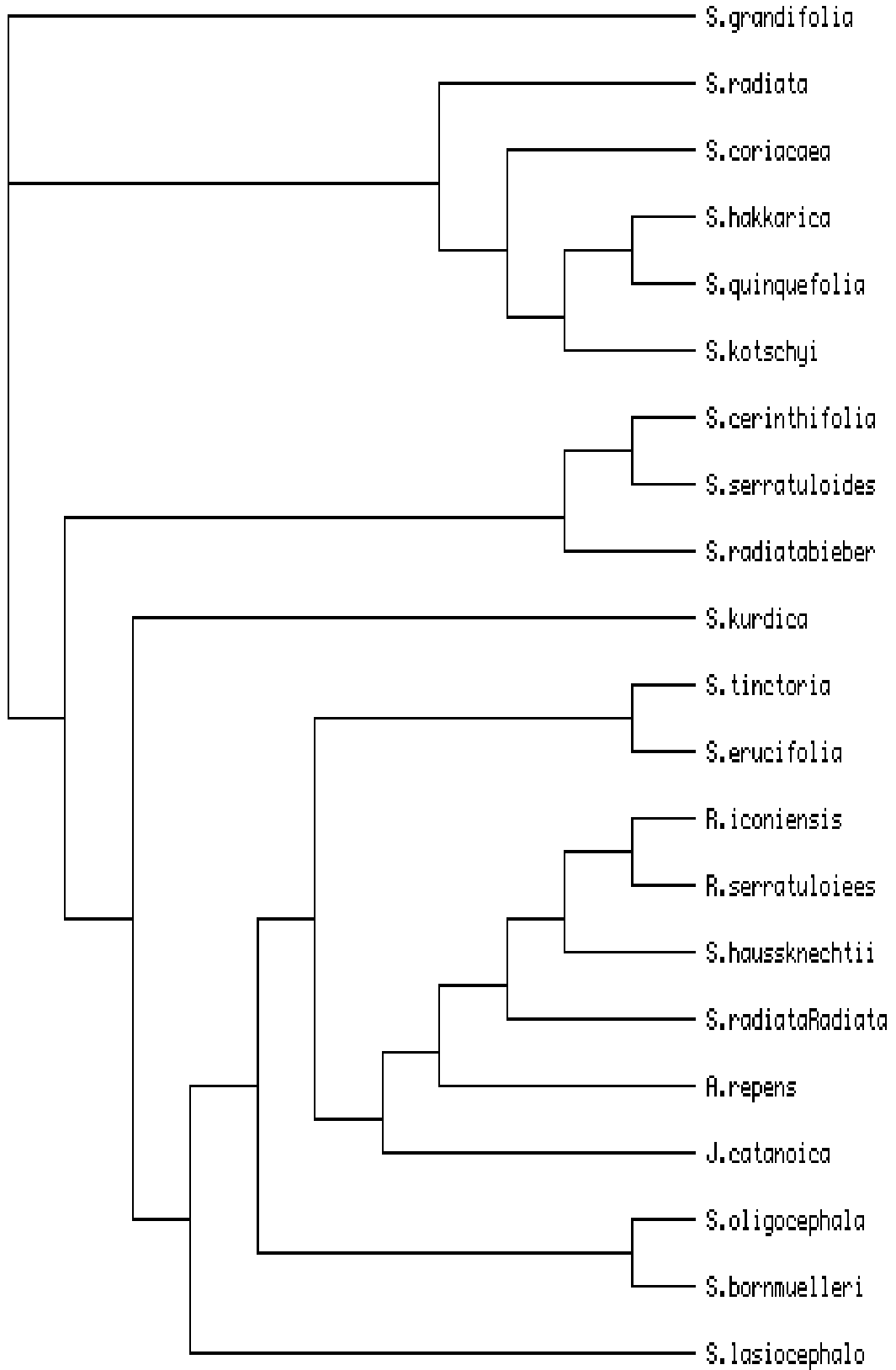
Genetik uzaklık metodunda temel prensip, dizi çiftleri arasındaki farkın uzaklığına dayanır. Bu uzaklık taksonlar arasında uzaklık matrisi oluşturmak için kullanılabilir. Uzaklık metodunda küme temelli ve optimalite (en iyilik) temelli algoritmalar kullanılır. Küme temelli algoritmalarda uzaklık matrisi en benzer dizi çiftlerinden oluşturulur.

UPGMA analizinde dal uzunlukları eşit olarak hesaplanır bu nedenle tarihsel zaman hakkında bilgi vermez.

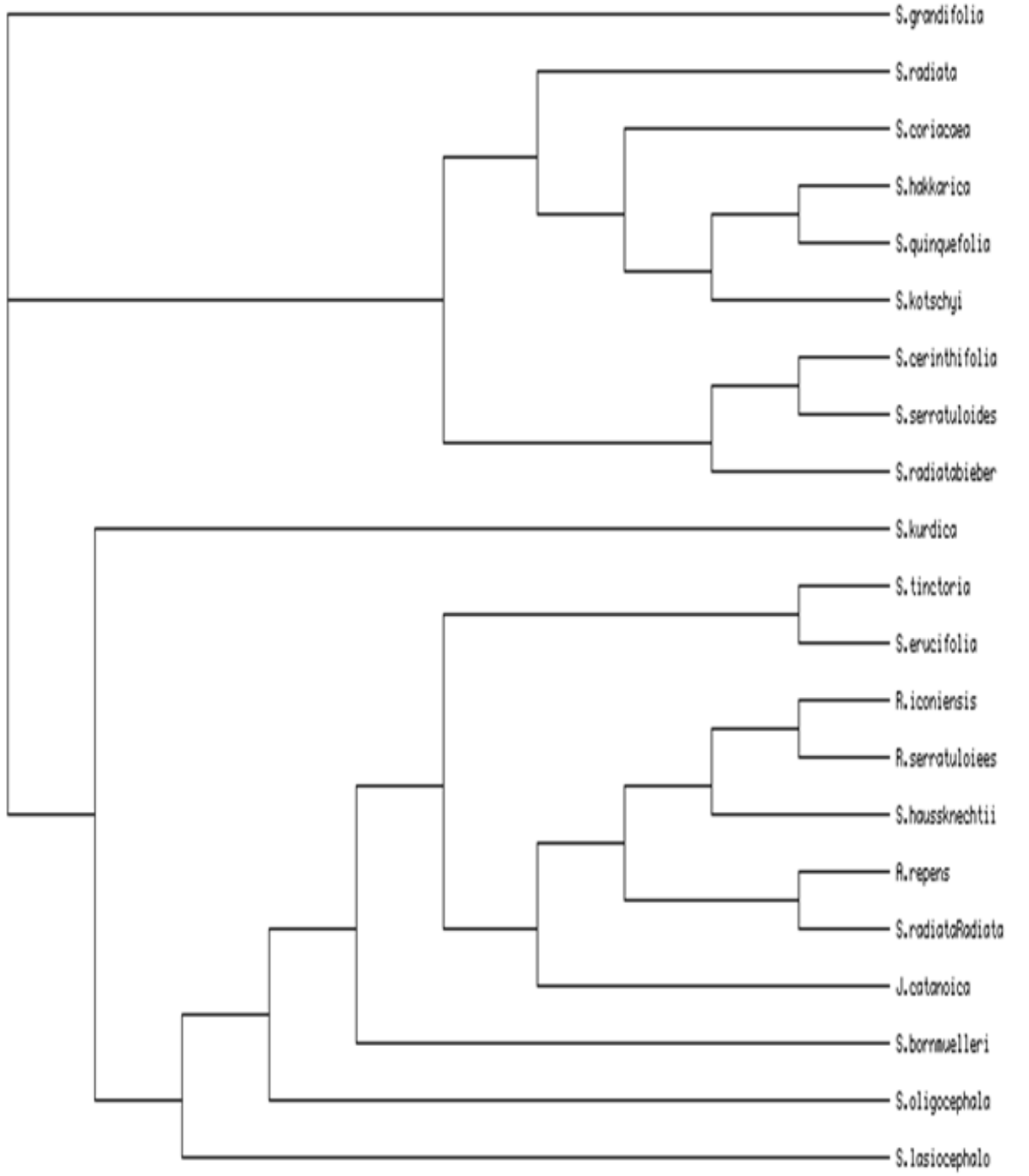
NJ analizi sonucu oluşan ağaç Şekil 18’de UPGMA analizi sonucu oluşan ağaç ise Şekil 17’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi NJ analizi sonucunda oluşan filogenetik ağaçtaki (Şekil 18) dal uzunlukları birbirinden farklıdır. Filogramdaki bu dal uzunluklarının farklı olması taksonlarda meydana gelen değişim miktarını gösterir. Şekil 18’deki ağaçta en fazla değişimin gözlemlendiği takson, dal uzunluğu en fazla olan *J. cataonica* taksonudur. Dal uzunluğu en kısa olan *S. radita* taksonu en az değişimin meydana geldiği taksondur.

UPGMA ağacı, parsimony ağaçlarından çok farklı bir topolojiye sahip olup *S. radiata subsp. radiata*’yı çok farklı bir konuma yerleştirmiştir (Şekil 17). Aynı şekilde NJ ağacı da bu farklılığı yansıtmamaktadır (Şekil 18).

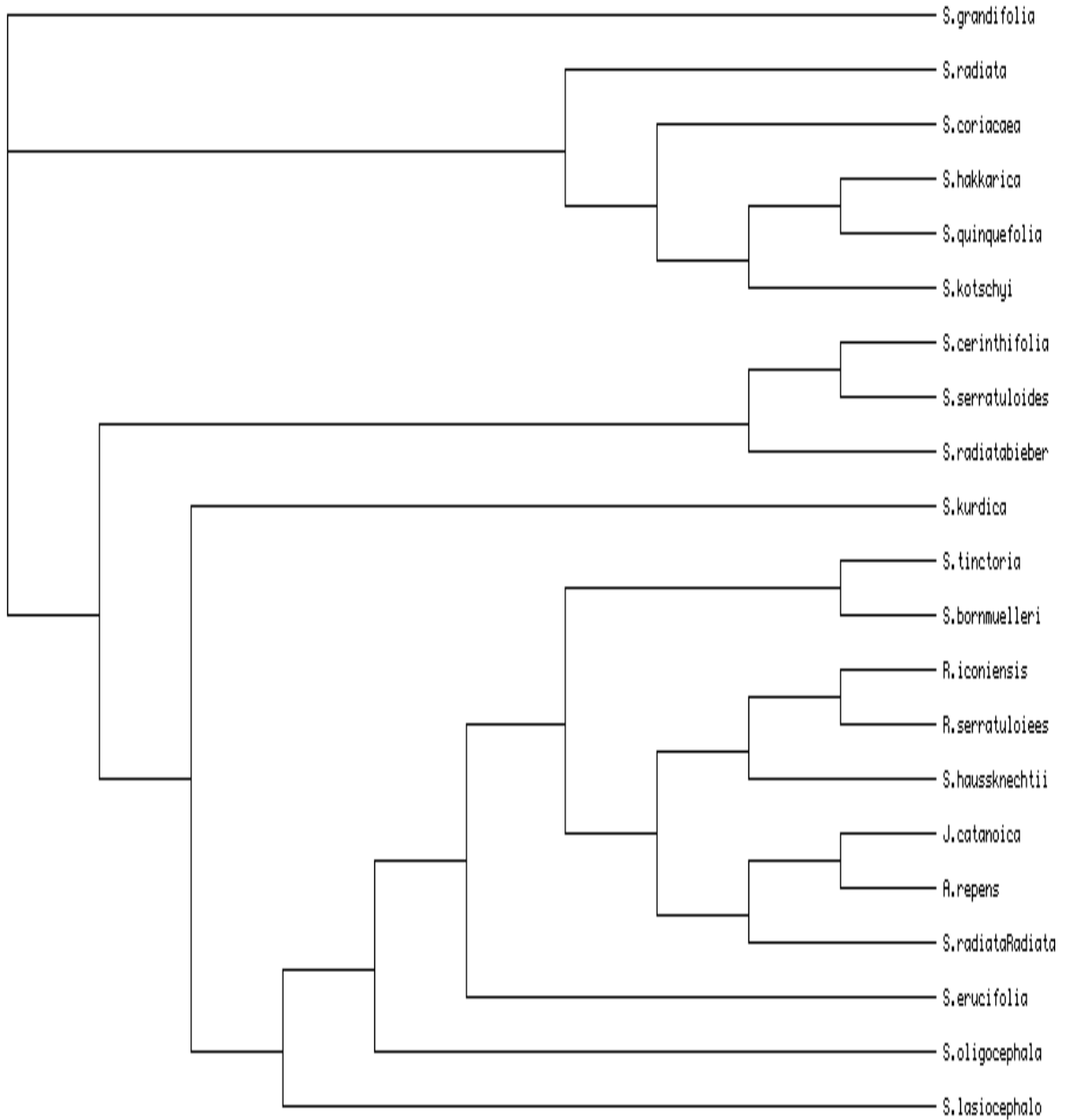
4.2 trnL-F bölgesi kullanılarak yapılan fiogenetik analiz;



Şekil 19 trnL-F bölgesinin Parsimoni Analizi Sonucu Oluşan 1 Numaralı Ağaç



Şekil 20 trnL-F bölgesinin Parsimoni Analizi Sonucu oluşan 500 Numaralı Ağaç

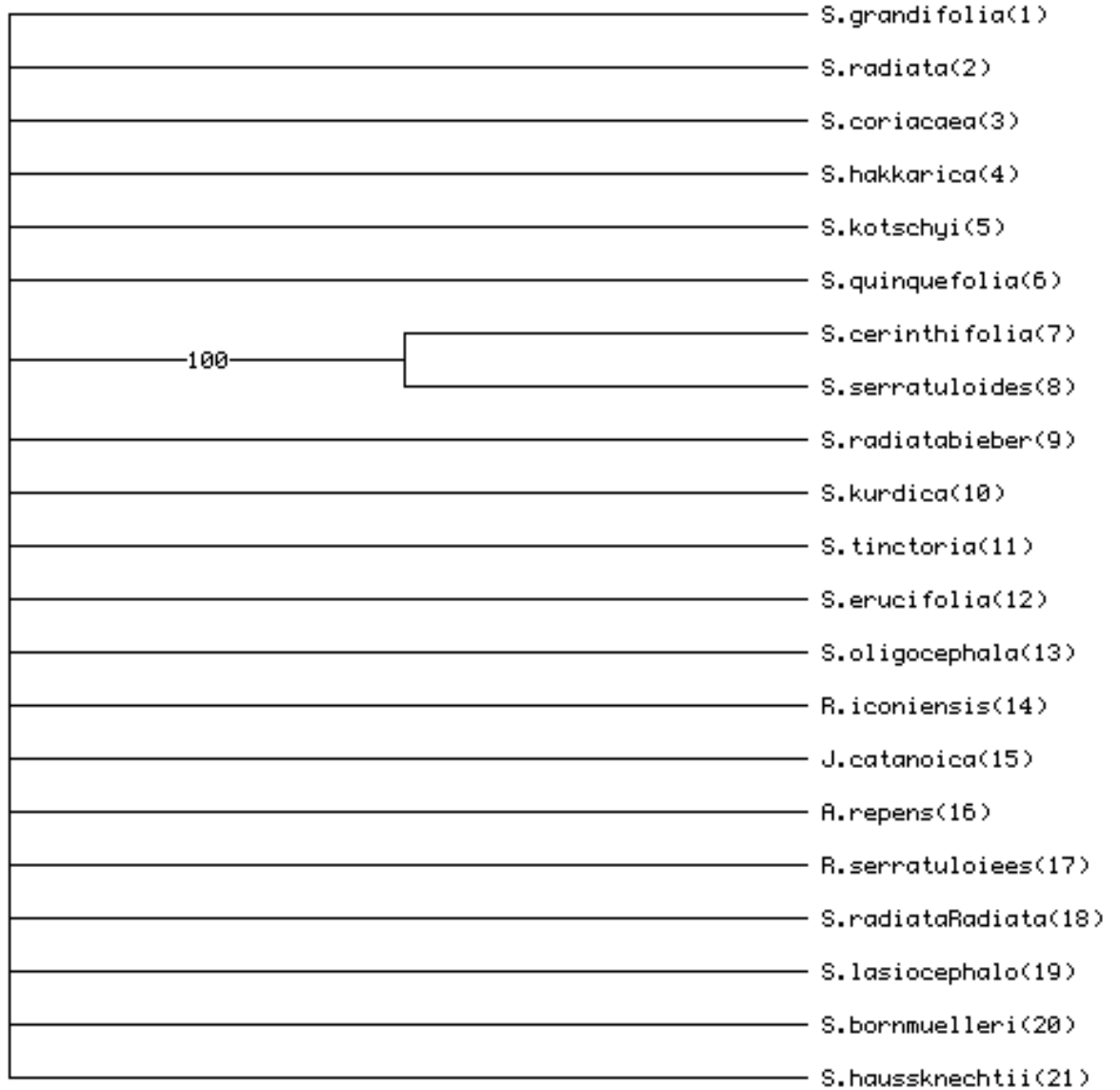


Şekil 21 *trnL-F* bölgesinin Parsimoni Analizi Sonucun Elde Edilen 1000 Numaralı Ağaç

Karakter temelli yöntemlerden Maksimum Parsimoni kriteri kullanılarak Branch and Bound algoritmasıyla araştırma yapıldı. Bu analiz için oluşturulacak maksimum ağaç sayısı 1000 olarak seçildi. Yapılan analiz sonucunda 1000 ağaç elde edildi. Arama sonucunda oluşan 1000 ağaçtan 1 numaralı ağaç, 500 numaralı ağaç ve 1000 numaralı ağaç olmak üzere toplam 3 tane ağaç seçildi. Şekil 19’da 1 numaralı ağaç, Şekil 20’de 500 numaralı ağaç ve Şekil 21’de 1000 numaralı ağaç verilmiştir.

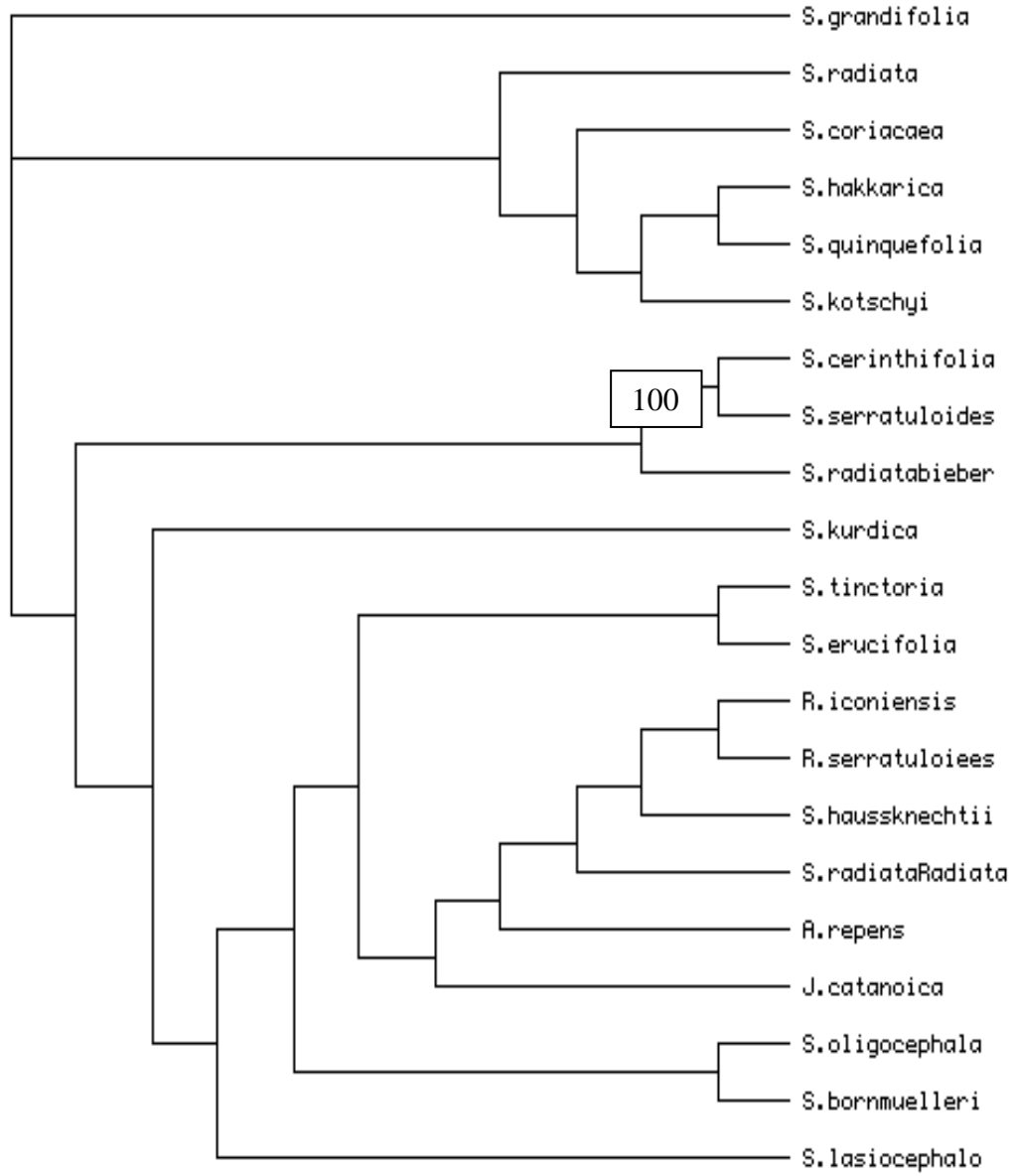
Yapılan analizde toplam 503 karakter incelenmiştir. Bu karakterlerden, 427 karakter sabit (constant) karakterli, 45 karakter değişken çıkmıştır. Parsimonik bilgi içeren karakter sayısı ise 31 çıkmıştır. Şekil 19, Şekil 20 ve Şekil 21'deki ağaçlarda dış grup olarak seçilen cinslerin taksonları *Serratula* cinsinin taksonlarından tam olarak ayrılmamıştır. Oluşan 1 numaralı (Şekil 19), 500 numaralı (Şekil 20) ve 1000 numaralı (Şekil 21) ağaçlarda dış gruplardan *R. iconiensis* ve *R. serratuloides* taksonları monofiletik taksonlar olarak gözükmemektedir ve *Serratula haussknechtii*'nin de bu taksonlarla parafiletik takson olduğunu görmekteyiz. *J. cataonica* ve *A. repens* taksonları da monofiletik taksonlardır. *S. radiata subsp. radiata* da bu taksonlarla parafiletik taksondur.

1000 numaralı ağaçta (Şekil 21) *S. tinctoria* taksonu ve *S. bornmuelleri* taksonunun monofiletik grup olduğunu görmekteyiz. 1 numaralı ağaçta ise (Şekil 19) *S. tinctoria* ve *S. erucifolia*'nın monofiletik grup olduğunu görmekteyiz.

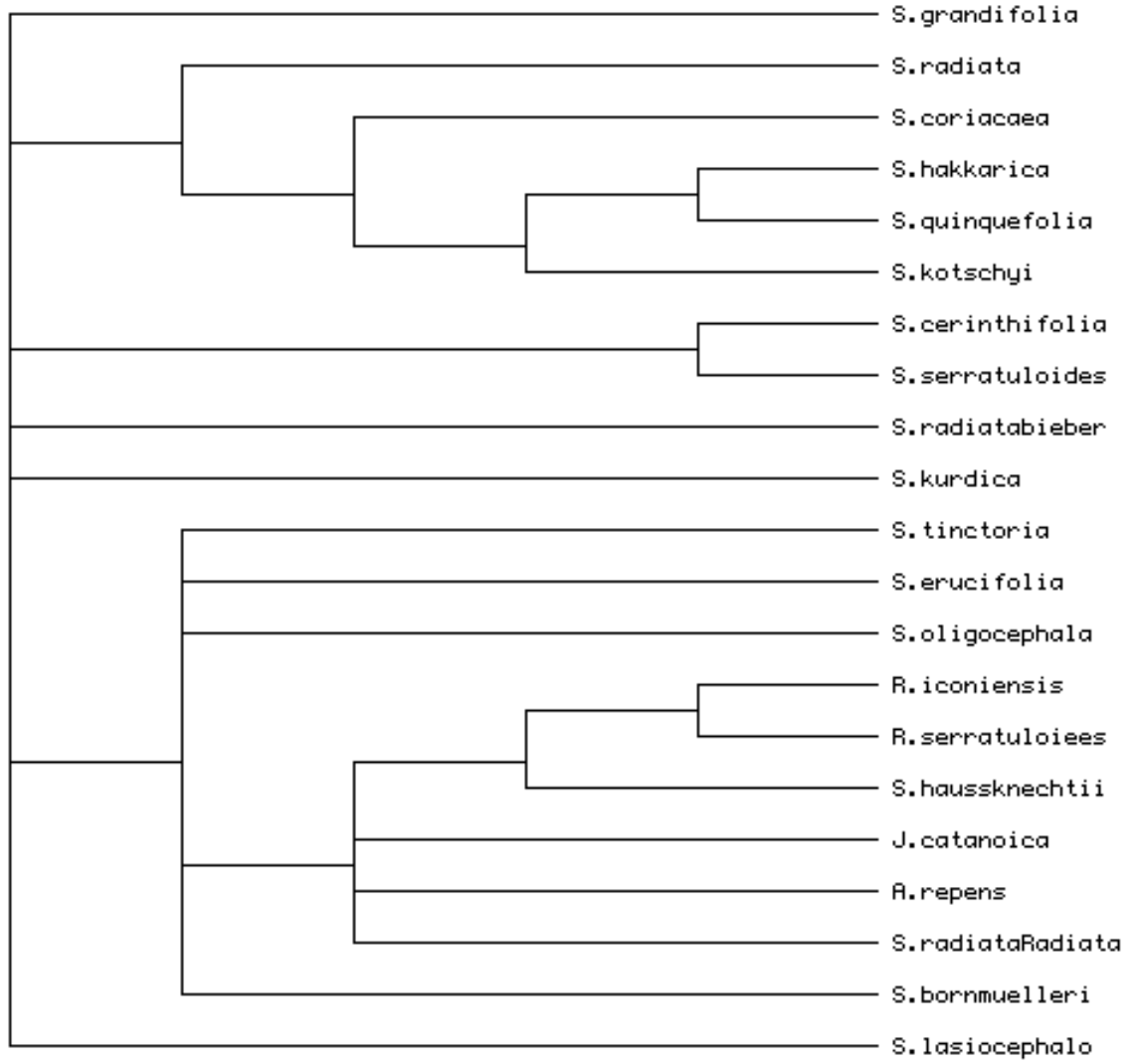


Şekil 22 *trnL-F* Bölgesinin Bootstrap Analizi Sonucu Oluşan Parsimoni Ağacı

Bu analizde (Şekil 22) toplam 503 karakter bulunmaktadır. Bu karakterlerden 427'si sabit, 45'i değişken, 31'i parsimony açısından anlamlı karakterlerdir. Bu analizde *S.cerintifolia* ve *S. serratuloides* monofiletik grup olarak görünmektedir. İki tason arasındaki dalın güvenilirlik oranı %100'dür. Bu iki takson arasındaki ilişki aynı şekilde ITS bölgesi ile yapılan filogenetik analizlerde de desteklenmiştir. Diğer taksonlar arasındaki dalların güvenilirliği %50'nin altında olduğundan dallar çökmüştür ve politomi oluşmuştur.



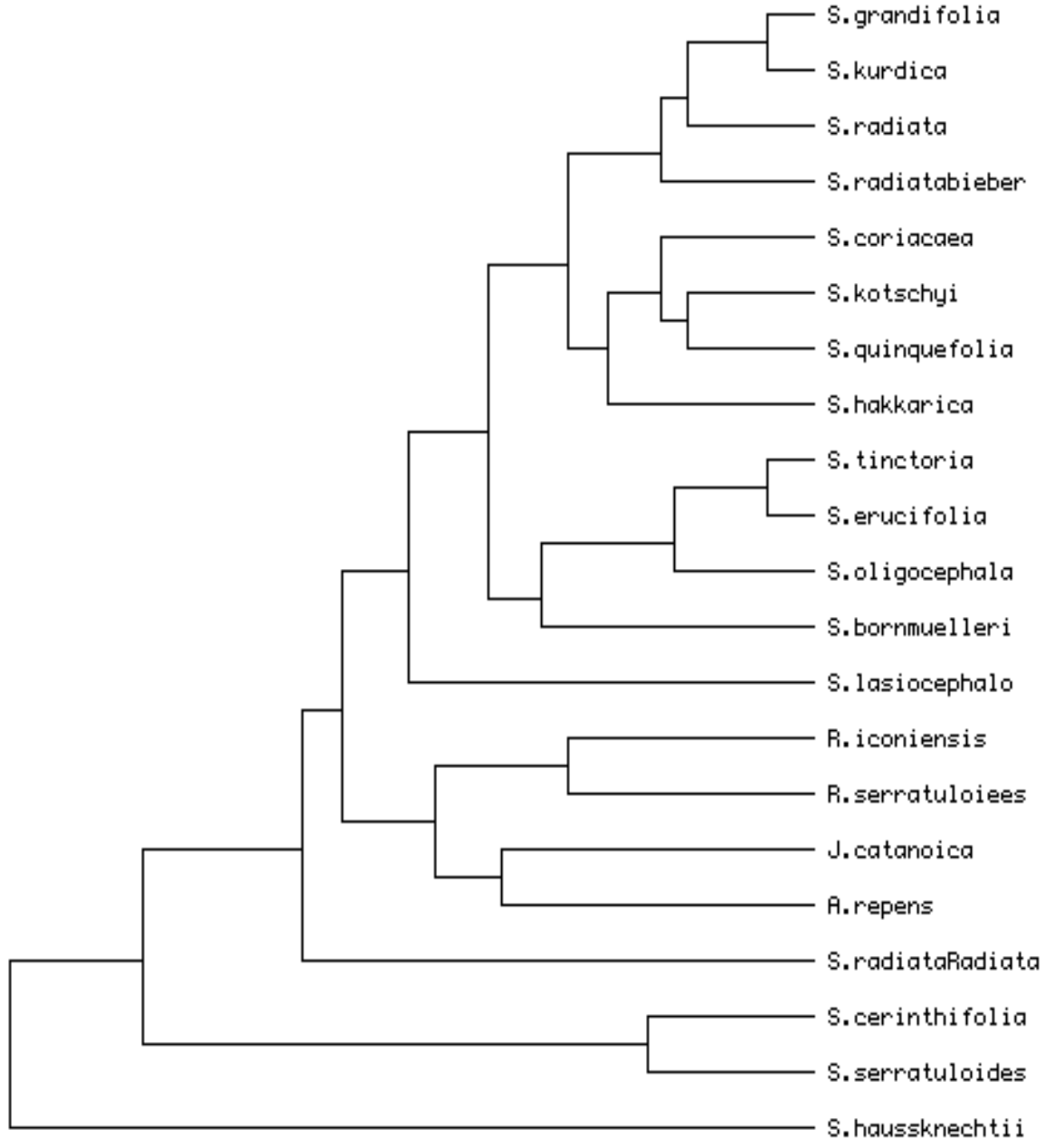
Şekil 23 *trnL-F* Bölgesinin Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş 1 Numaralı Parsimoni Ağacı



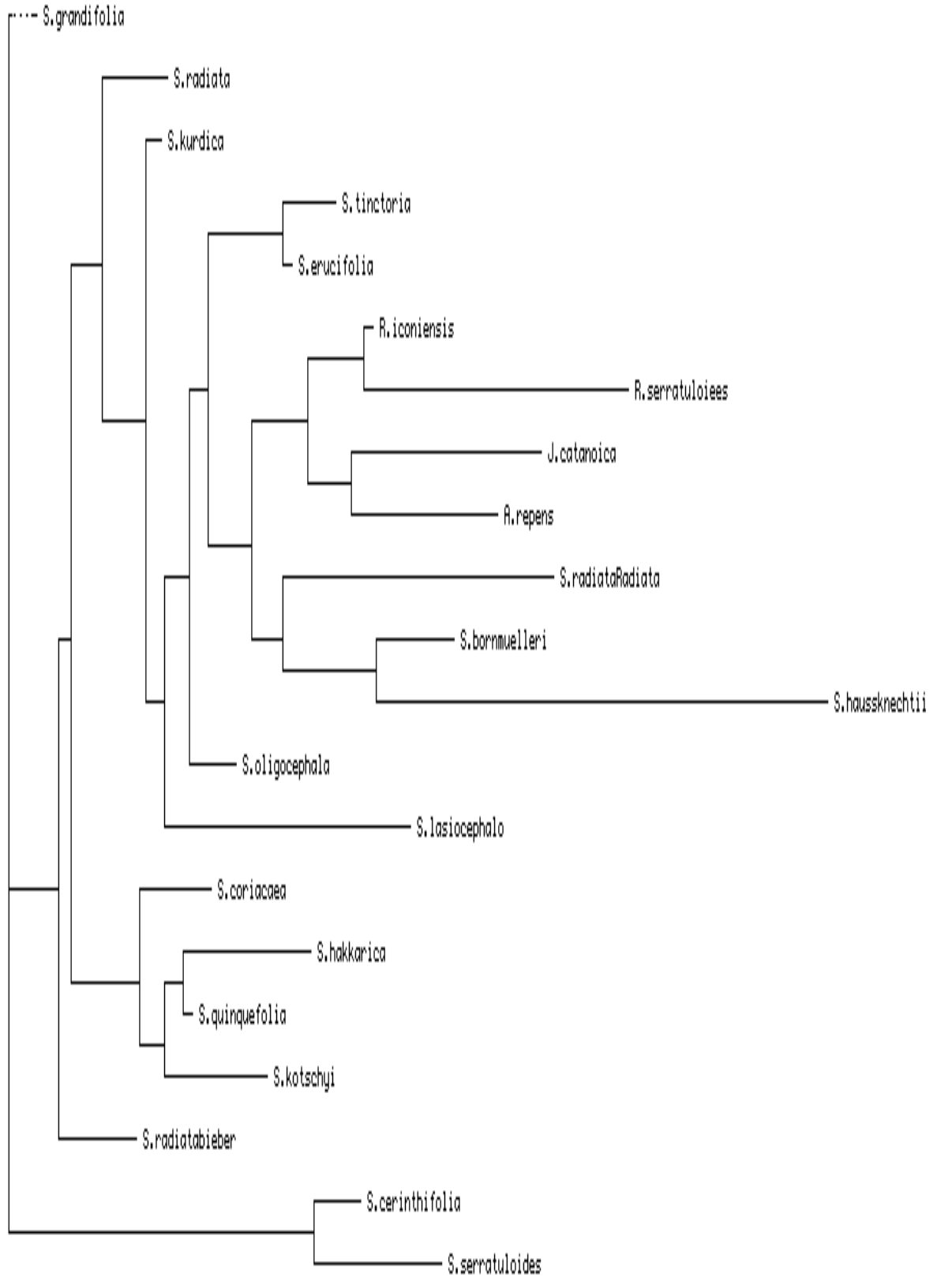
Şekil 24 *trnL-F* bölgesinin Parsimoni Sonucu Oluşan 1000 Ağacın Strict Konsensus Ağacı

Oluşan ağaçta (Şekil 24) dış gruplardan *R. İconiensis* ve *R. serratuloides* taksonları monofiletik taksonlar olarak çıkmıştır ve *S. haussknechtii*'nin de bu iki türe yakın akraba olduğunu görmekteyiz. *S. cerinthifolia* ve *S. serratuloides* monofiletik grup olarak gözükmektedir. *S. hakkarica* ve *S. quinquefolia* da monofiletik taksonlardır. *S.kotschyi* de bu iki takson ile monofiletiktir. Morfolojik verilere göre yapılan sınıflandırmada da *S.kotschyi* ve *S. hakkarica* taksonlarının birbirine çok benzediği gözlenmiş, hatta *S. hakkarica*'nın *S.kotschyi* ile aynı tür olduğu sanılmıştır. Fakat dallanmamış basit gövde yapısı, obkonikal kapituluma

sahip olması ve ince gövde yapısı ile *S.kotschyi*'den farklı bir takson olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 25 trnL-F bölgesinin UPGMA Analizi Sonucu Oluşan Ağaç



Şekil 26 *trnL-F* bölgesinin Neighbor-Joining (NJ) Analizi Sonucu Oluşan Ağaç

ITS bölgesinin verileriyle yapılan filogenetik analizde olduğu gibi, *trnL-F* bölgesinin verileriyle yapılan analizde de UPGMA ağacı, parsimony ağaçlarından çok farklı bir topolojide çıkmış, *S. radiata subsp. radiata*'yı çok farklı bir konuma yerleştirmiştir (Şekil 25). Aynı şekilde NJ ağacı da bu farklılığı yansıtmamaktadır (Şekil 26).

Şekil 26'da görüldüğü gibi NJ analizi sonucunda oluşan filogenetik ağaçtaki dal uzunluklarının birbirinden farklı olduğu gözlemlenmektedir. Filogramdaki bu dal uzunluklarının farklı olması taksonlarda meydana gelen değişim miktarını gösterir. Dal uzunluğu en fazla olan *S. haussknechtii* en fazla değişimin gözlemlendiği takson, dal uzunluğu en kısa olan *S. quinquefolia* en az değişimin gözlemlendiği taksondur. Sonuç olarak, dış grup olarak kullanılan taksonların yüksek düzeyde bootstrap değerleriyle iç gruptan ayrıldığı ve iç grubun monofiletik olduğu görülmüştür. Ayrıca iç gruptan sekiz takson diğer iç grup taksonlarından yakın zamanda net bir şekilde ayrılmıştır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Havey, M.J., "Phylogenetic relationships among cultivated *Allium* species from restriction enzyme analysis of chloroplast genome", *Theor. Appl. Genet.*, (1991) **81**, 752.
- [2] Yang, X. and Quiros, C., "Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers", *Theor. Appl. Genet.*, (1993) **86**, 205.
- [3] Baldwin, B.G. and Markos, S., "Phylogenetic Utility of the External Transcribed Spacer (ETS) of 18S–26S rDNA. Congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia*", *Mol. Phyl. Evol.*, (1999) **10**, 449.
- [4] Davis, P.H., *Flora of Turkey and the East Aegean Island*, 5, Edinburgh University, London, (1967).
- [5] Akman, Y., *Angiosperma, Palme Yayıncılık*, Ankara, (2007).
- [6] Dai, J.Q. and Hou, Z.F., "Sesquiterpenes and Flavonoids from *Serratula strangulata*", *J. of the Chinese Chem. Soc.*, (2001) **48**, 249.
- [7] Delbecque, J.P., Beydon, P., Chapuis, L. and Corio, M.F., "In vitro incorporation of radiolabelled cholesterol and mevalonic acid into ecdystreoid by hairy root cultures of a plant *Serratula tinctoria*", *Eur. J. Entomol.*, (1995) **92**, 301.
- [8] Delbecque, J.P., Beydon, P., Chapuis, L. and Corio, M.F., "Sterol and ecdysteroid profiles of *Serratula tinctoria*", *J. Inra Bordeaux.*, (2003) **86**, 95.
- [9] Bathori, M., Hunyadi, A. and Dinya, Z., "Monitoring the antioxidant activity of extracts originated from various *Serratula* species and isolation of

- flavonoids from *Serratula coronata*", *Depart. of Organic Chem.*, (2003) **15**, 90.
- [10] Tel, A. Z. and Tatlı, A., "Yeni floristlik kayıtlar", *D.Ü. F.B.E. Dergisi*, (2004) **7**, 113.
- [11] Özhatay, N., Kültür, Ş. and Aslan, S., "Check-list of additional taxa to the supplement flora of Turkey IV" *Bilim Teknik*, (2009) **33**.
- [12] Odinkova, V.N., Galyautdinova, I.V., Nedopekina, D.V., Khalilova, L.M., Shashkov, A.S. and Lafont, R., "Phytoecdysteroids from the juice of *Serratula coronata* L.", *Biol. Science*, (2001)
- [13] Elsevier, B.V., "Determination of the total flavonoid-content of *S. coronata*, *S. wolffii* and *S. tinctoria* by spectrophotometry", *J. Fitoterapia*, (2004) **75**, 162.
- [14] Semchenko, M. and Zobel, K., "The role of leaf lobation in elongation responses to shade in the rosette-forming forb *Serratula tinctoria*", *J. Institute of Botany and Ecology, University of Tartu*, (2007).
- [15] Martins, L., Hellwig, F., "Systematic position of the genera *Serratula* and *Klasea* within Centaureinae inferred from ETS and ITS sequence data and new combinations in *Klasea*", *I.A.P.T.*, (2005) **3**, 632.
- [16] Bissels, S., Hölzel, N. and Otte, A., "Population structure of the threatened perennial *Serratula tinctoria* in relation to vegetation and management", *I.A.V.S.*, (2004) **2**, 267.
- [17] Semaan, M.T. and Haber, R.M., "*Serratula oligocephala*, a new record for the flora of Lebanon", *Turk J Bot*, (2006) **31**, 75.

- [18] Mummenhoff, K., Franzke, A. and Koch, M., "Molecular phylogenetic of thlaspi Brassicaceae based on chloroplast DNA restriction site variation and sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA", *Cand. J. Botany*, (1997) **75**, 469.
- [19] Liu, J.Q., Gao, T.G., Chen, Z. D. and Lu, A. M., "Molecular phylogeny and biogeography of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Nannoglottis*", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, (2002) **23**, 307.
- [20] Graham, S.W. and Olmstead, R.G., "Systematics utility of 17 chloroplast genes for inferring the phylogeny of theb Angiosperms", *American Journal of Botany*, (2000) **11**, 87.
- [21] Baldwin, B., G. and Markos, S., "Phylogenetic utility congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia*", *Mol. Phyl. Evol.*, (1999) **10**, 449.
- [22] Froslev, T.G., Matheny, P.B. and Hibbett, D.S., "Lower Level Relationships in the mushroom genus *Cortinarius* a comparison of Rpb1, Rpb2, and ITS phylogenies", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, (2005) **37**, 602.
- [23] Fior, S., Karis, P.O., Casazza, G., Minuto, L. and Sala, F., "Molecular phylogeny of the Caryophyllaceae inferred from chloroplast matK and nuclear rDNA ITS sequences" *American Journal of Botany* (2006) **93**, 399.
- [24] Saiki R.K., Stoffel , G.D.H. and Erlich, H.A., " Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", *Science*, (1998) **239**, 487.
- [25] Angiolillo, A., Mencuccini, M. and Baldoni, L., "Olive Genetic Diversity Assessed Using Amplified Fragment Length Polymorphisms", *Theor Appl Genet.*, (1999) **98**,411.

- [26] Jones, N., “Markers and mapping; we are all geneticists now”, *New Phytol.*, (1991) **137**, 165.
- [27] Yıldırım, A. and Kandemir, N., *Genetik markörler ve Analiz Metotları*, Özcan, S.E., Gürel, M., Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, (2001).
- [28] Remi, A., Wattier, A.L.D., Barbara, A.W. and Maggs, C.A., "cpDNA-RFLP in *Ceramium* (Rhodophyta) Intraspecific Polymorphism and species level phylogeny", *American Journal of Botany*, (2001) **88**, 1209.
- [29] Motomi, T.Y., King, R.M., Watanabe, K., Sanae, J.Y. and Crawford, D.J., "Molecular phylogeny of Eupatorieae (Asteraceae) estimated from Cpdna RFLP and ITS implication for the polyploid origin hypothesis of the tribe", *J. of Plant Research*, (2000) **113**, 91.
- [30] Rosa, R., Angiolillo, A., Guerrero, C., Pellegrini, M., Rallo, L., Besnard, G., Berville, A. and Martin, A., "A first linkage map of Olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR Markers", *Theor Appl. Genet.*, (2003) **106**, 1273.
- [31] Erlich, H.A., *PCR Technology*, Stockton Press, (1989).
- [32] Welsh J., “Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers”, *J. Nuc. Acids Research*, (1990) **18**, 7213.
- [33] Staub, J.E., Sequen, F.C. and Gupta, M., “Genetic markers, map construction and their application in plant breeding”, *Hort Science*, (1996) **31**, 729.
- [34] Babalola, O., "Molecular techniques: an overview of methods for the detection of bacteria", *African Journal of Biotechnology*", (2003) **2**, 710.
- [35] Rafalski, J.A., “Genetic diagnostic in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines” *Trends Genet.*, (1993) **93**, 275.

- [36] Tingey, S.V. and Tufa, J.P., "Genetic Analyses with Random Amplified Polymorphic DNA Markers", *Plant Physiol*, (1993) **101**,349.
- [37] Bardakçı, F., "Genetic Analyses with Random Amlified Polymorphic DNA (RAPD) Markers", *Turk. J. Biol.*, (2001) **25**, 185.
- [38] Babaoglu, S., Açık, L., Çelebi, A.and Adıgüzel, N., "Molecular analysis of Turkish *Alyssum* L. (Brassicaceae) species by RAPD and SDS-Page methods", *G.Ü., Fen Bilimleri Dergisi*, (2004) **17**, 25.
- [39] Zabeau, M., Amplified fragment lenght polymorphism (AFLP), European Patent Application, (1993).
- [40] Okogbenin, J.M. and Fregene,M., "Development of SSR markers for the Cassava molecular genetic map", *Euphytica*, (2006) **147**, 433.
- [41] Ergül, A., Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs) Genomik DNA Parmakizi Analizleri ile Moleküler Karakterizasyon, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi, (2000).
- [42] Onarıcı, S., "Protein and DNA in Systematic Biology", *Turkish Journal Of Biology*, (2003) **27**, 47.
- [43] İetjiewicz, E., Rafalski, A., and Labuda, D., "Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification" *Genomics*, (1994) **20**,176.
- [44] Fang, D.Q., "Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers", *Theor Appl Genet.*, (1997) 95, 408.
- [45] Akkuş, S., DNA parmak izi ve adli biyoloji kongresi, İstanbul, (2006).

- [46] Malyshev, S., "Molecular markers in mapping plant genome", *Molecular Biology*, (1997) **31**, 163.
- [47] Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F. and Donoghue, M.J., "The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny", *Ann. Mo. Bot. Gard*, (1995) **82**, 247.
- [48] Goel, S., Raina, S.N. and Ogihara, Y., "Molecular evolution and phylogenetic ITS sequences of nuclear ribosomal DNA in the *Phaseolus vigna* complex", *Mol. Biol. Evol.*, (2002) **22**, 1.
- [49] White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J., Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, Academic Press Inc, San Diego, USA, (1990).
- [50] Cerbah, M., Souza-Chies, T., Jubier, M.F., Lejeune, B. and Siljak-Yakovlev, S., "Molecular Phylogeny of the Genus *Hypochaeris* Using Internal Transcribed Spacers of Nuclear rDNA: Inference for Chromosomal Evolution", *Mol. Biol. Evol.*, 15/3, (1998) **15**, 345.
- [51] Eddie, W.M.M., Gaskin, T.S.J., Haberle, R.C. and Jansena, R.K., "Phylogeny of Campanulaceae S. Str. Inferred from Its Sequences of Nuclear Ribosomal DNA", *Annals of the Missouri Botanical Garden*, (2003) **90**, 554.
- [52] Dayle, E., Saar, N.O.P., Sorensen, P.D. and Duvall, M.R., "Angiosperm DNA Contamination by Endophytic Fungi: Detection and Methods of Avoidance", *Plant Molecular Biology Reporter*, (2001) **19**, 249.
- [53] Baldwin B.G., "Phylogenetic Utility of the Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: an Example from the Compositae" *Mol. Biol. Evol.*, (1992) **1**, 3.

- [54] Freeman S. and Herron, J.C., *Evrimsel Analiz*, Çıplak, B., Basıbüyük. H. H., Karaytuğ, S., and Gündüz, İ., Palme Yayıncılık, (1999).
- [55] Soltis, D.E., Soltis, P.S., Nicrent, D.L., Johnson, L.A., Hahn, W.J., Hoot, S.B., Sweere, J.A., Kuzoff, R.K., Kron, K.A., Chase, M.W., Swensen, S.M., Zimmer, E.A., Chaw, S.M., Gillespie, L.J., Kress, W.J. and Sytsma, K.J., "Angiosperm Phylogeny Inferred from 18 S Ribosomal DNA Sequences", *Ann. Miissouri Bot. Garden*, (1997) **84**, 381.
- [56] Pillay, M., Mazzella, C., "Chloroplast Genome Differences between *Paspalum Dilatatum* Poir and the Related Species *P. Notatum* Flugge", *Theoretical and Applied Genetics*, (1997) **95**, 696.
- [57] Doebley, J. and Blanton, W.R., A., "Restriction Site Variation in the *Zea* Chloroplast Genome", *Genetics*, (1987) **117**,139.
- [58] Olmstead, R.G., Kim, K.J., Jansen, R.K., and Wagstaff, S.J., "The Phylogeny of the Asteridae Sensu Lato Based on Chloroplast Ndhf Gene Sequences", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, (2000) **16**, 96.
- [59] Bayer, R. J., Soltis, D.E., Soltis, P.S., "Phylogenetic inferences in *Antennaria* (Asteraceae: Gnaphalieae: Cassiniinae) based on sequences from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS)" *American Journal of Botany*, (1996) **83**, 516.
- [60] Deutch, A.Y., Franklin, J., Levy, S., Wallace, D.C. and Zhang, J., "Profiling Genes Related to Mitochondrial Function in Mice Treated with N-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (2003) **308**, 197.
- [61] Wallace, D.C., "Mitochondrial Defects in Cardiomyopathy and Neuromuscular Disease", *Am. Hearth J.*, (2000) **139**, 70.

- [62] Kartavtsev, Y.P., Jung, S.O., Lee, Y.M., Byeon, H.K. and Lee, J.S., "Complete Mitochondrial Genome of the Bullhead Torrent Catfish, *Liobagrus obesus* (Siluriformes, Amblycipididae): Genome Description and Phylogenetic Considerations Inferred from the Cyt B and 16s Rrna Genes", *Gene*, (2007) **396**, 13.
- [63] Wallace, D.C., "A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine", *Annual Review of Genetics*, (2005) **39**, 359.
- [64] Su, B., Wang, Y.X., Lan, H., Wang, W. and Zhang, Y., "Phylogenetic Study of Complete Cytochrome B Genes in Musk Deer (Genus *Moschus*) Using Museum Samples", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, (1999) **12**, 241.
- [65] Zhang, D. and Sang, T., "Physical mapping of ribosomal RNA genes in *Peonies* (*Paeonia*, *Paeoniaceae*) by fluorescent in situ hybridization: Implications for Phylogeny and Concerted Evolution", *American Journal of Botany*, (1999) **86**, 735.
- [66] Maxam A., "A new method of sequencing DNA" *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (1977) **74**,560.
- [67] Sanger, F. and Coulson, N.S., "DNA sequencing with chain terminating inhibitors", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (1977) **74**, 5467.
- [68] Sambrook, J.F. and Maniatis, E.F., *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory Press, New York, (1989).
- [69] Klug, S.W. and Cummings, W.R., *Concept of Genetics*, Prentice Hall, New Jersey (2000).

- [70] Thompson, J.D., Higgins, D.G, and Gibson, T.J., “CLUSTALW: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice”, *Nucleic Acid Research*, (1994) **22**, 4673.
- [71] Notredame, C.H., “Saga, sequence alignment by genetic algorithm.”, *Nucleic Acid Research*, (1996), **24**, 1515.
- [72] Saitou, N. and Imanishi, T. “Relative efficiencies of the fitch-margoliash, maximum parsimony, maximum-Likelihood, minimum-evolution and neighbour-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree” *Mol Biol Evol.*, (1989) **6**, 514.
- [73] Başbüyük, H. H., Bardakçı, F., Belshaw, R., Quicke, D. L. J., *Phylogenetic Systematics*, Önder Matbaa, Sivas, (2000).
- [74] Mount, D., *Bioinformatics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Chapter 7, Phylogenetic prediction, (2001) 281.
- [75] Felsenstein, J., “Estimation of hominoid phylogeny from a DNA hybridization data set”, *Molecular Evolution*, (1987) **26**, 123.
- [76] <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>, (2011).
- [77] *MR BAYES*. <http://mrbayes.csit.fsu.edu/tr.>, (2011).
- [78] *PAUP*, <http://conferences.computer.org/Bioinformatics>, (2011)
- [79] Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., “The Principles and Practice of Numerical Classification” *Numerical Taxonomy*, (1973).
- [80] *PHYLIP*. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>, (09.01.2011)

6. EKLER

6.1 ClustalW'da hizalanmış ITS5A nrDNA dizisinin Veri Matrisi

```
S.grandifolia -----CAAGGTTTCC-GTAGGTGAACCTGC--GGAAGG
S.serinthifolia -----GGTTTCC-GTAGGTGACCTGC--GGAAGG
S.radiatabieber -----AAACAAGGTTTCC-GTAGGTGA-CCTGC--GGAAGG
S.hakkarica -----AAACAAGGTTTCC-GTAGGTGA-CCTGC--GGAAGG
S.radiataradiata -----GTAAAAATAAGTTTTTGTGGTGA-CCTGCCGGAGAGG
S.radiata -----ACAAGGTTTCC-GTAGGTGAACCTGC--GGAAGG
S.hausnecti -----TTTCCGTAGGTGAACCTGC--GGAAGG
S.kotschy -----AAACAAGGTTTCC-GTAGGTGAACCTGC--GGAAGG
S.kurdica -----AATCAAGGTTTCC-GTAGGTGA-CCTGC--GGAAGG
S.oligocephala -----AAACAAGGTTTCC-GTAGGTGA-CCTGC--GGAAGG
S.lasiocephala -----ACAAGGTTTCC-GTAGGTGAACCTGC--GGAAGG
S.quinguefolia -----TAAGGTC-----GAAG-TCTGC--GGAAGG
S.serratuloides -----ACAAGGTTTCC-GTAGGTGA-CCTGC--GGAAGG
S.ericufolia -----CGTAACAAGGTTTCC-GTAGGTGAACCTGC--GGAAGG
A.repens -----TAACAAGGTTTCC-GTAGGTGAACCTGC--GGAAGG
R.serratuloides -----TTTCC-GTAGGTGAACCTGC--GGAAGG
R.iconiensis -----TAGGTGAACCTGC--GGAAGG
S.bornmuelleri -GTCTTATCATTTTTGAGAGAGTCTACAGTTTCC-GTAGGTGA-ACTGC--GGAAGG
S.coriacaea -----GGTTCCGGTAGGTGA-CCTGCCGGAAGG
J.catanoica -----GTAACAAGGTTTCC-GTAGGTGAACCTGC--GGAAGG
S.tinctoria TCCTTTCCACTTTTTGAGAGAGAAGTCTACAAGTTTCCGTA-GTGAACCTGC--GGAAGG
S.grandifolia ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCACAGCAGAACGACCCG-TGAA--CACGTAATCACAACC
S.serinthifolia ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCACAGCAGAACGACCCG-TGAA--CACGTAATCACAACC
S.radiatabieber ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCACAGCAGAACGACCCG-TGAA--CACGTAATCACAACC
S.hakkarica ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCACAGCAGAACGACCCG-TGAA--CACGTAATCACAACC
S.radiataradiata ATCTGATTGTCGAATTGCCTGCACAGCAGAACGACCCG-TGAA--CACGTAATCACAACC
S.radiata ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCACAGCAGAACGACCCG-TGAA--CACGTAATCACAACC
S.hausnecti ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCACAGCAGAACGACCCG-TGAA--CACGTAATCACAACC
S.kotschy ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCATAGCAGAACGACCCG-TGAA--CACGTAATCACAACC
S.kurdica ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCACTG---AACGACCCG-TGAA--CACGTAATCACAACC
S.oligocephala ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCACTG---AACGACCCG-TGAA--CACGTAATCACAACC
S.lasiocephala ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCACAGCAGAACGACCCG-TGAA--CATGTAATCACAACC
S.quinguefolia ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCACAGCAGAACGACCCG-TGAA--CACGTAATCACAACC
S.serratuloides -TC--ATTGTCGAA--GCCTGCACAGCAGAACGACCCG-TGAA--CACGTAATCACAACC
S.ericufolia ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCACAGCAGAACGACCCG-TGAA--CACGTAATCACAACC
A.repens ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCACAGCAGAACAACCCG-TGAA--CATGTAATCACAATA
R.serratuloides ATC--ATTGTCGAA--ACCTGCACAGCAGAACAACCCG-TGAA--CATGTAATCACAATC
R.iconiensis ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCACAGCAGAACGACCCG-TGAA--CATGTAATCATAACC
S.bornmuelleri ATC--ATTGTCGAA--CCTGCACAGCAGAACGACCCG-TGAA--CACGTAATTACAACC
S.coriacaea GTC--ATTGTCGAA--GCCTGCACAGCAGAACGACCCGGTGAA--CAAGTAATCACAACC
J.catanoica ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCATAGCAGAACGACCCG-TGAA--CACGTAATCACAACA
S.tinctoria ATC--ATTGTCGAA--GCCTGCACAGCAGAACGACCCGTGAAACCATGTAATCACAACC
S.grandifolia -GGGTGTCGT-GGGATCGGGTGTGAGCCT--GAGCC-CTG-CGATGCTCGCCG---CCAT
S.serinthifolia -GGGTGTCGT-GGGATCGGGTGTGAGCCT--GAGCC-CTG-CGATGCTCGCCG---CCAT
S.radiatabieber -GCGTGTCTGT-GGGATCGGGTGTGAGCCT--GAGCC-CTG-CGATGCTCGCCG---CCAT
S.hakkarica -TGGTGTCTGT-GGGATCGGGTGTGAGCCT--GAGCC-CTG-CGATGCTCGCCG---CCAT
S.radiataradiata -GCGTGTCTGT-GGGATCGGGTGTGAGCCT--GAGCC-CTG-CGATGCTCGCCG---CCAT
S.radiata -GCGTGTCTGT-GGGATCGGGTGTGAGCCT--GAGCC-CTG-CGATGCTCGCCG---CCAT
S.hausnecti -GCGTGTCTGT-GGGATCGGGTGTGAGCCT--GAGCC-CTA-CGATGTGCGCCG---CCAT
S.kotschy -GGGTGTCGT-GGGATCGGGTGTGAGCCT--GAGCC-CTG-CGATGCTCGCCG---CCAT
S.kurdica -GGGTGTCGT-GGGATCAGGTGTGAGCCT--GAGCC-CTA-CGATGCTCGCCG---CCAT
S.oligocephala -GGGTGTCGT-GGGATCAGGTGTGAGCCT--GAGCC-CTA-CGATGCTCGCCG---CCAT
S.lasiocephala -GGGTGTCGT-GGGATCGGGTGTGAGCCT--GAGCC-CTA-CGATGCTGCGCCG---CCAT
S.quinguefolia -GGGTGTCGT-GGGATCGGGTGTGAGCCT--GAGCC-TTA-CGATGCTCGCCG---CCAT
S.serratuloides -GGGTGTCGT-GGGATTGGGTGTGAGCCT--GAGCC-CTG-CGATGCTGCGCCG---CCAT
S.ericufolia -GCGTGTCTGT-GGGATCGGGTGTGAGCCT--GAGCC-CTG-CGATGCTCGCCG---CCAT
A.repens -GGGTGTCGT-GGGATTGGGTGTGAGCCT--TAGTC-CTG-CGATGCTCGTCG---GCAC
R.serratuloides -GGGTGTCGT-GGGATTGGGTATGAGCCT--TAGTC-TTG-CAATGCTCGTCG---GCAT
R.iconiensis -GGGTGTCGT-GAGATTGGGTGTGAGCCT--GAGCC-TTG-CGATGCTCGTCG---ACAT
S.bornmuelleri -GGGTGTCGT-GGGATCGGGTGTGAGCCT--GAGCCATG-CGATGCTGTGTCGA--GCAT
S.coriacaea TGGGTGTCGT-GGGATCGGGTGTGAGCCT--GAGCCCTTG-CGATGCTCGCCG---CCAT
J.catanoica -GGGTGTCGCGGGGTGAGCCT--GGTCC-TCG-TGATGCTTTGCTG--GCAT
S.tinctoria CGGGTGTCGT-GGGATCGGGTGTGAGCCTGAAGCCCATATCGATGCTCGCCGACCCAT
S.grandifolia GCGTGCAA-GGTGCCTATCTTT-AGGCATCGAGG-ACGTTG-TGTGCG-GCA-CAAAAA-C
S.serinthifolia GCGTGCAA-GGTGCCTATCTTT-AGGCATCGAGG-ACGTTG-TGTGCG-GCA-CAAAAA-C
S.radiatabieber GCGTGCAA-GGTGCCTATCTTT-AGGCATCGAGG-ACGTTG-TGTGCG-GCA-CAAAAA-C
```

S. hakkarica GCGTGCAA-GGTGCCTATCTTT-AGGCATCGAGG-ACGTTG-TGTGCG-GCA-CAAAAA-C
S. radiataradiata GCGTGCAA-GGTGCCTATCTTT-AGGCATCCAGG-ACGTTG-TGTGCG-GCA-CAAAAA-C
S. radiata GCGTGCAA-GGTGCCTATCTTT-AGGCATCGAGG-ACGTTG-TGTGCG-GCA-CAAAAA-C
S. hausnecti GCGTGCAA-GGTGCCTATCTTT-AGGCATCGAGG-ACGTTG-TGTGCG-GCA-CAAAAA-C
S. kotschy GCGTGCAA-AGTGCCTATCTTT-AGGCATCGAGG-ACGTTG-TGTGCG-GCA-CAAAAA-C
S. kurdica GCGTGCAA-GGTGCCTATCTTT-AGGCATCGAGG-ACGTTG-TGTTG-GCA-CAAAA--C
S. oligocephala GCGTGCAA-GGTGCCTATCTTT-AGGCATCGAGG-ACGTTG-TGTTG-GCA-CAAAA--C
S. lasiocephala GCGTGCAA-GGTGCCTATCTTT-AGGCATCGAGG-ATGTTG-TGTGCG-GCA-CAAAAA-C
S. quinquefolia GCGTGCAA-GGTGCCTATCTTT-AGGCATCGAGG-ACGTTG-TGTGCG-GCA-CAAAAA-C
S. serratuloides GCGTGCAA-GGTGCCTATCTTTTAGGCATCGAGG-ACGTTG-TGTGCG-GCA-CAAAAA-C
S. ericufolia GCGTGCAA-GGTGCCTATCTTT-AGGCATCGAGG-ACGTTG-TGTGCG-GCA-CAAAAA-C
A. repens GCGTGCAA-GGTGCCTATCTTT-AGGCATCGTTCG-ATGTTT-TGTGCG-GCA-CAAAAA-C
R. serratuloides GCGTCTAA-GGTGCTTATCTTT-AGGCACCATCG-ATGTTT--GTCG-GCA-CAAAAA-C
R. iconiensis GCGTGCAA-GGTGCCTATATTT-AGGCATCGTGG-ACGTTG-TGTCA-GCA-CAAAAA-C
S. bornmuelleri TCGTGCAA-GGCGCCTATCTTT-AGGCATCGTGG-ACGTTG-TGTGCGTCA-CAAAAC-C
S. coriaca GCGTGCAA-GGTGCCTATCTTT-AAGGATCGAGG-AAGTTG-TGTGCG-GCA-CAAAAA-C
J. catanoica GCATGCAT-GGTGTTTCTTGCG-AGGCATGTTG-TGTTG-GCA-CGAAAACA
S. tinctoria GCATTCAAAGGTGCCCTTTTCATAGGCATTGAGGGATGTTGGTGTGGGTATCAAAAAAC
S. grandifolia AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
S. serinthifolia AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
S. radiatabieber AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
S. hakkarica AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
S. radiataradiata AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
S. radiata AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
S. hausnecti AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACATAACTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
S. kotschy AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
S. kurdica CAAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
S. oligocephala CAAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
S. lasiocephala AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
S. quinquefolia AAACCCGGCACGGTATGTGCCAAGGAAAATAAAACTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
S. serratuloides AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
S. ericufolia AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
A. repens AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
R. serratuloides AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
R. iconiensis AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAATTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
S. bornmuelleri AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
S. coriaca AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGTGCGTCTCGTGTG
J. catanoica AACCCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACATAAGAAGGGTGCGTCCCGTGTG
S. tinctoria AAACCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTCAGAAGGGTGCGTCTCTGTG
S. grandifolia CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCAATAA-CCATAAACGACTC-TCGG
S. serinthifolia CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCAATAA-CCATAAACGACTC-TCGG
S. radiatabieber CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCAATAA-CCATAAACGACTC-TCGG
S. hakkarica CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCAATAA-CCATAAACGACTC-TCGG
S. radiataradiata CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCAATAA-CCATAAACGACTC-TCGG
S. radiata CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCAATAA-CCATAAACGACTC-TCGG
S. hausnecti CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCAATAA-CCATAAACGACTC-TCGG
S. kotschy CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCAATAA-CCATAAACGACTC-TCGG
S. kurdica CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCAATAA-CCATAAACGACTC-TCGG
S. oligocephala CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCAATAA-CCATAAACGACTC-TCGG
S. lasiocephala CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCAATAA-CCATAAACGACTC-TCGG
S. quinquefolia CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCAATAA-CCATAAACGACTC-TCGG
S. serratuloides CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCAATAA-CCATAAACGACTC-TCGG
S. ericufolia CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCAATAA-CCATAAACGACTC-TCGG
A. repens TCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCATTAA-CCATAAACGACTC-TCGG
R. serratuloides TCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCATTAA-CCATAAACGACTC-TCGG
R. iconiensis TCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCATTAA-CCATAAACGACTC-TCGG
S. bornmuelleri TCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCATTAA-CCATAAACGACTC-TCGG
S. coriaca CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCATTAA-CCATAAACGACTC-TCGG
J. catanoica CCCCCTTTTCGGTGTGCGCATGGGTCGTGCTCTCATTAAACCATAAACGACTC-TCGG
S. tinctoria CCCCCTTTTCGGTGTGACACACGGGTCGTGGCCTCTCATAAACCCATAAACGACTCCTCGA
S. grandifolia CAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTG
S. serinthifolia CAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTG
S. radiatabieber CAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTG
S. hakkarica CAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTG
S. radiataradiata CAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTG
S. radiata CAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTG
S. hausnecti CAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTG
S. kotschy CAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTG
S. kurdica CAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTG
S. oligocephala CAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTG
S. lasiocephala CAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTG
S. quinquefolia CAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTG
S. serratuloides CAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCKATACCTGGTGTG
S. ericufolia CAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCKATACCTGGTGTG
A. repens CAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGGTGTG

S.hausnecti GGCCTAAAAAGGAGTCCCTTTGGCGGACGC-ACGGCTAGTGGTGGTTGTCA-AGGCCTT
S.kotschyi GGCCTAAAAAGGAGTCCCTTTGGCGGATGC-ACGGCTAGTGGTGGTTGTCA-AGGCCTT
S.kurdica GGCCTAAAAAGAG--TCCCTTTGTTCGGACGC-ACGGCTAGTGGTGGTTGTCA-AGGCCTT
S.oligocephala GGCCTAAAAAGAG--TCCCTTTGTTCGGACGC-ACGGCTAGTGGTGGTTGTCA-AGGCCTT
S.lasiocephala GGCCTAAAAAGGAGTCCCTTTGGCGGATGC-ACGGCTAGTGGTGGTTGTCA-TGGCCTT
S.quinguefolia GGCCTAAAAAGGAGTCCCTTTGGCGGACGC-ACGGCTAGTGGTGGTTGTCA-AGGCCTT
S.serratuloides GGCCTAAAAAGGAGTCCCTTTGGCGGACGC-ACGGCTAGTGGTGGTTGTCA-AGGCCTT
S.ericufolia GGCCTAAAAAGGAGTCCCTTTGGCGGACGC-ACGGCTAGTGGTGGTTGTCA-AGGCCTT
A.repens GGCCTAAAAAGGAGTCCCTTTGGCGGGCGC-ACGGCTAGTGGTGGTTGTCA-AGGCCTT
R.serratuloides GGCCTAAAAAGGAGTCCCTTTGGCGGGTGC-ACGGCTAGTGGTGGTTGTCA-AGGCCTT
R.iconiensis GGCCTAAAAAGGAGTCCCTTTGGCGGACGC-ACGACTAGTGGTGGTTGTCA-AGGCCTT
S.bornmuelleri GGCCTAAAAAGGAGTCCCTTTGGCGGATGC-ACGGCTAGTGGTGGTTGTCA-TGGCCTT
S.coriacaea GGCCTAAAAAGGAGTCCCTTTGGCGGACGC-ACGGCTAGTGGTGGTTGTCA-AGGCCTT
J.catanoica GGCCTAAAAAGGAGTCCCTTTGACGGACGC-ACGACTAGTGGTGGTTGTCA-AGGCCTT
S.tinctoria GGCCTAAAAAGGAG-TCCCTTTGGTGGATGCCACGGCTAGTGGTGGTTGTCAATGGGCCTT
S.grandifolia CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGC-AAGGAA-TCGCTC-TCTAAAGACCC--AACGTG-TCG
S.serinthifolia CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGC-AAGGAA-TCGCTC-TCTAAAGACCC--AACGTG-TCG
S.radiatabieber CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAA-TCGCTC-TCTAAAGACCC--AACGTG-TCG
S.hakkarica CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAA-TCGCTC-TCTAAAGACCC--AACGTG-TCG
S.bornmuelleri CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAA-TCGCTC-TCTAAAGACCC--AACGTG-TCG
S.radiata CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAA-TCGCTC-TCTAAAGACCC--AACGTG-TCG
S.hausnecti CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAA-TCGCTC-TCTAAAGACCC--AACGTG-TCG
S.kotschyi CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAA-TCGCTC-TCTAAAGACCC--AACGTG-TCG
S.kurdica CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAA-TTGTCTCTAT-AAAGACCC--AACGTG-TCG
S.oligocephala CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAA-TTGTCTCTAT-AAAGACCC--AACGTG-TCG
S.lasiocephala CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAA-TTGTCTCTAT-AAAGACCC--AACGTG-TCG
S.quinguefolia CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAA-TTGTCTCTAT-AAAGACCC--AACGTG-TCG
S.serratuloides CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAA-TCGCTC-TCTAAAGACCC--AACGTG-TCG
S.ericufolia CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAA-TCGCTC-TCTAAAGACCC--AACGTG-TCG
A.repens CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAT-TCGCTC-TCTAAAGACCC--AACGTG-TCG
R.serratuloides CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAT-TCGCTC-TCTAAAGACCC--AACGTG-TCG
R.iconiensis CGTATCGAGTCCGTGTTG-ATGCAAGGGAAATCGCTC-TCTAAAGACCC--AACGTG-TCG
S.bornmuelleri CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAA-TCGCTC-TATAAGACCC--AACGTG-TCG
S.coriacaea CGTATCGAGCCGTGTTG-ATGCAAGGGAA-TCGCTC-TATAAGACCC--AACGTG-TCG
J.catanoica TGTAACGAGCCGTGCGG-ATGCAAGGGAA-TCGCTC-TAAAAAACC--AACGTG-TCG
S.tinctoria CGTATCGAGCCGTGTTGATGCAAGGGAA-TCGCTC-TATAAGACCC--AACGTG-TCG
S.grandifolia TC-TTAC-GACGAT-GCTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGG-GACTACCCGCTGA
S.serinthifolia TC-TTAC-GACGAT-GCTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGG--ACTACCCG---
S.radiatabieber TC-TTAC-GACGAT-GCTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGG--ACTACCCG---
S.hakkarica TC-TTAC-GACGAT-GCTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGG-GACTACCCG---
S.radiataradiata TC-TTAC-GACGAT-GCTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGG-GACTACCCGCTGA
S.radiata TC-TTAC-GACGAT-GCTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGG-GACTA-----
S.hausnecti TC-TTAC-GACGAT-GCTTCGACCG--CGACTCC-ACGTCAGACCG-GAACGTAA-----
S.kotschyi TC-TTAC-GACGAT-GCTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGGACTAC-----
S.kurdica TT-TTAC-GACGAT-ACTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGG-GACTACCCG---
S.oligocephala TT-TTAC-GACGAT-ACTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGG-A-----
S.lasiocephala TC-TTAC-GACGAT-GCTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGG-GACTAC-----
S.quinguefolia TC-TTAC-GACGAT-GCTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGG-GACTAC-----
S.serratuloides TC-TTAC-GACGAT-GCTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGG-GACAACCCG---
S.ericufolia TCCTTAC-GACGAT-GCTTCGATCCGTCGACCC--AGGTCCTGCGGGAA-----
A.repens TC-TTATAGACGAT-GCTCGCGCCG--CGACCC--AGGTCAGGCGG--CGGACTACCCGCGT-
R.serratuloides TC-TTAC-GATGAT-ACTTCGACCG--CG-ACCC--AGGTCAGGCGG--CGGACTAC-----
R.iconiensis TC-TTAC-GACGAT-GCTTCGACCG--CG-ACCC--AGGTCAGGCGGGA-----
S.bornmuelleri TC--TAC-GACGATGCTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGGGA--ACTACCCGTTGA
S.coriacaea GTCTTAC-GACGGATGCTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGG--ACTACCCG---
J.catanoica TC-TTGA-GACGC-GCTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGG-GACTACCCG---
S.tinctoria TC-TTAC-GACGAT--GCTTCGACCG--CGACCC--AGGTCAGGCGGACTACCCGTTT
S.grandifolia -----
S.serinthifolia -----
S.radiatabieber -----
S.hakkarica -----
S.radiataradiata GTT-----
S.radiata -----
S.hausnecti -----
S.kotschyi -----
S.kurdica -----
S.oligocephala -----
S.lasiocephala -----
S.quinguefolia -----
S.serratuloides -----
S.ericufolia -----
A.repens -----
R.serratuloides -----
R.iconiensis -----
S.bornmuelleri G-----

S.coriacaea -----
 J.catanoica -----
 S.tinctoria AAAGCATCAATAAAGCGGGAGAGA

6.2 ClustalW'da hizalanmış trnL-f cpDNA dizisinin Veri Matrisi

S.grandifolia -----TTCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.radiata -----TTCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.coriacaea -----TGGTTC-AAAGTCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.hakkarica -----TGGTTC-AACAGGCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.kotschyi -----TGGTTC AAGTTCCTCTATCCCCAAAAAAGACCCTTTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.quinguefolia -----TCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.cerinthifolia -----TCCTCTATCCCCAAATCCCCAAAAAGACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.serratuloides GGTTCAAGGTTCTCTATCCCCAAATCCCCAAAAAGACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.radiatabieber -----TGGTTC AAGTTCCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.kurdica -----GGTTC AAGTTCCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.tinctoria -----TGGTTC AAGTTCCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.erucifolia -----GGTTC AAGTTCCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.oligocephala -----GGTTC AAGTTCCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 R.iconiensis -----GGTTC AAGTTCCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 J.catanoica -----TGGTTC AAGTTCCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 A.repens -----TGGTTC AAGTTCCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 R.serratuloiees -----TGGTTC AAGTTCCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.radiataRadiata -----TGGTTC AAGTTCCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.lasiocephalo -----TGGTTC AAGTTCCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.bornmuelleri -----TGGTTC AAGTTCCTCTATCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCCTAATTATTTTC
 S.haussknechtii ---TTTTTGGTTC AAGTTCCTCTTTCCCCAAAAA-GACCATTGACTCCTAATTATTTTC
 S.grandifolia TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.radiata TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.coriacaea TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.hakkarica TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.kotschyi TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.quinguefolia TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.cerinthifolia TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.serratuloides TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.radiatabieber TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.kurdica TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.tinctoria TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.erucifolia TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.oligocephala TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 R.iconiensis TCCTATCCTTTTTAT-----TTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 J.catanoica TCGTATCCTTTTTAT-----TTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 A.repens TCCTATCCTTTTTAT-----TTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 R.serratuloiees TCCTATCCTTTTTAT-----TTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.radiataRadiata TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.lasiocephalo TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.bornmuelleri TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.haussknechtii TCCTATCCTTTTTATTTATTTATTTATTTATCCTTTTTTCTTAGCGGTTCAAAATTCCTTA
 S.grandifolia TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.radiata TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.coriacaea TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.hakkarica TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.kotschyi TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.quinguefolia TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.cerinthifolia TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.serratuloides TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.radiatabieber TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.kurdica TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.tinctoria TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.erucifolia TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.oligocephala TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 R.iconiensis TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 J.catanoica TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 A.repens TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 R.serratuloiees TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.radiataRadiata TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.lasiocephalo TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.bornmuelleri TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.haussknechtii TCCTTTCTTTCTCATTCACTACTCGTTATACA-----AATGGAT
 S.grandifolia CTGAGCGGAAATGCTGTTCTCTATCAGATGATATATG-ATACATGTACAATGAA

R. iconiensis	ACCCTTTCAATTGACATAGACCCAAGTT-ATCTAGTAAAATGAAAATGAGGATGAG----
J. catanoica	ACCCTTTCAATTGACATACACCCAAGTT-ATCTAGTAAAATGAAAATGAGGATGAG----
A. repens	ACCCTTTCAATTGACATAGACCCAAGTT-ATCTAGTAAAATGAAAATGAGGATGAG----
R. serratuloiees	ACCCTTTCAATTGACATAGACCCAAGTT-ATCTAGTAAAATGAAAATGAGGATGAG----
S. radiataRadiata	ACCCTTTCAATTGACATAGACCCAAGTT-ATCTAGTAAAATGAAAATGAGGATGAG----
S. lasiocephalo	ACCCTTTCAATTGACATAGACCCAAGTT-ATCTAGTAAAATGAAAATGAGGATGAG----
S. bornmuelleri	ACCCTTTCAATTGACATAGACCCAAGTT-ATCTAGTAAAATGAAAATGAGGATGAG----
S. haussknechtii	ACCCTTTCAATTGACATAGACACAAAATTATCTAGTAAAATGAAAATGAGGATGAG----
S. grandifolia	--ACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGC-AGAGGACTGAAAATCCA
S. radiata	--ACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGC-AGAGGACTGAAAATCC
S. coriaca	--ACATCAGGAATAGTGCG-GGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGC-AGAGGACTGAAAATCC
S. hakkarica	--ACATCAGGAATAGTGCG-GGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGC-AGAGGACTGAAAATCC
S. kotschy	--ACATCAGGAATAGTGCG-GGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGC-AGAGGACTGAAAATCC
S. quinquefolia	--ACATCAGGAATAGTGCGCGGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGCTAGAGGACTGAAAATCC
S. cerinthifolia	--ACATCAGGAATAGTCACGGGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGC-AGAGGACTGAAAATCT
S. serratuloides	--ACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGC-AGAGGACTGAAAATCC
S. radiatabieber	--ACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGC-AGAGGACTGAAAATCC
S. kurdica	--ACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGC-AGAGGACTGAAAATCC
S. tinctoria	AGACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGC-AGAGGACTGAAAATCC
S. erucifolia	--ACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGC-AGAGGACTGAAAATCC
S. oligocephala	--ACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGC-AGAGGACTGAAAATCC
R. iconiensis	--ACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGCAGA-GGACTGAAAATCC
J. catanoica	--ACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGCAGA-GGACTGAAAATCC
A. repens	--ACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGCAGATGGACTGAAAATCC
R. serratuloiees	--ACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCT-CAGTT-GGTAGAGCAGAGACTGAAAAGCC
S. radiataRadiata	--ACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCT-CAGTTTGGTAGAGC-AAAGGACTAAAATCC
S. lasiocephalo	--ACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCT-CAGTATGGTAGAGCAGGAGGACTGAAAATCC
S. bornmuelleri	--ACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCTTTCAGTT-TGTAGAGAAAGAGA-----
S. haussknechtii	--ACATCAGGAATAGTC--GGGATAGCT-CAGTT-GGTGGAGCAACAGGAGTGATATCC
S. grandifolia	TCGTGTCCAA-----
S. radiata	TCGTGTCAACGGTTCCCAATTTA
S. coriaca	TCGTGTCAA-----
S. hakkarica	TCGTGTCCC-----
S. kotschy	TCGTGTCCACAGGTTTCAAATA--
S. quinquefolia	TCGTGTCCC-----
S. cerinthifolia	ACGTGTCAA-----
S. serratuloides	TCGTGTCCAAGTTCCAAATA---
S. radiatabieber	TCGTGTCC-----
S. kurdica	TCGTGTCCA-----
S. tinctoria	TCGTGCCCCAGTTCAAATA---
S. erucifolia	TCGTGTCCCCAGTTCAAATA---
S. oligocephala	TCGTGTCCC-----
R. iconiensis	TCGTGTCA-----
J. catanoica	TCGTGTCCACAGTTCAAATA---
A. repens	TCGTGTCCACAGTTCAAAT---
R. serratuloiees	TCTGTGCGCCTTTCAAATA---
S. radiataRadiata	TCTGTGTCACAATTCAAATAAAAT
S. lasiocephalo	TCGTGTCCAGG-----
S. bornmuelleri	-----
S. haussknechtii	GCCTGACACCCCTTCAATCAAA