

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

**TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN *SIDERITIS* L. (*Lamiaceae*) CİNSİNİN
EMPEDOCLIA SEKSİYONUNA AİT TAKSONLARIN ITS ÇEKİRDEK
RİBOZOMAL DNA DİZİLERİNE DAYALI FİLOGENETİK ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cüneyt TEZ

Balıkesir, Temmuz-2011

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

TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN *SIDERITIS* L. (*Lamiaceae*) CİNSİNİN
EMPEDOCLIA SEKSİYONUNA AİT TAKSONLARIN ITS ÇEKİRDEK
RİBOZOMAL DNA DİZİLERİNE DAYALI FİLOGENETİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cüneyt TEZ

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Fatih COŞKUN

Sınav Tarihi: 15.07.2011

Juri Üyeleri: Yard. Doç. Dr. Fatih COŞKUN (Danışman-BAÜ)

Yard. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR (BAÜ)

Yard. Doç. Dr. Ekrem AKÇİÇEK (BAÜ)

Balıkesir, Temmuz-2011

Bu yüksek lisans alışması TUBİTAK 108T158 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN *SIDERITIS* L. (*Lamiaceae*) CİNSİNİN *EMPEDOCLIA* SEKSİYONUNA AİT TAKSONLARIN ITS ÇEKİRDEK RİBOZOMAL DNA DİZİLERİNE DAYALI FİLOGENETİK ANALİZİ

Cüneyt TEZ

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

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

Balıkesir, 2011

Türkiye *Sideritis* L. türlerinin sistematik revizyonu Duman ve Arkadaşları tarafından 2005'te yapılmış olup, bu çalışmaya göre Türkiye'de *Sideritis* L. (*Lamiaceae*) cinsine ait 46 türe ait 59 takson belirlenmiştir. Ülkemizde yetişen *Sideritis* taksonlarının çoğunluğu (46 türün 42'si) *Empedoclia* seksiyonunda yer almaktadır.

Sideritis L. (dağ çayı) türleri ile birçok çalışma yapılmış olmasına karşın, filogenetik akrabalık durumları için henüz moleküler veya moleküler genetik verilere dayalı bir analiz yapılmamıştır. Bu çalışma ile; Türkiye'de yayılış gösteren *Sideritis* L. cinsinin *Empedoclia* seksiyonuna ait taksonların moleküler sistematik analizi yapılmıştır. Çalışmada çekirdek DNA'sının (nrDNA) ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi kullanılmıştır. Taze bitki materyallerinden genomik DNA'lar, fenol-kloroform-izoamilalkol ve SIGMA ticari kiti kullanılarak elde edilmiştir. İzole edilen gDNA'ların ITS bölgeleri ITS4 ve ITS5A primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Dizi analizi sonucu elde edilen ITS (ITS1, ITS2 ve 5.8S rDNA) bölgesinin DNA dizilerinin işlenmesinde Sequencher 4.10.1 programı, dizilerin hizalanmasında ClustalW programı ve filogenetik analiz için PAUP 4.0b10 programı kullanılmıştır.

Sideritis cinsinin *Empedoclia* seksiyonuna ait taksonlar arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemek için PAUP 4.0b10 programında analizler yapılmıştır. Karakter temelli yöntemlerden Maksimum Parsimoni kriteri kullanılarak Heuristic (Cesaretlendirici) araştırma yapılmıştır ve ortak karar (konsensus) ağaçları oluşturulmuştur. Yine parsimoni kriteri kullanılarak Bootstrap analizi yapılmıştır. Mesafe temelli yöntemlerden ise NJ (Neighbour Joining) ve UPGMA (Unweighted Pair-Group Metod of Arithmetic Avarage) analizleri yapılmıştır. Bu analizlerin sonucunda *Empedoclia* seksiyonu, dış gruptan ve *Hesiodia* seksiyonundan ayrılmıştır. Ayrıca *Empedoclia* seksiyonu 3 kladdan oluşmuştur.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: *Sideritis*, nrDNA, ITS, Filogenetik Analiz, *Empedoclia*, PAUP

ABSTRACT

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF TAXA BELONGING TO THE SECTION *EMPODECLIA* OF THE GENUS *SIDERITIS* L. (*Lamiaceae*) GROWING IN TURKEY USING ITS nrDNA SEQUENCES

Cüneyt TEZ

Balıkesir University, Institute of Science, Department of Biology

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

Balıkesir - Turkey, 2011

Sideritis L. species native to Turkey were revised by Duman et al. in 2005 and the members of this genus have been delimited with 44 species in total of 55 taxa. The majority of *Sideritis* taxa grown in our country belongs to the section *Empedoclia*.

Despite many of investigations on *Sideritis* species, an analysis based on molecular or molecular genetics data has not been done for the phylogenetic relationships, yet. For this study; taxa which belong *Sideritis* L. genus's *Empedoclia* section which grown in Turkey has been done systematic analysis. In study, nuclear DNA's (nrDNA) ITS (Internal Transcribed Spacer) region has been used. Genomic DNAs from fresh plant materials, has been extracted with using fenol-kloroform-izoamilalkol and SIGMA commercial kit. Isolated gDNA's ITS regions have been amplified using ITS4 and ITS5A primers with PCR. Gained after sequence analysis ITS (ITS1, ITS2 ve 5.8S rRNA) regions' DNA sequences has been used Sequencher 4.10.1 programme to manipulate to sequences, ClustalW programme for allignment and PAUP 4.0b10 programme for phylogenetic analysis.

Series of analysis were done with PAUP 4.0b10 programme to determine the phylogenetic relationship between the taxons of *Empedoclia* section of *Sideritis* genus. Heuristic resarch was done by using Maximum Parsimoni criteria which is one of the character based technique and consensus trees were constituted. Bootsrap analysis was done by using parsimony criteria once again. NJ (Neighbour Joining) and UPGMA (Unweighted Pair-Group Metod of Arithmetic Avarage) analysis of range based technique also were done. As a result of this analysis, *Empedoclia* section was seperated from outgroup and *Hesiodia* section. In addition, *Empedoclia* section was formed 3 clad.

KEYWORDS: *Sideritis*, nrDNA, ITS, Phylogenetic Analysis, *Empedoclia*, PAUP

İÇİNDEKİLER	<u>Sayfa</u>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER.....	ii
ABSTRACT, KEYWORDS.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ.....	x
ÖNSÖZ.....	xi
1 GİRİŞ	1
1.1 <i>Lamiaceae</i> Familyasının Morfolojik Özellikleri.....	2
1.2 <i>Sideritis</i> L. Cinsinin Morfolojik Özellikleri.....	3
1.2.1 <i>Sideritis</i> L. Cinsinin Sistematikteki Yeri	4
1.2.2 <i>Sideritis</i> L. Cinsi ve Dünya Üzerindeki Yayılışı.....	4
1.2.3 <i>Sideritis</i> Türleri Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	6
1.2.4 <i>Sideritis</i> L. Cinsinin Ekonomik ve Tıbbi Önemi	14
1.3 Moleküler Sistematik	14
1.3.1 Markır Tipleri.....	16
1.3.1.1 Morfolojik Markırlar	16
1.3.1.2 Biyokimyasal Markırlar	16
1.3.1.3 DNA Markırları.....	17
1.3.1.3.1 Hibridizasyona Dayalı Moleküler Markırlar	18
1.3.1.3.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi.....	18
1.3.1.3.2 PCR'ye Dayalı Moleküler Belirteçler.....	20
1.3.1.3.2.1 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA(s)) - Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA	21
1.3.1.3.2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) - Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi.....	22
1.3.1.3.2.3 Minisatellitler (SSR) / Mikrosatellitler (VNTR).....	23
1.3.1.3.2.4 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) - Basit İç Dizi Tekrarları	24
1.3.1.3.2.5 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) - Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Polimorfik Diziler	25

1.3.1.3.2.6	CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence) - Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler.....	26
1.3.1.3.2.7	ESTs (Expressed Sequence Tags)-İşaretli İfade Edilen Diziler.....	26
1.3.1.3.2.8	ASAP (Allele Spesific Associated Primers) - Allele Özgü Birleşen Primerler.....	27
1.3.1.3.2.9	SNP (Single Nucleotide Polymorphism-Tek Nükleotit Polimorfizmi)	27
1.3.1.3.2.10	SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism-Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizm)	28
1.3.1.3.2.11	STS (Sequence Tagged Sites - Dizisi Etiketlenmiş Alanlar).....	29
1.3.1.3.2.12	SPAR (Single Primer Amplification Reaction)	29
1.3.1.3.2.13	SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism)	30
1.3.2	ITS (Internal Transcribed Spacer) ve rDNA.....	30
1.3.2.1	ITS Bölgesi ve Genel Özellikleri	30
1.3.2.2	rDNA ve ITS Bölgeleri Arasındaki İlişki	32
1.3.2.3	rDNA Bölgeleri.....	33
1.3.2.3.1	Küçük Alt Birim rDNA (18S)	33
1.3.2.3.2	5.8S rDNA	34
1.3.2.3.3	Büyük Alt Birim rDNA (28S)	34
1.3.3	DNA Dizileme	35
1.3.3.1	Maxam ve Gilbert'in DNA Kimyasal Kırılma (DNA Sequencing)Yöntemi..	36
1.3.3.2	Sanger Dizileme (Cycle Sequencing) Yöntemi	37
1.3.3.3	Otomatik DNA Dizi Analizi	39
1.3.3.4	Çoklu Dizi Hizalama ve Clustal W Programı.....	41
1.3.4	Filogenetik Analiz.....	42
1.3.4.1	Filogenetik Ağaç	42
1.3.4.1.1	Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler	44
1.3.4.1.1.1	Karakter Temelli Yöntemler	44
1.3.4.1.1.1.1	Maximum Parsimony (MP) Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi	44
1.3.4.1.1.1.2	Maximum Likelihood (ML) Metodu-En yüksek ihtimal	46
1.3.4.1.1.1.3	Bayes Metodu.....	47
1.3.4.1.1.2	Mesafe Temelli Yöntemler	47
1.3.4.1.2	Filogenetik Ağaçların Oluşturulmasında Kullanılan Programlar	48
1.3.4.1.2.1	PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony)	49
1.3.4.1.2.2	Mr. Bayes (Bayesian Inference of Phylogeny)	50
1.3.4.1.2.3	PHYLIP (The Phylogeny Inference Package)	51

2	MATERYAL VE YÖNTEM	52
2.1	Materyal	52
2.1.1	Bitki Materyallerinin Toplanması	52
2.1.2	Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması	54
2.1.3	Kullanılan Kimyasallar	54
2.1.3.1	Genomik DNA izolasyonunda Kullanılan Kimyasallar.....	55
2.1.3.1.1	Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Metoduyla Yapılan DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar	55
2.1.3.1.2	SIGMA Kiti ile Yapılan İzolasyonda Kullanılan Kimyasallar	55
2.1.3.1.3	PCR’de Kullanılan Kimyasallar	56
2.1.3.1.4	Agaroz Jel Elektroforez Tamponları.....	57
2.2	Yöntem.....	57
2.2.1	Bitkilerden Genomik DNA İzolasyonu.....	57
2.2.1.1	Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Protokolü.....	57
2.2.1.2	SIGMA Kiti ile Yapılan DNA İzolasyonu Protokolü.....	58
2.2.2	DNA Safılık ve Miktar Tayini	59
2.2.3	PCR Uygulamaları	60
2.2.4	Agaroz Jel Elektroforezi	61
2.2.5	Dizileme ve Dizi Analizi.....	62
2.2.6	Filogenetik Analiz.....	62
3	BULGULAR	63
3.1	Bitki Materyallerinin Toplanması	63
3.2	DNA İzolasyonu.....	67
3.3	PCR Reaksiyonları	68
3.4	DNA Dizileme ve Dizi Analizi	70
3.4.1	Dizileme Reaksiyonları	70
3.4.2	Dizilerin İşlenmesi	70
3.4.3	Dizilerin Hizalanması.....	71
3.5	Filogenetik Analiz.....	71
4	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	72
5	KAYNAKLAR	90
6	EKLER	101

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

<u>Kısaltma Adı</u>	<u>Tanımı</u>
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-Borikasıit- 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
Tm	: Erime Sıcaklıkları
NCBI	: National Center For Biotechnology Information
MgCl₂	: Magnezyum Klorür

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	<i>Sideritis</i> L. Cinsinin Dünya Üzerindeki Yayılışı.....	5
Şekil 1.2	nrDNA'nın ITS Bölgesi.....	31
Şekil 1.3	ITS Primerlerinin rDNA Üzerindeki Bağlanma Bölgeleri.....	33
Şekil 1.4	Dizi Analizi Sonucu Oluşan Piklerin Görüntüsü.....	40
Şekil 3.1	Sigma Kiti ile İzole Edilen Bazı <i>Sideritis</i> Türlerinin gDNA'larının Jel Görüntüsü.....	68
Şekil 3.2	Fenol-Kloroform Kullanılarak İzole Edilen Bazı <i>Sideritis</i> Türlerinin gDNA'larının Agaroz Jel Görüntüsü.....	68
Şekil 3.3	Bazı <i>Sideritis</i> Türlerinin ITS ile Yapılan PCR Görüntüsü.....	69
Şekil 3.4	Bazı <i>Sideritis</i> Türlerinin ITS ile Yapılan PCR Görüntüsü.....	69
Şekil 3.5	Bazı <i>Sideritis</i> Türlerinin ITS ile Yapılan PCR Görüntüsü.....	69
Şekil 4.1	Parsimoni Kriteri Kullanılarak Elde Edilen 1 Numaralı Ağaç.....	74
Şekil 4.2	Parsimoni Kriteri Kullanılarak Elde Edilen 5000 Numaralı Ağaç	75
Şekil 4.3	Parsimoni Kriteri Kullanılarak Elde Edilen 10000 Numaralı Ağaç	76
Şekil 4.4	Bootstrap Analizi Sonucunda Oluşan Parsimoni Ağacı.....	78
Şekil 4.5	Bootstrap Değerleri İşlenmiş 5000 Numaralı Parsimoni Ağacı....	80
Şekil 4.6	Parsimoni ile Elde Edilen 10000 Ağacın Strict Konsensusu.....	84
Şekil 4.7	Parsimoni ile Elde Edilen 10000 Ağacın Semi-Strict Konsensusu	85
Şekil 4.8	Parsimoni ile Elde Edilen 10000 Ağacın Majority Rule Ağacı....	85
Şekil 4.9	UPGMA Analizi Sonucunda Oluşan Ağaç.....	87
Şekil 4.10	Neighbor-Joining (NJ) Analizi Sonucunda Oluşan Ağaç.....	88

TABLO LİSTESİ

Tablo Numarası	Adı	Sayfa
Tablo 1.1	Kimyasal Kırılma Yönteminde Kullanılan Kimyasallar.....	36
Tablo 1.2	Kimyasal Kırılma Yöntemi ile Yapılan Reaksiyonların Elektroforez Sonrası Görüntüsü.....	37
Tablo 1.3	Enzimatik Zincir Sonlanma Yöntemi ile Yapılan Reaksiyonların Elektroforez Sonrası Görüntüsü.....	39
Tablo 2.1	Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler ve Özellikleri.....	55
Tablo 2.2	PCR’de (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Kullanılan Kimyasallar...	56
Tablo 2.3	PCR’de Kullanılan Primerler.....	56
Tablo 2.4	5X TBE Tamponu Hazırlama.....	57
Tablo 2.5	Kullanılan PCR Programı.....	61
Tablo 3.1	Çalışmada Kullanılan Bitki Materyalleri ve Lokaliteleri.....	63

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana her türlü desteği sağlayan, tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren, danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatih COŞKUN'a teşekkürlerimi sunarım.

Kullanılan bitki materyallerini temin eden Gazi Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hayri DUMAN'a, Selçuk Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ahmet DURAN'a, Balıkesir Üniversitesi Öğretim Üyesi danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Fatih COŞKUN'a, Sayın Prof. Dr. Gülendam TÜMEN'e, Sayın Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ'ye ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ekrem AKÇİÇEK'e teşekkürlerimi sunarım.

108T158 numaralı projeye, gerekli teçhizata, kimyasallara ve sarf malzemelere sahip olmamızı sağlayan TUBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmalarım boyunca kimyasal ve sarf malzeme sıkıntısı çektiğim zamanlarda desteğini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarım boyunca bir arada hoş vakit geçirdiğimiz ve deneylerimizin büyük çoğunluğunu beraber yaptığımız arkadaşım Gülsüm GÖREN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca, laboratuar çalışmalarım sırasında benden bilgisini, yardımlarını ve arkadaşlığını esirgemeyen Şakir AKGÜN, Öznur SUAKAR, Görkem DENİZ, Emre SEVİNDİK, Berna SANÖN, Taner ÖZCAN, Necla ŞAHİN ve Nur Gökçe ÇETİNER'e teşekkürlerimi sunarım.

Öğrenim hayatım boyunca bana ilgi ve fedakarlık göstererek, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen ailem; Şehri TEZ, Yücel TEZ ve Burak TEZ'e teşekkürü borç bilirim.

Balıkesir, 2011

Cüneyt TEZ

1 GİRİŞ

Sideritis L. cinsi bitkiler aleminin zengin familyalarından olan *Lamiaceae* familyasına aittir. Dünya'daki *Sideritis* türlerinin yaklaşık 1/3'ü ülkemizde bulunmaktadır. Özellikle gen merkezi Türkiye olan *Empedoclia* seksiyonuna ait 42 tür bulunmaktadır. Ülkemiz dışında bu seksiyona ait tür sayısı oldukça azdır. En çok tür ihtiva eden ülke Yunanistan'da 6 türü bulunmaktadır. Türkiye *Sideritis* türlerinin revizyonu H. Duman ve arkadaşları tarafından yapılmıştır.

Bugüne kadar, *Sideritis* L. cinsi üyeleri ile ilgili birçok sistematik çalışma yapılmıştır. Buna rağmen, *Sideritis* L. cinsinin sınıflandırılmasında taksonomik açıdan bazı problemler bulunmaktadır. Günümüzde bu tür sistematik problemlerin çözümünde moleküler çalışmaların önemli katkılar sağladığı bilinmektedir. Bitki türlerinin morfolojik karakterlere dayanılarak yapılan taksonomik sınıflandırması, bitkinin yaşına, fizyolojik durumuna ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermekte ve bazen yetersiz kalmaktadır [1]. Ayrıca, morfolojik özellikleri birbirine yakın olan gruplar genetik olarak birbirinden çok farklı da olabilmektedir. Bu olumsuzlukları ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilen moleküler genetik markırlar; bitkilerdeki genetik çeşitliliğinin ortaya konmasında, bitki türleri arasındaki taksonomik ve filogenetik ilişkilerin doğru bir şekilde belirlenmesinde başarıyla kullanılmaktadır [2]. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden birisi ise nrDNA bölgesi üzerinde bulunan ITS (Internal Transcribed Spacers) PCR'dir.

ITS bölgeleri, bitkilerdeki moleküler sistematik çalışmalarında son yıllarda sıklıkla kullanılan bir bölge haline gelmiştir [3]. Bu tür çalışmalarla, taksonların nrDNA ITS bölgeleri çoğaltılıp baz polimorfizmine bakılarak taksonlar arasındaki akrabalık dereceleri belirlenebilmektedir. Bu çalışmanın amacı, sistematik çalışmalarda sıkça kullanılan ve oldukça geçerli sonuçların elde edildiği ITS PCR yöntemini kullanarak, *Sideritis* L. cinsinin *Empedoclia* seksiyonuna ait tür ve tür altı seviyesindeki toplam 53 türe ait 71 taksonun, *Hesiodia* seksiyonuna ait 2 taksonun

(*Sideritis montana* subsp. *remota*, *Sideritis romana* subsp. *curvidens*) ve *Sideritis* cinsine yakın olduğu bilinen 3 dış grubun (*Stachys woronowii*, *Stachys* FC01 ve *Marrubium* FC02) akrabalık ilişkilerini ortaya çıkarmak, taksonomik problemlerinin çözümüne katkıda bulunmak ve daha sonra gerçekleştirilebilecek çalışmalara sağlam bir zemin oluşturmaktır.

1.1 *Lamiaceae* Familyasının Morfolojik Özellikleri

Otlar veya çalılar, genellikle glandular ve aromatik, gövdeler 4 köşeli veya değil. Yapraklar stipulasız, basit, bazen pennat, daima opposit, ovat, eliptik, rotundat. Temel çiçek durumu brakte veya floral yaprakların koltuğunda taşınan vertisillastrum şeklindedir. Ayrıca vertisillastrumlar spikai baş, rasemus veya simoz durumlar şeklinde düzenlenmiş olabilir. Çiçekler hermafrodit veya erkek sterildir. Brakteler yapraklara benzer veya belirgin şekilde farklılaşmıştır. Brakteoller mevcut veya eksiktir. Kaliks genellikle 5 loplu, üst lop 3, alt lop 2 dişlidir. Nadiren loplar veya dişler 1-1 veya 1-4 şeklindedir ya da kaliks aktinomorftur. Damarlar 5-20'dir. Korolla gamopetal, zigomorfik ve bilabiat, tüpsü, genellikle üst dudak belirsiz 2 loplu, dik ya da çok az konkav, alt dudak 3 loplu, nadiren alt dudak indirgenmiş ve alt dudak 5 loplu, ya da üstte 1 ve altta 4 loplu, ya da korolla aktinomorfiktir. Stamenler korolla yüzeyine yapışık, 4 ve didinam ya da 2, üstteki çift genellikle alttaki çiftten daha kısa, anter tekaları 2 ya da 1 gözlü, parale ya da divergent, nadiren (*Salvia*' da) konnektiflerin uzamasıyla birbirinden ayrılmıştır. Ovaryum üst durumlu, 2 karpelli ve 4 ovüllü, 4 loplu. Stilus ginobazik, nadiren değil, tepede bifid. Meyve 4 (nadiren az) kuru (nadiren etli) [4-5].

1.2 *Sideritis* L. Cinsinin Morfolojik Özellikleri

Sideritis türleri bir veya çok yıllık, otsu ya da çalimsı bitkiler şeklindedir. Gövde dik, yükselici, genellikle dallanmış ve tabanda odunsu haldedir. Pinos veya tomentos tüylü, nadiren tüsüz, salgı tüylü veya salgı tüyüne sahip değildirler. Yaprakları genellikle karşılıklı, dekusat, tam veya krenat-dentat kenarlıdır. Damarlanma pennat olup çiçek durumu vertisillastrumdur. Vertisillatlar 4-20 adettir. Her vertisillat 5-6 çiçekli, vertisillatların arası mesafeli veya birbirine yakın ve spika şeklinde kümelenmiştir. Brakteler yaprak gibi, tam veya kaliks tüpünü örtmüş bir haldedir. Brakteol yoktur. Kaliks tubulat-kampanulat, bazen bilabilat şeklinde olup 5-10 damarlı ve 5 dişlidir. Dişler birbirine eşit veya üst diş alt diştan daha geniştir. Korolla genellikle sarı, bazen beyaz ya da mor renklidir. Korolla tüpü kaliksten kısa veya uzun olabilmektedir. Üst dudak hemen hemen dik, tam veya bifit; alt dudak yatık ve 3 lobludur. Stamenler korolla tüpü içinde, 4 tane, didinam ve birbirine paralel iki sıra meydana getirmiştir. Alt stamenler üst stamenlerden daha uzundur. Anterler 2 gözlü ve çoğunlukla şekli bozulmuş bir haldedir. Stilus korolla tüpü içinde, ginobazik, bifit, alt lob genişlemiş, üst lobu sarar durumdadır. Stamenlerin ve stilusun boyu, korolla tüpünden uzun değildir. Ovaryum üst durumlu, iki karpelli, 4 gözlü, her gözde tek ovüllüdür. Meyva kuruyunca 4 merikarpe ayrılan sizokarp, ovat, uçta, yuvarlak ve tüsüzdür [6].

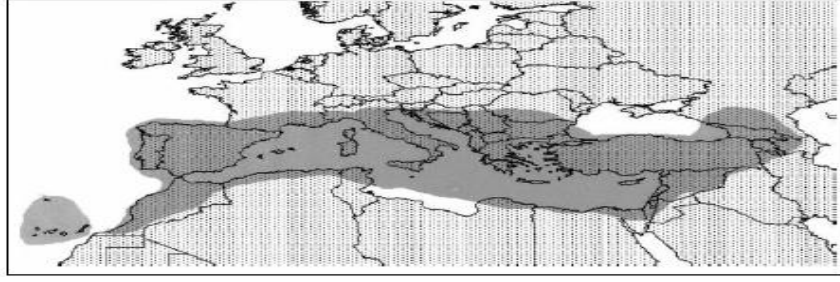
Hesiodia Benthams seksiyonundaki bitkiler bir yıllık olup brakteleri az çok tam ve yaprak gibidir. Kaliks az çok 2 dudaklı, üst diş alttaki dört diştan daha geniş bir haldedir. *Empedoclia* seksiyonu çok yıllık bitkilerden oluşmaktadır. Brakteler *Hesiodia* seksiyonundakilerinin aksine yaprağa benzemez ve kaliks dişleri birbirine hemen hemen eşittir [6].

1.2.1 *Sideritis* L. Cinsinin Sistematikteki Yeri

Regnum	:	<i>Plantae</i>
Divisio	:	<i>Spermatophyta</i>
Subdivisio	:	<i>Angiospermae</i>
Classis	:	<i>Magnalopsida</i>
Subclass	:	<i>Asteridae</i>
Ordo	:	<i>Lamiales</i>
Familia	:	<i>Lamiaceae</i>
Genus	:	<i>Sideritis</i>
Subgenus	:	<i>Sideritis</i>
Sect	:	<i>Sideritis</i>
Sect	:	<i>Empedoclia</i>
Sect	:	<i>Hesiodia</i>
Sect	:	<i>Burgsdorfia</i>
Subgenus	:	<i>Marrubiastrum</i>
Sect	:	<i>Marrubiastrum</i>
Sect	:	<i>Empedocleopsis</i>
Sect	:	<i>Creticae</i>

1.2.2 *Sideritis* L. Cinsi ve Dünya Üzerindeki Yayılışı

Sideritis L. cinsi bitkiler aleminin zengin familyalarından olan *Lamiaceae* familyasına aittir. *Lamiaceae* familyası bitkileri, hemen hemen her çeşit habitatta ve yükseltide, Kuzey Kutbu'ndan Himalayalar'a, Güney Doğu Asya'dan, Hawaii ve Avustralya'ya, Afrika ve Amerika'ya kadar geniş bir alanda yayılış göstermekle birlikte (Şekil 1.1), asıl yayılış alanı Akdeniz havzasıdır [7]. *Lamiaceae* familyasının dünya üzerinde 224 cinsi ve yaklaşık 5600 türü bulunur. Türkiye florasında ise *Lamiaceae* familyası 45 cins, 565 tür ve toplam 735 takson ile temsil edilmektedir [8].



Şekil 1.1 *Sideritis* L. Cinsinin Dünya Üzerindeki Yayılışı [9]

Sideritis L. cinsi Dünya’da özellikle Akdeniz havzasında yayılış göstermekle birlikte, Bahamalar’dan Çin’e ve Almanya’dan Fas’a kadar geniş bir alan içinde, 150’den fazla tür ile temsil edilmekte ve iki alt cinsle ayrılmaktadır. Bunlar subgenus *Sideritis* ve subgenus *Marrubiastrum*(Moench) Mendoza-Heuer. Makedonezya’ya endemik olan *Marrubiastrum* alt cinsi, 3 seksiyon altında [*Marrubiastrum*(Moench) Bentham, *Empedocleopsis* Huynh, *Creticae* P. Perez & L. Negrin] toplanmış ve alt cinsin tamamı Perez De Paz ve Negrin Sosa tarafından 1992 yılında revize edilmiş olup üç seksiyonun toplam tür sayısı 24’tür. *Sideritis* alt cinsi Akdeniz’de yaygın olup ikisi çok yıllık [*Sideritis*, *Empedoclia* (Rafin) Bentham] ikisi bir yıllık bitkileri içeren [*Hesiodia* (Moench) Bentham, *Burgsdorfia* (Moench) Briquet] 4 seksiyonu bulunmaktadır. Bu seksiyonlardan, Batı Akdeniz’de, özellikle İspanya’da yayılış gösteren *Sideritis* seksiyonunun revizyonu 1994 yılında Obon De Castro ve Rivera Nunez tarafından yapılmıştır. İspanya florası, çoğu endemik 89 takson ile *Sideritis* seksiyonunun gen merkezidir [9-12]

Ülkemizde ise *Sideritis* cinsi, 3 seksiyon ile temsil edilmektedir. Bunlar; *Hesiodia* (Moench) Bentham, *Burgsdorfia* (Moench) Briquet ve *Empedoclia* (Rafin) Bentham. *Sideritis*’in Türkiye Florası’nın 7. cildinde 38 türü bulunurken [6], 10. ciltte tür sayısı 40’a [13], 11. ciltte 45’e [14] ve son olarak yayınlanan *S. ozturkii* Z. Aytaç & Aksoy [15] ile 46’ya ulaşmıştır. Yeni tür *S. aytacii* H. Duman & P. Şahin’nin ilavesi ile birlikte *Sideritis* cinsinin ülkemizdeki toplam tür sayısı 47’ye, takson sayısı ise 54’e ulaşmıştır. Ülkemizde yayılış gösteren 47 türden 42 tanesi *Empedoclia* (53 takson), 3 tanesi *Burgsdorfia* 1’i de *Hesiodia*(5takson) seksiyonuna aittir. Bunlardan *Empedoclia* seksiyonunun gen merkezi, % 80 endemizm oranı ile

Türkiye'dir. *Sideritis* L. cinsinin *Empedoclia* seksiyonuna ait 53 takson bulunmaktadır ve bunlardan 41 takson endemiktir. *Sideritis* cinsinin sahip olduğu bu yüksek endemizm oranı nedeniyle ülkemiz bu cinsin iki esas gen merkezinden biridir. *Sideritis* L. cinsinin diğer gen merkezi *Sideritis* seksiyonuna ait yaklaşık 50 türün bulunduğu Güneybatı Avrupa'daki Iberian Peninsula bölgesidir [14]. *Sideritis* L. cinsinin ismi Yunanca kökenli bir kelime olan ve demir anlamına gelen "sideros" dan gelmektedir. Bu isim, bu cinse ait bitkilerin yaraları iyileştirme özelliğinden dolayı verilmiştir [16].

1.2.3 *Sideritis* Türleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

Sideritis türleri üzerine çok sayıda kimyasal araştırma mevcut olup, çalışmalar özellikle uçucu yağlar, diterpenler ve flavanoitler üzerinde yoğunlaşmıştır [14, 17-20]. Kimyasal çalışmalar yanında, *Sideritis* türleri üzerinde yapılmış farmakolojik araştırma da vardır [21-22]. Son zamanlarda biyolojik aktivite çalışmalarına ilave olarak, özellikle antiinflamatuvar, analjezik, diüretik, antiülser, antidepresan, antimikrobiyal ve böcek kovucu etkileri çeşitli araştırmacılar tarafından araştırılmıştır [20, 23-26].

Ülkemizde yetişen *Sideritis* türleri üzerine morfolojik ve anatomik araştırmalar *S. congesta* üzerinde yapılan çalışma ile başlamıştır [27]. Morfolojik ve anatomik araştırmalar, daha sonra *S. arguta*, *S. libanotica* subsp. *linearis* üzerinde yapılan çalışmalarla devam etmiştir [28-29]. *S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana* ve *S. germanicopolitana* subsp. *viridis* türleri üzerinde yapılan anatomik ve morfolojik çalışmalar sonucunda alt türlerin varyete olması gerektiği ilgili araştırmacılar tarafından belirtilmiştir [30]. Bu iki alt tür üzerinde çimlenme fizyolojisi de çalışılmış, anatomik ve morfolojik olarak birbirine çok benzeyen bu iki taksonun, tohumlarının çimlenmesi konusunda önemli farklılıklar gösterdiği açıklanmıştır [31]. Morfolojisi, anatomisi ve ekolojisi çalışılan diğer bir takson ise endemik bir tür olan *S. trojana* 'dır [32]. *S. sipylea* ve *S. perfoliata* üzerinde yapılan kemotaksonomik çalışmada, türlerin morfolojik karakterleri de verilmiştir [33]. *S.*

vulcanica ise, morfolojik ve anatomik özellikleri yanında, korolojik özellikleri açısından da değerlendirilmiştir [34].

Gergis ve ark. (1991), *Sideritis sipylea* Boiss. uçucu yağının kimyasal kompozisyonu ve antimikrobiyal aktivitesi arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Bitkinin uçucu yağı TLC (Thin Layer Chromotography) ile hazırlanarak beş fraksiyona ayrılmış ve her fraksiyonun antimikrobiyal aktivitesi 6 bakteri ve *Candida albicans*'la test edilmiştir. Bir fraksiyon hiçbir etki göstermemiş, diğer fraksiyonlar ise gram pozitif bakterilere gram negatif bakterilerden daha etkili bulunmuştur. Fraksiyonlar antifungal aktivite göstermiştir. Çok etkili olan iki fraksiyon GC (Gas Chromatography) ve GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) ile analiz edilmiş, aslında bazı alkollerin karışımı olan 33 bileşen tespit edilmiştir. İkinci fraksiyondan karvakrolun etkili olduğu altı bileşik tespit edilmiştir. Yağların antimikrobiyal aktivitesinde alkollerin vazgeçilmez olduğu görülmüştür [35].

Krımer ve ark. (2003), Türkiye'de endemik olarak bulunan beş *Sideritis* türünün (*S. argyrea*, *S. armeniaca*, *S. hololeuca*, *S. stricta* ve *S. taurica*) uçucu yağlarını çalışmıştır. Bu bitkilerin çiçek kısımlarının uçucu yağları GC/MS (Gas Chromatography- Mass Spectrometry) ile analiz edilmiştir. *S. argyrea*, *S. armeniaca*, *S. hololeuca* ve *S. stricta*'nın yağlarında ana bileşenler beta-pinene (sırasıyla %20, %39, %35, %30) ve alpha-pinene (sırasıyla %14, %17, %16, %13) olarak belirlenmiştir. Ayrıca *S. taurica*'nın yağında ana bileşenler alpha-bisabolol (%10) ve alpha-pinene (%9) olarak belirlenmiştir [36].

Dulger ve ark. (2005), Türkiye'de endemik olarak bulunan bazı *Sideritis* türlerinin (*S. albiflora*, *S. brevibracteata* ve *S. pisidica*) ekstre ve fraksiyonlarının disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon metodu ile *Escherichia coli* ATCC 11230, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Klebsiella pneumoniae* UC57, *Micrococcus luteus* La 2971, *Micrococcus flavus* ATCC 14452, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Corynebacterium xerosis* CCM 7064, *Mycobacterium smegmatis* CCM 2067, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 9730, *Kluyveromyces fragilis* NRRL 2415 and *Rhodotorula rubra* CCY'ya karşı antimikrobiyal aktivitesini incelemiştir. *S. pisidica*'nın metanol ekstresi ve

kloroform fraksiyonu, *S. albiflora* ve *S. brevibracteata*'nın metanol ekstresi, butanol ve kloroform fraksiyonu bazı bakteri ve mayalara karşı iyi antimikrobiyal etki göstermiştir. İnhibisyon zon çapları 10–20 mm, MIC değerleri ise 0.03–0.38 l/ml aralığında tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucu bu türlerin geleneksel tıp alanında kullanılabilceğini desteklemiştir [37].

Güney-Batı Anadolu'da yayılış gösteren 20 *Sideritis* türü üzerinde yapılan sistematik bir çalışmada, türlerin anatomik, morfolojik ve sitolojik özellikleri belirlenerek, sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda ülkemizdeki 3 *Sideritis* seksiyonu arasında genel bir ayırım yapılmakla beraber, *Empedoclia* seksiyonunda tür içi ve türler arası geniş bir varyasyonun olduğu belirtilmiştir [38]. Bir başka çalışmada ise, Anadolu'da yayılış gösteren *S.leptoclada*, *S. albiflora*, *S. phrygia* türlerinin anatomik, morfolojik ve sitotaksonomik özellikleri incelenmiştir [39]. Balıkesir Kazdağı'ndan toplanan, *S. perfoliata*, *S. athoa*, *S. dichotoma* ve *S. trojana*'nın kromozom sayıları $2n=32$ olarak tespit edilmiş, kromozom uzunlukları belirlenerek idiogramları ile birlikte verilmiştir [40]. Yabancı araştırmacılar tarafından ülkemizde yetişen *Sideritis* türleri üzerinde yapılmış karyolojik çalışmalar da mevcuttur [13, 41-42].

Ezer ve ark. (1994), Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden topladıkları *S. congesta*, *S. perfoliata*, *S. arguta*, *S. argyrea*, *S. pisidica* ve *S. libanotica* subsp. *linearis* türlerinin petrol, kloroform, etil asetat, etanol ve aseton ekstrelerinin aktivitelelerini *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* var. *oxytoca*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Streptococcus agalactiae*'ye karşı incelemiştir. Petrol ve kloroform ekstrelerinin diğer ekstrelerden daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiğini, aseton ekstrelerinin gram pozitif bakterilere gram negatif bakterilerden daha etkili olduğunu belirlemiştir [43].

Ezer ve Abbasoğlu (1996), Türkiye'de yetişen bazı *Sideritis* türlerinin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitelelerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada; *S. congesta*, *S. argyrea* ve *S. lycia*'nın toprak üstü kısımlarının antimikrobiyal etki gösterdiğini belirlemiştir. Mantarlara (*Candida albicans* ve *C. parapsilosis*) karşı

olan etki bakterilere (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *S. faecalis*) karşı olan etkiden daha fazla bulunmuştur. *S. argyrea* ve *S. lycia*'nın uçucu yağları test edilen mikroorganizmalara karşı benzer etki göstermiş, en küçük etkiyi ise *S. congesta*'nın uçucu yağları göstermiştir [44].

Türkiye'nin değişik yörelerinden toplanan 15 *Sideritis* türünün (*S. athoa*, *S. brevidens*, *S. caesarea*, *S. condensata*, *S. congesta*, *S. dichotoma*, *S. erythrantha* var. *cedretorum*, *S. germanicopolitana* ssp. *germanicopolitana*, *S. hololeuca*, *S. lanata*, *S. libanotica* ssp. *violascens*, *S. lycia*, *S. niveotomentosa*, *S. perfoliata*, *S. phrygia*, *S. pisidica*) tohum yağları hekzan kullanılarak Soxhlet cihazı tarafından elde edilmiştir. Yağ verimi %5.6–36.3 arasında bulunmuştur. Yağların içindeki yağlı asitler, metil ester ve onların bileşiklerine GC/MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) tarafından dönüştürülmüştür. Bütün türlerden elde edilen yağların temel yağ asitleri linoleic (%45.4–64.0), oleic (%12.3- 26.5), 6-octadecynoic (%4.5–26.8), palmitic (%0.3–9.4) ve linolenic (%0.8–2.0) asitler olarak belirlenmiştir [45].

Kılıç ve ark.(2003), Türkiye'de bulunan bazı *Sideritis* türlerinin (*S. athoa*, *S. trojana*, *S. dichotoma*, *S. sipylea*, *S. argyrea*) fitokimyasal analizini yapmıştır. Linearol, foliol, epicandiol, siderol ve ent-7 α , 18-dihydroxy-15 β , 16 β -epoxykaurane antibakteriyal aktivite testleri için kullanılmıştır. Antibakteriyel aktivite testleri *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermitis*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans*'a karşı disk difüzyon metodu kullanılarak yapılmıştır. Sonuç olarak 7-epicandiol'den *E.coli*'ye karşı en yüksek etkileşim gözlenmiş, dahası aynı bileşik *S.aureus* ve *E. faecalis*'e karşı da aktif olarak belirlenmiş, ent-7 α , 18-dihydroxy-15 β , 16 β -epoxykaurane *B. subtilis*'e karşı kısmen de olsa aktif bulunmuştur [46].

Özkan ve ark.(2005), *Lamiaceae* familyasına mensup Türkiye'de endemik olarak bulunan *Sideritis condensata* (Boiss. & Heldr.) ve *Sideritis erythrantha* var. *erythrantha* (Boiss. & Heldr.) türlerinden elde edilen ekstraktların antioksidan ve antibakteriyel etkilerini araştırmıştır. Antibakteriyel aktivite agar difüzyon tekniği kullanılarak bakteriye karşı (*Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7,

Klebsiella pneumoniae, *Mycobacterium smegmatis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*) araştırılmıştır. *Sideritis condensata* ekstreleri diğer ekstrelerden daha etkili bulunmuştur. Bütün konsantrasyonlarda, en duyarlı bakteri *Pseudomonas aeruginosa* olmasına rağmen, en dirençli bakteriler *Sideritis condensata* ekstreleri için, *Enterococcus faecalis*, *Sideritis erythrantha* var. *erythrantha* ekstresi için ise *Staphylococcus aureus* olarak belirlenmiştir [47].

İşcan ve ark.(2005), *Lamiaceae* familyasından Türkiye’de endemik olarak bulunan *Sideritis cilicica* Boiss. & Bal. ve *Sideritis bilgerana* P.H.Davis’in toprak üstü kısımlarından uçucu yağları elde etmek için hidrodilütasyon metodu kullanmıştır. *S.bilgerana*’nın yağındaki temel bileşimler β -pinene (%48) ve α -pinene(%32) olduğu halde *S. cilicica*’nın yağındaki temel bileşenler β -pinene (%39), α -pinene (%28) ve β - phellandrene (%20) olarak GC (Gas Chromatography) ve GC/MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) metoduyla belirlenmiştir. Yağların antimikrobiyal etkileri mikrodilüsyon broth metodu kullanılarak değerlendirilmiştir. Her iki yağ da *C. albicans* üzerine iyi inhibitör etkiler göstermiştir [48].

Loğoğlu ve ark. (2006), Türkiye’de İzmir-Karaburun-Akdağ’dan topladıkları *Sideritis siplea* Boiss.’ten izole edilen siderol, linearol ve epicandicandiol dahil bazı diterpenleri ve bunların biyolojik aktivitelerini çalışmışlardır. Ayrıca bu çalışmada linearol ve epicandicandiol’un diasetat türevleri de elde edilmiştir. Bütün bu bileşenlerin antibakteriyel aktivitelerini *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 11230), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Candida albicans* (ATCC 90028)’e karşı disk difüzyon metodu uygulayarak araştırmışlardır. Linearol, linearoldiacetate, siderol ve epicandicandioldiacetate’nin çalışılan mikroorganizmaların hiç birine karşı aktif bulunmadığı, Epicandicandiol’un ise *S.aureus*, *B. subtilis* ve *C. albicans*’a karşı 10 mm’lik zonlar meydana getirdiği belirtilmiştir [49].

Kılıç (2006), *Sideritis stricta* Boiss & Heldr.'nin aseton özütlerinden bilinen dokuz ve yeni ent-kaurene diterpenoidi elde etmiştir. *Sideritis stricta*'nın aseton ekstresinin antimikrobiyal aktivitesini standart bakteriler ve mantar suşlarına (*E.coli* ATCC 29995, *S. aureus* ATCC 6538P, *K.pneumonia* CCM 2318 ve *C. albicans* ATCC 10239) karşı agar difüzyon metodu kullanarak test etmiştir. MİK değerlerinin sonucu, gentamisin ve flukonazol ile karşılaştırdığında bu değerlerin test edilen bakteriler ve mantar türüne karşı çok az bir etkileşim içinde olduğunu belirtmiştir [50].

Sağdıç ve ark.(2007), *Lamiaceae* familyasına mensup, Türkiye'de endemik olarak bulunan *Sideritis ozturkii* Aytaç & Aksoy ve *Sideritis caesarea* Duman, Aytaç & Baser'nin metanol ekstrelerinin total fenolik, flavanol ve flavonal bileşikleri ve bunların antimikrobiyal ve antioksidan etkilerini belirlemiştir. Antimikrobiyal etki 15 mikroorganizmaya (*Aeromonas hydrophila* ATCC 7965, *Bacillus brevis* FMC 3, *B. cereus* FMC 19, *B. subtilis* ATCC 6630, *B. subtilis* var. *niger* ATCC 10, *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* FMC5, *Morgenella morgani*, *Mycobacterium smegmatis* RUT, *Proteus mirabilis* BC 3624, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 28213, *Yersina enterocolitica* ATCC 1501, *Candida albicans* ATCC 1223 ve *Saccharomyces cerevisiae* BC 5461) karşı agar difüzyon metoduyla değerlendirilmiştir. Sonuç olarak *S. ozturkii* ve *S. caesarea* ekstrelerinin gıda koruma ve insan sağlığında doğal antimikrobiyal ve antioksidan etkenler olarak kullanılabileceği söylenmiştir [51].

Çarıkçı ve ark.(2007), *Sideritis tmolea* P.H.Davis'nin aseton ekstresinden farklı kromatografik metodlar kullanarak bilinen dört ent-kaurene diterpenoidi ayırtmıştır. *Sideritis tmolea* bitkisinde bulunan siderol'un aseton ve metanol özütlerini mikroorganizmalara karşı test ederek, ham aseton ve metanol özütlerinin *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177)'e karşı etkileşim göstermediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca bitkiye ait ham aseton ve metanol özütlerinin antimikrobiyal etkileşiminin olmadığını da belirlemişlerdir [52].

Türkiye Flora'sındaki mevcut yayılışlara ek olarak, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü ile Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü tarafından yürütülen projeler çerçevesinde, 1987-1994 yılları arasında yapılan arazi çalışmaları verilerine dayanarak, *Sideritis* türlerine ait yeni lokalite kayıtları rapor edilmiştir [53]. Ülkemizde halk ilaçları üzerinde yapılan bir dizi çalışmada ise, bazı *Sideritis* türlerinin halk arasındaki isimleri ve kullanılışları yanında lokaliteleri de bildirilmiştir [54-56]. *Sideritis* L. türleriyle ilgili moleküler filogenetik alanında yapılan çalışmalara bakıldığında ise pek fazla çalışmanın bulunmadığı görülmektedir [57-60]. Dünya üzerinde yapılan bazı çalışmalar aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Fernandez-Peralta ve Gonzalez-Aquilera (1986), yaptıkları çalışmada *Sideritis* cinsinin *Eusideritis* seksiyonuna ait 6 yakın akraba taksonun (*S. leucantha*, *S. pusilla*, *S. flavovirens*, *S. granatensis*, *S. biflora* ve *S. osteoxylla*) genetik akrabalığını tespit etmek ve bu taksonların *Eusideritis* seksiyonu içindeki durumunu aydınlatmak için bu taksonun mayotik davranışlarını, karyotipik özelliklerini, polenlerinin büyüklüğü ve fertilitelerini, DNA miktarını ve tohum protein profillerini incelemişlerdir [59].

Las Heras Vazquez ve ark. (1999), Güneybatı İspanya'nın endemik bir türü olan *Sideritis pusilla* (*Lamiaceae*) taksonunun populasyon yapısını ve genetik akrabalığını değerlendirdikleri çalışmada, *Sideritis pusilla*'nın 8 farklı infraspesifik taksonunu kapsayan 13 bitki populasyonuna ve bunların atasal türleri farzedilen *S. hirsuta* L. ve *S. leucantha*'ya RAPD tekniği uygulamışlardır. Sonuçta tür içi taksonlar üç ana grup altında toplanmış ve *Sideritis pusilla*'nın atasal türleri farzedilen bu türlerden oldukça farklı olduğu bulunmuştur [58].

Barber ve ark. (2000)'nin, Makaronezya'ya endemik *Sideritis* türlerinin ada içi ve adalar arası evrimlerini tespit etmek amacıyla kloroplast DNA'sını analiz ettikleri çalışmada, Makaronezya'da yetişen ve bölgeye endemik türlerin tek bir atadan geldiği tezi doğrulanmış ve ada *Sideritis*'lerinin evrim sonucu farklılaşarak yeni taksonlara ayrıldığı belirtilmiştir [60]. Barber ve ark. (2002)'nin yaptığı diğer bir çalışmada ise Makaronezya'ya endemik *Marrubiastrum* alt cinsinden 7 takson ile

Sideritis alt cisindeki 4 seksiyona ait 25 taksonun çekirdek ve kloroplast DNA dizileri karşılaştırılmıştır. Çalışmada çekirdek ribozomal DNA'sının transkribe edilebilen ara bölge (ITS) dizileri ile kloroplast genomunun iki kodlanamayan bölge dizisi analiz edilmiştir. *Sideritis* alt cinsine ait çok yıllık *Empedoclia* ve *Sideritis* seksiyonlarının her birinin monofiletik olduğu ancak tek yıllık seksiyonların monofiletik gruplar olmadığı belirtilmiştir [57].

Gazi Üniversitesi'nde 2006 yılında Feyza ÖKE'nin yapmış olduğu “ Türkiye *Sideritis* L. (Labiatae) Türlerinin Tohum Protein Analizleri ” başlıklı yüksek lisans çalışmasında ise *Sideritis* türlerine ait 74 populasyon ile *Stachys woronowii*'ye ait 1 populasyondan alınan tohumlardan toplam tohum proteinleri izole edilmiş ve SDS-PAGE'de yürütülmüştür. Jellerin fotoğrafları çekilmiş ve bantların varlığı ve yokluğu tespit edilmiştir. Türler arasındaki genetik uzaklıklar POPGEN istatistik programı kullanılarak hesaplanmış ve türler arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogram oluşturulmuştur. Bu dendrograma göre protein profilleri ile elde edilen genetik akrabalık, morfolojik özelliklere göre yapılan sistematik ilişki ile benzerlik göstermiştir. Elde edilen protein profilleri *Sideritis* L. cinsi için taksonomik problemlerin çözümünde kullanılabilir sonuçlar vermiştir. Bu çalışma ile Türkiye'de doğal olarak yetişen tüm *Sideritis* L. türlerinin genetik akrabalığı protein analizleri ile ilk kez araştırılmıştır [61].

Ülkemizde yetişen *Sideritis* cinsine ait türler hakkında DNA dizilerine dayalı olarak yapılmış herhangi bir moleküler filogenetik çalışma mevcut değildir. TÜBİTAK 108T158 numaralı projenin öncülüğünde yaptığımız bu çalışma ile *Sideritis* L. cinsinin *Empedoclia* seksiyonuna ait türlerin genomik DNA'sının ITS bölgesi çoğaltılmış ve bu bölgeye ait diziler kullanılarak genetik akrabalıklar belirlenmiştir.

1.2.4 *Sideritis* L. Cinsinin Ekonomik ve Tıbbi Önemi

Sideritis türleri halk arasında adaçayı, dağ çayı adları ile tanınmakta ve çay şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bunlardan farklı olarak sarıkız çayı, kuyruk çayı, adaçayı gibi değişik yöresel isimlere de sahiptir. Halk tıbbında sinir sistemi uyarıcısı, antiinflamatuvar, antispazmodik, karminatif, analjezik, sedatif, antitussif, stomaşik ve antikonvulsan etkilerinden dolayı ve soğuk algınlıklarında öksürük kesici ve gastrointestinal hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [62]. Son yıllarda yapılan araştırmalarla bazı *Sideritis* türleri ekstrelerinin antifeedant [26], antistres [63], analjezik [25], antioksidan [64], antibakteriyal[43, 65], antiinflamatuvar etkileri belirlenmiştir. Ayrıca bu türlerin diterpen yapısındaki bileşikleri ve uçucu yağlar ile ilgili pek çok araştırma yapılmıştır [36, 62, 66-72].

Türkiye’de iç ve dış ticareti yapılan 25’i endemik 31 *Sideritis* taksonunun olduğu ve bilinçsiz toplama sonucunda yok olma tehlikesi altında olan ilk 50 tür arasında endemik türler olan *S. sipylea*, *S. tmolea* ve *S. trojana*’nın da bulunduğu açıklanmıştır [73].

1.3 Moleküler Sistemik

Son yıllarda bitki türlerinin tanımlanmasında morfolojik karakterlerin yanı sıra moleküler verilerin kullanılması hız kazanmıştır [74]. Yüksek yapılı bitkiler, nüklear (çekirdek) ve sitoplazmik (mitokondri ve kloroplast) kalıtmadan sorumlu genetik materyale sahiptirler. Bu genetik materyallerin replikasyon modeli ve tamiri birbirinden farklılık gösterir. Çekirdek genomu eşeyli kalıtımlanan lineer bir yapıya sahip iken, kloroplast ve mitokondri genomu eşeysiz olarak kalıtımlanıp dairesel bir yapıdadır.

Moleküler bitki sistematigi çalışmlarında hem nüklear hem de organelar genom veri kaynağı olarak kullanılabilir. Mitokondri DNA'sı oldukça değişken olduğu için sistematik çalışmlarda daha çok nüklear DNA ve kloroplast DNA'sı kullanılmaktadır. Bu amaçla genomik DNA, mtDNA ve cpDNA üzerindeki birçok özel bölgeden yararlanılmaktadır. Özellikle daha önceden bilinen ve klasik taksonomik yöntemlerle çözüme kavuşturulamayan birçok sistematik problem, moleküler verilerden elde edilen deliller sayesinde aşılabilir. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden birisi de nrDNA bölgesi üzerinde bulunan ITS (Internal Transcribed Spacers) PCR'dir. ITS bölgeleri, bitkilerdeki moleküler sistematik çalışmlarda son yıllarda sıklıkla kullanılan bir bölge haline gelmiştir [75]. Bu tür çalışmlarla, taksonların nrDNA ITS bölgeleri çoğaltılıp baz polimorfizmine bakılarak taksonlar arasındaki akrabalık dereceleri belirlenebilir. Geleneksel taksonomik yöntemlerin verilerini desteklemek amacıyla kullanılan; anatomik, morfolojik, sitolojik ve karyolojik verilerin yanında, günümüzde moleküler veriler kullanılarak çok sayıda takson içeren grupların sistematik problemlerinin çözümüne katkı sağlanmaktadır.

Moleküler sistematikte; DNA-DNA hibridizasyonu, Protein markırları ve PCR'ye dayalı teknikler kullanılmaktadır. Son zamanlarda PCR'ye dayalı teknikler sistematik çalışmlarda daha çok kullanılmaya başlanmıştır. Bunlar RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphisms), Mikrosatellit gibi özel tekniklerdir. PCR yardımıyla genomik DNA üzerinde yerleşmiş olan ETS (External Transcribed Spacer), IGS (Intergenic Spacer), cpDNA üzerinde bulunan *matK*, *trnT-trnL* genler arası bölgeleri elde edilip baz dizin analizi yapılarak sistematik çalışmlarda yoğun olarak kullanılmaktadır. ITS bölgesi de PCR ile çoğaltılarak sistematik çalışmlarda kullanılan bir bölgedir.

1.3.1 Markır Tipleri

1.3.1.1 Morfolojik Markırlar

Tek lokus ile idare edilen morfolojik özellikler, değişik çevre koşullarında ifade edilebildiği sürece genetik markır olarak kullanılabilir. Populasyonların genetik yapısının belirlenmesi için yapılan ilk çalışmalar morfolojik özelliklere dayanmaktadır. Genetik çeşitliliğin tamamı morfolojiye yansımaz. Morfolojiden gelen bulgular her ne kadar populasyonların ayırt edilmesinde kullanılmışsa da, genotip-çevre etkileşimleri ve bir genin birden fazla lokus tarafından belirlenmesi gibi durumlardan dolayı morfoloji yeterli olmamaktadır. Morfolojik karakterler kullanılarak yapılan çalışmalar günümüzde geliştirilmiş tekniklerle yapılan çalışmalara göre daha az sayıdadır. Ciddi uzmanlık ve bilgi birikimi gerekmektedir [76]. Morfolojik markırların analizleri kolaydır ve haritalama populasyonunda yapılacak bir gözlem ile kolayca belirlenirler. Morfolojik özellikler az sayıdadırlar, çevreden ve diğer lokuslardan etkilenirler.

1.3.1.2 Biyokimyasal Markırlar

Biyokimyasal markırlar, genlerin ürettikleri proteinlerdir. İzoenzimler farklı olarak yüklenmiş proteinlerdir. Elektroforez tekniği kullanılarak kolayca ayrılabilirler. Enzimler spesifik biyokimyasal reaksiyonları katalizlerler. Belirli enzimlerin substrat ve kofaktörleri eklenerek jel üzerinde görülmesi sağlanır ve enzimatik reaksiyonların ürünleri renkli olarak üretilir. Renkli ürünler jel üzerinde görülür bantlar oluşturur. Bu bantlar genetik temellere sahiptir ve kodominant markır olarak genetik bilgi sağlar. Bununla birlikte morfolojik karakterlere göre çok daha yaygın kullanılmakla birlikte izoenzim lokuslarının azlığı ve bazı enzim sistemlerinin çevre koşullarından etkileniyor olması kullanımlarını sınırlar.

1.3.1.3 DNA Markırları

Bitki teşhisleri için geleneksel teşhis anahtarları, organizmaların morfolojik, anatomik ve nadiren kimyasal özelliklerine göre çalışılır. Öncelikle organizmaların kesin belirlenebilmesi için değişik türler arasında morfolojik ve anatomik özelliklerin farklılıkları yeterli olmayabilir. Ayrıca, farklı habitatlarda yaşayınca organizmalar oldukça sık birbirinden farklı değişimler gösterebilirler, böylece aynı türlere ait organizmalar farklı morfolojik ve anatomik özellikler gösterebilirler. Bu nedenle genotip fenotipten daha stabildir. Morfolojik olarak ortaya çıkan çeşitlilik, genetik çeşitliliğin ancak küçük bir yüzdesini oluşturduğu gibi, genetik çeşitliliğin büyük bir kısmı da morfolojiye yansımamaktadır. Morfolojiden elde edilen bilgiler genetik farklılıkları belirlemede kullanılsa da genotip-çevre etkileşimi, bir karakterin birden fazla lokus tarafından belirlenmesi ve bir genin birden fazla karakteri etkilemesi gibi nedenlerden dolayı her zaman yeterli olmamaktadır. Bu sebeple genotipleme konusunda DNA'ya bağlı olarak gelişmiş olan moleküler teknolojiler ve moleküler markırlar çözüm oluşturmaktadır.

Moleküler markır; DNA'nın bir parçası, diğer bir deyişle belirli bir gene beraber kalıtılan bir DNA parçasıdır. Aslında tanımlanan bir gendir ama genomun belirli bir parçasını ifade ettiği için belirteç(markır) denmiştir. Canlıların yapısını belirleyen şifre de DNA zincirlerinde olduğundan moleküler markırlar, canlı popülasyonundaki çeşitlilik veya o popülasyon içindeki canlı genotipleri arasındaki ilişkilerin tespitinde %100'e yakın güvenilirlikle değerlendirilirler [77].

Moleküler markırlar genotipik tanımlamada, çeşit tescilinde, ıslah hatlarının tanımlanmasında ve tohum saflık testlerinde, hibrit çeşit saflık testlerinde, cinsiyet belirlemede, genetik çeşitliliğin belirlenmesinde ve gen kaynaklarının genetik kökeninin belirlenmesinde kullanılırlar.

DNA Markırında Bulunması İstemenen Özellikler

1. Polimorfik olmalı,
2. Kodominant olmalı,
3. Genom boyunca dağılım göstermeli,
4. Kolay uygulanabilir olmalı,
5. Kolay ve hızlı analiz edilebilmeli,
6. Güvenilir olmalı,
7. Tekrar edilebilmeli,
8. Çevre ve diğer lokuslardan etkilenmemelidir.

1.3.1.3.1 Hibridizasyona Dayalı Moleküler Markırlar

1.3.1.3.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

DNA belirteçleri içerisinde ilk keşfedilenidir [78]. Bu yöntemde genomik DNA, 4-6 nükleotid tanıyan restriksiyon endonükleaz enzimlerle kesilir, böylece bir tek enzimin kesebildiği ancak farklı uzunluklarda DNA fragmentleri oluşur [77]. Bu oluşan DNA fragmentleri elektroforezde büyüklüklerine göre ayrılır. Kesim bölgelerindeki tek bir nükleotidin bile sebep olduğu mutasyonlardan dolayı restriksiyon fragmentlerinin uzunluğundaki varyasyon saptanır [79]. Southern Blot tekniği ile uygun bir membrana aktarılan DNA'lar, biyotinilasyonla işaretlenmiş ve radyoaktif olmayan veya radyoaktif problemlerle (genellikle P32 ile işaretlenmiş, 300-3000bp uzunluğunda kısa DNA zincirleri) hibritleştirilir. Oluşan bu radyoaktif hibritler otoradyografi tekniğiyle gözlenir. Böylece bitki tür ve çeşidine özgü restriksiyon bantları belirlenir. Karşılaştırmada eğer DNA'ların uzunluklarında bir farklılık varsa polimorfizm elde edilir.

Tekniğin en önemli aşaması uygun problemlerin seçimidir. RFLP probu olarak, genellikle 200-2000 baz uzunluğunda DNA parçaları kullanılır. Prob DNA'nın en önemli özelliği genomda az sayıda kopyasının bulunmasıdır [80]. Bu amaçla rastgele genomik veya cDNA kütüphanelerinden oluşturulan, homolog ve heterolog problemler kullanılmaktadır [81]. Genler çoğunlukla az kopya olup kendilerine özgü dizilişler taşıdıkları için cDNA'lar da az kopya olurlar. cDNA'lar dışında az kopya oldukları belirlenmiş olan genomik DNA parçaları da RFLP probu olarak kullanılır [80].

RFLP'nin çok önemli iki avantajı vardır. Türler, cinsler ve hatta familyalar arasında transferleri mümkündür, böylece bir türde bir RFLP belirteci bir kez haritalandığında akraba pek çok tür için o haritalama bölgesinde potansiyel bir belirteç belirlenmiş olur. Diğer önemli avantajı ise güvenilir olmalarıdır, farklı laboratuvarlarda farklı araştırmacılar tamamen aynı sonuçları elde edebilmektedir. Ayrıca RFLP belirteçleri, heterozigot bireylerin de karakterize edilmesine olanak sağlayan eşbaksın (kodominant) özelliktedir.

Polimorfizmin belirlenmesi için radyoizotopların kullanılması ve sonuçların alınmasının uzun süre alması RFLP analizlerinin en önemli dezavantajlarıdır. Ayrıca RFLP tekniği için büyük miktarlarda saf DNA gerekmektedir. Laboratuvar ve materyal masrafları RFLP'nin kullanımını sınırlandırmaktadır [80]. Tekniğin son bir dezavantajı ise, genomlarda az kopya olan dizilişler belli noktalarda kümelendikleri için RFLP belirteçleri genom üzerinde rastgele dağılım göstermezler. Bu belirteçlere dayalı haritalarda yaygın olarak büyük boşluklar görülebilir [82].

1.3.1.3.2 PCR'ye Dayalı Moleküler Belirteçler

PCR tekniği 1985 yılında K. Mullis ve arkadaşları tarafından keşfedilmiş ve moleküler biyolojide bir devrim yaratmıştır. 1988'de termostabil DNA polimerazın keşfiyle beraber PCR'nin araştırmalarda ve laboratuvarlardaki kullanımını çok ilerlemiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), özel DNA dizilerinin, uygun primerlerin kullanımıyla in vitro şartlarda enzimatik olarak çoğaltılması tekniğidir [83]. DNA üretim işlemi birbirini izleyen bir seri özgül sıcaklık devrelerinde yapılır. Oldukça düşük miktarlarda kalıp DNA kullanılarak bir veya daha fazla DNA fragmentinin milyonlarca kopyası üretilir ve bunlar, otoradyografi veya boyama yapılarak gözlenir [84].

Hızlı, hassas ve pahalı olmayan bir tekniktir. PCR tekniği DNA belirteçlerinin oluşumunda temel oluşturmuştur. Polimorfizmin belirlenmesinde en çok kullanılan teknik olan RFLP'nin uygulamasının çok zaman alması ve oldukça pahalı bir metot olması nedeniyle PCR'nin keşfiyle beraber DNA'nın seçilmiş bölgelerinin çoğaltılmasına dayanan genetik yöntemler gelişmeye başlamıştır [85]. PCR belirteç sistemlerinde 10-25 baz çifti uzunluğunda primer olarak adlandırılan oligonükleotidler kullanılır. Bu primerler genomda bağlandıkları yerlerin arasını eğer 3-4 kb'nin altında olursa 1-1.5 milyon defa çoğaltırlar. Genomdaki değişik yerlerdeki polimorfizmi bulmak için primerler değişik şekillerde tasarlanabilir. Farklı primer ve primer kombinasyonları kullanılarak farklı belirteçler geliştirilebilir.

PCR reaksiyonları sırasında kullanılan şartlar, üretilen bantları ve bantların tekrarlanabilirliğini etkiler. Bunlar DNA ve magnezyum ($MgCl_2$) konsantrasyonu, primerlerin DNA dizinine en uygun yapışma sıcaklığı (primerin G+C miktarı belirleyicidir) ile primerlerin uzunluğudur. Yapışma sıcaklığı, 30-40°C gibi düşük sıcaklıklara inildiğinde başlatıcı DNA pek çok yere kolayca yapışacağı için pek çok yere ait özgül olmayan DNA üretimi yapılır. Yapışma sıcaklığının yüksek tutulmasıyla (55-60°C) ise başlatıcı DNA sadece özgül bölgelere yapışır ve buradan üretim yapar [80].

1.3.1.3.2.1 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA(s)) - Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA

PCR'nin keşfiyle başlangıçta belirli DNA bölgelerinin çoğaltımı için baz dizilimi bilinen bölgelerin primer çiftleri kullanılarak bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda ilgili dizilerin belirlenmesinde karşılaşılan güçlükler ve dizisi bilinen bölgelerle çalışmanın getirdiği kısıtlamalar, sonrasında rastgele primerle çalışılan daha kolay ve etkin bir yöntem olan RAPD'in keşfini getirmiştir. Bu teknik birbirinden bağımsız farklı iki bilim adamı grubu [86-87] tarafından geliştirilmiştir. Welsh ve McClelland bu tekniğe AP-PCR (Arbitrary Primed-PCR) adını vermişlerdir. İki teknik de prensip olarak aynıdır.

RAPD tekniği, 9-10 baz çifti uzunluğundaki rastgele oligonükleotitlerin (primerlerin), DNA'nın iki iplikçığı üzerinde, birbirine karşıt iki farklı noktada tamamlayıcılarını bulması ve bu ara bölgenin çoğaltılması esasına dayanır [87]. Diğer PCR uygulamalarının aksine 2 yerine tek bir primer kullanılır [87], en az %50 G-C içeriğine sahiptir [88]. Primer kalıp DNA üzerinde komplementeri olan, birbirine yakın iki bölgeye bağlanarak arada kalan DNA bölgesinin amplifikasyonunu sağlar. Bu şekilde çoğaltılan DNA dizileri elektroforez ile agaroz veya poliakrilamid jel üzerinde ayrılıp etidyum bromür veya gümüş boyama ile boyanır [89]. Sonuçta bazı dizilerin çoğaltıldığı, bazılarının ise çoğaltılmadığı gözlenir [87]. Primer bağlanma noktalarındaki mutasyon veya dizi değişikliklerinin sonucunda amplifikasyon bantlarının varlığı ya da yokluğuna bakılarak polimorfizm tespit edilir. Genom boyunca rastgele bir şekilde polimorfizmin ortaya çıkarılmasında oldukça duyarlı ve etkili bir tekniktir [90]. Primerdeki tek bir nükleotidin yerdeğişimi RAPD'de tamamen farklı bir değişikliğe yol açar. Bu da sistemin duyarlılığının göstergesidir. Bu teknikte başarılı bir sonuç alabilmek için genomik diziye uygun primerin seçimi oldukça önemlidir. RAPD bantlarının varlığı veya yokluğu ile belirlenen bireyler arasındaki polimorfizmleri gösteren bu belirteçler genellikle dominant belirteçlerdir [89].

RAPD yönteminin en önemli dezavantajı, belirteçlerinin dominant olması sebebiyle heterozigotları teşhis etmenin zor olmasıdır. Reaksiyon birçok hassas değişkenle birbirine bağlı olduğu için, elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği düşüktür [91-92]. RAPD markırları; genom haritalama ve gen etiketleme, genetik parmakizi belirleme ve çeşit tanımlama, populasyon farklılığı, klon tanımlama, taksonomik ve filogenetik çalışmalar, genetik introgresyon, pedigri ve ebeveyn analizi, bitki büyüme ve gelişmesi, taksonomik kimliğin belirlenmesi, akrabalık derecelerinin belirlenmesi ve karışık genom örneklerinin analizi, bitkinin farklı yaşam evrelerinin araştırılması, yabancı tozlanma oranlarının tahmini, ve QTL (Quantitative Trait Locus) analizi gibi çok değişik amaçlı çalışmalarda kullanılmaktadır [93].

1.3.1.3.2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) - Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi

Zabeau ve Vos tarafından 1993’de geliştirilen AFLP tekniği, RFLP tekniğinin güvenilirliğine PCR tekniğinin gücünün katılmasıyla oluşturulan oldukça güçlü ve güvenilir bir yöntemdir [94]. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) tekniği RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir [80]. Kesimleme enzimleri ile kesilmiş DNA parçalarının selektif amplifikasyonuna dayanmaktadır. AFLP; PCR ile RFLP tekniğinin kombinasyonudur. Primerler hem diziye özgü hem de rastgele olabilir.

Tekniğin uygulama aşamaları şöyledir:

1. DNA spesifik kesimleme enzimleri ile (EcoR1/MseI) kesilir. Kesilen parçalar biyotinle işaretlenmiş iki adaptör ile bir DNA ligaz vasıtası ile birleştirilir.
2. PCR ile yapılandırılan adaptörlere uygun primerler ve kesimleme fragmentler bir ön çoğaltma işlemine tabi tutulur.
3. Radyoaktif olarak işaretlenen özel primerler ile gerçek amplifikasyon sağlanır. Sonuçlar poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenir. Poliakrilamid jel bir baz uzunluğunu dahi ayırt edebilecek niteliktedir. Görüntülemeye gümüş boyama da kullanılabilir [95].

Avantajları :

- ✓ Polimorfizm oranının yüksek olması
- ✓ RFLP'ye göre hızlı olması
- ✓ Minimum primer testi ile çok sayıda markır üretmesi
- ✓ Parmak izi analizleri için uygun olması
- ✓ QTL analizleri için uygun olması
- ✓ Sayıları RAPD ve RFLP'den daha fazladır.
- ✓ Genomik DNA'nın bilinmesine gerek yoktur.

Tekniğin dezavantajları ise; saf ve yüksek moleküler ağırlıkta DNA'ya gereksinim duyulması, pahalı bir teknik olması, genellikle dominant belirteçler vermesi ve farklı genetik haritalar arasında transferinin güç olmasıdır [82].

1.3.1.3.2.3 Minisatellitler (VNTR) / Mikrosatellitler (SSR)

Yüksek organizmalarda henüz görevleri tam olarak bilinmeyen ancak düzenleyici rollere sahip oldukları düşünülen, rastgele ardışık tekrarlanan, 2-6 nükleotid gruplarından oluşan bölgeler bulunmaktadır. Bu tekrarlar içerdikleri nükleotid sayısına göre mikrosatellit veya minisatellit olarak adlandırılırlar. (AT), (GT), (ATT), (CTT) veya (GATA) gibi nükleotitlerinin n sayısında tekrarlarından oluşurlar. Mikrosatellitler aynı zamanda STR (Short Tandem Repeats) veya SSR (Simple Sequence Repeats) olarak da anılır. 11-60 bp uzunluğundaki tekrarlardan oluşan minisatellitlerden (VNTR: Variable Number Tandem Repeats) farklıdır. Minisatellitler genellikle kromozomların uç kısımlarında telomere yakın yerde bulunurken, mikrosatellitler yüksek organizmalara ait kromozomlarda daha bol ve gelişigüzel dağılım gösterirler [77].

Mikrosatellitleri çevreleyen DNA dizileri genellikle aynı türün bireyleri arasında korunmuş olduklarından, farklı genotiplerde çakışan SSR'lerin PCR primerleri ile çoğaltılarak seçimine izin vermektedir. Ardışık tekrarların sayısındaki farklılık PCR sonucu farklı uzunlukta parça çoğaltımıyla sonuçlanır. Bu tekrarlar çok yakın tür ve çeşitler arasında dahi tekrarlanan ünitelerin sayısında değişikliğe yol

açan mutasyonlar nedeni ile oldukça polimorfiktir [96]. Bu sayede ökaryotik genomda polimorfizmin mükemmel kaynakları olup genetik çalışmalarda oldukça etkili olmuşlardır [89]. Tekrarlanan DNA'yı çevreleyen korunmuş diziler tekrarlar özgüdür, yani özgüdür. Bu diziler SSR primerlerini dizaynetmek için kullanılarak belli bir lokus PCR ile klonlanıp çoğaltılır. PCR ürünleri ise jeller üzerinde büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra floresan, gümüş nitrat veya etidyum bromür yöntemlerinin biriyle tespit edilir. Polimorfizmin kaynağı tekrar sayılarıdır [77].

SSR'lar yüksek miktarda polimorfik olmaları, kodominant olmaları, PCR yoluyla hızlı çoğaltıma olanak tanınmaları ve bilinen primer dizileri sayesinde öteki belirteç uygulamalarına göre daha kullanışlıdır [97]. Öte yandan SSR'de primer geliştirme safhası oldukça pahalı, teknik uzmanlık gerektiren, zaman alıcı çalışmalar içerir. DNA klonlarının tekrarlanan oligonükleotid içeren proplarla melezlenme yoluyla bulunması, nükleotid dizilişlerinin belirlenmesi ve yan yana tekrarlanan yapıların başlangıç ve bitiş yerlerinden özel başlatıcı DNA'lar geliştirilmesi gerekmektedir [80].

1.3.1.3.2.4 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) - Basit İç Dizi Tekrarları

Teknik 5' ve 3' sonda güçlendirilen kısa, tekrarlanan DNA zincirlerinin primer olarak kullanılmasını, PCR ürünlerinin elektroforez ile büyüklüklerine göre ayrılmasını ve jel üzerinde DNA'ların tespitini içerir. Primer olarak 2-4 farklı veya aynı nükleotidlerle sabitleştirilen, basit olarak tekrarlanan DNA zincirleri kullanılır. Bir reaksiyonda tekrarlanan zincir aynı kalmak kaydıyla, sabitleştirici DNA'ların farklı kombinasyonları primer olarak aynı reaksiyonda kullanılarak bir tek PCR reaksiyonunda güçlendirilen hedef DNA dizilerinin sayıları artırılır. Böylece bir jel üzerinde yürütülecek bant veya belirteç sayısı artırılmış olur. Bu diğer DNA belirteçlerinin üretebildiği sayılarla karşılaştırıldığında önemli bir avantaj sağlar [77].

RAPD ile maliyeti hemen aynı olan ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) [98] tekniği RAPD'e göre oldukça güvenilir, tekrarlanabilirlik oranı yüksek ve PCR koşullarından çok etkilenmeyen bir tekniktir. Bu teknik genetik çeşitlilik, sınıflandırma, moleküler markır bulma çalışmaları, evrim ve genom haritası oluşturma çalışmalarında son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır [99]. Dezavantajları ise primerlerin ayrı ayrı bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi ve benzer büyüklükteki bantların aynı olmama durumudur [77].

1.3.1.3.2.5 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) - Belirlenmiş ve oğaltılmış Polimorfik Diziler

Bir polimorfik RFLP veya RAPD klonlanır ve dizi analizi yapılır. Bu spesifik fragmentlere göre 2-24 nukleotitik PCR primeri sentezlenir. PCR'de oğaltılmış spesifik primerleri bir kesim enzimleri ile kesilir. Sonuçta DNA'daki büyüklük değişimi tespit edilir [100]. RAPD ve ISSR gibi belirteç spesifikitesi düşük olan belirteçlerin gücü, bu yöntemlerle elde edilen bantların jel üzerinden çıkarılarak 3' sonlarındaki DNA zincirlerinin tespiti ve bunların daha uzun, dolayısıyla da daha özgül primerler olarak PCR reaksiyonlarında kullanılması ile arttırılır.

Orjinali olan RAPD ve ISSR belirteçlerine göre daha üstün özelliklere sahiptirler, tekrarlanabilirlikleri yüksektir. Genellikle dominant belirteçler oluşturmasına rağmen, tek tek bantların restriksiyon enzimleriyle kesilmesiyle kodominant belirteçlere dönüştürülebilir [77]. Çok düşük miktarlarda kalıp DNA gerektirmesi, yüksek duyarlılıkta olması, kolay ve hızlı kullanım sunan SCAR belirteçleri bu avantajlarının yanında primer geliştirmede DNA bilgisini gerektirir.

1.3.1.3.2.6 CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence) - Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler

PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve elektroforezle büyüklüklerine göre ayrılan bu kesilmiş fragmentlerin tespitini içerir. Primerler cDNA veya genomik DNA klonlarından, klonlanan ve DNA zincirleri tespit edilen RAPD, ISSR bantlarından elde edilir. Çok düşük miktarda kalıp DNA gerektirirken, primer için ise DNA bilgisi gerektirir.

Hem SCAR hem de CAPS primerleri geliştirebilmek için DNA zincir bilgisine ihtiyaç olduğundan bu iki yöntem de yaygın olarak kullanılmayıp daha çok RAPD, ISSR ve AFLP gibi spesifitesi düşük belirteçlerin spesifitesini arttırmak amacıyla kullanılırlar.

1.3.1.3.2.7 ESTs (Expressed Sequence Tags)-İşaretli İfade Edilen Diziler

EST belirteçler temel prensip itibari ile 150-400bp büyüklüğündeki mRNA'ların tamamı ya da belirli bir bölümüne yakın bir kısmına karşılık gelen cDNA klonlarının dizi analiz sonucu oluşturulmuş DNA belirteçleridir. mRNA'lar ve cDNA'lar kullanıldığı için ifade edilmiş (expressed) terimi kullanılmaktadır. Gen bankasında çok sık başvurulan elemanlardandır. Etkinliği çok yüksek bir tekniktir. Bu teknik tanımlamanın yanı sıra, haritalama çalışmalarında kullanılmaktadır.

Bir EST, cDNA sekansının bir segmenti olup mRNA'ya benzer. EST'ler genomik sekansı açıklamada bir dayanaktır ve spesifik dokulardaki veya büyüme koşullarıyla ilişkili gen ekspresyonunu analiz etmeyi sağlar. İnsanda genlerin ekspresyonunun tanımlanması kodlanmayan DNA bölgelerinin (intronların) olmasından dolayı zordur. Bu nedenle mRNA izolasyonu ile ifadesi olan genleri tespit etmek mümkündür. Ancak mRNA hücre dışında stabil değildir. Bu nedenle mRNA'dan cDNA(komplementer DNA) sentezlenir. cDNA ifade edilen sekansı içerir. Daha sonra molekülün iki ucundan EST oluşturmak üzere birkaç yüz nükleotid sekanslanır.

EST sekansları eksprese edilen genlerin kurulmasında hızlı bir metottur. Herhangi bir çeşit cDNA kütüphanesi sekanslama yapmak için kullanılabilir. Single-pass (tek geçişli) sekanslama cDNA klonunda sadece bir uçtan yapılır. Bu verilerin hızlı ve oldukça ucuz toplanmasını sağlar. Ancak single-pass sekanslama birçok hata içermektedir.

1.3.1.3.2.8 ASAP (Allele Specific Associated Primers)- Allele Özgü Birleşen Primerler

Gu et al. (1995)'e göre bu teknoloji, belli bir bağlanma sıcaklığında tek bir DNA parçası oluşturan allel-spesifik bağlantılı primerlerin kullanılması suretiyle alkali DNA ekstraksiyonunu takiben mikrotiter tabakalar içinde DNA çoğaltımına dayanmaktadır [101]. DNA parçası sadece uygun allele sahip bireylerde oluşmakta ve bu sayede çoğaltılan DNA parçalarının elektroforezde ayırımına ihtiyaç göstermemektedir. Bu metotta kullanılan etidyum bromid DNA çift sarmala bağlanmakta ancak PCR karışımındaki serbest nükleotidlere bağlanmamaktadır. Bu yöntem DNA ekstraksiyon süresini kısaltmak ve geniş çaplı taramalarda PCR reaksiyonunun güvenilirliğini arttırmak için geliştirilmiştir.

1.3.1.3.2.9 SNP (Single Nucleotide Polymorphism-Tek Nükleotit Polimorfizmi)

SNP'ler transisyonlar (bir pürin bazın (A,G) diğer bir pürin bazına veya bir pirimidin bazın (C,T) diğer pirimidin bazına değişmesi) ve transversiyonlar (bir pürin bazının bir pirimidin bazına değişimi veya tersi) gibi baz değişimlerini içermektedir. G>A ve C>T transisyonları, insan genomundaki SNP'lerin %25'ini oluşturmaktadır. Tek nükleotid pozisyonundaki varyasyon terminolojisi allel frekansı ile açıklanmaktadır. Bir popülasyondaki tek baz değişiminin frekansı %1'den büyükse bu değişim SNP, %1'den küçük ise mutasyon olarak adlandırılır.

SNP'ler yaygın olarak bireyler arasında DNA'daki tek nükleotit değişiklikleri olarak adlandırılır. Bu nokta değişikliklerini tespit eden yöntemler, bir veya birkaç bazlık küçük insersiyon ya da delesyonları da bulabilir. Polimorfizmler popülasyonda en az %1 sıklıktan daha az yaygın bir varyantın olduğu bölge olarak da sıklıkla tanımlanırlar. Bu varyantlar düşük sıklıkta olmasına karşın bazı durumlarda çok önemlidirler.

SNP'ler iki yolla; hastalığa katkısı bulunan genlerin bulunması için kullanışlıdır. Bazı SNP alleleri, direk olarak hastalığa katkısı olan gen fonksiyon veya regülasyonunda farklılığa yol açan DNA sekans varyantlarıdır. Birçok SNP alleli muhtemelen hastalığa küçük miktarda katkıda bulunuyor. Bunların, fonksiyonal SNP'lerin bulunmasında genetik markır olarak kullanılması; markır SNP'ler ve fonksiyonal SNP'ler arasındaki ortaklık nedeniyle, kullanışlıdır.

1.3.1.3.2.10 SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism-Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizm)

SSCP tek zincirli DNA'nın molekül içi etkilişimi sonucu her zincirin farklı formda katlanıp kıvrılmasıyla değişik konformasyonların oluşmasına ve poliakrilamid jelde farklı hızda hareket etmesi üzerine kurulmuş bir yöntemdir. Mutasyon içeren DNA molekülü tek baz bile farklı olsa normal dizide değişik bir yapı oluşturacağından farklı yerlerde bantlaşma gözlenmektedir. Normal ve incelenen örnek arasında fark olması, mutasyonun varlığını göstermektedir. Nokta mutasyonlarının DNA dizi analizi ile kesin olarak teşhis edilebilmesine rağmen taranacak DNA fragmenti büyüdükçe, teşhis süresi ve analiz maliyeti artmaktadır. Bunu önlemek amacıyla mutasyon içeren gen, kısa DNA parçacıkları (200 bp) halinde amplifiye edilip SSCP yöntemiyle taranarak mutasyonun bulunduğu fragment belirlenir.

Böylece, büyük bir genin tümünü analiz etmek yerine sadece mutasyon içeren parçanın incelenme sürecini kısalttığı gibi maliyeti de azaltmaktadır. Burada asıl amaç mutasyonun bulunduğu bölgeyi belirlemektir.

1.3.1.3.2.11 STS (Sequence Tagged Sites - Dizisi Etiketlenmiş Alanlar)

STS tekniği RFLP güvenilirliğini ve PCR kolaylığını biraraya getiren bir tekniktir. Nükleotid diziliŖi bilinen az kopyalı RFLP problemlerinden yeterli uzunlukta (16-24 nükleotid) baŖlatıcı DNA'lar geliŖtirilmektedir. BaŖlatıcı DNA'lar ile genomik DNA üzerinde çok spesifik Ŗartlarda DNA üretimi yapılması ile RFLP probleminin temsil ettiği lokus çoğaltılmaktadır. Farklı genotiplerden üretilen DNA'ların 4 nükleotid taŖıyan bir seri kesim enzimi ile kesilmesi sonucu üretilen parçaların içindeki tek nükleotid deđiŖikliđi bile tanımlanabilmektedir.

Avantajları:

- Çoğunlukla kodominant özellikte markır üretmektedirler.
- Kullanımı RFLP'ye göre çok daha kolay, ucuz ve hızlıdır.
- RAPD gibi az miktarda DNA yeterlidir.
- BaŖlatıcı DNA'ların iyi sečilmesi Ŗartı ile farklı haritalar arasında transferi mümkündür.
- Teknik otomasyona uygundur.

Bu tekniğin dezavantajı; ilgili RFLP probleminin nükleik asit diziliŖinin bilinmesini ve buna göre bir çift baŖlatıcı DNA geliŖtirilmesini gerektirmesidir. Orta düzeyde polimorfizm vermesi de bir diğer dezavantajdır.

1.3.1.3.2.12 SPAR (Single Primer Amplification Reaction)

SPAR, deney baŖına çoklu markır üreten bir DNA markır sistemidir. Kullanılan primerler SSR tabanlıdır ve SSR'ler arası DNA dizileri çoğaltılır. Polimorfizmin düzeyi tür içindeki genomik çeŖitliliđe bağlıdır. Çoğu DNA markırını dağınık genom bölgelerini haritalar. Çoğu SSR-SPAR dominant karakterde olmasına rağmen kodominant olanları da saptanabilir [96].

1.3.1.3.2.13 SRAP (Sequence Related Amplified Polimorphism)

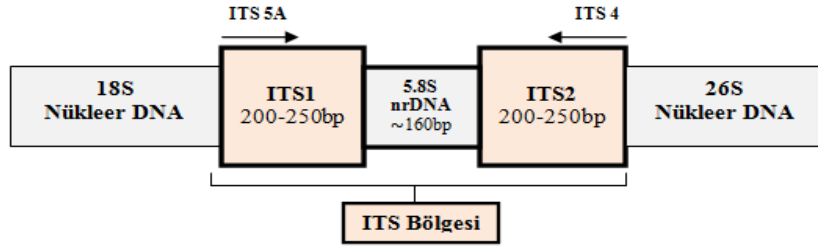
SRAP, Li ve Quiros tarafından 2001 yılında ORFs denilen çekirdek sekansları baz alınarak uygulanan bir tekniktir. Teknik genomun kodlanan bölgelerinin seçilmesi esasına dayanır. SRAP, RAPD benzeri bir yöntemdir. Polimorfik, otomasyona uygun, uygulanması kolay, güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği yüksektir. RAPD'e göre daha spesifik bölgeleri taramaktadır. Elde edilen fragmentlerin jellerden izolasyonu kolaydır. Dezavantajları RAPD'in aksine özel primer dizilimi istemesidir.

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 karşılaştırılmasındaki kullanışlılığı nedeniyle, daha 1990'lı yıllarda bu bölge hızlı bir şekilde çalışılmaya başlanmıştır. Mevcut veriler, ITS baz dizilerinin, Angiosperm'lerde değişik seviyelerde filogenetik açıdan kullanışlı olduğunu göstermektedir. Bu veriler, genetik sürüklenmelere yönelik etkili sinyaller ortaya koymaktadır [102].

Bazı bitki gruplarında ITS1 ve ITS2'de yüksek oranda varyasyonla karşılaşılırken, bazılarında ise, nükleotit varyasyonunun az bir dizisine rastlanılmaktadır. Aynı toplam DNA değerlendirmelerinde; çoğu gruplarda ITS dizilerinin, cpDNA baz dizinlerinden çok daha fazla değişkenlik gösterdiği ve daha bilgilendirici olduğu sonucuna varılmıştır [103].



Şekil 1.2 nrDNA'nın ITS Bölgesi [104].

ITS Bölgesinin Genel Özellikleri

- Filogenetiğin yeniden inşasında yeterli veri sunacak kadar uygun bir büyüklüğe (Şekil 1.2) sahiptir (600–700bp).
- Genomik DNA üzerinde yüksek kopya sayısına sahiptirler.
- Cins ve tür içi seviyelerde ileri derecede korunmuş olan rDNA gen bölgelerine komşu olarak bulunmaktadır.
- Cins ve tür seviyesindeki filogenetik çalışmalarda DNA içerikleri, açıklayıcı bilgiler sunmaktadır.
- rDNA gen bölgelerine göre daha hızlı nükleotit baz değişimi gösterirler.
- ITS1 ve ITS2 bölgelerinin filogenetik açıdan sundukları veriler farklı düzeydedir. Bu bölgelere dayalı analizlerde ITS1 verileri, daha fazla filogenetik çözümler sunmaktadır ve nükleotid içeriği ITS2'ye göre % 29 daha değişkendir.
- rDNA'nın olgun 18S, 5.8S ve 28S alt birimlerinin oluşumu sürecinde görev almaktadır [75].
- Ökaryotik organizmalarda 5.8S gen bölgesi, çoğunlukla ITS bölgeleri ile birlikte değerlendirilir.

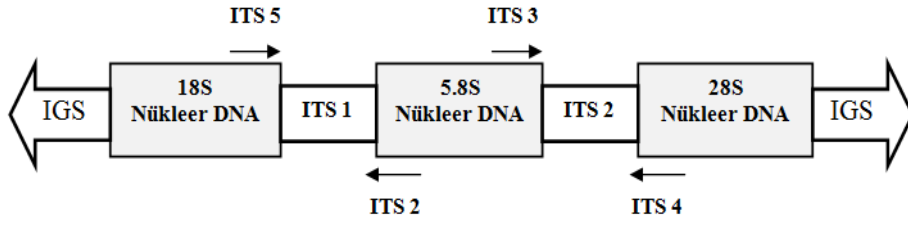
1.3.2.2 rDNA ve ITS Bölgeleri Arasındaki İlişki

Bitki gruplarını doğal ortamlarında tanımlamada ve taksonları ayırt etmede zorluklarla karşılaşılabilir. Anahtarlarda kullanılan fenetik karakterler genellikle tam ayırt edici olamamaktadır. Özellikle kültürü yapılan türlerle, doğal tiplerin akrabalıklarının ortaya konmasında, türlerin teşhisi, toplanması ve korunması sırasında tanımlama büyük önem taşımaktadır [102].

Moleküler biyolojideki son gelişmeler, türe özgü gen bölgelerinin belirlenmesiyle bitki türlerinin tanımlanmasına imkân vermektedir. Buna yönelik olarak, rDNA'nın ITS bölgeleri, bitkilerdeki moleküler sistematik çalışmalarda sıklıkla başvurulan yöntemlerden biri haline gelmiştir [75].

ITS (internal transcribed spacers) bölümleri cins ve tür düzeyinde yapılacak filogenetik bir çalışma için en güvenilir metotlardandır. Bu nedenle ribozomal DNA internal transcribed spacers (rDNA ITS) bitki sistematigi ve tanımlamada sahip oldukları genomik bölümlerin işlevi ile paralel olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Kullanımdaki avantajı ribozomal DNA'nın yüksek düzeyde konservatif genlere sahip olması ve ITS bölümleri arasında konumlanmasıdır.

Genomik DNA üzerindeki rDNA bölgeleri, çoklu gen yapılarından oluşur ve ardışık sıralanmış tekrarlı diziler şeklindedir. rDNA tekrarları; genomik DNA'nın NOR (Nükleolar Organizer Region) bölgelerinde yerleşmiş durumdadır ve 18S küçük alt birim, 5.8S ve 28S büyük alt birim rDNA'ları kodlayan genlerden oluşmaktadır. ITS bölgeleri, genomik DNA üzerindeki bu rDNA tekrarları içinde yerleşmiştir. Bu bölgeler, rDNA'nın alt birimleri ile transkribe edilmektedir ve korunmuş bölgeleri (18S, 5.8S ve 28S) birbirinden ayıran iki kısımdan (ITS1 ve ITS2) oluşmaktadır [75]. Bu ITS bölgeleri, rDNA gen bölgelerine bağlanabilen evrensel primerler kullanılarak PCR çalışmalarıyla kolayca elde edilebilir. Bu amaçla kullanılan evrensel ITS (ITS2, ITS3, ITS4 ve ITS5) primerlerinin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri Şekil 1.3'te gösterilmiştir.



Şekil 1.3 ITS Primerlerinin rDNA Üzerindeki Bağlanma Bölgeleri [123]

rDNA genleri, kopya edilmeyen bölgeler (IGS) ve ITS bölgelerinin varlığıyla birbirinden ayrılmıştır. IGS bölgeleri (ETS ve NTS), komşu rDNA tekrar birimleri arasında yer almaktadır. ETS, ribozomal mRNA ile kodlanan dış kopya bölgesidir ve onun promotör bölgesini ihtiva etmektedir. NTS (Non Transcribed Spacer) ise, tekrar birimleri arasında yerleşmiş kodlanmayan bölgelerdir [75]. ITS1, 18S (SSU) ile 5.8S arasında yerleşmiştir. ITS2 bölgesi ise, 5.8S ile 28S (LSU) genlerini ayıran DNA bölgesidir. Bu gen yapılarını ihtiva eden rDNA tekrarlarının ökaryotik organizmalardaki kopya sayısı, 200–30.000 arasında değişiklik göstermektedir. Bu, bütün genomun yaklaşık %1 veya daha fazlasını temsil etmektedir. Ayrıca genomik DNA'nın rDNA kopya sayısında ara sıra değişiklikler meydana gelebilmektedir.

1.3.2.3 rDNA Bölgeleri

1.3.2.3.1 Küçük Alt Birim rDNA (18S)

Küçük alt birim rDNA'sı yüksek derecede korunmuş DNA bölgelerinden biridir. Alem, şube ve sınıf seviyesindeki kategorilerde filogenetik çalışmaların yeniden inşası için yoğun olarak kullanılmaktadır. Bugüne kadar 4000'den daha fazla takson için, bu bölgeye ait DNA baz sırası belirlenmiştir. Küçük ve büyük alt birim rDNA nükleotit baz sıralarında aşırı korunmuş ve değişebilir bölgelerin bulunması, ilgili özel sorular için optimal filogenetik cevaba izin veren bir dizi oranlar sağlamaktadır.

Küçük alt birim rDNA baz sıraları, ata soyların belirlenmesinde, temel ökaryot ve fungal soylar arasında, Angiospermiler içinde, hayvanların düzenlenmesi gibi farklı taksonomik seviyelerde filogeninin yeniden inşasında kullanılmaktadır [102].

1.3.2.3.2 5.8S rDNA

rDNA tekrar birimleri içinde en küçük uzunluğa sahip olanı, 5.8S nükleer DNA'sıdır. rRNA'nın büyük alt biriminin bir parçasıdır ve lokus uzunluğu ile nükleotit içeriği ileri derecede korunmuştur. Bu bölgeye ait baz uzunluğu, arzu edilen kullanılabilir bir büyüklüğe sahip olmadığı (163-164 bp) ve filogeniye yeterli derecede veri sağlamadığı için, bu tip filogenetik çalışmalarda tek başına kullanılmaları uygun görülmemektedir. Bu nedenle nükleotit baz değişimlerinden, ITS bölgeleriyle birlikte değerlendirilmesi yoluyla yararlanılmaktadır [102].

1.3.2.3.3 Büyük Alt Birim rDNA (28S)

Küçük alt birim rDNA'ya göre daha uzun yapıdadır ve baz içeriği açısından daha fazla varyasyon gösterir. Büyük alt birim rDNA'sı çok farklı alt birimlere sahiptir. Bu nedenle filumlar arasında önemli derecede gen varyasyonu gösterirler. Küçük ve büyük alt birim rDNA'sı üzerinde değişebilir bölgeler veya yayılan segmentler olarak adlandırılan domainler mevcuttur. Ancak bu bölgelerdeki genişlemeler; rDNA baz dizinlerinin, akraba türleri ayırt etmede kullanılması için yeterli veri sunmamaktadır. Bu nedenle rDNA genlerinin gösterdiği varyasyonlardan, aile ve daha yukarı seviyelerde faydalanılmaktadır [102].

rDNA tekrarlarının ITS ve IGS bölgeleri, yüksek oranda varyasyon göstermeleri bakımından cinsler arasında, tür seviyesinde ve populasyonların çalışılmasında karşılaşılan taksonomik problemleri çözmede kullanılmaktadır. Ancak IGS (4–5kb) bölgelerinin ITS bölgelerine göre daha uzun parçalara sahip olması ve dizin analizindeki zorluk nedeniyle, filogenetik çalışmalarda çoğunlukla ITS bölgeleri tercih edilmektedir [102]. Yapılan RFLP çalışmaları, bu ara bölgelerin son 50 milyon yıl içinde ayrılmış olan yakın akraba taksonlar arasındaki filogeniyi ortaya koymada kullanılabileceğini göstermiştir [102].

1.3.3 DNA Dizileme

DNA dizi analizleri yada sekanslama, DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır. Bu hibridizasyon sırasında radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretleme yapılır. Sıklıkla gen mutasyonları (delesyon, insersiyon vb.) tespiti ya da rekombinant DNA oluşum yapılarının tayininde kullanılır. Ayrıca gen regülasyonunda yer alan genetik kontrol bölgeleri, konsensus dizileri, epistatik genler ve etkileri belirlenebilmektedir. Preimplantasyon tanısı, kalıtsal hastalık tayininde oldukça kullanılır.

Nükleotit dizilerinin belirlenmesinde iki temel teknik kullanılmaktadır.

1. Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi [105].
2. Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi [106].

Her iki teknik de üç temel basamaktan oluşmaktadır.

- DNA'nın hazırlanması
- Reaksiyonlar
- Yüksek voltajlı jel elektroforezi

1.3.3.1 Maxam ve Gilbert'in DNA Kimyasal Kırılma (DNA Sequencing) Yöntemi

Çok yönlü sekans olarak da bilinen bu yöntemde bazı kimyasallarla DNA özgül baz dizilerinden kesilerek değişik uzunlukta fragmentler elde edilir. Bu metotta bir sekans jelinden kırk klon analizi yapılabilmektedir. Yine de çok fazla tercih edilmeyen metottur. Ana mantık DNA'daki bazların tahrip edilip hasar görmüş bölgelerden piperidin ile fosfodiester bağlarının kırılmasıdır. İlk olarak DNA parçası bir ucundan işaretlenir. İşaretleme sonrası DNA dört parçaya ayrılır. Her bir örneğe bazlardan birini tahrip edebilecek kimyasallar eklenir. Maxam ve Gilbert yönteminde özgül bazlar ile zincirlerin kırılmasında kullanılan kimyasallar Tablo 1.1'de verilmiştir [107].

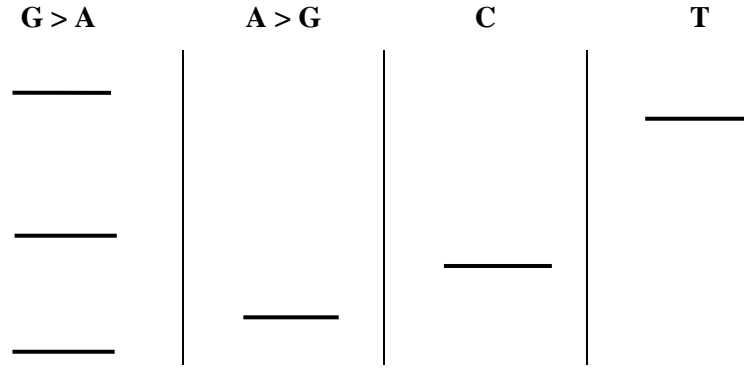
Tablo 1.1 Kimyasal Kırılma Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

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

Pürinlerin kırılmasında dimetil sülfat kullanılır. Dimetil sülfat ile N₇ no' lu pozisyonundan metillenen DNA'ya bazik ortamda piperidin uygulanırsa DNA guanin bazından kırılır. Bazik ortam yerine asidik ortam tercih edilirse bu sefer DNA guanin yerine adenin bazından kırılır. Pirimidin bazlarının kırılması ise hidrazin ile yapılır. 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. Dört farklı bazı ayırmada kullanılan reaksiyonlardan elde edilen parçacıklar, yüksek voltajlı elektroforez sonunda X-ray duyarlı film ile kaplanarak otoradyograma alınır.

Otoradyografik bantlar 5'-3' yönünde en alttan en üste doğru okunduğunda Tablo 1.2'deki gibi 5'-3' yönündeki baz dizilimini verir [108].

Tablo 1.2 Kimyasal Kırılma Yöntemi ile Yapılan Reaksiyonların Elektroforez Sonrası Görüntüsü



Kimyasal kırılma yöntemi ile yapılan reaksiyonların elektroforez sonrası görüntüsü ve okuma sonucu; GAGCTG

1.3.3.2 Sanger Dizileme (Cycle Sequencing) Yöntemi

Dideoksi ya da zincir sonlanması reaksiyonları olarak da bilinir. Tehlikeli kimyasallardan uzak ve daha hızlı bir yöntem olduğundan Maxam-Gilbert yöntemine tercih edilir. Bu yöntem için:

- Tek iplikçi kalıp DNA'ya,
- dNTP'lere,
- ddNTP'lere,
- DNA polimeraz'a
- Serbest OH grubu içeren primere ihtiyaç vardır.

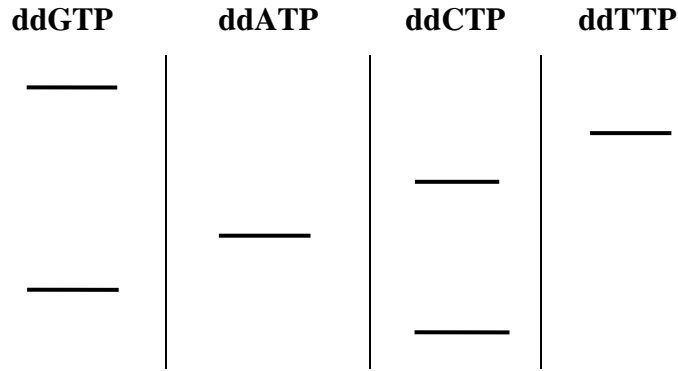
ddNTP'ler dideoksinükleosittrifosfatlardır. OH grubu taşımayan modifiye nükleotit substratlardır. Bunlar riboz şekerinin ikinci karbon atomuna ek olarak üçüncü karbon atomunda da deoksi halde olduğundan fosfodiester bağının oluşumu engellenir yeni nükleotitler yapıya katılmaz. DNA zincir uzaması sonlanır. Bu Sanger yönteminin en can alıcı noktasıdır.

İlk olarak analiz için kullanılacak kalıp DNA asimetrik amplifikasyon yöntemiyle hazırlanır. Böylece daha fazla kalıp DNA elde edilir. Bu amaçla dizi analizinin yapılacağı kolun primer derişimi komplementer kolunkinden daha yüksek tutulur. Döngü ilerlediğinde sınırlayıcı primerin bittiği anda yalnızca uzama kolu çoğalır. Amplifikasyon bitiminde ürün ortamdaki maddelerden arındırılır. Artık tek zincirli kalıp DNA olarak kullanılmaya hazırdır.

İlk olarak reaksiyon sonunda oluşacak ürünlerin rahat görüntülenebilmesi için DNA molekülü işaretlenir. İşaretleme işlemi için genelde S35, P33 ya da P32 kullanılır. İşaretleme ya gama pozisyonunda, yapısında bulunduran nükleotitleri kullanarak ya da alfa pozisyonunda işaretli dNTP'leri kullanarak yapılır. DNA polimeraz, primer kalıp DNA ve dNTP'ler ortama konulup, işaretli nükleotitin yapıya katılması sağlanır. Kullanılan ddNTP'lerin konsantrasyonu diğer maddelerden daha düşük olmalıdır. İşaretleme primere de yapılabilir. İşaretlemeden sonra zincir sonlanması reaksiyonlarına geçilir. Karışım dört kısma ayrılarak dört tüpe konulur. Her tüpe gerekli enzim faktörleriyle birlikte düşük derişimli farklı ddNTP'ler konulur ve inkübe edilir. ddNTP'ler ve dNTP'ler aynı karışıma konduğunda aralarında bir yarışma olur. Substrat olarak dNTP'ler kullanıldığı sürece uzama devam eder. Sentezin herhangi bir noktasında yapıya dideoksi girdiğinde reaksiyon durur. Her tüpte aynı anda birbirinden bağımsız birçok reaksiyon olmuştur. Sonuçta primer sonundan başlayıp sonlanmaların olduğu bölgelere kadar çeşitli uzunlukta DNA parçaları oluşur.

Oluşan ürünlerin ayrıştırılabilmesi için denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi kullanılır. Elektroforez sonunda jel kurutulur ve otoradyografi ile fotoğrafı çekilir. Otoradyogramdan elde edilen en kısası en önde olmak üzere basamak şeklindeki bantlar, radyoaktif izotop taşıyan tek zincirli DNA moleküllerine aittir. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP'nin tipine göre okunur. Otoradyogramdaki bu bant verilerinden yararlanılarak Tablo 1.3'teki gibi 5'-3' yönüne doğru olan baz dizilimi saptanmış olur [108].

Tablo 1.3 Enzimatik Zincir Sonlanma Yöntemi ile Yapılan Reaksiyonların Elektroforez Sonrası Görüntüsü

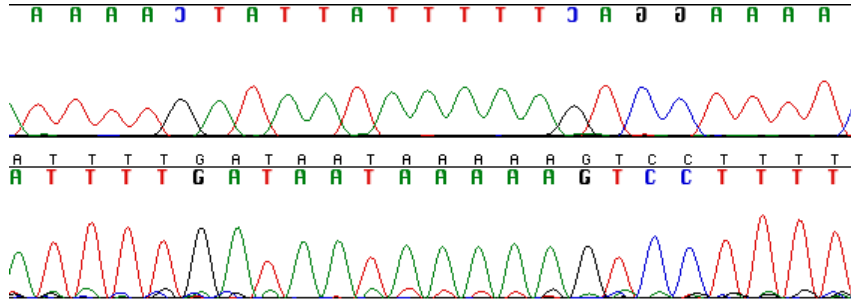


Enzimatik zincir sonlanma yöntemi ile yapılan reaksiyonların elektroforez sonrası görüntüsü ve okuma sonucu; CGACTG

1.3.3.3 Otomatik DNA Dizi Analizi

İnsan Genom Projesi gibi büyük projeler çok sayıda DNA dizi analizi yapılmasını gerektirmektedir. Artan analiz sayısı, uzun zaman ve yüksek iş gücü gerektirir. Bu gelişmeler sonucunda otomasyon kaçınılmaz olmuştur. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde de yarar sağlamıştır.

Otomatik DNA Dizi analizinde de Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmıştır. Tek farkı radyoaktif izotop yerine floresan boyaların kullanılmasıdır. Bu sistemde dört farklı renkte boya kullanılır ve sonuçta, dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkteki piklerin oluşturduğu bir model ortaya çıkar. Guanin bazı siyah renkle, Timin bazı kırmızı renkle, Adenin bazı yeşil renkle ve Sitozin bazı mavi renkle Şekil 1.4'teki gibi gösterilir.



Şekil 1.4 Dizi Analizi Sonucu Oluşan Piklerin Görüntüsü

Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA'nın bulunduğu jelmatriks bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya, ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir [107].

1.3.3.4 Çoklu Dizi Hizalama ve Clustal W Programı

Çoklu dizi hizalama, biyoinformatikte temel bir araçtır. Çoklu dizi hizalama, dizi oluşturma, moleküler modelleme, veritabanı aramaları, filogenetik ağaç oluşturulması gibi konularda başlıca araçtır. İkili dizi hizalamadan çok daha fazla bilgi verir. Çoklu dizi hizalamada dinamik programlama tekniğiyle polinom zamanda optimum sonuç bulunabilmesine rağmen, var olan çoklu dizi hizalama teknikleri optimum hizalamayı ancak dizi sayısıyla üssel ilişkili bir sürede bulabilir. Bu da pratikte gerekli olan büyük boyutlu verilerde problemin çözümünü, günümüz hesaplama gücüyle imkansız kılar. Ayrıca bazı buluşsal (heuristic) yöntemlerle ortaya çıkan sonuçların yerel optimuma takılma ihtimalleri çok yüksektir. Buna ek olarak, bulunan hizalamalar uzmanların bakış açılarına göre de farklı değerler alabilmektedirler. Bu yüzden yerel optimaya takılmadan farklı iyi hizalamalar verebilecek yöntemler gittikçe önem kazanmaktadır.

Çoklu dizi hizalamada en çok kullanılan yöntem aşamalı hizalama yöntemidir. Bu yöntemi kullanan araçların en yaygını CLUSTALW'dur [109]. Önce eldeki dizilerin ikili benzerlikleri kullanılarak tahmini bir filogenetik ağaç oluşturulur. Daha sonra bu bilgiden yararlanılarak, aşamalı olarak diziler hizalanır. Bu yöntemin en önemli dezavantajları, yerel minimuma takılması ve problemi doğru şekilde modelleyecek parametrelerin belirlenmesinin zor olmasıdır. Bunun yanısıra olasılıklı (stochastic) yöntemler kullanan yaklaşımlar da olmuştur. Çok yavaş yöntemlerdir ve daha çok çözüme yakın noktalardan başlayarak iyileştirme yapmak amacıyla kullanılırlar. Çoklu dizi hizalama problemlerini çözmek için kullanılan diğer bir ana yaklaşımsa son dönemlerde oldukça yaygın olarak kullanılan genetik algoritmalarıdır. En çok bilinen örneklerden biri SAGA (Sequence Alignment by Genetic Algorithm)'dır [110]. SAGA ClustalW'ya yakın hizalamalar bulmuştur ama daha başarılı değildir.

1.3.4 Filogenetik Analiz

Organizmaların evrimsel tarihi filogeni olarak adlandırılır. Filogenetik ise türler/organizma grupları arası genetik bağları ve ilişkileri (evrimsel akrabalığı) araştıran bilim dalıdır. Belirli karakterleri (morfolojik ve/veya genetik) inceler ve benzer karakterleri taşıyan organizmaların genetik olarak birbirine yakın oldukları varsayımından yola çıkar. Moleküler filogenetik kavramı ise günümüzde DNA ve protein dizilerini de içeren moleküler veriler türler arası ilişkileri analiz etmek için kullanılır. Genomlar, mutasyonların birikmesi ile evrimleşirler ve farklı organizmaların genomları arasındaki nükleotid dizisi farkı iki genomun birbirinden ayrılma zamanlamasını yansıtabilir. Farklı genomları karşılaştırarak aralarındaki evrimsel ilişkileri ortaya çıkarmak mümkündür.

Organizmaların evrimsel tarihinin saptanmasında moleküler veriler kullanılırken bazı varsayımların varlığı söz konusudur:

1. Kullanılan moleküler diziler homologdurlar. Yani ortak bir kaynakları vardır ve zaman içerisinde farklılaşmışlardır.
2. Filogenetik farklılaşmanın iki kola ayrılarak gerçekleştiği varsayılır. Filogenetik ağaçtaki bir dal belirli bir noktada iki kola ayrılır.
3. Bir dizideki her bir pozisyon birbirinden bağımsız olarak evrim geçirmiştir. Diziler arasındaki çeşitlilik kesin filogenetik ağaçların inşası için yeterli bilgi sağlamaktadır.

1.3.4.1 Filogenetik Ağaç

Filogenetik incelemelerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermede en uygun yaklaşım elde edilen verilerin çeşitli akış şemaları ve istatistiksel analizlerle filogenetik ağaca dönüştürülmesidir [111]. Evrimsel ilişkileri görsel olarak ortaya koymak için en uygun araç filogenetik ağaçlardır. Dizileme çalışmaları ile elde edilen bilginin özetlenmesini ve görsel olarak anlaşılabilmesini sağlarlar.

Bunun yanı sıra;

- Genler arası etkileşim
- İlaç tasarımları
- Aşı çalışmalarında patojen strain çeşitliliği
- Genetik hastalıklar ve bulaşıcı hastalıkların epidemiyolojisi
- Yeni genlerin görevlerinin tespiti
- Mikrobiyal ekoloji çalışmalarında da kullanılır.

Bir filogenetik ağaç, dallanma olaylarının modelini ve bazı durumlarda zamanını tanımlar. Türleşme sırasını ve hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını kaydeder. Ağaç, başlıca bir düğüm (node) ve dallardan (branch) oluşur. Dalları, türlerin atasal popülasyonlarının zaman içerisindeki durumlarını gösterir. Düğümler ise bir türün iki veya daha fazla türev popülasyona ayrıldığı noktaya karşılık gelir [112]. Ağaçtaki öncülü olmayan düğüm köktür. Kök ortak bir atayı temsil eder, ağacın herhangi bir yerinde yer alabilir. Köksüz ağaçlarda ise ortak ata gösterilmeden sadece türler arası ilişki ön plana çıkarılır [113]. Filogenetik ağaçta her bir düğüm evrimsel süreçte ayrılan taksonomik bir gruba karşılık gelir. Ağaçta dış dallar taksonları, iç dallar ve düğümler ise taksonlar arası ilişkiyi yansıtır. Birbiri ile yakın ilişkili türler ağaçta birbirine komşu dallarda yer almaları ile ayırtedilirler. Ağaç dallarının paterni topoloji olarak adlandırılır ve dal uzunluğu genellikle dalda oluşmuş değişikliklerin sayısını belirler [113].

Filogenetik analizlerde ilk adım incelenecek dizinin elde edilmesidir. Daha sonra bu diziler istenirse referans dizi denilen daha önce saptanmış ve üzerinde uzlaşılarak doğruluğuna karar verilmiş dizilerle karşılaştırılabilir. Son yıllarda moleküler filogeni alanında kaydedilen gelişmeler neticesinde çeşitli türlerden elde edilen diziler GenBank, EMBL gibi özel veritabanı sistemlerinde toplanarak kullanıcıların hizmetine sunulmuştur [113].

1.3.4.1.1 Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler

Günümüzde kullanılmakta olan yöntemler temel olarak ini başlık altında toplanmaktadır:

A. Karakter Temelli Yöntemler

1. Maximum parsimony (MP)
2. Maximum likelihood (ML)
3. Mr. Bayes

B. Mesafe Temelli Yöntemler

1. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)
2. Neighbour Joining (NJ)

1.3.4.1.1.1 Karakter Temelli Yöntemler

Dizilerde biriken mutasyonların sayılmasına dayanırlar. Farklı karakterlere dayanmaktadırlar ki; bu karakterler her bir taksondaki canlıya ait olan moleküler dizilerdir.

1.3.4.1.1.1.1 Maximum Parsimony (MP) Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi

İncelenen diziler ya da genetik uzaklıklar ile uyumlu bir ağaç elde etmek için gerekli en az mutasyonların saptanmasına dayanan bir yöntemdir. Maksimum Parsimoni (MP), minimum evrimsel metod (parsimoni=tutumluluk) olarak tanımlanabilir. Evrimsel biyolojide tutumluluk demek, evrimsel süreçte neler olduğuna ilişkin sonuca varılırken, araştırmacının karmaşık yerine basit açıklamaları, başka bir deyişle açığa çıkan evrimsel değişimin miktarını azaltan veri yorumlarını tercih etmesi demektir. Parsimoniye göre tercih edilen ağaç, açığa çıkmış olan evrimsel değişimin toplam miktarını en aza indirgeyen ağaçtır [112]. MP yöntemi uygulanırken, dizi pozisyonlarının farklı puanlamaları tercih edilebilir. Örneğin;

korunmuş bölgede gerçekleşen bazı mutasyonlar, değişken bölgedeki mutasyonlardan daha çok vurgulanmak istenebilir. Ya da transversiyonlar transisyonlardan daha önemli olarak vurgulanabilir. MP analizi ile en iyi sonuçlar dizi çiftleri arasındaki benzerliklerin çok güçlü olduğu ve az sayıda dizinin olduğu durumlarda alınır.

MP ile ağaçların oluşturulmasında “kesin” ve “tahmini” yaklaşımlar söz konusudur. Kesin yaklaşımda olası tüm ağaçlar gözden geçirilir ve kullanılan optimalite ölçütüne en uygun ağaç belirlenir. Çok zaman alıcıdır ve yirmiden fazla örnekleme varlığında uygun değildir. Çok sayıda dizinin bulunduğu durumlarda “tahmini” yaklaşım uygulanmaktadır. En tutumlu ağaçların güvenilirlik dereceleri istatistiksel olarak da değerlendirilebilir. Bu probleme yönelik yaklaşımlardan biri bootstrap (seç-bağla testi) olarak adlandırılır. Bootstrap araştırması elde edilen ağaçların dallarının parsimoni kriteri kullanılarak istatistiksel yönden en güvenilir olan dalları belirlemede kullanılır [109].

Seç-bağla testinde, bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturulur. Örneğin, çalışmada 700 baz çiftlik bir dizi bulunuyorsa bilgisayar bu pozisyonlardan birini rastgele seçmek ve bunu yeni veri setinde ilk öge olarak kullanmakla seç-bağla testine başlar. Daha sonra, rastgele seçtiği bir pozisyon yeni veri setinin ikinci veri noktasını oluşturur (ikinci veri noktasının birincisinin aynı olmaansı 1/700'dür). Bilgisayar orijinal verinin rastgele bir örneklemesini temsil eden 700 baz çifti içeren yeni bir veri seti oluşturuncaya kadar bu işleme devam eder. Sonra, bu yeni veri seti filogeniyi hesaplamak için kullanılır. Bu işlemi tekrarlamak suretiyle araştırmacı yeniden örneklenmiş veri setinden oluşan ağaçlarda belli bir dalın açığa çıkma yüzdesini % 50, %80 ya da % 100 şekilde ortaya koyar. Bootstrap değeri % 0 ile % 100 arasında değişir. Kress ve arkadaşlarının (2002) karakterize ettiği bootstrap destek kriterlerine göre, \geq % 85 güçlü, % 70-85 arası orta, %50-70 arası zayıf ve $<$ % 50 çok zayıf şeklinde tanımlanmıştır. Bootstrap desteğinin % 70 ya da daha büyük oluşu genellikle doğru filogeninin tanımlanması ile ilişkilendirilir. Eğer, belli bir dal için bootstrap desteği % 50'nin altında ise; ağacın bu kısmındaki dallanma modelinin belirlenemediği sonucuna varılır ve filogenetik ağaçta bu dal tek düğümden çok çatalı olarak verilir. Bu durum moleküler sistematikte politomi olarak adlandırılır.

1.3.4.1.1.2 Maximum Likelihood (ML) Metodu-En yüksek ihtimal

Gözlenen veriyi oluşturmada en yüksek olasılığa sahip en iyi ağacı seçmede olasılık modellerini kullanan zor ve karmaşık bir yöntemdir. Bu yöntemin kuramsal olarak nasıl işlediğini kavramak için yeteri istatistik bilgisi ile donanmış olmak gerekir. Bu yöntemde her olası ağaç topolojisi araştırılır ve dizi hizalamasında yalnızca bilgi verici bölgeler değil her pozisyon hesaba katılır. Nükleotid veya aminoasit değişimlerine olasılık değerleri verilerek elde edilen belirli bir değişim modeli ile bu yöntem, ata dizilerin ara boğum noktalarına ve sonrasında günümüzde yaşayan canlılara ait olan dizilere evrimleşme olasılığını hesaplar. Çok iyi temellendirilmiş istatistiğe dayandığından matematiksel olarak daha zahmetli bir yöntemdir. Bu zorluktan dolayı taksonların sayısı belirli bir seviyeyi aştığında bu yöntemin kullanılması imkansız hale gelir. Bu sorunu ortadan kaldırmak için bazı farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Quartet puzzling, genetik algoritmalar ve Bayes yöntemi bunlar arasında yer almaktadır.

Joseph Felsenstein tarafından 1981 yılında MP'ye alternatif olarak ortaya konulmuş bir yöntemdir [114]. Araştırmacıya sunulan bütün bilginin daha etkili kullanmak ve olası birçok ağaç içerisinde en iyi ağacı seçmede istatistiksel testler kullanma olanağı yaratmak için ortaya konmuştur. Bu yöntem, farklı tipteki nükleotid değişikliğinin açığa çıkma olasılıklarını tanımlayan bir matematiksel formül ve dal uzunlukları bilinen belli bir ağaç verildiğinde, bu belli DNA dizisi setini elde etme olasılığı nedir sorusunu sormaktadır. Bu yöntem için bir bilgisayar programı, her ağaç topolojisini değerlendirir veya gözlenen verinin oluşturulması olasılığını hesaplar. Eğer ağaç doğruysa her dalın oluşturulma olasılığı toplamı, gözlenen verinin oluşturulması olasılığını temsil eder. Bu olasılık ağaçların olasılığı olarak temsil edilir. Böylece, yarışan ağaç topolojilerinin kabul ya da reddi için kriter en yüksek olasılığı olan ağacı seçmektir, en olası ağaç en iyi ağaçtır. Ancak olasılık metodları, hesaplamada yavaşlar ve bu teknikle çok büyük veri setleri, parsimoni yöntemleriyle olduğu kadar kapsamlı analiz edilemezler.

1.3.4.1.1.3 Bayes Metodu

Filogenetiğin en popüler metodudur. Temelde Maximum Likelihood metoduna benzer, ancak önceki (prior) olasılık kullanımı ile bu yöntemden ayrılır. Var olan gözlemlere dayanarak gözlenmeyen bir şey hakkında sonuç çıkarma temeline dayanır. Bu yöntemde ağaç seçiminde, “önceki olasılık”, analiz öncesinde tüm olası ağaç topolojileri için geçerli olan olasılıktır. Ağacın oluşturulmasından önce her bir topolojinin olasılığı birbirine eşittir. “Şarta bağlı olasılık”, dizi hizalanmasında gözlenen karakterlerin değişikliğe uğrama frekansıdır. Bu iki olasılık değeri, Bayes algoritması tarafından, gözlemlere en fazla uygunluğu gösteren en olası ağaçların saptanması için kullanılır. Aşağıdaki eşitliğin geçerli olduğu bu yöntem ML yönteminden daha hızlıdır ve daha geniş çapta veri kümelerini kullanabilir.

$$\text{Sonraki olasılık} = (\text{Önceki olasılık} \times \text{Şarta bağlı olasılık}) / \text{Toplam olasılık}$$

1.3.4.1.1.2 Mesafe Temelli Yöntemler

Dizi hizalanması sonucu elde edilen hesaplanmış evrimsel mesafeler, her bir takson çifti arasındaki mesafelerin bir matrisinin oluşturulmasında kullanılabilirler. Matristeki bu çiftlerli mesafe skorlarına dayanarak tüm taksonlar için bir filogenetik ağaç oluşturulabilir. Bu yöntemde kullanılan algoritmalar, kümelenme temelli veya en iyi durum (optimum durum) temelli olarak iki kola ayrılırlar. Kümelenme temelli algoritmalar, en benzer dizi çiftlerinden başlayan bir mesafe matrisine dayanarak filogenetik ağacı hesap ederler. Bu algoritmalar, aritmetik ortalamayı kullanarak ağırlıklı olmayan çift grup yöntemini (UPGMA-unweighted pair group method algorithm) ve komşu birleştirme yöntemini içerirler. En iyi durum temelli algoritmalar, pek çok farklı ağaç topolojisini (pek çok noktadan ve dallardan oluşan bir ağ yapısı) karşılaştırırlar ve ağaçtaki önceden tahmin edilen mesafeler ile gerçek evrimsel mesafeler arasındaki en iyi uyumu göstereni seçerler.

Genetik uzaklık yöntemi filogenetik ağacı oluşturmak için dizi grubunda her bir çift arasında değişikliklerin sayısını temel alır. Birbirlerine genetik uzaklığı en az olan türler birleştirilerek bir ağaç oluşturulur. Aralarında az sayıda nükleotid değişikliği olan bu dizi çiftleri komşu (neighbours) olarak adlandırılır. Uzaklık metodları ile hizalanan diziler arasındaki farklılıkların miktarına göre ağaç oluşturulur. Ağacın dalları boyunca ortaya çıkan değişiklik sayısı diziler arasındaki uzaklığı gösterir [113]. Tercih edilen ağaç, taksonlar arasındaki mesafeyi en aza indirgeyen ağaçtır [112]. Bu yöntemler diğerlerinden daha kolay ve hızlı olup, çok sayıda dizi için kullanılabilir. Bunlar içinde en çok kullanılanlar Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) metodu ve Neighbour Joining (NJ) metodudur.

1.3.4.1.2 Filogenetik Ağaçların Oluşturulmasında Kullanılan Programlar

Filogenetik alanında çalışan akademisyenler ve bu alanda program geliştirenler genellikle MAC kullanmaktadırlar. Her ne kadar programların PC versiyonları mevcut ise de MAC versiyonları daha ileri ve üst sürümdürler. Filogenetik ağaçların eldesinde en yaygın kullanılan programlar PAUP, PHYLIP, MRBAYES'dır. Ancak bu programların önerdikleri ağaçları bilgisayarda görüntülenmesini sağlayan başka bir program daha vardır. Bu program Treeview programıdır.[115]

1.3.4.1.2.1 PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony)

Parsimony ve maximum likelihood metotları dahil pek çok metot kullanarak populasyon verilerini detaylı araştırmaya yardımcı ücretli bir programdır [116]. PAUP 4.0b10'un sahip olduğu bazı özellikler aşağıda belirtildiği gibidir:

- Parsimoni yöntemine ek olarak Maksimum Olasılık yöntemi ve en iyi durum temelli yöntemlere dayanarak filogenetik ağaçların araştırılmasına tam destek sağlar.
- Belirli ağaçlar üzerinde veya ağaç oluşturulması sırasında, Maksimum Olasılık modeli parametrelerinin otomatik olarak önceden tahmin edilmesini sağlar.
- En genel geri dönüşebilir model ve onun alt modellerini de içeren geniş bir DNA değişim modelleri yelpazesi içerir.
- Adım adım ekleme, dal değiştirme, komşu birleştirme, quartet-puzzling, yıldızbozulma ve UPGMA ağaç araştırma algoritmaları mevcuttur.
- Birbirine uyumlu evrimsel ilişkilere sahip olan bir gruptaki tüm ağaçlar için en geniş taksonlar alt kümesini gösteren uyuşma alt ağaçlarını hesaplar.
- Ön yüklemeye ek olarak, bütün en iyilik ölçütleri (optimality criteria) altında Jackknife yeniden örneklendirme analizi yapabilir.
- Ağaçlar arasındaki belirli farklılıkların saptanabileceği parametrik ve non-parametrik testler vardır.
- Henüz oluşturulmamış ağaçların oluşturulup yayınlanması. Yeni ağaçların oluşturulması sırasında benzer sayfalar arasında aynı anda taramaların yapılabilmemesine olanak sağlar.
- Goloboff'un örtük ağırlık cimrilik kriteri altında ağaç taraması ve değerlendirilmesi yapar.
- Maksimum olasılıkların (maximum likelihood) kullanımıyla atasal nükleotidlerin tahminini yapar.

1.3.4.1.2.2 Mr. Bayes (Bayesian Inference of Phylogeny)

Filogeninin, Bayes Metodu ile tahmini için kullanılan bir programdır. Amaç tek bir doğru filogeniyi bulmayı değil, bütün muhtemel filogenilerin sonraki (posterior) olasılık dağılımlarını hesaplamaktır. [117]

Programın bazı özellikleri:

- Nükleotit, aminoasit, restriksiyon bölgesi, morfolojik bilgi analizi
- Tek bir analizde bilgi türlerini karıştırma
- Bilgi bölmeleri arasındaki parametreleri gösterme
- Evolusyon modelleri bakımından zenginlik
- Tamamen hiyerarşik olarak Bayes çerçevesi içinde pozitif olarak seçilmiş bölgelerin hesaplanması

Programın en son versiyonu MrBayes 3.1'dir. Bu versiyon içerdiği çok sayıdaki hata ayıklayıcılarla daha da sınırlandırılmış, bunun yanında birkaç yeni özellik de içermektedir. Geçmiş durumların ve yer oranlarının çıkarımları birleştirici tanıların hesaplanmasını eş zamanlı ve bağımsız olarak yapar.

1.3.4.1.2.3 PHYLIP (The Phylogeny Inference Package)

Filogenetik haritaların (evrimsel soyağaçlarının) çıkarılması için internet üzerinde bedava olarak ulaşılabilen bir programlar paketidir. Pakette kullanılabilen metotlar parsimony, uzaklık matrisi, çöz-bağla işlevi (bootstrapping) ve ortak karar (consensus) ağaçlarını kapsayan olasılık metotlarını içerir [118].

PHYLIP’de Kullanılan Programlar:

- DNA dizileri
- Protein dizileri
- Restrüksiyon bölgeleri
- Uzaklık matrisleri
- Gen frekansları
- Kantitatif (Nicel) özellikler
- Ayırıcı özellikler
- Ağaç çizimi, ortak karar (consensus) ağaçları, ağaç uzaklıkları ve ağaç işlemleri

PHYLIP büyük olasılıkla en geniş şekilde dağılmış filogeni paketidir. PAUP ve MrBayes’ten sonra üçüncü en çok kullanılan filogenetik paketidir. PHYLIP 1980 yılının Ekim ayından beri kullanımdadır ve 26 000’nin üzerinde kayıtlı kullanıcısı vardır.

2 MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Bitki Materyallerinin Toplanması

Çalışmada kullanılan bitki materyallerin büyük çoğunluğu Prof. Dr. Hayri DUMAN tarafından çeşitli lokalitelerden toplanmış olup, geriye kalan bitki örnekleri ise Prof. Dr. Gülendir TÜMEN, Yard. Doç. Dr. Fatih COŞKUN, Yard. Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ, Yard. Doç. Dr. Ekrem AKÇİÇEK, Prof. Dr. Ahmet DURAN tarafından toplanmıştır. Taze bitki materyalleri araziden toplandıktan sonra silika jel içerisinde saklanmıştır.

Türkiye’de doğal olarak yayılış gösteren *Sideritis* L. cinsinin *Empedoclia* seksiyonuna ait çalışılan taksonlar aşağıda verilmiş ve endemik olanlar (E) kısaltması ile belirtilmiştir [6, 15]. Bu taksonlar florada belirtilen bölgelerden toplanmıştır ve lokaliteleri bulgular kısmında Tablo 3.1’de verilmiştir.

1. *Sideritis phrygia* Bornm. (E)
2. *Sideritis amasiaca* Bornm. subsp. *amasiaca* (E)
3. *Sideritis amasiaca* Bornm. subsp. *chorumensis*
4. *Sideritis amasiaca* Bornm. subsp. *karabükensis*
5. *Sideritis galatica* Bornm. (E)
6. *Sideritis armeniaca* Bornm. (E)
7. *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *germanicopolitana* (E)
8. *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. ex Bornm. (E)
9. *Sideritis syriaca* L. subsp. *nusairiensis* (Post) Hub.-Mor.
10. *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *libanotica*
11. *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *kurdica* (Bornm.) Hub.-Mor.
12. *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm. (E)

13. *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *microchlamys* (Hand.-Mazz.) Hub.-Mor.
14. *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *violascens* P.H. Davis (E)
15. *Sideritis serratifolia* Hub.-Mor. (E)
16. *Sideritis serratifolia* subsp. *caesarea* H.Duman, Aytaç & Başer (E)
17. *Sideritis pisidica* Boiss. & Heldr. apud Benth. (E)
18. *Sideritis pisidica* var. *termessii*
19. *Sideritis perfoliata* L.
20. *Sideritis huber-morathii* Greuter & Burdet (E)
21. *Sideritis athoa* Papanikolaou & Kokkini
22. *Sideritis akmanii* Z. Aytaç, M. Ekici & A. Dönmez (E)
23. *Sideritis gulendamiae* H. Duman & F.A. Karaveliogulları (E)
24. *Sideritis scardica* Griseb.
25. *Sideritis vuralii* H. Duman & Baser (E)
26. *Sideritis ozturkii* Z. Aytaç & A. Aksoy (E)
27. *Sideritis aytacii* H. Duman & P. Sahin *sp. nov.* (E)
28. *Sideritis kirimerae*
29. *Sideritis hololeuca* Boiss. & Heldr. apud Bentham (E)
30. *Sideritis phlomoides* Boiss. & Bal. (E)
31. *Sideritis sipylea* Boiss. (E)
32. *Sideritis erythrantha* Boiss. & Heldr. apud Bentham var. *erythrantha* (E)
33. *Sideritis erythrantha* Boiss. & Heldr. apud Benth. var. *cedretorum* P.H. Davis (E)
34. *Sideritis brevidens* P.H. Davis (E)
35. *Sideritis stricta* Boiss. & Heldr. apud Bentham (E)
36. *Sideritis vulcanica* Hub.-Mor. (E)
37. *Sideritis condensata* subsp. *condensata* (E)
38. *Sideritis condensata* subsp. *arguta* (E)
39. *Sideritis tmolea* P.H. Davis (E)
40. *Sideritis congesta* P.H. Davis & Hub.-Mor. (E)
41. *Sideritis cilicica* Boiss. & Bal. (E)
42. *Sideritis niveotomentosa* Hub.-Mor. (E)
43. *Sideritis lycia* Boiss. & Heldr. apud Bentham (E)
44. *Sideritis leptoclada* O. Schwarz & P.H. Davis (E)
45. *Sideritis brevibracteata* P.H. Davis (E)

46. *Sideritis albiflora* Hub.-Mor. (E)
47. *Sideritis rubriflora* Hub.-Mor. (E)
48. *Sideritis argyrea* P.H. Davis (E)
49. *Sideritis bilgerana* P.H. Davis (E)
50. *Sideritis hispida* P.H. Davis (E)
51. *Sideritis dichotoma* Huter (E)
52. *Sideritis taurica* Stephan ex Wild
53. *Sideritis trojana* Bornm. (E)

2.1.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması

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

2.1.3 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Merck ve Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallardan Tris, üre, izopropil alkol ve EDTA Amresco'dan; borik asit, fenol-kloroform ve etanol Merck'ten temin edilmiştir. Yine DNA izolasyonunda kullanılan RNaz A ise Sigma Aldrich'ten alınmıştır. PCR reaksiyonlarında kullanılan dNTP mix, 10X tampon, Taq DNA polimeraz ve MgCl₂ kimyasalları ile Fermantas firmasından alınmıştır. Jel elektroforezinde kullanılan Agaroz Biomax'tan, etidyum bromid Appllichem'den, yükleme boyası ve DNA büyüklük belirleyici Fermantas firmalarından yerli kuruluşlar aracılığıyla temin edilmiştir.

2.1.3.1 Genomik DNA izolasyonunda Kullanılan Kimyasallar

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

Bu çalışmada kullanılan bitki materyallerinin yarısına yakının genomik DNA'sı (gDNA) Dellaporta ve arkadaşları [119] tarafından geliştirilen ve modifiye edilen yöntemle izole edilmiştir. İzolasyon için kullanılan tüm kimyasallar Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1 Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler ve Özellikleri

Solusyonlar	Kompozisyonu
Ekstraksiyon tamponu (1 L)	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	10 mM
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 gDNA'sı SIGMA G2N70 Plant Genomic DNA Miniprep Kit ile izole edilmiştir. Kit ile birlikte gelen hazır solusyonlar ise şunlardır: Lysis Solution Part A, Lysis Solution Part B, Precipitation Solution, Binding Solution, Column Preparation Solution, Wash Solution, Elution Solution (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH approx. 8.0)

2.1.3.1.3 PCR’de Kullanılan Kimyasallar

PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler Integrated DNA Technologies (IDT A.B.D.) firmasından temin edildi. Primerler laboratuara gelir gelmez veya -20°C buzdolabından çıkarıldıktan sonra yaklaşık 15 sn 12.000 rpm’de santrifüj yapılarak kuru çökeltinin tüpün dibinde toplanması sağlandı ve 1 ml dH₂O içerisinde çözülerek stok hazırlandı. Her bir primerin son konsantrasyonu 5 nmol/ml (5 µM) olacak şekilde sulandırıldı. Çalışmada kullanılan primerlerin DNA dizileri, erime sıcaklıkları (T_m) Tablo 2.3’de verilmiştir. PCR’de kullanılan diğer kimyasallar da Tablo 2.2’deki gibidir.

Tablo 2.2 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	-
ITS4	2.5 µl	pmol / ml
ITS5A	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	

Tablo 2.3 PCR’de Kullanılan Primerler

Primer	Nükleotid Dizisi (5’- 3’)	T _m Değeri	Primer Dizaynını Yapan
Forward ITS 5A	TCCTCCGCTTATTGATATGC	49.9 °C	Kenneth J. Wurdack tarafından (Alice M. Stanford, 2000)[120]
Reverse ITS 4	CCTTATCATTAGAGGAAGGAG	52.1 °C	Bruce G. Baldwin, 1992 - White et al.,1990[120]

2.1.3.1.4 Agaroz Jel Elektroforez Tamponları

Agaroz jel elektroforezinde 0.5X'lik TBE kullanılır. Bunun için ise hazırlanan 5X TBE seyreltilir. 5X TBE'nin hazırlanışı ve kullanılan kimyasallar Tablo 2.4'deki gibidir.

Tablo 2.4 5X TBE Tamponu Hazırlama

Tris - Base	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

Bu çalışmada kullanılan bitki materyallerinin yarısına yakınının gDNA'sı Dellaporta ve arkadaşları [119] tarafından geliştirilen ve modifiye edilen yöntemle, geriye kalan örneklerin DNA izolasyonu ise Sigma ticari kitinin protokolüne uygun olarak yapılmıştır. DNA izole ederken kullanılan bu yöntemlerin protokolleri aşağıda verilmiştir.

2.2.1.1 Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Protokolü

Silika jel içerisindeki taze bitki örneklerinden 100 mg tartılarak havana alındı. Havana sıvı azot ilave edildi ve yapraklar toz haline getirilene kadar ezildi. Toz haline getirilen bitkiler eppendorf tüplerine alındı. 600 µL ekstraksiyon (izolasyon) tamponu eklenerek çözüldü ve vorteks yapıldı. Üzerine 500 µL fenol-kloroform-izoamilalkol eklendi ve 5 dk alt-üst edildi. 12000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Böylece proteinler dibeye çöktü ve DNA üst kısımda kaldı. Oluşan süpernatant (500 µL) temiz bir tüpe aktarıldı. Üstteki süpernatant hacminin %10'u kadar (50 µL) 3M

Sodyum Asetat (NaAc: ph 5.2) eklendi ve alt-üst edildi. Süpernatant hacmi kadar (500 µL) izopropanol eklendikten sonra DNA çıplak gözle görüldü. Daha sonra 2 dk 12000 rpm'de santrifüj yapılarak DNA çöktürüldü. Dipte pellet oluştu ve üstteki çözelti atık şişeye boşaltıldı. Oluşan pellete 500 µL TE (10 mM, ph 8) eklendi ve pellet pipetaj yapılarak çözüldü. 5 µL RNaz A (10 mg/ml) eklendi ve pipetaj yapılarak yağsı tabaka homejen hale getirildi. 30 dk 37°C'de inkübasyona bırakılarak RNA uzaklaştırıldı. 50 µL NaAc (3M) eklendi ve alt-üst edildi. 1 mL %90'lık ETOH eklenip alt-üst edildi ve -80°C'de 10 dk bekletildi. Daha sonra 10 dk 13000 rpm'de santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Üstteki süpernatant çöpe atıldı ve altta pellet kaldı. Kalan çökelti ise %70'lik ETOH ile pipetaj yapılarak yıkandı. 2 dk 12000 rpm'de santrifüj yapıldı. Oluşan çökeltiden etanol pipet yardımıyla pellete dokunmadan dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra 20-30 sn 12000 rpm'de santrifüj yapıldı. Ependorf tüpler kağıt üzerine yan yatırıldı ve etanol kalıntılarının uçması sağlandı. Oluşan gDNA çökeltisi, 50 µL TE veya 200 µL saf su eklenerek pellet kayboluncaya kadar çözüldü ve gDNA izole edilmiş oldu.

2.2.1.2 SIGMA Kiti ile Yapılan DNA İzolasyonu Protokolü

Bitki materyallerinden 100 mg alındı ve havanda sıvı azotla toz haline getirildi. 350 µL Lysis Solution (Part A) ve 50 µL Lysis Solution (Part B) eklendi. Vorteks yapıldı ve 4µl RNaz pipetaj yapılarak eklendi. 65°C'de 10 dk su banyosunda bekletildi. Daha sonra 130 µL Precipitation Solution eklendi ve 5 dk buzda bekletildi. 5 dk maksimum hızda (16000 g) santrifüj yapıldı. Sıvı kısım alındı ve mavi filtreli tüpe aktarıldı. Kalan çökelti tüpüyle beraber çöpe atıldı. Mavi filtreli tüp 1 dk maksimum hızda santrifüj edildi. Daha sonra kolon atıldı ve ependorf tüp kaldı. Üzerine 700 µL Binding Solution eklendi ve toplam sıvı 1000 µL civarına geldi. Bu basamaklardan bağımsız olarak kırmızı kolonlu tüpler hazırlanması için kullanılacak her bir kırmızı kolonlu tüpe 500 µL Column Preparation Solution eklendi ve 1 dk 12000 g'de santrifüj yapıldı. Sıvı atıldı ve böylece kolon önceki basamaktaki 1000 µL sıvının geçirilmesi için hazır hale geldi. 1000 µL'lik karışımdan 700 µL kırmızı kolonlu tüpe aktarıldı ve 16000 g'de 1 dk santrifüj yapıldı. Sıvı atıldı ve kırmızı

kolon tüpe yeniden kondu. Daha sonra geriye kalan 300 µl'lik karışım da kolondan geçirildi ve maksimum hızda 1 dk santrifüj yapıldı. Sıvı ve tüp atıldı. Kolon yeni bir tüpe yıkanması için kondu ve 500 µL Wash Solution eklendi. Maksimum hızda 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra sıvı atıldı ve tüp kaldı. 500 µL Wash Solution eklendi ve maksimum hızda 3 dk santrifüj yapıldı. Sıvı, kolona temas ettirilmeden atıldı. Yeni 2ml'lik tüp çıkarıldı ve içerisine kolon yerleştirildi. 100µl Elution Solution (kullanmadan önce 65°C'de ısıtıldı) eklendi. Maksimum hızda 1dk santrifüj yapıldı ve kolon sıvıya temas ettirilmeden çıkarıldı. Böylelikle 1. Solüsyon hazır hale geldi. Yeni 2 ml' lik tüp hazırlandı ve kolon bu tüpe yerleştirildi. 100 µl Elution Solution (kullanmadan önce 65°C'de ısıtılır) eklendi ve maksimum hızda 1 dk santrifüj yapıldı. Kolon sıvıya temas ettirilmeden çıkarıldı ve atıldı. Böylelikle 2. Solüsyon da hazır hale gelmiş oldu.

2.2.2 DNA Saflık ve Miktar Tayini

DNA, RNA, oligonükleotidler ve hatta mononükleotidler sıvı solüsyonlar içinde, ultraviyole ışığın altında sahip oldukları absorpsiyon A (optik yoğunluk, OD) üzerinden doğrudan ölçülebilir. Örnek saf olduğunda (protein, fenol gibi kontaminantları çok düşük miktarlarda olduğunda), nükleotid bazları tarafından absorbe olan ultraviyole radyasyonun miktarı spektrofotometrik olarak basit ve doğru biçimde ölçülebilir. Kontaminantların varlığı, oran hesaplaması ile ayırt edilebilir. *Nükleik asitlerin maksimum absorbans verdiği dalga boyu A260'dır. Proteinlerin maksimum absorbans verdiği dalga boyu A280'dir.* Karbonhidratlar, peptitler, fenoller veya aromatik bileşikler gibi maddelerin maksimum absorbans verdiği dalga boyu ise A230'dur. A260/A280 oranı nükleik asitlerin saflığı için kullanılır. Bu oran saf bir DNA için 1.7-2 arasında olmalıdır. Çalışmada izole edilen DNA'ların saflığı bu değerler arasında çıkmıştır.

İzole edilen gDNA'ların Absorbans değerlerinin ölçümü kuvars küvetlerle yapılmıştır. Öncelikle küvetlerdeki bir kuyucuk kör(boş örnek) seçilmiştir ve buraya sadece 200µl saf su konulmuştur. Küvetteki diğer kuyucukların her birine 5µl DNA, 195µl saf su konmuştur. Daha sonra DNA'nın spektrofotometrede A260 ve A280 değerleri ölçülmüştür. Spektrometrik sonuçlara göre çift zincirli DNA molekülünün miktar tayini ise, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Çalışmamızda formüldeki seyreltme katsayısı 40 olarak hesaplanmıştır. 5µl DNA ve 195µl su konulmuştur, yani DNA 40kat seyreltilmiştir. DNA'ların spektrofotometrik ölçümü aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

DNA Konsantrasyonu(ng/µl) = Absorbans değeri (A260) x Seyreltme Katsayısı x 50ng/µl

2.2.3 PCR Uygulamaları

İzole edilmiş genomik DNA'ların ITS bölgelerinin çoğaltılmasında aşağıdaki primerler 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, 25mM MgCl₂'den 2.5µl, 10mM dNTP'den 0.4µl, 50pmol/µl'lik primerlerden 2.5µl, Taq DNA Polimeraz'dan 0.3µl, DMSO'dan 2.5µl, kalıp DNA'dan 2µl, dH₂O'dan 10.8µl alınarak 25µl son hacmine tamamlanmıştır. PCR uygulamalarında olası bir kontaminasyonu engellemek için her uygulamada, genomik DNA içermeyen negatif kontroller kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan PCR programı Tablo 2.5'deki gibidir.

Tablo 2.5 Kullanılan PCR Programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94°C	5dk	1 döngü
Denatürasyon	94°C	30sn	35 döngü
Primer Bağlanma (Annealing)	50°C	45sn	
Uzatma (Extension)	72°C	1dk	
Son Uzatma (Final Extension)	72°C	10dk	1 döngü
Son Sıcaklık (Final Hold)	4°C	25sa	

2.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonucunda oluşan bantların gözlenmesi için %0,8'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için 0,8 g agaroz tartıldı ve 100 mL 0,5 X TBE tamponu içinde, mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Karışım 50°C'ye soğutularak içerisine 1 µL EtBr ilave edildi. Tampon, tarakları önceden yerleştirilmiş jel kasetine döküldü ve polimerleşmesi için 15 dk beklendi. Jel polimerleştikten sonra kasetten taraklar çekilerek çıkartıldı. Hazırlanan jel, elektroforez tankına yerleştirilip üzeri kaplanıncaya kadar 0.5X TBE tamponu ile dolduruldu.

3 µl PCR ürünü, 3 µl yükleme boyası (6X DNA loading dye) ile boyandı ve kuyucuklara pipet yardımıyla yüklendi. PCR ürününün büyüklüğünü belirleyebilmek amacıyla 5 µl DNA büyüklük belirleyici (1 kb DNA ladder) boş bir kuyucuğa yüklendi. Örnekler 100 voltta 40 dk yürütüldü. Daha sonra kullanılan jel, jel görüntüleme cihazına alındı. UV ışığı altında bantlar gözlemlendi ve jel görüntüleme cihazının bilgisayar programı ve fotoğraf makinesi yardımıyla fotoğrafları çekilip veriler kaydedildi.

2.2.5 Dizileme ve Dizi Analizi

Çoğaltılan ITS bölgelerinin DNA dizilerini elde etmek için, PCR ürünleri dizilemeye Refgen firmasına gönderilerek hizmet alımı yapıldı. Hizmet alımının detayları Bulgular 3.4'te açıklanmıştır. Dizi analizi için ücretli profesyonel bir bilgisayar programı olan Sequencher 4.10.1 kullanıldı. Bu programda kontiglerin (contig) durumlarına bakılarak DNA dizileri görsel olarak işlendi ve ortak karar (konsensus) dizileri oluşturuldu. Oluşturulan konsensus dizileri Word'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 ClustalW programına yapıştırıldı ve varsayılan ayarların komutları kullanılarak dizi hizalaması gerçekleştirildi.

2.2.6 Filogenetik Analiz

Dizileri elde edilmiş olan *Sideritis* cinsine ait türlerin akrabalık derecelerini öğrenebilmek için tüm dünyada çok yaygın olarak kullanılan PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) 4.0b10 filogenetik analiz yazılımının uygun parametreleri kullanıldı. Bu parametrelerden karakter temelli metotlar kullanılırken en iyilik kriteri (Optimality criterion) olarak parsimoni kriteri seçilip, arama algoritması (Search algorithm) olarak Heuristic araştırma ve Bootstrap seçilmiştir. Yapılan analizlerde kullanılan kriterler ve karakterlerle ilgili veriler, sonuçlar ve tartışma bölümünde ayrıntılı olarak verilmiştir. Mesafe temelli yöntemlerden ise UPGMA ve NJ metotları seçilerek fenetik analizleri de yapılmıştır.

3 BULGULAR

3.1 Bitki Materyallerinin Toplanması

Çalışmada kullanılan *Sideritis* L. cinsinin *Empedoclia* seksiyonuna ait 53 takson florada belirtilen bölgelerden toplanmıştır. Bazı taksonlar farklı lokalitelerden toplandı ve dolayısıyla farklı numaralar ile etiketlendi. Tablo 3.1'e bakılacak olursa *Sideritis perfoliata* türüne ait 5 farklı etiketin, *Sideritis libanotica* subsp. *violascens* taksonuna ait 3 farklı etiketin, *Sideritis stricta*, *Sideritis brevibracteata*, ve *Sideritis albiflora*'ya ait 2 farklı etiketin olduğu görülmektedir. Böylelikle çalışılan takson sayısı 71'e çıktı. Dış grup olarak *Sideritis* cinsine yakın olduğu bilinen *Stachys woronowii* HD 9936, *Stachys* FC01, *Marrubium* FC02 türleri kullanıldı ve Tablo3.1' de belirtilen yerlerden toplandı. Ayrıca *Hesiodia* seksiyonuna ait olan tek yıllık türlerden *Sideritis montana* subsp. *remota* FC 0101, *Sideritis romana* subsp. *curvidens* FC 0100 de analize katıldı. Böylece yapılan çalışmada kullanılan toplam takson sayısı 76'ya ulaştı.

Tablo 3.1 Çalışmada Kullanılan Bitki Materyalleri ve Lokaliteleri

NO	TAKSONLAR	LOKALİTE
1	<i>Sideritis brevibracteata</i> HD 10173	C3 Antalya: Alanya, Hacımehmetli köyü, 200m, maki açıklığı, 18.04.2010 H.Duman 10173
2	<i>Sideritis brevibracteata</i> HD 10189	C3 Antalya: Alanya, Ulaş, 5 m., maki açıklığı, kalker alanlar, 21.05.2010 H. Duman 10189
3	<i>Sideritis libanotica</i> subsp. <i>violascens</i> HD 10190	C4 Konya: Taşkent-Alanya yolu, Çukuryurt geçidi, 1950-2000 m. yüksek dağ stebi, 20.05.2010 H. Duman 10190
4	<i>Sideritis libanotica</i> subsp. <i>violascens</i> P.H. Davis HD 10223	C3 Antalya: Seydişehir-Akseki yolu, Akseki'ye 38 km kala, 1600 m, <i>Abies cilicica</i> açıklığı, 23.7.2010. H. Duman 10223
5	<i>Sideritis libanotica</i> subsp. <i>violascens</i> HD 10077	C3 Antalya: Beyşehir-Akseki yolu, Akseki'ye 38 km kala, <i>Abies cilicica</i> açıklığı, 1650-1700 m, 23.7.2009. 36 S 0404038 D, 4117997 K. H. Duman 10077.
6	<i>Sideritis libanotica</i> subsp. <i>microchlamys</i> AD 8639	C7 Urfa: A. Duran 8639

Tablo 3.1' in devamı

7	<i>Sideritis libanotica</i> subsp. <i>libanotica</i> HD 5186	Hatay- Samandağı
8	<i>Sideritis libanotica</i> Labill. subsp. <i>libanotica</i> HD 10265	C6 Hatay: İskenderun, Arsuz, Avcılırsuyu çevresi, 50-80 m, dere yatağı, serpantin alanlar, 11.6.2010 <i>H. Duman</i> 10265
9	<i>Sideritis libanotica</i> subsp. <i>linearis</i> HD 10057	C3 Burdur: Burdur'un doğusu, Erozyonlu yamaçlar, 1000-1050 m, 20.7.2009. 36 S 0263837 D, 4180642 K. <i>H. Duman</i> 10057.
10	<i>Sideritis libanotica</i> subsp. <i>linearis</i> HD 10005	C3 Isparta: Barla, Gelincik Dağı, Küçük Kapı Tepe kuzeyi, 1600-1700 m, Kalker kayalık yamaçlar, 2.7.2009. 36 S 03029012 D, 4217917 K. <i>H. Duman</i> 10005.
11	<i>Sideritis libanotica</i> subsp. <i>kurdica</i> AD 8635	C7 Mardin : A.Duran 8635
12	<i>Sideritis amasiaca</i> subsp. <i>chorumensis</i> HD 5175-B	Çorum
13	<i>Sideritis amasiaca</i> Bornm. subsp. <i>amasiaca</i> HD 10232	A5 Amasya: Amasya-Alikayası yolu 1 km, 500 m, kalker kayalık, 14.8.2010 <i>H. Duman</i> 10232.
14	<i>Sideritis amasiaca</i> Bornm. subsp. <i>chorumensis</i> H. Duman sp.nov. HD 10234	A5 Çorum: İskilip-Tosya yolu 29 km, 1100-1150 m, Pinus nigra açıklığı 14.8.2010 <i>H. Duman</i> 10234
15	<i>Sideritis amasiaca</i> Bornm. subsp. <i>karabükensis</i> H. Duman sp.nov. HD 10237	A4 Karabük: Keltepe, Sipahiler-Karaağaç, 900-1000 m, Pinus nigra açıklığı, 15.8.2010. <i>H. Duman</i> 10237
16	<i>Sideritis germanicopolitana</i> Bornm. subsp. <i>germanicopolitana</i> HD 10236	A4 Kastamonu: Araç. Araç-Karabük yolu, Araç çıkışı, 650 m, kalker kayalık, 15.8.2010 <i>H. Duman</i> 10236.
17	<i>Sideritis germanicopolitana</i> Bornm. subsp. <i>viridis</i> Hauskn. ex Bornm HD 10235	A5 Kastamonu: Tosya-İskilip yolu 25 km, 1200 m, Pinus nigra açıklığı, 14.8.2010. <i>H. Duman</i> 10235
18	<i>Sideritis perfoliata</i> HD 5189	Hatay-Yayladağı
19	<i>Sideritis perfoliata</i> HD 5194	Hatay-Yayladağı
20	<i>Sideritis perfoliata</i> EA 5333	C6 Hatay: Antakya –Yayladağı arası 24.km, kayalık alan, 900m, 20.07.2009 <i>E. Akçiçek</i> (EA 5333) <i>T. Dirmenci</i> .
21	<i>Sideritis perfoliata</i> HD 10088	C4 İçel: Gülnar Ermenek yolu 48.km, Pinus brutia açıklığı, marnlı topraklar, 1200 m, 24.7.2009. 36 S 0500320 D, 4037714 K. <i>H. Duman</i> 10088.
22	<i>Sideritis perfoliata</i> L. HD 10231	A6 Tokat: Niksar, Niksar-Reşadiye yolu 20 km, 350 m, maki açıklığı, 14.8.2010 <i>H. Duman</i> 10231
23	<i>Sideritis condensata</i> subsp. <i>condensata</i> HD 10058	C3 Isparta: Ağlasun, Ağlasun-Sagalassos 5 km, 1300-1400 m, maki açıklığı, 21.7.2009. 36 S 0281985 D, 4172338 K. <i>H. Duman</i> 10058
24	<i>Sideritis condensata</i> subsp. <i>arguta</i> HD 10086	C3 Antalya: Manavgat-Akseki yolu, Hacıobası köyü çevresi, Pinus brutia açıklığı, 130 m, 22.7.2009. 36 S 0376705 D, 4067648 K. <i>H. Duman</i> 10086.
25	<i>Sideritis condensata</i> subsp. <i>arguta</i> HD 10069	C3 Antalya: Manavgat-Akseki yolu, Hacıobası köyü çevresi, Pinus brutia açıklığı, 130 m, 22.7.2009. 36 S 0376705 D, 4067648 K. <i>H. Duman</i> 10069.
26	<i>Sideritis taurica</i> Stephan ex Willd HD 10229	A 6 Sivas: Koyulhisar-Reşadiye yolu, 5 km, 630 m, 14.8.2010. <i>H. Duman</i> 10229

Tablo 3.1' in devamı

27	<i>Sideritis taurica</i> HD 10233	A5 Çorum: İskilip-Tosya yolu 5 km, 800-900 m, Hareketli yamaçlar, 14.8.2010 <i>H. Duman</i> 10233
28	<i>Sideritis cilicica</i> Boiss. & Balansa HD 10225	C5 Adana: Kozan, Kozan-Feke yolu, Horzum, Çobancık yaylası çevresi, 800-900 m, maki açıklığı, kalker kayalık, 12..8.2010 <i>H. Duman</i> 10225.
29	<i>Sideritis armeniaca</i> Bornm HD 10228	A7 Giresun: Alucra-Şebinkarahisar yolu 10 km, 1400-1500 m, serpantin step, 14.8.2010. <i>H. Duman</i> 10228.
30	<i>Sideritis syriaca</i> L. subsp. <i>nusairiensis</i> (Post) Hub.-Mor HD 10266	C6 Hatay: Belen, atik yaylası çevresi, 900-1000 m, kalker taşlık alanlar, 13.6.2010. <i>H.Duman</i> 10266
31	<i>Sideritis huber-morathii</i> Greuter & Burdet HD 10269	C6 Hatay: Şenköy, Ziyaret dağı, 1200 m, maki açıklığı, 11.6.2010. <i>H.Duman</i> 10269
32	<i>Sideritis aytacii</i> H. Duman & P. Şahin HD 10267	C5 Niğde: Ulukışla, Ulukışla-Kılan yolu, 1500-1600 m, yüksek dağ stebi, 10.6.2010. <i>H. Duman</i> 10267
33	<i>Sideritis stricta</i> HD 10065	C3 Antalya: Termessos Milli Parkı, Pinus brutia açıklığı, 514 m, 21.7.2009. 36 S 0277838 D, 4099147 K. <i>H. Duman</i> 10065.
34	<i>Sideritis stricta</i> HD 10061	
35	<i>Sideritis tmolea</i> HD 10052	B2 İzmir: Ödemiş-Bozdağ, Şişli step yamaçlar, 1500-1600 m, 20.7.2009. 35 S 0595669 D, 4245973 K. <i>H. Duman</i> 10052.
36	<i>Sideritis dichotoma</i> Huter HD 10238	A4 Karabük: Keltepe, Sorgun Yayla çevresi, 1500-1600 m, kalker kayalık, 15.8.2010. <i>H. Duman</i> 10238.
37	<i>Sideritis phlomoides</i> Boiss. & Balansa HD 10226	B5 Kayseri: Yahyalı, Aladağlar, Maden çevresi, 2400-2500 m, yüksek dağ stebi, 13.8.2010 <i>H. Duman</i> 10226.
38	<i>Sideritis phlomoides</i> HD 10096	
39	<i>Sideritis brevidens</i> HD 10091	C4 İçel: Gülnar, Gülnar Mut yolu 2.km, Pinus brutia açıklığı, kalker taşlık alanlar, 1040 m, 24.7.2009. 36 S 0536680 D, 4023678 K. <i>H. Duman</i> 10091.
40	<i>Sideritis phrygia</i> HD 10056	B3 Afyon: Çay-Yalvaç dağ yolu 10. km, hareketli yamaçlar, 1200-1300 m, 20.7.2009. 36 S 0327812 D, 4267233 K. <i>H. Duman</i> 10056.
41	<i>Sideritis kirimerae</i> HD 10063	C3 Antalya: Bakırlıdağ, Saklıkent mevki, yüksek dağ stebi, 1800-1900 m, 22.7.2009. 36 S 0262499 D, 4080682 K. <i>H. Duman</i> 10063.
42	<i>Sideritis pisidica</i> HD 10071	C3 Konya: Derebucak, Huğlu, Huğlu-Beyşehir yolu 2. km, meşe açıklığı, kalker kayalık, 1320 m, 23.7.2009. 36 S 0374745 D, 4150752 K. <i>H. Duman</i> 10071.
43	<i>Sideritis pisidica</i> var. <i>termessi</i> HD 10064	C3 Antalya: Termessos Milli Parkı, orman açıklığı, 900-950 m, 22.7.2009. 36 S 0274734 D, 4096779 K. <i>H. Duman</i> 10064.
44	<i>Sideritis erythrantha</i> subsp. <i>erythrantha</i> HD 10067	C3 Antalya: Serik, Gebiz, Bozburun Dağı, 1500m, Pinus nigra açıklığı, 22.7.2009. 36 S 0325416D, 4135213 K H. <i>Duman</i> 10067.
45	<i>Sideritis erythrantha</i> subsp. <i>cedretorum</i> HD 10087	C4 Antalya: Alanya, Alanya-hadim yolu, Elmalısu mevki, 1270 m, Pinus nigra açıklığı, 24.7.2009. 36 S 0442467 D, 4047277K. <i>H. Duman</i> 10087.
46	<i>Sideritis albiflora</i> HD 10060	C2 Antalya: Kaş, Kaş çevresi, 100 m, maki açıklığı, 21.7.2009. <i>H. Duman</i> 10060

Tablo 3.1' in devamı

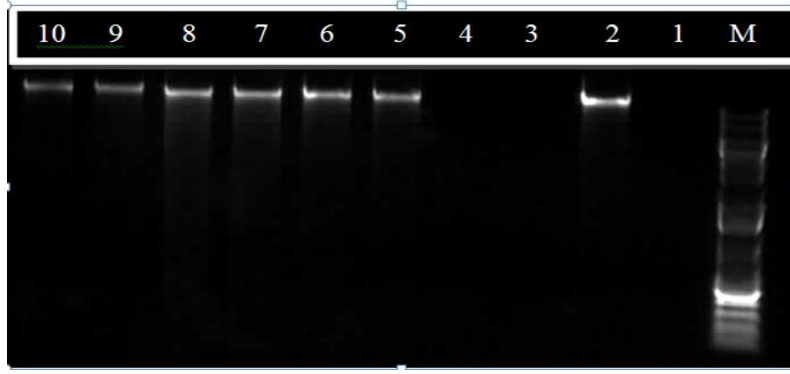
47	<i>Sideritis albiflora</i> HD 10095	C2 Antalya: Kaş, Kaş çevresi, 100 m, maki açıklığı, 24.6.2009. <i>H. Duman</i> 10095.
48	<i>Sideritis serratifolia</i> hub.-Mor. subsp. <i>caesarea</i> (H.Duman, Aytaç & Başer) HD 10227	B6 Kayseri: Sarız, Binboğa Dağı, Dayıoluk Köyü doğu sırtları, 2000-2100 m, yüksek dağ stebi, 13.8.2010. <i>H. Duman</i> 10227.
49	<i>Sideritis serratifolia</i> HD 10073	B4 Konya: Konya-Beyşehir yolu 50. km, Pinus nigra açıklığı, 1325 m, 23.7.2009. 36 S 0412939 D, 4192124 K. <i>H. Duman</i> 10073.
50	<i>Sideritis akmanii</i> HD 10054	B3 Afyon: Sandıklı, Kumalar Dağı, yüksek dağ stebi, 1600-1700 m, 20.7.2009. 36 S 0269490 D, 4261181 K. <i>H. Duman</i> 10054
51	<i>Sideritis leptoclada</i> HD 10059	C2 Muğla: Fethiye, Fethiye-Antalya 8.km, serpantin yamaçlar, maki, 200 m, 21.7.2009. 35 S 0702912 D, 4057112 K. <i>H. Duman</i> 10059.
52	<i>Sideritis leptoclada</i> O. Schwarz & P.H. Davis HD 10268	C2 Muğla. Fethiye, Fethiye- Göcek yolu, 50-100 m, serpantinli alanlar, frigana, 2.7.2010. <i>H. Duman</i> 10268
53	<i>Sideritis athoa</i> EA 4248	B1 Balıkesir: İvrindi, Madra Dağı, Çalkaya mevki, kayalık alan, 900-1000m. 05.07.2009.
54	<i>Sideritis trojana</i> Dirmenci 3690	B1 Balıkesir: Kazdağı, Sarıkız tepe, kalker kayalıklar, 1720m. 14.20.2009. <i>T. Dirmenci</i> (Dirmenci 3690).
55	<i>Sideritis gulendamiae</i> HD 10048	B3 Eskişehir: Sivrihisar-Afyonkarahisar yolu, Aşağıkepen köyü güneyi, marnlı step, 950-980 m, 19.7.2009. 36 S 0369902 D, 4359424 K. <i>H. Duman</i> 10048.
56	<i>Sideritis rubriflora</i> HD 10093	C4 İçel: Silifke, Taşucu batısı, Frigana, 5-10 m, 24.7.2009. 36 S 0577671 D, 4019427 K. <i>H. Duman</i> 10093.
57	<i>Sideritis hololeuca</i> HD 10089	C4 İçel: Gülnar Ermenek yolu, Olukpınar köyü çevresi, Pinus brutia açıklığı, marnlı topraklar, 1200 m, 24.7.2009. 36 S 0501091 D, 4036976 K. <i>H. Duman</i> 10089.
58	<i>Sideritis libanotica</i> subsp. <i>libanotica</i> EA 5324	C6 Hatay: Yayladağ Yeditepe köyü, orman alanı, 444m, 20.7.2009. <i>E. Akçiçek</i> (EA5324), <i>T. Dirmenci</i> .
59	<i>Sideritis argyrea</i> HD 10084	C4 Antalya: Alanya, Alanya-Hadim yolu, Erikli deresi çevresi, 1300-1350 m, Pinus nigra açıklığı, 24.7.2009. 36 S 0440753 D, 4045246 K. <i>H. Duman</i> 10084.
60	<i>Sideritis scardica</i> EA 5298	A1 Kırklareli: Demirköy-Sarpdereköyü Dupnisa mağarası üstü, orman açıklığı, 350 m 21.06.2009. <i>E. Akçiçek</i> (EA 5298), <i>T. Dirmenci</i> .
61	<i>Sideritis vuralii</i> HD 10090	C4 İçel: Gülnar Ermenek yolu 30. km, Kalker kayalık, açık alanlar, 1320 m, 24.7.2009. 36 S 0513955 D, 4032114 K. <i>H. Duman</i> 10090.
62	<i>Sideritis bilgerana</i> HD 10087	C4 Karaman: Ermenek, Tepebaşı- Güneyyurt, Pinus brutia açıklığı, marnlı topraklar, 990 m, 24.7.2009. 36 S 0478139 D, 4058869 K. <i>H.Duman</i> 10087.
63	<i>Sideritis niveotomentosa</i> HD 10092	C4 İçel: Gülnar Silifke yolu 20.km, Pinus brutia açıklığı, kalker taşlık alanlar, 1040 m, 24.7.2009. 36 S 0551423 D, 4022884 K. <i>H. Duman</i> 10092.

Tablo 3.1' in devamı

64	<i>Sideritis vulcanica</i> HD 10094	B7 Elazığ: Maden-Ergani yolu 3. km. 1000-1100 m, volkanik yamaçlar, 14.6.2009. <i>H. Duman</i> 10094.
65	<i>Sideritis ozturkii</i> HD 10070	C3 Konya. Derebucak, Çamlık, Kızıldağ, 1600-1700m, <i>Pinus nigra</i> açıklığı, serpantin, 23.7.2009. 36 S 0383842 D, 4134930 K. <i>H. Duman</i> 10070.
66	<i>Sideritis lycia</i> HD 10062	C3 Antalya: Kemer- Kumluca 10. km, <i>Pinus brutia</i> açıklığı, 130 m, 21.7.2009. 36 S 0274499 D, 4042178 K. <i>H. Duman</i> 10062.
67	<i>Sideritis hispida</i> HD 10080	C4 Konya: Bozkır, Bozkır çevresi, 1175 m, step, 23.7.2009. 36 S 0431214 D, 4116185 K. <i>H. Duman</i> 10080.
68	<i>Sideritis congesta</i> HD 10068	C3 Antalya: Manavgat, Manavgat-Akseki yolu, Hacıobası köyü çevresi, 30 m, frigana açıklığı, 22.7.2009. 36 S 0375103D, 4065871 K H. Duman 10068
69	<i>Sideritis sipylea</i> HD 10049	B1 Manisa: Spil Dağı, hareketli yamaçlar, 850-950 m, 19.7.2009. 35 S 0535614 D, 4270350 K. <i>H. Duman</i> 10049.
70	<i>Sideritis galatica</i> HD 10047	
71	<i>Sideritis galatica</i> HD 10045	A4 Ankara: Akyurt-Çankırı 10. km, metamorfik alan, 1250-1300 m, 18.7.2009. 40° 08' N, 33° 11'D. <i>H. Duman</i> 10045.
72	<i>Sideritis montana</i> subsp. <i>remota</i> FC 0101	Erdek: Seyitgazi türbesi civarı kayalar üzerinde 60 m. FC0101 08.07.2010
73	<i>Sideritis romana</i> subsp. <i>curvidens</i> FC 0100	Erdek: limanın batısındaki tepe, askeri kampın yanı, Seyitgazi türbesi civarı kayaların arası 50-60m 08.07.2010 FC0100
74	<i>Marrubium</i> FC02	B6 Sivas: Zara-İmranlı yolu kenarı, 13. km, mezarlık alanı, şistli alan. <i>Fatih Coşkun</i> (FC02).
75	<i>Stachys woronowii</i> HD 9936	B4 Konya: Çumra-Haim yolu, Çiçekköy çevresi, meşelik, 1150-1200 m, 16.5.2009. 36 S 0463969 D, 4128178 K. <i>H. Duman</i> 9936.
76	<i>Stachys</i> FC01	

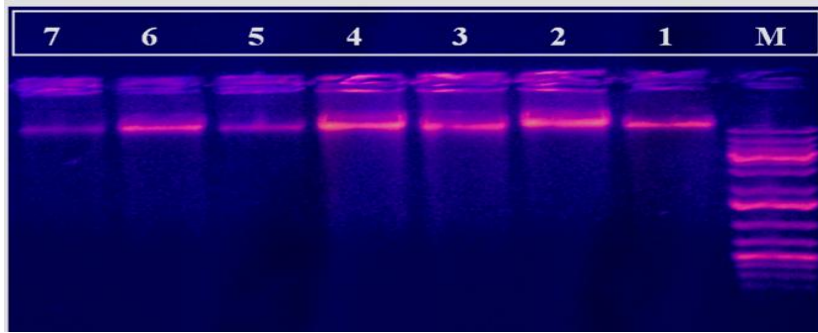
3.2 DNA İzolasyonu

Bitki örneklerinin genomik DNA'ları materyal ve yöntemde bahsedilen Della Porta ve arkadaşlarının geliştirdiği Fenol-Kloroform ve Sigma ticari kitinin izolasyon protokolleri takip edilerek elde edildi [119]. Sigma kiti kullanarak izole edilen bazı *Sideritis* türlerine ait gDNA'ların agaroz jel görüntüsü Şekil 3.1'deki, Fenol-Kloroform metoduyla izole edilen bazı *Sideritis* türlerine ait gDNA'ların agaroz jel görüntüsü ise Şekil 3.2'deki gibidir.



Şekil 3.1 Sigma Kiti ile İzole Edilen Bazı *Sideritis* Türlerinin gDNA'larının Jel Görüntüsü(Siyah-Beyaz)

M: Markır, 1: *Sideritis perfoliata*, 2: *Sideritis taurica*, 3: *Sideritis cilicica*, 4: *Sideritis armeniaca*, 5: *Sideritis aytacii*, 6: *Sideritis tmolea*, 7: *Sideritis dichotoma*, 8: *Sideritis phlomoides*, 9: *Sideritis brevidens*, 10: *Sideritis phrygia*

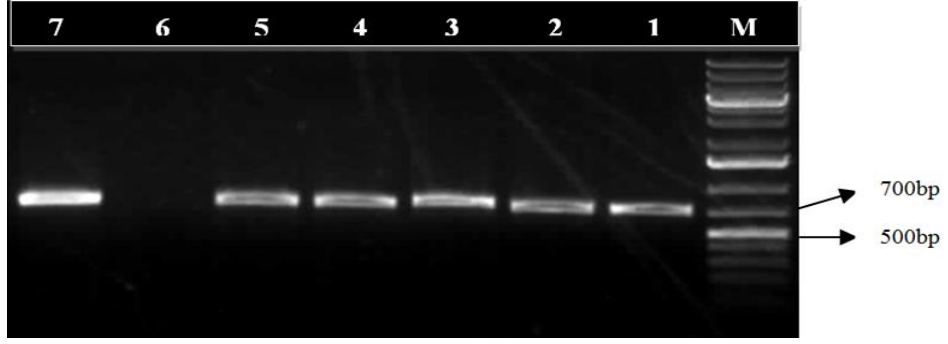


Şekil 3.2 Fenol-Kloroform Kullanılarak İzole Edilen Bazı *Sideritis* Türlerinin gDNA'larının Agaroz Jel Görüntüsü (Renkli)

M: Markır, 1: *Sideritis kirimerae*, 2: *Sideritis pisidica*, 3: *Sideritis albiflora*, 4: *Sideritis serratifolia*, 5: *Sideritis akmanii*, 6: *Sideritis leptoclada*, 7: *Sideritis athoa*

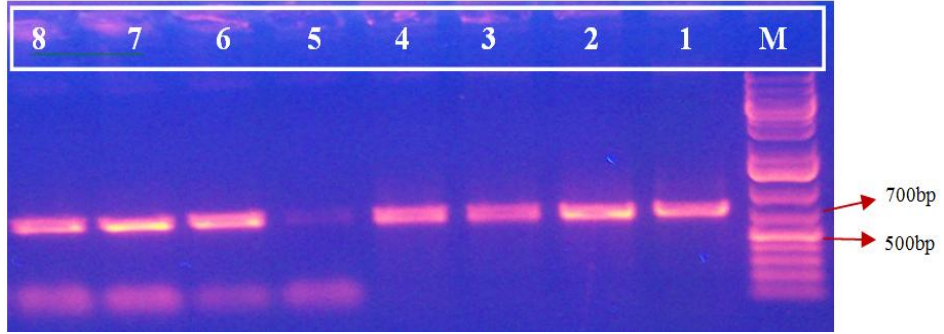
3.3 PCR Reaksiyonları

İzole edilen gDNA'lara; ITS4, ITS5A primerleri ve gerekli kimyasallar (Tablo 2.2) kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Böylelikle PCR sonucunda taksonların gDNA'sının ITS bölgesi çoğaltıldı. Elde edilen bazı *Sideritis* türlerine ait ITS bantlarının agaroz jel görüntüsü ise Şekil 3.3-3.5'deki gibidir.



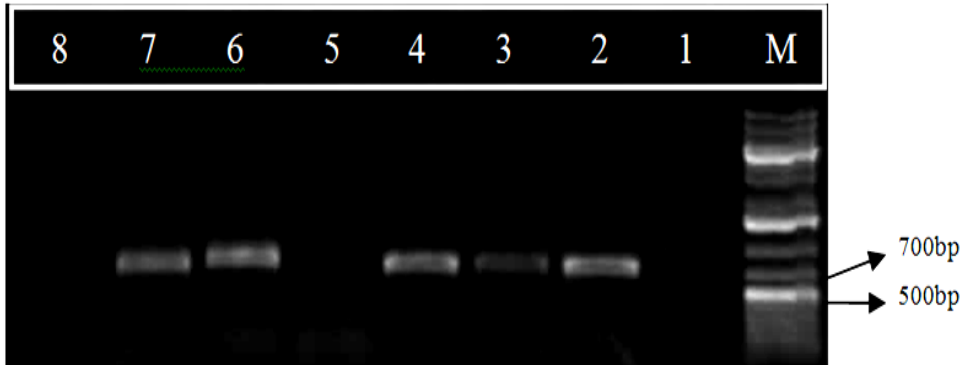
Şekil 3.3 Bazı *Sideritis* Türlerinin ITS ile Yapılan PCR Görüntüsü (Siyah-Beyaz)

M: Markır, 1: *Sideritis kirimerae*, 2: *Sideritis pisidica*, 3: *Sideritis albiflora*, 4: *Sideritis serratifolia*, 5: *Sideritis akmanii*, 6: *Sideritis leptoclada*, 7: *Sideritis athoa*



Şekil 3.4 Bazı *Sideritis* Türlerinin ITS ile Yapılan PCR Görüntüsü (Renkli)

M: Markır, 1: *Sideritis perfoliata*, 2: *Sideritis taurica*, 3: *Sideritis cilicica*, 4: *Sideritis armeniaca*, 5: *Sideritis aytacii*, 6: *Sideritis tmolea*, 7: *Sideritis dichotoma*, 8: *Sideritis phlomoides*



Şekil 3.5 Bazı *Sideritis* Türlerinin ITS ile Yapılan PCR Görüntüsü (Siyah-Beyaz)

M: Markır, 1: *Sideritis brevidens*, 2: *Sideritis phrygia*, 3: *Sideritis trojana*, 4: *Sideritis gulendamiae*, 5: *Sideritis rubriflora*, 6: *Sideritis hololeuca*, 7: *Sideritis argyrea*, 8: *Sideritis scardica*

3.4 DNA Dizileme ve Dizi Analizi

3.4.1 Dizileme Reaksiyonları

ITS bölgesinin tamamı PCR ile elde edildikten sonra, PCR ürünlerinin saflaştırılması ve dizilenmesi (Cycle sequencing) reaksiyonları için Refgen firmasına hizmet alımı yapılmak üzere gönderildi. Otomatik DNA dizileyicisi üniversitemizde olmadığı için bu reaksiyonları yapmak amacıyla REFGEN firmasından hizmet alımı yapıldı. Hizmet alımı; PCR ürünlerinin saflaştırılması, dizileme reaksiyonları (cycle sequencing), dizileme ürünlerinin saflaştırılması (purification) ve poliakrilamid jel elektroforezi yardımıyla dizileme ürünlerinin kromatogramlar (elektroferogramlar) haline getirilmesi kısımlarından içermektedir. Gerçekleştirilen dizileme reaksiyonlarının sonuçları *ABI prism* formatındaki dosyalar şeklinde bize ulaştı.

3.4.2 Dizilerin İşlenmesi

ABI prism formatındaki dosyalar şeklinde gelen DNA dizilerin işlenmesi için Sequencher 4.10.1 programı kullanıldı. Her bir türe ait olarak gelen ileri (forward) ve geri (reverse) dizilerden kontig oluşturuldu. Dizileme reaksiyonlarını gerçekleştiren cihazın yanlış okumuş olduğu bazı bazlar, kromatogramdaki (videogram) sinyallerin (piklerin) güçlülüğüne, temizliğine bakılarak Sequencher 4.10.1 programında el ile görsel olarak düzeltildi ve kontig dizileri elde edildi. Böylelikle çalışılan taksonların ITS bölgelerinin ileri (ITS5A) DNA dizileri elde edildi.

3.4.3 Dizilerin Hizalanması

Dizilerin hizalanması için ClustalW programı kullanıldı. Bu program Fasta formatında çalıştığından elde edilen DNA dizileri Microsoft Office Word programı yardımıyla Fasta formatına çevrildi ve hizalamaya hazır hale getirildi. DNA baz sıraları ClustalW programında varsayılan komutlar kullanılarak hizalandı ve türler arasındaki baz farklılıkları tespit edildi. 76 taksona ait yapılan DNA dizilerin hizalanması sonucunda oluşan baz farklılıkları EK’te gösterilmiştir.

3.5 Filogenetik Analiz

Filogenetik analiz için PAUP 4.0b10 programı kullanıldı. Bu program #Nexus formatında çalışmaktadır. ClustalW programında hizalanmış olan diziler #Nexus formatına çevrilerek PAUP 4.0b10 programında filogenetik analize hazır hale getirildi. Çalışmada MAC bilgisayar kullanıldı ve PAUP’un MAC versiyonunda filogenetik analizler yapıldı. MAC bilgisayarda PAUP açıldıktan sonra ekranın üst kısmında oluşan pencereleden, yapılması istenen analizler ve kriterler seçilerek kolaylıkla filogenetik ağaçlar oluşturuldu.

Kriterlerden karakter temelli yöntemlerden olan Parsimoni seçilip Heuristic araştırma yapıldı ve oluşan ağaçlar kaydedildi (Şekil 4.1-4.3). Oluşan ağaçların ortak uyumluluk (konsensus) ağaçları pencereden gerekli yollar izlenerek oluşturuldu ve kaydedildi (Şekil 4.6-4.8). Yine Parsimoni kriterinde bootstrap analizi yapıldı ve ağaç kaydedildi (Şekil 4.4). Daha sonra mesafe (distance) temelli yöntem kullanılarak UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average- Şekil 4.9) ve NJ (Neighbor Joining- Şekil 4.10) analizleri yapıldı. Oluşturulan filogenetik ağaçlar ve yorumlar sonuç bölümünde sunulmuştur.

4 SONUÇLAR VE TARTIŞMA

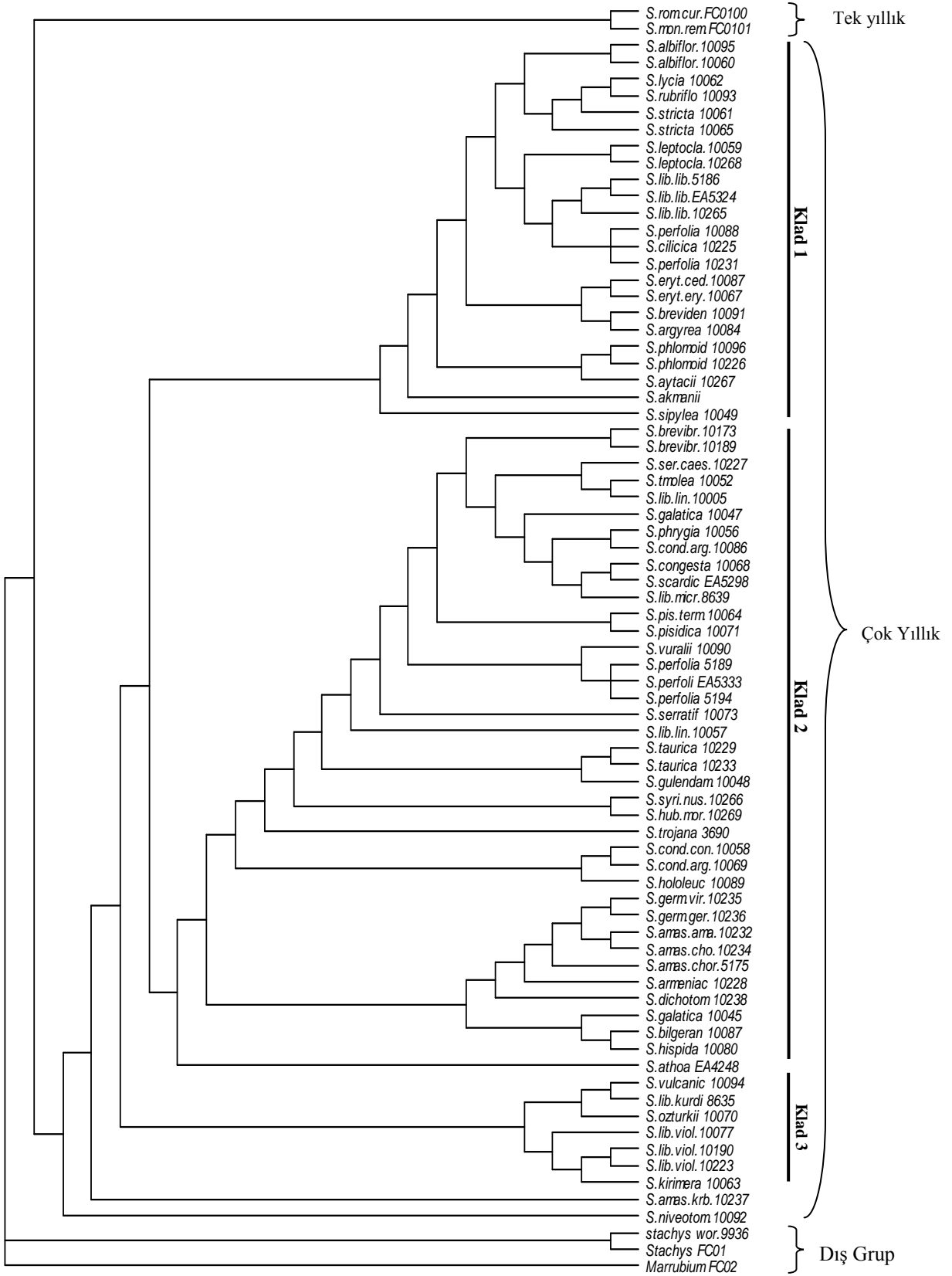
DNA dizi analizi çalışmaları, özellikle son on yıl içerisinde çok önemli bilgilerin birikimini sağlamıştır. Özellikle ITS bölgesi son zamanlarda en çok çalışılan bölgelerden biri olmuştur. ITS bölgesi sırasıyla ITS1 (200-250bp), 5.8S rDNA (160 bp) ve ITS2 (200-250 bp) bölgelerinden oluşmaktadır (Şekil 1.2). Bu bölgelerden 5.8S rDNA bölgesi korunmuş bir bölgedir, çalışmalarda ITS bölgesinin kullanmayı cezbeden bölgeler ise ITS1 ve ITS2 bölgeleridir. ITS1 ve ITS2 olarak adlandırılan ITS bölgeleri, kodlanmayan iki ara (spacer) bölge olmaları bakımından çalışmalar için çok uygundur. Bu ara bölgeler rDNA'nın kodlanan bölgelerine kıyasla selektif avantaj sundukları için daha fazla mutasyon biriktirebilmekte ve türlerarası, tür içi ve hatta populasyon düzeyinde var olan polimorfizmlerin ortaya çıkmasında etkili olabilmektedirler.

Türkiye'de yayılış gösteren *Sideritis* L. cinsinin *Empedoclia* seksiyonuna ait 71 taksonun akrabalık ilişkilerini ortaya koymak amacıyla nrDNA ITS bölgesi çalışıldı. Literatüre göre ülkemizde yetişen *Sideritis* cinsinin *Empedoclia* seksiyonuna ait taksonlarla ilgili daha önce yapılmış böyle bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile öncelikle *Sideritis* türlerinden gDNA'lar izole edildi, daha sonra gDNA'nın ITS bölgeleri PCR yardımıyla çoğaltıldı. Elde edilen dizilerin dizi analizi ve filogenetik analizleri yapıldı. Böylece türler arasındaki genetik benzerlikler ve farklılıklar ortaya kondu. Çalışma sonucunda *Sideritis* cinsinin *Empedoclia* seksiyonuna ait taksonların ITS bölgelerinin DNA baz sıraları elde edildi ve ilk kez bu araştırma ile DNA dizilerine dayalı olarak akrabalık dereceleri belirlenmiş oldu.

Çalışılan taksonların ITS nrDNA bölgesinin tamamı kullanılarak toplam baz uzunluğunun 640-698 baz çifti (bç/bp) arasında değişim gösterdiği gözlemlendi. Bu taksonların ITS bölgesine ait verilerin filogenetik analizi PAUP 4.0b10 programı kullanılarak yapıldı. Analiz için ise parsimoni ve genetik uzaklık kriterleri kullanıldı. Parsimoni en sık çalışılan ve kullanılan filogenetik ağaç oluşturma metodudur. Bu metod olası bütün ağaçları değerlendirme ve farklı ağaçlar arasından seçmeye yarayan, her biri için bir kriter ya da bir skor verme esasına dayanır. Maksimum parsimoni’de kriter, verilen ağaçtaki verileri açıklayabilmek için gerçek olduğu kabul edilen genetik değişimlerin sayısıdır. Parsimonisi en yüksek olan ağaç, en tutumlu olan yani genetik ilişkiyi en gerçekçi yansıtan ağaçtır [108].

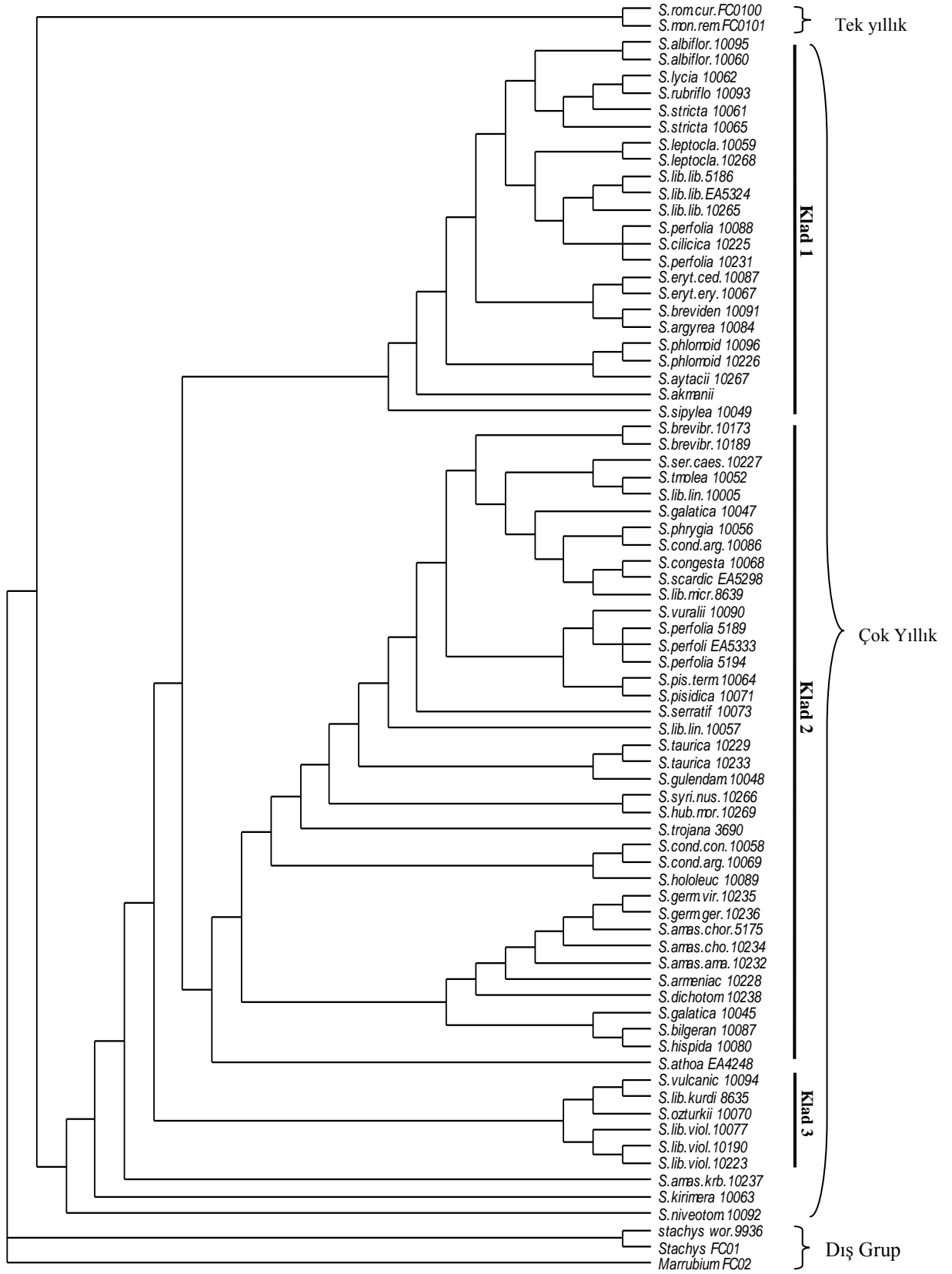
Parsimoni kriteri kullanılarak oluşturulan Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’teki ağaçların yanlarında bulunan çizgiler kladları göstermektedir. Her çizginin üzerinde hangi klad olduğu yazmaktadır ve o klada ait taksonlar gözlemlenmektedir. Tek yıllık yazan türler *Sideritis* cinsinin *Hesiodia* seksiyonuna ait taksonlar iken, çok yıllık yazanlar ise *Empedoclia* seksiyonuna ait taksonları içermektedir.

1



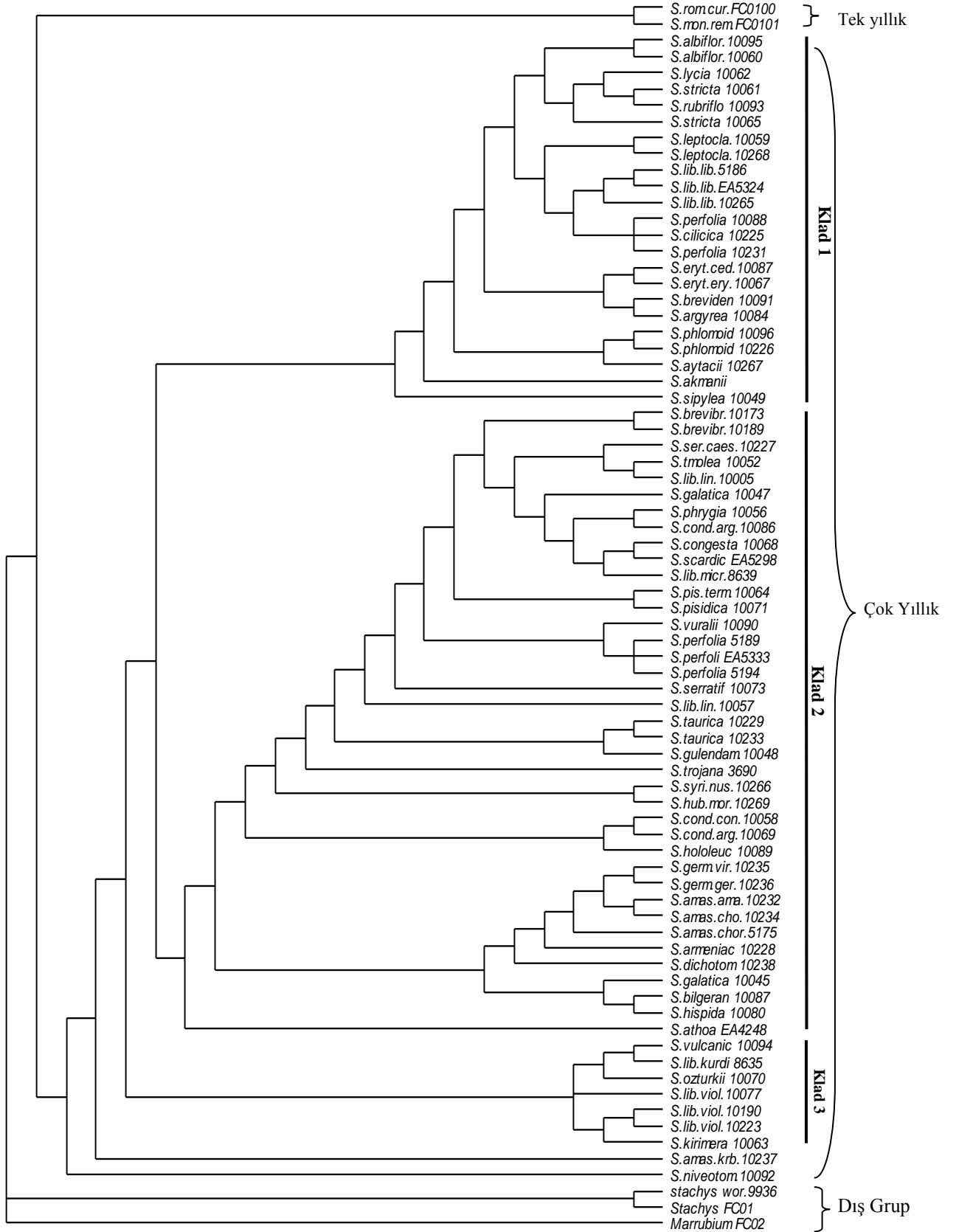
Şekil 4.1 Parsimoni Kriteri Kullanılarak Elde Edilen 1 Numaralı Ağaç

5000



Şekil 4.2 Parsimoni Kriteri Kullanılarak Elde Edilen 5000 Numaralı Ağaç

10000



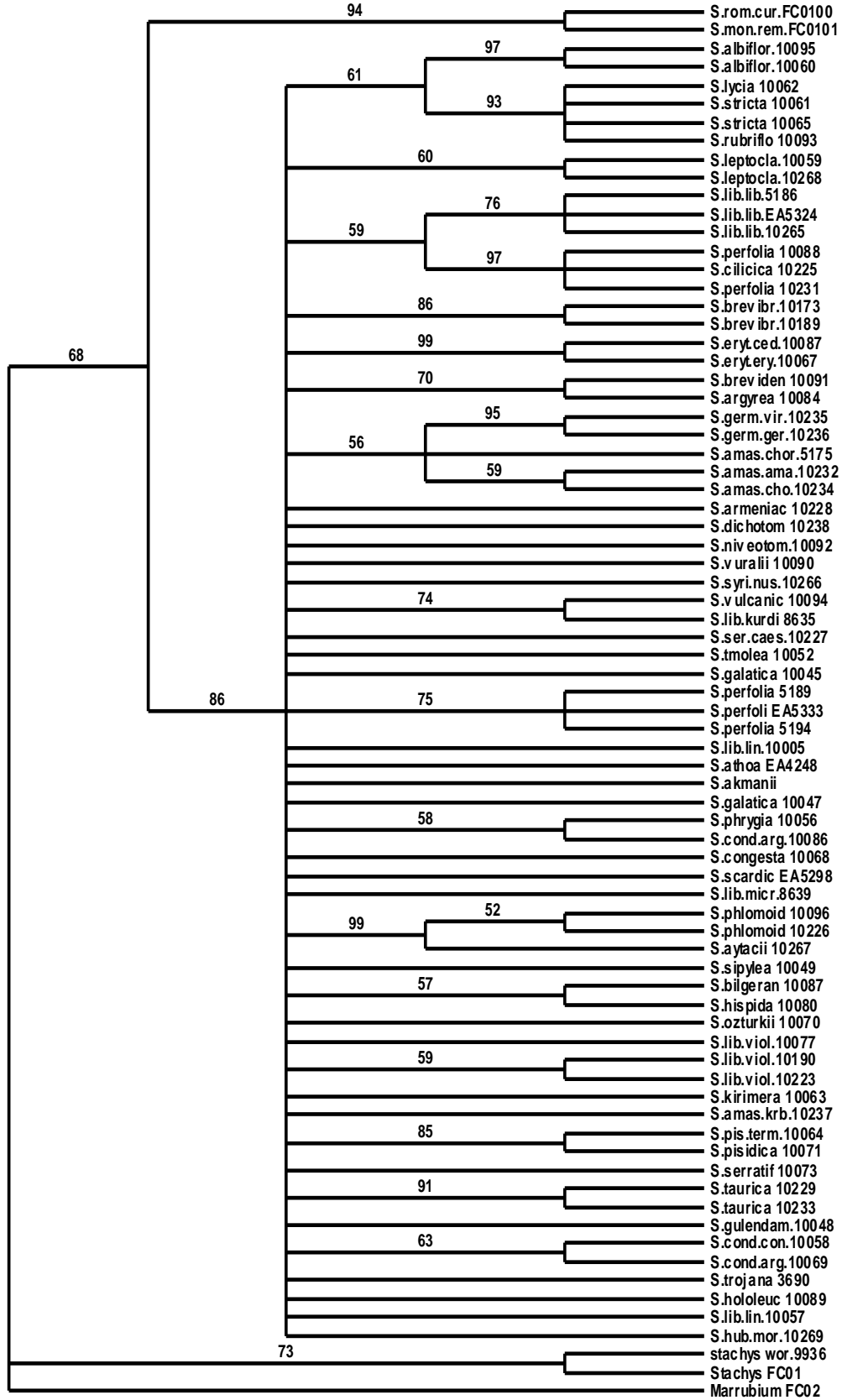
Şekil 4.3 Parsimoni Kriteri Kullanılarak Elde Edilen 10000 Numaralı Ağaç

Karakter temelli yöntemlerden Maksimum Parsimoni kriteri kullanılarak Heuristic araştırma yapıldı. Bu arama için oluşturulacak maksimum ağaç sayısı 10,000 olarak seçildi. Yapılacak aramada oluşacak dalları değerlendirmek için kullanılan algoritma TBR (Tree-Bisection-Reconnection) olarak seçildi. Tüm karakter tipleri sırasız (unordered) ve eşit ağırlıkta olacak şekilde ayarlandı. Yapılan analiz sonucunda 10,000 ağaç elde edildi. Arama sonucunda oluşan 10,000 filogenetik ağaçtan 1 numaralı ağaç, 5000 numaralı ağaç ve 10,000 numaralı ağaç olmak üzere 3 tane filogenetik ağaç bu çalışmada sunuldu. Şekil 4.1’de parsimoni kriteri sonucunda oluşan 1 numaralı ağaç, Şekil 4.2’de 5000 numaralı ağaç, Şekil 4.3’de ise 10000 numaralı ağaç gösterilmiştir.

Yapılan parsimoni analizinde toplam 774 karakter incelenmiş ve bunlardan 512 (%66.1) karakter sabit(constant) karakterli, 140 (%18.1) karakter değişken çıkmıştır. Parsimonik bilgi içeren karakter sayısı ise 122 (%15.8) çıkmıştır. Heuristic arama sonucunda toplam 1 783 503 194 farklı ağaç topolojisi oluşturulmuş ve en iyi parsimonik ağaçların skoru (basamak sayısı) 567 olarak bulunmuştur. Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’teki ağaçlarda dış grup olarak seçilen cinsler ağacın en altında yer almış olup *Sideritis* cinsinden bariz bir şekilde ayrılmışlardır. *Stachys* cinsine ait iki tür kendi içerisinde monofiletik bir grup oluşturmuştur, *Marrubium* ise onlardan ayrılmıştır. *Sideritis* cinsinin tek yıllık türlerinden olan *Hesiodia* seksiyonuna ait *S. romana* subsp. *curvidens* ve *S. montana* subsp. *remota* türleri dış gruptan sonra ayrılarak kendi aralarında monofiletik bir grup oluşturmuşlardır. Seçilen ağaçların üçünde de bu iki türün ağacın en üst kısmında monofiletik bir grup olarak ortaya çıktığı gözlemlenmektedir.

Empedoclia seksiyonuna ait taksonların bulunduğu kısma bakıldığında (Şekil 4.1-4.3), bu seksiyona ait türlerin 3 ayrı kladda toplandıkları gözlemlenmektedir. Seçilen ağaçlardaki 3 klad birbiri ile kıyaslandığında, kladlara ait türlerin tüm ağaçlarda (sırasıyla 1., 5000., 10000. ağaçlarda) aynı olduğunu gözlemlenmektedir. Mavi renkle gösterilmiş olan klada ait taksonlar 3 ağaçta da aynıdır. Yine yeşil ve sarı renkle gösterilmiş kladların üyeleri 3 ağaçta da aynıdır. Fakat kladlar içerisinde bulunan bazı türlerin topolojilerinin ağaç içerisindeki konumlarının değişiklikler olduğu gözlemlenmektedir.

Bootstrap

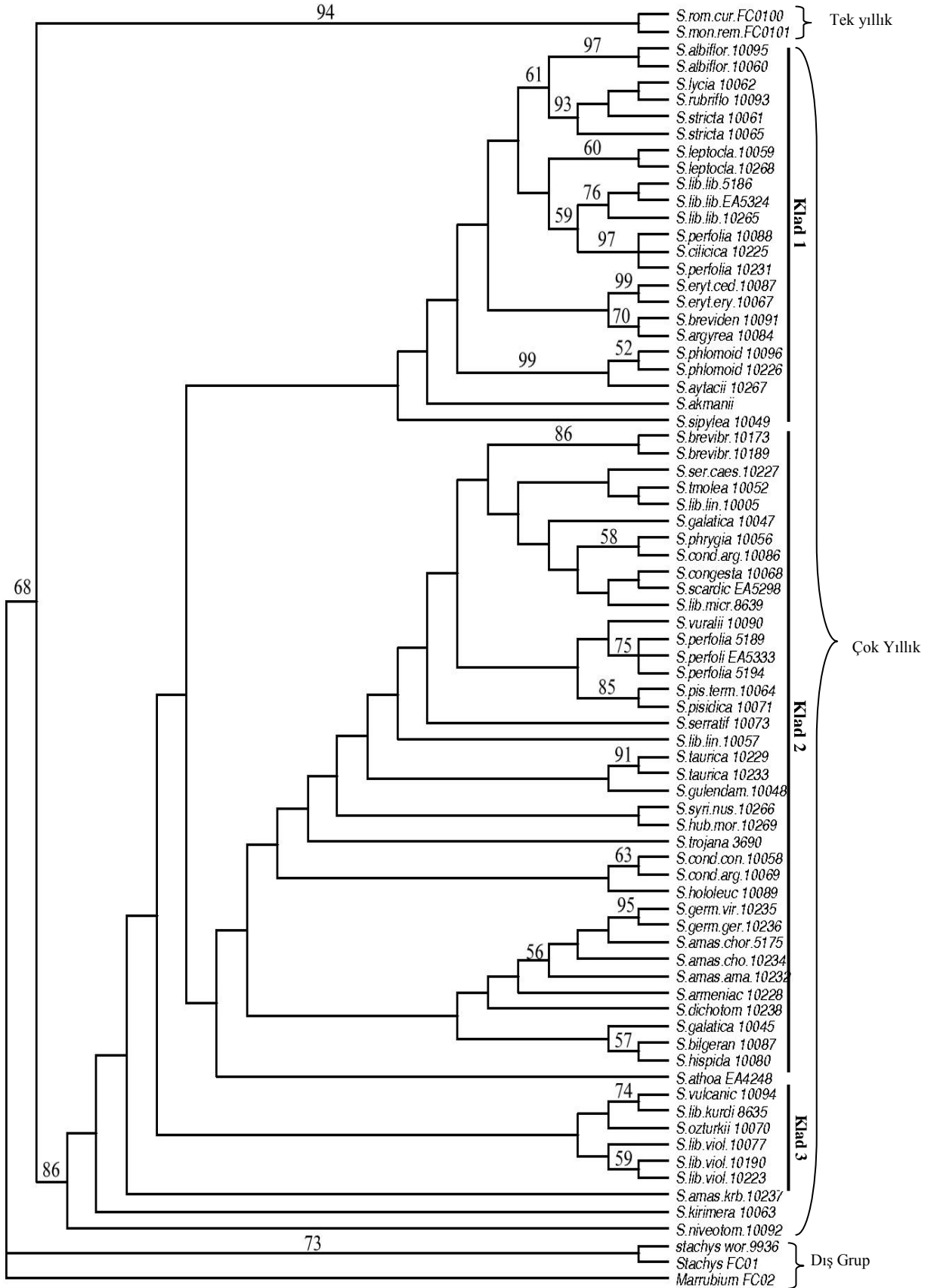


Şekil 4.4 Bootstrap Analizi Sonucunda Oluşan Parsimoni Ağacı

Bu analizlerin yanında ayrıca maksimum parsimoni yönteminde bootstrap analizi yapılmıştır (Şekil 4.4). Bu yöntem elde edilen ağaçların dallarının parsimoni kriteri kullanılarak istatistiksel yönden en güvenilir olan dallarını belirlemede kullanılır. Her bir dalın yüzdeler olarak ne oranda desteklendiğini gösterir. Eğer yapılan destek %50'nin altında ise program bu dalı çok zayıf olarak nitelendirir ve oraya güvenilemeyeceği için çökertir, çöken dal sonucunda oluşan basamaklanmamış dallanma ise politomi olarak adlandırılır. Şekil 4.4'de oluşturulan bootstrap ağacı, maksimum ağaç sayısı 1000 seçilerek ve 100 tekrar (replicate) yapılarak elde edilmiştir. Takson sayısı fazla olduğu için maksimum ağaç sayısı 1000, tekrar sayısı 100 seçilmiştir. Tekrar sayısını veya maksimum ağaç sayısını arttırdığımızda çok uzun sürerek bilgisayarın kapasitesi analiz için yetersiz kaldı. Şekil 4.5'de ise 5000 numaralı parsimoni ağacının üzerine Bootstrap analizi sonucunda oluşan dalların desteklenme yüzdeleri yerleştirilmiştir.

Şekil 4.4'te görüldüğü gibi bootstrap analizi sonucunda oluşan ağaçta pek çok dal çökmüştür. Bunun nedeni giriş bölümünde bahsedildiği gibi; o dal için bootstrap desteğinin % 50'nin altında kalmasıdır. Ağacın bu kısmındaki dallanma modeli belirlenemediğinden güvenilebilir yorum yapılamaz. Sadece bu dal tek düğümden çok çatallı olarak ayrılmıştır ve dallarda politomi oluşmuştur denilebilir.

5000



Şekil 4.5 Bootstrap değerleri işlenmiş 5000 numaralı Parsimoni Ağacı

Elde edilen 5000 numaralı Maksimum Parsimoni ağacının üzerine Şekil 4.5'te görüldüğü gibi bootstrap yüzdeleri işlendi. Buraya bakarak 73 taksonun temelde iki grup oluşturduğu görülmektedir ve bu durum bootstrap analizinde de %68, %94 ve %86 olarak desteklenmiştir. *Hesiodia* seksiyonuna ait eklediğimiz tek yıllık türler *Sideritis montana* subsp. *remota*, *Sideritis romana* subsp. *curvidens*, *Empedoclia* seksiyonuna ait çok yıllık türlerden ayrılarak kendi arasında monofiletik bir grup oluşturmuşlardır ve bu dal %94 destek almıştır (Şekil 4.5). *Empedoclia* seksiyonuna ait 71 taksonun bulunduğu dal ise %86 olarak desteklenmiştir (Şekil 4.5). *Empedoclia* seksiyonuna ait 71 takson 3 ayrı kladda toplanarak ayrı birer grup oluşturmuşlardır. Dış grup olarak analize katılan *Marrubium* FC02, *Stachys woronowii* HD 9936, *Stachys* FC01 taksonları ise beklenildiği gibi *Sideritis* cinsinden ayrılmışlardır.

Farklı iki lokaliteden toplanan *S. albiflora*, *S. leptoclada*, *S. brevibracteata* ve *S. stricta* taksonlarının her biri kendi içlerinde grup oluşturmuşlardır. Bootstrap analizi (Şekil 4.5) sonucunda farklı lokalitelerden toplanan *S. albiflora*' ların bulunduğu dal %97, *S. leptocalada*' ların bulunduğu dal %60, *S. brevibracteata*' ların bulunduğu dal %86 destek almıştır (Şekil 4.5). Buradan farklı lokalitelerden toplanan aynı taksonların, birbirinin aynısı olduğu ve bir farklılık gözlemlenmediği görülmektedir.

Farklı üç lokaliteden toplanan *S. libanotica* subsp. *libanotica* ve *S. libanotica* subsp. *violascens* taksonları ayrılarak kendi içlerinde grup oluşturmuşlardır. Ayrıca *S. libanotica* subsp. *violascens* ile *S. libanotica* subsp. *kurdica*, *S. vulcanica* ve *S. ozturkii* yakın akraba çıkmıştır. Isparta'dan toplanmış *S. libanotica* subsp. *linearis* HD 10005 ile *S. tmolea* ile kardeş takson çıkmıştır. Bu iki taksonun kardeş taksonu ise *S. serratifolia* subsp. *caesarea* çıkmıştır. Ancak bu dallar herhangi bir bootstrap desteği almamıştır. *S. libanotica* subsp. *kurdica* ile *S. vulcanica* kardeş takson çıkmış olup bu dal %74'lük bir bootstrap desteği almıştır. Ayrıca bu iki takson *S. ozturkii*'ye yakın akraba çıkmıştır. Yine *S. libanotica* subsp. *kurdica*'nın *S. libanotica* subsp. *violascens* ile de yakın akraba çıktığı görülmektedir. *S. congesta* ve *S. scardica* kardeş takson çıkmışlardır, bunlara en yakın akraba ise *S. libanotica* subsp. *microchlamys* çıkmıştır. Ancak bu dallar bootstrap desteği almamıştır.

İki farklı lokaliteden toplanan *S. phlomoides* taksonları kendi içinde bir grup oluşturmuşlardır ve bu dal bootstrap analizi sonucunda %52 desteklenmiştir (Şekil 4.5). Ayrıca *S. aytacii* *S. phlomoides*'e yakın akraba çıkmıştır ve bu grubun da desteklenmesi %99'dur. (Şekil 4.5). Gazi Üniversitesi'nde Feyza Öke'nin 2006 yılında yaptığı yüksek lisans çalışmasında da tohum proteini analizleri sonucu bu iki türün protein profilleri %98 yakın çıkmıştır [61]. Buradan rahatlıkla *S. phlomoides* ile *S. aytacii*'nin kardeş takson olduğunu söyleyebiliriz.

Aynı mevkilerden (Hatay-Yayladağı) toplanan fakat farklı etiketlenen (HD 5189,HD 5194,EA 5333) üç *S. perfoliata* taksonlarının, beklendiği gibi kendi aralarında bir grup oluşturduğu görülmektedir ve bu dal bootstrap analizinde %75 desteklenmektedir (Şekil 4.5). Buna karşın İçel'den toplanan *S. perfoliata* HD 10088 ve Tokat'tan toplanan *S. perfoliata* HD 10231 taksonları; Hatay'dan toplanan diğer üç *S. perfoliata*'dan farklı bir yerde yer alarak, aralarına *S. cilicica*'yı da alarak beraber üçlü bir grup oluşturmuşlardır. Bu üçlü dal bootstrap analizinde % 97 desteklenmiştir (Şekil 4.5). Buradan *S. cilicica*'nın *S. perfoliata* ile yakın akraba olduğu söylenebilir. Ancak Hatay'dan toplanan *S. perfoliata* örneklerinin kesinlikle diğer bölgelerden toplanan örneklerden farklı olduğu gözükmemektedir.

İki farklı lokaliteden toplanan *S. taurica* taksonları kendi içinde bir grup oluşturmuştur ve bu dal bootstrap analizinde %91 desteklenmiştir (Şekil 4.5). Bunun yanında *S. taurica* ile *S. gulendamiae* yakın akraba çıkmıştır. *S. lycia* ile *S. rubriflora* kardeş takson çıkmışlardır ve bunlara en yakın akraba olarak *S. stricta* çıkmıştır.

İki alt tür olan *S. erythrantha* subsp. *erythrantha* ve *S. erythrantha* subsp. *cedretorum* beklendiği gibi kardeş takson çıkmışlardır ve bu dal bootstrap analizinde %99 desteklenmiştir (Şekil 4.5). *S. brevidens* ile *S. argyrea* da ayrıca kardeş takson olarak çıkmışlardır ve bu dal %70 bootstrap desteği almıştır (Şekil 4.5). Ayrıca bu iki takson *S. erythrantha*'nın alt türlerine yakın akraba çıkmıştır. Ancak bu ilişki bootstrap desteği almamıştır.

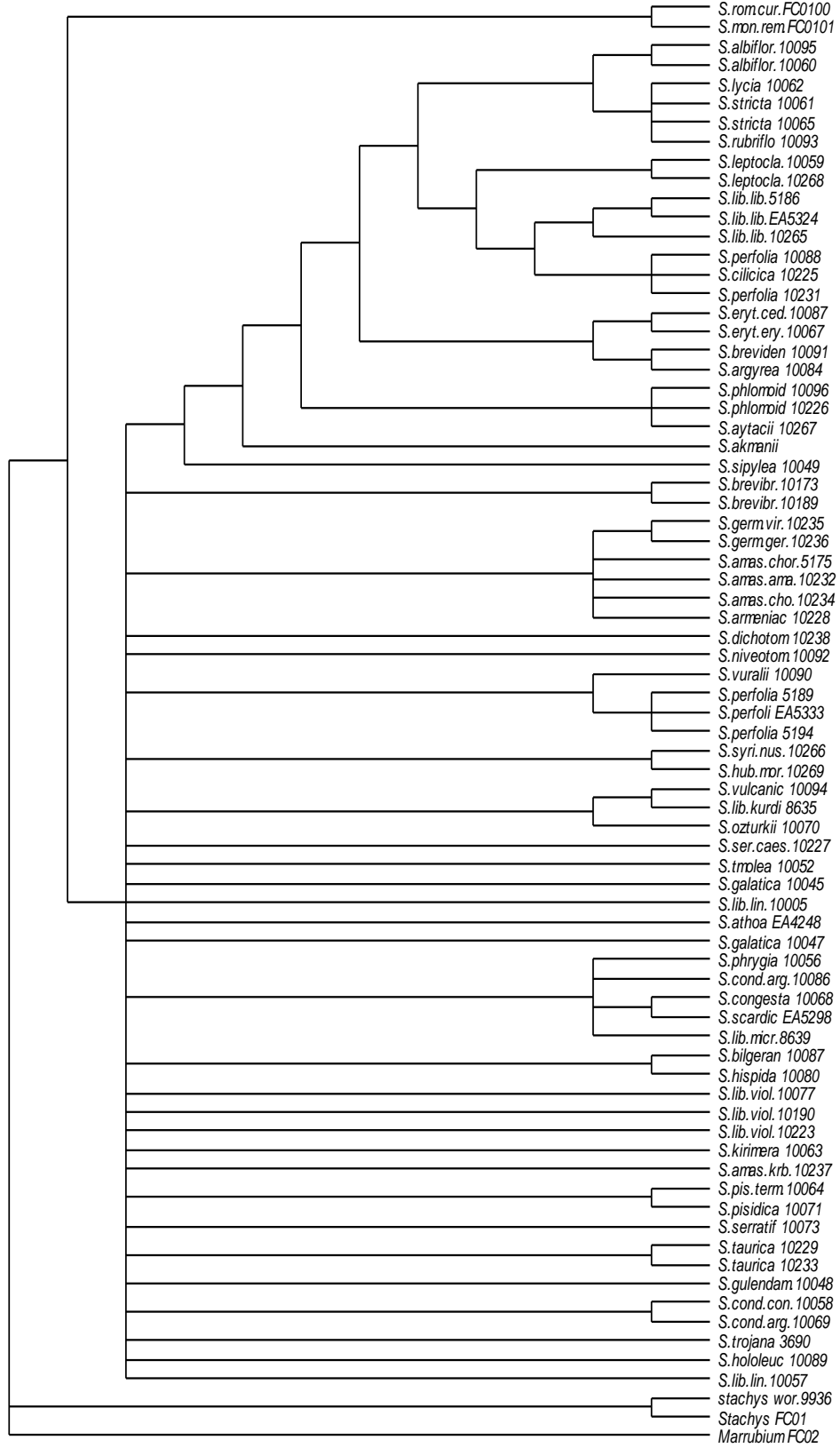
İki alt tür olan *S. pisidica* ve *S. pisidica* var. *termessi* beklendiği gibi kardeş takson çıkmışlardır ve bu dal da bootstrap analizinde %85 desteklenmiştir (Şekil 4.5). Yine iki alt tür olan *S. condensata* subsp. *condensata* ve *S. condensata* subsp. *arguta* kardeş takson çıkmışlardır ve bu dal bootstrap analizinde %63 desteklenmiştir (Şekil 4.5). Ayrıca *S. condensata*'nın alt türleri *S. hololeuca* ile yakın akraba çıkmışlardır.

S. bilgerana ile *S. hispida*'nın kardeş takson olduğu çıkmıştır ve bu dalın bootstrap analizinde %57 desteklendiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.5). Ayrıca bunlara en yakın akraba olarak da, Ankara'dan toplanan *S. galatica* HD 10045 çıkmıştır. Diğer *S. galatica* HD 10047 ise bu daldan uzak bir yerde bulunarak farklı olduğu anlaşılmalı birlikte bootstrap desteği bulunmamaktadır.

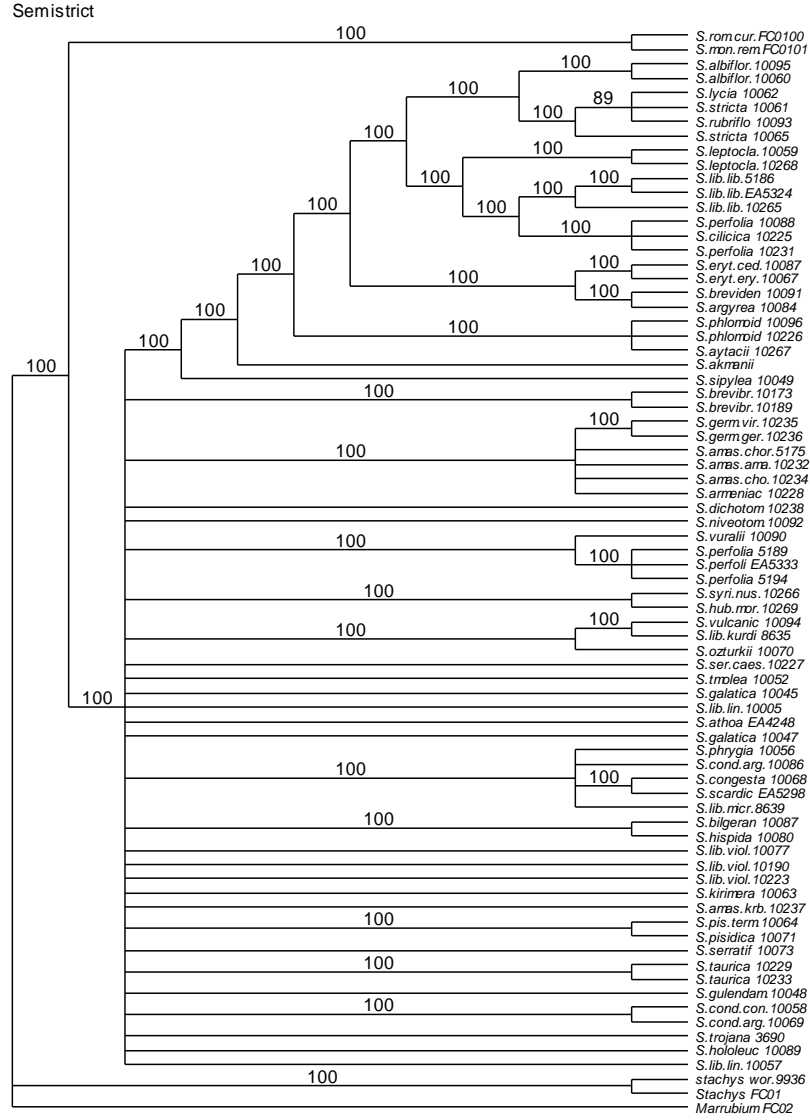
İki alt tür olan *S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana* ve *S. germanicopolitana* subsp. *viridis* beklendiği gibi kardeş takson çıkmıştır ve bu dal bootstrap analizinde %95 desteklenmiştir (Şekil 4.5). Bu taksonlara en yakın akraba ise *S. amasiaca*'nın alt türleridir. *S. amasiaca*'nın alt türlerinden *S. amasiaca* subsp. *amasiaca* ile iki farklı lokaliteden toplanan *S. amasiaca* subsp. *chorumensis* taksonları bir arada grup oluşturmuşlardır ve *S. germanicopolitana*'nın alt türleri ile yakın akraba çıkmışlardır. *S. amasiaca* subsp. *karabükensis* ise bu taksonlardan çok farklı bir yerde çıkmış olup %56 ve %59'luk bootstrap desteğiyle *S. amasiaca* alt türlerinden farklılığı belirlenmiştir.

Maksimum parsimoni kriterinde Heuristic araştırma sonucunda oluşturulan 10.000 ağacın ortak karar (konsensus) ağaçları oluşturulmuştur. Bu ağaçlardan Strict konsensus ağacı Şekil 4.6'da, Majority Rule ağacı Şekil 4.7'de ve Semi-strict konsensus ağacı Şekil 4.8'de görüldüğü gibidir.

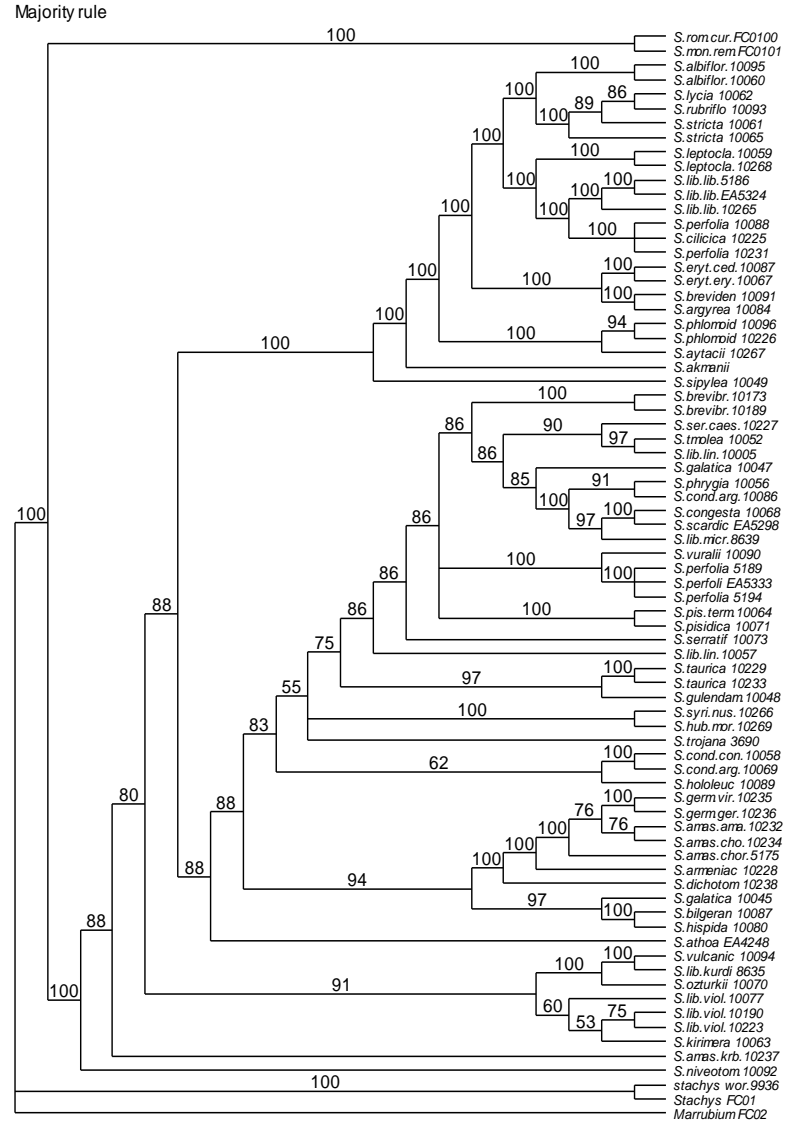
Strict



Şekil 4.6 Parsimoni ile Elde Edilen 10000 Ağacın Strict Konsensusu



Şekil 4.7 Parsimoni ile Elde Edilen 10000 Ağacın Semi-Strict Konsensusu



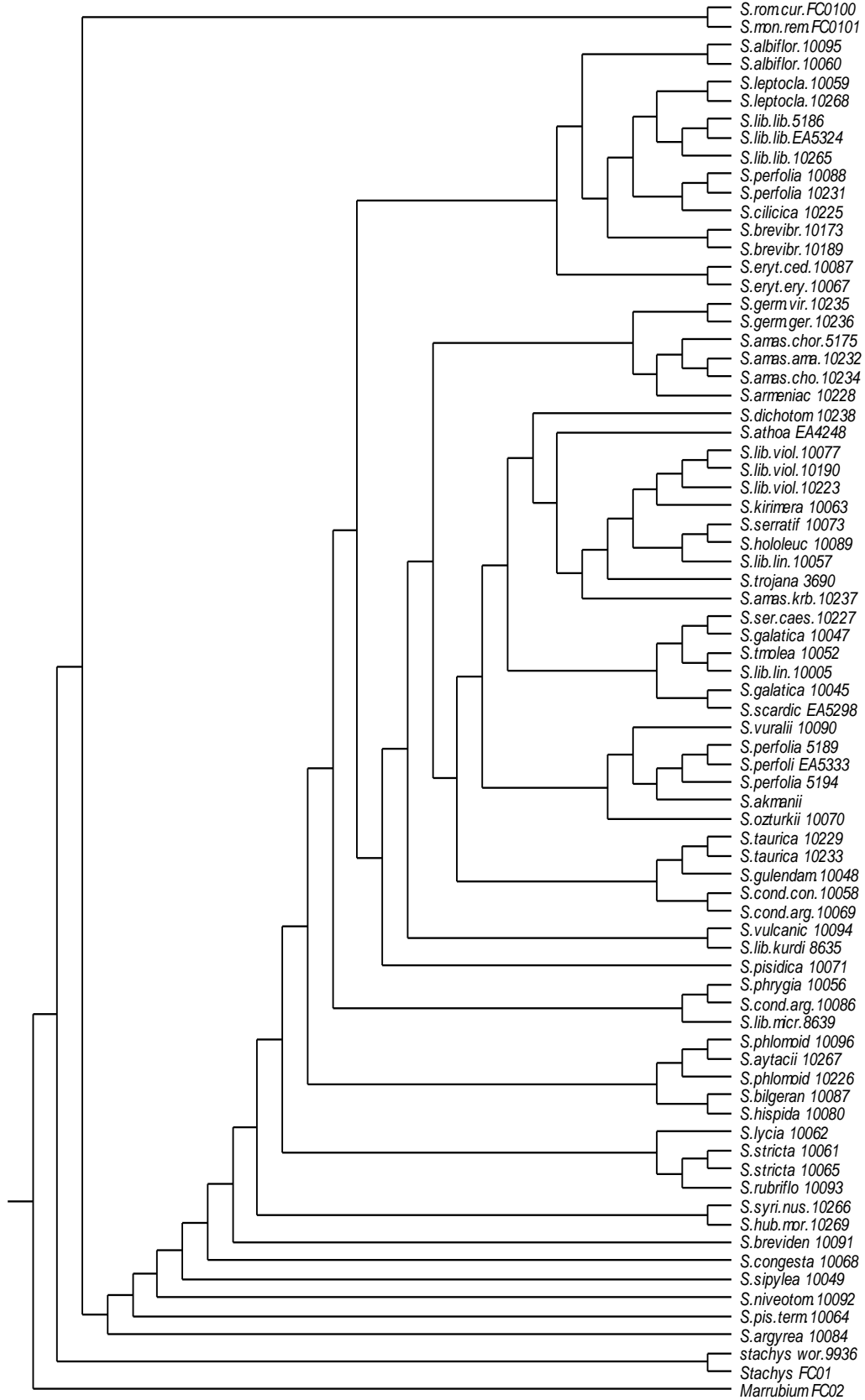
Şekil 4.8 Parsimoni ile Elde Edilen 10000 Ağacın Majority Rule Ağacı

Maksimum Parsimoni yöntemine ek olarak mesafe temelli yöntemlerden UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) ve NJ (neighbor joining) analizleri yapılmıştır. UPGMA Analizi sonucu oluşan filogenetik ağaç Şekil 4.9'da, NJ Analizi sonucu oluşan filogenetik ağaç Şekil 4.10'da gösterildiği gibidir.

Genetik uzaklık metodu, dizi çiftleri arasındaki farkın derecesine ve uzaklığına dayanır. Bu uzaklık taksonlar arasında uzaklık matrisi oluşturmak için kullanılabilir. Uzaklık metodunda iki farklı algoritma kullanılır. Bunlardan biri küme temelli diğeri ise optimalite (en iyilik) temelli algoritmalarıdır. Küme temelli algoritmalarda uzaklık matrisi en benzer dizi çiftlerinden başlanarak yapılır. UPGMA ve NJ olmak üzere iki çeşidi vardır. Optimalite temelli algoritmalarda ise birçok ağaç topolojisini kıyaslar ve ağaçlar arasında verilere göre en iyi uyduğu düşünüleni seçer.

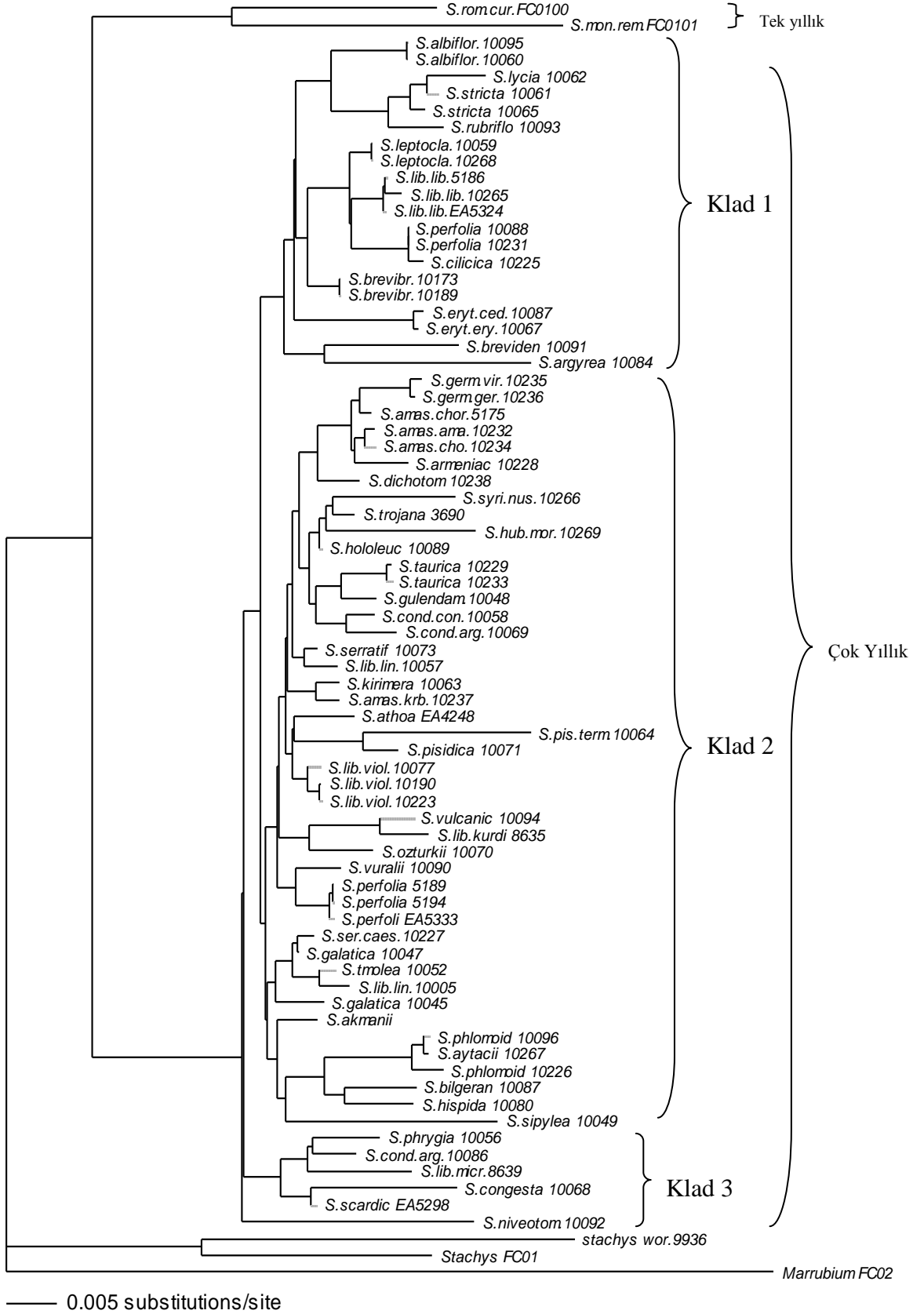
Şekil 4.10'da NJ analizi sonucunda oluşan filogenetik ağaçtaki dal uzunluklarının birbirinden farklı olduğu gözlemlenmektedir. Filogramdaki bu dal uzunluklarının farklı olması türlerin hangisinin daha önce veya sonra ortaya çıktığını gösterir. Filogenetik ağaçtaki uzun olan dallar günümüze en yakın olan atayı göstermektedir, kısa olan dallar ise en eski (ilkel) atayı göstermektedir. Şekil 4.9'daki UPGMA analizinde ise dal uzunlukları eşit olarak hesaplanmaktadır. Bu metot ilk kullanılan metot olup günümüzde kardeş taksonların aynı oranda mutasyona uğrama şartlarının geçerli kabul edilmemesinden dolayı Neighbour Joining (Komşu Katılım) metoduyla mesafelerin ölçülmesini ortaya çıkarmıştır ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Şekil 4.10).

UPGMA



Şekil 4.9 UPGMA Analizi Sonucunda Oluşan Ağaç

NJ



Şekil 4.10 Neighbor-Joining (NJ) Analizi Sonucunda Oluşan Ağaç

Yukarıda kullanılan kriterlerin yanı sıra en uygun filogenetik ağacın bulunması için parsimoni kriterinde değişik algoritmalar kullanılabilir. Bunlardan “Kes-Bağla (Branch-and-Bound)” algoritması, optimizasyonları birbirine çok yakın olan ağaç topolojileri arasından gerçeği en doğru yansıtan dallanmayı bulmaya çalışır. Türkçe karşılığı tamamen tüketici (en kesin) metod anlamına gelen “Exhaustive” algoritması da köksüz olan ağaçların hepsini değerlendirmeye alır ve sonuçta kesin olan ağaç topolojisini verir, ancak burada kullanılan takson sayısı bu araştırma algoritmasının sınırlarının (12 takson) üzerinde olduğu için bu algoritmalar kullanılamamıştır. Branch-and-Bound analizi yapılmaya çalışılmıştır, bilgisayar bir hafta çalışır durumda bırakılmasına rağmen, ön yükleme kutusunun henüz dolmaya başlamadığı ve aramaya devam ettiği gözlemlenmiştir. Bilgisayarın birkaç ay açık tutulması halinde bile analizin neticelenmesi zor gözükmekteydi. Bunun üzerine branch-and-bound analizine son verildi ve heuristic search ile analiz yapıldı.

Bütün analizleri özetlemek gerekirse, bu çalışmada *Sideritis* cinsinin *Empedoclia* seksiyonuna ait taksonların ITS dizileri karşılaştırılarak filogenetik analizleri yapılmıştır. Buna göre *Empedoclia* seksiyonuna ait 71 takson, tek yıllık türlerin bulunduğu *Hesiodia* seksiyonundan ve dış grup olarak seçtiğimiz taksonlardan ayrılmıştır ve kendi aralarında bir grup oluşturmuşlardır. Ayrıca *Empedoclia* seksiyonu 3 kladdan oluşmaktadır.

5 KAYNAKLAR

- [1] Havey, M.J., "Phylogenetic relationships among cultivated *Allium* species from restriction enzyme analysis of chloroplast genome". *Theor. Appl. Genet.*, **81**, (1991) 752-757.
- [2] Yang, X., and Quiros., C., "Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers". *Theor. Appl. Genet.*, **86**, (1993) 205-212.
- [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* (Compositae)., *Mol. Phyl. Evol.*, **10**, (1999) 449-463.
- [4] Davis, P.H., "Flora of Turkey and the East Aegean Islands", Edinburg. University of Edinburg Press., **7**, (1982) 297.
- [5] Metcalfe, C.R., Chalk., L., "Anatomy of the Dicotyledones",. Oxford University Press, Londra., **2**, (1950) 1041.
- [6] Huber-Morath, A., "Flora of Turkey and The East Aegean Islands", (Ed. P.H. Davis). Edinburg University Press, Edinburgh, **7**, (1982) 178-199.
- [7] Heywood, V.H., *Flowering Plants of The World.*, BT Batsford Ltd., London, (1996) 239.
- [8] Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K.H.C., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands.*, Supplement II, Edinburgh, (2000).
- [9] Barber J.C., F.O., J., Santos-Guerra A., Turner K.G., Jansen R.K., Origin of Macaronesian *Sideritis* L. (*Lamioideae: Lamiaceae*) inferred from nuclear and chloroplast sequence datasets, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **23/3**, (2002) 293-306.
- [10] Obon de Castro, C., Rivera Nunez, D., A taxonomic revision of the section *Sideritis* (Genus *Sideritis*) (*Labiatae*), Ed. J. Cramer Berlin-Stuttgart, (1994).

- [11] La Serna Ramos I.E., S.L.N., Perez de Paz P.L., A palinological study of the genus *Sideritis* subgenus *Marrubiastrum* (*Lamiaceae*): Macaronesian endemism,. Grana, **33/1**, (1994) 21-37.
- [12] Barber J.C., O.J.F., Santos-Guerra A., Marrero A., Jansen R.K., Evolution of endemic *Sideritis* (*Lamiaceae*) in Macaronesia: Insights from a Chloroplast DNA restriction site analysis,. Syst. Bot., **25/4**, (2000) 633-647.
- [13] Davis, P.H., Mill, R.R. and Tan, K., Flora of Turkey and The East Aegean Islands. University Press, Edinburgh, **10**, (1988).
- [14] Kırimer, N., Tabanca, N., Demirci, B., Baser, K.H.C, Duman, H., Aytacı, Z., "The essential oil of a new *Sideritis* species: *Sideritis ozturkii* AYTAÇ and AKSOY". Chemistry of Natural Compounds, **37/3**, (2001a) 234-237.
- [15] Aytacı, Z., Aksoy., A., "A new *Sideritis* L. species (*Labiatae*) from Turkey"., Flora Meditt, **10**, (2000) 181-184.
- [16] Yordanova, M., Apostolova, I., "Estimation of the status of representative populations of *Sideritis scardica* Griseb. in the Rhodopi Mts". Phytologia Balcanica, **6/1**, (2000) 43-57.
- [17] Topçu G., G.A.C., Kilic T., Yıldız Y.K., Tümen G., Diterpens from *Sideritis trojana*. Nat. Prod. Lett., **16/1**, (2002b) 33-37.
- [18] Ezer N., A.Y., Flavonoids from *Sideritis lycia*. Hacettepe Üniv. Ecz. Fak. Der., **15/2**, (1995) 81-87.
- [19] Akçoş Y., E.N., Özçelik B., Abbasoğlu U., Iridoid glycosides from *Sideritis lycia* Boiss Heldr. and its antimicrobial activities, FABAD, J. Pharm. Sci., **23**, (1998) 99-103.
- [20] Akçoş Y., E.N., Çalış İ., Demirdamar R., Tel B.C., Polyphenolic compounds of *Sideritis lycia* and their anti-inflammatory activity. Pharmaceutical Biology, **36/5**, (1999) 1-5.
- [21] Ezer N., *Sideritis congesta* Davis et Huber-Morath üzerinde farmakognozik araştırmalar, (Dr. Tezi). Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilim. Enst., ANKARA, (1980).
- [22] Akçoş Y., *Sideritis lycia* Boiss.-Heldr. üzerinde farmakognozik araştırmalar (Y.L. Tezi). Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilim. Enst., ANKARA, (1994).

- [23] Ezer N., A.Y., Rodrigez B., Abbasoğlu U., *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm.'den Elde Edilen İridoit Heteroziti ve Antimikrobiyal Aktivitesi. Hacettepe Üniv. Ecz. Fak. Der., **15/1**, (1995b) 15-21.
- [24] Kırimer, N., Tanrıverdi H., Başaran A., Timuralp G., Şimşek S., Başer K.H., Research into diuretic effect of *Sideritis dichotoma* Huter FABAD, J. Pharm. Sci., **22/3**, (1996b) 101-103.
- [25] Aydın S., Ö.Y., Beis R., Başer K.H.C., Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic activity. Phytother. Res., **10/4**, (1996) 342-344.
- [26] Bondi M.L., B.M., Piozzi F., Başer K.H.C., Simmonds M.S.J., Diversity and antifeedant activity of diterpens from Turkish species of *Sideritis*. Biochem. Syst. Ecol., **28/4**, (2000) 299-303.
- [27] Sezik E., E.N., Türkiye'de halk ilacı ve çay olarak kullanılan bitkiler üzerinde morfolojik ve anatomik araştırmalar, *Sideritis congesta* Davis et. Huber-Morath. Doğa, **7**, (1983) 163-168.
- [28] Ezer N., S.E., Türkiye' de halk ilacı ve çay olarak kullanılan bitkiler üzerinde morfolojik ve anatomik araştırmalar VI. *Sideritis arguta* Boiss et. Heldr. . Doğa, **12/2**, (1988) 136-142.
- [29] Ezer N., Halk ilacı ve çay olarak kullanılan *Sideritis libanotica* Labill., subsp. *linearis* (Bentham) Bornm. üzerindeki morfolojik ve anatomik araştırmalar. Doğa, **1**, (1991) 1-9.
- [30] Koca F., K.A., Başer K.H.C., *Sideritis germanicopolitana* üzerinde morfolojik ve anatomik araştırmalar. Tr. J. of Botany, **18**, (1994) 153-159.
- [31] Yücel E., *S. germanicopolitana* Bornm. subsp. *germanicopolitana* ve *S. germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn. Ex Bornm.'in tohum çimlenme özellikleri üzerine bir araştırma. Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi, **2**, (1996) 71-85.
- [32] Uysal İ., *Sideritis trojana* Bornm. endemik türünün morfolojisi, anatomisi ve ekolojisi Doğa-Tr. J. Botany, **15/3**, (1991) 371-379.
- [33] Nakipoğlu M., Chemotaxonomical studies on the *Sideritis* species of Turkey (*Sideritis sipylea*, *Sideritis perfoliata*). Anadolu, J. of AARI, **5/1**, (1995) 118-129.

- [34] Arslan K., *Sideritis vulcanica* Hub.-Mor. üzerinde anatomik, morfolojik ve korolojik çalışmalar (Y. L. Tezi). Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, (1999).
- [35] Gergis, V., Spiliotis, V., Argyriadou, N., Poulos, C., Relation between the antimicrobial activity and the chemical Composition of the essential oil of *Sideritis sipylea* Boiss. (*Labiatae*). Flavour and Fragrance Journal, **1**, (1991) 93-95.
- [36] Kırimer, N., Tabanca, N., Ozek, T., Baser, K.H.C., Tumen, G., Duman, H., Composition of Essential Oils from Five Endemic *Sideritis* Species. Journal of Essential Oil Research, **4**, (2003) 221-225.
- [37] Dulger, B., Gonuz, A., Bican, T., Antimicrobial studies on three endemic species of *Sideritis* from Turkey. Acta Biologica Cracoviensia, **2**, (2005a) 153-156.
- [38] Kıtık A., N.M.Ç., Tan A., Kesercioğlu T., Otan H., Sarı A.O., Oğuz B., Aydın H., Güneybatı anadolu bölgesinde yayılış gösteren bazı *Sideritis* L. türlerinin toplanması üzerinde biyosistemik araştırmalar. Anadolu J. of AAPI., **8/1**, (1998) 26-54.
- [39] Aydın H., Cytotaxonomical, anatomical and morphological researches on some *Sideritis* L. species (M. Sc.). Dokuz Eylül University Graduate School of Natural and Applied Sciences, İzmir, (1993).
- [40] Öz Serap., Balıkesir Edremit Kazdağ Yöresinde Yetişen *Sideritis* Türlerinde Kromozom Çalışmaları (*S. perfoliata* L., *S. athena* Papanikolau-Kokkini, *S. dichotoma* Huter, *S. trojana* Bornm.), (Y. L. Tezi) Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, (1995).
- [41] Contandriopoulos J., Contribution a l' Etude Cytotaxinomique des *Sideritis* section *Empedoclia* (*Labiatae*). Plant Systematics and Evolution, **129**, (1978) 277-289.
- [42] Baltisberger M., Cytological investigations of some plants from Turkey. Willdenowia, **21**, (1991) 225-232.
- [43] Ezer N., U.G., Güneş I., Erol K., Antibacterial activity of some *Sideritis* species. Fitoterapia, **6**, (1994) 549-551.
- [44] Ezer N., A., U., Antibacterial Activity of Essential oils of Some *Sideritis* species Growing in Turkey. Fitoterapia, **5**, (1996) 474-475.

- [45] Ertan, A., Azcan, N., Demirci, B. ve Baser, K. H. C., Fatty Acid Composition of *Sideritis* Species. Chemistry of Natural Compounds, **4**, (2001).
- [46] Kılıç, T., Yıldız, K., Gören, A.C., Tumen, G., Topcu, G. 2003. Phytochemical Analysis of Some *Sideritis* Species of Turkey. Chemistry of Natural Compounds, **5**, (2003).
- [47] Özkan, G., Sağdıç, O., Özcan, M., Özçelik, H., ve Ünvers, A., Antioxidant and Antibacterial Activities of Turkish Endemic *Sideritis* Extracts. Grasy Aceites, **1**, (2005) 16-20.
- [48] İşcan, G., Kırimer, N., Kurkcuoğlu, M., Baser, K. H. C. Composition and Antimicrobial Activit of the Essential Oil of Two Endemic Species from Turkey: *Sideritis cilicica* and *Sideritis bilgerana*. Chemistry of Natural Compounds, **6**, (2005).
- [49] Loğoğlu, E., Arslan, S., Öktemer, A, ve Şakıyan, İ., Biological Activities of Some Natural Compounds from *Sideritis sipylea* Boiss. Phytotherapy Research, **20**, (2006) 294-297.
- [50] Kılıç, T., Isolation and Biological Activity of New and Known Diterpenoids from *Sideritis stricta* Boiss..& Heldr. Molecules, **11**, (2006) 257-262.
- [51] Sağdıç, O., Aksoy, A., Gülcan, Ö., Ekici, L., Albayrak, S., Biological Activities of the Extracts of Two Endemic *Sideritis* Species in Turkey. Elsevier, **5**, (2007).
- [52] Çarıkcı, S., Çöl, Ç., Kılıç, T., Azizoğlu, A., Diterpenoids from *Sideritis tmolea* P. H. Davis. ACG Publications, **1/4**, (2007) 44-50.
- [53] Otan H., S.A.O., Nakiboğlu M., Aydın H., Türkiye' de toplanan *Sideritis* türlerinin floristik kayıtları. Anadolu J. of AAPI, **4/2**, (1994) 22-36.
- [54] Yeşilada E., H.G., Sezik E., Tabata M., Fujita T., Tanaka T., Takeda Y., Takaishi Y., Traditional medicine in Turkey V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. J. Ethnopharmacol, **46**, (1995) 133-152.
- [55] Yeşilada E., H.G., Sezik E., Tabata M., Goto T., Ikeshiro Y., Traditional medicine in Turkey IV. Folk medicine in the Mediterranean subdivision. J. Ethnopharmacol, **39**, (1993) 31-38.
- [56] Honda G., Y.E., Sezik E., Tabata M., Fujita T., Tanaka T., Takeda Y., Takaishi Y., Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West

Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces. J. Ethnopharmacol, **53**, (1996) 75-87.

- [57] Barber, J.C., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Turner, K.G., Jansen, R.K., "Origin of Macaronesian *Sideritis* L. (*Lamioideae*: *Lamiaceae*) inferred from nuclear and chloroplast sequence datasets". Molecular Phylogenetics and Evolution, **23/3**, (2002) 293-306.
- [58] Las Heras Vazquez, J., Gomez-Mercado, F., Guerrero J.L.G., Rodriguez-Garcia, I., Garcia-Maroto, F. "Genetic relationships and population structure within taxa of the endemic *Sideritis pusilla* (*Lamiaceae*) assessed using RAPDs". Botanical Journal of the Linnean Society, **129**, (1999) 345-358.
- [59] Fernandez-Peralta, A.M., Gonzalez-Agiulera, J.J., and Sanudo, A., "Phylogenetic relationships in the *Sideritis leucantha* Group (*Lamiaceae*)". Plants Systematics and Evolution, **152**, (1986) 167-183.
- [60] Barber, J.C., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Marreo, A. and Jansen, R.K., "Evolution of endemic *Sideritis* (*Lamiaceae*) in Macaronesia: Insights from a chloroplast DNA restriction site analysis". Systematic Botany, **25**, (2000) 633-647.
- [61] Öke, F., " Türkiye *Sideritis* L. (*Labiatae*) Türlerinin Tohum Protein Analizleri ", Y.Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü., Gazi Üniversitesi: ANKARA, (2006).
- [62] Krimer N., T.N., Tümen G., Duman H., Başer K.H.C., Composition of the essential oils of four endemic *Sideritis* species from Turkey. Flavour and Fragrance Journal, **14**, (1999) 421-425.
- [63] Öztürk Y., A.S., Öztürk N., Başer K.H.C., Effects of extracts from certain *Sideritis* species on swimming performance in Mice. Phytother. Res., **10/1**, (1996) 70-73.
- [64] Tunalier Z., Ö.N., Koşar M., Başer K.H.C., Duman H., Krimer N., Chem. Nat. Prod., **40/3**, (2004) 206-210.
- [65] Ezer N., V.R., Canigüeral S. and Adzet T., Essential oil composition of four Turkish species of *Sideritis*. Phytochemistry, **41**, (1996) 203-205.
- [66] Başer, H.C., Vural M., Tümen G., Akyalçın H., Satıl F., Two new records for Flora of Turkey. Turkish J. Botany, **19/4** (1995) 489-490.

- [67] Özcan M., C.J.C., Akgül A., Essential oil composition of Turkish mountain tea (*Sideritis* ssp.). Food Chem., **75/4**, (2001) 459-463.
- [68] Başer K.H.C., K.N., Tümen G., Essential oil of *Sideritis scardica* Griseb. subsp. *scardica*. J. Essent. Oil. Res., **9/2**, (1997) 205-207.
- [69] Tabanca N., K.N., Başer K.H.C., The composition of essential oils from two varieties of *Sideritis erythrantha* var. *erythrantha* and var. *cedretorum* Turk J. Chem., **25/2**, (2001) 201-208.
- [70] Krimer N., D.B., Duman H., Başer K.H.C., Chem. Nat. Comp., **40/1**, (2004) 19-23.
- [71] Krimer N., T.N., Ozek T., Tümen G., Başer K.H.C., Essential oils of annual *Sideritis* species growing in Turkey. Pharmaceutical Biology, **38/2**, (2000) 106-111.
- [72] Krimer N., O.T., Tanrıverdi H., Koca F., Kaya A., Başer K.H.C., J. Essent Oil Res., **4**, (1992) 583.
- [73] Özhatay, N., Koyuncu, M., Türkiye' de doğal bitkilerin ticareti, Ulusal ve Uluslar arası ticaret amacıyla doğal ortamlarından toplanan tıbbi ve aromatik bitkiler ve korunmaları için öneriler. Proceedings of XIIth Int. Symposium on Plant Originated Crude Drugs, Ankara, Turkey, (1998).
- [74] Mummenhoff, K., Franzke, A. and Koch, M., Molecular phylogenetic of *Thlaspi* s.l. (Brassicaceae) Based on Chloroplast DNA Restriction Site Variation and Sequences of the Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA. Cand. J. Botany, **75**, (1997) 469-487.
- [75] Baldwin, B.G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campell, C. S. and Donoghue, M. J., The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden, (1995) 250-272.
- [76] Khan, S., W. Spoor, Use of molecular and morphologic markers as a quality control in plant tissue culture. Pakistan Journal of Biological Sciences, **4/4** (2001) 479-482.
- [77] Gülşen O., a.M.M., 2005., Bitki biliminde kullanılan genetik markerlar ve kullanım alanları. Alatarım, **4/2**, (2005) 27-37.

- [78] Saiki R. K., G.D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Hiquchi, R., Horn, G.T., Mullis K.B., and Erlich, H.A., Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNAPolymerase. *Science*, **239**, (1998) 487-491.
- [79] Jones.N., O.H.a.T., H., Markers and mapping; we are all geneticists now. *New Phytol*, **137**, (1991) 165-177.
- [80] Yildirim, A., Kandemir, N., Genetik markörler ve Analiz Metotları. Bitki Biyoteknolojisi II-Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, S. Özcan, E. Gürel, M. Babaoğlu (eds.) Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, (2001).
- [81] Striem, M.J., Spiegel-Roy, P., Ben- Hayyim, G., Beckham, J. and Gidoni, D., Genomic DNA fingerprinting of *Vitis vinifera* by use of multi-loci probes. *Vitis*, **29**, (1990) 223-227.
- [82] Walton M., Molecular markers: which ones to use? *Seed World*, July(1993), 23-29.
- [83] Erlich, H.A., PCR Technology. Stockton Press. NY., (1989).
- [84] Weissing K., DNA Fingerprinting Plants and Fungi. CRC Press, USA., (1995).
- [85] Tingey, S.V., Rafalski, J.A. and Williams, J. G. K., Genetic analysis with RAPD markers, Application of RAPD Technology to Plant Breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series, Minnesota, November(1992), 3-8.
- [86] Williams, J.G.K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful markers. *Nucleic acids research*, **18/22**, (1990) 6531-6535.
- [87] Welsh J., M.M., Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, **18/24**, (1990) 7213-7218.
- [88] Satchwell, M.F., DNA fingerprinting hybrid poplar (*Populus spp.*) clones using RAPD-PCR with hot air temperature cycling,. State University of N.Y., College of Environmental Science and Forestry, Syracuse, N.Y., USA, (1998), May.
- [89] Staub., J.E., Sequen, F. C., Grupta, M., , Genetic Markers, Map Construction and Their Application in Plant Breeding. *Hort Science*, **31/5**, (1996) 729-741.

- [90] Rafalski, J.A.a.T., S. V., Genetic diagnostic in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. Trends Genet., August (8), **93**, (1993) 275-280.
- [91] Tingey, S.V., Del Tufa, J.P., "Genetic Analyses with Random Amplified Polymorphic DNA Markers". Plant Physiol, **101**, (1993) 349-352.
- [92] Bardakçı, F., "Genetic Analyses with Random Amlified Polymorphic DNA (RAPD) Markers". Turk J Biol., **25**, (2001) 185-196.
- [93] Lodhi, M.A., Genetic mapping and genome analysis of grape (Vitis sp.). Cornell University, New York., (1994) 233.
- [94] Zabeau, M., Amplified fragment lenght polymorphism (AFLP). European Patent Application 92402629.7, (1993).
- [95] 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).
- [96] Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero, S. J. and Owen. J.L., Amplification of DNA markers from evalutionarily diverse genomesusing single primers of simplesequence repeats. Theoretical and Applied Genetics, **89**, (1994) 998-1006.
- [97] Saghai-Marroof, M.A., Biyashev, R.B., Yang, G.P., Lhang, Q. and Allard, R.W., Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley species diversity, chromosomal locations and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci, **91**, (1994) 5466-5470.
- [98] Zietjiewicz, E., Rafalski, A., and Labuda, D., Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, **20**, (1994) 176-183.
- [99] Fang, D.Q.v.R.M.L., Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theor Appl Genet., **95**, (1997) 408-417.
- [100] Akkuş, S., DNA parmak izi ve adli biyoloji. http://www.ctf.edu.tr/ctftbiyo/yenikongre/kongre2006/kongre_programi/2, (2006).
- [101] Malyshev, S.V.a.K., N.A., Molecular markers in mapping plant genomes. Molecular Biology, **31/2**, (1997) 163-171.

- [102] Baldwin B. G., Phylogenetic Utility of the Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: an Example from the Compositae. *Molecular Phylogeny evolution*, **1**, (1992) 3-16.
- [103] Baldwin, B.G.a.M., S., Phylogenetic Utility of the External Transcribed Spacer (ETS) of 18S–26S rDNA. Congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Mol. Phyl. Evol.*, **10**, (1999) 449-463.
- [104] White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols A guide to methods and application* eds: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T. J. Academic Press Inc, San Diego, USA., (1990).
- [105] Maxam A., G.W., A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74**, (1977) 560-564.
- [106] Sanger F., N.S., Coulson A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74**, (1977) 5463-5467.
- [107] Sambrook, J.F., E.F., Maniatis, T., *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory Press New York., (1989).
- [108] Klug, S.W., Cummings, W.R., *Concept of Genetics*. Prentice Hall, New Jersey (2000), 745.
- [109] 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*, **22**, (1994) 4673-4680.
- [110] Notredame, C.a.H., D.G., “Saga: Sequence Alignment by Genetic Algorithm.”, *Nucleic Acid Research*, **24/8**, (1996) 1515-1524.
- [111] 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*, **6**, (1989) 514-525.
- [112] Freeman S. and Herron, J.C., *Evrimsel Analiz*. Çıplak, B., Basıbüyük. H. H., Karaytuğ. S. ve Gündüz. İ. (eds.), Palme Yayıncılık, **28-29**, (1999) 438-449.

- [113] Mount, D., Bioinformatics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Chapter 7 Phylogenetic prediction, (2001), 281-324.
- [114] Felsenstein, J., Estimation of hominoid phylogeny from a DNA hybridization data set. *Molecular Evolution*, **26**, (1987) 123-131.
- [115] TREEVIEW. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>. (09.01.2011).
- [116] PAUP <http://paup.csit.fsu.edu/>, (09.01.2011).
- [117] MR BAYES. <http://mrbayes.csit.fsu.edu/>, (09.01.2011).
- [118] PHYLIP. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>, (09.01.2011).
- [119] Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B., "A Plant DNA Miniprep: Version II". *Plant Molecular Biology Reporter*, **1/4**, (1983) 19-21.
- [120] Alice M. Stanford, R.H., Clifford R. Parks, "Phylogeny and Biogeography of Juglans (Juglandaceae) Based on mATK and ITS Sequence Data". *American Journal of Botany*, **87/6**, (2000) 872.
- [121] Reconstructing Phylogenetic Networks Using Maximum Parsimony http://conferences.computer.org/Bioinformatics/CSB2005/PDF3/14_nakhlehl_parsimony.pdf (17.01.2011)
- [122] Berry, V., Gascuel, O., Caraux, G., "Choosing the Tree Which Actually Best Explains the Data: Another Look at the Bootstrap in Phylogenetic Reconstruction", *Computational Statistics & Data Analysis*, **32/3-4**, (2000) 273.
- [123] Gültepe M., "Kuzey Anadolu Bölgesi'nde Doğal Olarak Yayılış Gösteren Bazı *Hieracium* L. (*Asteraceae*) Taksonlarının nrDNA ITS bölgeleri Bakımından Karşılaştırılması", Y.Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü., Karadeniz Teknik Üniversitesi TRABZON, (2007).

EKLER

ClustalW'da hizalanmış ITS5A nrDNA dizisinin Veri Matrisi

```
S.rom.curv.FC0100 -----CAAGGTTTCCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.mont.rem.FC0101 -----TTCCGTAG-TG-GACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.albiflora_10095 -----GTG-A-CCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.albiflora_10060 -----TAGGTG-A-CCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.leptoc.10059 -----CAAGGTTTCCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.leptoc.10268 -----CAAGGTTTCCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.lib.lib.5186 -----AGGTTTCCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.lib.lib.EA5324 -----ACAAGGTTTCCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.perfoliata_10088 -----GGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.cilicica_10225 -----TG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.perfoliata_10231 -----GGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.lib.lib.10265 -TCGTACAAGGTTTCCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.brevibrac.10173 -----GTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.brevibrac.10189 -----GTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.lycia_10062 -----CGTAGGT-GACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.stricta_10061 -----GTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.stricta_10065 -----AAGGTTTCCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.rubriflora_10093 -----TGCATAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.eryth.cedr.10087 -----AGGATC--ATTGTCGAA-CCTGCAAAA
S.eryth.eryth.10067 -----ACTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAA-CCTGCAAAA
S.brevioides_10091 -----CGTAGGTG-ACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.argyrea_10084 -----ATAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.germ.vir.10235 -----GAAACCTGCAAAA
S.amas.chor.5175B -----CTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.germ.germ.10236 -----CTTTCGTAGGTG-A-CCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.amas.amas.10232 -----GTG-A-CCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.amas.chor.10234 -----GTG-A-CCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.armeniaca_10228 -----AGGTTCCGATAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.dichotoma_10238 ---CAACAAGGTTTCCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.niveotom.10092 -----CCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.vuralii_10090 -----GCTCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.syri.nus.10266 --CGTACAAGGTTTCCGTAGGTG-A-CCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.vulcanica_10094 -----ACAAGGTTTCCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.lib.kurdica_8635 -----GGTG-A-CCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.serrat.caes.10227 -----AGGTTTCGTAGGTG-A-CCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.tmolea_10052 -----TAGGTG-A-CCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.galatica_10045 -----TTTCCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.perfoliata_5189 -----GGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.perfoliata_EA5333 -----GGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.perfoliata_5194 -----GTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.lib.linear.10005 -----TTCACGTCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.athoa_EA4248 -----GTG-A-CCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.akmanii -----TAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.galatica_10047 -----TAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.phrygia_10056 -----GT-GAACTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.cond.arg.10086 -----T-GAACTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.congesta_10068 -----TGAAC-GCACTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.scardica_EA5298 -----TGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAG
S.lib.microc.8639 -----ATAGGT-GACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.phlomoides_10096 -----TG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.phlomoides_10226 TCGTACAAGGTTTCCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.aytacii_10267 ---TACTCAGGTTTTCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.sipylea_10049 -----CAAGGTTTCCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.bilgerana_10087 -----GTG-AAC-TGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.ozturkii_10070 -----GGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.lib.violas.10077 -----TAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.lib.violas.10190 -----GGTTCCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.lib.violas.10223 -----GGTTCCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.kirimerae_10063 -----GTAGTAGTGACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.amas.karab.10237 -----GTGACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.hispida_10080 -----T-GACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.pisid.term.10064 -----TAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.pisidica_10071 -----TAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.serratifolia_10073 -----TAGGTG--ACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.taurica_10229 -----GGTTTCGTAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.taurica_10233 -----GGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.gulendam.10048 -----TAGGTG-A-CCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.cond.cond.10058 -----TTTCCGTAGGTG-A-CCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.trojana_3690 -----T-GACCTGCGGA--GGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.hololeuca_10089 -----TAGGTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.cond.arg.10069 -----TAGGTG-A--CTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.lib.linear.10057 -----GTG-AACCTGCGGAAGGATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
S.huber.mor.10269 -----TCCGTAGGTG-GTCTGCGGAAGGATCATTGTCGAA-CCTGCAA-
stachys_wor.9936 -----CGGCGGCC
Stachys_FC01 -----
Marrubium_FC02 -----CCGTAGTGACCTGCGGA--GATC--ATTGTCGAAACCTGCAAAA
```

ClustalW'da hizalanmış ITS5A nrDNA dizisinin Veri Matrisi

S.rom.curv.FC0100 GCAGACC-GCGAACACGTTCAACAAAAACAAAACCCGGCCGGGGAGCGGGGGCG---
S.mont.rem.FC0101 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAAAAAAACAAAACCCGG---GGGCCGCGAGG-----
S.albiflora_10095 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAATGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.albiflora_10060 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAATGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.leptoc.10059 GCAGACCCGCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.leptoc.10268 GCAGACCCGCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.lib.lib.5186 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CTACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.lib.lib.EA5324 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CTACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.perfoliata_10088 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.cilicica_10225 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.perfoliata_10231 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.lib.lib.10265 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CTACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.brevibrac.10173 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.brevibrac.10189 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.lycia_10062 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.stricta_10061 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.stricta_10065 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.rubriflora_10093 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.eryth.cedr.10087 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CGACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.eryth.eryth.10067 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.brevidents_10091 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.argyrea_10084 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.germ.vir.10235 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.amas.chor.5175B GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.germ.germ.10236 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.amas.amas.10232 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.amas.chor.10234 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.armeniaca_10228 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CGACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.dichotoma_10238 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.niveotom.10092 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.vuralii_10090 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.syri.nus.10266 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGATCGGGGGCG---
S.vulcanica_10094 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAGCGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.lib.kurdica_8635 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.serrat.caes.10227 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.tmolea_10052 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.galatica_10045 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.perfoliata_5189 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.perfoliata_EA5333 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.perfoliata_5194 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.lib.linear.10005 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.athoa_EA4248 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAGCGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.akmanii GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.galatica_10047 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.phrygia_10056 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.cond.arg.10086 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.congesta_10068 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.scardica_EA5298 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.lib.microc.8639 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.phlomoides_10096 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.phlomoides_10226 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.aytacii_10267 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.sipylea_10049 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.bilgerana_10087 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.ozturkii_10070 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.lib.violas.10077 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.lib.violas.10190 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.lib.violas.10223 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.kirimerae_10063 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.amas.karab.10237 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.hispida_10080 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.pisid.term.10064 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAGCGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.pisidica_10071 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.serratifolia_10073 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.taurica_10229 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAGCGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.taurica_10233 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CGACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.gulendam.10048 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.cond.cond.10058 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.trojana_3690 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.hololeuca_10089 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.cond.arg.10069 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.lib.linear.10057 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGAGCGGGGGCG---
S.huber.mor.10269 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAACGCCCGGCCGCCGCGGATCGGGGGCG---
stachys_wor_9936 GCGGAGCGGGGGAGACCCGGGACG---CGCGCCGAAC---CCGCCGGCG---
Stachys_FC01 -----CCGCCGGCG---
Marrubium_FC02 GCAGACC-GCGAACACGTTTACAGAAA---CAAC---CCCGGGCCCGGGTCCGGGGGGCAA

**

ClustalW'da hizalanmış ITS5A nrDNA dizisinin Veri Matrisi

```

S.rom.curv.FC0100      -----ACCCCGG-GACGCG---GCCG-----CG--C
S.mont.rem.FC0101      -----      CCCC-----CG--A
S.albiflora_10095      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.albiflora_10060      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.leptoc.10059         -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.leptoc.10268         -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.lib.lib.5186         -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.lib.lib.EA5324        -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.perfoliata_10088      -----ACCCCGC-GACGCG---GCAC-----CGGCC
S.cilicica_10225        -----ACCCCGC-GACGCG---GCAC-----CGGCC
S.perfoliata_10231      -----ACCCCGC-GACGCG---GCAC-----CGGCC
S.lib.lib.10265         -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.brevibrac.10173      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.brevibrac.10189      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.lycia_10062          -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.stricta_10061         -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.stricta_10065         -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.rubriflora_10093      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.eryth.cedr.10087      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.eryth.eryth.10067     -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.brevidens_10091      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.argyrea_10084         -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.germ.vir.10235        -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.amas.chor.5175B       -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.germ.germ.10236       -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.amas.amas.10232       -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.amas.chor.10234       -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.armeniaca_10228       -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.dichotoma_10238       -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.niveotom.10092        -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.vuralii_10090         -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.syri.nus.10266        -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.vulcanica_10094       -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.lib.kurdica_8635      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.serrat.caes.10227     -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.tmolea_10052          -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.galatica_10045        -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.perfoliata_5189        -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.perfoliata_EA5333     -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.perfoliata_5194        -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.lib.linear.10005      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.athoa_EA4248          -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.akmanii               -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.galatica_10047        -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.phrygia_10056         -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.cond.arg.10086         -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.congesta_10068        -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.scardica_EA5298       -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.lib.microc.8639       -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.phlomoides_10096      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.phlomoides_10226      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.aytacii_10267         -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.sipylea_10049         -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.bilgerana_10087       -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.ozturkii_10070        -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.lib.violas.10077      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.lib.violas.10190      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.lib.violas.10223      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.kirimerae_10063       -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.amas.karab.10237      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.hispida_10080         -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.pisid.term.10064      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.pisidica_10071        -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.serratifolia_10073    -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.taurica_10229         -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.taurica_10233         -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.gulendam.10048        -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.cond.cond.10058       -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.trojana_3690          -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.hololeuca_10089       -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.cond.arg.10069        -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.lib.linear.10057      -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
S.huber.mor.10269       -----ACCCCGC-GACGCG---GCCC-----CGGCC
stachys_wor_9936        -----      CTCGC-GCCGCG-----CGGGC
Stachys_FC01            -----      CCCC-GCCGCG-----CGGGC
Marrubium_FC02          CCCCCGCCCGAGGCACCGAATCCCGCCGCGCGCGCTCGCGCTCGCGCGTGGGGC
                                                                    * *
                                                                    **

```


ClustalW'da hizalanmış ITS5A nrDNA dizisinin Veri Matrisi

S.rom.curv.FC0100 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.mont.rem.FC0101 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.albiflora_10095 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.albiflora_10060 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.leptoc.10059 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.leptoc.10268 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.lib.lib.5186 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.lib.lib.EA5324 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.perfoliata_10088 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.cilicica_10225 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.perfoliata_10231 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.lib.lib.10265 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.brevibrac.10173 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.brevibrac.10189 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.lycia_10062 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.stricta_10061 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.stricta_10065 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.rubriflora_10093 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.eryth.cedr.10087 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.eryth.eryth.10067 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.brevidens_10091 TAAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.argyrea_10084 T-AAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.germ.vir.10235 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.amas.chor.5175B CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.germ.germ.10236 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.amas.amas.10232 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.amas.chor.10234 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.armeniaca_10228 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.dichotoma_10238 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.niveotom.10092 TAAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.vuralii_10090 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.syri.nus.10266 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.vulcanica_10094 TAAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.lib.kurdica_8635 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.serrat.caes.10227 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.tmolea_10052 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.galatica_10045 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.perfoliata_5189 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.perfoliata_EA5333 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.perfoliata_5194 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.lib.linear.10005 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.athoa_EA4248 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.akmanii CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.galatica_10047 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.phrygia_10056 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.cond.arg.10086 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.congesta_10068 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.scardica_EA5298 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.lib.microc.8639 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.phlomoides_10096 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.phlomoides_10226 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.aytacii_10267 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.sipylea_10049 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.bilgerana_10087 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.ozturkii_10070 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.lib.violas.10077 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.lib.violas.10190 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.lib.violas.10223 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.kirimerae_10063 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.amas.karab.10237 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.hispida_10080 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.pisid.term.10064 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.pisidica_10071 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.serratifolia_10073 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.taurica_10229 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.taurica_10233 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.gulendam.10048 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.cond.10058 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.trojana_3690 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.hololeuca_10089 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.cond.arg.10069 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.lib.linear.10057 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
S.huber.wor.10269 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
stachys_mor_9936 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
Stachys_FC01 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
Marrubium_FC02 CTAACGACTCTC-GGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
***** * ***** * * *****

ClustalW'da hizalanmış ITS5A nrDNA dizisinin Veri Matrisi

```

S.rom.curv.FC0100      TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.mont.rem.FC0101     TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.albiflora_10095     TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.albiflora_10060     TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.leptoc.10059        TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.leptoc.10268        TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.lib.lib.5186         TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.lib.lib.EA5324      TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.perfoliata_10088    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.cilicica_10225     TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.perfoliata_10231    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.lib.lib.10265       TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.brevibrac.10173    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.brevibrac.10189    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.lycia_10062         TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.stricta_10061      TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.stricta_10065      TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.rubriflora_10093   TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.eryth.cedr.10087   TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.eryth.eryth.10067  TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.brevirens.10091    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.argyrea_10084      TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.germ.vir.10235     TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.amas.chor.5175B    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.germ.germ.10236    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.amas.amas.10232    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.amas.chor.10234    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.armeniaca_10228    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.dichotoma_10238    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.niveotom.10092     TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.vuralii_10090      TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.syri.nus.10266     TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.vulcanica_10094    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.lib.kurdica_8635   TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.serrat.caes.10227  TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.tmolea_10052       TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.galatica_10045     TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.perfoliata_5189    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.perfoliata_EA5333  TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.perfoliata_5194    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.lib.linear.10005   TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.athoa_EA4248       TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.akmanii            TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.galatica_10047     TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.phrygia_10056      TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.cond.arg.10086     TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.congesta_10068     TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.scardica_EA5298    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.lib.microc.8639    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.phlomoides_10096  TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.phlomoides_10226  TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.aytacii_10267     TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.sipylea_10049     TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.bilgerana_10087   TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.ozturkii_10070    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.lib.violas.10077   TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.lib.violas.10190   TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.lib.violas.10223   TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.kirimerae_10063   TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.amas.karab.10237  TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.hispida_10080     TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.pisid.ter.10064   TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.pisidica_10071    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.serratifolia_10073 TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.taurica_10229     TCGGATACTTGGTGTG-TGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.taurica_10233     TCGGATACTTGGTGTG-TGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.gulendam.10048    TCGGATACTTGGTGGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.cond.cond.10058   TCGGATACTTGGTGTG-TGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.trojana_3690      TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.hololeuca_10089   TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.cond.arg.10069    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.lib.linear.10057  TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
S.huber.mor.10269   TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
stachys_wor_9936    TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
Stachys_FC01        TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
Marrubium_FC02      TCGGATACTTGGTGTG-AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTT
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```


ClustalW'da hizalanmış ITS5A nrDNA dizisinin Veri Matrisi

S.rom.curv.FC0100 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.mont.rem.FC0101 GCGCCCGAAGCCATC-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.albiflora_10095 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.albiflora_10060 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.leptoc.10059 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.leptoc.10268 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.lib.lib.5186 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.lib.lib.EA5324 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.perfoliata_10088 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.cilicica_10225 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.perfoliata_10231 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.lib.lib.10265 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.brevibrac.10173 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.brevibrac.10189 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.lycia_10062 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.stricta_10061 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.stricta_10065 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.rubriflora_10093 GCGCCCGAAGCCATC-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.eryth.cedr.10087 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.eryth.eryth.10067 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.brevidens_10091 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.argyrea_10084 GCGCC- GAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.germ.vir.10235 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.amas.chor.5175B GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.germ.germ.10236 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.amas.amas.10232 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.amas.chor.10234 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.armeniaca_10228 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.dichotoma_10238 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.niveotom.10092 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.vuralii_10090 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.syri.nus.10266 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.vulcanica_10094 GCGCCCGAAGCCATC-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.lib.kurdica_8635 GCGCCCGAAGCCATC-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.serrat.caes.10227 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.tmolea_10052 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.galatica_10045 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.perfoliata_5189 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.perfoliata_EA5333 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.perfoliata_5194 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.lib.linear.10005 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.athoa_EA4248 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.akmanii GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.galatica_10047 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.phrygia_10056 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.cond.arg.10086 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.congesta_10068 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.scardica_EA5298 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.lib.microc.8639 GCGCCCGAAGCCATC-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.phlomoides_10096 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.phlomoides_10226 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.aytacii_10267 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.sipylea_10049 GCGCCCGAAGCCATTAAGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.bilgerana_10087 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.ozturkii_10070 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.lib.violas.10077 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.lib.violas.10190 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.lib.violas.10223 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.kirimerae_10063 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.amas.karab.10237 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.hispida_10080 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.pisid.term.10064 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.pisidica_10071 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.serratifolia_10073 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.taurica_10229 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.taurica_10233 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.gulendam.10048 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.cond.cond.10058 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.trojana_3690 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.hololeuca_10089 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.cond.arg.10069 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.lib.linear.10057 GCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
S.huber.mor.10269 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
stachys_wor_9936 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
Stachys_FC01 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
Marrubium_FC02 GCGCCCGAAGCCATT-AGGCCGAGGGCAGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCC
***** ** * * * ***** ** * * * *

ClustalW'da hizalanmış ITS5A nrDNA dizisinin Veri Matrisi

```

S.rom.curv.FC0100      CCCCTCCCCCTCCAC-----GGGGGCGGGCG----GGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.mont.rem.FC0101     CCCCCTCCCCACGCCTCTCGGGGCGGGGGTGGGCG--TCGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.albiflora_10095     CC-TC-CCC-CCC---TCGCA---CGGGGGGGG-TG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.albiflora_10060     CC-TC-CCC-CCC---TCGCA---CGGGGGGGG-TG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.leptoc.10059        CC-CT-CCCACCC---TCGCA---CGGGGTGGG-TG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.leptoc.10268        CC-CT-CCCACCC---TCGCA---CGGGGTGGG-TG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.lib.lib.5186         CC-CT-CCCCCCCG-CTCGCG---CGGGGTGGG-TG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.lib.lib.EA5324       CC-CT-CCCCCCCG-CTCGCG---CGGGGTGGG-TG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.perfoliata_10088     CC-CT-CCCCCCCCGCTCGCG---CGGGGTGGG-TG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.cilicica_10225      CC-CT-CCCCCCCCGCTCGCG---CGGGGTGGG-TG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.perfoliata_10231     CC-CT-CCCCCCCCGCTCGCG---CGGGGTGGG-TG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.lib.lib.10265        CC-CT-CCCCCCCCGCTCGCG---CGGGGTGGG-TG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.brevibrac.10173     CC-CT-CCCCCCCCGCTCGCG---CGGGGTGGG-TG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.brevibrac.10189     CC-CT-CCCCCCCCGCTCGCG---CGGGGTGGG-TG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.lycia_10062         CC-TC-CCCCCG--CCCGCA---CGGGTGGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.stricta_10061       CC-TC-CCCCCG--CCCGCA---CGGGTGGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.stricta_10065       CC-TC-CCCCCG--CCCGCA---CGGGTGGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.rubriflora_10093    CC-TC-CCCCCG--CCCGCA---CGGGTGGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.eryth.cedr.10087    CC-CTCCCCCGCTCTCGCA---CGGGGCGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.eryth.eryth.10067  CC-CTCCCCCGCTCTCGCA---CGGGGCGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.breviidents_10091   CC-CCTCCCCCGCTCTCGCG---CGGGGGGGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.argyrea_10084       CC-CT--CCCACCGCCCGCA---CGGGGCGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.germ.vir.10235      CC-TTCCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-CGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.amas.chor.5175B     CC-CT-CCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-CGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.germ.germ.10236     CC-CT-CCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-CGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.amas.amas.10232     CC-CT-CCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-CGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.amas.chor.10234     CC-CT-CCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-CGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.armeniaca_10228     CC-CT-CCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-CGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.dichotoma_10238    CC-CT-CCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-CGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.niveotom.10092      CC-CT-CCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-TGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.vuralii_10090       CC-CT-CCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-TGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.syri.nus.10266      CC-CT-CCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-CGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.vulcanica_10094     CC-CT-CCCCCGCTCTCGCA---CGGGG-CGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.lib.kurdica_8635    CC-CT-CCCCCGCTCTCGCA---CGGGG-CGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.serrat.caes.10227  CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-GGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.tmolea_10052        CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-TGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.galatica_10045      CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-CGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.perfoliata_5189     CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGGGTGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.perfoliata_EA5333   CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGGGTGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.perfoliata_5194     CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGGGTGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.lib.linear.10005    CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-TGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.athoa_EA4248        CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-TGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.akmanii             CC-CTCCCCCG--CTCGCA---CGGGG-TGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.galatica_10047      CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-CGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.phrygia_10056       CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-TGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.cond.arg.10086      CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-TGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.congesta_10068      CC-CTCCCCCGCTCTCGCA---CGGGG-CGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.scardica_EA5298     CC-CTCCCCCGCTCTCGCA---CGGGG-CGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.lib.microc.8639     CC-CTCCCCCGCTCTCGCA---CGGGG-CGGGCG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.phlomoides_10096    CC---CTCCACCCCTCGCA---CGGG-GTGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.phlomoides_10226   CC---CTCCACCCCTCGCA---CGGG-GTGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.aytaaii_10267      CC---CTCCACCCCTCGCA---CGGG-GTGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.sipylea_10049       CCTCCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GTGTGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.bilgerana_10087    CC--CTCCTCCCCCTCGCG---CGGG-GCGGGTG--GCCGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.ozturkii_10070     CCCCCTCCCCCGCTCTCGCA---CGGG-GTGGGCG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.lib.violas.10077    CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GTGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.lib.violas.10190    CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GTGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.lib.violas.10223    CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GTGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.kirimerae_10063    CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GTGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.amas.karab.10237   CC-CTCCCCCG--GTCTCGCG---CGGGTGGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.hispida_10080       CC-TCTCCTCCCCCTCGCG---CGGG-GCGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.pisid.term.10064   CC-CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GTGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.pisidica_10071     CC-CT-CCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GTGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.serratifolia_10073 CC--CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GTGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.taurica_10229       CC--CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GCGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.taurica_10233       CC--CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GCGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.gulendam.10048     CC--TTCCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GCGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.cond.cond.10058     CC--CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GCGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.trojana_3690        CC--CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GCGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.hololeuca_10089    CC--CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GCGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.cond.arg.10069      CC--CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GCGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.lib.linear.10057    CC--CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGG-GTGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
S.huber.mor.10269    CC--CTCCCCCGCTCTCGCG---CGGGG-CGGGTG--CGGGGCGGAGATTGGCCCCCC
stachys_wor_9936     CC---TCCCCCGCTCTCGGG-----GGGCG--TCGGGCGGAGATTGGCCCCCC
Stachys_FC01         CCCCACGCCCCCGACACGGG---GGGCGCCGGGA---GGGCGGAGATTGGCCCCCC
Marrubium_FC02       CC---TCCCC-----CGCG-----GGGTG---GGGGCGGAGATTGGCCCCCC
**                  *                  *****

```

ClustalW'da hizalanmış ITS5A nrDNA dizisinin Veri Matrisi

S.rom.curv.FC0100 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACACGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.mont.rem.FC0101 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACACGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.albiflora_10095 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.albiflora_10060 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.leptoc.10059 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.leptoc.10268 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.lib.lib.5186 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.lib.lib.EA5324 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.perfoliata_10088 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.cilicica_10225 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-TGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.perfoliata_10231 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.lib.lib.10265 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.brevibrac.10173 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.brevibrac.10189 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.lycia_10062 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.stricta_10061 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.stricta_10065 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.rubriflora_10093 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.eryth.cedr.10087 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.eryth.eryth.10067 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.brevidens_10091 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.argyrea_10084 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.germ.vir.10235 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.amas.chor.5175B GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.germ.germ.10236 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.amas.amas.10232 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.amas.chor.10234 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.armeniaca_10228 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.dichotoma_10238 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.niveotom.10092 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.vuralii_10090 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.syri.nus.10266 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.volcanica_10094 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.lib.kurdica_8635 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.serrat.caes.10227 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.tmolea_10052 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.galatica_10045 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.perfoliata_5189 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.perfoliata_EA5333 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.perfoliata_5194 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.lib.linear.10005 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.athoa_EA4248 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.akmanii GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.galatica_10047 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.phrygia_10056 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.cond.arg.10086 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.congesta_10068 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.scardica_EA5298 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.lib.microc.8639 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.phlomoides_10096 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.phlomoides_10226 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.aytacii_10267 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.sipylea_10049 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.bilgerana_10087 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.ozturkii_10070 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.lib.violas.10077 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.lib.violas.10190 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.lib.violas.10223 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.kirimerae_10063 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.amas.karab.10237 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.hispida_10080 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.pisid.ter.10064 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.pisidica_10071 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.serratifolia_10073 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.taurica_10229 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.taurica_10233 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.gulendam.10048 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.cond.cond.10058 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.trojana_3690 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.hololeuca_10089 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.cond.arg.10069 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.lib.linear.10057 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

S.huber.mor.10269 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

stachys_wor_9936 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

Stachys_FC01 GTGCGCA-GCGAT-GCGC-GCGGCC-GGCCCAAACCCGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

Marrubium_FC02 GTGCGCGCACGTCCGCCCGCGGCC-GGCCCAAATCGGAATCCGCCGTCGACGCAGC---

***** * **** * * * ***** * ***** * * * * *

ClustalW'da hizalanmış ITS5A nrDNA dizisinin Veri Matrisi

```

S.rom.curv.FC0100      GCC--GGCCGGGAGACGAAA--CGAACCCGGA--GGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.mont.rem.FC0101    GCC--GGAACGGAGACGAAC--CGAACCCCAACGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.albiflora_10095    GCC--GGCCCGGAGAG-A---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.albiflora_10060    GCC--GGCCCGGAGAG-A---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.leptoc.10059       GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.leptoc.10268       GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.lib.lib.5186        GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.lib.lib.EA5324      GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.perfoliata_10088   GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.cilicica_10225     GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.perfoliata_10231   GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.lib.lib.10265      GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.brevibrac.10173    GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.brevibrac.10189    GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.lycia_10062        GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.stricta_10061      GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.stricta_10065      GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.rubriflora_10093   GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--AGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.eryth.cedr.10087   GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.eryth.eryth.10067 GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.brevirens_10091    GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.argyrea_10084      GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGTACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.germ.vir.10235     GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.amas.chor.5175B    GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.germ.germ.10236    GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.amas.amas.10232    GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.amas.chor.10234    GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.armeniaca_10228    GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.dichotoma_10238   GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.niveotom.10092     GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.vuralii_10090     GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.syri.nus.10266     GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.vulcanica_10094    GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCGA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.lib.kurdica_8635   GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCGA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.serrat.caes.10227 GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.tmolea_10052       GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGTACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.galatica_10045     GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.perfoliata_5189    GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.perfoliata_EA5333  GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.perfoliata_5194    GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGTACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.lib.linear.10005   GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.athoa_EA4248      GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.akmanii            GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.galatica_10047     GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.phrygia_10056      GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGTACCCGA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.cond.arg.10086     GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.congesta_10068     GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.scardica_EA5298    GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.lib.microc.8639    GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGTACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.phlomoides_10096  GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.phlomoides_10226  GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGTACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.aytacii_10267     GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGTACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.sipylea_10049     GCC--GGCCCGGAGAGGA---AAGGACCCAAACGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.bilgerana_10087   GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGCACCCAAACGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.ozturkii_10070    GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCGA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.lib.violas.10077   GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.lib.violas.10190   GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.lib.violas.10223   GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.kirimerae_10063   GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.amas.karab.10237  GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.hispida_10080      GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGCACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.pisid.term.10064  GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.pisidica_10071    GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.serratifolia_10073 GCC--GGCCCGGAGAGGA---CGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.taurica_10229     GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.taurica_10233     GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.gulendam.10048    GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.cond.10058         GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCGA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.trojana_3690       GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAAACGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.hololeuca_10089   GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAAACGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.cond.arg.10069     GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCGA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.lib.linear.10057   GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAAAC--GGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
S.huber.mor.10269   GCC--GGCCCGGAGAGGA---AGGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACA
stachys_wor_9936    GTC--GGTCCGGAGACGA---GAACCCCAACGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
Stachys_FC01        GTC--GGTCCGGAGACTTGG--CAGACCCAA--CGGAGCGATCGC--GAATC--GCGCCC--ACG
Marrubium_FC02      GTC--GGTCCGGAACACGAAACGCAACCCAAACGGCGGAGCAC--GCATC--GTGCCC--ACG
* * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *

```

ClustalW'da hizalanmış ITS5A nrDNA dizisinin Veri Matrisi

```

S.rom.curv.FC0100      A-CCGCGACCCC-AGGTCAGGC--GGATCACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAT-
S.mont.rem.FC0101    A-CCGCGACCCC-AGGTCCAGCCGGGATCACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAT-
S.albiflora_10095    ACC-GCGACCCC-AGTTC-AG-----
S.albiflora_10060    ACC-GCGACCCC-AGTTC-AGG-----
S.leptoc.10059       ACC-GCGACCCC-AGGTC-AGGCGGGATCACCCGCTGAGTTT-----
S.leptoc.10268       ACC-GCGACCCC-AGGTC-AGGCGGGATCACCCGCTGAG-----
S.lib.lib.5186        ACC-GCGACCCC-AGGTC-AGGCGGGATCACCCGCTGAGTA-----
S.lib.lib.EA5324      ACC-GCGACCCC-AGGTC-AGGCGGGATCACCCGCTGAGTTAA-----
S.perfoliata_10088   ACC-GCGACCCC-AGGTC-AGGCGGGATCACCCGCTGAGTTAA-----
S.cilicica_10225     ACC-GCGACCCC-AGGTC-AGGCGGGATCACCCGCTGAGTTAA-----
S.perfoliata_10231   ACC-GCGACCCC-AGGTC-AGGCGGGATCACCCGCTGAGTTAA-----
S.lib.lib.10265       ACC-GCGACCCC-AGGTC-AGGCGGGATCACCCGCTGAG-----
S.brevibrac.10173    ACC-GCGACCCC-AGGTCCAGGCGGGATCACCCGCTGAG-----
S.brevibrac.10189    ACC-GCGACCCC-AGGTCCAGGCGGGATCACCCGCTGAG-----
S.lycia_10062        ACC-GCGACCCC-AGGTC-AGG-----
S.stricta_10061      ACC-GCGACCCC-AGGTC-AGG-----
S.stricta_10065      ACC-GCGACCCC-AGGTC-AGGCGGGATCACCC-----
S.rubriflora_10093   ACCGCGACCCC-AGGTC-AGGCGGGAT-----
S.eryth.cedr.10087   ACC-GCGACCCC-AGGTC-AGGCGGGATCACCCG-----
S.eryth.eryth.10067 ACC-GCGACCCC-AGGTC-----
S.brevioidens_10091 ACC-GCGACCCC-AGGTC-AGGCGGG-----
S.argyrea_10084      ACC-GCGACCCC-AGGTC-AGGCGCT-----
S.germ.vir.10235     A-CCGCGACCCC--AGTCA-GGCGGGATCACCCGCTG-----
S.amas.chor.5175B    A-CCGCGACCCA--GGTCA-GGCGGGATCACCCGCTGAGTTA-----
S.germ.germ.10236    A-CCGCGACCCC--AGTCA-GGCG-----
S.amas.amas.10232    A-CCGCGACCCCAGGTCA-GGGC-----
S.amas.chor.10234    A-CCGCGACCCC-AGGTCA-G-----
S.armeniaca_10228    A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCACCCGCTGAGTTTAAGCATATCA--
S.dichotoma_10238   A-CCGCGACCCC-CAGTCA-GGCGGGATCACCCGCTGAG-----
S.niveotom.10092     A-CCGCGACCCC-AGGTCA-G-----
S.vuralii_10090      A-CCGCGACCCC-AGGTC-----
S.syri.nus.10266     A-CCGCGACCCC-AGGTCC-AGGCGGGGAATCA-----
S.vulcanica_10094    A-CCGCGACCCC-A-----
S.lib.kurdica_8635   A-CCGCGACCCC-AGTCAG-GCCGGATCA-----
S.serrat.caes.10227 A-CCGCGACCCC-AGGTCA-G-----
S.tmolea_10052       A-CCGCGACCCC-AG-TCA-GG-----
S.galatica_10045     A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATC-----
S.perfoliata_5189    A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCACCCGCTGAGTTT-----
S.perfoliata_EA5333  A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GG-----
S.perfoliata_5194    A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCACCCGCTGAGTTTA-----
S.lib.linear.10005   A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGG-----
S.athoa_EA4248       A-CCGCGACCCC-AGTTCA-GGC-----
S.akmanii            A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCACCCGCTGAGTTTAAGCATATCA--
S.galatica_10047     A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCACCCG-----
S.phrygia_10056      A-CCGCGACCCC-AGTTCA-GGGGGATCACCC-----
S.cond.arg.10086     A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GG-----
S.congesta_10068     A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCACCC-----
S.scardica_EA5298    A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCACCCGCTGAGTTTAAGCAATATCAA
S.lib.microc.8639    A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GG-----
S.phlomoides_10096  A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCAACCCTGAG-----
S.phlomoides_10226  A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCAACCCTGAG-----
S.aytacii_10267     A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCA-CCCGCTG-----
S.sipylea_10049      A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATC-----
S.bilgerana_10087   AACCGGACCCCCAGGTCAAGGCGGG-----
S.ozturkii_10070    A-CCGCGACCCC--AGTCAGGGGG-----
S.lib.violas.10077   A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCACCC-----
S.lib.violas.10190   A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCACCCGCT-----
S.lib.violas.10223   A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCACCCCGC-----
S.kirimerae_10063   A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGC-----
S.amas.karab.10237  A-CCGCGACCCCAGGTCA-GGCGGGATCACCCGCTG-----
S.hispida_10080      A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGC-----
S.pisid.term.10064   A-CCGCGACCCC-AGTCCA-GGCGG-----
S.pisidica_10071    A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GG-----
S.serratifolia_10073 A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGG-----
S.taurica_10229      A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCG-----
S.taurica_10233     A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCACCCGCTG-----
S.gulendam.10048    A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGG-----
S.cond.cond.10058    A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCACCCGCTGAGTTTAAGCATATCT--
S.trojana_3690       A-CCGCGACCCC-AGGTCA-----
S.hololeuca_10089   A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GG-----
S.cond.arg.10069     A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCAC-----
S.lib.linear.10057   A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCACCC-----
S.huber.mor.10269   A-CCGCGACCCC-CAGTCA-GGGGGAATAACCCG-----
stachys_wor_9936    A-CCGCGACCCC--AGTCA-----
Stachys_FC01         A-CCGCGACCCC-AGGTCA-GGCGGGATCACCCGCTGAGTTTAAGCATATC---
Marrubium_FC02      A-CCGCGACCCC--AGTCAG-----
* * * * *

```