

**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN *CARLINA* L. (*ASTERACEAE*, *CARDUEAE*) TÜRLERİNİN
MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER FİLOGENETİK ANALİZİ**

DOKTORA TEZİ

Berna SANÖN

Balıkesir, Eylül 2011

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TÜRKİYE'DE YETİŞEN *CARLINA* L. (*ASTERACEAE*, *CARDUEAE*) TÜRLERİNİN
MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER FİLOGENETİK ANALİZİ

DOKTORA TEZİ

Berna SANÖN

Balıkesir, Eylül 2011

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TÜRKİYE'DE YETİŞEN *CARLINA L. (ASTERACEAE, CARDUEAE)*
TÜRLERİNİN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER FİLOGENETİK ANALİZİ

DOKTORA TEZİ

Berna SANÖN

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Bayram YILDIZ

2. Danışman: Yrd.Doç.Dr. Fatih ÇOŞKUN

Sınav Tarihi: 14.09.2011

Jüri Üyeleri: Prof.Dr. Bayram YILDIZ

Prof.Dr. Ali DÖNMEZ

Prof.Dr. Gülendir TÜMEN

Prof.Dr.A.Dilek AZAZ

Doç.Dr. Tuncay DİRMENÇİ

Yrd.Doç.Dr. Fatih ÇOŞKUN (Eş Danışman)

Yrd.Doç.Dr. İsmet BAŞARAN

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

Balıkesir, Eylül 2011

Bu doktora tez çalışması BAP 2011- 58 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

TÜRKİYE'DE YETİŞEN *CARLINA* L. (*ASTERACEAE*, *CARDUEAE*) TÜRLERİNİN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER FİLOGENETİK ANALİZİ

Berna SANÖN

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

(Doktora Tezi / Tez Danışmanı: Prof.Dr. Bayram YILDIZ)

2.Danışman: Yrd.Doç.Dr. Fatih Çoşkun)

Balıkesir, 2011

Asteraceae bir bitki grubu olarak; doğal kimyası, çiçeklenme morfolojisi, habitata adaptasyonu ile kozmopolit bir familyadır. Birçok taksonomik ve yeni moleküler filogenetik çalışmalar olmasına rağmen, Asteraceae familyasının kökeni tamamen tanımlanamamıştır. Çalışma materyali olan *Carlina* L. cinsi *Asteraceae* familyasının *Carduoideae* subfamilyasının *Cardueae* tribusuna dahildir. *Cardueae* tribusu tartışmalı bir gruptur ve geleneksel sınıflamada 4 alttribus'a (*Echinopsidinae*, *Carlininae*, *Carduinae* ve *Centaurenae*) ayrılır. *Carlina* cinsi Türkiye Florasında *C. lanata*, *C. vulgaris*, *C. tragacanthifolia*, *C. biebersteinii*, *C. intermedia*, *C. oligocephala*, *C. involucrata* subsp. *libanotica*, *C. corymbosa*, *C. graeca* türleriyle temsil edilmektedir.

Bu çalışmada Fenol-Kloroform-İzoamilalkol metodu kullanılarak, Türkiye'deki *Carlina* taksonları iç grup olarak ve *Atractylis*, *Cardopatium* ve *Carthamus* taksonları dış grup olarak seçilerek DNA izolasyonu yapıldı. Literatürde sıklıkla kullanılan güvenilirliği kanıtlanmış ITS (Internal Transcribed Spacer) nükleer ribozomal DNA (nrDNA) bölgesinin dizileri ve *trnL-F* (Transfer Kloroplast'ın tRNA'larını kodlayan L-F bölgesi) bölgesinin dizilerinin moleküler işaretleyici olarak kullanımıyla *Carlina* cinsine ait Türkiye de yetişen taksonlarının morfolojik ve moleküler filogenetik analizi yapıldı. Yapılan filogenetik analiz için elde edilen dizilerin işlenmesinde Sequencher 4.10.1 programı, dizilerin hizalanmasında ClustalW programı ve filogenetik analiz için PAUP 4.0b10 programı kullanılmıştır. Karakter temelli yöntemlerden Maksimum Parsimoni kriteri kullanılarak Heuristic araştırma yapılmıştır ve ortak karar uyumluluk (konsensus) ağaçları oluşturulmuştur. Yine parsimoni kriteri kullanılarak Bootstrap analizi yapılmıştır. Mesafe temelli yöntemlerden ise UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average) ve NJ (Neighbour Joining) analizleri yapılmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda; *Carlina*, *Cardopatium* ve *Atractylis* cinsleri *Carlininae* alt tribusuna da yer almıştır. Elde edilen veriler bu çalışmalarını desteklemektedir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: *Asteraceae:Cardueae*/ ITS/ *trnL-F*/ morfoloji/ filogenetik analiz

ABSTRACT

MORPHOLOGY AND MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE TAXA BELONGING TO THE GENUS *CARLINA* L.(*ASTERACEAE*,*CARDUEAE*) IN TURKEY

Berna SANÖN

Balıkesir University, Institute of Science, Department of Biology

(Ph.D. Thesis / Supervisor: Prof.Dr.Bayram YILDIZ

Second Supervisor:Asist.Prof.Dr. Fatih Coşkun)

Balıkesir-Turkey, 2011

Asteraceae, as a plant group, is a cosmopolitan family in terms of natural chemistry, flowering morphology, and adaptation to habitat. Even if there are numerous taxonomic and new molecular phylogenetic studies, the ancestors of the *Asteraceae* family are not well defined. Study material under consideration, *Carlina* L., is a member of the tribe *Cardueae* which belong to *Carduoideae* subfamily of the *Asteraceae*. The tribe *Cardueae* is a group still debated and according to traditional classification it can be divided into 4 subtribes (*Echinopsidinae*, *Carlininae*, *Carduinae* and *Centaurenae*). The genus *Carlina* is represented by the species in The Flora of Turkey and The East Aegean Island as *C. lanata*, *C. vulgaris*, *C. tragacanthifolia*, *C. biebersteinii*, *C. intermedia*, *C. oligocephala*, *C. involucrata* subsp. *libanotica*, *C. corymbosa*, *C. graeca*.

DNA Isolation was performed using phenol- chloroform- isoamylalcohol, selecting *Carlina* as ingroup taxa and *Cardopatum*, *Atractylis* and *Carthamus* as outgroup taxa ITS (Internal Transcribed Region) of the nuclear ribosomal DNA(nrDNA) and the *trnL-F* (Transfer RNA coding) region of the chloroplast DNA sequences which were used as molecular markers, taxa belonging to the genus *Carlina* distributed in Turkey were analyzed morphologically and molecular phylogenetically. Before the phylogenetic analysis, DNA sequences were aligned using the sequences 4.10.1 the sequences were aligned using the ClustalW and the phylogenetic analysis was performed using the PAUP 4.0b10 software. The character based method parsimony was used as the criterion with a heuristic search option and the Maximum Parsimony criterion was based on the character and the public by using Heuristic methods to research decision (consensus) trees was created. Again using the Bootstrap analysis have been made to the criterion of parsimony. Distance-based methods, the UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Average) and NJ (Neighbour Joining) analyses were made. In studies done before *Carlina*, *Cardopatum* ve *Atractylis* has taken *Carlininae* subtribus. The work of resulting data support it.

KEYWORDS:*Asteraceae: Cardueae/ITS/trnL-F/morphology/phylogenetic analysis*

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER.....	ii
ABSTRACT, KEY WORD	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
1.GİRİŞ	1
1.1 Asteraceae Familyası ile İlgili Genel Bilgiler.....	5
1.1.1 Asteraceae Familyası'nın Genel Özellikleri.....	5
1.1.2 <i>Carlina</i> L. Taksonlarının Yayılışı.....	6
1.1.3 Çalışılan Taksonların Etnobotanik Özellikleri.....	9
1.2 Moleküler Çalışmalar.....	11
1.2.1 Moleküler Belirteçler (Markırlar).....	11
1.2.1.1 Hibridizasyona Dayalı Markırlar.....	12
1.2.1.1.1 RFLP Kesme Fragment Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Lengt Polymorphism).....	12
1.2.1.2 PCR Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)'na bağlı markırlar	13
1.2.1.2.1 RAPD Rasgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı (Random Amplification of Polymorphic DNA)	15
1.2.1.2.2 AFLP Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Lengt Polymorphism),	16
1.2.1.2.3 SSR Mikrosatellit DNA Analizi (Short Sequence Repeats) (Basit Sıra Tekrarları).....	17
1.2.1.2.4 VNTR Mini satellitler (Variable Number Tandem Repeat)	18
1.2.1.2.5 Mikroarray.....	18
1.2.1.2.6 SSCP Tek zincir konformasyonel polimorfizm (Single Strand Conformational Polymorphism).....	19
1.2.1.3 EST's DNA markırları.....	20
1.2.2 ITS İnternal Ara Bölgeler (Internal Transcribed Spacers)	20
1.2.2.1 ITS'nin Genel Özellikleri.....	22
1.2.2.2 rDNA Çoklu Gen Ailesinin Fonksiyonel Sınırları ve Evrimi.....	23

	<u>Sayfa</u>
1.2.2.3 ITS'in Taksonomide Tercih Edilmesinin Nedenleri.....	25
1.2.2.4 ITS'in Taksonomik Seviyelerde Kullanımı.....	25
1.2.3 rDNA Bölgeleri.....	27
1.2.3.1 Küçük Alt Birim rDNA (18S).....	27
1.2.3.2 5.8S rDNA.....	27
1.2.3.3 Büyük Alt Birim rDNA (28S).....	27
1.2.4 <i>trnL-F</i> Transfer Kloroplast'ın tRNA'larını kodlayan L-F Bölgesi.....	28
1.2.5 Moleküler Filogenide Kullanılan DNA Çeşitleri.....	30
1.2.5.1 Mitokondrial DNA (mtDNA).....	30
1.2.5.2 Kloroplast DNA'sı (cpDNA).....	30
1.2.5.3 Çekirdek DNA'sı (nrDNA).....	31
1.2.6 DNA Dizileme.....	31
1.2.6 Agaroz Jel Elektrofrez (AGE).....	33
1.2.8 Otomatik DNA Dizi Analizi.....	34
1.2.9 Çoklu Dizi Hizalama ve Clustal W Programı.....	34
1.2.10 Filogenetik Analiz.....	35
1.2.10.1 Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler.....	35
1.2.10.1.1 Karakter Temelli Yöntemler.....	36
1.2.10.1.1.1 Maximum Parsimoni. (MP) Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi.....	36
1.2.10.1.1.2 Maximum Olasılık (ML) Metodu-En Yüksek İhtimal.....	37
1.2.10.1.1.3 Bayes Metodu.....	38
1.2.10.1.1 Mesafe Temelli Yöntemler.....	39
1.2.11 Filogenetik Ağaçların Oluşturulmasında Kullanılan Programlar.....	39
1.2.11.1 PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony).....	40
1.2.11.2 Mr. Bayes (Bayesian Inference of Phylogeny).....	41
1.2.11.3 PHYLIP (The Phylogeny Inference Package).....	41
2. MATERYAL METOD.....	43
2.1 Morfolojik Çalışmalar.....	43
2.1.1 Arazi Çalışması.....	43
2.1.2 Morfolojik Çalışma.....	44
2.2 Moleküler Sistemik Çalışmalar.....	44
2.2.1 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlaması.....	45
2.2.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	45
2.2.3 Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar.....	45
2.2.4 PCR Reaksiyonunda Kullanılan Kimyasallar.....	46
2.2.5 Agaroz Jel Elektrofrez Tamponları.....	47
2.3 Yöntem.....	48
2.3.1 DNA İzolasyonu.....	48
2.3.1.1 Fenol- Kloroform-İzoamilalkol Protokolü.....	48
2.3.2 DNA Saflık ve Miktar Tayini.....	49
2.3.3 PCR Analizleri.....	50
2.3.3.1 Kullanılan PCR Programları.....	50
2.3.4 Agaroz Jel Elektrofrez.....	51
2.3.5 DNA Dizilerinin Belirlenmesi.....	52

	<u>Sayfa</u>
2.3.6 DNA'nın Filogenetik ve Fenetik Analizi.....	52
3. BULGULAR.....	55
3.1 Morfolojik Bulgular.....	55
3.1.1 <i>Carlina</i> L.Cinsinin Genel Özellikleri.....	55
3.1.2 Tür Ayırım Anahtarı.....	55
3.1.3 Türlerin Betimleri ve Yayılış Alanları.....	57
3.1.3.1 <i>Carlina traganthifolia</i> Klatt	57
3.1.3.2 <i>Carlina corymbosa</i> L.	58
3.1.3.3 <i>Carlina graeca</i> Heldr. & Sart.	63
3.1.3.4 <i>Carlina oligocephala</i> Boiss. & Kotschy	66
3.1.3.5 <i>Carlina involucrata</i> (Boiss.) subsp. <i>libanotica</i> Meusel & Kästner	71
3.1.3.6 <i>Carlina lanata</i> L.	74
3.1.3.7 <i>Carlina vulgaris</i> L.	78
3.1.3.8 <i>Carlina intermedia</i> Schur	81
3.1.3.9 <i>Carlina biebersteinii</i> Bernh. ex Hornem.	84
3.1.3.10 <i>Carlina</i> sp.(BY16509).....	87
3.1.4 Filogenetik Analiz için Kullanılan Morfolojik Karakterler.....	89
3.2 Moleküler Bulgular.....	93
3.2.1 ITS ve <i>trnL-F</i> Dizilenmesi.....	93
3.2.2 Dizilerin Filogenetik Analizi.....	94
3.2.2.1 Temel Veri Setleri.....	95
3.2.2.1.1 Morfolojik Karakterlere Dayalı Yapılan PAUP Analizi.....	95
3.2.2.1.2 ITS Sonuçlarına Dayalı Yapılan PAUP Analizi.....	101
3.2.2.1.3 <i>trnL-F</i> Sonuçlarına Dayalı Yapılan PAUP Analizi.....	109
3.2.2.2 Birleştirilmiş Veri Setleri.....	115
3.2.2.2.1 ITS ve <i>trnL-F</i> Sonuçlarına Dayalı Yapılan PAUP Analizi.....	115
3.2.2.2.2 Morfoloji ve ITS Sonuçlarına Dayalı Yapılan PAUP Analizi.....	121
3.2.2.2.3 Morfoloji ve <i>trnL-F</i> Sonuçlarına Dayalı Yapılan PAUP Analizi.....	128
3.2.2.2.4 Morfoloji, ITS ve <i>trnL-F</i> Sonuçlarına Dayalı Yapılan PAUP Analizi.....	134
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	140
4.1 Temel Veri Setleri.....	142
4.1.1 Morfolojik Karakterlere Dayalı Yapılan Filogenetik Analiz.....	142
4.1.2 ITS Sonuçlarına Dayalı Yapılan Filogenetik Analiz	146
4.1.3 <i>trnL-F</i> Sonuçlarına Dayalı Yapılan Filogenetik Analiz	149
4.2 Birleştirilmiş Veri Setleri.....	152
4.2.1 ITS ve <i>trnL-F</i> Sonuçlarına Dayalı Yapılan Filogenetik Analiz	152
4.2.2 Morfoloji ve ITS Sonuçlarına Dayalı Yapılan Filogenetik Analiz	154
4.2.3 Morfoloji ve <i>trnL-F</i> Sonuçlarına Dayalı Yapılan Filogenetik Analiz	157
4.2.4 Morfoloji, ITS ve <i>trnL-F</i> Sonuçlarına Dayalı Yapılan Filogenetik Analiz	159

EKLER

KAYNAKLAR

KISALTMA LİSTESİ

<u>Adı</u>	<u>Tanımı</u>
L.	Linnaeus
C.	<i>Carlina</i>
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
nrDNA	Nüklear Ribozomal DNA
mtDNA	Mitokondri DNA'sı
cpDNA	Kloroplast DNA'sı
bp	Base Pair =baz çifti
ITS	Internal Transcribed Spacer
dH ₂ O	Distile Su
dNTP	Deoksiribonükleosid trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetraasetikasit
EtBr	Etidyum bromür
gDNA	Genomik DNA
PAUP	Phylogenetic Analysis Using Parsimony
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SSCP	Single Strand Conformational Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Trisboratetilendiamintetraasetikasit
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages
UV	Ultraviyole
VNTR	Variable Numbers of Tandem Repeat
ETS	External Transcribed Spacer
NaAc	Sodyum Asetat
TE	Tris – EDTA
EtOH	Etanol
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum Sülfat
T _m	Erime sıcaklıkları
NJ	Neighbour Joining
ddNTP	Dideoksiribonükleosid Trifosfat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
MP	Maximum Parsimony
ML	Maximum Likelihood
rpm	Revolutions Per Minute
PHYLIP	The Phylogeny Inference Package

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u> <u>Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1	<i>Carlina</i> L. Taksonlarının Dünyadaki Yayılışı.....	7
Şekil 1.2	<i>Carlina</i> L. Taksonlarının Türkiye'deki Yayılışı.....	8
Şekil 1.3	PCR Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Aşamaları.....	15
Şekil 1.4	RAPD Analizinin Aşamaları.....	15
Şekil 1.5	AFLP Metodunun Çalışma Sistemi.....	16
Şekil 1.6	DNA Üzerindeki ITS Bölgeleri.....	21
Şekil 1.7	ITS primerlerinin rDNA Üzerindeki Bağlanma Bölgeleri.....	21
Şekil 1.8	DNA Baz Dizisi Üzerinde <i>trnL-F</i> Bölgeleri.....	29
Şekil 1.9	DNA Dizi Analizinin Farklı Yöntemlerinin Şematize Gösterilmesi.....	32
Şekil 1.10	Dizi Analizi Sonucu Oluşan Piklerin Görüntüsü.....	34
Şekil 3.1	<i>Carlina corymbosa</i> L.'nin Türkiye'deki Yayılışı.....	60
Şekil 3.2	<i>Carlina corymbosa</i> L.'nin Tip Örneği.....	61
Şekil 3.3	<i>Carlina corymbosa</i> L.'nin Genel Görünümü.....	62
Şekil 3.4	<i>Carlina graeca</i> Heldr. & Sart.'nin Türkiye'deki Yayılışı.....	64
Şekil 3.5	<i>Carlina graeca</i> Heldr. & Sart.'nin Genel Görünümü.....	65
Şekil 3.6	<i>Carlina oligocephala</i> Boiss. & Kotschy subsp. <i>oligocephala</i> 'nın Türkiye'deki Yayılışı.....	68
Şekil 3.7	<i>Carlina oligocephala</i> Boiss. & Kotschy subsp. <i>oligocephala</i> 'nın Genel Görünümü.....	69
Şekil 3.8	<i>Carlina oligocephala</i> Boiss. & Kotschy subsp. <i>pallescens</i> (Wettst.) Meusel & Kästner.'nin Türkiye'deki Yayılışı.....	70
Şekil 3.9	<i>Carlina involucrata</i> Poiret subsp. <i>libanotica</i> (Boiss.) Meusel & Kästner.'nin Türkiye'deki Yayılışı.....	72
Şekil 3.10	<i>Carlina involucrata</i> Poiret subsp. <i>libanotica</i> (Boiss.) Meusel & Kästner.'nin Genel Görünümü.....	73
Şekil 3.11	<i>Carlina lanata</i> L.'in Türkiye'deki Yayılışı.....	75
Şekil 3.12	<i>Carlina lanata</i> L.'nin Tip Örneği.....	76
Şekil 3.13	<i>Carlina lanata</i> L.'nin Genel Görünümü.....	77
Şekil 3.14	<i>Carlina vulgaris</i> L. 'in Türkiye'deki Yayılışı.....	79
Şekil 3.15	<i>Carlina vulgaris</i> L. 'in Genel Görünümü.....	80
Şekil 3.16	<i>Carlina intermedia</i> Schur.'nin Türkiye'deki Yayılışı.....	82
Şekil 3.17	<i>Carlina intermedia</i> Schur.'nin Genel Görünümü.....	83
Şekil 3.18	<i>Carlina biebersteinii</i> Bernh. ex Hornem.'nin Türkiye'deki Yayılışı.....	85
Şekil 3.19	<i>Carlina biebersteinii</i> Bernh. ex Hornem.'nin Genel Görünümü.....	86
Şekil 3.20	<i>Carlina</i> sp.(BY16509)'nin Türkiye'deki Yayılışı.....	87
Şekil 3.21	<i>Carlina</i> sp.(BY16509)'nin Genel Görünümü.....	88
Şekil 3.22	<i>C. graeca</i> ve <i>C. biebersteinii</i> türlerinin <i>trnL-F</i> PCR Ürünlerinin (450bp) Jel Fotoğrafı (49,51,52 °C'de farklı sıcaklık aralıklarında)	

	<u>Sayfa</u>
ve $1,10^{-1},10^{-2}, 10^{-3}$ farklı yoğunluk konsantrasyonları).....	93
Şekil 3.23 Farklı Lokalitelerden Alınan <i>C. oligocephala</i> , <i>C. involucrata</i> Türleri ve <i>Carthamus dentatus</i> 'un (farklı konsantrasyonları ($10^{-1},10^{-2}$) ITS PCR Ürünlerinin (700bp) Jel Fotoğrafi.....	93
Şekil 3.24 <i>C. oligocephala</i> , <i>C. involucrata</i> Türleri ve <i>Cardopatum corymbosum</i> 'un (farklı konsantrasyonları ($2,1,10^{-1},10^{-2},10^{-3}$) ITS PCR Ürünlerinin (700bp) Jel Fotoğrafi.....	94
Şekil 3.25 Morfolojik Verilere Dayalı Branch-and-Bound Analizinde Oluşan Ağaç Topolojisi.....	95
Şekil 3.26 Morfolojik Verilere Dayalı Branch-and-Bound Analizinde Oluşan Ağaç Topolojisi.....	96
Şekil 3.27 Morfolojik Verilere Dayalı En İyi 106 Ağacın Strict Consensus Ağaç Topolojisi.....	97
Şekil 3.28 Morfolojik Verilere Dayalı Bootstrap Ağaç Topolojisi.....	98
Şekil 3.29 Morfolojik Verilere Dayalı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Ağaç Topolojisi.....	99
Şekil 3.30 Morfolojik Verilere Dayalı NJ (Neighbour Joining) Ağaç Topolojisi.....	100
Şekil 3.31 ITS Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Analizinde Oluşan Ağaç Topolojisi.....	102
Şekil 3.32 ITS Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Analizinde Oluşan Ağaç Topolojisi.....	103
Şekil 3.33 ITS Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Analizinde Oluşan Ağaç Topolojisi.....	104
Şekil 3.34 ITS Verilerine Dayalı En İyi 24 Ağacın Strict Consensus Ağaç Topolojisi.....	104
Şekil 3.35 ITS Verilerine Dayalı Bootstrap Ağaç Topolojisi.....	106
Şekil 3.36 ITS Verilerine Dayalı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Ağaç Topolojisi.....	107
Şekil 3.37 ITS Verilerine Dayalı NJ (Neighbour Joining) Ağaç Topolojisi.....	108
Şekil 3.38 <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Analizinde Oluşan Ağaç Topolojisi.....	110
Şekil 3.39 <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı En İyi 16 Ağacın Strict Consensus Ağaç Topolojisi.....	111
Şekil 3.40 <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı Bootstrap Ağaç Topolojisi.....	112
Şekil 3.41 <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Ağaç Topolojisi.....	113
Şekil 3.42 <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı NJ (Neighbour Joining) Ağaç Topolojisi.....	114
Şekil 3.43 ITS ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Analizinde Oluşan Ağaç Topolojisi.....	116
Şekil 3.44 ITS ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı En İyi 952 Ağacın Strict Consensus Ağaç Topolojisi.....	117
Şekil 3.45 ITS ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı Bootstrap Ağaç Topolojisi.....	118
Şekil 3.46 ITS ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Ağaç Topolojisi.....	119
Şekil 3.47 ITS ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı NJ (Neighbour Joining) Ağaç Topolojisi.....	120

Şekil 3.48 Morfoloji ve ITS Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Analizinde Oluşan Ağaç Topolojisi.....	122
Şekil 3.49 Morfoloji ve ITS Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Analizinde Ağaç Topolojisi.....	123
Şekil 3.50 Morfoloji ve ITS Verilerine Dayalı En İyi 568 Ağacın Strict Consensus Ağaç Topolojisi.....	124
Şekil 3.51 Morfoloji ve ITS Verilerine Dayalı Bootstrap Ağaç Topolojisi.....	125
Şekil 3.52 Morfoloji ve ITS Verilerine Dayalı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Ağaç Topolojisi.....	126
Şekil 3.53 Morfoloji ve ITS Verilerine Dayalı NJ (Neighbour Joining) Ağaç Topolojisi.....	127
Şekil 3.54 Morfoloji ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Analizinde Oluşan Ağaç Topolojisi.....	129
Şekil 3.55 Morfoloji ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı En iyi 547 Ağacın Strict Consensus Ağaç Topolojisi.....	130
Şekil 3.56 Morfoloji ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı Bootstrap Ağaç Topolojisi.....	131
Şekil 3.57 Morfoloji ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Ağaç Topolojisi.....	132
Şekil 3.58 Morfoloji ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı NJ (Neighbour Joining) Ağaç Topolojisi.....	133
Şekil 3.59 Morfoloji, ITS ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Analizinde Oluşan Ağaç Topolojisi.....	135
Şekil 3.60 Morfoloji, ITS ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı En İyi 1070 Ağacın Strict Consensus Ağaç Topolojisi.....	136
Şekil 3.61 Morfoloji, ITS ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı Bootstrap Ağaç Topolojisi.....	137
Şekil 3.62 Morfoloji, ITS ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Ağaç Topolojisi.....	138
Şekil 3.63 Morfoloji, ITS ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı NJ (Neighbour Joining) Ağaç Topolojisi.....	139
Şekil 4.1 Morfoloji Verilerine Dayalı Branch-and-Bound 1 numaralı Ağaç Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş Ağaç Topolojisi	145
Şekil 4.2 ITS Verilerine Dayalı Branch-and-Bound 1 numaralı Ağaç Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş Ağaç Topolojisi	148
Şekil 4.3 <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı <i>Branch-and-Bound</i> 1 numaralı Ağaç Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş Ağaç Topolojisi	151
Şekil 4.4 ITS ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı <i>Branch-and-Bound</i> 1 numaralı Ağaç Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş Ağaç Topolojisi.....	153
Şekil 4.5 Morfoloji ve ITS Verilerine Dayalı <i>Branch-and-Bound</i> 1 numaralı Ağaç Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş Ağaç Topolojisi.....	156
Şekil 4.6 Morfoloji ve <i>trnL-F</i> Verilerine Dayalı <i>Branch-and-Bound</i> 1 numaralı Ağaç Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş Ağaç Topolojisi	158
Şekil 4.7 Morfoloji, ITS ve <i>trnL-F</i> <i>Branch-and-Bound</i> 1 numaralı Ağaç Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş Ağaç Topolojisi.....	161

TABLO LİSTESİ

Tablo		
<u>Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo1.1	Değişik Bitkilere Ait ITS1 Bölgeleri İçindeki Korunmuş Baz Dizin Motifleri.....	26
Tablo1.2	Üç Kodlanmayan Bölgeyi Çoğaltan Primer Dizileri.....	29
Tablo 2.1	Dış Grup Taksonların lokaliteleri.....	44
Tablo2.2	PCR’da Kullanılan Kimyasallar.....	46
Tablo2.3	5XTBE Tamponu Hazırlanması.....	47
Tablo 2.4	PCR’da Kullanılan Primerler.....	48
Tablo 3.1	Filogenetik Analiz İçin Kullanılacak Morfolojik Karakter Durumları	90
Tablo 3.2	Filogenetik Analiz İçin Kullanılacak Matris Verileri.....	92
Tablo 4.1	Parsimoni Analizinde Temel ve Birleştirilmiş Veri Setleri Özeti.....	142

ÖNSÖZ

Bilimsel faaliyetleri sevmemde büyük katkısı olan ve çalışmalarım sırasında karşılaştığım her türlü güçlükte her zaman yardım ve manevi desteğiyle yanımda olan değerli danışmanım Prof. Dr. Bayram YILDIZ'a,

Her türlü bilgi, deneyim ve donanımını hiç esirgmeden benimle paylaşan değerli hocalarım danışmanım Yrd. Doç.Dr. Fatih COŞKUN'a ve Doç.Dr. Tuncay DİRMENCİ'ye,

Çalışmam için gerekli laboratuvar imkanlarını sağlayan BÜTAM Müdürlüğü'ne ve ayrıca Moleküler Biyoloji Laboratuvarı imkanları ile de çalışmanın desteklenmesini sağlayan Yrd. Doç.Dr. Fatih COŞKUN'a ve Yrd. Doç.Dr. Ekrem DÜNDAR'a

Bu çalışmaya 2011/58 no'lu araştırma projesi ile maddi destek sağlayan Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Projeleri Birimi'ne,

ANK, AEF, HUB, GAZI, EGE, ISTE Herbaryumlarında yapılan çalışmalarımızda bize yardımcı olan uzman personele,

İhtiyacım olan bilgisayar programlarında hiç sıkılmadan destek olan Dr. Alp ALPER'e,

Doktora çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Cüneyt TEZ, Gülsüm GÖREN, Emre SEVİNDİK, Necla ŞAHİN, Nur Gökçe ÇETİNER, Görkem SÖNMEZ, Öznur SUAKAR, Şakir AKGÜN, Taner ÖZCAN ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyip, bu günlere gelmemi sağlayan sevgili AİLEME en içten teşekkürlerimi sunarım.

Balıkesir, 2011

Berna SANÖN

1.GİRİŞ

Çeşitli yaşamları tanımlamak ve keşfetmek için canlıların geçmişine ait tarihsel bilgiler ve tahminler dünya üzerindeki habitat ve ekosistemleri tanımlamada temel oluşturur (Organizmalar nasıl bir araya gelir, organize olur, korunur, v.b.). Özellikle çevre sorunlarının artması ve türlerin yaşam alanlarının daralması ile 1990'dan sonra sistematikçiler; tür kavramı, coğrafik dağılım ve endemizm gibi çeşitli konularla daha çok uğraşmaya başlamışlardır [1].

Gelişen moleküler teknikler önceleri, bulaşıcı hastalıkların karakter analizlerinin tanımlanmasında kullanıldı. Sonrasında yeni gelişen metotlar ve gen teknolojileri sayesinde büyük çalışma grupları ve çalışma alanları ortaya çıkmış, aynı şekilde moleküler teknikler bitki ve hayvan taksonomisinde de kullanılmaya başlanmıştır [1].

Yaklaşık 50 yıl içinde bitki moleküler sistematigi önemli ölçüde gelişmiştir [2-4]. Dizi analizlerinin kullanılmasıyla [5] ve yeni filogenetik analiz metotlarının bulunmasıyla [6] moleküler sistematteki gelişmeler hızlanmıştır. Filogenetik bilgi açısından morfolojik karakterlerin yetersiz olduğu zamanlarda dizi analizleri çok faydalı olmaktadır [7]. Çünkü filogenetikçiler genellikle dizilerin filogenisinin organizmaların filogenisine çok yakın olduğunu kabul etmektedirler [3]. Moleküler analizler bütün atasal kökenin ortaya çıkarılmasına izin verdiğinden allopoliploid bitkilerin tarihinden sonuç çıkarmak için nükleer gen dizilerinin küçük kopyalarının kullanılması artmıştır. Bunun sonucu olarak farklı nükleer dizi gen ağaçlarının karşılaştırılması gerekli olabilmektedir [8].

Bir canlının filogenisi fosillerden takip edilebilir. Ancak bu durum birçok canlı için olanaksızdır. Özellikle yumuşak vücutlu canlıların fosil bırakma şansları hemen hemen yok gibidir. Bu nedenle bazı grupların sınıflandırılmalarında

filogenilerinden yararlanmak mümkün değildir. Ancak iyi fosil bırakan gruplarda ise doğru bir sınıflandırma için filogeni çok büyük yararlar sağlamaktadır.

Son yıllarda dizi analizi yöntemleri canlıların coğrafik orijinlerinin bulunmasından [9] canlıların filogenilerini moleküler olarak ispatlamaya kadar birçok alanda kullanılmaya başlamıştır [10].

Filogenetik çalışmalar 1970'lerde morfoloji ile başlayarak ve 1980'lerin sonu 1990'ların başında moleküler metotlar daha sık kullanılır hale gelmiştir. Moleküler çalışmaların artması kladistik yazılımın gelişmesine neden olmuştur. Morfolojik çalışmalarda bu yazılımlar ile daha yaygın kullanılır hale gelmiştir.

Bitki evrimsel biyolojisinde morfoloji, filogenetik çalışmalarda önemli rol oynamaktadır. Moleküler çalışmaların yaygınlaşması ile morfoloji için yeni fırsatlar gündeme gelmiştir.

Paleobotanik çalışmalar ise taksonlar arasındaki akrabalıklar için önemli kavramları verir. Hala günümüzde var olan taksonların çalışılmasıyla da şimdiye kadar elde edilen sonuçlar güçlenmekte ya da sorunların anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Doyle (1969)'un kanıtladığı filogeniye ait katkılar, angiosperm paleobotaniğinde kilometre taşları arasındadır [11].

Günümüzde DNA ve protein dizilerini de içeren moleküler veriler türler arası ilişkileri analiz etmek için kullanılmaktadır. 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; kullanılan moleküler dizilerin homolog olduğu, filogenetik farklılaşmanın iki kola ayrılarak gerçekleştiği varsayılır. Yine bir dizideki her bir pozisyonun birbirinden bağımsız olarak evrim geçirdiği kabul edilir [12].

Canlılar arasındaki genom benzerlikleri, DNA nükleotid dizisi ya da proteini oluşturan aminoasit zincir bilgileri kullanılarak yapılmaktadır. Moleküler çalışmalarda genomik DNA, mitokondri DNA'sı ve kloroplast DNA'sı kullanılmaktadır. Bunlar protein kodlayan genlerdir ve Filogenetik ilişkileri belirlemek için en sık kullanılan gen, 16S veya 18S rRNA genidir, çünkü bu genlerin dizisi birbirine yakın akraba sayılan türlerde korunumludur. Protein sentezinin oldukça eski ve tüm organizmalarda ortak bir özellik olmasından dolayı organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi ayırt edebilmek için rRNA'lar kullanılan başlıca moleküllerdir. rRNA evrensel olarak yayılış gösteren ve filogenetik farkı ölçülür bir şekilde koruyabilen bir moleküldür. Ayrıca rRNA gibi büyük bir moleküldeki olasılıkların sayısı oldukça fazladır ve iki dizi arasındaki benzerlikler filogenetik bir ilişkiyi işaret etmektedir. ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgeleri ise nükleer ribozomal DNA (nrDNA)'nın en çok çeşitlilik gösteren bölümüdür [12] ve bitki filogenetiğinin yeniden yapılanmasında önemli bir lokus olduğu kanıtlanmıştır [13,14].

Birçok taksonomik ve yeni moleküler filogenetik çalışmalara rağmen, **Asteraceae** familyasının kökeni tamamen tanımlanamamıştır [15,16]. Yapılan çalışmalarda familya kendi içinde **Barnadesioideae**, **Cichorioideae** ve **Asteroideae** olarak üç subfamilyaya ayrılır. Çalışma materyali olan *Carlina* L. cinsi **Asteraceae** familyasının **Cichorioideae** subfamilyasının **Cardueae** tribusuna dahildir [17]. Yapılan son çalışmalarda ise **Cardueae** tribusu **Carduoideae** subfamilyasına dahil edilmiştir. Familya kendi içinde de on iki subfamilyaya ayrılmıştır [18].

Cardueae tribusu tartışmalı bir gruptur ve geleneksel sınıflamada 4 subtribus'a (**Echinopsidinae**, **Carlininae**, **Carduinae** ve **Centaureinae**) ayrılmaktadır [17]. *Carlina* **Carlininae** alt tribusunda yer almaktadır. **Cardueae** tribusu içindeki problemlerin çoğu **Echinopsidinae** ve **Carlininae**'deki tribal sınırların ayırımında yaşanır. **Cardueae** içinde güçlüğü çoğu **Carlininae**'den kaynaklanmaktadır [17,19].

ITS'nin filogenetik analizi ve matK dizisinin çeşitlerinin kullanılması ile ayırma ve düzenleme yapılarak **Cardueae**'nin içerdiği **Carlininae** ve **Echinopsidinae**'nin monofiletikliği güçlü bir şekilde desteklenmiş olmasına rağmen

yinede bazı problemler devam etmektedir. **Carlininae**'nin ITS ile matK bölgesinin birleştirilmiş analizinin ağacın bu bölümünün çözümlenmemiş kısmının çözümlenmesini sağlamıştır. Bu sonuç diğer çalışmalarla da uyumludur [20, 21]. Muhtemelen **Cardueae** tribusu **Carlininae**'nin eski nesillerini oluşturur. Bu nesillere göre dağılım **Cardueae** için Doğu Akdeniz Bölgesi olarak işaret edilebilmektedir [20,21].

Carlininae'nin temel durumunu güçlendiren ilginç bir karakter *Atractylis* için de doğru olan ligulaların var olmasıdır [17]. Bu bulgular diğer bazı araştırmalarla da desteklenerek *Carlina* ve *Atractylis* cinsleri **Carlininae** subtribusuna dahil edilmiştir [22]. Ayrıca perikarpın doğrudan papus dokuları içinde uzanması, iki tabakalı endospermin sadece bazı **Carlininae** türlerinde olması *Berardia* cinsi ile benzerliklerini ortaya çıkarır. **Carduinae-Centaureinae** ile beraber *Berardia* arasında serbest papus olarak çok sıralı (pluriseriate) papus içermeleri ortak atadan geçen bir akrabalığın sonucu mümkün olduğu kanısını güçlendirmiştir [19].

Dış grup olarak kullandığımız *Carthamus* L. **Asteraceae** familyasının **Tubulifloreae** subfamilyasının **Cynareae** tribusuna aittir. *Carthamus* L. iki seksiyona ayrılır ve bu seksiyonlar da toplam 18 tür içermektedir. Bu türler Akdeniz havzasının doğusu merkez olmak üzere Akdeniz havzası dışında Arjantin, Avustralya, California ve Güney Afrika'ya yayılmıştır. 18 *Carthamus* taksonu üzerinde ITS ve ETS bölgelerinin çalışılmasıyla özellikle *C. lanatus*'un alt türleri arasında evrimsel ilişki analiz edilmiştir. *C. lanatus* türlerinin yüksek oranda autoapomorphic karaktere sahip olduğu ve ITS ile ETS dizilerinde çok düşük sinapomorfinin öne çıktığı gözlenmiştir [23-26]. Yine *C. tinctorius* ve *C. lanatus* populasyonları arasında SRAP analizi ile farklı primerlerle yapılan çalışmada yüksek polimorfizm gözlenmiştir [27]. Karyolojik çalışmalarda; **Centaureinae** subtribusunda *Carthamus* kompleksi ile *Aegialophila* cinsinde, ITS ve matK dizileriyle yapılmış moleküler analizlerinde alt tribusun *Crupina* polen tipinden köken aldığı belirtilmiştir [28].

1.1 Asteraceae Familyası ile İlgili Genel Bilgiler

Asteraceae familyası; doğal kimyası, çiçeklenme morfolojisi, habitata adaptasyonu ile kozmopolit bir familyadır. 1130 cins, 25000 yakın tür sayısı ile dünyanın her bölgesinde doğal yayılışa sahiptir [29]. Antartika dışında dünyanın en çok tropik ve subtropiklerin yarı kurak ortamlarında yoğunlaşmıştır [30].

1.1.1 Asteraceae Familyasının Genel Özellikleri

Çiçekli bitkilerin en büyük familyası olan **Asteraceae**; anatomik olarak reçine kanallarının ya da latisifer sisteminin bulunuşu ile karakterize edilir. Nişasta yerine toprakaltı organlarında inülin bulunması, tohumlarda ise yağ bulunması karakteristiktir. Türlerin çoğu seskiterpen alkaloidler içerir. Türlerin çoğu çokyıllık, rizumlu ve otsudur, bir kısmı da herdem yeşil çalı ve yarı çalıdır. Ağaç formunda çok az tür vardır. Ayrıca çok sayıda kazık köklü, yumrulu çokyıllık ve tekyıllık türler vardır. Yapraklar almaşlı, çok azı karşılıklı, nadiren dairesel, aya basit, genellikle loblu ya da dişli, bazen bileşiktir. Bazılarında yaprak ayasının bir kısmı diken şeklini almıştır. Stipul yoktur. Stomalar anomositik ya da anizostiktir. Familyanın karakteristik özelliklerinden biri kapitulum adı verilen çiçek durumudur. Her kapitulum, genişlemiş reseptakuluma bağlı sapsız, çok sayıda küçük çiçekten ve bu çiçekleri dıştan saran involukrumdan oluşur. Kapitulumlar gövde üzerinde başak, korimbozi panikula vb. gibi değişik şekillerde dizilirler. Bazı cinslerde (*Echinops* sp. gibi) kapitulum sık bir baş şeklinde toplanır. Bu durumda kapitulum tek çiçeğe indirgenmiştir. Çiçekler üst durumlu, simpetal, tam, bazen pistillat, nötr ya da staminattır. Çiçeklerin olgunlaşması kenardan içe doğru devam eder. Kapitulumda iki çeşit çiçek bulunur. Tubulat (tüpsü) çiçekler genellikle hermafrodit, bazen staminat ya da sterildir. Tüpsü ve 5 loblu korolla aktinomorfiktir. Filamentler serbest, anterleri birleşik (singenizis) 5 stamen vardır. Tüpsü çiçekler bazen iki dudaklı ve zigomorftur. Üst dudaklar iki, alt dudak 3 lobdan oluşur. Dilsli (ligulat) çiçekler pistillat, nötr ya da hermafrodittir. Tabanda kısa bir korolla tübü vardır. Bazen korollanın dilsli kısmı indirgenmiştir. Bu tip dilsli çiçeklere filiform çiçek denir, filiform çiçekler pistillattır, korollanın büyük bölümü yassılaştırmıştır. Tüm familya üyelerinde çiçeğin sepali, meyvelerin dağılımına yardımcı olmak için

değişmiş, tüysü, zarsı ya da kılçıklı hal almıştır. Bunlara papus denir. Tüm çiçeklerde ovaryum alt durumlu, iki karpelli ve bir bazal ovüllüdür. Kapitulumlar ya homogamdır (kapitulumda tüm çiçekler iki eşeyli), ya da heterogamdır (kapitulumda kenardaki çiçekler pistillat ya da steril, içtekiler ise iki eşeylidir). Bazen kapitulumun bir eşeylidir. Bu durumda, bir kapitulumda yalnız dişi (pistillat) ya da erkek çiçek (staminat) bulunur. Böyle bitkiler dioiktir. Familyanın meyveleri kendine özgü olup bir tohumlu sipseladır [30,31].

1.1.2 *Carlina* L. Taksonlarının Yayılışı

Çalışma materyali olan *Carlina* L. ilk olarak; Linne'nin Species Plantarum adlı eserinde 7 tür ile yer almıştır [32]. Bu türler; *C. acaulis*, *C. lanata*, *C. vulgaris*, *C. corymbosa*, *C. fabulosis*, *C. racemosa*, *C. pyrenaica*'dır.

Flora Orientalis'de *C. acanthifolia*, *C. vulgaris*, *C. longifolia*, *C. corymbosa*, *C. frigida*, *C. oligocephala*, *C. lanata* ve *C. gummiifera* olmak üzere 8 türle temsil edilir [33].

Carlina cinsinin dünyada 23 türü bulunmaktadır. *Carlina* cinsinin dünyadaki yayılışı ağırlıklı olarak Avrupa ve Güneydoğu Asya'dır. Ayrıca Doğu Asya ve Kuzey Amerika'da da türleri bulunmaktadır. Ülkeler bazında bakıldığında;

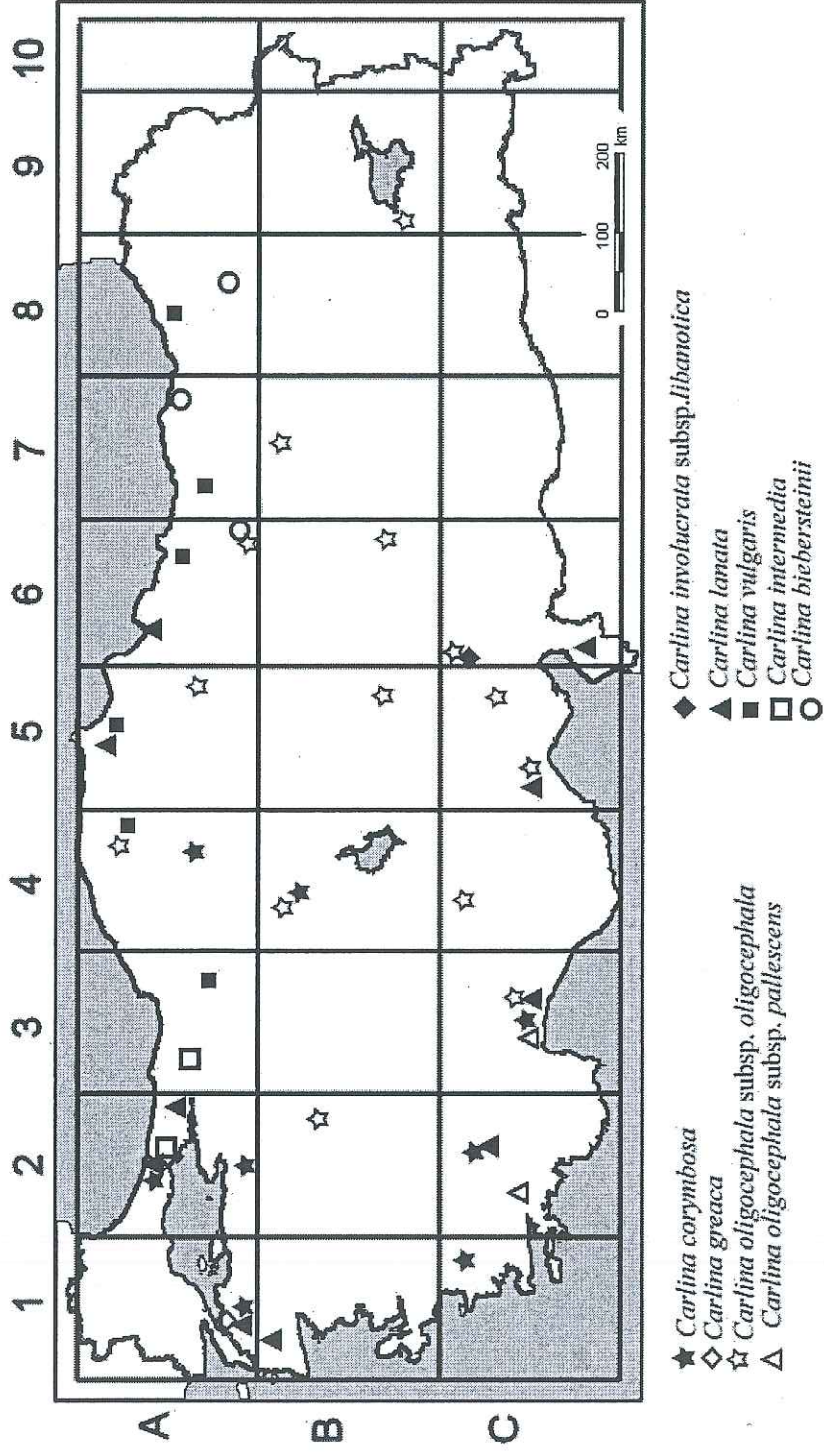
- Flora Europaea'de 13 türle; *C. diae*, *C. tragacanthifolia*, *C. corymbosa*, *C. sicula*, *C. barnebianana*, *C. vulgaris*, *C. frigida*, *C. fimensis*, *C. macrocephala*, *C. acaulis*, *C. acantifolia*, *C. lanata*, *C. racemosa* [34-35],
- Mountain Flora of Greece'de 4 türle; *C. vulgaris*, *C. frigida*, *C. acaulis*, *C. acantifolia* [36],
- Flora of N. America'da 1 türle; *C. vulgaris* [37],
- Flora Palestinian'da 4 türle; *C. curetum*, *C. lanata*, *C. libanotica*, *C. racemosa* [38,39],
- Flora of Israel'de 2 türle; *C. curetum*, *C. libanotica* [40],
- Flora of China'da 1 türle; *C. biebersteinii* [37],

- Flora Italica'da 13 türle; *C. acantifolia*, *C. acaulis*, *C. biebersteinii*, *C. corymbosa*, *C. gummifera*, *C. involocrata*, *C. lanata*, *C. nebrodensis*, *C. racemosa*, *C. sicula*, *C. stricta*, *C. utzka*, *C. vulgaris* [41],
- Flora Cyberia'da 2 türle; *C. acaulis*, *C. vulgaris* [42],
- Flora of Malta'da 2 türle; *C. lanata*, *C. involocrata* [43],
- Flora of Egypt'da 1 türle; *C. involocrata* [44],
- Flora of USSR'da 6 türle; *C. acaulis*, *C. biebersteinii*, *C. cirsioides*, *C. lanata*, *C. onopordifolia*, *C. vulgaris* [45],
- Flora of Iranica'da 3 türle; *C. vulgaris*, *C. kurdica*, *C. lanata* [46] temsil edilmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 *Carlina* L. Taksonlarının Dünyadaki Yayılışı

Carlina cinsi Türkiye Florasında 9 türle (10 takson) yer almıştır. Türkiye'de bulunan türler şunlardır: *C. traganthifolia* Klatt, *C. corymbosa* L., *C. graeca* Heldr.



Şekil 1.2 *Carlina* L. Taksonunun Türkiye'deki Yayılışı

& Sart., *C. oligocephala* Boiss. & Kotschy, *C. involucrata* Poiret subsp. *libanotica* (Boiss.) Meusel & Kästner, *C. lanata* L., *C. vulgaris* L., *C. intermedia* Schur, *C. biebersteinii* Bernh. ex Hornem. (Şekil 1.2) [47,48].

1.1.3 Çalışılan Taksonların Etnobotanik Özellikleri

Carlina türleri çoğunlukla tıbbi amaçlı kullanılmaktadır. *Carlina acaulis*; diüretik, diaforetik ve mide problemlerinde hatta nezle için yapılan gargaralarda kullanılır. Bulgaristan'da *C. acaulis* kökleri böbrek düzensizliklerinde, deri iltihaplarında, hemoroit ve sinir rahatsızlıklarında kullanılmakta, taze köklerin öz suyundan kurt düşürücü olarak yararlanılmaktadır. *C. acaulis* kökleri ile hazırlanan bitkisel ilaçlar günümüzde gastrointestinal bozukluklarda mide suyu akışını arttırıcı olarak kullanılmaktadır [49]. Ayrıca Almanya'da yapılan araştırmalarda *Carlina* köklerinin safra akışını teşvik ettiği ve karaciğer yağlanmalarının temizlenmesine yardımcı olduğu tanımlanmıştır. Bölgesel uygulanan çayının da diş ağrılarına iyi geldiği gözlenmiştir. Halk arasında kök özleriyle hazırlanan suyun yaraları yıkamada etkili olduğu bilinmektedir [50]. Yine *Carlina acanthifolia*'nın kökleri de bu rahatsızlıklar da kullanılır. *Carlina acaulis* köklerinin morfolojik ve anatomik özelliklerinde benzerdir ve benzer amaçlarla kullanılmaktadır.

Çoğunlukla kullanılmasına rağmen bu bitkilerin farmakolojik aktivite sınırlarının bilgileri ve süresi tamamen araştırılmamıştır. Bitkilerin kökleri %20 inulin, %1-2 uçucu yağ, flavanoid içerir. *Carlina acaulis* köklerinin uçucu yağları antifungal ve antibakteriyel etkiye sahiptir [49].

Kıbrıs'ta *Cardopatium corymbosum* kökleri antiseptik etkisinden dolayı yaralara lokal olarak uygulanır. Bazı farmasötik çalışmalar hâlâ bu tür üzerinde devam etmekle beraber tamamen çözümlenememiştir [51].

Dış grup olarak seçilen *Carthamus*'un üç türü Pakistan'da Skardu adında sebze olarak tüketilir. *Carthamus lanatus*'un akenleri linoik asit ve protein bakımından zengindir. *C. oxycantha*'nın yaprak, çiçek ve gövdesi sebze olarak tüketilmekte olup, *C. tinctorius*'dan dokuz önemli kimyasal madde elde edilmektedir

ve şekerli müşhil, iştah açıcı, diüretik ve boya olarak kullanılmaktadır. Çiçekleri canlandırıcı, yatıştırıcı, terletici, deri rahatsızlıklarını ve kızamıktaki şikayetleri gidericidir. Tohumlar diüretiktir ve romatizma için tonik olarak kullanılır. Arterosikloroziste etkilidir ve kan serumunda kolesterolün seviyesinin düşürülmesine yardımcıdır. Çiçek ve tohumlar mestural canlanmayı sağlar [52]. Avustralya'da doğal mantarların yok edilmesinde ve kontrolünde [53] biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılır [54].

Carthamus lanatus antitümör ve interferonu uyaran aktiviteye sahiptir. Son yıllarda antioksidant, antibakteriyal, antifungal aktivitesi olmak üzere biyolojik aktivitesinin çeşitliliği ve sitotoksitesi gösterilmiştir. Ancheva ve arkadaşları klastogenik ve mitotik etkisi üzerine temel biyoaktif bölümlerini ve bu türe özgü yapısının temelini çalışmışlardır ve bu çalışmalar farelerin kemik iliğindeki kromozom bozuklukları üzerinde yapılan araştırmalara dayanmaktadır [55,56]. *C. tinctorius* L. yağ içeriğindeki varyasyonları yaygın olarak işlenmekte ve Safran yerine de kullanılmaktadır [24].

Çalışma materyali olarak seçilen *Carlina* cinsine ait yurtdışında yapılmış moleküler filogenetiğe [17,22,57,58] ve morfolojik verilere dayanan çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, [59-64] Türkiye'de yayılış gösteren türler ile yapılmış morfolojik ve moleküler filogenetik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Türkiye'de yayılış gösteren türlerinin polen morfolojileri üzerine bir çalışma yapılmıştır [65]. Yine yurtdışı araştırmalarda, *Asteraceae* familyasının polen morfolojisi ile ilgili moleküler veriler kullanılarak bazı çalışmalara rastlanmıştır [66-68]. *C. vulgaris* türü ile *Salix repens* taksonları arasındaki assosiyasyonda, *Salix* taksonu altındaki nemli toprak da fideler yetiştirilmiş, kumlu tepeler üzerinde yapay alanlarda su havzaları kullanılmış ve *C. vulgaris*'de mycorrhiza için uygun alanlar olabileceği rapor edilmiştir [69]. *Carlina vulgaris* taksonları ile populasyon dinamiği üzerine de araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmada benzer kumul alanlarda populasyonun daha verimli olması üzerine üç sebep olabileceği öne sürülmüştür. Bunlar; zayıf fidelerin verimli çiçeklenme dönemleri geçirmesinin güç olması, verimli bitki alanlarında erken çiçeklenme ile kısa hayat süresinin olması ve total populasyonun farklı pilot alanlardaki değişkenliğinin *Carlina* populasyonların ani zayıflamasına yol açması

şeklinde belirlenmiştir. Oniki ay boyunca yedi yıl yapılan gözlemlerde tek bireylerde çiçeklenmenin arttığı, hızlı büyümenin ve erken çiçeklenmenin artmasının verimsizlik üzerine etkili olduğu gözlemlenmiştir [70]. Yine çalışma konusu dışındaki araştırmalarda da çalışılan taksonların (flora ve biomass gibi) yer aldığı çalışmalara rastlanmıştır [71-73]. Biz bu çalışma ile Türkiye'deki türlerin yurtdışındaki çalışmalardaki sonuçlarla uyumunu karşılaştırmak suretiyle *Carlina* cinsinin ayrılma sınırlarına da katkıda bulunmuş olacağız.

Bu çalışmanın amacı, Akdeniz bölgesinde yayılış gösteren, sistematik açıdan problemli bir cins olan *Carlina*'nın diğer yakın gruplarla ve kendi içindeki taksonlarının filogenetik ilişkilerini araştırmaktır. Bulunacak sonuçlarla; **Carlininae** subtribusu içinde yer alan *Carlina* cinsinin morfolojisini değerlendirmek, subtribus içinde geleneksel sınıflandırmayla moleküler filogeniyi karşılaştırmak, subtribus taksonları arasındaki sınırları belirlemek ve varsa çelişkileri analiz etmek; dış grup olarak seçilen *Cardopatum*, *Atractylis* ve *Carthamus* cinslerinin **Cardueae** tribusundaki durumunu değerlendirmektir. Çünkü yapılan son çalışmalarda *Carlina* ve *Atractylis*, **Carlininae** subtribusuna yerleştirilmiştir [17,22]. **Cardueae** tribusu içinde yer alan *Cardopatum*, **Carlininae** alt tribusunda yer almamıştır [17]. Bu taksonlar Türkiye Florası'nda **Cardueae** tribusunda yer alan cinslerdir.

Yapılacak çalışma ile morfolojik ve moleküler filogenetik analizlerde bulunan sonuçların karşılaştırması yapılarak, cinsin Türkiye Florasındaki yeri, yayılış alanları ve statülerinin netleştirilmesine katkıda bulunulacaktır.

1.2 Moleküler Çalışmalar

1.2.1 Moleküler Belirteçler (Markırlar)

Canlılar arasındaki genetik farklılıklar, farklı genler taşımalarından kaynaklanmaktadır. Aileler içi, türler içi ve popülasyonlar arası genetik varyasyon genetik markırlarla değerlendirilmektedir. Genetik markır, bağlantılı bir lokustaki allelleri tanımlamak için kullanılan saptanabilir gen ya da DNA parçasıdır.

Genetik markır tipleri;

- Morfolojik markır,
- Protein markırları ve
- DNA markırları olarak üç gruba ayrılabilir.

Bunlardan DNA markırları; farklı genotiplere ait DNA nükleik asit diziliş farklılığını çeşitli şekillerde ortaya koyan markırlardır. Tüm dünyada moleküler ve genetik alanında yapılan çalışmalar baş döndürücü bir hıza erişmiştir. Böylece tür içi ve türler arası genetik farklılıklar bireylerin DNA'larının karşılaştırılmasıyla moleküler düzeyde araştırılabilmektedir. Bazı sıraları aralarındaki bu farklılıklar aynı zamanda genom haritalarının oluşturulmasında, kalıtsal hastalıkların teşhisinde, popülasyon genetiği çalışmalarında, bitki ve hayvan ıslahı çalışmalarında önemli rol oynamaktadır [74].

Bu markırlar çeşitli yöntemlerde kullanılır. Bunlar;

1-Hibridizasyona dayalı markırlar

RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)

2-PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) a bağlı markırlar

RAPD (Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)

SSR (STR) Mikrosatellit DNA Analizi (Basit Sıra Tekrarları)

VNTR (Mini satellitler)

Mikroarray

SSCP(Tek zincir konformasyonel polimorfizm)

3- EST's DNA markırları

1.2.1.1 Hibridizasyona Dayalı Markırlar

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

RFLP analizi, dokulardan izole edilmiş genomik DNA'nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince özel olarak kesilmesi ve prob esasına

dayanmaktadır. Bir DNA parçasının yaklaşık her 100 nükleotid çiftinde nükleotid dizisi bireylerde değişiklik gösterir.

Sonuç olarak; bir kromozom üzerinde bulunan bir kesme enzimi tanıma dizisi, diğerinde bulunmayabilir. Bu durumda, kesme parçası büyüklükleri bu bölge için farklıdır. Bu yöntemde, özütleme ve saflaştırmadan sonra elde edilen DNA kesme enzimleri ile kesilir, oluşan parçalar daha sonra molekül büyüklüklerine göre jel elektroforezinde ayrılırlar. Bir RFLP, DNA'nın nükleotid sıralanışındaki varyasyonla oluşur. Bu varyasyonun sebebi bir nokta mutasyonu, kaybolma (delesyon) ya da eklenme (insersiyon) olabilir.

Elektroforez sonucu büyüklüklerine göre ayrılan bantlar, RFLP analizinin diğer aşamalarında kullanılmak üzere southern emdirimi metodu kullanılarak taşıyıcı bir yüzeye aktarılır ve orada sabitlenebilir. Alkali solüsyon uygulamasıyla tek eksenli hale getirilen fragmentlerden bazıları etiketli sondalarla eşleşerek görülebilir hale getirilir, eşleşmemiş sondalar yıkanarak uzaklaştırılır [74].

1.2.1.2 PCR Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)'na Bağlı Markırlar

PCR yöntemi bir organizma veya mutant gene ilişkin, sağlam veya parçalanmış DNA ya da RNA'nın in vitro çoğaltılmasına olanak sağlayan bir yöntemdir. 1985 yılında Mullis ve ark. tarafından ortaya atılmış ve avantajları nedeniyle moleküler biyoloji, tıp, arkeoloji gibi değişik alanlarda uygulanabilen bir yöntem olmuştur. Bu yöntem; saç teli, sperm gibi değişik dokulardan elde edilen 1-2 hücreden bile sonuç alma olanağı sağlamaktadır. Ayrıca parafinlenmiş dokular, Guthrie kanları ya da hücre lizatları amplifikasyon için kalıp oluşturmaktadır. Çok az miktardaki materyalden 24 saat gibi kısa bir sürede sonucun alımıp tanınım konulabilmesi PCR yönteminin avantajlarından biridir. Bunların yanı sıra DNA amplifikasyonu in vitro koşullarda gerçekleştirilmektedir. Amplifikasyon bakteri veya viral reaksiyonlara dayanmamaktadır. Belli bir noktada amplifikasyon durdurulduğunda onun devam etmediğinden emin olunmaktadır.

PCR yönteminde her döngü 3 aşamadan oluşmaktadır. Bunlar;

- Denatürasyon
- Primer bağlanması (annealing)
- Primerin uzaması (extension)dır.

DNA'nın Denatürasyonu

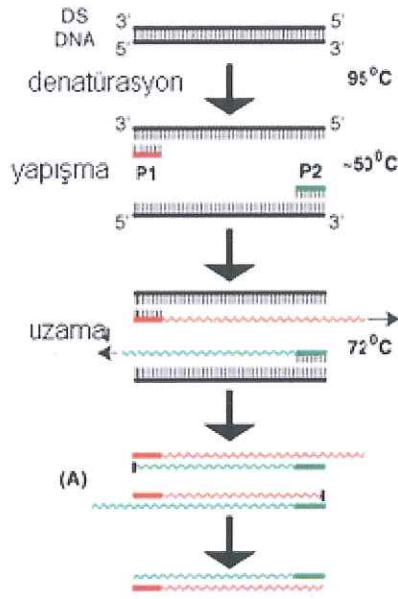
Çoğaltılmak istenen çift sarmal DNA, sarmalları birleştiren hidrojen bağlarının ayrılması için denatüre edilerek tek sarmal haline getirilir. DNA sarmallarının ayrılması için uygulanabilecek pek çok fiziksel ve kimyasal yöntem olmasına karşın 90-95°C'ye kadar ısıtmak basit ve etkili bir işlemdir.

Primer bağlanması (annealing)

Bu aşamada primer adı verilen ve çoğaltılması istenen DNA için spesifik olan oligonükleotid, birinci aşamada elde edilen DNA tek ipliği üzerinde kendisine komplementer olan nükleotid dizisiyle hibridize olur (annealing yapar). Bu DNA parçaları, orijinal (hedef) DNA ipliğinin amplifikasyonunu başlatmak amacıyla kullanıldıklarından primer (öncü) olarak adlandırılırlar ve 18-30 nükleotidden oluşan oligomerlerdir. Her bir primer, örnekteki DNA sarmalının 3' veya 5' sarmalından birinin tamamlayıcısıdır ve çoğaltılacak olan DNA bölgesine özgüdür. Annealing aşamasında ortamın ortalama ısısı 30-70 °C'ye düşürülür.

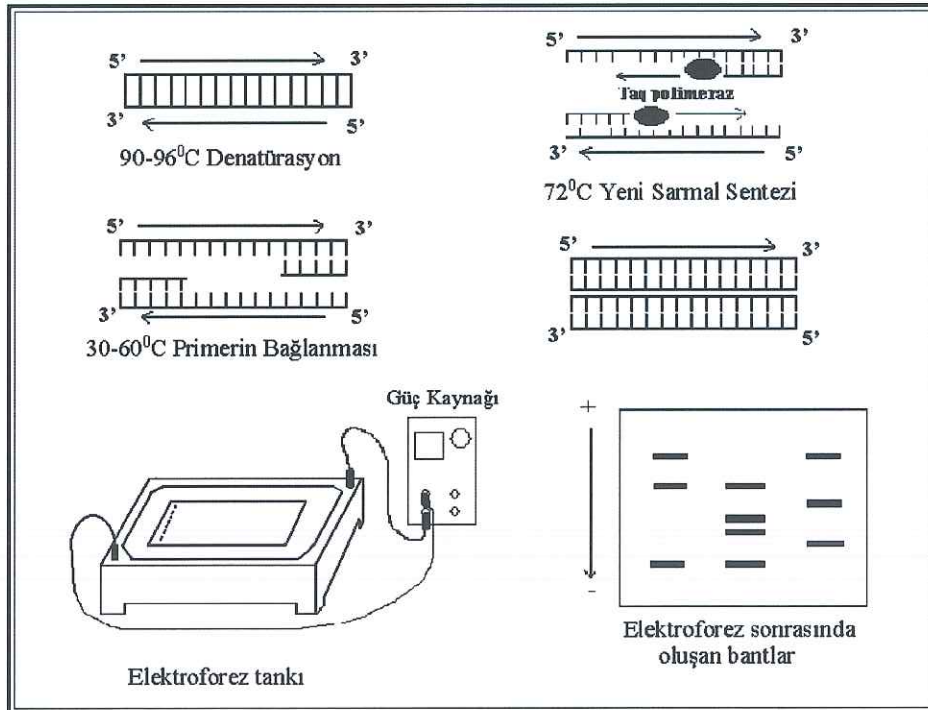
Primerin uzaması (extension)

Annealing tamamlandıktan sonra primer hibritleştiği tek ipliğin karşılığını sentezler. Bu sentez için termostabil özelliği olan ve *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen Taq polimeraz enzimi nükleotidleri orijinal DNA ipliğine komplementer olacak biçimde primere ekler ve uzatır. Oluşan yeni DNA iplikleri bir sonraki döngüde primerler için kalıp olarak rol oynar. Primerlerin uzatılması aşamasında 70-75°C'ler arasında bir ısı uygulanır. (Şekil 1.3) [75,76].



Şekil 1.3 PCR Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Aşamaları [77]

1.2.1.2.1 RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA



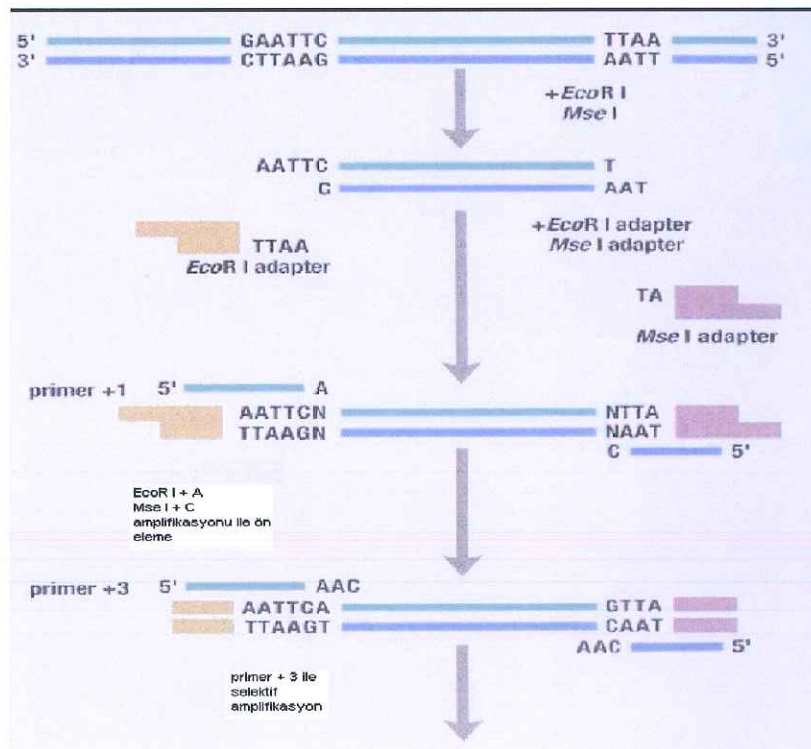
Şekil 1.4 RAPD Analizinin Aşamaları [74]

RAPD yöntemi; nükleotid sırası rastgele belirlenen kısa zincirli oligonükleotidlerin kullanıldığı, PCR ile genomik DNA'da ilgili bölgelerin çoğaltıldığı bir polimorfizm belirleme yöntemidir (Şekil 1.4).

Bu teknikte 6–10 nükleotid uzunluğunda başlatıcı DNA'lar kullanarak genom üzerinde rastgele bölgelerin DNA çoğaltımı yapılır. Başlatıcı DNA'ların hazırlanmasında belirli bir DNA sırasına ait bilgi gerekmemektedir.

RAPD tekniği; çabuk sonuç vermesi, ucuz olması, az işgücü gerektirmesi, az miktarda ve düşük kalitede DNA'ya ihtiyaç duyulması bakımından popüler hale gelmiştir. Ayrıca polimorfizm oranı da çok yüksektir. Tekniğin dezavantajları ise güvenilirliğin çok sınırlı olması, tekrarlanabilirliğin düşük olması ve dominant kalıtım göstermesidir [74].

1.2.1.2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)



Şekil 1.5 AFLP Metodunun Çalışma Sistemi [78]

Bu yöntemde DNA kesme endonükleazları ve PCR tekniği bir arada kullanılır. DNA EcoRI gibi 6 bp'lik tanıma sırasına sahip nadir kesim yapan ve 4 bp'lik Msel gibi tanıma sırasına sahip daha sık kesim yapan iki enzimle kesilir. Bu şekilde meydana gelen kesme parçacıklarının kesim yerlerine, adaptör olarak adlandırılan kesme enzimi için özgün sıralar takılır (Şekil 1.5).

Daha sonra iki aşamalı PCR uygulanır. Adaptör sırasına ve bu kesim yerine komplementer ayrıca 3' ucundaki seçiciliği artırmak için ekstra bir nükleotid taşıyan +1 primer eklenir. Bu nedenle DNA şablonunda çoğaltım sadece primerin ekstra seçici bazının kesme fragmentinin buna karşılık gelen bazına komplementer olması halinde mümkündür. İki +1 primerin kullanılmasıyla çoğaltılan fragmentlerin sayısı teorik olarak, orijinal fragmentlerin 1/16'sı kadar azalır. Bu aşama preamplifikasyon olarak adlandırılır. Daha sonra seçici çoğaltım olarak tanımlanan 2. PCR uygulanarak primerin seçiciliği artırılır. Bu amaçla, kesim yerine adaptöre komplementer olacak ekstra iki baz içeren bir primer eklenir (+2 primer). Sayısı primerin seçici bazıyla ve nadir kesim yapan enzimin katıldığı fragmentlerin gösterilmesiyle önemli ölçüde azalan fragmentler, jel elektroforezinde ayrılırlar, röntgen filmi ya da floresans boya kullanılmasıyla görünür hale getirilirler [74].

1.2.1.2.3 SSR Basit Sıra Tekrarları (Short Sequence Repeats) Mikrosatellit DNA Analizi

SSR veya STR olarak da adlandırılan mikrosatellit DNA 2–9 baz çiftlik, ardışık olarak tekrarlanan birimlerden oluşmuştur. Mikrosatellit polimorfizmi ya da tekrarlanma sayısındaki farklılıklar, bu lokusların iki tarafındaki korunmuş sıralara komplementer olan özgün primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılması ve daha sonra fragmentlerin elektroforetik ayrımı temelinde saptanabilir. Daha sonra bu fragmentler poliakrilamid jelde görünür hale getirilir.

Mikrosatellit DNA markırları; popülasyon düzeyindeki araştırmalarda son derece kullanışlıdır. Şimdiye kadar değinilen yöntemlerden farklı olarak, bir mikrosatellit lokusun çoğaltılabilmesi için bu sıranın etrafındaki sıraların bilinmesi

gerekmektedir. Mikrosatellitlerin genetik markır olarak kullanılmasındaki en zor aşama bu sıraların belirlenmesi aşamasıdır.

Mikrosatellitlerde polimorfizm oranı ile sonuçların tekrarlanabilirliği çok yüksektir. Bir diğer avantajı ise kodominant markır olduğundan heterozigotlarla homozigotların ayırt edilebilmesidir [74].

1.2.1.2.4 VNTR Mini Satelitler (Variable Number Tandem Repeat)

Mini-satellitler genellikle 9-100 baz çiftinden oluşur. Herhangi bir moleküler markırın yakın ilişkili taksonlar arasındaki farklılıkları belirleyebilme gücü, genetik polimorfizm olasılığını arttıracak lokusa özgü mutasyon hızına bağlıdır. Bu mutasyonlar arasındaki evrimsel mekanizmaları anlamak taksonlar ve nesiller arasındaki ilişki olasılığını belirlemek açısından oldukça önemlidir. Bu sebepten dolayı yüksek varyasyon gösteren markırlar ve bu lokuslardaki mutasyonlar dikkatli ve eksiksiz filogenetik hipotezler oluşturmak için gereklidir [74].

1.2.1.2.5 Mikroarray

Son yıllarda birçok organizmanın DNA baz dizileri belirlenmiş olmasına rağmen bu DNA baz dizileri kendi başlarına bir şey ifade etmezler. Mikroarray tekniği sayesinde DNA baz dizileri belli olan genlerin hücredeki fonksiyonları araştırılmaktadır.

Bir array, nükleik asit örneklerinin düzgün bir şekilde sıralanması ile oluşmaktadır. Bilinen ve bilinmeyen DNA örneklerinin baz eşleşmesi özelliğine göre hibridizasyonu için uygun bir ortam sağlayarak bilinmeyen DNA'ların tanımlanabilmesi için kullanılır.

Bu teknolojiye ilk olarak iki farklı koşulda tutulan iki ayrı örnekten izole edilen mRNA'lardan RT yöntemi ile cDNA'lar sentezlenir. Sonra bu örneklerin biri cyanine, Cy3 ve diğeri cyanine, Cy5 boyasıyla işaretlenerek iki farklı probu oluşturur. Cy5 ve Cy3 iki farklı boya (dyes) olup farklı emme ve uyarılma

(excitation) özelliğine sahip olmalarından dolayı iki farklı renk olarak kırmızı ve yeşil üretirler. Bu iki farklı boyayla etiketlenip işaretlenen ve iki farklı örnekten elde edilen cDNA'lar karıştırılır. Oligonükleotidleri veya cDNA baz dizilerini içeren ve binlerce geni ifade eden DNA mikroarrayleriyle hibridizasyon için kullanılır. Daha sonra boyaların ışıkla uyarılmasıyla oluşan kırmızı ve yeşil renkteki Cy3 ve Cy5 sinyalleri array tarayıcıları yardımıyla farklı dalga boylarında okunur. İki farklı dalga boyunda elde edilen Cy3 ve Cy5 sinyallerinin oranları bir cDNA parçasının iki farklı probdaki yoğunluğunu ifade eder. Bu sinyallerin yoğunluklarını karşılaştırmak ve analiz sonuçlarını sayısal olarak belirlemek için bu amaçla hazırlanmış bilgisayar programları kullanılır. Elde edilen bu görüntüde

- kırmızı renk, herhangi bir mRNA'nın prob 1'de prob 2'ye göre fazla olduğunu,
- sarı renk, mRNA'nın iki farklı probda da eşit miktarlarda bulunduğunu,
- yeşil renk ise, mRNA'nın prob 2'de prob 1'e göre daha fazla olduğunu ifade eder.

Daha sonra her bir sinyalin ortalaması alındıktan sonra mikroarrayde kendiliğinden oluşabilecek sinyal çıkartılır ve her bir değer için normalizasyon işlemi farklı koşullarda ekspresyonu, değişmeyen temel bir genle (housekeeping gene) veya sinyal yoğunluğu bilinen herhangi bir mRNA kullanılarak yapılır. Normalleştirilen bu veriler gen ekspresyon görüntülerinin belirlenmesinde kullanılır [74].

1.2.1.2.6 SSCP Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizm (Single Strand Conformational Polymorphism)

Geçmişteki birçok metodun yetersizliğini ortadan kaldırmıştır. PCR-SSCP analizleri; PCR amplifikasyonu, restriksiyon enzimi ile kesim ve denatüre olmamış akrilamid jel elektroforezine dayanır. DNA varyasyonu tek zincirli PCR ürünlerinin primer ve sekonder yapılarının değişmesinden dolayı göç mesafelerindeki farklılıklarla belirlenir. SSCP, tek nükleotitten oluşan varyasyonlar dahil olmak üzere %80'e kadar tüm DNA varyasyonlarına karşı hassastır.

SSCP genellikle kısa uzunluktaki DNA varyasyonlarını belirlemek için düşünölmüştür. Bu sebepten dolayı PCR parçalarının boyu 175 -250 bp arasında değişmektedir. PZR istenmeyen ürünlerin ortadan kaldırılması amacıyla optimize edilmesi çok önemlidir. Bunun için PCR ürünleri, SSCP jeline yüklenmeden önce agaroz jel elektroforezi yapıldıktan sonra jelden geri kazanılabilir [74].

1.2.1.3 EST's DNA Markırları

EST genellikle 300-500 baz çiftlik dizilerdir. Bunlar yardımıyla bilinmeyen bölgelerin ya da genlerin dizileri belirlenebilmektedir. Böylece maliyetin düşük olması da sağlanmaktadır.

EST'ler sadece fonksiyonu bilinen proteinlerin dizi bilgilerini ifade eder. Bu veriler kullanılarak da model olmayan bir organizmanın kısmi genomu oluşturulabilir yani bu kısımlarla genom bilgisinin genel durumu yorumlanabilir.

1.2.2 ITS İç Ara Boşluk Doldurucu Bölgeler (Internal Transcribed Spacers)

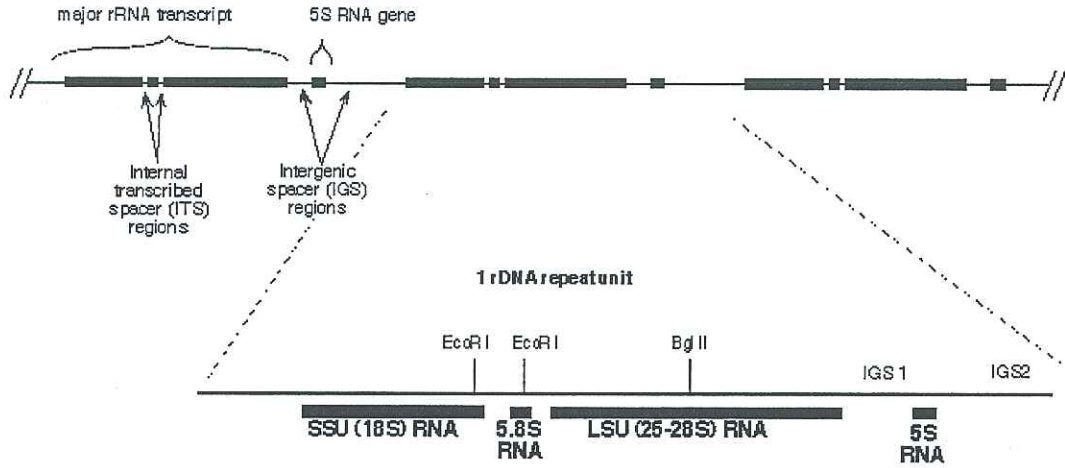
Bazı durumlarda bitki gruplarının doğal ortamlarda tanımlamada ve taksonları ayırt etmekte zorluklarla karşılaşılabilir. Anahtarlarda kullanılan fenetik karakterler genellikle tam ayırt edici olamamaktadır. Özellikle kültürü yapılan türlerde, doğal tiplerin akrabalıklarının ortaya konmasında, türlerin teşhisi, toplanması ve korunması sırasında tanımlama büyük önem taşımaktadır [79].

Bitki germ plazması koleksiyonlarında tutulan tür ya da alttürle ait birçok grubun yanlış isimle isimlendirildiği anlaşılmıştır. Bu nedenle, taksonlarla ilgili yapılacak tüm bilimsel araştırmalar için öncelikle gerçekleştirilmesi gereken çalışma tam ve doğru teşhistir.

Moleküler biyolojide son gelişmeler, türe özgü gen bölgelerinin belirlenmesiyle bitki türlerinin tanımlanmasına olanak vermektedir. Buna yönelik

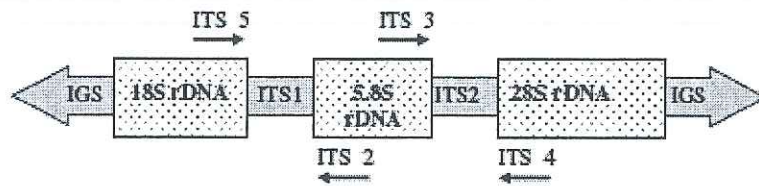
olarak, rDNA'nın ITS bölgeleri, bitkilerdeki moleküler sistematik çalışmalarda sıklıkla başvurulan yöntemlerden biri haline gelmiştir [13].

Genomik DNA üzerindeki rDNA bölgeleri, çoklu gen yapılarından oluşan ve ardışık sıralanmış tekrarlı diziler şeklindedir (Şekil 1.6)



Şekil 1.6 DNA Üzerindeki ITS Bölgeleri[13]

18S küçük alt birim (Small Subunit), 5.8S ve 28S büyük alt birim (Large Subunit) 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 [13]. 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 1.7'de verilmiştir.



Şekil 1.7 ITS Primerlerinin rDNA Üzerindeki Bağlanma Bölgeleri[13]

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 promotor bölgesini ihtiva etmektedir. NTS (Non Transcribed Spacer) ise, tekrar birimleri arasında yerleşmiş kodlanmayan bölgeleridir [13]. 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, 200-30000 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.

1.2.2.1 ITS'nin Genel Özellikleri

- 1-Bütün bölgenin toplam uzunluğu yaklaşık 700 bp kadardır. Ökaryotik organizmalarda 5.8S gen bölgesi, çoğunlukla ITS bölgeleri ile birlikte değerlendirilir.
- 2-Bu bölgelerin korunmuş rDNA gen bölgelerine göre daha fazla değişkenlik gösterdiği kanıtlanmıştır.
- 3-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.
- 4-Bu bölgeler, rDNA'nın olgun 18S, 5.8S ve 28S alt birimlerinin oluşumu sürecinde görev almaktadır [13].

1970'lerde DNA dizin analizi çalışmalarının hız kazanmasıyla, rRNA'lar ve komşu bölgeleri üzerindeki sekonder yapı çalışmaları büyük artış göstermiştir. Her tekrar birimi, olgun rRNA'ları oluşturacak olan bir prekürsör (preRNA) olarak kopya edilir [79].

ITS1 ve ITS2 bölgeleri ribozomal transkripsiyon ürününün bir parçası olmasına rağmen olgun ribozomal alt birimlerin yapısına dahil edilmezler. Ancak bu bölgeler, rRNA'ların olgunlaşması sürecine katkıda bulunmaktadır [80].

preRNA molekülünün çeşitli olgun RNA türlerine dönüşümünü sağlayan transkripsiyon sonrası süreçte her iki ITS bölgesi kesilip çıkarılır ve ortamdan uzaklaştırılır. ITS bölgelerinin, baz değişimi sınırlamalarından nispeten uzak olduğuna inanılmaktadır. Bu durum Angiosperm'lerden elde edilen ITS bölgelerine dayalı filogenetik analiz sonuçları ile desteklenmektedir [81].

ITS1'de meydana gelebilecek delesyon-insersiyon olayları veya nokta mutasyonları, olgun SSU ve LSU rDNA'ların üretimine engel olabilmektedir. ITS2 bölgesinde oluşabilecek bu çeşit mutasyonlar sonucunda da büyük alt birim rRNA'ların oluşumu zarar görebilmektedir. ITS bölgesinin primer yapısında bu çeşit değişiklikler meydana gelmesine rağmen sekonder yapıları ileri derecede korunmuştur.

ITS bölgeleri, değişebilir bölgelerinin yanında korunmuş bölgelerde ihtiva etmektedir. Özellikle ITS1 bölgesinin merkezine yakın kısımlarında değişmeden kalabilen korunmuş bölgelerin varlığı tespit edilmiştir.

1.2.2.2 rDNA Çoklu Gen Ailesinin Fonksiyonel Sınırları ve Evrimi

ITS bölgesi, ribozomal alt birimleri kodlayan nrDNA içindeki gen bölgeleri arasında yer almaktadır. Nüklear DNA'daki bu bölgeler, spesifik kromozomların nükleolar organizör bölgesinde art arda sıralanmış tekrarlar şeklinde düzenlenir [82]. Her tam birim, olgun 18S, 5.8S ve 28s RNA alt birimleri için işlenen bir prekürsör olarak kopya edilir. ITS bölgesi, bu rRNA'nın olgunlaşma işlemine yardımcı olur.

Angiospermler arasında, ITS'in 5' ve 3' ucuna yakın kısımlarının yüksek derecede değişkenlik gösterdiği ve anlaşılır biçimde hizalanamadığı belirlenmiştir. Fakat merkeze yakın gövde yapıları benzer baz sıralarına sahiptir [83]. Bu bölgeler, yüksek derecede korunmuş sekonder yapıların oluşumunu sağlayan yüksek oranda G (Guanin), C (Sitozin) ve T (Timin) içeriğine sahiptir. Bu nedenle ITS'in merkezine yakın bölgesi, ileri derecede korunmuştur ve büyük bitki familyalarında, hatta tek yıllık ve çok yıllık bitkiler arasında da hizalanabilen bir baz içeriğine sahiptir [83]. Saç tokası biçimindeki bu küçük motif, 25 bp'den daha küçüktür. Bu üç bölgenin

birleşmesinden oluşan yapı, ITS'in primer dizin yapısından ziyade, sekonder yapısının korunmuş olarak kalmasına katkı sağlar. Bu durum, ITS1 bölgesinin sekonder yapı kararlılığını artırır. Baz içeriği açısından daha az değişkenlik gösterdiği bilinen ITS2 bölgesi üzerindeki çalışmalar diğer bölgelere göre daha az düzeydedir.

Ribozomal genlerin, büyük miktarlarda protein ürününe ihtiyaç duyulması nedeniyle çoklu gen familyası olarak var olduğuna inanılmaktadır [84]. Üstelik protein üretiminde ve DNA'nın işlenmesi sırasında, ribozomların önemli fonksiyonlarının yanı sıra, rDNA kopyaları arasında tekdüzeliğe gereksinim vardır. rDNA'lar çoğunlukla türler arasındaki çeşitliliğin değişik seviyelerini oluşturan gen sürüklenmesi nedeniyle tür içinde yüksek oranda homojenlik gösterir [85]. Bir tür içinde rDNA'daki ara bölgelerin kopyalarında görülen en yaygın varyasyon basit baz çifti değişimleridir [13]. Diğer varyasyonlar, ara bölgelerin küçük bir oranında meydana gelen insersiyon-delesyon olaylarını içerir. Bireylere ait kopya tekrarları arasındaki homojenite, gen dönüşümü ve eşit olmayan crossing-over olayları sayesinde baz varyasyonu ile sonuçlanır [86]. Bu mekanizmalar sayesinde rDNA kopyaları özdeşleştirilir ve gen sürüklenmesi nedeniyle bir tür boyunca dağılır.

Gen dönüşümü, bir dizinin kendini değiştirmeden etkileşime girdiği diğer dizini bir şekilde transforme ettiği zaman meydana gelir. Bu durum, olası beş yoldan biriyle gerçekleşir; aynı lokusta iki allel arasında, iç kromatik değiş tokuş sırasında, kardeş kromatitlerin birbirlerini etkilemesi durumunda, homolog kromozomların allelik olmayan lokuslarında veya homolog olmayan kromozomlar arasında veya gen kopyaları arasındaki etkileşimden kaynaklanmaktadır. Gen değişiminin, kromozom replikasyonundan hemen sonra bu olayların meydana gelmesi ile gerçekleştiği kabul edilir. Tek bir gen değişimi sırasında transfer edilen DNA miktarı büyük oranda değişiklik gösterebilir, fakat genlerin sayısında bir değişiklik meydana gelmez. Kromozomlar arasındaki ve içindeki değişiklikler çok yüksek dizin benzerlikleri gerektirmez ve kopyalanan ve elde edilen DNA sırasında bazen üstünlük görülebilir. Bu durum, kopyalanmış genlerin homojenizasyonuna yol açan gen değişiminin tekrarlayan döngüleri olarak ifade edilir.

1.2.2.3 ITS'in Taksonomide Tercih Edilmesinin Nedenleri

nrDNA gen bölgelerinde bulunan ITS bölgeleri, moleküler ve sistematik açıdan sahip oldukları ayırt edici özellikler nedeniyle filogenetik analiz çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu bölgeler filogenetiğin yeniden inşasında yeterli veri sunacak kadar uygun bir büyüklüğe sahiptir (600-700bp). Cins ve tür içi seviyelerde ileri derecede korunmuş olan rDNA gen bölgelerine komşu olarak bulunmaktadır. PCR ile çoğaltılarak karşılaştırılmaları için büyüklüğü son derece elverişlidir. rDNA gen bölgelerine göre daha hızlı nükleotit baz değişimi gösterirler. Cins ve tür seviyesindeki filogenetik çalışmalarda DNA içerikleri, açıklayıcı bilgiler sunmaktadır. Genomik DNA üzerinde yüksek kopya sayısına sahiptirler. Bu bölgelerin evrenselliği, alt birim unsurları ve bölgeler arasındaki farklı baz varyasyon oranları nedeniyle, sistematikte kullanılmaları yaygınlaşmıştır.

1.2.2.4 ITS'in Taksonomik Seviyelerde Kullanımı

ITS bölgesi filogenetik çalışmalarda kullanışlıdır, çünkü;

- ITS bölgesi 700bp çiftlik küçük bir bölgedir ve yüksek seviyede korunmuş 18S ve 26S nrDNA gen dizilerine sahiptir.
- ITS-1 bölgeleri sinapomorfizm gösterdiği için ITS-2 bölgesinden daha kullanışlıdır. Bitki nükleer genomunda fazla tekrara sahiptir. Bu nrDNA'nın amplifikasyonunu ve dizilenmesini daha kolay hale getirmektedir. 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 dizisinin, angiosperm'ler de değişik seviyelerde filogenetik açıdan kullanışlı olduğunu göstermektedir. Bu veriler, genetik sürüklenmelere yönelik etkili sinyaller ortaya koymaktadır [80].
- Bitki sistematikteki karşılaştırmalarda ve filogenetik analizlerde kullanılmak üzere, Genbank veri bankasına 20 Haziran 2006 tarihine kadar yalnızca yeşil bitkiler için 3016 adet ITS nükleotit baz sırası kaydı gerçekleştirilmiştir.

- Homolog olmayan kopyaları nokta mutasyonu ve insersiyon/delesyon şeklinde bulunabilmektedir. Bu türün bireyleri arasında varyasyonlara sebep olabilmektedir. Bazı bitki gruplarında ITS1 ve ITS2’de yüksek oranda varyasyonla karşılaşılırken, bazılarında ise, nükleotit varyasyonlarının 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 [81].

ITS bölgelerinin, hibrit taksonlara yönelik filogenetik analizlerde kullanılması uygun görülmemektedir. Çünkü hibritlerden elde edilecek ITS bölgelerinin hangi atasal genomdan çoğaltıldığı bilinmemesi, güvenilir olmayan değerlendirmelere neden olacaktır [13] (Tablo 1.1).

rDNA tekrarlarının yüksek kopya sayısı nedeniyle (hücre başına 30000’e kadar), ona göre küçük ebatta olan ITS bölgelerini PCR ile çoğaltmak oldukça kolaydır. Bu durum ITS bölgelerini filogenetik ve biyocoğrafik araştırmalar için ilgi çekici bir hale getirmektedir [80].

Tablo1.1 Değişik Bitkilere Ait ITS1 Bölgeleri İçindeki Korunmuş Baz Dizin Motifleri [80]

Tür Adı	Korunmuş Bölge
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	GGCACG-AAAAGTGTCAAGGAA
<i>Nicotiana rustica</i> L.	GGCGTGGAAAAGCGCCAAGGAA
<i>Oryza sativa</i> L.	GGCGCC-GACGGCGTCAAGGAA
<i>Triticum aestivum</i> L.	GGCGCC-GAAGGCGTCAAGGAA
<i>Gossypium longicalyx</i> Hutch. and Lee	GGCGTG-AATTGCGCCAAGGAA
<i>Gossypium robinsonii</i> L.	GGCGCG-AATCGCGCCAAGGAA
<i>Iliamna</i> spp. Rydberg	GGCGCG-AATTGCGCCAAGGAA

1.2.3 rDNA Bölgeleri

1.2.3.1 Küçük Alt Birim rDNA (18S)

Küçük alt birim rDNA'sı yüksek derecede korunmuş DNA bölgelerinden biridir ve alem, şube ve sınıf seviyesindeki kategorilerde filogenetik çalışmaların yeniden inşası için yoğun olarak kullanılmaktadır. Bugüne kadar 4000'den fazla takson için, bu bölgeye ait DNA baz sırası belirlenmiştir [80]. 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, angiospermler içinde, hayvanların düzenlenmesi gibi farklı taksonomik seviyelerde filogeninin yeniden inşasında kullanılmaktadır [80].

1.2.3.2 5.8S rDNA

rDNA tekrar birimleri içinde en küçük uzunluğa sahip olanı 5.8S nüklear 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 [80].

1.2.3.3 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 birimlere sahiptir. Bu nedenle filumlar arasında önemli derecede gen varyasyonu gösterirler.

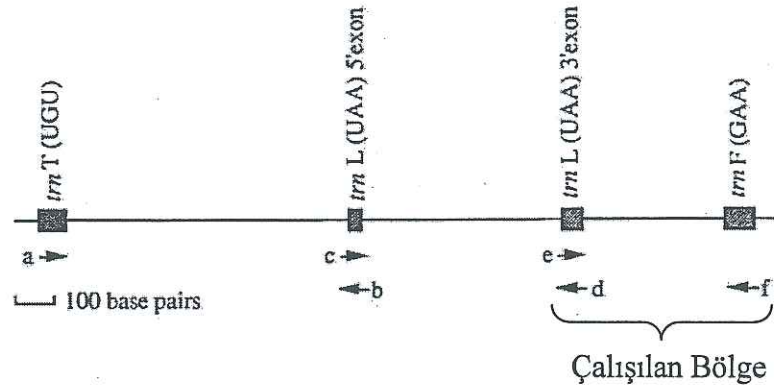
Küçük ve büyük alt birim rDNA'sı üzerinde değişebilir bölgeler veya yayılan segmentler olarak adlandırılan domainler mevcuttur. Ancak bu bölgelerdeki genişlemeler; rDNA baz dizinlerinin, akraba türleri ayırt etmekte kullanılması için yeterli veri sunmamaktadır. Bu nedenle rDNA genlerinin gösterdiği varyasyonlardan, aile ve daha yukarı seviyelerde faydalanılmaktadır [80].

rDNA tekrarlarının ITS ve IGS bölgeleri, yüksek oranda varyasyon göstermeleri bakımından cinsler arasında, tür seviyesinde ve populasyonların çalışılmasında karşılaşılan taksonomik problemleri çözmeye kullanılmaktadır. Ancak IGS (4-5 kb) bölgelerinin ITS bölgelerine göre daha uzun parçalara sahip olması ve dizi analizindeki zorluk nedeniyle, filogenetik çalışmalarda çoğunlukla ITS bölgeleri tercih edilmektedir [80]. Yapılan RFLP çalışmaları, bu ara bölgelerin son 50 milyon yıl içinde ayrılmış olan yakın akraba taksonlar arasındaki filogeniyi ortaya koymada kullanılabileceğini göstermiştir [80].

1.2.4 *trnL-F* Transfer Kloroplast'ın Ribonükleik asit (RNA) Kodlayan L-F Bölgesi

cpDNA dizi varyeteleri, geniş ölçüde angiosperm ve diğer bitkiler arasında interspesifik akrabalıkları araştırır. Fakat bu moleküllerin düşük evrimsel oranı intraspesifik derecede ciddi bir sınırlayıcıdır. Kodlanmayan bölgeler mutasyonları en yüksek sıklıkta görüntülemek ve verimli evrimsel ilişkiyi analiz etmek için kullanılabilir [87]. Kodlamayan bölgelerden biri; cpDNA parçalarıdır, en geniş kullanımıyla aile altında filogenetik akrabalık adresi olmalarından dolayı, t-RNA (*trnT-trnF*) bölgesi yaygın olarak çalışılır (Şekil 1.8).

Bu bölge; *trnT* (UGU) ve *trnL* (UAA) 5' eksonu arasındaki genler arası boşluk, *trnL* (UAA) intronu, *trnL*(UAA) 3' eksonu ile *trnF* (GAA) genler arası boşluğundan oluşur. *trnL* geni iki yüksek korunmuş ekson içerir (Şekil 1.8). Bunlar bir grup intron tarafından bölünmüştür. Her iki taraf bütünüyle tutucu olsa da merkez bölüm yüksek değişkenliktedir. Algler, karayosunları, eğreltiler, gimnospermler ve angiospermler'de yüksek oranda başarıyla çalışılmıştır.



Şekil 1.8 DNA Baz Dizisi Üzerinde *trnL-F* Bölgeleri[87]

trnT (UGU) ve *trnF* (GAA) arasındaki bölge özellikle evrimsel çalışmalar için uygundur, çünkü;

- Korunmuş *trn* genlerinin ve yüzlerce baz çiftlik kodlama yapmayan bölge birbirini takip eder.
- Tek kopya bölgelerinde mutasyon yüksek orandadır.
- Birçok tür arasında genlerin tekrar düzenlenmesinin olmayışı.

Aşağıdaki tabloda ise üç kodlanmayan bölgeyi çoğaltan üç çift primer dizisi verilmiştir. (Tablo 1.2)

Tablo 1.2 Üç Kodlanmayan Bölgeyi Çoğaltan Primer Dizileri [87]

Name	Code	Sequence 5'-3'
a	B48557	CATTACAAATGCGATGCTCT
b	A49291	TCTACCGATTTCGCCATATC
c	B49317	CGAAATCGGTAGACGCTACG
d	A49855	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
e	B49873	GGTTC AAGTCCCTCTATCCC
f	A50272	ATTTGAAC TGGTGACACGAG

1.2.5 Moleküler Filogenide Kullanılan DNA Çeşitleri

1.2.5.1 Mitokondrial DNA (mtDNA)

mtDNA mitokondri içinde lokalize olmuş, halkasal DNA molekülüdür. Mitokondri, proto-ökaryot hücrenin simbiyontu olarak günümüzden yaklaşık 1,5-2 milyar yıl önce ortaya çıkmıştır ve genlerinin büyük bir kısmını hücrenin çekirdeğine aktarmıştır. Nükleer DNA'yı kodlayan nükleer-sitosolik sistem mitokondriyal genleri şifreler ve mitokondriyal sistemde şifrelenen genlerin ifade edilmesini sağlar.

mtDNA 12S ve 16S rRNA'lar ile 22 adet tRNA ve 13 adet polipeptit kodlar. Bunların hepsi oksidatif fosforilasyonun mitokondriyal enerji üreten enzimleri içindir.

İnsanda mtDNA anne tarafından kalıtılır. Çünkü nesilden nesile oosit sitoplazmasıyla geçer. mtDNA hayvanlarda 16000 -18000 baz çiftinden oluşurken, bitkilerde daha büyüktür ve uç noktadaki limitlerde çeşitlilik gösterir. Replikasyonu yarı korunumludur. Hücre içinde enerji gereksinimini karşıladığından mutasyon sıklığı fazladır. Yüksek oranda korunmuş evrimsel dizilere sahiptir [88].

mtDNA boyutunun küçük olması ve yüksek oranda korunmuş yapısının olması popülasyonlar, türler ve daha üst taksonomik seviyelerin evrimsel ilişkilerini belirlemede uygun moleküllerdir [88].

1.2.5.2 Kloroplast DNA'sı (cpDNA)

cpDNA halkasal bir moleküldür. cpDNA yarı korunumlu olarak eşler ve anne tarafından kalıtılır. Çiçekli bitkilerin kloroplast genomu 120-217 kb uzunluğunda yüksek derecede korunmuştur. Çok fazla kodlanmayan bölge içermediği için nükleer genoma göre çok daha yavaş hızla evrimleşir. Birçok türde genom küçük ve büyük eşsiz dizi bölgeleri içerir ve bunlar bir çift ters tekrarla birbirinden ayrılır.

Kloroplast tarafından kodlanan ribuloz 1,5-bifosfatkarboksilaz/oksijenaz (RUBISCO) geninin büyük fragmenti *rbcL* bitki filogenisinde kullanılmaktadır. RUBISCO enzimi Kalvin çemberinde karbondioksit fiksasyonundan sorumludur ve karbon döngüsünün bağlantı noktasında bulunur. *rbcL* genlerinin dizisi çok açıktır, yavaş bir hızla evrimleşirler. Bu nedenle bitki filogenisinde cins ve daha üst taksonomik kategorilerde uygundur.

ndhF dizisinin sistematik çalışmalarda kullanımı ilk defa familyalar arasındaki ilişkiyi belirlemede olmuştur [88].

1.2.5.3 Çekirdek DNA'sı (nrDNA)

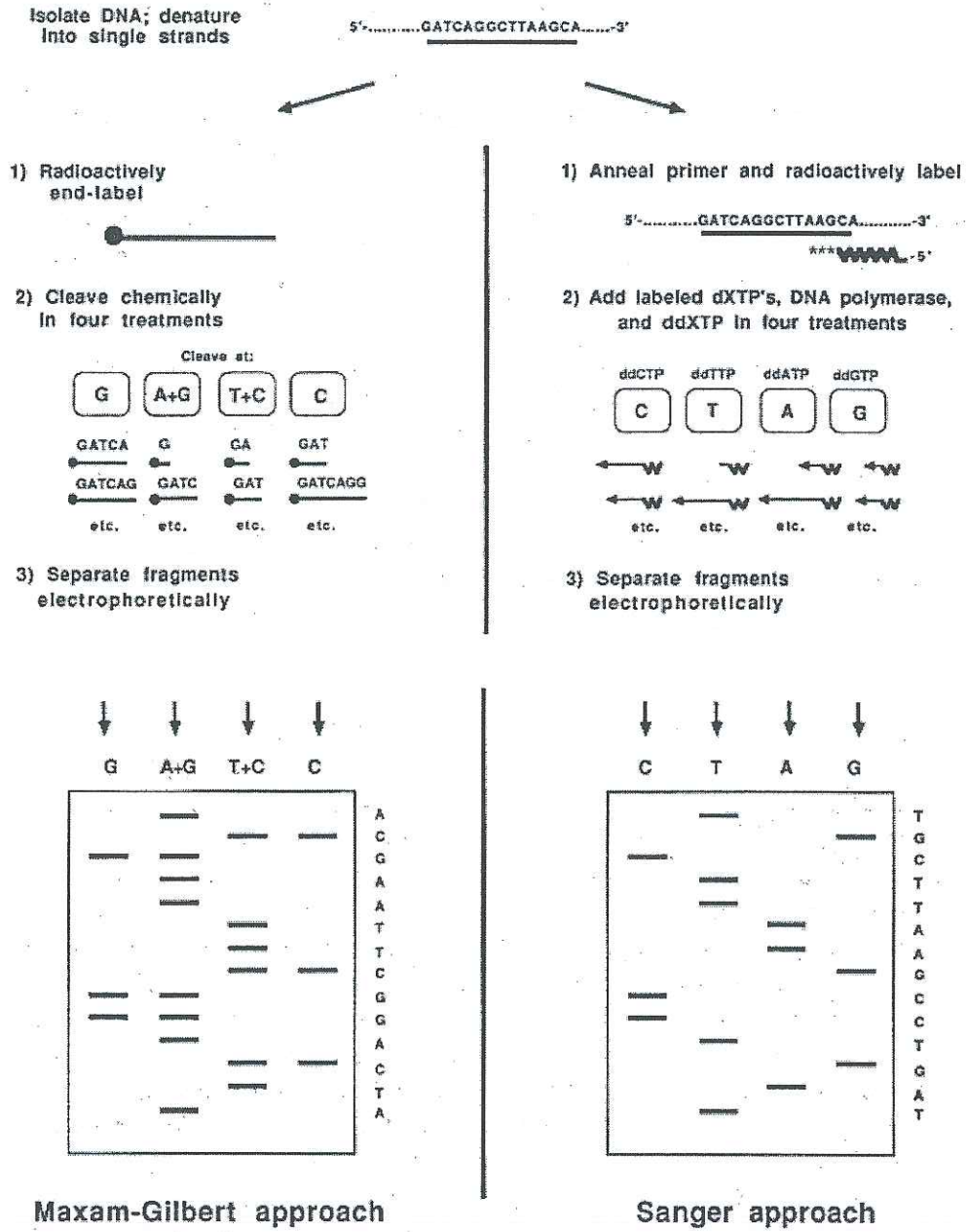
Çekirdek genlerinin kalıtımı çift ataya aittir. Çekirdek genomundaki DNA miktarı aynı cins içindeki türler arasında çeşitlilik gösterir ve bu bitkiler ile yapılan çalışmalarda sorunlar çıkarır.

Çekirdek genomlar, her genomda bir tane olacak şekilde belli DNA dizileri içerir (tek kopya DNA). Diğer diziler genomda birçok kere oluşabilir (tekrar DNA). Bunların oranı genom kompleksliliğini gösterir. Çünkü tek kopya DNA diğer dizilerden farklıdır [88].

1.2.6 DNA Dizileme

DNA saflaştırmasında direkt dizi belirten metodlar yaklaşık 20 yıldır mevcuttur. Bir yaklaşım, Maxam ve Gilbert tarafından ortaya konmuştur [74]. Özel bazlarda (A,T,C,G) sfesifik kimyasal ayrılma reaksiyonlarına dayanır. DNA'nın hedef uzamasının sonu radyoaktif etiketlemedir ve DNA temel-spesifik pozisyonlara bölünen farklı kimyasal reaksiyonlar içinde işleyen 4 alt örneğe ayrılır. Örneğin, bir alt örnek dimetil sülfat ve piperidin içinde muamele edilir, ki DNA sonuçları sadece G pozisyonunda ayrılır. Fragmanlar poliakrilamid jelde elektroforetik olarak ayrılarak otoradyografide görüntülenir. Diğer 3 baz için spesifik paralel reaksiyonlar uygulanır ve fragmanlar jelde komşu şeritler üzerinde ayrılır. Böylece, DNA dizileri

bir otoradyograf üstünde görünen basamak gibi bant örneklerinden direkt okunabilir (Şekil 1.9) [74].



Şekil 1.9 DNA Dizi Analizinin Farklı Yöntemlerinin Şematize Gösterilmesi[74]

Diğer alternatif dizileme prosedürü, Sanger ve ark. tarafından benzer zamanlarda tanıtılmıştır. Bu yöntem daha işlevsel ve uygulaması kolay olduğundan günümüzde daha çok tercih edilmektedir. Bu metot in vitro DNA replikasyonunu

kesiminin kontrol edilmesine dayanır. Çift-iplikli DNA tek-iplikli DNA ya denatüre olur, ve kısa bir DNA segmentinin, (primer) hedef DNA üstünde bir diziyi komplementer olabileceği bilinir. Bu karıştırılan primer/template 4 alt örnek içinde bölünür, her biri DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir primer arttırma reaksiyonuna maruz kalır. 4 reaksiyonun tamamı 4 deoksinükleotit (dA, dT, dC, dG) ayrıca bir tek dideoksinükleotit (ddN, deoksinükleotitte bulunan 3'-OH grup eksik olan bir nükleotit) içerir. DNA dizi sentezleri radyoaktif olarak yapılır, bu hem primerin sonunda etiketlenmesi ile hem de sentez sırasında bir deoksinükleotit etiketlenmesinin birleşmesi ile olmaktadır. DNA dizi genişlemesi serbest 3'-OH de nükleotitlerin parçaları tarafından meydana gelir, öyle ki, ddNTPler nerede olursa büyüyen iplikler içinde birleşir, ilave iplikler durdurulur. Polimeraz reaksiyonlar kondisyonlar altında gerçekleştirilir, öyle ki ddNTPslerin birleşmesi nadir ve seyrek olur. Böylece, belli bir bazda son bulmadan önce çeşitli uzunluklarda gerçekleştirilen bir alt örnekte DNA molekülleri farklıdır. 4 alt örnekten fragmanlar poliakrilamid bir jelde elektroforetik olarak ayrılır, oto radyografi ile görüntülenir, ve DNA dizileri direkt okunur [74].

Kolay bir yöntem olması işlevsel olmasıyla günümüzde de tercih edilen bir yöntem olmasına rağmen günümüzde otomatik dizi analiz cihazlarının ile bu analizler daha rahat çalışılabilmektedir.

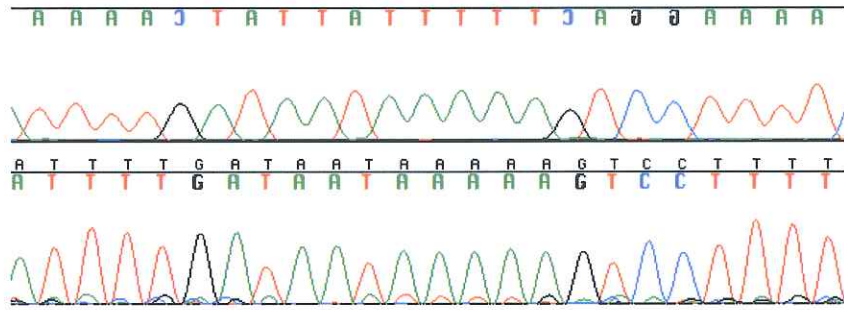
1.2.7 Agaroz Jel Elektroforezi (AGE)

Agaroz ortalama molekül ağırlığı 12000 olan doğrusal bir polisakkarittir ve kırmızı bir alg türü olan *Agar agar*'dan izole edilir. Yüksek sıcaklıklarda suda çözünmesi, soğutulduğunda bu polimerde çapraz bağların oluşması sonucu jel yapısı oluşur. Bu olay geri dönüşümlüdür. Agaroz orta büyüklükte ve büyük DNA moleküllerini elektroforezde ayırmak için en yaygın destek ortamıdır. Ayrıştırılacak moleküllerin büyüklüğüne bağlı olarak genelde %0.3 ile 2.0 agaroz konsantrasyonları kullanılır.

Agaroz jeller genellikle floresan bir boya olan etidyumbromür ile boyanır ve UV ışığı altında DNA parçaları görüntülenir [75].

1.2.8 Otomatik DNA Dizi Analizi

Otomatik DNA Dizi analizinde de Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmıştır [90]. 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 1.10'daki gibi gösterilir.



Şekil 1.10 Dizi Analizi Sonucu Oluşan Piklerin Görüntüsü [89]

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 [90].

1.2.9 Çoklu Dizi Hizalama ve Clustal W Programı

Çoklu dizi hizalama, dizi oluşturma, moleküler modelleme, veritabanı aramaları, filogenetik ağaç oluşturulması gibi konularda başlıca araçtır. 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 [91]. 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. 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 [92]. SAGA ClustalW'ya yakın hizalamalar bulmuştur ama daha başarılı değildir.

1.2.10 Filogenetik Analiz

1.2.10.1 Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler

Günümüzde kullanılmakta olan yöntemler temel olarak iki 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)
 - a) Minimum Evrim Metodu
 - b) En Az Karakter Metodu

1.2.10.1.1 Karakter Temelli Yöntemler

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

1.2.10.1.1.1 Maksimum Parsimoni (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 [93]. 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 [91].

Seç-bağla testinde, bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturulur. Rastgele seçtiği bir pozisyon yeni veri setinin ikinci veri noktasını oluşturur (ikinci veri noktasının birincisinin aynı olma şansı 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 çatallı olarak verilir. Bu durum moleküler sistematiğe politomi olarak adlandırılır.

1.2.10.1.1.2 Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood) (ML) Metodu En yüksek ihtimal

Gözlenen veriyi oluşturmada en yüksek olasılığa sahip en iyi ağacı seçmede olasılık modellerini kullanan bir yöntemdir. 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 [94]. 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 nükleotit 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.

1.2.10.1.1.3 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.

Sonraki olasılık= (Önceki olasılık x Şarta bağlı olasılık) / Toplam olasılık

1.2.10.1.2 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 (NJ- Neighbour Joining) 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 [95]. Tercih edilen ağaç, taksonlar arasındaki mesafeyi en aza indirgeyen ağaçtır [94]. Bu yöntemler diğerlerinden daha kolay ve hızlı olup, çok sayıda dizi için kullanılabilir. Bunlar içinde en çok kullanılanlar Unweighted Pair Group Method Algorithm (UPGMA) metodu ve Neighbour Joining (NJ) metodudur.

1.2.10 Filogenetik Ağaçların Oluşturulmasında Kullanılan Programlar

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 [96].

1.2.11.1 PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony)

Parsimony ve maximum likelihood metotları dahil pek çok metot kullanarak populasyon verilerini detaylı araştırmaya yardımcı ücretli bir programdır [97]. 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 yapılabilmesine olanak sağlar.
- Goloboff'un örtük ağırlık cimrilik kriteri altında ağaç taraması ve değerlendirilmesi yapar.
- Maksimum olasılıkların (maximum likelihood) kullanımıyla atasal nükleotidlerin tahminini yapar.

1.2.11.2 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 [98].

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 tanılarının hesaplanmasını eş zamanlı ve bağımsız olarak yapar.

1.2.11.3 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 [99].

PHYLIP'de Kullanılan Programlar:

- DNA dizileri
- Protein dizileri
- Restriksiyon 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 26000'nin üzerinde kayıtlı kullanıcısı vardır.

2. MATERYAL METOD

2.1 Morfolojik Çalışmalar

2.1.1 Arazi Çalışması

Çalışma materyali olarak seçilen *Carlina* L. örnekleri 2006-2010 yılları arasında bitkilerin vejetasyon dönemleri olan Haziran- Eylül aylarında toplanmıştır.

Öncelikle çalışmaya Prof.Dr. Bayram YILDIZ'ın kişisel koleksiyonunda bulunan örnekler üzerinde başlanmıştır. Moleküler çalışmalar için gerekli görülen taze örnekler ve eksik olan *Carlina* taksonlarından, çiçeklenme dönemlerinde kolaylık olması için öncelikle Flora of Turkey'de [47,48] belirtilen lokaliteler olmak üzere farklı lokalitelerden örnek toplanmıştır. Moleküler analizlerde kullanılmak üzere ayrılan örneklerin silikajel içinde yaprak ve çiçek kısımları kurutulmuştur. Toplanan örnekler bilinen herbaryum teknikleriyle numaralandırılıp kurutulmuş, kartonlara yapıştırılıp etiketlenmiştir.

Dış grup için planlanan *Atractylis cancellata* ve *Cardopatum corymbosum* örnekleri çiçeklenme dönemleri takip edilerek toplanmıştır. Yapılan arazi çalışmaları sırasında dış grup örneklerine ilave olarak *Carthamus lanatus* ve *Carthamus dentatus* türlerinin de hem herbaryum materyali olarak hem de moleküler analizler için silikajel içinde örnekleri toplanmıştır (Tablo 2.1). Taze bitki örnekleri standart herbaryum materyali hazırlama yöntemleriyle herbaryum materyali haline getirilmiştir. Bu örneklerin hepsi çalışma bittikten sonra Balıkesir Üniversitesi herbaryumuna verilmiştir.

Öncelikle yurt içi herbaryumlar (ISTE, ANK, GAZI, HUB, EGE, AEF) ziyaret edilerek mevcut örnekler incelenmiştir. Ayrıca Viyana (W) ve Cenevre (G) herbaryumları Prof.Dr. Bayram YILDIZ ve Doç.Dr. Tuncay DİRMENCİ tarafından

ziyaret edilerek bu herbaryumlarda bulunan Türkiye ve komşu ülkelerden toplanan örnekler incelenmiştir.

Tablo 2.1 Dış Grup Taksonların lokaliteleri

Takson	Lokalite ve Herbaryum numarası
<i>Atractylis cancellata</i>	C1 İzmir: Söke-Bafa Gölü Arası, rüzgar enerjisi çevresi, 15.05.2010, kuzey 37288300 doğu 2721600, BY-BS 17138
<i>Cardopatum corymbosum</i>	B1 Akhisar: Saruhan arası, 20km, 50m yol kenarı, 15.05.2010, BY-BS 17137
<i>Carthamus lanatus</i>	C1 İzmir: Söke-Bafa Gölü Arası, 15.05.2010, BY-BS 17139
<i>Carthamus dentatus</i>	A1(A) Çanakkale: Ezine yol üzeri, 50-100m, 07.08.2009, BY-BS 17110

2.1.2 Morfolojik Çalışmalar

Çalışma materyali olarak belirlenen *Carlina* taksonları arasında morfolojik farklılıkları belirlemek için incelemelere başlanmıştır. Teşhis anahtarına göre teşhisleri yapılan örneklerin, morfolojik karakterlerini daha iyi belirlemek için, aydınlatma kağıtlarına ayırt edici özelliklerini gösteren çizimleri yapılmıştır.

Bu çalışmada dış morfolojik karakterlerdeki farklar belirlendikten sonra tür anahtarı oluşturulmuştur. Dış grup olarak belirlenen *Atractylis*, *Cardopatum* ve *Carthamus* taksonları ile çeşitli araştırmalar yapılmıştır [73]. Yapılan moleküler çalışmalarda elde edilen veriler, morfolojik verilerle de birleştirilerek cinsin türleri ve türlerin akrabalığı ve filogenisi belirlenmiştir.

Herbaryumda incelediğimiz örneklere ve elde edilen literatür verilerine dayanarak anahtarlar oluşturulmuştur.

2.2 Moleküler Sistemik Çalışmalar

Herbaryum materyali olarak elimizde bulunan örneklerin belirtilen moleküler tekniklerle analizleri yapılmıştır. Bu amaçla arazide içinde silika jel bulunan kilitli torbalar içinde kurutulan örneklerden; genomik DNA izolasyonu için, bitkilerin öncelikle tomurcukları, bunun bulunamadığı durumlarda ise sağlıklı ve yeşil yaprakları kullanılmıştır.

2.2.1 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlaması

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.

2.2.2 Çalışmada 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 ise Fermantas firmasından alınmıştır. Jel elektroforezinde kullanılan Agaroz Biomax'tan, etidyumbromid Appllichem'den, yükleme boyası ve DNA büyüklük belirleyici Fermantas firmalarından yerli kuruluşlar aracılığıyla temin edilmiştir.

2.2.3 Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar

Örneklerin hepsinde genomik DNA izolasyonları Fenol-Kloroform-İzoamilalkol metodu ile yapılmıştır. Bunun için kullanılan kimyasallar ve çözeltiler aşağıda verilmiştir.

Çözelti Kompozisyonu:

Ekstraksiyon tamponu (1L)

Üre 33,6 gr

EDTA (pH: 8) 0,5 M

Tris-HCl (pH:8) 1 M

NaCl 5 M

SDS %10

Fenol/Kloroform/İzoamil alkol 25 : 24 : 1

NaAc (pH : 5,2) 3 M

İzopropil alkol %100

TE (Tris – EDTA)	10 mM
RNaz A	10 mg / mL
Etanol (EtOH)	%70'lik ve %100 lük

2.2.4 PCR Reaksiyonunda 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 12000 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 kimyasallar Tablo 2.2'de; primerlerin DNA dizileri, erime sıcaklıkları (T_m) Tablo 2.4'de verilmiştir.

Tablo 2.2 PCR'de (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Adı	Miktarı	Konsantrasyon
dH ₂ O	11.8 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	1 µL	
Toplam	25 µL	

2.2.5 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 2.3'deki gibidir.

Tablo 2.3 5X TBE Tamponu Hazırlama

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

Chapman ve ark. *Asteraceae* familyası için uygun olabilecek primerlerle yaptığı çalışmada [100]; polimorfizm gösteren 10 tane genel amaçlı primer belirlemiştir. Literatürde sıklıkla kullanılan güvenilirliği kanıtlanmış dizilerin moleküler işaretleyici olarak kullanımıyla *Carlina* cinsinin Türkiye'de yetişen taksonlarının filogenetik analizinin yapılmıştır.

Yürütülen moleküler çalışmalar ITS ve *trnL-F* dizilerinin tespiti şeklindedir. ITS dizileme için çekirdek genomuna ait olan ve ribozomal RNA'ları kodlayan ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesinin tamamı (ITS1+5.8S rRNA kodlayan DNA+ITS2) kullanılmıştır.

Yine bu analizleri desteklemek amacıyla kloroplast DNA (cpDNA) dizi varyasyonları kullanılmıştır. Bu analizler için *trnL-F* primerleri ile çalışılmıştır. Kullanılan primerler angiospermilerin interspesifik akrabalıklarının aydınlatılmasında sıklıkla kullanılırlar [87,101-110].

PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler Integrated DNA Technologies (A.B.D.) firmasından temin edildi. Primerler laboratuara gelir gelmez veya -20 °C buzdolabından çıkarıldıktan sonra yaklaşık 15 sn 12000 rpm'de satrifüj yapılarak kuru çökeltinin tüpün dibinde toplanması sağlandı ve 1 ml dH₂O içerisinde çözülerek

stok hazırlandı. Her bir primerin son konsantrasyonu 50 mmol olacak şekilde sulandırıldı.

Tablo 2.4 PCR’de Kullanılan Primerler

	Primer	Nükleotid Dizisi (5’- 3’)	Tm Değeri	Primer Dizaynını Yapan
Forward	ITS 5A	TCCTCCGCTTATTGATATGC	49.9 °C	Kenneth J. Wurdack tarafından (Alice M. Stanford, 2000)[111]
Reverse	ITS 4	CCTTATCATTAGAGGAAGGAG	52.1°C	Bruce G. Baldwin, 1992 - White et al.,1990[111]
Forward	trnL-e	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	51	Taberlet et.al.1991[87]
Reverse	trnF-f	ATTGAACTGGTGACACGAG	51	Taberlet et.al.1991[87]

2.3 Yöntem

2.3.1 DNA İzolasyonu

Moleküler çalışma yöntemleriyle öncelikle, Türkiye’deki *Carlina* taksonlarının iç grup olarak; *Atractylis*, *Cardopatum* ve *Carthamus* taksonlarının dış grup olarak Genomik DNA izolasyonları yapıldı.

2.3.1.1 Fenol- Kloroform İzomilalkol Protokolü

Genomik DNA izolasyonu için Fenol-Kloroform-İzoamilalkol metodu kullanıldı [112]. Bu metotta öncelikle taze yapraktan 0.120- 0.140 mg alınarak havanda sıvı azot ile toz haline getirildikten sonra ependorf tüpünün yaklaşık 200µL’lik seviyesine gelecek kadar dolduruldu. Sıvı azot uçtuktan sonra 600µL izolasyon tamponu eklenerek 5dk. alt üst edilerek çözüldü. Üzerine 500 µL Fenol-Kloroform-İzoamil alkol eklendi. 5dk alt üst edildi. 12000 rpm’de 5dk santrifüj edildi. Üstteki süpernatant 500 µL’lik temiz bir tüpe aktarıldı. Alttaki posa atıldı. Üstteki süpernatant hacminin %10’u kadar 3 µL Sodyumasetat (pH:5,2) eklendi. Üstüne 1 süpernatant hacmi kadar oda sıcaklığında olan İzopropanol eklendi. Alt üst edilir. 12000 rpm’de 2dk. çöktürüldü. Oluşan pellete zarar vermeden süpernatant atıldı. Oluşan pellet üstüne 500 µL TE (10m µ, ph:8) eklenerek pipetajla pellet

tamamen çözüldü. Bu çözelti için 5 µL RNazA (10mg/mlt) eklenerek alt üst edildi, pipetaj yapıldı. 37°C'de 30dk inkübe edilerek RNA'nın uzaklaşması sağlandı. Tekrar 50 µL NaAc eklenir ve alt üst edildi. 1000 µL %90'luk ETOH eklenerek alt üst edildi. Karışım -80°C'de 10dk. bekletilir (-20°C'de 30dk.) 13000 rpm'de 10dk. santrifüj edildi, DNA'nın çökmesi sağlandı. Pellete zarar vermeden süpernatant atıldı. Kalan çökeltiye %70'lik EtOH'den 1000 µL konularak pipetaj yapılarak yıkandı. 12000 rpm'de 2dk. santrifüj yapılır. Süpernatant atıldı. Oluşan çökeltiden EtOH tamamen uzaklaştırıldıktan sonra oluşan genomik DNA çözeltisi 50 µL TE (ya da 200 µL saf su) eklenerek pipetajla çözüldü.

2.3.2 DNA Safılık 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 konulmuştur. 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 40 kat seyreltilmiştir. DNA'ların spektrofotometrik ölçümü aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

DNA Konsantrasyonu($\text{ng}/\mu\text{l}$) = Absorbans değeri (A_{260}) x Seyreltme Katsayısı x $50\text{ng}/\mu\text{l}$

2.3.3 PCR Analizleri

PCR için belirlenen gerekli kimyasallar ve DNA örnekleri buz üzerine alınarak istenilen konsantrasyonda mix hazırlandı. Mixe en son enzim eklendi. İzolasyonu yapılan örneklerden belirli konsantrasyonlarda alınan DNA örnekleri PCR tüplerine alındı ve üzerine mix ilave edildi. PCR tüpüne konulan örneklerin pipetajın yanı sıra mix ile daha iyi karışması için 1-2 sn santrifüjleme yapıldı. Tüpler sırasıyla yerleştirildikten sonra uygun programda reaksiyon uygulandı.

2.3.3.1 Kullanılan PCR Programları

İzole edilmiş genomik DNA'ların ITS ve trnL-F bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primerler yardımıyla, rDNA gen tekrarları arasında kalan ITS1, 5,8 S ve ITS2 bölgeleri ve trn bölgeleri PCR yoluyla çoğaltılmıştır. DNA üzerinden bu bölgelerin çoğaltılması $200\ \mu\text{L}$ 'lik tüplerde; 10X 'lik reaksiyon tamponundan $2.5\ \mu\text{L}$, 25mM MgCl_2 'den $2.5\ \mu\text{L}$, 10mM dNTP 'den $0.4\ \mu\text{L}$, $50\text{pmol}/\mu\text{l}$ 'lik primerlerden $2.5\ \mu\text{L}$, Taq DNA Polimeraz'dan $0.3\ \mu\text{l}$, DMSO'dan $2.5\ \mu\text{L}$, kalıp DNA'dan $1\ \mu\text{L}$, dH_2O 'dan $11.8\ \mu\text{l}$ alınarak $25\ \mu\text{L}$ son hacmine tamamlanmıştır. PCR uygulamalarında olası bir kontaminasyonu engellemek için her uygulamada, genomik DNA içermeyen negatif kontroller kullanılmıştır.

ITS primerleri için;

PCR ile örneklerin hedef bölgelerin çoğaltılması için kullanılan PCR Programı;

Thermocycler program basamakları: 1. 5 dk $94\ ^\circ\text{C}$ 'de (denaturasyon)

2. 30 s $94\ ^\circ\text{C}$ 'de

3. 30 s $53\ ^\circ\text{C}$ 'de (kullanılan primerlerin T_m değerlerine bağlı olarak bu bağlanma sıcaklığı değiştirilecektir)

4. 45 s 72 °C'de (2., 3. ve 4. adımlar 40 defa tekrarlanacak)

5. 10 dk 72 °C'de

işlem sonrası 4 °C'de saklama şeklindedir.

trnL-F primerleri için;

PCR ile Örneklerin Hedef Bölgelerin Çoğaltılması için kullanılan PCR Programı;

Thermocycler program basamakları: 1. 5 dk. 94 °C'de (denaturasyon)

2. 45 s 94 °C'de

3. 45s 51 °C'de (kullanılan primerlerin Tm değerlerine bağlı olarak bu bağlanma sıcaklığı değiştirilecektir),

4. 2dk. 72 °C'de (2., 3. ve 4. adımlar 35 defa tekrarlanacak)

5. 10 dk 72 °C'de

işlem sonrası 4 °C'de saklama şeklindedir.

2.3.4 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 volta 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.

2.3.5 DNA Dizilerinin Belirlenmesi

PCR reaksiyonları ve saflaştırılması Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Araştırma Merkezi (BÜTAM) Biyoloji Laboratuvarlarında, kalan dizin (sekanslama) reaksiyonları ve saflaştırması da Balıkesir Üniversitesinde Otomatik DNA Dizinleyicisi olmadığı için hizmet alımı olarak bu hizmeti veren ticari kuruluşlar aracılığıyla (Refgen) yapıldı.

Bu analiz sonuçlarının sağlıklı olması amacıyla görsel olarak DNA dizilerinin doğruluğunun teker teker kontrol edilmesi gerekli olup moleküler sistematik çalışmalarda uluslararası alanda sıklıkla kullanılan Sequencher adlı profesyonel bilgisayar programı kullanıldı.

2.3.6 DNA'nın Filogenetik ve Fenetik Analizi

Filogeni evrimsel secere (soy) ilişkisidir. Tür ve tür üstü kategoriler jeolojik dönemlerde türleşme süreçleri ile oluşur. Bir takson veya takson grubunun filogenilerinin belirlenmesi için; zamansal olarak (önce-sonra) onların birbirleri ve diğer taksonlarla ortak ata temelinde durumlarının ortaya konması gerekir. Yani türlerin doğal sistemler oluşturması için secere (filogeni) ilişkilerinin yansıtılması gerekir. Günümüz metodları ile secere ilişkisi kesin ortaya konulmaması da evrimsel sorunların incelenmesi ve gruplar arası evrimsel ilişkilerin güçlü hipotezlerle desteklenmesi bu konudaki güvenilirliği arttırmaktadır. [113]

Fenetik gözlemler ise taksonlar arasındaki benzerliği esas alır. Bu yolla doğal sınıflandırmayı oluşturur. En fazla benzerliğin ortak ataya sahip taksonlar arasında olduğunu kabul eder. [113]

Belirlenen DNA dizilerinin analiz için uygun hale gelmesi için hizalanması gerekmektedir. Dizilerin hizalanması için, ClustalW programı internetten ücretsiz olarak kullanılabilir [114]. Bu programlar yardımıyla şimdiye kadar gerekli dizi verileri elde edilen taksonların DNA dizileri hizalandı.

Daha sonra günümüzde dünya çapında çok yaygın olarak kullanılan PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) 4.0b10 filogenetik analiz yazılımının uygun parametreleri kullanılarak elde edilen DNA dizilerinden asıl veri olan filogenetik ağaçlar oluşturuldu [115].

Filogenetik analizin yapılması için karakter temelli yöntemlerden Maksimum Parsimoni(=Tutumluluk) yöntemi kullanıldı. MP yönteminin temel prensibi; tercih edilen ağaç, açığa çıkmış olan evrimsel değişimin toplam miktarını en aza indirgeyen ağaçtır. Evrimin en kısa yolu izlediği kabul edilir. Bu analizde optimal ağaçların oluşturulmasında kullanılan farklı metodlar tercih edilebilir. MP analizinde optimal ağaçların oluşturulmasında en etkili olan Heuristic search kullanıldı. Heuristic search en kısa ağacı garanti etmez ama elde edilen sonuçlar güvenilirdir [115].

ITS, *trnL-F* ve morfoloji ile ilgili matrisler kullanılarak ayrı ayrı PAUP analizi yapıldı. Branch- and -Bound araştırma setinde, ideal kriter (optimality criterion): Parsimony (MP), ek dizi (Addition sequence): furthest, çoklu ağaçlar (Multrees) seçeneği etkili, baş (initial 'MaxTrees' setting) dizileme:100, Branches collapsed (creating polytomies) if maksimum branch length was zero, topolojik sınırlama uygulanmadı (topological constraints not enforced), ağaç köksüz tanımlandı.

Bootstrap analizi [116] 1000 tekrarlı olarak yapıldı. Bu filogenetik analiz en tutumlu ağaçların güvenilirlik dereceleri istatistiksel olarak da değerlendirilebilir. Bootstrapping testi, belli bir ağaç üzerindeki dallardan hangilerinin diğerlerine göre daha iyi desteklendiklerini değerlendiren bir tekniktir. Bootstrapping testinde, bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturur.

Ayrıca mesafe temelli (Distance) yöntemlerden; UPGMA (=Unweighted Pair Group Mean Arithmetic Average) aritmetik ortalama kullanarak yapılan ağırlıklı olmayan çift grup yöntemi ile komşu birleştirme yöntemini içeren NJ (= Neighbour Joining) metotları kullanıldı. Bu yöntemler ile fenetik analizler yapıldı.

3. BULGULAR

3.1 Morfolojik Bulgular

3.1.1 *Carlina* L. Cinsinin Genel Özellikleri

Çok yıllık, iki yıllık veya tek yıllık bitkilerdir, nadiren bodur çalı formundadırlar. Bitkiler rozet yapraklı, yaprakları alternat, dişli, pinnat loblu veya pinnat parçalı. Kapitulumlar homogam; diskoid, involukrum çan şeklinde ya da \pm küresel; dıştaki fillariler yapraksı, 1-2 pinnatifit (nadiren pinnatisekt), dikenli, ortadakiler linear-lanseolat, dik, çiçeklerden çok uzun değil; içtekiler linear, zarsı, sarı, saman rengi ya da kırmızimsı, ışınsal sıralanmış, çiçeklerden çok uzun. Çiçek tablasında (reseptakulum) her bir çiçeği saran zarsı ya da kıkırdağımsı çok parçalı palea var, palealar reseptakulumdan derin bal peteği şeklinde çıkar. Çiçek rengi sarı nadiren koyu pembe. Akenler yuvarlak, basık tüylü. Papus plumoz, kirli beyaz, tabanda birleşik ve dallanmış.

3.1.2 Tür Ayırım Anahtarı

- | | |
|---|-----------------------------------|
| 1- Bodur kubbemsi çalılar | 1. <i>tragacanthifolia</i> |
| 1- Tek yıllık, ikiyillik ya da çok yıllık bitkiler | |
| 2- Tek yıllık bitkiler, içteki fillariler pembe ya da gümüşü pembe | 6. <i>lanata</i> |
| 2- İki ya da çokyıllık bitkiler, içteki fillariler parlak sarı ya da saman sarısı | |
| 3- Yarı rozetsi ikiyillik, genellikle tabanda dallanmamış; dış fillariler iç fillarilerden belirgin olarak uzun değil | |
| 4- Yapraklar, uzun bazal yapraklardan orta gövde yapraklarına doğru aniden kısalır; üst gövde yaprakları ovat-lanseolat, uç lob, üst loblardan sonra aniden daralır, aken ovat-oblong, 1.5-2 mm, seyrek tüylü | 7. <i>vulgaris</i> |
| 4- Yapraklar, uzun bazal yapraklardan orta gövde yapraklarına doğru dereceli | |

kısalır; üst gövde yaprakları dar lanseolatdan ovat-lanseolata kadar, düzenli ve dikenli, tabanda kısa dikenli loblu, uç lobu kademeli daralır.

5- Gövde yaprakları uzun, düz, lineer-lanseolat, dişler düzenli, dikenler zayıf, üst yapraklar (3-)4-6(-7) cm; dış fillariler sık örümcek ağsı tüylü, içtekilere eşit **9. biebersteinii**

5- Gövde yaprakları kısa, undulat, ovat-lanseolat, dikenler kuvvetli, üst yapraklar 2.5-3.5 cm, dış fillariler seyrek örümcek ağsı tüylü, içtekilerden kısa **8. intermedia**

3- Çok yıllık bitkiler, tabanda genellikle dallanmış; dış fillariler içtekilerden belirgin olarak uzun

6- Tabanda çok sayıda kalıcı roset yapraklı; iç fillariler saman rengi, tüm bitki sık örümcek ağsı tüylü

7- Bütün yapraklar lineer-lanseolat, dikenler kuvvetli, 10 mm'ye kadar, gövde yaprakları küçük kulakçıklı **4. oligocephala**

7- Bütün yapraklar ovat-oblong, dikenler zayıf, 1-2 mm, gövde yaprakları büyük kulakçıklı **10. Carlina sp. (BY16509)**

6- Gövde kalıcı roset yapraklı değil; iç fillariler parlak sarı, bitki tüysüz ya da seyrek örümcek ağsı tüylü

8- Yapraklar pinnatisekt; alt yapraklar orta damara kadar bölünmüş, kapitulum (2-)2.5-3.5(-4.5) cm genişlikte, dış fillarilerin tabanı belirgin olarak şişkin

5. involucrata subsp. libanotica

8- Yapraklar pinnatifit; alt yapraklar en fazla 2/3'ne kadar bölünmüş, kapitulum (1.2-)1.3-1.5(-2) cm genişlikte; dış fillarilerin tabanında kalınlaşma belirgin değil

9- Gövde seyrek yapraklı; üst gövde yaprakları ovat-lanseolat, boyu eninin 4-4.5 katı kadar, uç dikenini 1-1.4(-2) cm; dış fillariler (1.4-)1.9-4.8(-5.6)cm, lineer-lanseolat, uç dikenini (0.7-)1.2(-2.5) cm **2. corymbosa**

9- Gövde sık yapraklı; üst gövde yaprakları lineer-lanseolat, boyu eninin 5-5.5 katı kadar, uç dikenini 1.5-2.2(-3) cm; dış fillariler (3-)4-5(-6) cm, oblong-lanseolat, uç dikenini (1.5-)1.8-2.4(-3.1) cm **3. graeca**

3.1.3 Türlerin Betimleri ve Yayılış Alanları

3.1.3.1 *C. traganthifolia* Klatt in Leopoldina 20:94 (1884). Eş Adı: *Atractylis conformis* Barbey & Major in Stefani, Major & Barbey, Karpathos 115, t.8 (1885); *Carlina conformis* (Barbey & Major) P.H.Davis in Notes R.B.G. Edinb. 21:127 (1953). Ic: Measul & Kästner, po. Cit. T. 2b (1972).

Bodur kubbemsi çalılar, 20-30cm, kalıcı, beyaz-keçemsi tüylü. Gövde ve dallar mevsimsel olarak düzenli değişen küçük, geniş, küçük dişli yaprakçıklı ve sert, uzun dikenli brakteye benzer yapraklı. Kapitulular (1.2-)1.5(-2.2) cm genişlikte. Dış fillariler 1- pinnatisekt, uzun, sert dikenli, iç yüzeyi beyazımsı saman rengindedir.

Çiçeklenme zamanı : Temmuz- Eylül

Yetiştirme ortamı : Kayalık yamaçlar, 30- 400m

Tip örneği : [Islands] Rhodus, von Berg (B).

Türkiye'deki yayılışı : Islands. Is: Samos, Fors.- Maj. obs.; Kalimnos, Runemark; Nisiros, Papatsou 478; Tilos, Ade; Rodhos, Rech. 1503.

Genel yayılışı: Ege Adaları, doğu Akdeniz elementi, of isolated taxonomic position.

Notlar: Bu tür sadece Ege Adalarında bulunduğu için örnek bulmak mümkün olmamıştır. Türkiye Florası'nda yer aldığı şekliyle çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1.3.2 *C. corymbosa* L., Sp. Ol. 828 no 3 (1753). Eş Adı: *C. corymbosa* L. *rothii* Boiss., Fl. Or. 3:449 (1875); *C. rothii* (Boiss.) Hal., Consp. Fl. Graec. 2:98 (1902). Ic: Fiori, Ic. Fl. Ital. F. 3694 (1904). (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3)

Çok yıllık bitkiler, kökler odunlu, dallanmış. Gövde (22-)30-45(-60) cm, dik ya da yatık-dik, basit ya da üst kısımda dallanmış, taban yaprakları yok ya da az, varsa lanseolat, 1/2'sine kadar bölünmüş. Yapraklar derimsi, parlak, kulakçıklı, tüsüz, sadece orta damarlar örüncek ağsı-tüylü, 4-6 loblu, loblar lineer, dikenler 1-2 mm zayıf; orta gövde yaprakları oblong-lanseolat, 1/2'sine kadar bölünmüş; üst yapraklar eliptikden triangular-eliptiğe doğru, 1/3'üne kadar bölünmüş, boyu eninin 4-4.5 katı kadar, loblar geniş, 4(-5) çift, uç dikenler kuvvetli, 1-1.4(-2) cm. Kapitulumlar ters konikten geniş ters koniğe kadar, tabanda kısmen kalınlaşmış, (0.7-) 1.2-2 (-2.5) cm genişlikte. Dış fillariler lineer-lanseolat, (1.4-)1.9-4.8(-5.6) cm, uç dikenini (0.7-)1.2(-2.5) cm, parlak sarı, iç fillarilerden uzun; iç fillariler uç dikenini dahil (1.4-)1.9-4.8(-5.6) cm, parlak sarı, Korolla 10-12 mm, anterler korolladan dışarı çıkmış, anterler 10-21 mm; filament 2 mm tüylü. Papus 10-11mm. Aken 1.5 mm, sık beyaz tüylü.

Çiçeklenme zamanı: Temmuz- Eylül

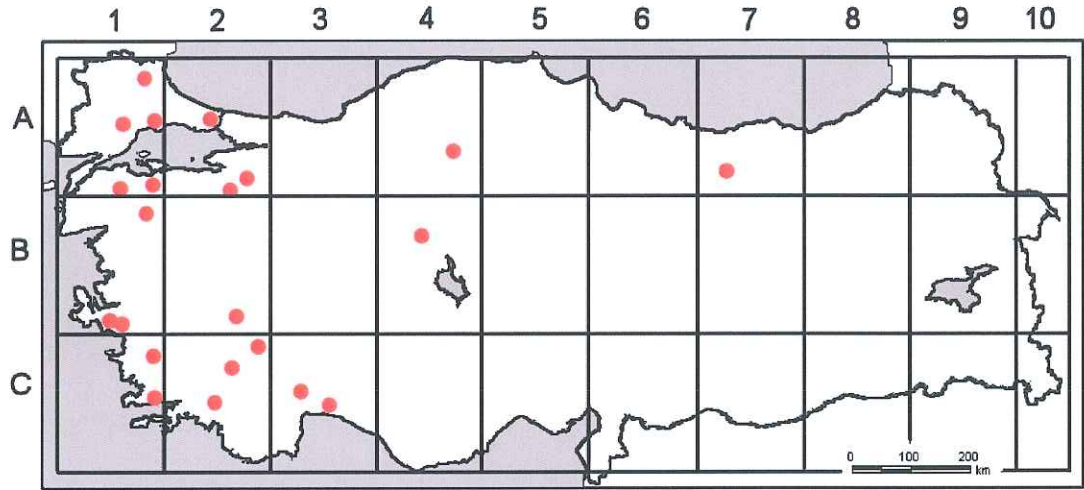
Yetiştirme ortamı: *Pinus brutia* ormanları, *Quercus infectoria* çalılıkları, kuru tepe ve otlaklar, 10-1450 m

Tip Örneği: İtalya'dan tanımlanmıştır (Hb. Linn. 970/4).

Türkiye'deki yayılışı: **A1(E) Kırklareli:** Kırklareli-Demirköy- İğneada arası, 500m, 29.10.1974, ISTE 31191! **A1(A) Çanakkale:** Nagram yakınları, *Sint.* 1883:1003, Gökçeada: Marmara burnu dolayları, 40m, 30.7.1975, *Seçmen, Leblebici*, EGE 200261! **Balıkesir:** Marmara Adası, nahiye merkezi, Çınarlıköy arasındaki ekilmiş alan, 20m, 28.10.1977, *E. Tuzlacı* ISTE 38796! Marmara Adası, Büyük çayır, 450m, 12.7.1978, *E. Tuzlacı* ISTE 40306. **A2(E) İstanbul:** Aydos, 27.7.1950, *A. Baytop, A. Berk, T. Baytop* ISTE 4079! Kayışdağı eteği, 23.7.1950, *J. Areues (Paris) T. Baytop, A. Berk*, ISTE 4070! Kilyos, tarla içi, 10.10.1970, *A. Baytop* ISTE 18549! Kilyos, 3.9.1952, *T. Baytop* ISTE 2991! Küçükçekmece-Büyükçekmece, 50-100m, *D. 39239*, İstanbul- Cendere- Kemerburgaz yolu, Cendere ilerisi boş arazi, 1.6.1993, *N. Özhatay&E. Özhatay* ISTE 69893! **A2(A) İstanbul:** Beykoz, Beykoz Konakları, 100m, maki, 9.6.1999, *H. Şağban* HUB 3385! Bahçeşehir, kuzey

yamaçları, 50-80m, 10.9.1997, *O. Küçüker, M. Yazgen* ISTF 37180!, **İzmit**: kuru güney yamaçlar, 10m, 6.8.1957, *D. 32914 (W!)* Tekirdağ: Tekirdağ- Saray, Güngörmez Köyü, mezarlık arkası, *Quercus* altı, 22.7.1977, *A. Baytop& E. Tuzlacı* ISTE 38098! Bursa: Uludağ yolu, 400m, *Yıldız&Arabacı* (BY 16583)! **Bursa**: Uludağ, Rech. 15395(W!) Uludağ- Soğukpınar, 8.1948, *M. Başarman* ISTF 8416! Çekirge-Uludağ, 27.10.1944, *M. Başarman* ISTF 5014! İstanbul: İstanbul- Beykoz- Polenezköy, 9.1943, *M. Başarman* ISTF 2609! Beykoz- Polenezköy, 9.1943, *M. Başarman* ISTF 2610!, İstanbul- Maltepe, Süreyya Paşa Hastanesi Ormanı, 24.8.1995, *M. Keskin* ISTE 77223! **A4 Çankırı**: Eldivan Dağı – Yayla çay deresi, 1450m, *Czczott* 853, **A7 Giresun**: Alucra 2km batısı yol kenarı, *Yıldız*, 1700m (BY16384)! **B1 Balıkesir**: Burhaniye- Ören, Güney öğretmenler mahallesi, kuzey doğusu, 30.8.1977, *S. Kuş* ISTF 31037! Ayvalık- Şeytan Sofrası, 25.8.1980, *A.A.Meriçli* ISTE 45839! Ayvalık- Balık Adası, 75m, 30.10.1996, *K. Alpınar* ISTE 73039! Ayvalık- Sarımsaklı Yarımadası güneyi, ilkkurşun, d.s., 25.10.1995, *K. Alpınar* ISTE 68648!, Ayvalık- Sarımsaklı Yarımadası güneyi, ilkkurşun, d.s., 4.9.1997, *K. Alpınar* ISTE 74436! Kazdağı, 2010, *Dirmenci* 3739! **İzmir**, Çamaltı tuzlası, Üç tepeler, 16.8.1994, *N.Geyikçi* EGE 37594! Çeşme- Dalyanköy, deniz kenarı, 7.8.1985, *C. Yilmazer* EGE 28573! **Aydın**: Söke- Doğanlar Köyü, Dilek yarımadası Milli parkı 5.km, *Yıldız*, (BY 16476)! Söke- Doğanlar Köyü, 50m, *Yıldız* (BY 16503)! **B2 Denizli**: Denizli- Çivril, Demirciköyün batısı, step, 1200-1350 m, 3.7.1984, *Z. Aytaç* GAZİ 1513! **B4 Ankara**: Ankara, vii 1939, *Kasapligil*, **C1 Muğla**: Mughla (Caria) near Ağla on Sandras Dağh.,backs in *Pinus brutia* forest, 25.July.1947, *Davis*.1358 (W!) Datça, *Khan et al.* 81, Akçabük- Akyarlar, deniz kenarı kayalık yamaç, 29.8.1992, *B.Kuş* ISTF 36058! Datça, deniz kıyısı yamaçları, 5 m, 4.7.1983, ISTE 51566! Köyceğiz, Sancıbeli, yol kenarı, metamorfik, 50m, *A.Güner M.Vural*, GAZİ 10154!, Ortaca, Dalyan, Eskiköy, 20m, su kanalı içi ve kenarı, 15.7.1991, *A. Güner* (9635) HUB 31133! **C2 Afyon**: Dazkırı- Çardak arası, 10km, 820m, 7.10.1980, *A. Baytop* ISTE 45885! **Denizli**: Denizli yakınları, *M.& D. Zohary* 3497, Babadağ, Başkuru Köyü, *P. brutia* ormanı, 850 m, 2.9.1996, *S. Oluk*, EGE 34700! Çivril, Belence Köyü, 1000 m, 24.9.1984, *Gemici*, EGE 25966 ! **C3 Antalya**: Kargı çay Durbanas arası, Derince deresi, *D.* 14416.

Genel yayılışı: Ege adaları, doğu Akdeniz elementi



Şekil 3.1 *Carlina corymbosa* L.'nin Türkiye'deki Yayılışı

Notlar: *C. corymbosa*, diken uzunluğu, yaprakların parçalanma derecesi, dış fillarilerin uzunluğu bakımından çeşitlilik gösterir. Genellikle dış fillariler uzundur. Bazen iç fillarilere eşittir (ISTE 69983). *Carlina* cinsinin Türkiye türlerinden *C. graeca* ve *C. involucrata*'ya yakındır. Gövde uçlarında 5-6 kapitulunun olması, üst yaprakların küçük (2-3 mm) loblu, loblar hariç 2-3 x 1 cm ve dikenlerinin zayıf olmasıyla *C. graeca* ile *C. involucrata*'dan ayrılır. ISTE 74436 numaralı örnek yaprakların iki yüzde de sık tüylü olması ile diğer örneklerden farklıdır.



Şekil 3.2 *Carlina corymbosa* L.'nin Tip Örneği [117]



Şekil 3.3 *Carlina corymbosa* L.'nin Genel Görünümü. (A-B üst gövde yaprakları, C orta gövde yaprağı, D-E alt gövde yapraklarıdır. Ölçekler 2cm'yi göstermektedir)

3.1.3.3 C. graeca Heldr. & Sart. In Heldr., Herb. Graec. Norm., no. 423 (c. 1855).
Eş Adı: *C. corymbosa* sensu Sm. in Sibth. & Sm., Prodr. Fl. Graec. 2:158 (1816), non L. (1753); *C. corymbosa* L. *graeca* (Heldr. & Sart.) Boiss., Gl. Or. 3:449 (1875); *C. corymbosa* L. *graeca* (Heldr. & Sart.) Rech. Fil. In gl. Aeg. 644 (1943).
(Şekil 3.3, Şekil 3.4)

Odonlu çok yıllık, genellikle tabanda dallanmış. Gövde (20-)25-30(-40)cm ± yatık-dik, genellikle üstte çok dallanmış, 8-12 kapitulumlu. Yapraklar derimsi, kulakçıklı, örümcek ağsı tüylü orta damar hariç tüysüz, 1/2'sine kadar bölünmüş, loblar uzun aküminat, dikenler zayıf, 1-2 mm; alt gövde yaprakları lanseolat; orta gövde yaprakları oblong-lanseolat; üst gövde yaprakları dar oblong-elliptik, boyu eninin 5-5.5 katı kadar. 4-6 çift segmentli, uç dikenleri 1.5-2 cm. Kapitulmlar (1.2-)1.3-1.5(-1.8) cm genişlikte. Dış fillariler oblong-lanseolat, (1.5-)1.8-2.4(-3.1) cm'lik uç dikenleri dahil (3-)4-5(-6)cm, tabanda kısmen kalınlaşmış, iç fillarilerden çok uzun; iç fillariler sarı. Korolla 10-14 mm; anterler 12-13 mm saman rengi, filamentler 2 mm. Papus 14-15 mm, kirli beyaz. Aken 4-5 mm sık beyaz tüylü.

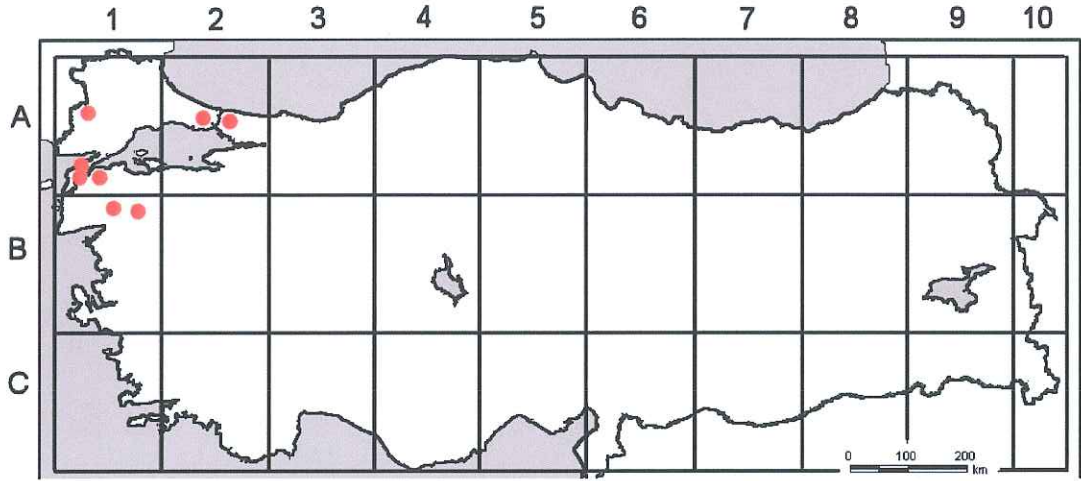
Çiçeklenme zamanı: Temmuz-Eylül

Yetiştirme ortamı: Kuru bayırlar, kayalık otlaklar, 300-1000m

Tip örneği: Sibth. & Sm., Fl. Graeca 9: t. 837 (1837), muhtemelen OXF.

Türkiye'deki yayılışı: **A1(E) Çanakkale:** Kilia, *Unger* 557, Çanakkale: Gelibolu, Güneyli-Ahmetli arası, 20m, *Yıldız* (BY.16598)! Gökçeada, 0-10 m, *Yıldız*, (BY16987)! Edirne: Edirne- Enez, İÜ Sosyal Tesisleri kumsalı, 1.8.1995, *K. Alpınar* ISTE 68347! **B1 Balıkesir:** Balya- Yenice arası, 400m, *Yıldız- Dirmenci*, (BY16494)! Balıkesir: Bayramiç- Yenice arası, 350 m, *Yıldız. Dirmenci*, (BY16502)!

Genel yayılışı: Ege adaları, Doğu Akdeniz elementi.



Şekil 3.4 *Carlina graeca* Heldr. & Sart.'nın Türkiye'deki yayılışı

Notlar: Türkiye'de yayılışı sınırlı olan *Carlina graeca*, *C. corymbosa* ve *C. involucrata*'ya yakın bir türdür. Ancak daha sık yapraklı, üst gövde yaprakları en az 1/2'sine kadar bölünmüş olması, yaprakların eninin, loblar hariç 5-7 mm olması, gövde uçlarında çok dallanmış, 8-12 küçük kapitulalı olması ile bu türlerden ayrılır.



Şekil 3.5 *Carlina graeca* Heldr. & Sart.'nın genel görünümü (A-B alt gövde yaprakları, C-D orta gövde yaprakları, E-F üst gövde yapraklarıdır. Ölçekler 2cm'yi göstermektedir)

3.1.3.4 C. oligocephala Boiss. & Kotschy in Boiss., Diagn. Ser. 2(3):51(1856).

Çok yıllık otsu, odunlu tabandan dallanmış, beyaz, sık örümcek ağı ya da keçemsi tüylü. Gövde (15-) 20- 35(-50) cm, dik ya da yatık-dik, üste dallanma az, rozet yapraklar kalıcı. Gövde yaprakları her iki yüzde beyaz keçemsi tüylü, aya (0.5-)1-2(-1.5) cm genişlikte, uç dikenleri uzun, 3 -5 mm, tabanda dar; alt ve orta gövde yaprakları oblong-lanseolat, üst gövde yaprakları lanseolattan eliptiğe kadar. Kapitulumlar geniş ya da dar, ters konik, (1.4-)1-1.6(-2) cm genişlikte. Dış fillariler (1.8-)2.5-2(-2.5) cm, orta kısımlarda keçemsi tüylü; iç fillarileri saman rengi. Korolla 14-20 mm; anterler 9-11mm, saman rengi, korolladan dışarı çıkmış; filament 2 mm, tüsüz. Papus 12-20 mm. Aken 4-6 mm, beyaz, sık, basık tüylü.

Çiçeklenme zamanı: Temmuz-Eylül

Yetiştirme ortamı: *Pinus nigra*, *Quercus libani* ve *Q. aegilops* ormanları, dağ yamaçları, stepler, 100-2000m.

1. Bitki keçemsi tüylü, yaprak ayası 0.8-1.5 mm genişlikte, dikenler zayıf

subsp. **oligocephala**

2. Bitki seyrek örümcek ağı tüylü, yaprak ayası 0.5-0.6 cm genişlikte, dikenler kuvvetli

subsp. **pallescens**

Subsp. **oligocephala** Eş Adı: *C. oligocephala* Boiss. & Kotschy var. *microcephala* Boiss., Fl. Or. 3:450 (1875), *C. foliosa* Boiss., loc. cit.(1875) (Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8).

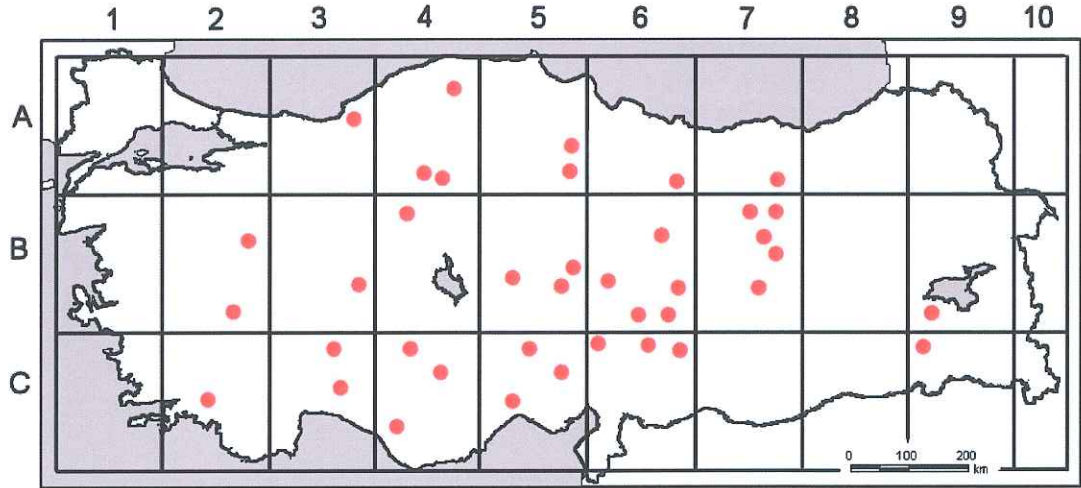
Tip örneği: [Turkey C5 İçel] Gusguta Tauri Cilicici, 1675m, 1854, Kotschy 281.

Türkiye'deki yayılışı: Kuzey, Güney & İç Anadolu. **A3 Bolu:** Abant Gölü-Mudurnu Arası, 7 km, güney batısı, 24.8.1973, 900 m, *F.Holtz*, *P. Hamel* EGE 23356! Karabük- Safranbolu arası, 400 m, *Yıldız & Dirmenci*, (BY16545)! **A4 Kastamonu:** Kastamonu'nun batısı, 800 m, *D. 38753*, Kırıkkale: Koçubaba Kasabası, meşe orman içi, 1250 m, 10.8.1989, *A.A.Dönmez* (1473) HUB 31131! **Ankara:** Elmadağ- Yeşildere Köyü üstü, İdris Dağı, 1200-1400 m, 8.9.1988, *M. Koyuncu* 7773, AEF 16562! Gütül ilçesi, Kirmir çayı vadisi, İnönü mağaralar civarı, aglomera, kayalık, 780 m, 11.8.01, *B. Tarıkanya* HUB 1311! **A5 Amasya:** Amasya,

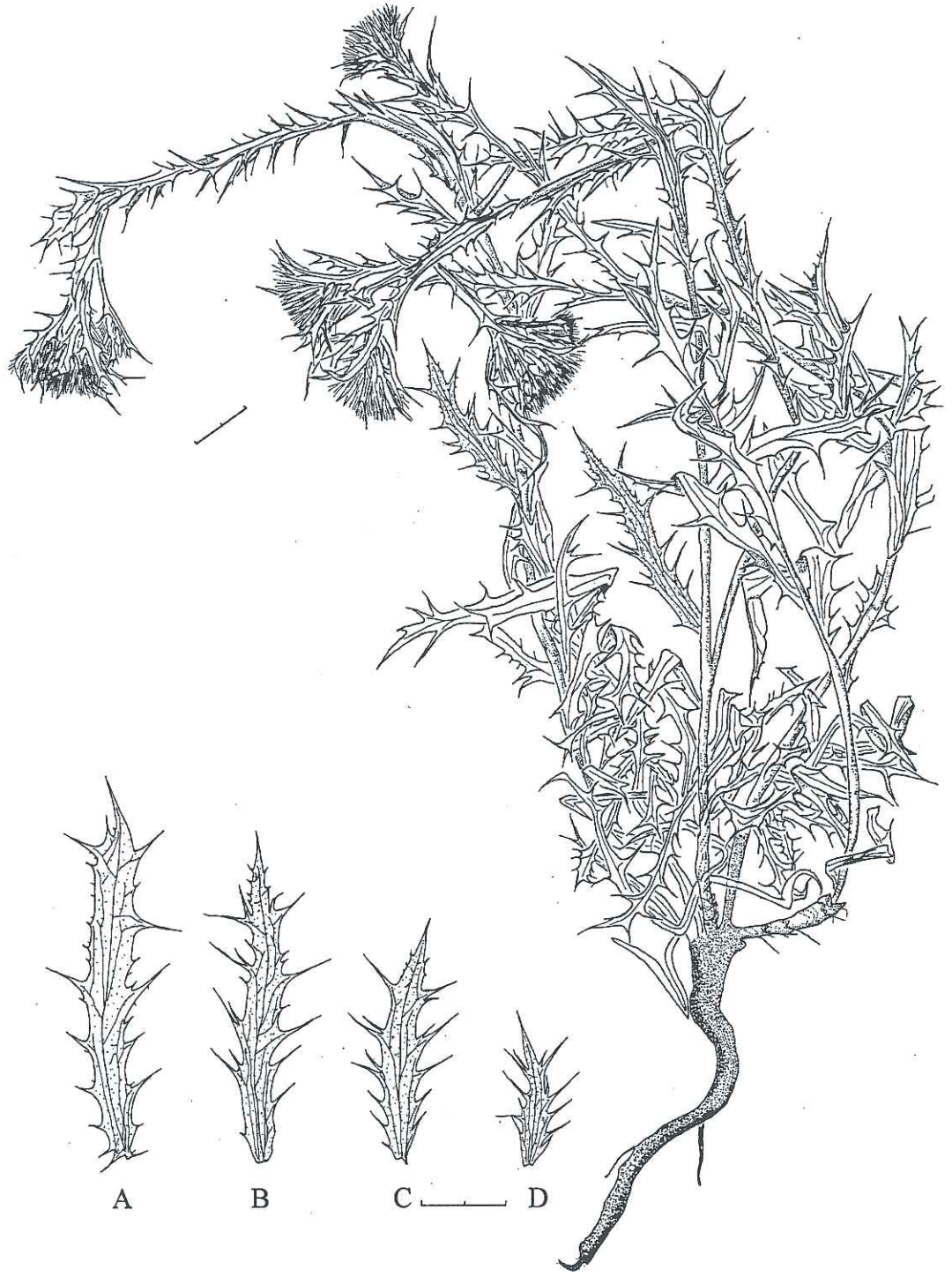
1500 m, *Bornm.* 1889: 1484, Direkli Köyü, Bayeyn mevkii, 700 m, dağ eteklerindeki taşlık vadi, 7.8.1987, *S.Peker* GAZI 1684! **A6 Sivas:** Yıldız Dağı, Çirçir, 1400 m, *Tobey* 2344, **A7 Gümüşhane:** Bayburt – Gümüşhane arası, 1800 m, *Furse* 4099, **A7;** Infra Gümüşhane, 1000 m, 18.8.1956, *K.H.Rehinger* 37712(W!) Aktaş Tepe, orman açıklığı, 1500-1700 m, 14.9.1995, *Cremca* 16695, EGE 26903! **B2 Denizli:** Demirciköy, Tatarcık mahallesi, kuzey batısı, step, 1350 m, 21.8.1984, *Z.Aytaç* GAZI 1655! **B3 Kütahya:** Gediz – Şaphane Dağı, 1100- 1300 m, *D.* 18466. **Konya:** Sultandağları- Cankurtaran üstleri, Gökbayır Tepe, 1800 m, 29.9.1976, *G. Dökmeci* ISTE 36064! **B4 Ankara:** Keçiören'nin kuzeyi viii 1906, *Frères E.C.*, Kızılcahamam: Soğuklu Milli Parkı, 13.9.1966, *Lelebici & Ersoy*, EGE 6332! **B5 Kayseri:** Kayseri yakınları, 1100m, *Bal.*, **B5;** Göreme, 1200 m, 26.8.1977, *F. Sorger* 77-68-12(W!), Alidağ, 30.7.1942, *A. Heilbronn & M. Başarman* ISTF 981! **Nevşehir:** Nevşehir- Zelve arası, 1130 m, volkanik tuf vadisi, 8.8.1989, *M.Vural & Ö.Eyüboğlu*, GAZI 5479! Zelve Dağı, volkanik tuf vadi, erozyon yamaç, 1250 m, 18.10.1989, *M.Vural&Ü. Kol* GAZI 5592! **B6 Malatya:** 40 km Malatya'nın batısı, *M. & D. Zohary* 28112, Darende yolu, 65 km, 1450 m, 17.8.1984, *Seçmen-Gemici* EGE 28442! **Kahramanmaraş:** Maraş 16 km. Göksun, Pinus pall.Wald 1330 m, 31.8.1977, *F.Sorger*, 77-79-3(W!) **Sivas:** Gök Pınar 1600 m, 7.9.1977, *F.Sorger* 77-1(W!) **Kayseri:** Sarız, Keklikoluk Köyü, Işık Dağı (Binboğa), step, 200-2300 m, 11.9.1991, *H.Duman* GAZI 3900! **B7 Erzincan:** Erzincan – Refahiye, 1400 m, 1957, *K.H:Rechinger*,15153(W!) Yaylabaş Köyü, Kazankaya Dağı, 1200-2000 m, 6.8.1980, *Ş. Yıldırım* (3797) HUB 31136! **Sivas:** Yama Dağları, 1700 m, 1.8.1976, *F.Sorger*, 76-13-13(W!) **Tunceli:** E. Ovacık, 15-25 km ENE linkes Seitental des Muzurfl 1700 m, 19.7.1982, *F. Sorger*, 82-128-6(W!) **Elazığ:** Malatya arası, Elazığ'dan 20 km sonra, step, 1.9.1954, *D.* 24804 AEF 7797! Göksun, Berit Dağı, Çavdar gediği, dağ stepi, 1800-2000 m, 11.9.1981, *B. Yıldız* (3365) HUB 31135! **B9 Bitlis:** Karz Dağı, 1900 m, *D.* 24553, **C2 Muğla:** Fethiye- Kayaköy arası, 9.8.1981, *N. Saraçoğlu& A. Meriçli* ISTE 47521! **C3 Antalya:** Kargı çayı – Beydam arası, 1200 m, *D.* 14262, **C4 Konya:** Karadağ – Karancı deresi, 2000 m, *D.*14627, Ermenek- Yellibel, açık taşlık yerler, 1700 m, 10.8.1979, *M.Vural* GAZI 1946! Ermenek, Göktepe kasabası, Dumlugöze (Muz vadisi) Köyü, 900-1200 m, 13.9.1983, *H. Sümbül* (2455) HUB 31132! Ermenek, Kazancı Kasabası civarı, 700-1100m, 14.10.1983, *H. Sümbül* (2611) HUB 31139! Hadim-Beyreli yolu, 1-2km,

step, 1800m, 1.8.2008, *Yıldız* 16839! **Antalya:** Gündoğmuş- Yelek Dağı arası, Beycukuru, taşlık kayalık yer, 1430 m, 5.8.1980, *E. Tuzlacı, B. Çubukçu, A. Meriçli* ISTE 45682! **Isparta:** Şarkikaraağaç- Kızıldağ Milli Parkı, Kıyakdede Dağı-Göztepe Dağı arası, 1200-1300 m, 23.7.1994, *B.Mutlu* (999) HUB 31132! **C5 Adana:** Gülek, Çiftlik'in 2km batısı, 800 m, *D. 16424*, **Konya:** Ereğli- Aydos Dağı, Delimahmutlu-Çakıllar arası, meşe ormanı, kalkerli yamaç, 1700m, 29.8.1977, *S. Erik* (2688) HUB 31137! **İçel:** Analanköy- Tirtal Köyü arası, 7.8.1980, 1580 m, *E. Tuzlacı, G. Sarıyar, A. Meriçli* ISTE 45707! **C6 Kahramanmaraş:** Engicek Dağının kuzeyi, yüksek dağ stepleri, 2100-2200 m, 29.8.1987, *H.Duman*, GAZI 3784!, Süleymancık, Ilıcak-Zorkun arası, 1500 m, 8.9.1981, *B. Yıldız* (3264) HUB 31130! Ahır Dağı, Tekeyatağı Bağları, step, 1350-1500 m, 2.3.1994, *H.Duman & Z. Aytaç* (4262) HUB 31129! Göksun, Kınıkkoz Köyünün doğusu, 1500 m, 21.8.1972, *B.Yıldız* (1481) HUB 31138! **Adıyaman:** Atatürk Barajı, 700 m, 13.7.1996, *N. Adıgüzel* GAZI 2740! **C9 Siirt:** Halakur dağı, Cizre'nin kuzeyi, 1500 m, *Nábělek* 3722.

Genel yayılışı: Lübnan



Şekil 3.6 *Carlina oligocephala* Boiss. & Kotschy subsp. *oligocephala* 'nın Türkiye'deki yayılışı



Şekil 3.7 *Carlina oligocephala* Boiss. & Kotschy subsp. *oligocephala*'nın genel görünümü (A rozet yaprak, B alt gövde yaprağı, C orta gövde yaprağı, D üst gövde yaprağıdır. Ölçekler 2cm'yi göstermektedir)

subsp. *pallescens* (Wettst.) Meusel & Kastner in Notes R.B.G. Edinb. 33:429 (1975). **Eř Adı:** *C. pallescens* Wettst. In Sitz.-Ber. Akad. Wiss. Wien 98:371, t. 3 f. 1-8 (1890) (şekil 3.7)

Gövde yapraklarının ayası, sert dikenli ve orta damarına kadar parçalanmış. Dikenler set, 2-2.5 cm. Korolla 14-16 mm, anterlerle aynı boyda, saman rengi, papus 12-14 mm, aken 4-6mm sık beyaz tüylü

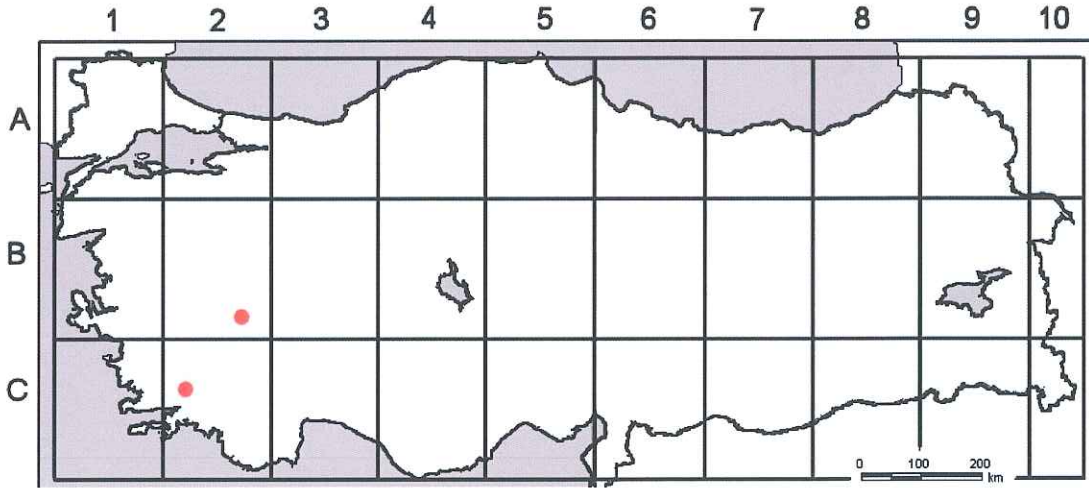
Çiçeklenme zamanı: Temmuz- Eylül

Yetiřme ortamı: *Pinus nigra*, *Quercus libani* ve *Q. aegilops* ormanları, dağ yamaçları, stepler, 100-2000 m

Tip örneği: [Turkey C3 Antalya] am Wege von Termessus nach Gülik Han, 1885, Heider (W!).

Türkiye'deki yayılışı: Güney batı Anadolu.**B2** Denizli: Demirciköy, Tatarcık mahallesinin kuzey batısı, step, 1350 m, 21.8.1984, Z.Aytaç, GAZI 1655!
C2 Muğla: Baba Dağ – Ovacık arası, Akbel yaylası, 1070m, D. 13695

Genel yayılışı: Endemik. Doğu Akdeniz elementi.



şekil 3.8 *Carlina oligocephala* Boiss. & Kotschy subsp. *pallescens* (Wettst.) Meusel & Kastner

Notlar: *C. oligocephala* Türkiye'de en yaygın türdür. Yaygın olmasına karşın ayırt edilmesi ve tanınması kolaydır. Ülkemizde yetişen tüm türlerden

kolaylıkla ayırt edilebilir. Tüm bitki keçemsi örümcek ağı tüylüdür. Tabanda sık kalıcı rozet yapraklar mevcuttur. Gövde yaprakları şekil ve büyüklük olarak benzer, kapitulum çan şeklindedir. Dış fillariler içtekilerden uzun ve iç fillarilerin saman rengi olmasıyla diğer türlerden farklıdır.

Türün Antalya, Muğla ve Denizli yörelerinde bulunan popülasyonlarında bireyler daha kulakçıl karakterlidir. Yapraklar daha derimsi ve kuvvetli-uzun dikenlidir. Bu özellikleri ile *C. corymbosa*'ya yaklaşmaktadır. Bu nedenle ayrı bir alttür olarak kalması uygundur.

3.1.3.5 *C. involucrata* subsp. *Poiret libanotica* (Boiss.) Meusel & Kästner in Notes R.B.G. Edinb. 33:429 (1975). Eş Adı: *C. libanotica* Boiss. Diagn. Ser. 1(10):95 (1849), *C. corymbosa* L. var. *libanotica* (Boiss.) Boiss., Fl. Or. 3:450 (1875), *C. pallescens* Wettst. In Sitz.-Ber. Akad. Wiss. Wien 98:371, t. 3 f. 1-8 (1890) (Şekil 3.9, Şekil 3.10)

Çok yıllık, odunlu tabandan dallanmış. Gövde (29-)33-45(-72) cm, dik, sert, dallanmamış, bazen uçlarda 1-2 kapitulumlu. Tabanda birkaç bazal yapraklı, bazal yaprakların alt ve üst yüzeyi tüsüz; gövde alt yaprakları oblong-lanseolat; gövde orta yaprakları oblong-eliptikten eliptiğe kadar, gövde üst yaprakları sık tüylü genellikle triangular, boyu eninin 4.5-6'sı kadar, dikenli 1-4 mm, sert. Kapitulumlar geniş terskonikten koniğe kadar, (2-)2.5-3.5(-4.0) cm genişlikte. Dış fillariler lanseolatdan lineer-lanseolata kadar, tabanda belirgin klavatlı, (3.9-)4.5-5.5(-6.5) cm, iç fillarilerden uzun; iç fillariler parlak sarı. Korolla 12-14 mm; anterlerler korollaya eşit, saman rengi. Papus 12-14 mm. Aken 4-5 mm, filamentler seyrek beyaz tüylü.

Çiçeklenme zamanı: Temmuz-Ağustos

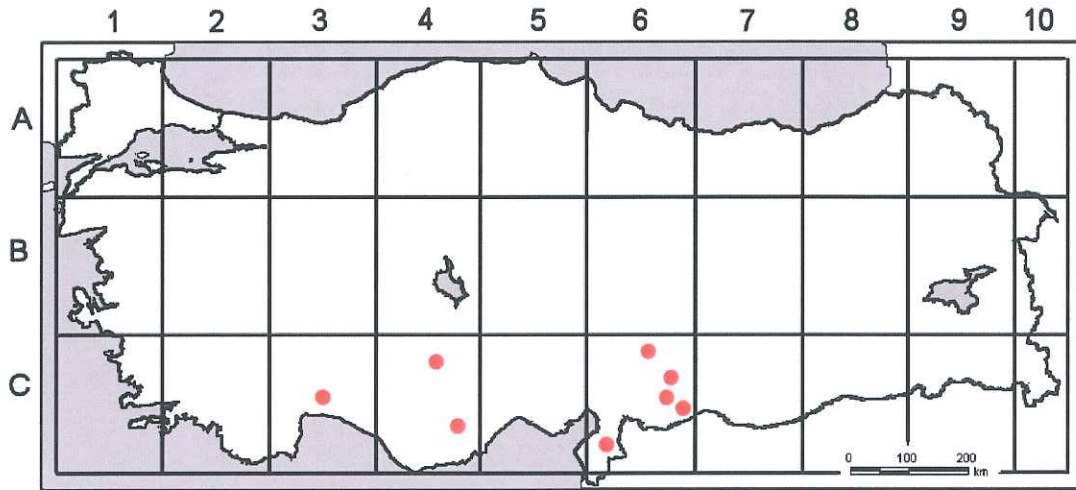
Yetiştirme ortamı: Kuru otlaklar, kayalık bayırlar, *P. brutia* orman açıklığı, 400-2000m

Lektotip: [Lübnan]in regione intermedia Libani circa Deir el Kammar, vii 1846, *Boissier* (G!).

Türkiye'deki yayılışı: Güney Anadolu (Amanus, Anti- Taurus). **C3 Antalya:** Konyaaltı, kumul, 10m, 4.9.1980, *N. Özhatay, E. Tuzlacı, B. Çubukçu, A. Meriçli* ISTE 45666a!, **C3 Antalya:** Antalya- Termessus Milli parkı,

Yıldız,(BY17083)! **C4 Konya:** Ermenek- Gülner yolu, 3-4 m, tarla, 1100m, 20.7.1983, *M. Koyuncu* 6667, AEF 11728. **İçel:** Mut- Ermenek yolu, Evren Köyü çevresi, yol kenarı, 200 m, 24.7.1981, *B.Yıldız* 1983, AEF 11729. **C6 Kahramanmaraş:** Süleymanlı- Avcılar Kuzey doğusu, 700, *Pinus* ormanı, 8.9.1981, *B. Yıldız* (3285) HUB 31140! **Adana:** Bahçe dağı, Haruniye, 400 m, *D.1645*, **Adana/Hatay:** Amanus, 1300-2000 m, *Haradj.* 1913, Osmaniye, Kuşcubeli-Nurdağ arası, 1300-1400 m, 1.9.2006, *Yıldız* (BY16422) Osmaniye: Bahçe-Hasanbeyli arası, *P. brutia* orman açıklığı, 1.7.2010, *Yıldız* (BY16145)! **Hatay:** Hatay- Belen Sırtları, 20.9.1976, *M. Miski* ISTE 35965! Maraş: Maraş 20 vii 1865, *Hauskn.*

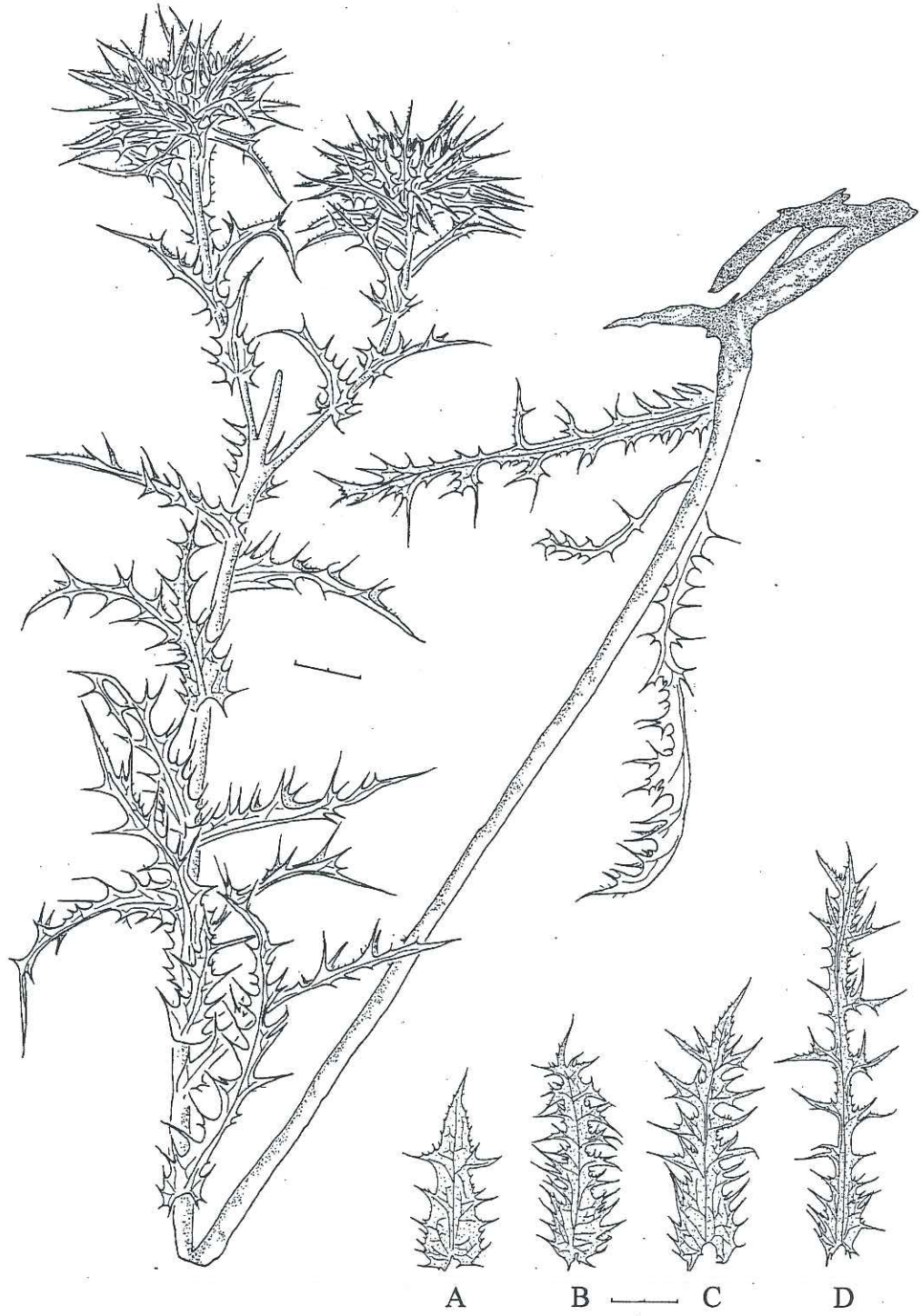
Genel yayılışı: Lübnan, Doğu Akdeniz elementi.



Şekil 3.9 *Carlina involucrata* Poiret subsp. *libanotica* (Boiss.) Meusel & Kästner'nın Türkiye'deki yayılışı

Notlar: *Carlina involucrata* subsp. *libanotica* Türkiye türlerinden *C. corymbosa*'ya yakındır. Gövdesinin kalın, sadece uçta az dallanmış olması, yaprak ayasının 3/4'ünden orta damara kadar bölünmüş olması, kapitulunun 4-5 cm eninde olması, dış fillarilerin iç fillarilerden uzun ve sert dikenli olması ile *C. corymbosa*'dan farklıdır.

Daha önce Kahramanmaraş ve Amanos dağlarından kayıtlı olan alttürün Antalya'ya kadar yayıldığı belirlenmiştir.



Şekil 3.10 *Carlina involucrata* Poiret subsp. *libanotica* (Boiss.) Meusel & Kästner'nin genel görünümü (A üst gövde yaprağı, B orta gövde yaprağı, C alt gövde yaprağı, D rozet yaprağıdır. Ölçekler 2cm'yi göstermektedir)

3.1.3.6 C. lanata L. Sp. Pl. 828 (1753). Ic: Sibth. & Sm., Fl. Graeca 9: t. 836 (1837); Reichb., Ic. Fl. Germ. 15: t. 743 (1852). (Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13)

Tek yıllık, nadiren iki yıllık, otsu bitkiler. Gövde (5-)15-23(-30) cm, tüylü, dallanmamış ya da üstte kimoz dallanmış, taban yaprakları yok ya da az. Yaprakları yünsü- keçemsi tüylü; alt gövde yaprakları ± yumuşak, oblanseolat, pinnatilobat; orta ve üst gövde yaprakları sert, dar oblong-eliptikten lanseolata kadar, uzun, dağınık dikenli. Kapitulular (1.2-)1.5-2(-3) cm genişlikte. Dış fillariler lanseolat, dağınık dikenli, oblong, iç fillarilerden uzun; iç fillariler lineer, mor, gümüşü-beyaz ya da gümüşü-mor. Korolla 10-14 mm, anterler 8-10 mm, korolladan çıkmış, saman rengi. Papus 12-14 mm. Akenler 3-4 mm, seyrek beyaz tüylü.

Çiçeklenme zamanı: Haziran- Ağustos

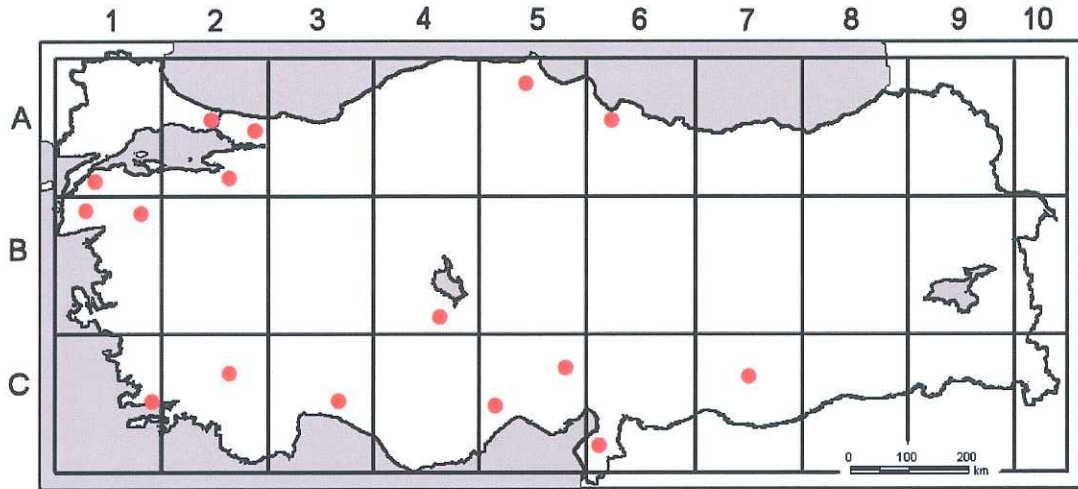
Yetiştirme ortamı: Kuru çayırlar ve kayalık bayırlar, stepler, 10-800m

Tip örneği: İtalya, Güney Fransa'da tanımlanmıştır (Hb. Linn. 970/3)

Türkiye'deki yayılışı: **A1(A) Çanakkale:** Sarıyer dağının yakınları, *Sint.* 1883:691, Gökçeada: Aydıncık Burnu, Tuz gölünün Batısı, tuzlu habitat, 11.8.1976, *Seçmen&Leblebici*, EGE 20027! Gökçeada deniz kenarı, 29.7.1975, *Seçmen-Leblebici* EGE 20025! Kumkale, tuzlu kurumuş bataklık, 31.7.1971, *A. Baytop* ISTE 20837! Eceabat- Seddülbahir civarı, 21.7.1975, *N. Özhatay& E. Özhatay* ISTE 33002! **A2(E) İstanbul:** Küçükçekmece- Büyükçekmece arası, *A. Baytop* ISTE 11737! Kartal- Yakacık, yol kenarı, çayırılık alan, 17.7.1972, *H. Demiriz, A. Aydın, İ. Odice* ISTF 26489! Tuzla, 6.7.1945, *Heilbronn* ISTF 5394! Çatalca tren İstasyonunun batısındaki dere kenarı, 25.7.1972, *N. Özhatay& E. Özhatay* ISTE 23008! Caddebostan, çayırılık alan, 20 m, 27.7.1951, *H. Demiriz* ISTF 11465! Bayramoğlu, Yelkenkaya (İş Bankası Tesisleri) girişi, 28.7.1972, *H. Argöksel* ISTE 23017! **A2(A) Kocaeli:** Üsküdar'dan İzmit'e 30km, 50 m, *McNeill* 220, Bayramoğlu- Çayırova, yol kenarı, 23.8.1967, *B.Tut, A.Aydın* ISTF 22682! Yalova, 8.1943, *A.Mete* ISTF 2571! Yalova, 8.1943, *A.Mete* ISTF2751! **A5 Sinop:** 10 m, D.38089, **A6 Samsun:** Hacı İsmail Köyü yakınları, 30 m, *Tobey* 854, **B1 Çanakkale:** Kumkale, *A. Baytop* (ISTE 20837!) Ayvacık, Behramkale Köyü, Kadirga mevki, d.s., 11.7.1983, *K. Alpınar* ISTE 51659! Balıkesir: Balya- Yenice arası, *Yıldız& Dirmenci*, 350-400 m (BY16501)! İvrindi, 16.8.1980, *G. Çakırer* ISTE 45803a! Ayvalık- Alibey Adası duba, 6 m, 3.7.1995 ISTE! **İzmir:** Çamaltı Tuzlası,

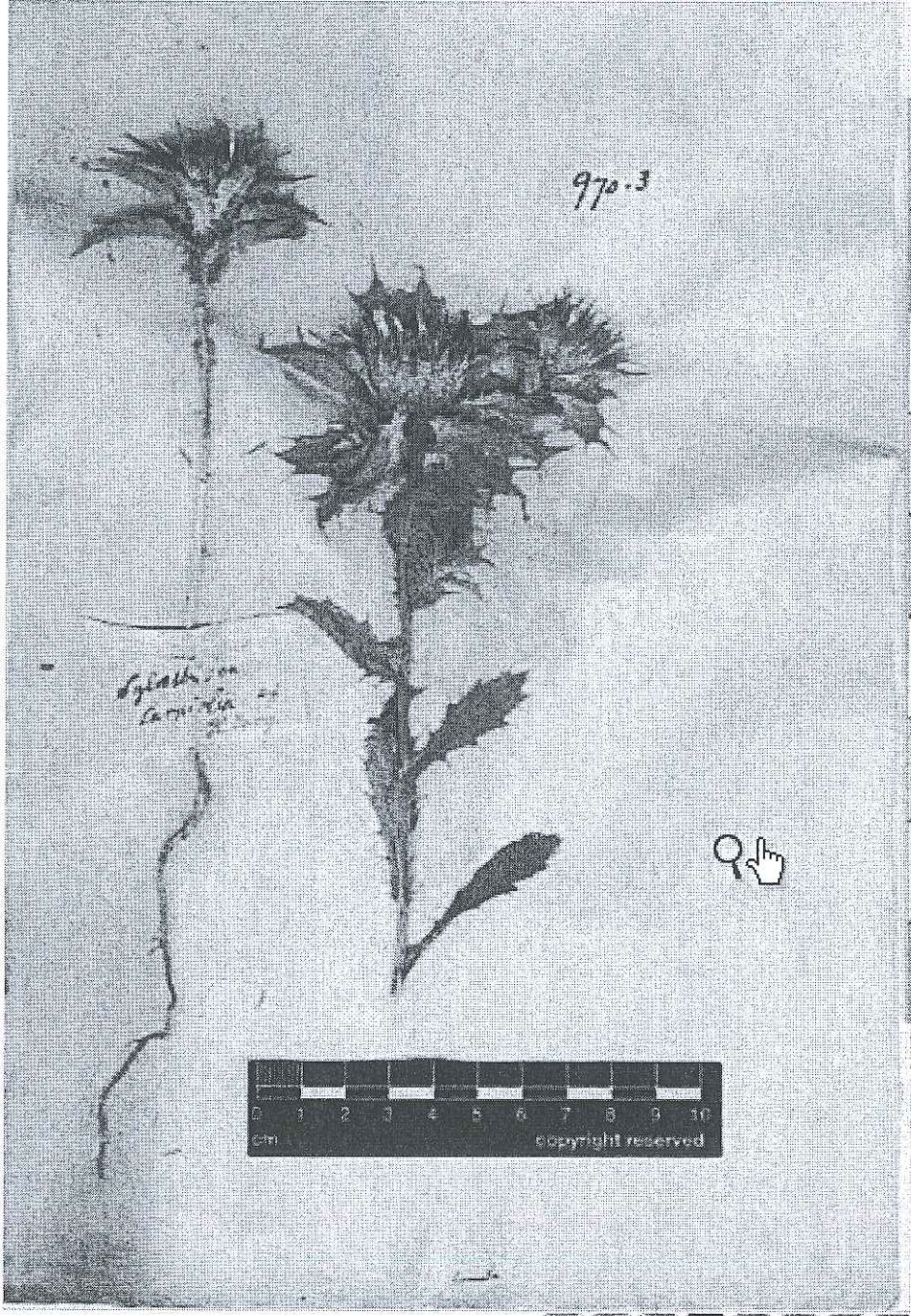
Üç Tepeler yoluşu, tarla kenarı, 22.6.1994, *Kayıkcı*, EGE 37596! **B4 Konya:** Cihanbeyli- İnsuyu, 14.6.1942, *M. Başarman* ISTF 1671! **C1 Muğla:** Datça- Knidos Harabeleri, 10 m, 4.7.1983, *E. Tuzlacı* ISTE 51555! Bodrum- Kargı kıyı kayalığı, d.s., 7.7.1983, *E. Tuzlacı* ISTE 51615! **C2 Denizli:** Denizli'nin 10 km batısı, *M. & D. Zohary* 9410, **C3 Antalya:** Serik, *Khan et al.* 183, İçel- Anamur: Aksas: Gilindere, 5.6.1950, *A. Attila* ISTF 10291! Finike- Kale arası, Beymelek çevresi, 13.7.1984, *Hostvig- Seçmen- A. Strid* EGE 31333! **C5 Adana:** Seyhan, havaalanı karşısı, 100 m, 6.7.1998, *B. Mutlu* HUB 4104! **İçel:** Cennet, Silifke'nin 16 km doğusu, 40 m, *Sorger* 71-22-11, Avlan Gölü kıyıları, 28.6.1979, *Seçmen, Leblebici*, EGE 16476! **C6 Hatay:** Hassa, 750 m, *Aberdeen Univ. Amanus Exped.* K1 735, **C7 Şanlıurfa:** Ceylanpınar- Büyük Çırçıp Deresi, dere yatağı, 530 m, 11.7.1996, *N. Adıgüzel* GAZİ 2719!.

Genel yayılışı: Ege Adaları, Akdeniz elementi.

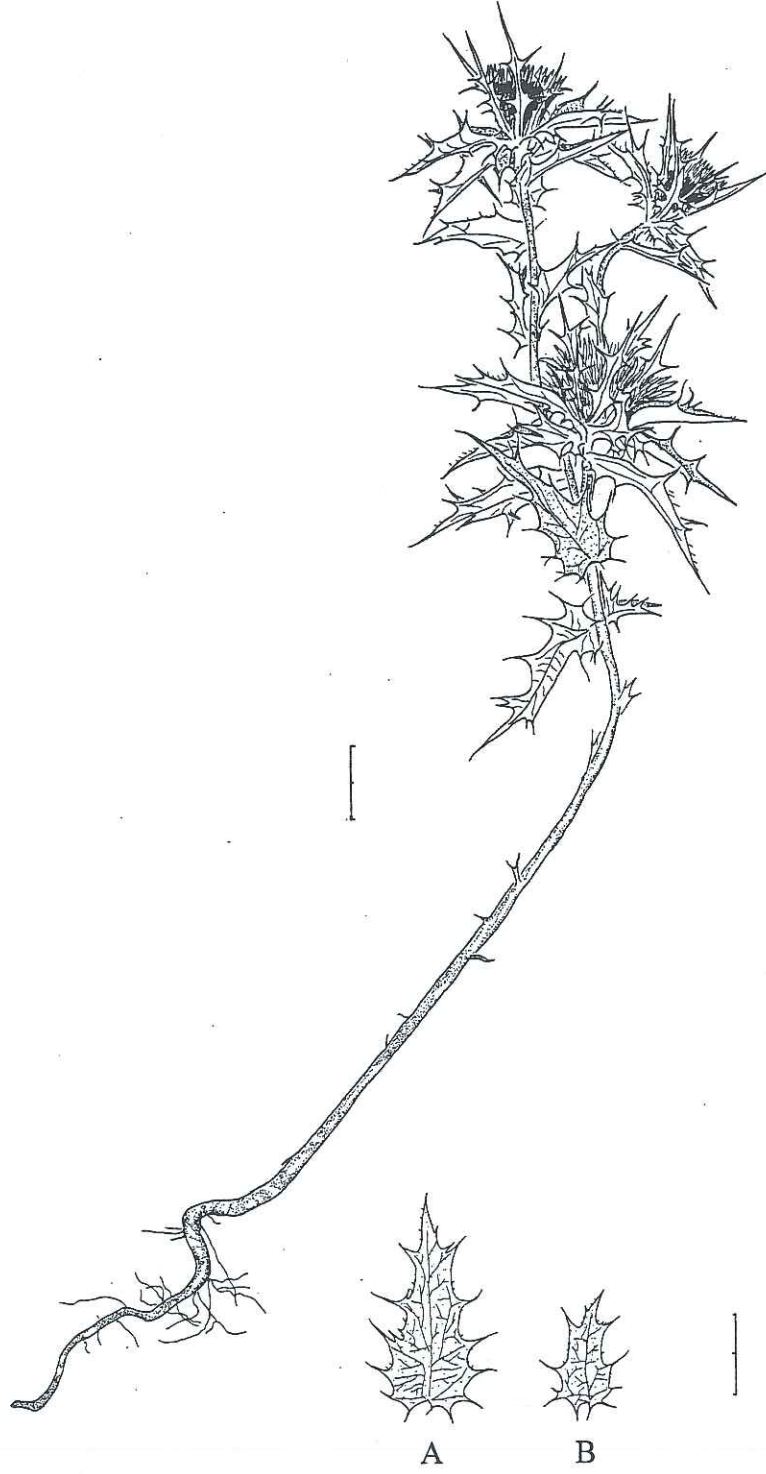


Şekil 3.11 *Carlina lanata* L.'nin Türkiye'deki Yayılışı

Notlar: *C. lanata*'nın Türkiye'de yetişen türler arasında yakın akrabası yoktur. Tek yıllık olması, iç fillarilerin genellikle mor renkli olması ile diğer türlerden farklıdır ve kolayca ayırt edilebilen izole bir türdür.



Şekil 3.12 *Carlina lanata* L.'nin Tip Örneği [117]



Şekil 3.13 *Carlina lanata* L.'nin Genel Görünümü (A orta gövde yaprağı, B üst gövde yaprağıdır. Ölçekler 2cm'yi göstermektedir)

3.1.3.7 *C. vulgaris* L. Sp. Pl. 828 no. 4 (1753), err. '*corymbosa*' (cf. Errata). **Eş Adı:** *C. vulgaris* L. f. *brachyphylla* Hausskn. In Mitt. Bot. Ver. Ges. 6: 26 (1888), *C. vulgaris* L. f. *leptophylla* Hausskn., loc. cit., pro parte, non Griesselich (1836), *C. semiamplexicaulis* Form. in Öst. Bot. Zeitschri 40:86 (1890), *C. rigida* Form. in Verh. Nat. Ver. Brünn 34:305 (1895), *C. striata* Form Brünn 37:169 (1898). Ic: Hegi, III. Fl. Mittel-Eur. 6(2):822, 824, t. 269 (1928). (Şekil 3.14, Şekil 3.15)

Monokarpik, çoğunlukla iki yıllık, bazen tek yıllık, yarı rozetsi bitkiler. Gövde (15-)20-40(-50) cm. Yapraklar undulat-dentat, alt yüz örümcek ağı tüylü, kulakçık yok ya da küçük, dişler delici, dağınık pulsu diken loblu, 1-3mm zayıf dikenli. Roset ve alt gövde yaprakları 5- 8(-10) cm, oblong-lanseolat, orta gövde yapraklar aniden kısalır; (2-)3- 4(-5.5) cm, ovat-lanseolat; üst yapraklar 2-3cm, ovatdan ovat-oblonga kadar. Kapitula 1.5- 2.5(-4)cm genişliğinde, dalda tek. Dış fillariler oblong-lanseolat, saman rengi iç fillarilerden kısa, sık örümcek ağı tüylü, uçta dallanmış dikenli, dikenli kısım mor. İç fillarilerin dışı orta kısımlarda mor. Korolla 8-9 mm uç kısımları mor, anterler uç kısımları hariç mor ve tabanda tüylü 10-12 mm, korolladan 1-2 mm kadar dışarı çıkmış. Papus 8-9 mm, aken 2 mm, kısa, sık, kahverengi tüylü.

Çiçeklenme zamanı: Haziran- Ağustos

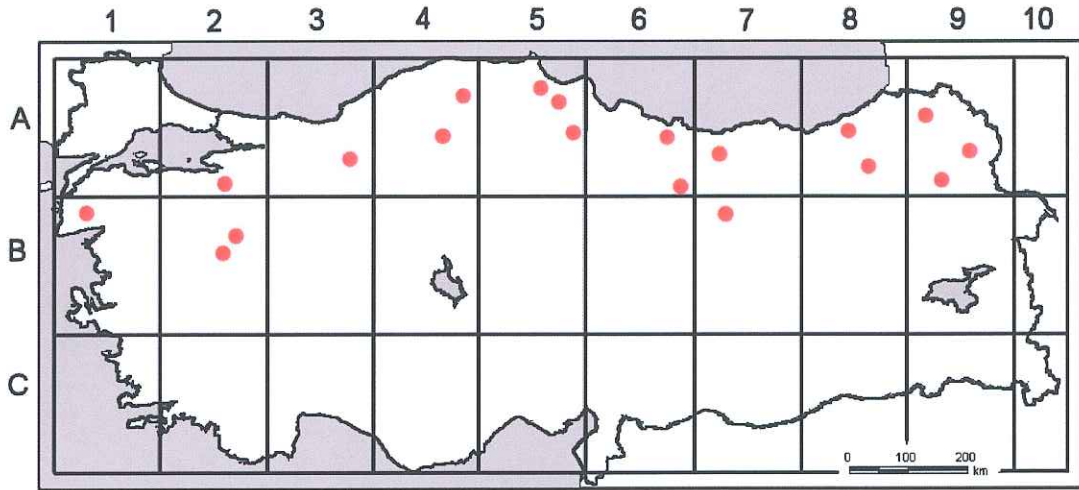
Yetiştirme ortamı: *Fagus*, *Carpinus* ve *Pinus sylvestris* ormanları, dere kenarları, açık kayalık otlaklar ve kaya çıkıntıları, 700-2000m.

Tip örneği: Avrupa'dan tanımlanmıştır (Hb. Cliff., Hb. Linn. 970/5)

Türkiye'deki yayılışı: **A2(A) Bursa:** Uludağ- Gökdere yolu, 9.9.1944, *M. Başarman* ISTF 4818! **A3 Bolu:** Akyarma, 120 km Ankara'nın kuzey doğusu, 1560 m, *Kukkonen* 8237, Düzce, 1.7.1978, *M. Pirdal* EGE 33386! **A4 Kastamonu:** Ilgaz dağı etekleri, 1400 m, *D.* 38300, Tosya- Gavur Dağı, gölet yolu, 1200 m, 11.9.1990, *Z. Aytaç* GAZİ 3395! Tosya'ya 25 km kala, yol kenarı, 1450 m, 6.9.1994, *N. Adıgüzel & ark* GAZİ 1792, **Çankırı:** Atkocalar- Dumanlı Dağı, Aşarkale Tepesi mevki, step, 1300 m, 18.8.1991, *H. Duman* GAZİ 1449! **A5 Sinop:** Gerze- Boyabat arası, 1200 m, *D.* 25023, Boyabat arası, 1300 m, *Yıldız & Dirmenci*, (BY16571)! Boyabat arası, Dranaz Geçidi, 18.8.1973, *F. Holtz*, EGE 23355! **Amasya:** Suluova-Aktaş yolu, Karahise Köyü, Sugözü Yaylası, 1500 m, 12.8.1977, *ISTE* 38404! **A6 Ordu:** Çambaşı, 1900 m, *Tobey* 1287, **Sivas:** Şerefiye, Çamlıkale Köyü-Kösedağ arası,

1600-1700 m, *Yıldız&Çelik* (BY 4828)! **A7 Giresun:** Balabandağları, Tamdere civarı, 2000 m, D.20488, **A8 Rize:** Güneyce- İkizdere arası, 700 m, D. 20841, **Erzurum:** Tortum, Azort Yaylası, Azort Köyü deresi, 1000-2500 m, 28.7.1984, *Demirkuş* (2142) HUB 31123! 31124! **A9 Ardahan:** Posof- Türközü arası, 1800 m, *Yıldız-&Dirmenci* (BY16335)! Posof- Türközü arası, 1500,24.8.2010, *Yıldız-&Dirmenci* (BY17165)! **Kars:** Sarıkamış, 22.7.1947, *M. Heilbronn & M. Başarman* ISTF 7961! Göle, Balçesme 2200 m, 16.8.1984, *Demirkuş* (2698) HUB 31126! **Artvin:** Şavşat, Sahora, Kocabey Kışlası, yol kenarı, 1550 m, 18.9.2004, *H. Altınözlü* HUB 4262! **B1 Balıkesir:** Edremit, 1230 m, *Aydoğan & Sönmez* (ISTO 7373), **B2 Kütahya:** Simav, Kiçir orman bölgesi, 1125 m, *Celik & Ener* (ISTO 7551), Gediz- Murat Dağı, Çukurören yolu, taşlık- çayırılık alan, 1200 m, 2.8.1980, *A. Çırp.* ISTF 34497! **B4 Ankara:** Kızılcahamam Soğuklu Milli Parkı, 13.9.1966, *Leblebici-N. Ersoy* EGE 6332! **B7 Erzincan:** Sipikör, Kainik deresi, *Sint.* 1890:3280.

Genel yayılışı: Kafkasya, kuzey batı İran.



Şekil 3.14 *Carlina vulgaris* L. 'nın Türkiye'deki Yayılışı

Notlar: *C. vulgaris*, *C. intermedia* ve *C. biebersteinii* Türkiye'de yetişen yakın akraba üç türdür. Örnekler uygun ve yeterli olmaz ise ayrımları zordur. Özellikle *C. biebersteinii* ve *C. vulgaris*'in yayılış alanları da çakıştığı için benzerlik biraz daha fazladır. Rozet yaprakların toplanmasına özellikle dikkat edilmesi gerekir. Rozet yaprakları en kısa olan tür *C. vulgaris*'dir. En fazla 10 cm'e ulaşmaktadır. Diğer iki türün ise en az 10 cm ve daha uzundur.

Orta gövde yaprakları en kısa ve geniş olan tür *C. vulgaris*'dir. Bu türde orta gövde yaprakları dikenler hariç 5.5x2 cm'e kadardır.



Şekil 3.15 *Carlina vulgaris* L. 'nın Genel Görünümü. (A-B üst gövde yaprağı, C-E orta gövde yaprağı, D alt gövde yaprağıdır. Ölçekler 2cm'yi göstermektedir)

3.1.3.8 C. intermedia Schur, Enum. Pl. Transs. 413 (1866). Eş adı: *C. longifolia* Reichb. var. *brevibracteata* Andrae in Bot. Zeitung 13:313 (1855), *C. brevibracteata* (Andrae) Simonkai Enus. Pl. Transs. 342 (1887), *C. vulgaris* L. f. *leptophylla* Hausskn. In Mitt. Bot. Ver. Ges. 6:26 (1888) pro parte, non Griesselich (1836), *C. semiamplexicaulis* Form. var. *angustifolia* Form in Verh. Nat. Ver. Brünn 32:163 (1893), *C. vulgaris* L. *intermedia* (Schur) Hayek, Prodr. Fl. Balc. 2: 694 (1931). (Şekil 3.16, Şekil 3.17)

Genellikle çok yıllık, bazen iki yıllık, semi-rosulat bitkiler. Gövde (25-)30-45(-50) cm. Gövde yaprakları düz ya da undulat, örüncek ağsı tüylüden örüncek ağsı -lanata kadar, kısa dikenli loblu, uç dikene doğru dereceli olarak daralır, rozet yapraklar 8-20 cm, dar lanseolat, alt ve orta gövde yapraklarına doğru kademeli küçülür. Orta gövde yaprakları 6-8 cm, lanseolattan oblong-lanseolata doğru değişir; üst gövde yaprakları 2-3.5 cm, lanseolattan ovat-lanseolata kadar. Kapitulumlar (1-) 2-2.5 cm genişlikte, involoukrum keçemsi tüylü. Dış fillariler ± dağınık pulsu dikenli, iç fillarilerden kısa, iç fillariler saman rengi. Korolla 12-15 mm; anterler 9-11 mm, korolladan 0.5 mm kadar dışarı çıkmış, saman rengi. Papus 12-14 mm. Akenler 3-4 mm, sık beyaz tüylü.

Çiçeklenme zamanı: Haziran- Ağustos

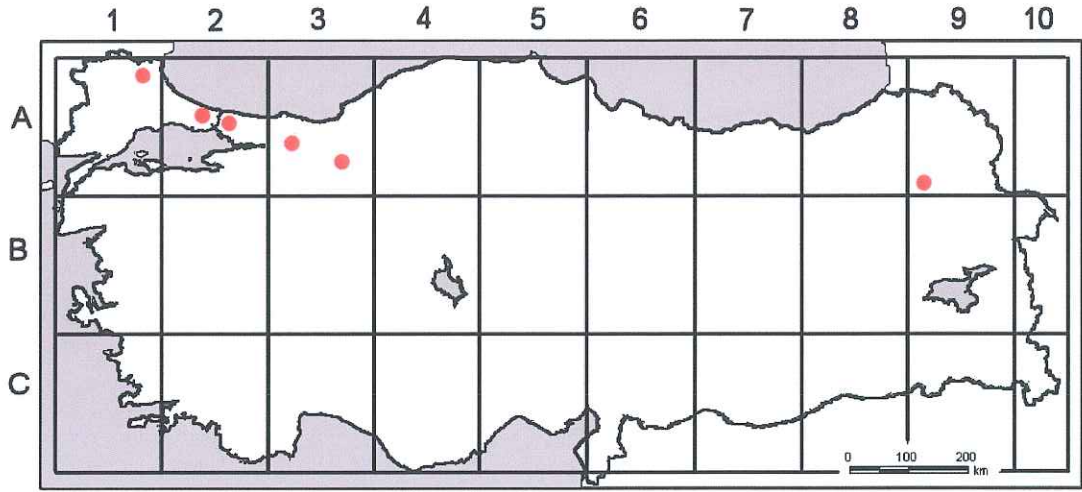
etişme ortamı: otlu bayırlar, makiler, otlaklar, 250m

Genel yayılışı: Orta & güney doğu Avrupa.

Sintip:[Rumania] an waldigen Orten und zwischen Gebüschchen der Hügelund Berggion, vonzöglich auf Kalkboden, oberhalb der Weinberge bei Hammersdorf, auf dem Schlossberge bei Kronstadt, 460-915m, Jul. Aug., *Schur*.

Türkiye'deki yayılışı: Kuzey batı Anadolu (A1)E **Kırklareli:** Üsküp, 300m *Yıldız&Dirmenci*, (BY16526)! **A2(E) İstanbul:** Zekeriyaköy, 29 vi 1891, *Azn.*, **A2(A) İstanbul:** Beykoz, Kirazlı, 100m, yol kenarı, 9.8.2001, *H. Altınözlü* HUB 3681! **A3 Karabük:** Yenice arası, 200 m, *Yıldız& Dirmenci*, (BY14542)! **Sakarya:**Hendek yakınları, İbrik deresi, 250 m, *Czeczott* 716.

Genel yayılışı: Orta& Güneybatı Avrupa.



Şekil 3.16 *Carlina intermedia* Schur'nın Türkiye'deki Yayılışı

Notlar: Türkiye'de sadece batı Marmara Bölgesi ve Batı Karadeniz'de bulunan bu tür, yapraklarının alt yüzünde sık keçemsi- örümcek ağı tüylü olması ve kapitulunun daha küçük olmasıyla (en fazla 2 cm eninde), iç fillarilerin krem rengi olmasıyla *C. vulgaris* ve *C. biebersteinii*'den farklıdır.



Şekil 3.17 *Carlina intermedia* Schur'nın Genel Görünümü. (A rozet yaprak, B alt gövde yaprağı, C-D orta gövde yaprağı, E üst gövde yaprağıdır. Ölçekler 2cm'yi göstermektedir)

3.1.3.9 *Carlina biebersteinii* Bernh. ex Hornem. Hort. Hafn. Suppl. 94 (1819). Eş Adı: *C. longifolia* Reichb., Pl. Crit. 8:25, t. 1008 (1830), non Viv. (1824), *C. vulgaris* L. f. *leptophylla* Griesselich, Kl. Bot. Schr. 1:104 (1836), *C. vulgaris* L. var. *stenophylla* Rota, Prosp. Fl. Prov. Bergamo 55 (1853), *C. longifolia* Reichb. var. *pontica* Boiss., Fl. Or. 3:449 (1875), *C. vulgaris* L. subsp. *longifolia* (Reichb.), Nym. Consp. 401 (1879), *C. stricta* (Rouy) Fritsch, Excursionsfl. Österr.ed. 2, 635 (1909). Ic: Hegi, III. Fl. Mittel-Eur. 6(2):823 (1928). (Şekil 3.18, 3.19)

Genellikle iki yıllık, semi-rosulat bitkiler, gövde (12-)15-30 cm. Yapraklar genellikle düz, alt yüz örümcek ağı tüylüden lanata kadar, dentat dikenli, uca doğru dereceli olarak daralır. Rozet yapraklar 10-20 cm, lanseolat, alt ve orta gövde yapraklarına doğru dereceli olarak küçülür. Orta gövde yaprakları (6-)7-13 cm; üst gövde yaprakları (3-)4-6(-7) cm, oblong-lanseolat. Kapitulumlar (2-)2.5-3.5 cm. Korolla 10-11mm korolla dişleri mor, anterler 10 mm korolladan 2mm dışarı çıkmış orta kısımları mor, papus 17-19mm, akenler 4-6mm beyaz tüylü. Dış fillariler lineer-lanseolat, spinose-denticulat, iç fillarilere yakın eşitlikte, iç fillariler saman rengi. Şekil 3.17, 3.18)

Çiçeklenme zamanı: Haziran- Ağustos

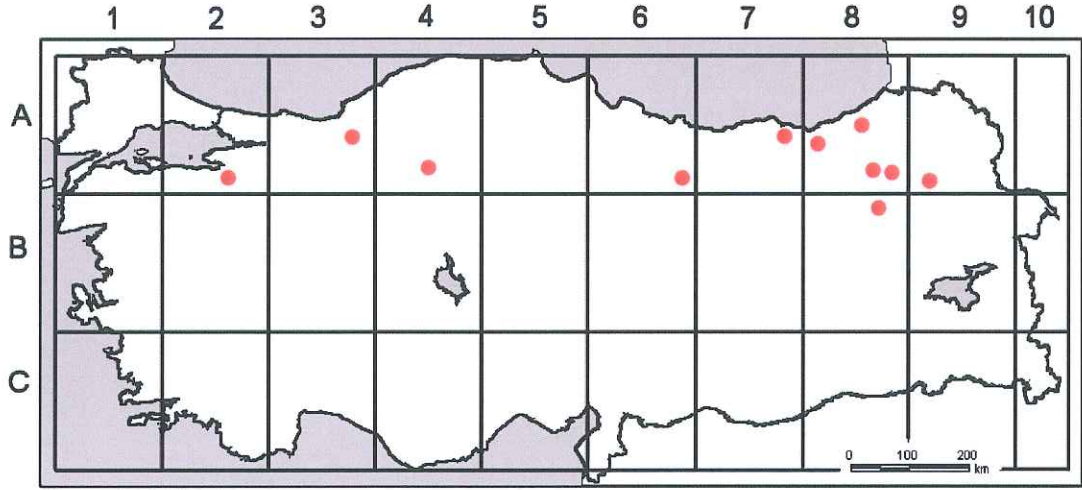
Yetiştirme ortamı: step bozkır, 1600-2000m

Türkiye'deki yayılışı: Kuzeybatı Anadolu & Batı Anadolu çevresi A2(A)

İstanbul: Beykoz, Kirazlı, 100 m, yol kenarı, 9.8.2001, *H. Altınözlü* HUB 3682!
Bursa: Uludağ: Bakacık, 4.8.1944, *M. Başarman* ISTF 4646! **A3 Bolu:** Yedigöller yolu, 900 m, 11.8.1988, *K. Alpınar&H. Hart* ISTE 59452! **A4 Ankara:** Çubuk-Karagöl arası, *Pinus- Populus* karışık ormanı, 15.8.1973, *S. Erik* (407) HUB 11120!
A6 Sivas: Yıldız dağı, *Wiedemann.*, Maraş çukuru, 1400 m, step, 25.7.2010, *Yıldız* 17116!
A7 Trabzon: Soğanlı geçidi, 1600 m **A8 Trabzon:** Çaykara- Bayburt yolu, Çaykara'dan 22 km sonra, Köknar Köyü, 100 m, 6.10.1982, *E. Nyholm* ISTE 49801!
Erzurum: Dijimil (Cimil), 2000 m, **Rize:** İkizdere, Dereköy- Çiftköprü arası, 1200 m, kayalık, 22.8.1985, *A. Güner, M. Vural* (AG 6885) HUB 31125! Çamlı Hemşin, Meydan-Çat Köyleri arası, 1050 m, 25.8.1983, *A. Güner* (5378) HUB 31121!
Erzurum: Erzurum İspir arası, Çatak Köyünün batısı, MezraaTepe, *Populus* ormanı, 2150 m, 17.8.1976, *A. Tatlı* (5447) HUB 1119!
A9 Erzurum: Olur-Akdağlar arası, 1500 m, *Yıldız*, (BY16891)! Şenkaya- Yaymeşe Köyü (Armişen), *P. sylvestris*

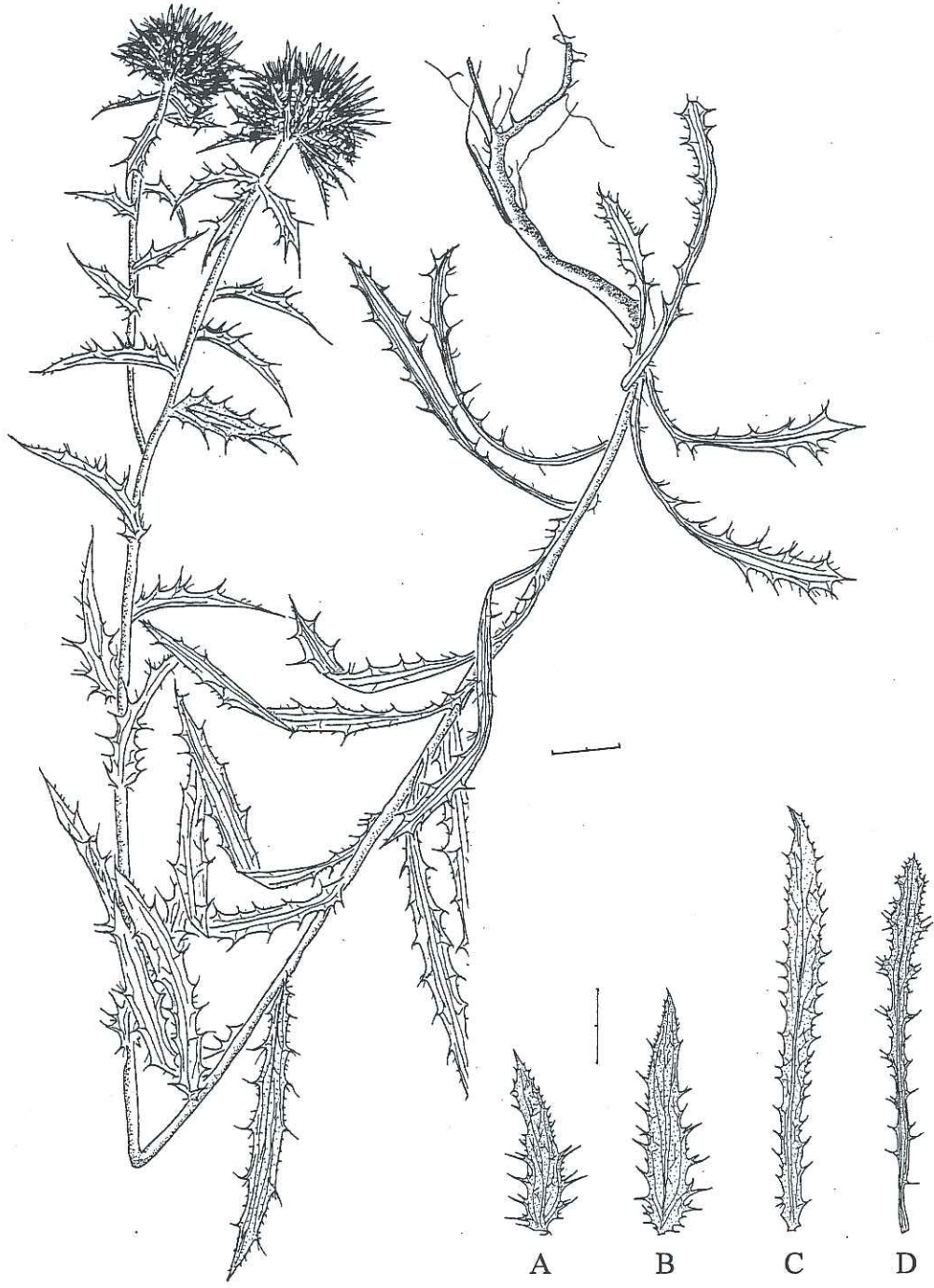
açıklığı, 2500 m, 11.9.1993, Y.Altan GAZI 5701!. Oltu- Başbağlar Köyü arası, 2150 m Yıldız, (BY 16342!).

Genel yayılışı: Kuzey, orta & batı Avrupa, Yugoslavya.



Şekil 3.18 *Carlina biebersteinii* Bernh. ex Hornem.'nın Türkiye'deki Yayılışı

Notlar: *C. biebersteinii* *C. vulgaris*'e yakın bir türdür. Ancak gövde orta yaprakları 10 cm kadar, lineer lanseolat ve lanseolat olmasıyla farklıdır.



Şekil 3.19 *Carlina biebersteinii* Bernh. Ex Hornem.'nın Genel Görünümü. (A üst gövde yaprağı, B orta gövde yaprağı, C alt gövde yaprağı, D rozet yaprağıdır. Ölçekler 2cm'yi göstermektedir)

3.1.3.10 *Carlina* sp. (BY 16509) (Şekil 3.20, Şekil 3.21)

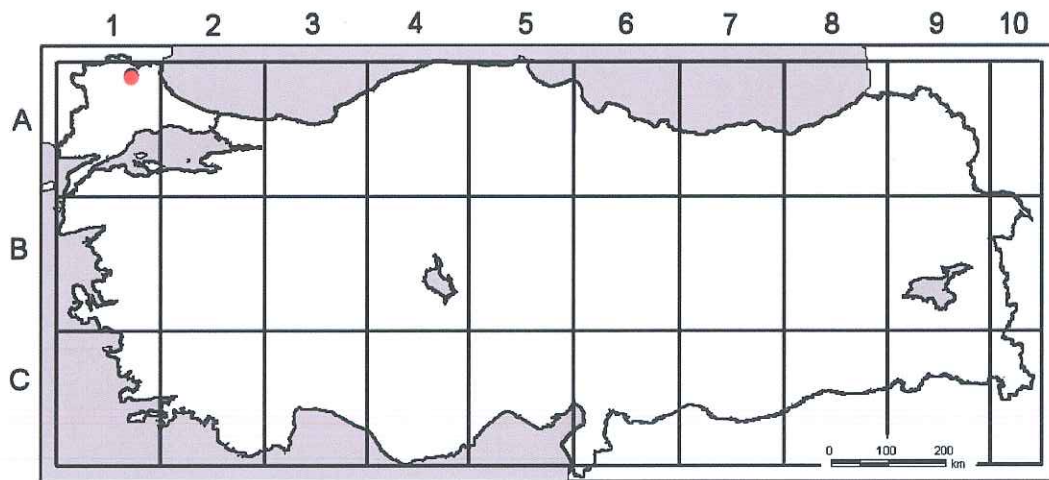
Çok yıllık, genellikle tabanda dallanmış. Gövde 40- 70 cm, dik, gövde dallanmaz, bazen uçta 1-2 dalla ayrılmıştır. Bazal yapraklar bilinmiyor. Gövde yaprakları uca doğru kademeli olarak küçülür. Orta gövde yaprakları büyük kulakçıklıdır ve sapsız, 1/2'sine kadar parçalı, 6-7x3-4cm (1-2mm uç dikenler dahil), ovatdan ovat lanseolata kadar. Üst gövde yaprakları ovat, 1/3'üne kadar parçalı, 4-5x3cm (dikenler dahil) gövdeyi kısmen sarar. Kapitulum büyük, dış fillariler hariç 3cm'e genişliğine kadar. Dış fillariler 3cm'e kadar orta damara kadar bölünmüş, iç fillarilerden çok uzun. Orta fillariler küçük, lanseolat 5mm (uç dikenini hariç yuvarlak). Papusun tabanı paleamsı, sorguçlu (plumose). Anterler 1.5-2 mm kuyruklu, kuyruk kısmı tüylü 10-12 mm dallanmış. İç fillariler 20 x 2cm uçları uzun sivri uçlu, saman rengidir.

Çiçeklenme zamanı: Temmuz-Ağustos

Yetiştirme ortamı: Meşelik açıklıkları, 500 m.

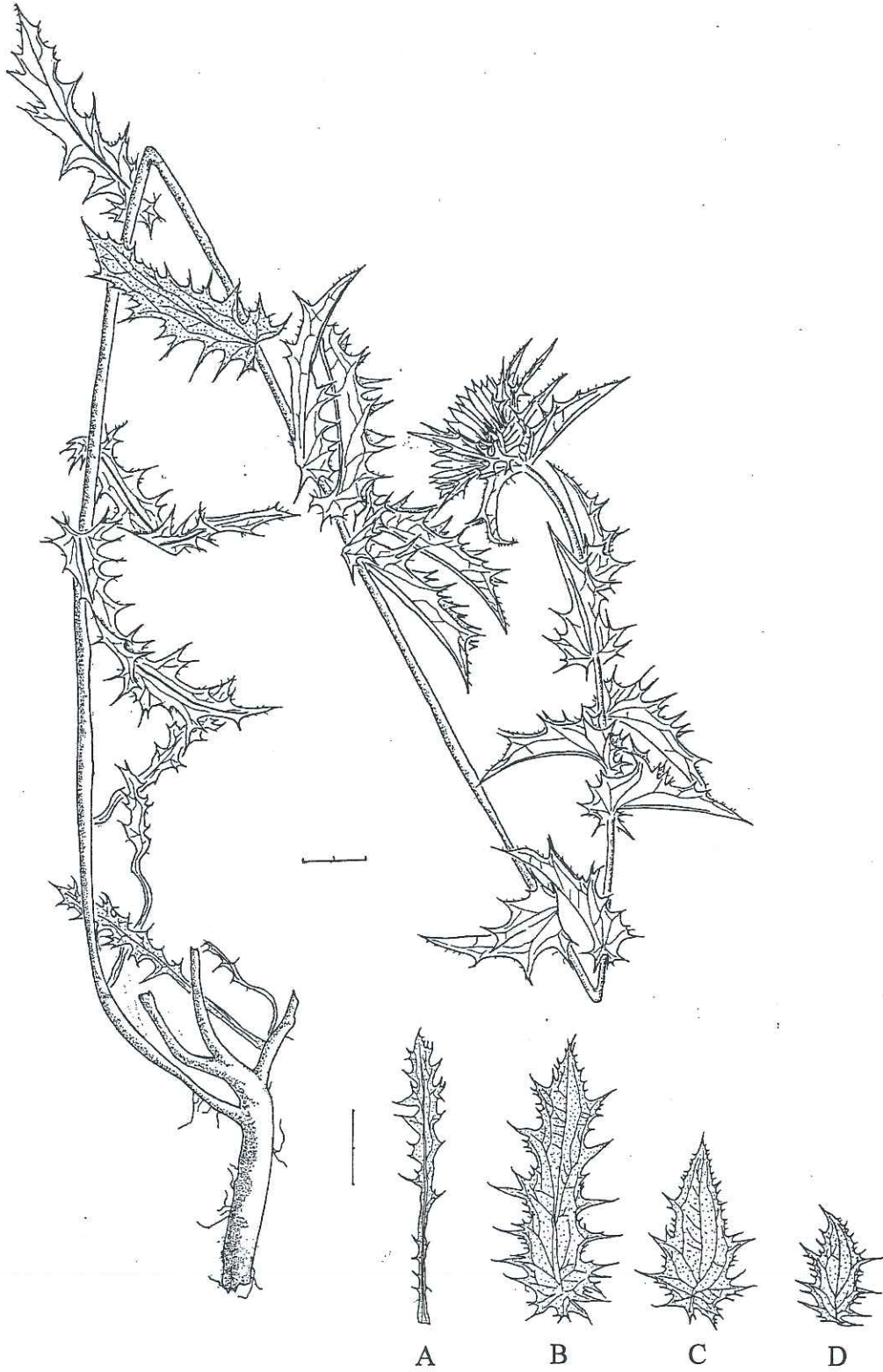
Türkiye'deki yayılışı: (A1)E Kırklareli: Kofcaz-Böcek deresi, 500 m, *Yıldız, Dirmenci*, (BY16509)!

Genel yayılışı: Akdeniz elementi.



Şekil 3.20 *Carlina* sp. (BY 16509)'nın Türkiye'deki Yayılışı

Notlar: Yukarıda belirtilen tek lokaliteden toplanan örnekler *C. corymbosa*'ya yakındır. Tüm bitki sık keçemsi tüylüdür.



Şekil 3.21 *Carlina* sp. (BY 16509)'nun Genel Görünümü (A rozet yaprak, B alt gövde yaprağı, C orta gövde yaprağı, D üst gövde yaprağıdır. Ölçekler 2cm'yi göstermektedir)

3.1.4 Filogenetik Analiz için Kullanılan Morfolojik Karakterler

Çalışılan örneklerin morfolojik karakterlerine göre teşhisleri yapıldı. Elde edilen morfolojik özelliklerin atasal ve türemiş karakter durumlarını belirlemek için ilgili kaynaklar tarandı [60, 61, 64, 31, 118-120]. Bu ayırt edici karakterler filogenetik analiz için bir tabloda toplandı. Tablo 3.1'de karakter durumları sayısal kodlama şeklinde düzenlendi.

Taksonlar için kodlanan karakter durumları, ayrı bir tabloda bir matris oluşturacak şekilde aşağıda toplandı. Bu veriler PAUP [101] filogenetik analiz programı kullanılarak yorumlandı.

Tablo 3.1 Filogenetik Analiz İçin Kullanılacak Morfolojik Karakter Durumları

Morfolojik Karakterler	Karakter Numarası	Karakter Durumları
Habitus	1	Perennial(0)
Rozet durumu	2	rozet var(0)
Rozet yaprak	3	tabanda kalıcı(0)
Gövdenin tabandan çıkışı	4	erect(0)
Gövde durumu	5	tabanda dallı(0)
Gövde yaprak yoğunluğu	6	seyrek yapraklı(0)
Gövde yaprak lobları	7	uç aniden daralır(0)
Yaprak laminası	8	pinnatifid(0)
Gövde yaprak tipi	9	ovat(0)
Yaprak	10	derimsi(0)
Yaprakta tüy durumu (alt)	11	keçemsi tüylü (0) tüysüz(3)
Yaprakta tüy durumu (üst)	12	keçemsi tüylü (0) tüysüz(3)
Dış fillari uzunluğu	13	iç fillariden uzun(0)
Dış fillari şekli	14	linear lanseolat(0) ovat-acuminat(3)
İç fillari rengi	15	sarı(0) yeşil(3)
Polen tipi	16	prolat sfenoidal(0)
Rosulat durumu	17	semi-rosulat(0)
		Biennial (1)
		rozet yok (1)
		tabanda kalıcı değil (1)
		ascending (1)
		tabanda dallanmamış (1)
		sık yapraklı (1)
		uç kademeli daralır (1)
		pinnatisect (1)
		ovat-lanseolat (1)
		otsu (1)
		örümcek ağsı tüylü (1)
		örümcek ağsı tüylü (1)
		iç fillariden kısa (1)
		oblong lanseolat (1)
		saman rengi(1)
		morumsu kırmızı (2)
		sunorbat(1)
		yok (1)
		Annual(2)
		erect- ascending(2)
		Lanseolat (2)
		örümcek ağsı lanat(2)
		örümcek ağsı lanat (2)
		eşit (2)
		lanseolat (2)
		oblatt sfenoidal (2)

Tablo 3.1'in Devamı

Gövde alt yapraklar	18	ovate-oblong (0) oblong-eliptik (3)	oblong-lanseolat(1)	lanseolat(2)
Gövde orta yapraklar	19	ovate-oblong (0) oblong-eliptik (3)	oblong-lanseolat(1)	lanseolat(2)
Gövde üst yapraklar	20	ovate-oblong (0) eliptik (3)	lanseolat(1) triangular(5)	oblong-eliptik(2)
Yaprak kenarı	21	düz (0)	dışlı(1)	
Yaprak dikenleri	22	pulsu (0)	1-3mm(1)	3-5mm(2)
Korolla rengi	23	sarı (0) mavi (3)	saman rengi(1)	morumsu-kırmızı(2)
Anter	24	Korolladan çıkmamış-eşit(0)	Korolladan dışarı çıkmış(1)	
Anter rengi	25	sarı (0)	saman rengi(1)	mor(2)
Papus uzunluğu	26	8-10.5mm (0)	12-14mm(1)	17-20mm(2)
Aken tüy durumu	27	seyrek tüylü(0)	sık tüylü(1)	
Aken uzunluğu	28	1.5-2mm (0)	3-4mm(1)	4-6mm(2)

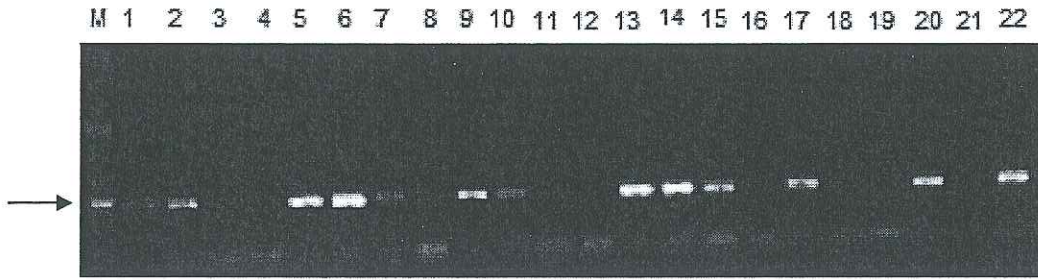
Tablo 3.2 Filogenetik Analiz için Kullanılacak Matris Verileri

↓T ↑r / → Karakterler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
<i>C.corymbosa</i>	0	1	1	2	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	2	1	2	1	3	1	1	1	1	1	1	0	0
<i>C.greaca</i>	0	1	1	2	0	1	1	0	2	0	1	2	1	0	2	1	2	1	2	1	2	1	1	0	1	1	0	2
<i>C. oligo. ssp. oligocephala</i>	0	1	0	2	0	1	1	0	2	1	0	2	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2
<i>C. oligo. ssp. pallascens</i>	0	1	0	2	0	0	1	0	2	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	2	1	0	1	1	0	2
<i>C. involuocrata</i>	0	1	1	0	0	1	1	2	0	3	3	0	2	0	1	1	1	1	3	4	1	1	1	0	1	1	1	2
<i>C. lanata</i>	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	2	1	1	3	3	3	2	1	1	0	1	1	1	1	1
<i>C.vulgaris</i>	2	0	0	0	1	1	0	2	1	2	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	2	0	0	0
<i>C. intermedia</i>	2	0	0	0	1	0	1	0	1	1	2	1	2	0	0	2	0	2	2	0	0	1	1	1	1	1	0	1
<i>C. biebersteinii</i>	2	0	0	0	1	0	1	0	2	1	2	1	1	0	0	2	0	1	1	1	1	0	2	1	2	2	1	2
<i>Carlina</i> sp. (BY 16509)	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	2	0	?	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
<i>Cardopatum corymbosum</i>	0	1	?	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	?	1	?	1	1	1	1	1	1	3	0	?	?	?	?
<i>Atractylis cancellata</i>	2	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	3	?	1	1	1	1	1	1	2	0	1	0	1	1
<i>Carthamus lanatus</i>	2	1	?	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	3	1	?	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>Cuerthamus dentatus</i>	2	1	?	0	1	1	1	0	2	1	0	0	0	3	2	?	1	0	0	0	0	1	2	1	1	1	1	2

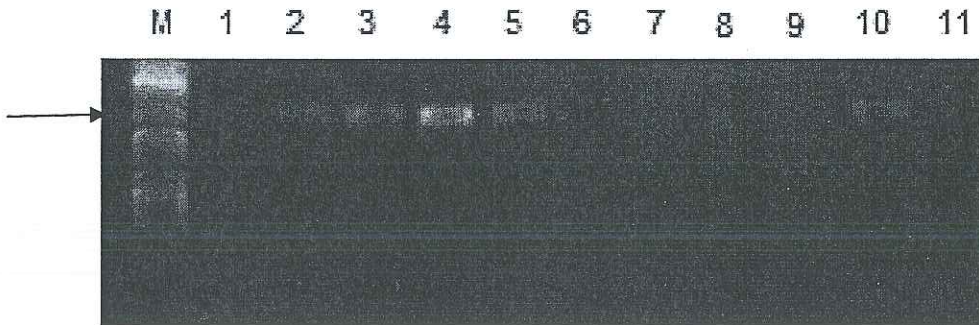
3.2 Moleküler Bulgular

3.2.1 ITS ve trnL-F Dizilenmesi

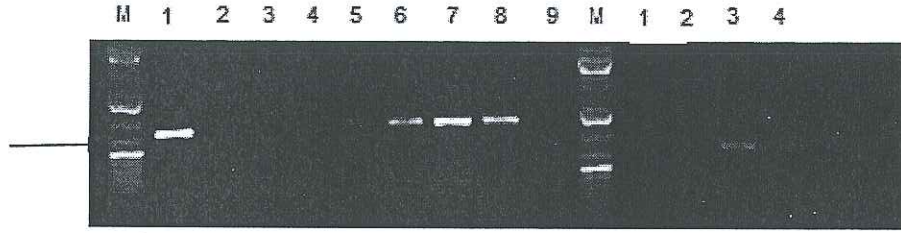
Çalışmada kullanılan *Carlina* taksonuna ait örneklerin PCR reaksiyonu ile ITS ve trnL-F bölgeleri çoğaltıldı. Dizi analizi için bu konuda çalışan ticari bir şirket olan Refgen'e örnekler gönderildi. Diziler Forward ve Revers primerleriyle çift yönlü okutuldu. Dizi analizi için gönderilmek üzere hazırlanan örneklerden bazılarının PCR görüntüleri aşağıdaki şekillerdedir.



Şekil 3.22 *C. graeca* ve *C. biebersteinii* türlerinin trnL-F PCR ürünlerinin (450bp) Jel Fotoğrafi (49,51,52 °C'de farklı sıcaklık aralıklarında ve $1,10^{-1},10^{-2}, 10^{-3}$ farklı yoğunluk konsantrasyonları)



Şekil 3.23 Farklı Lokalitelerden alınan *C. oligocephala*, *C. involucrata* Türleri ve *Carthamus dentatus*'un (farklı konsantrasyonları ($10^{-1},10^{-2}$) ITS PCR Ürünlerinin (700bp) Jel Fotoğraf



Şekil 3.24 *C. oligocephala*, *C.involucrata* türleri ve *Cardopatum corymbosum*'un farklı konsantrasyonları (2,1,10⁻¹,10⁻²,10⁻³) ITS PCR Ürünlerinin (700bp) Jel Fotoğrafı

3.2.2 Dizilerin Filogenetik Analizi

DNA dizileme için internette ücretsiz olan ClustalW programı kullanıldı [100]. Bu program yardımıyla şimdiye kadar gerekli dizi verileri elde edilen taksonların DNA dizinleri hizalandı.

Daha sonra günümüzde dünya çapında çok yaygın olarak kullanılan PAUP filogenetik analiz yazılımının uygun parametreleri kullanılarak elde edilen DNA dizilerinden asıl veri olan filogenetik ağaçlar oluşturuldu [104]. Ayrıca UPGMA ve/veya NJ metotlarıyla da fenetik analizlere bakıldı [104].

Parsimoni verilerin değerlendirilmesi için en sık kullanılan metottur. Olası bütün ağaçları değerlendirmek ve seçim yapmak için her birine farklı bir kriter ya da skor verme esasına dayanır. Maksimum parsimoni en tutumlu olan yani ilişkiyi en gerçekçi yansıtan ağacı belirlemektir.

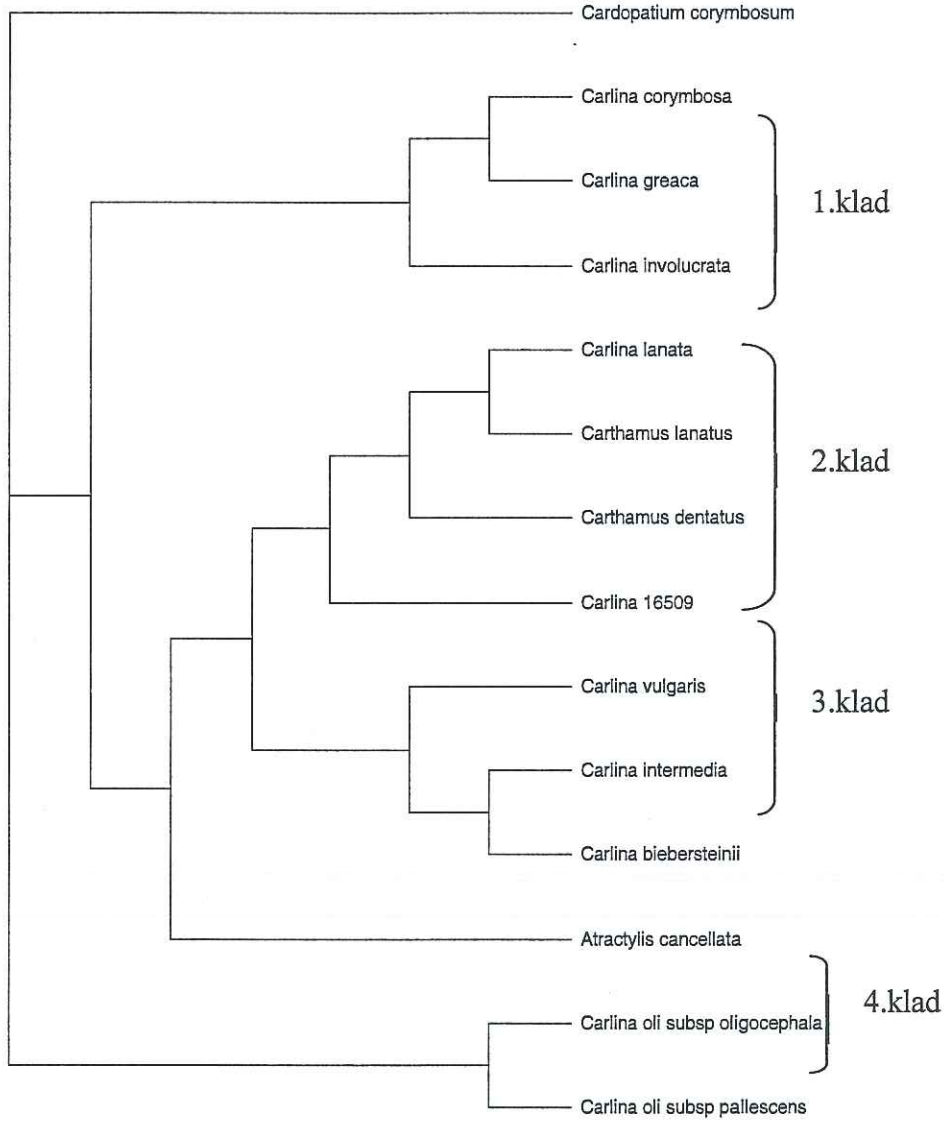
Bunun için PAUP analizinde; parsimoni kriteri seçilerek heuristic search yapıldı. Branch-and Band, Strict Consensus ve Bootstrap ağaçları oluşturuldu. Ayrıca birçok ağaç topolojisini karşılaştıran Distance kriteri seçilerek de UPGMA ve NJ ağaçları oluşturuldu.

3.2.2.1 Temel Veri Setleri

3.2.2.1.1 Morfolojik Karakterler Kullanılarak Yapılan PAUP Analizi

Parsimoni kriteri kullanılarak yapılan analizlerde 28 morfolojik karakter kullanılmıştır. Branch-and-Bound analizi sonucuna göre 27 karakter bilgi verici (informative) karakter, 1 karakterde bilgi edinilemeyen (uninformative) karakterdir. Maksimum ağaç sayısı 1000, tekrar sayısı 100 seçilmiştir.

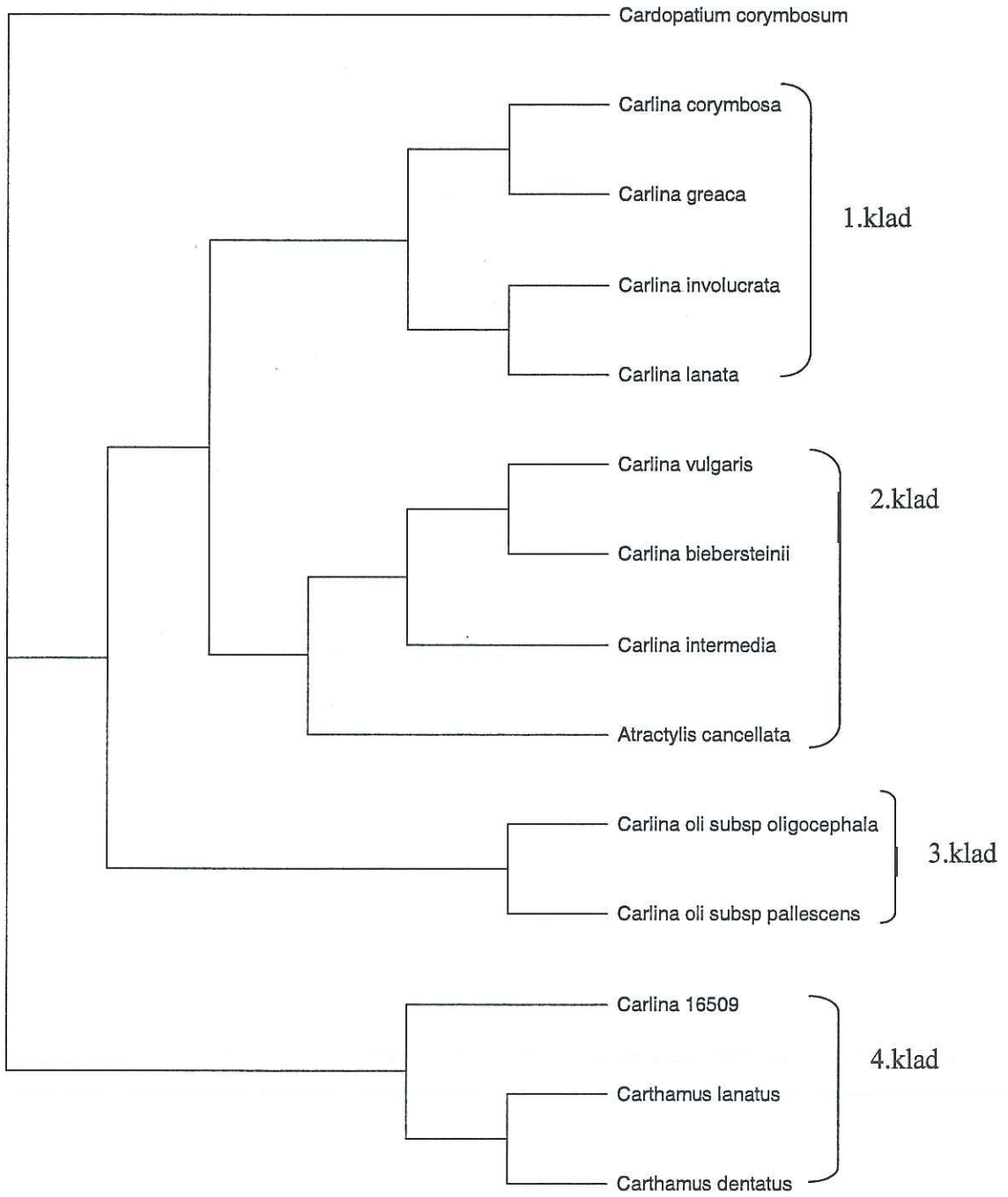
1



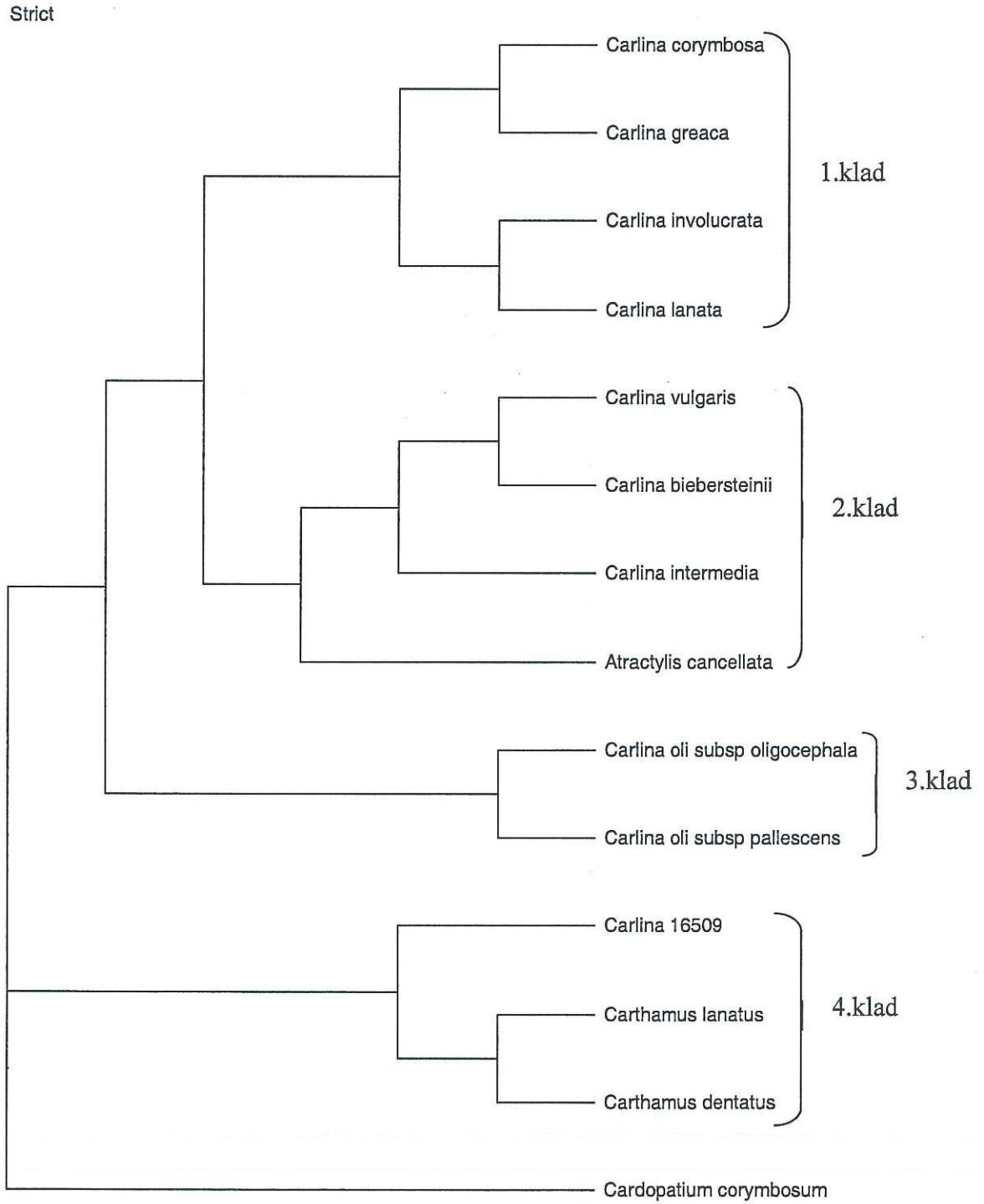
Şekil 3.25 Morfolojik Verilere Dayalı Branch-and-Bound Analizinde Oluşan Ağaç Topolojisi

Analizde 106 en iyi ağaç belirlendi ve bunlardan 2 tanesi en güvenilir ağaç topolojisine sahip ağaçtır. Aşağıda bu iki ağaç topolojisi Şekil 3.25 ve Şekil 3.26'da verilmiştir.

2

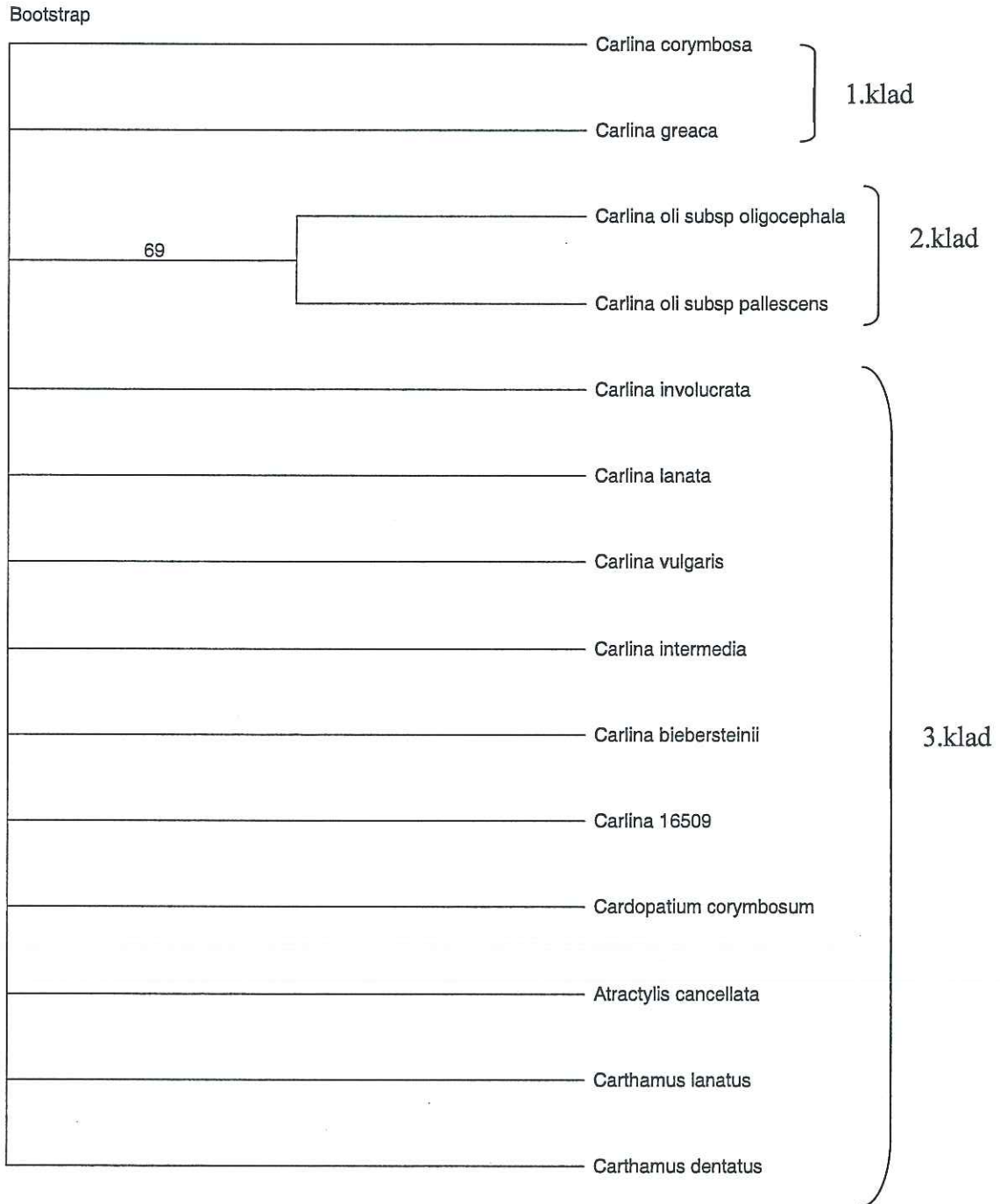


Şekil 3.26 Morfolojik Verilere Dayalı Branch-and-Bound Analizinde Oluşan Ağaç Topolojisi



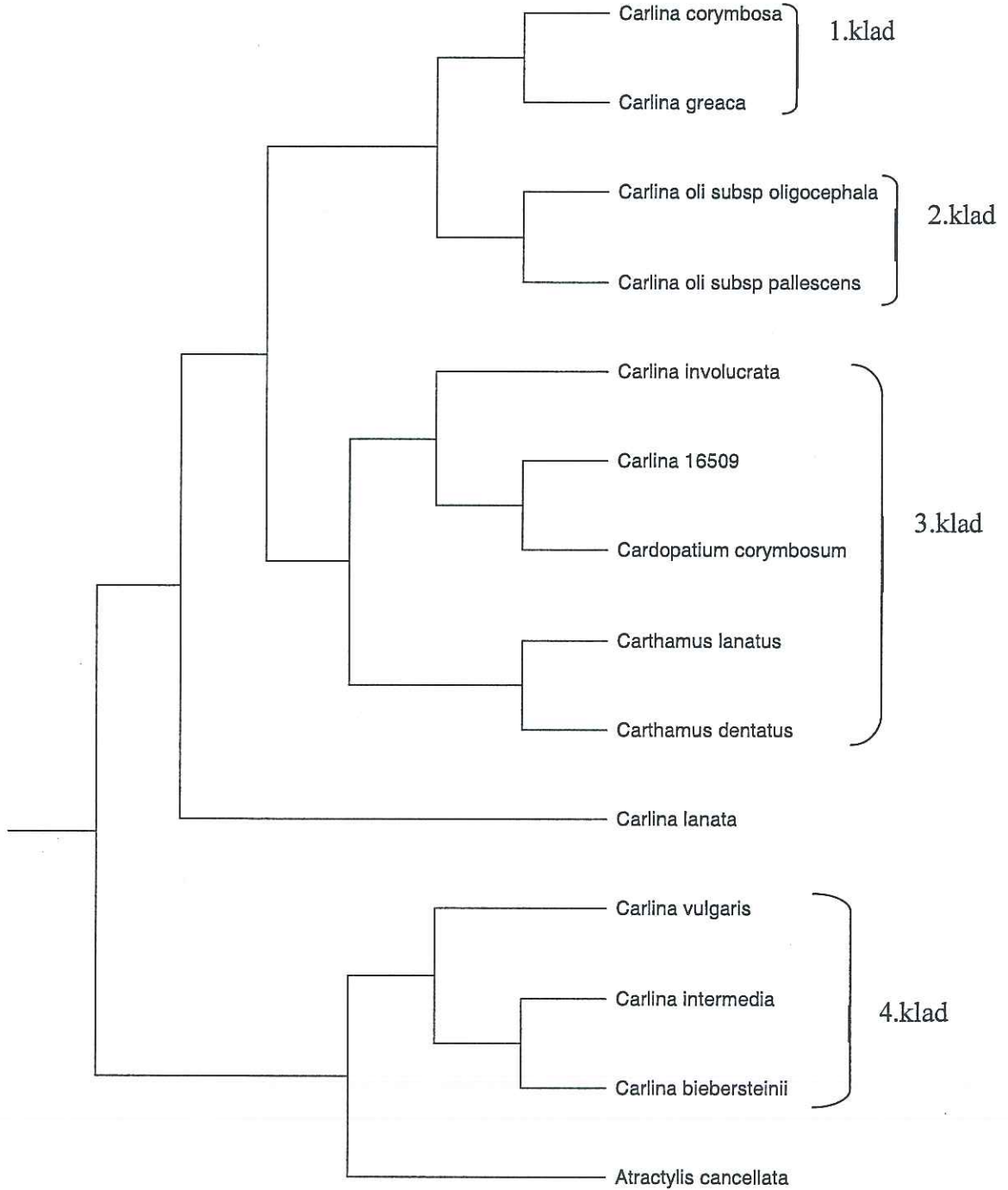
Şekil 3.27 Morfolojik Verilere Dayalı En iyi 106 Ağacın Strict Consensus Ağaç Topolojisi

Hearustic search ile oluşturulan Strict Consensus ağacı verilerinde 1000 tane mesafe temelli yöntemler kullanılarak oluşturulan UPGMA ve NJ ağaçları sırasıyla Şekil 3.29 ve Şekil 3.30'da verilmiştir. En yakın komşu ağaç topolojilerinin karşılaştırmalı istatistiksel analizi yapıldığında ağaç üzerinde belirtilen birim her taksonun birbirine göre ayrılma önceliğini belirtmektedir.

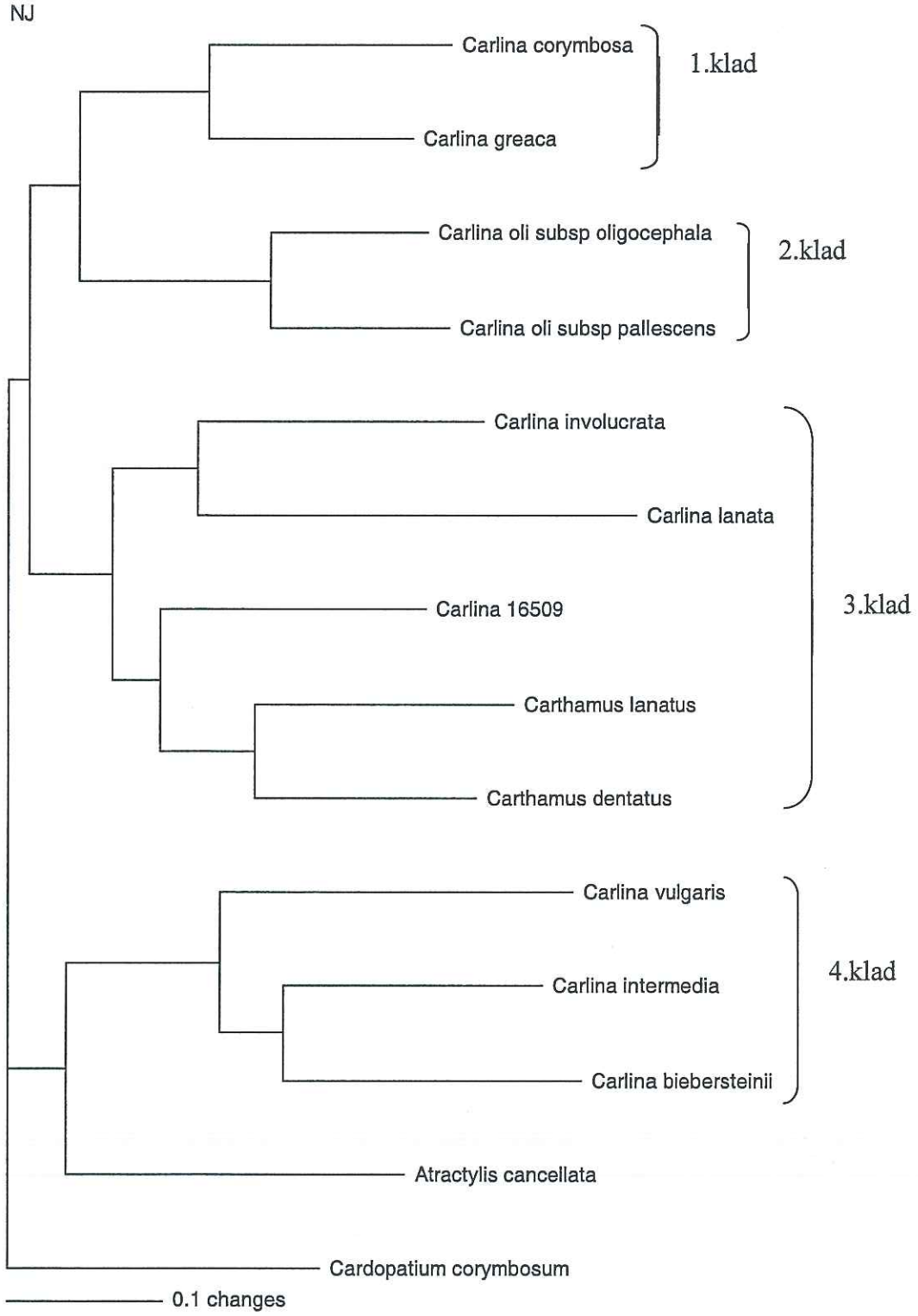


Şekil 3.28 Morfolojik Verilere Dayalı Bootstrap Ağaç Topolojisi

UPGMA



Şekil 3.29 Morfolojik Verilere Dayalı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Ağaç Topolojisi



Şekil 3.30 Morfolojik Verilere Dayalı NJ (Neighbour Joining) Ağaç Topolojisi

3.2.2.1.2 ITS Sonuçları Kullanılarak Yapılan PAUP Analizi

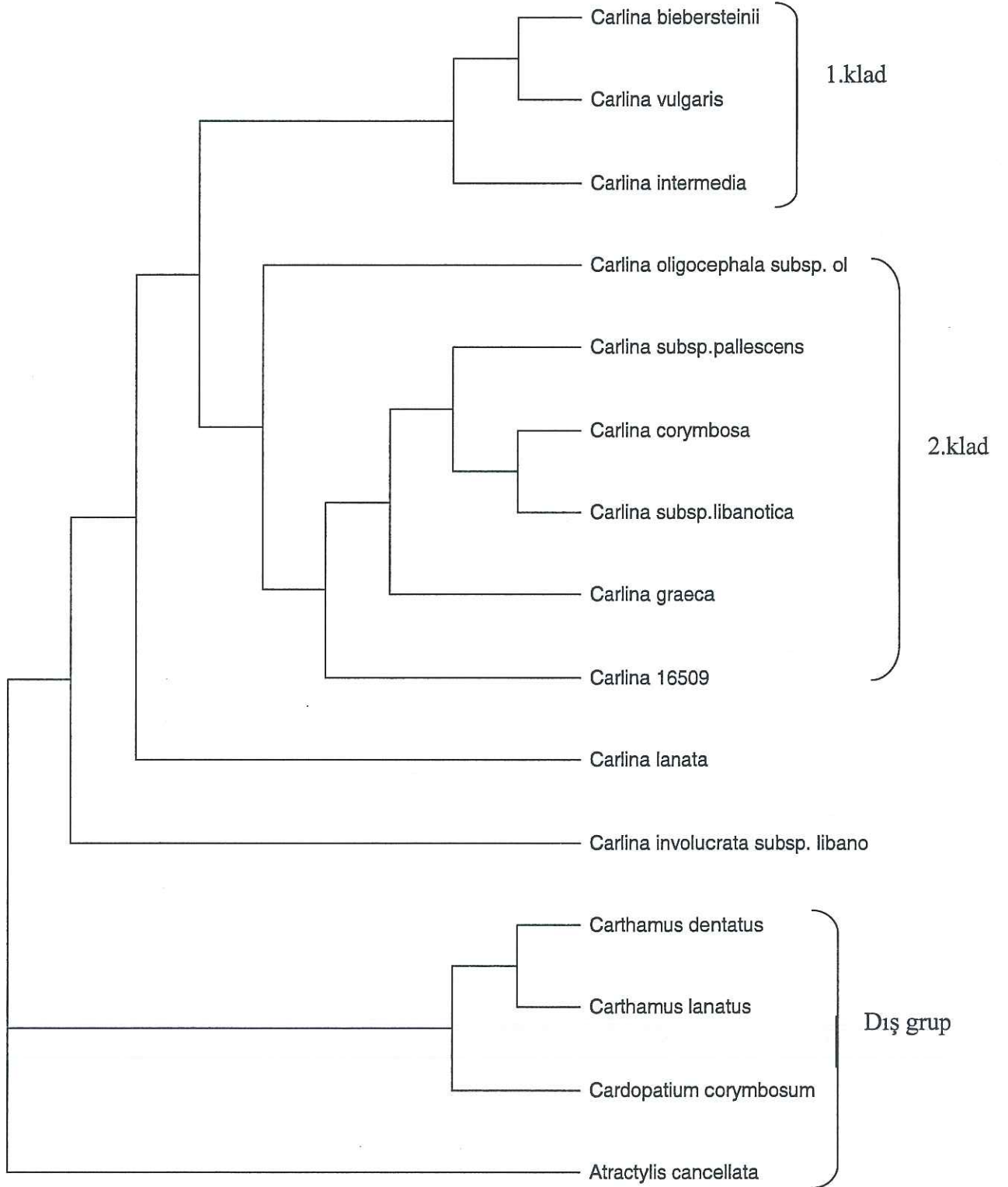
1000 ağaç seti seçilerek yapılan analizde; Branch-and-Bound algoritmasıyla parsimoni ağaçları oluşturulmuş ve total 803 ağaç oluşmuştur. değişmeyen (constant) değer 494, değişken (variable) değer 180, bilgi verici (informative) değer 129, en iyi ağaç sayısı 444 ve en güvenilir ağaç sayısı 24 bulunmuştur. Şekil 3.31, Şekil 3.32 ve Şekil 3.33'de analizin seçtiği üç ağaç topolojisi verilmiştir.

Heuristic Search yapılarak oluşturulan Strict Consensus ağacında; yine Maksimum ağaç sayısı 1000, tekrar sayısı 100 seçilmiştir (Şekil 3.34).

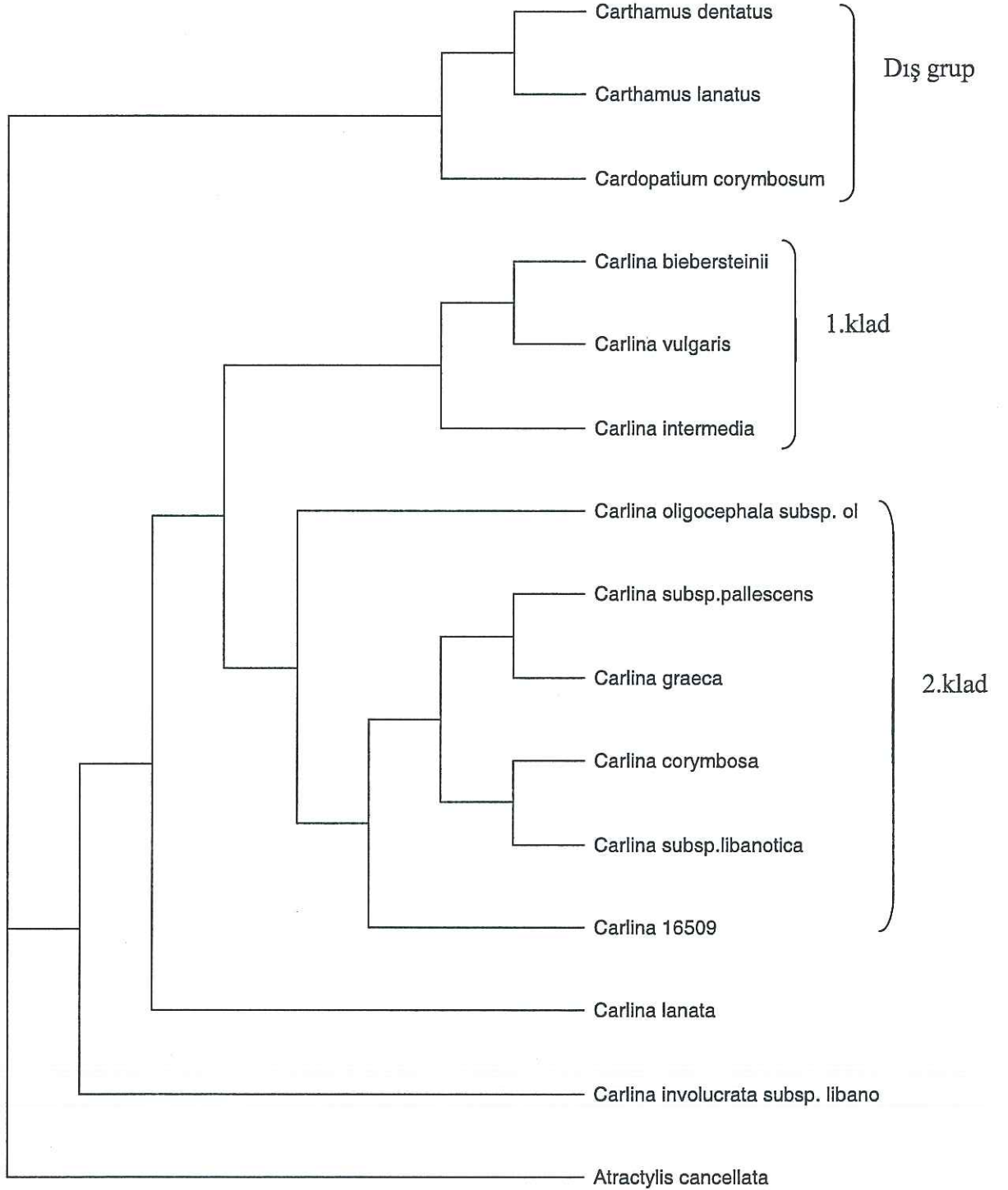
Bootstrap analizi için aynı kriterlerde seçilen ağaç topolojisinde total, değişmeyen (constant), değişken (variable), bilgi verici (informative) değerleri yine aynı olup en iyi ağaç skoru 461, yeniden düzenlene (rearrangement) değer 6412 'dir (Şekil 3.35).

Mesafe temelli yapılan UPGMA ve NJ analizleride Şekil 3.36 ile Şekil 3.37'de verilmiştir. En yakın komşu ağaç topolojilerinin karşılaştırmalı istatistiksel analizi yapıldığında ağaç üzerinde belirtilen birim her taksonun birbirine göre ayrılma önceliğini belirtmektedir.

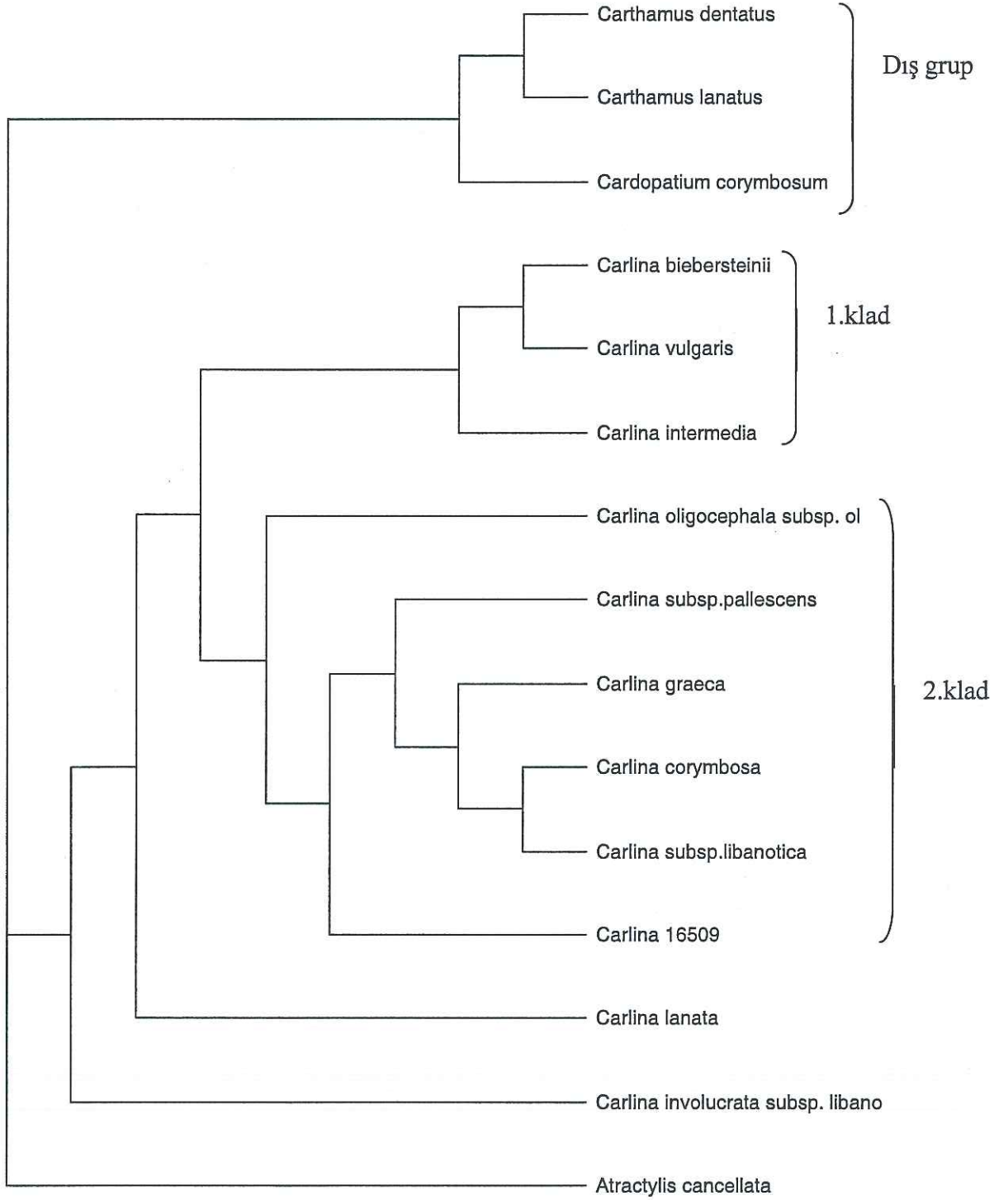
1



Şekil 3.31 ITS Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Ağaç Topolojisi



Şekil 3.32 ITS Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Ağaç Topolojisi

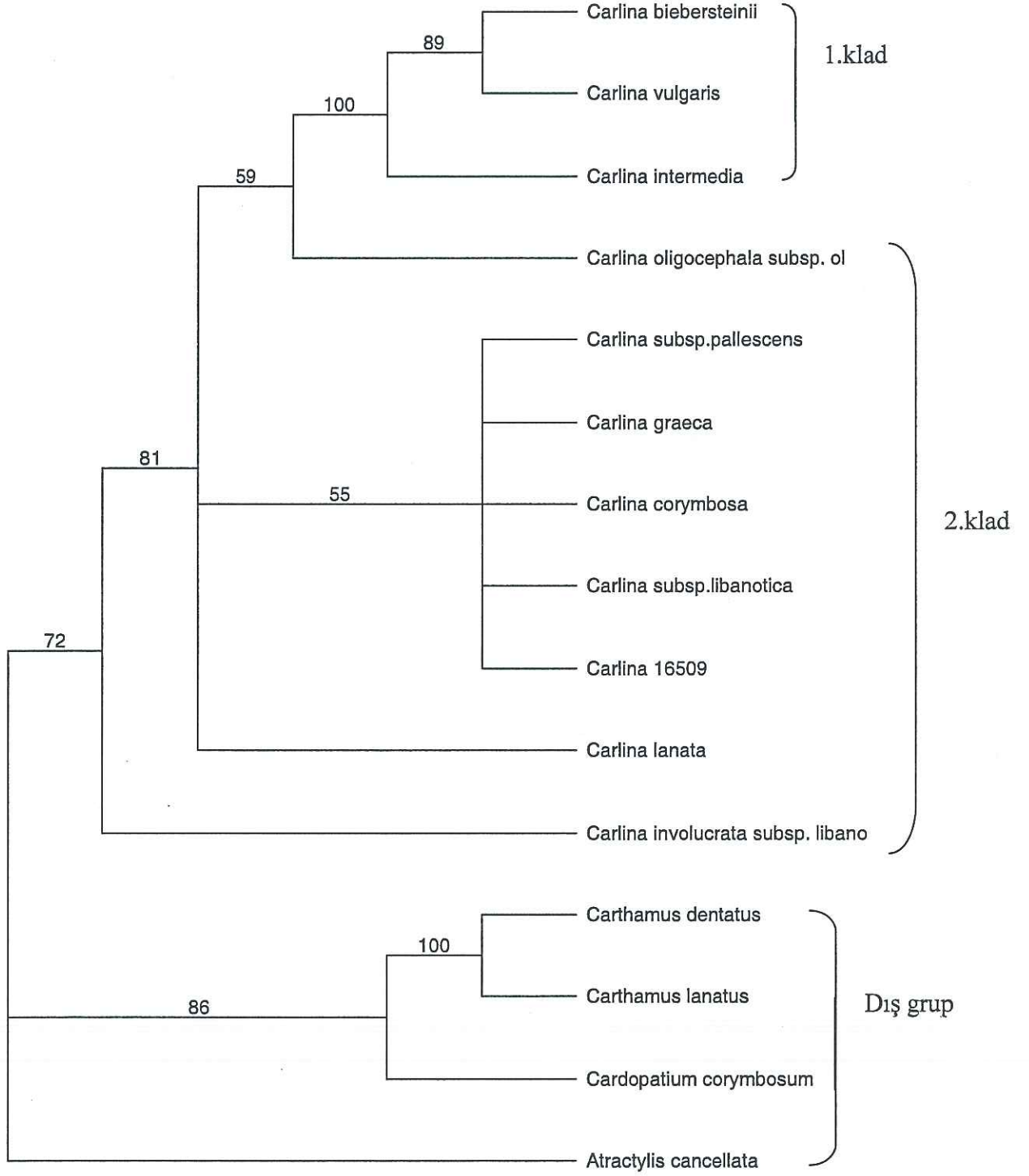


Şekil 3.33 ITS Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Ağaç Topolojisi



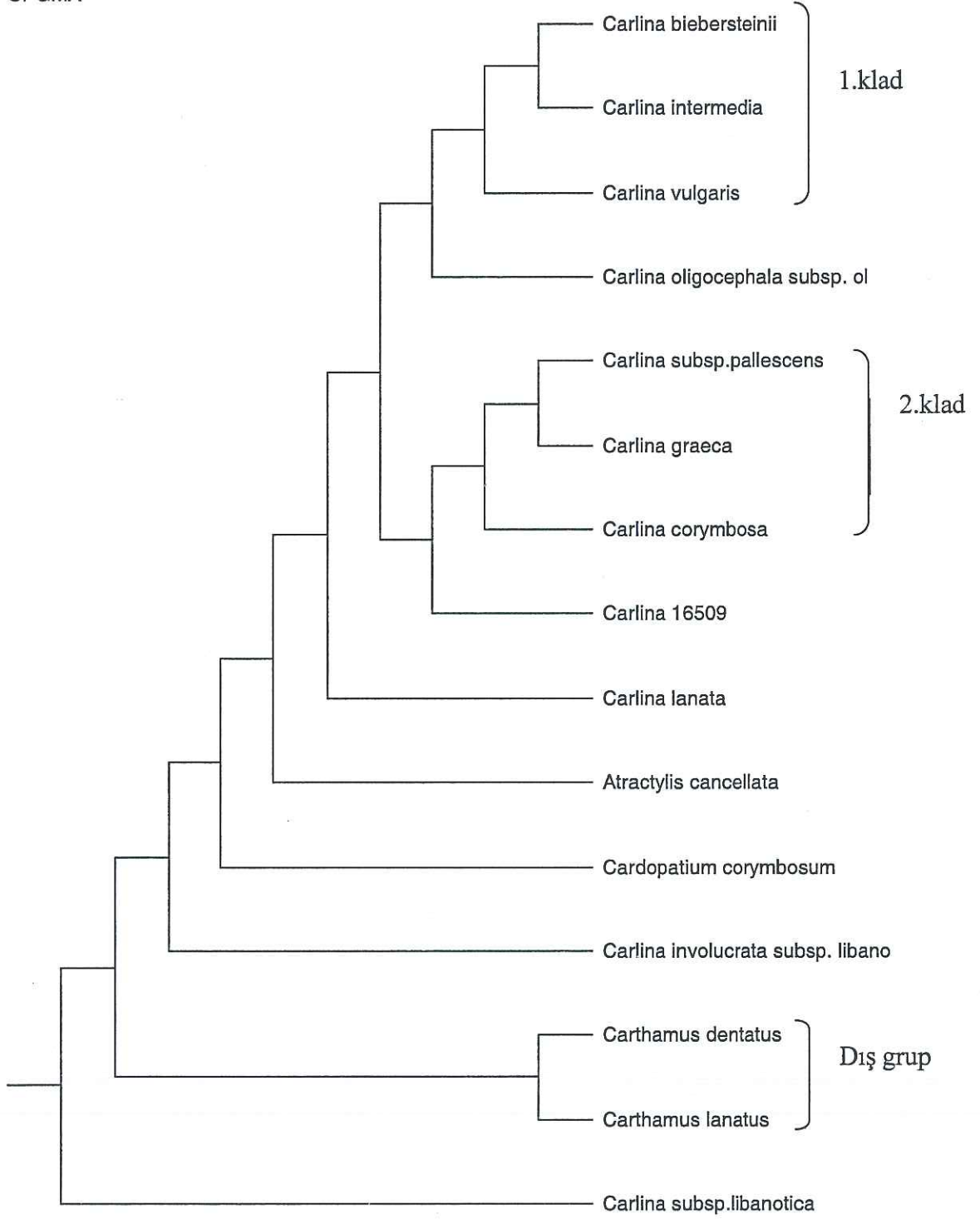
Şekil 3.34 ITS Verilerine Dayalı En İyi 24 Ağacın Strict Consensus Ağaç Topolojisi

Bootstrap

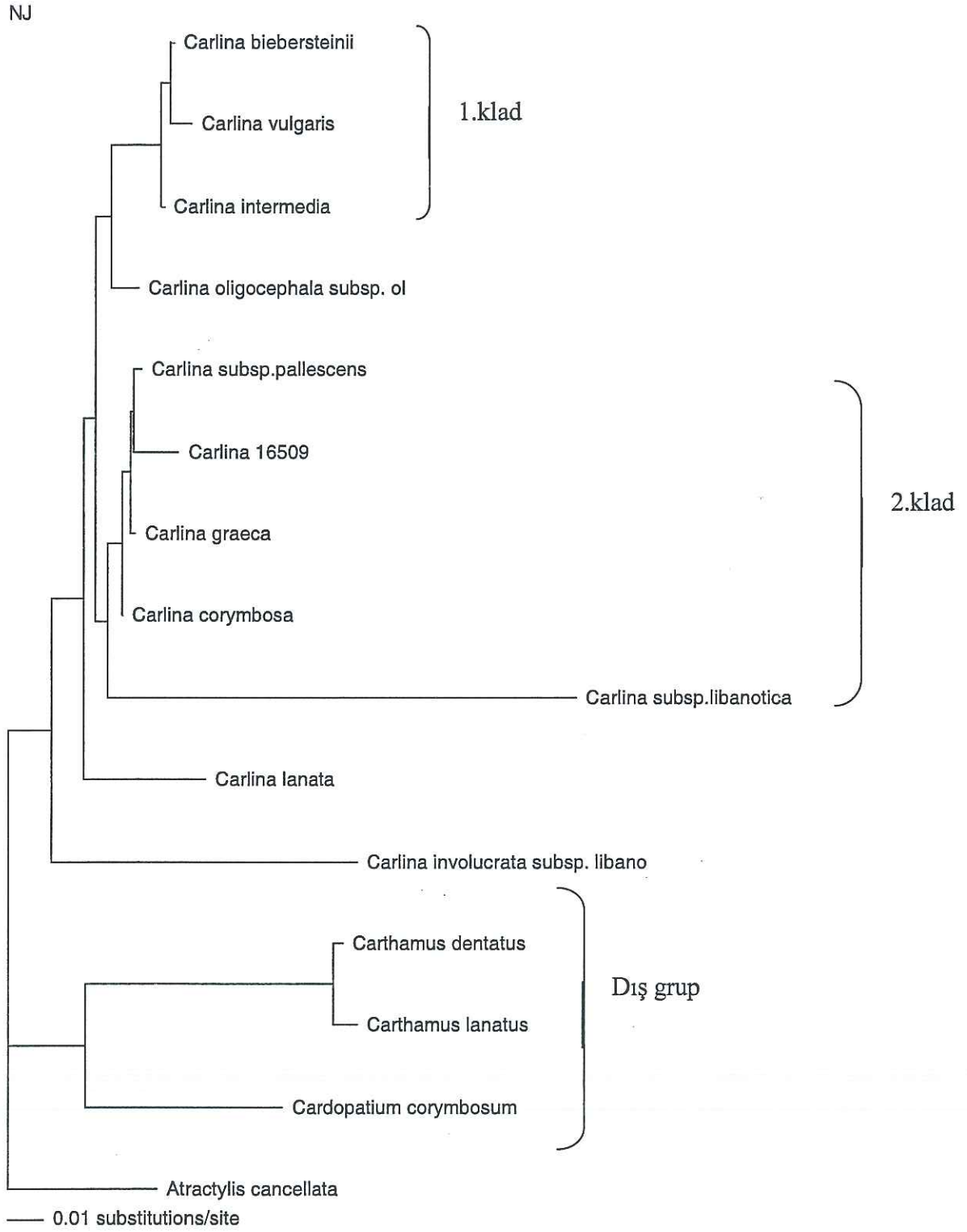


Şekil 3.35 ITS Verilerine Dayalı Bootstrap Ağaç Topolojisi

UPGMA



Şekil 3.36 ITS Verilere Dayalı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Ağaç Topolojisi



Şekil 3.37 ITS Verilere Dayalı NJ (Neighbour Joining) Ağaç Topolojisi

3.2.2.1.3 *trnL-F* Sonuçları Kullanılarak Yapılan PAUP Analizi

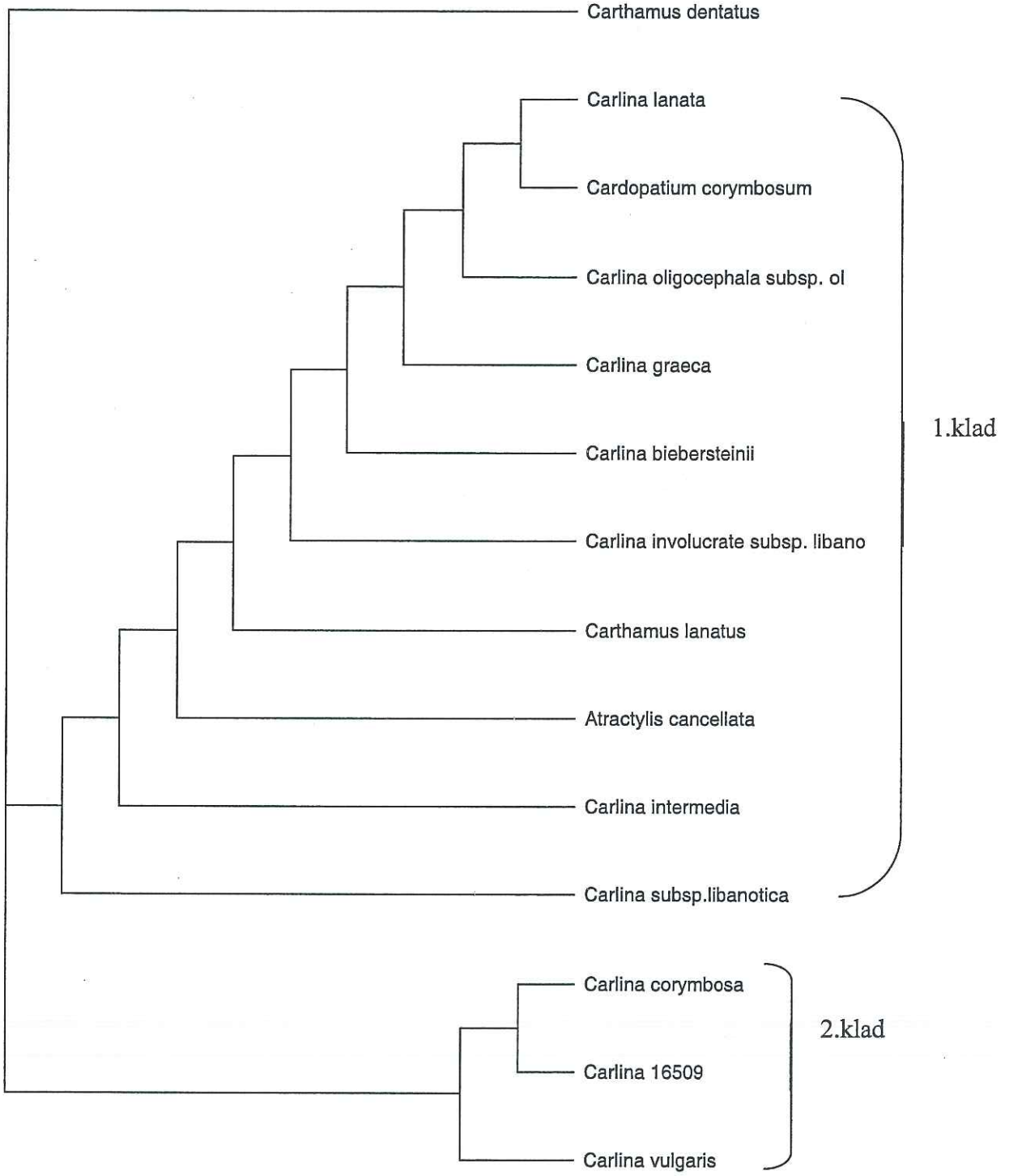
1000 ağaç seti seçilerek yapılan analizde; Branch-and-Bound algoritmasıyla parsimoni ağaçları oluşturulmuş ve total 534 ağaç oluşmuştur. Değişmeyen (constant) değer 219, değişken (variable) değer 91, bilgi verici (informative) değer 224, en iyi ağaç sayısı 425 ve en güvenilir ağaç sayısı 16 bulunmuştur. Şekil 3.38’de analizin seçtiği ağaç topolojisi verilmiştir.

Heuristic Search yapılarak oluşturulan Strict Consensus ağacında; yine 1000 ağaç seti seçilerek 100 tekrarlı analiz yapıldığında ağaçla ilgili aynı verilere ulaşılmıştır. Yeniden düzenlenen (rearrangement) değer 17276’dır (Şekil 3.39)

Bootstrap analizi için aynı kriterlerde seçilen ağaç topolojisinde total, değişmeyen (constant), değişken (variable), bilgi verici (informative) değerleri yine aynı olup en iyi ağaç skoru 413, yeniden düzenlene (rearrangement) değer 77580 ‘dir (Şekil 3.40).

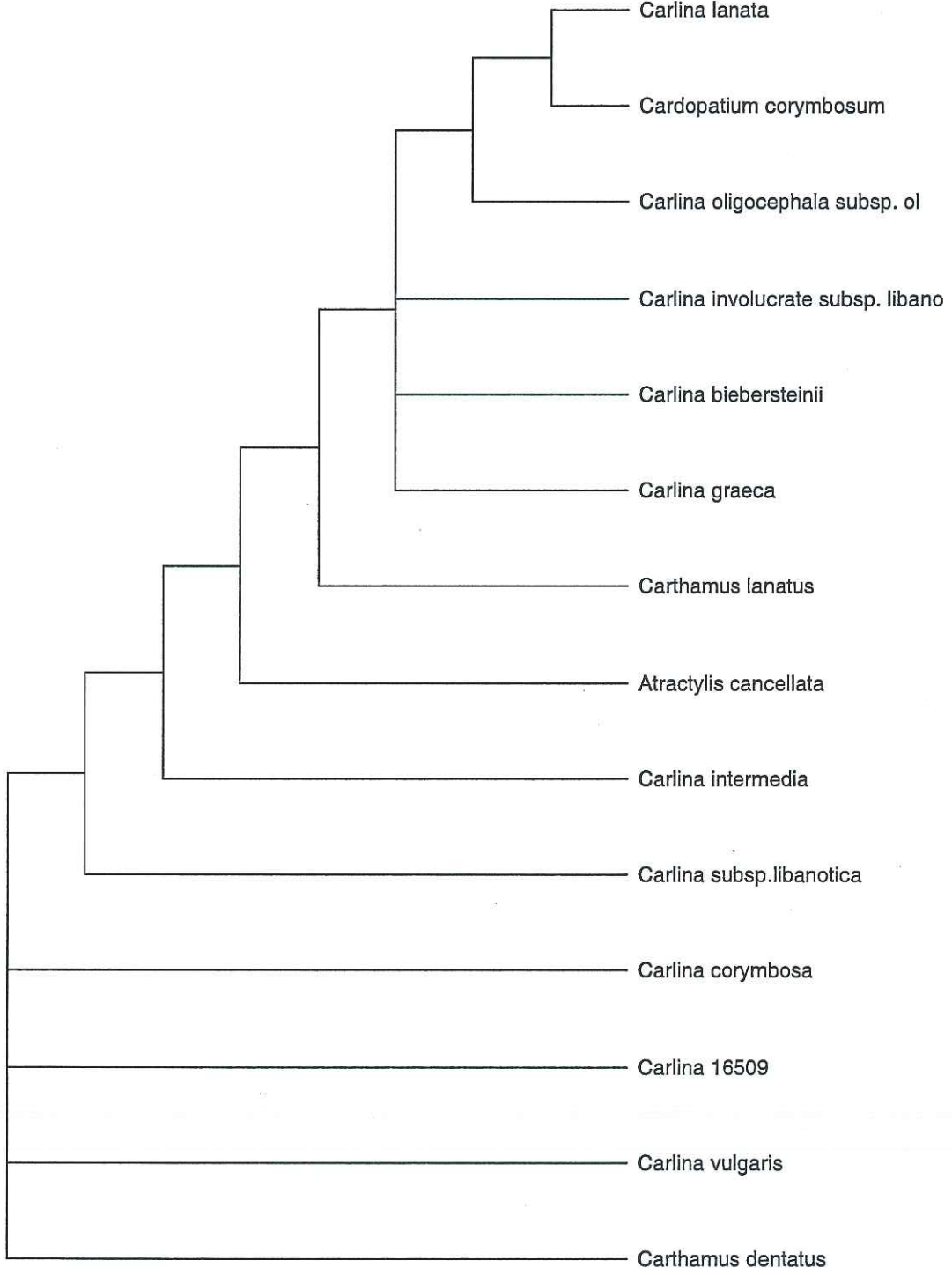
Mesafe temelli yapılan UPGMA ve NJ analizleride Şekil 3.41 ile Şekil 3.42’de verilmiştir. En yakın komşu ağaç topolojilerinin karşılaştırmalı istatistiksel analizi yapıldığında ağaç üzerinde belirtilen birim her taksonun birbirine göre ayrılma önceliğini belirtmektedir.

1



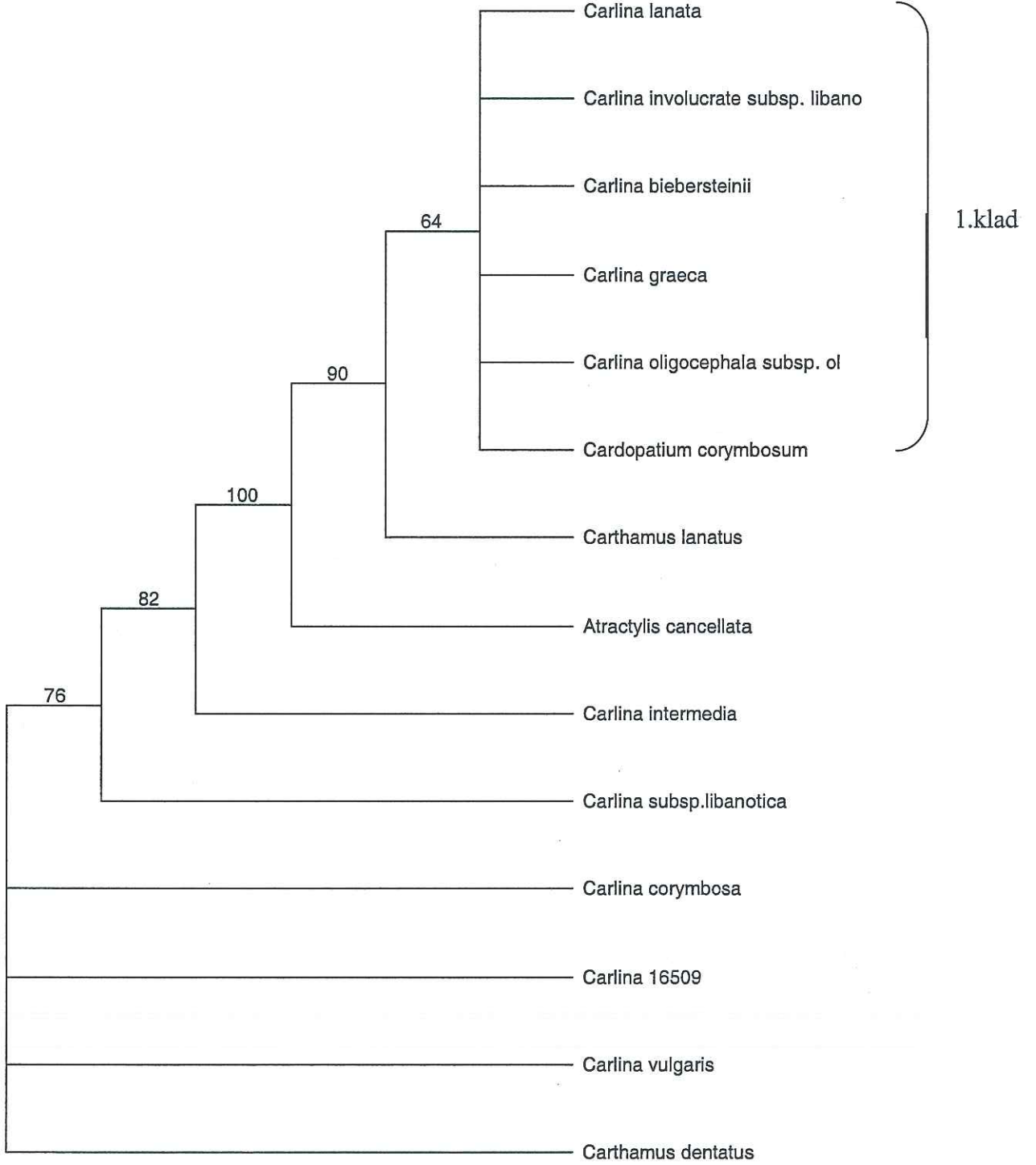
Şekil 3.38 *trnL-F* Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Ağaç Topolojisi

Strict



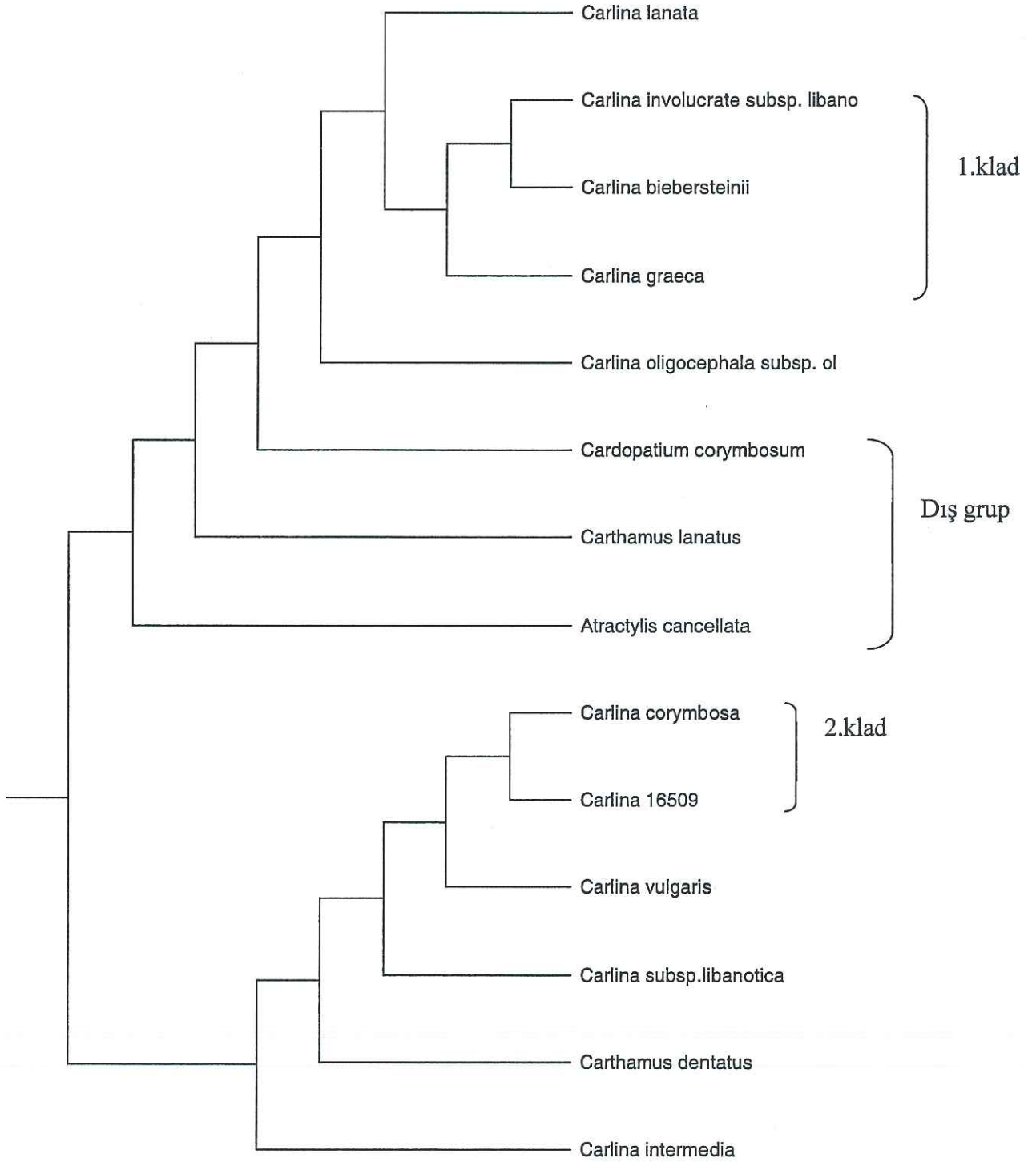
Şekil 3.39 *trnL-F* Verilerine Dayalı En İyi 16 Ağacın Strict Consensus Ağaç Topolojisi

Bootstrap



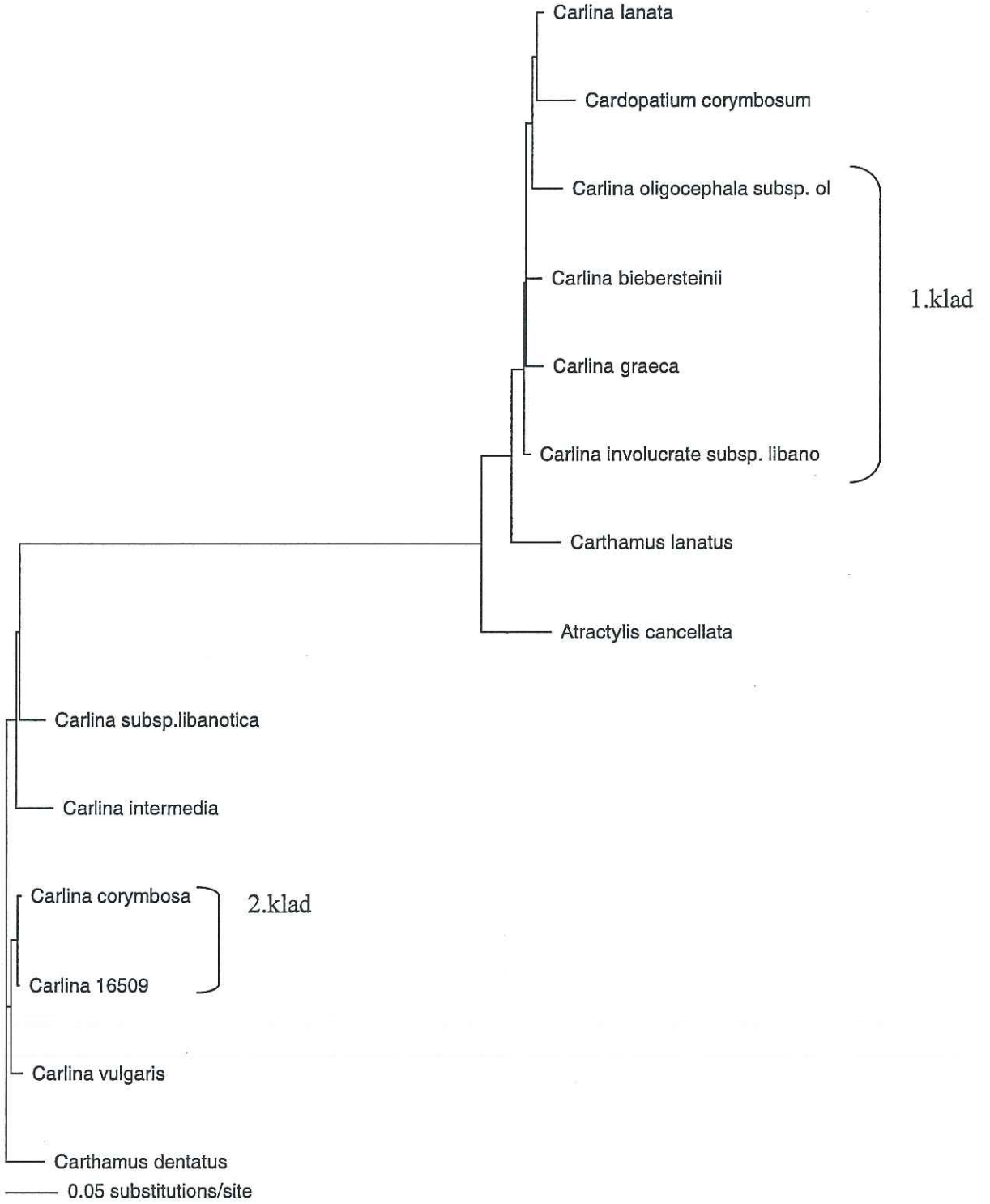
Şekil 3.40 *trnL-F* Verilerine Dayalı Bootstrap Ağaç Topolojisi

UPGMA



Şekil 3.41 *trnL-F* Verilerine Dayalı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Aritmetic Mean) Ağaç Topolojisi

NJ



Şekil 3.42 *trnL-F* Verilerine Dayalı NJ (Neighbour Joining) Ağaç Topolojisi

Birleştirilmiş Veri Setleri

ITS ve *trnL-F* Sonuçları Kullanılarak Yapılan PAUP Analizi

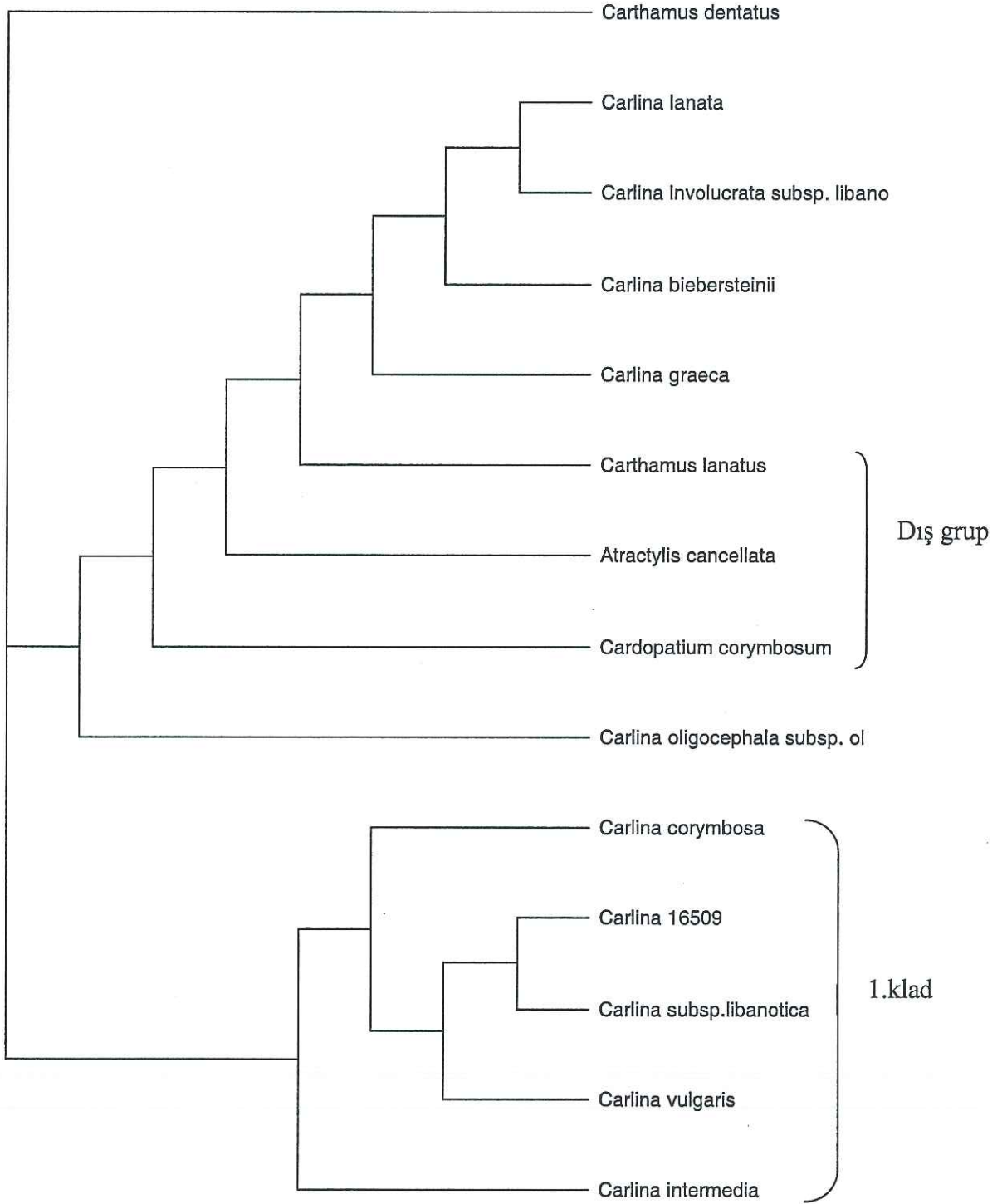
10000 ağaç seti seçilerek yapılan analizde; Branch-and-Bound algoritmasıyla parsimoni ağaçları oluşturulmuş ve total 1337 ağaç oluşmuştur. Değişmeyen (constant) değer 728, değişken (variable) değer 258, bilgi verici (informative) değer 351, en iyi ağaç sayısı 952 ve en güvenilir ağaç sayısı 1 bulunmuştur. Şekil 3.43'de analizin seçtiği ağaç topolojisi verilmiştir.

Heuristic Search yapılarak oluşturulan Strict Consensus ağacında; yine 1000 ağaç seti seçilerek 100 tekrarlı analiz yapıldığında ağaçla ilgili aynı verilere ulaşılmıştır. (Şekil 3.44)

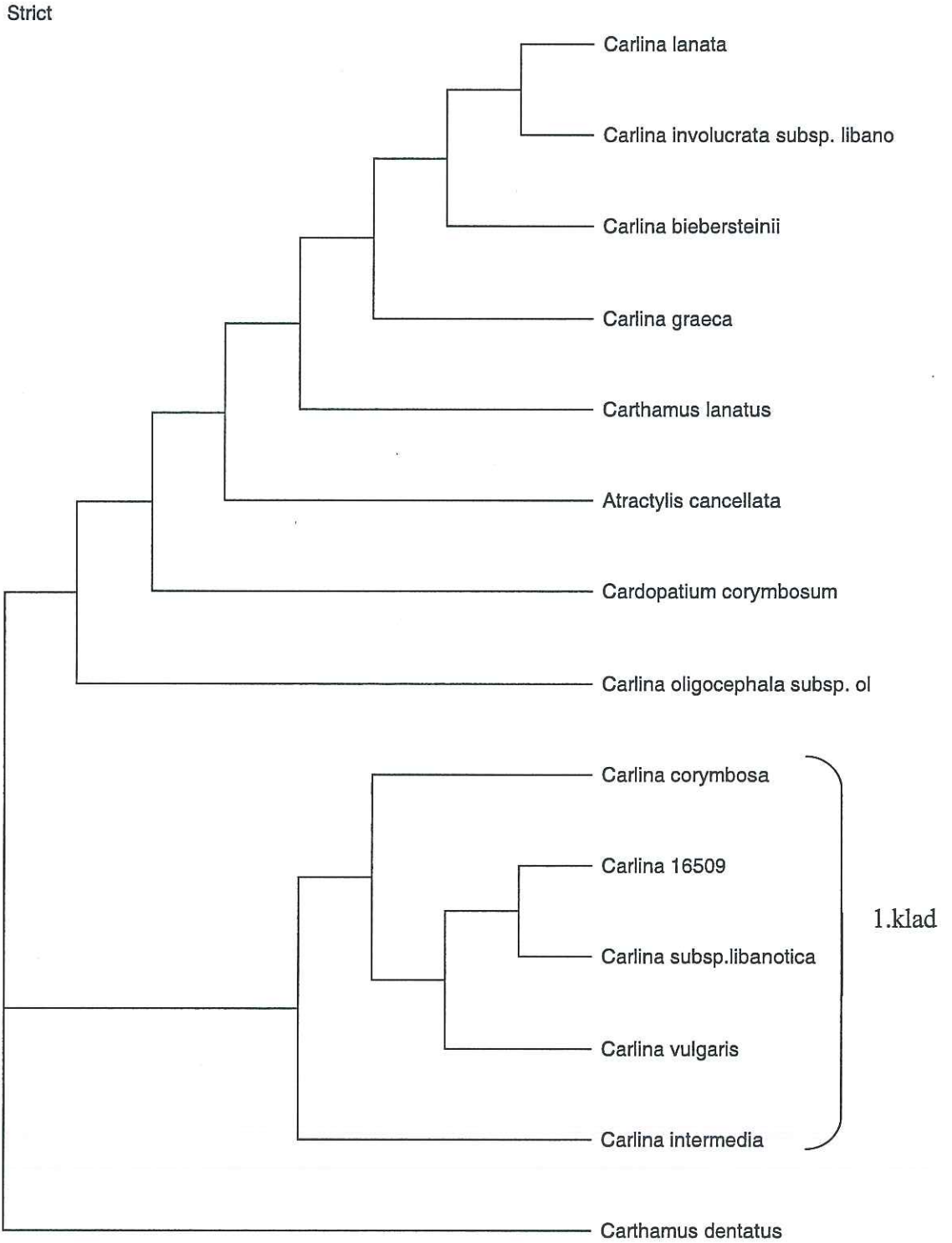
Bootstrap analizi için aynı kriterlerde seçilen ağaç topolojisinde total, değişmeyen (constant), değişken (variable), bilgi verici (informative) değerleri yine aynı olup en iyi ağaç skoru 971, yeniden düzenlenen (rearrangement) değer 1509'dir. (Şekil 3.45)

Mesafe temelli yapılan UPGMA ve NJ analizleri de Şekil 3.46 ile Şekil 3.47'de verilmiştir. En yakın komşu ağaç topolojilerinin karşılaştırmalı istatistiksel analizi yapıldığında ağaç üzerinde belirtilen birim her taksonun birbirine göre ayrılma önceliğini belirtmektedir.

1

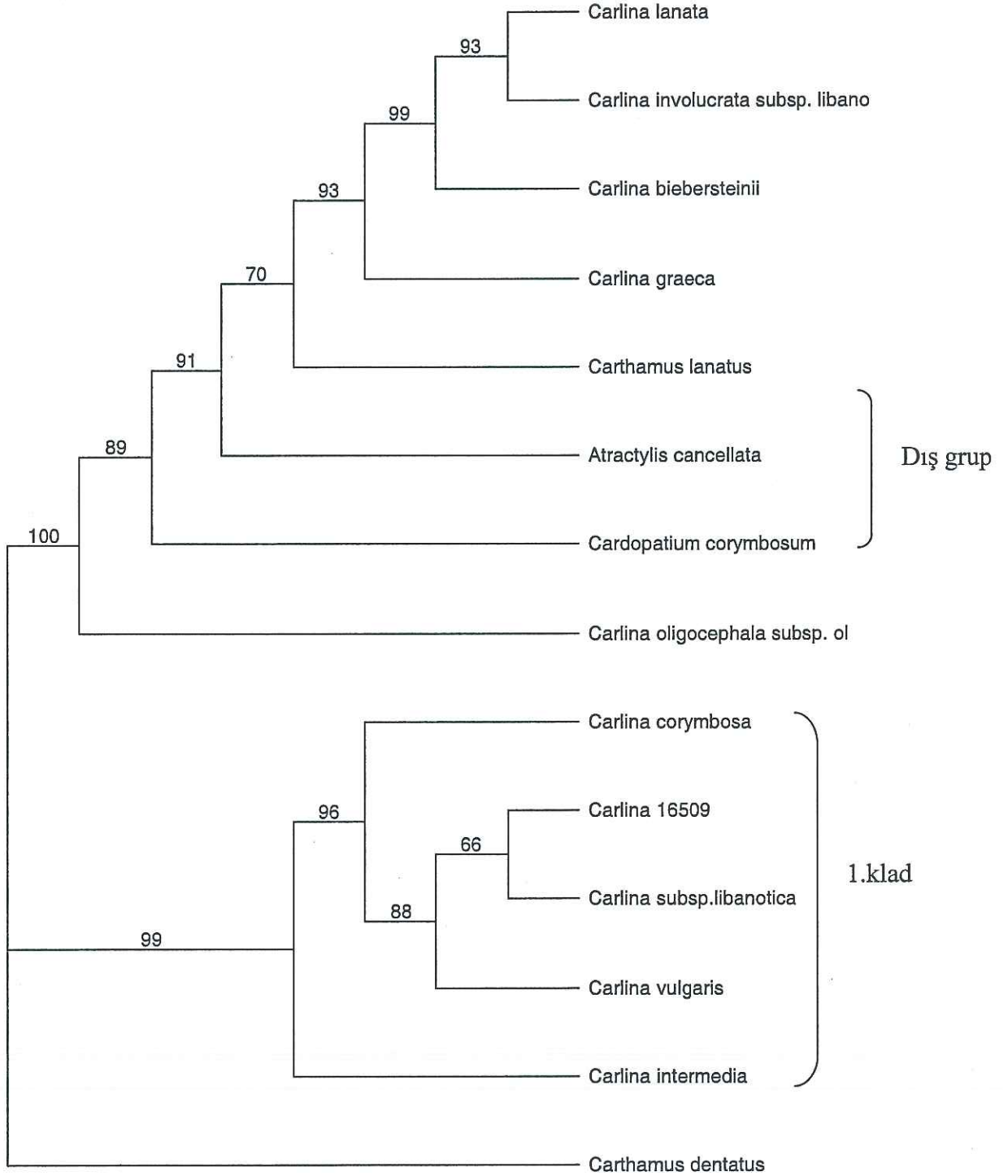


Şekil 3.43 ITS ve *trnL-F* Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Ağaç Topolojisi



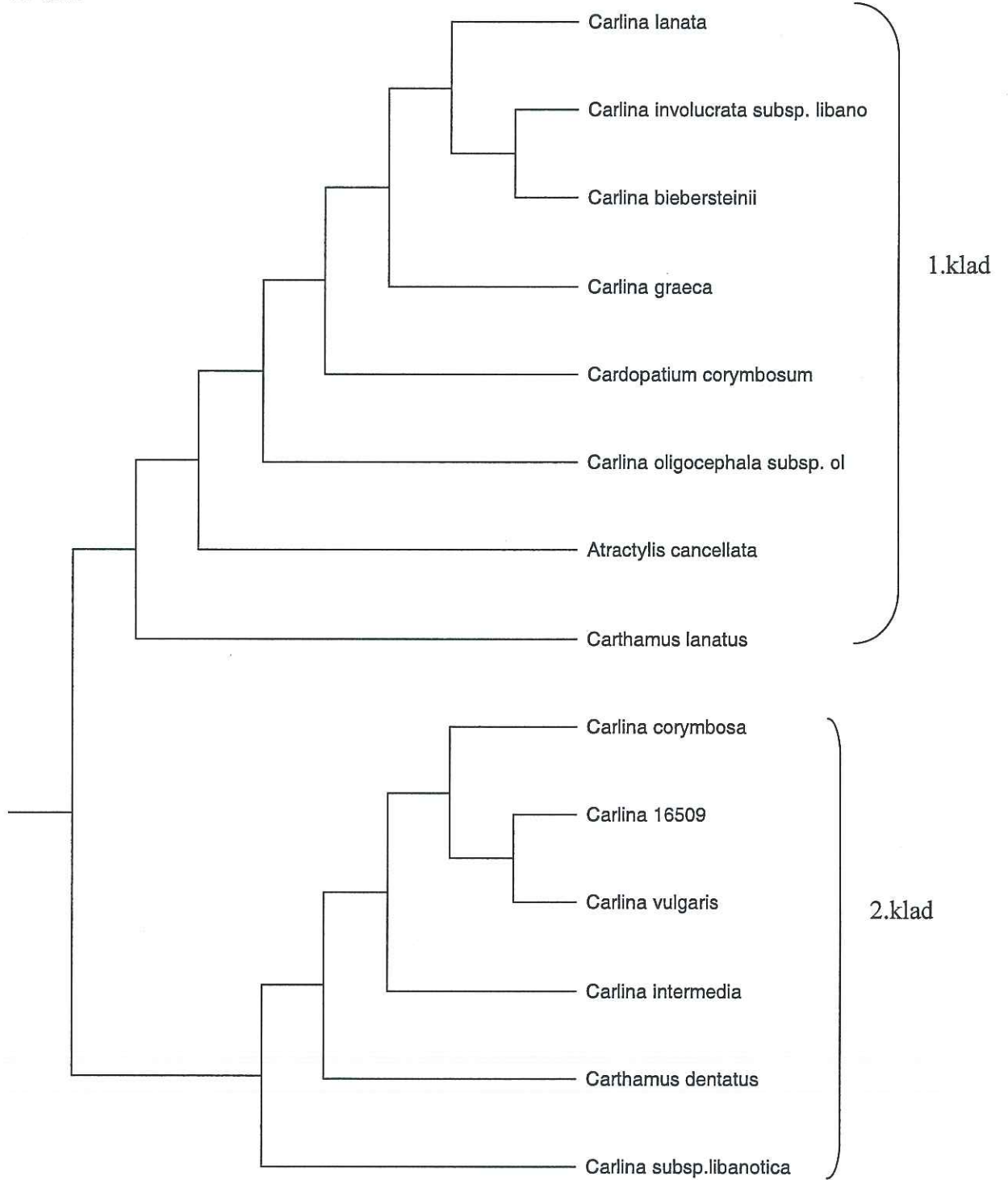
Şekil 3.44 ITS ve *trnL-F* Verilerine Dayalı En İyi 952 Ağacın Strict Consensus Ağaç Topolojisi

Bootstrap



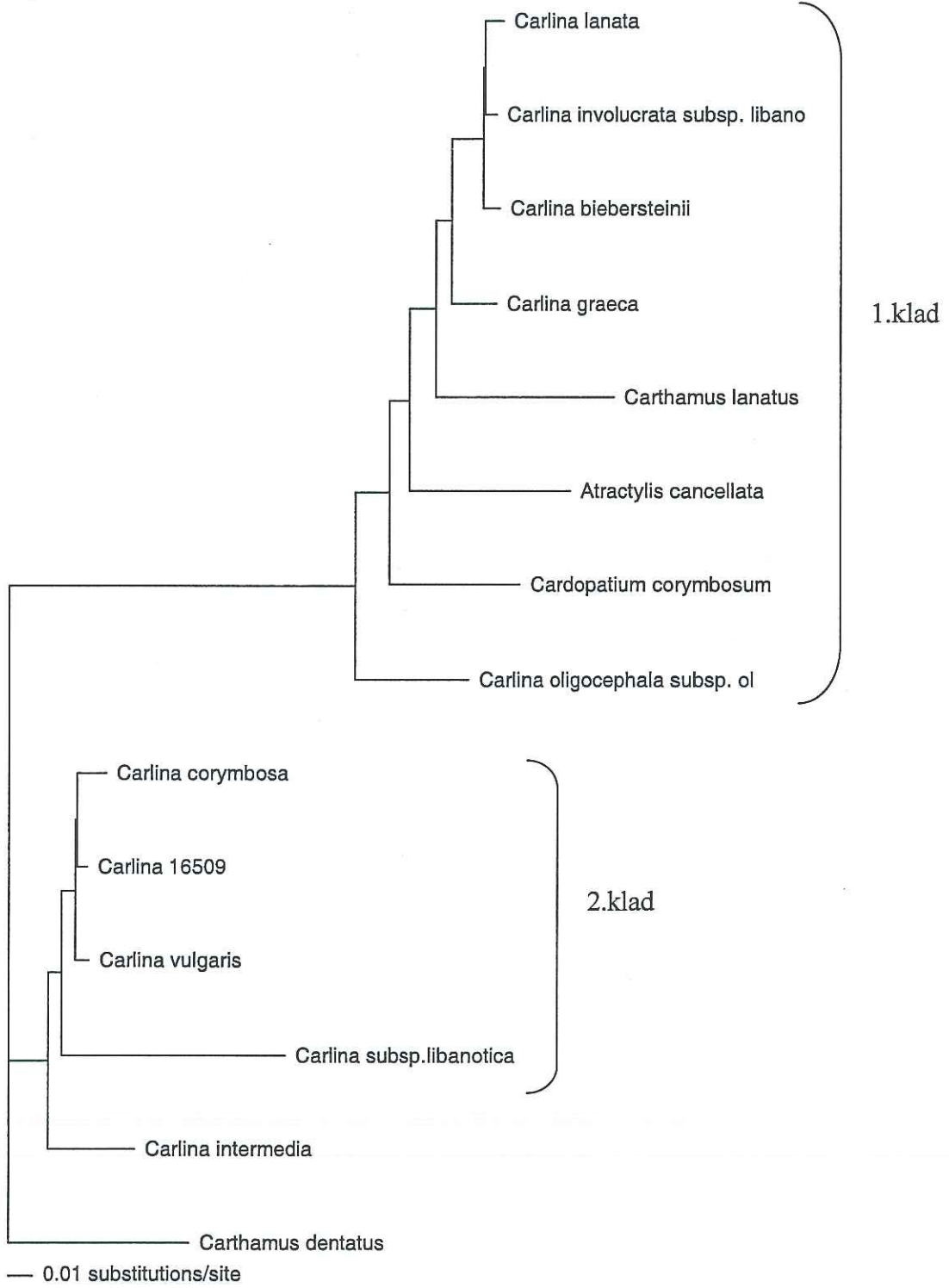
Şekil 3.45 ITS ve *trnL-F* Verilerine Dayalı Bootstrap Ağaç Topolojisi

UPGMA



Şekil 3.46 ITS ve *trnL-F* Verilerine Dayalı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Ağaç Topolojisi

NJ



Şekil 3. 47 ITS ve *trnL-F* Verilerine Dayalı NJ(Neighbour Joining) Ağaç Topolojisi

3.2.2.2.2 Morfoloji ve ITS Sonuçları Kullanılarak Yapılan PAUP Analizi

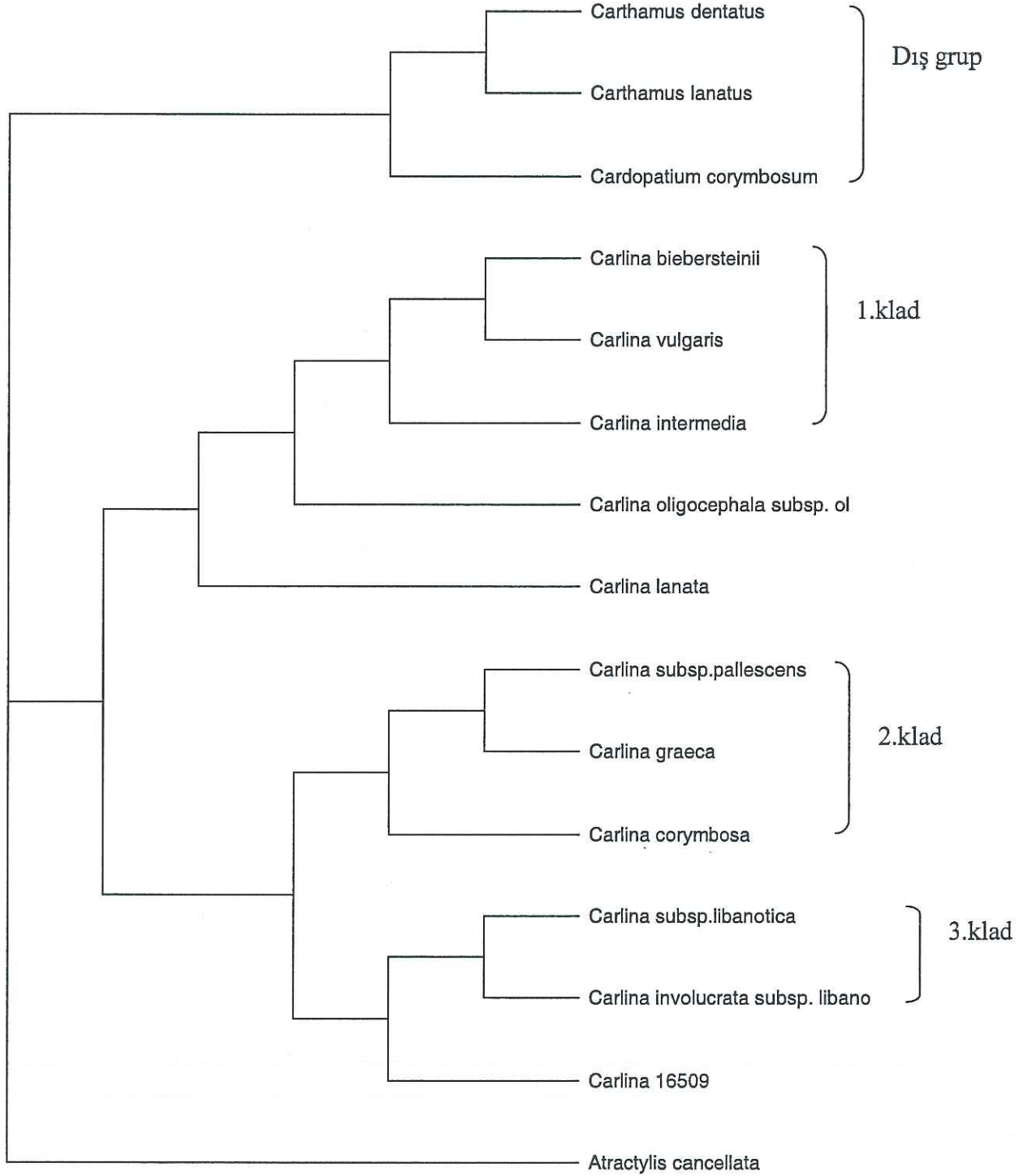
1000 ağaç seti seçilerek yapılan analizde; Branch-and-Bound algoritmasıyla parsimoni ağaçları oluşturulmuş ve total 831 ağaç oluşmuştur. Değişmeyen (constant) değer 494, değişken (variable) değer 180, bilgi verici (informative) değer 157, en iyi ağaç sayısı 568 ve en güvenilir ağaç sayısı 2 bulunmuştur. Şekil 3.48 ve Şekil 3.49'da analizin seçtiği ağaç topolojisi verilmiştir.

Heuristic Search yapılarak oluşturulan Strict Consensus ağacında; yine 1000 ağaç seti seçilerek 100 tekrarlı analiz yapıldığında ağaçla ilgili aynı verilere ulaşılmıştır. Yeniden düzenlenen (rearrangement) değer 2810'dır (Şekil 3.50).

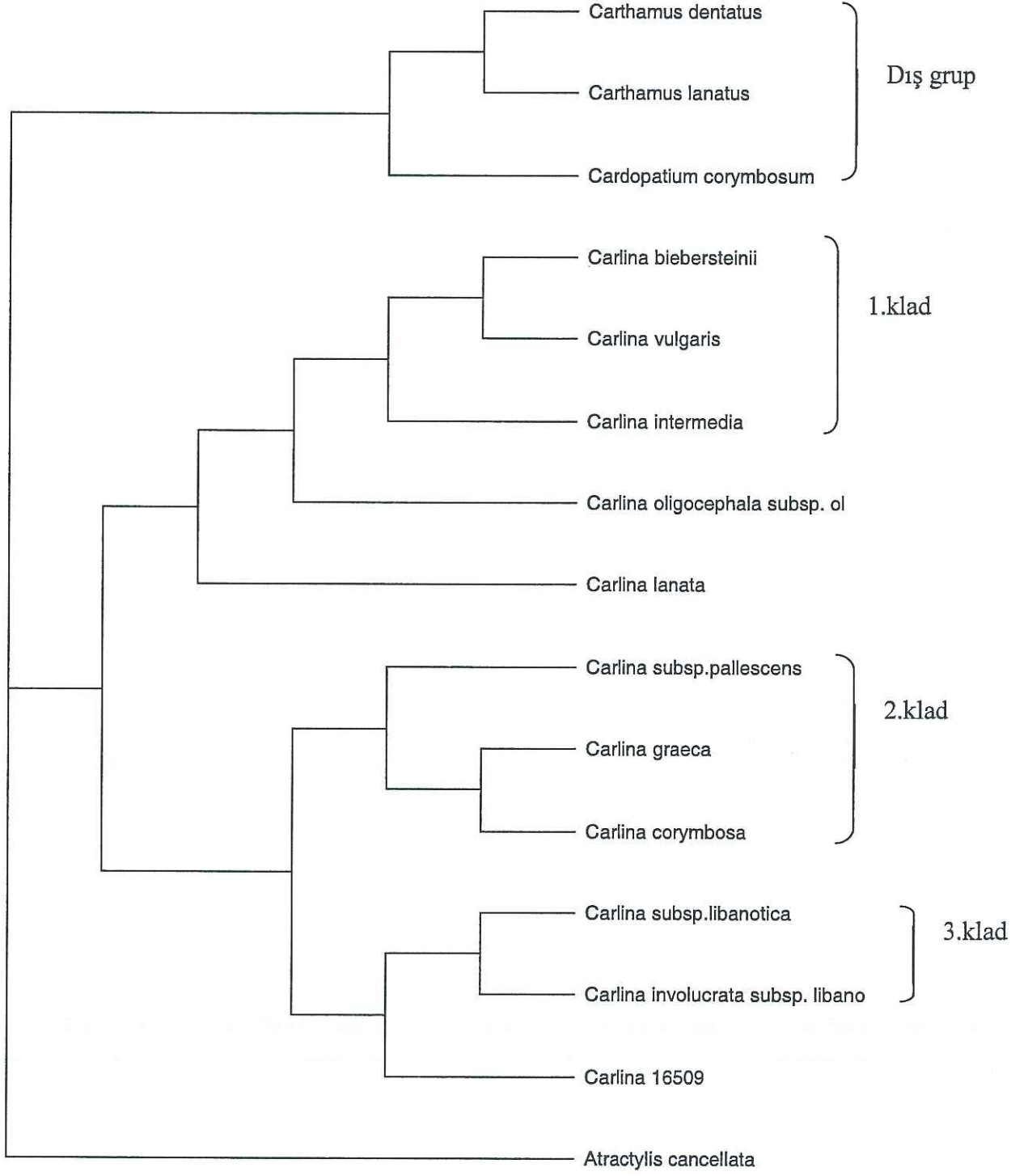
Bootstrap analizi için aynı kriterlerde seçilen ağaç topolojisinde total, değişmeyen (constant), değişken (variable), bilgi verici (informative) değerleri yine aynı olup en iyi ağaç skoru 545, yeniden düzlenene (rearrangement) değer 3738 'dir (Şekil 3.51).

Mesafe temelli yapılan UPGMA ve NJ analizleride Şekil 3.52 ile Şekil 3.53'de verilmiştir. En yakın komşu ağaç topolojilerinin karşılaştırmalı istatistiksel analizi yapıldığında ağaç üzerinde belirtilen birim her taksonun birbirine göre ayrılma önceliğini belirtmektedir.

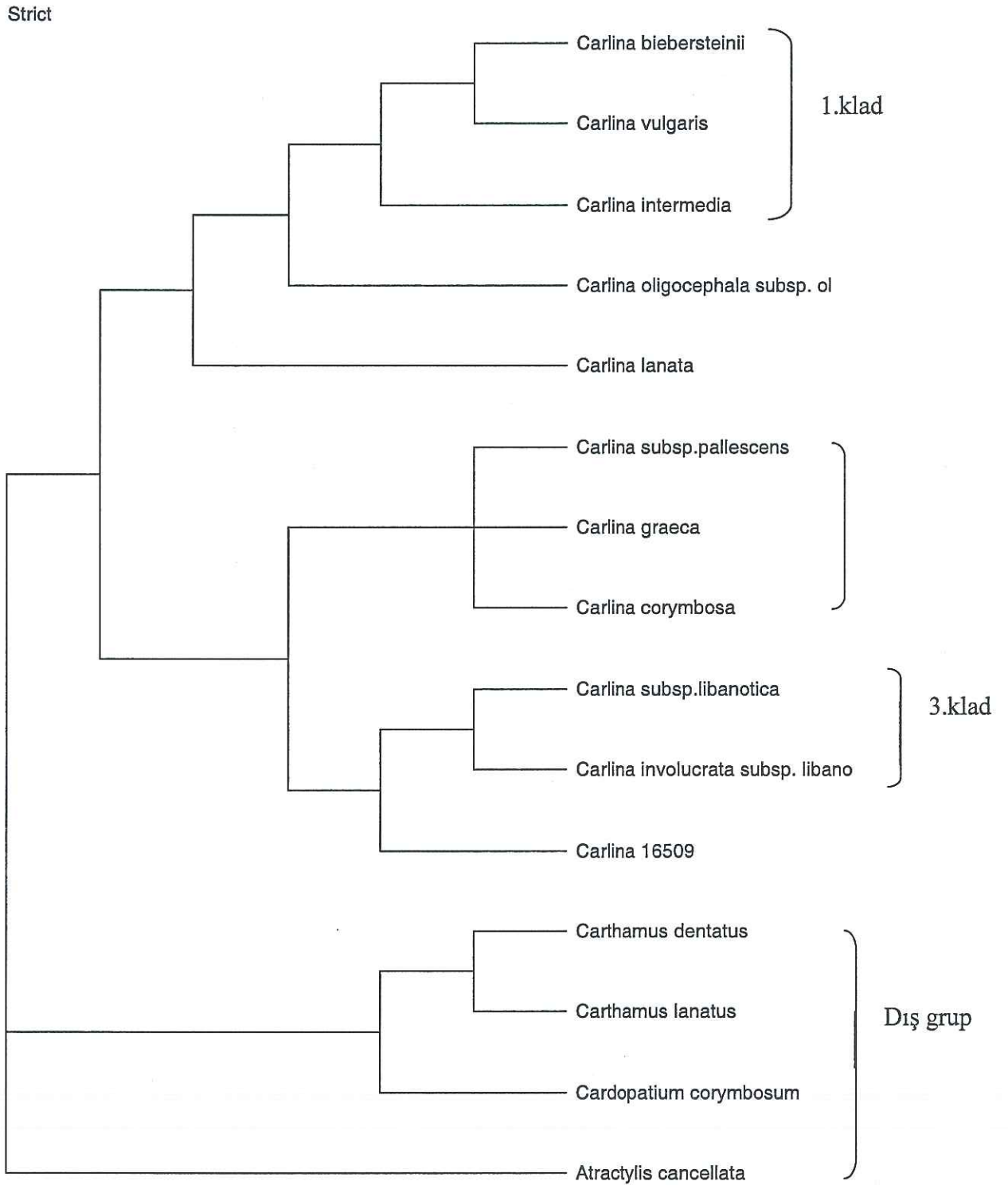
1



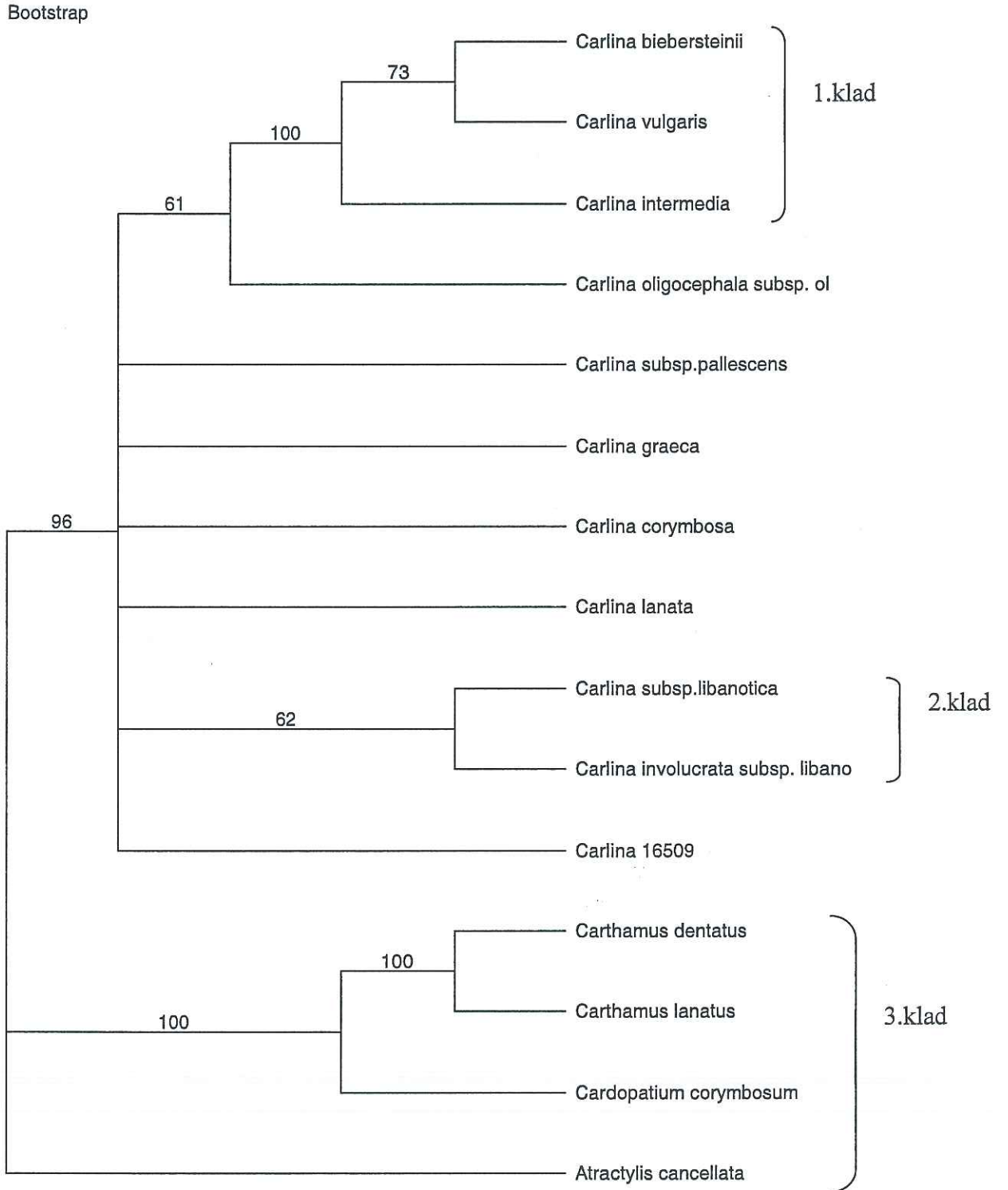
Şekil 3.48 Morfoloji ve ITS Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Ağaç Topolojisi



Şekil 3.49 Morfoloji ve ITS Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Ağaç Topolojisi

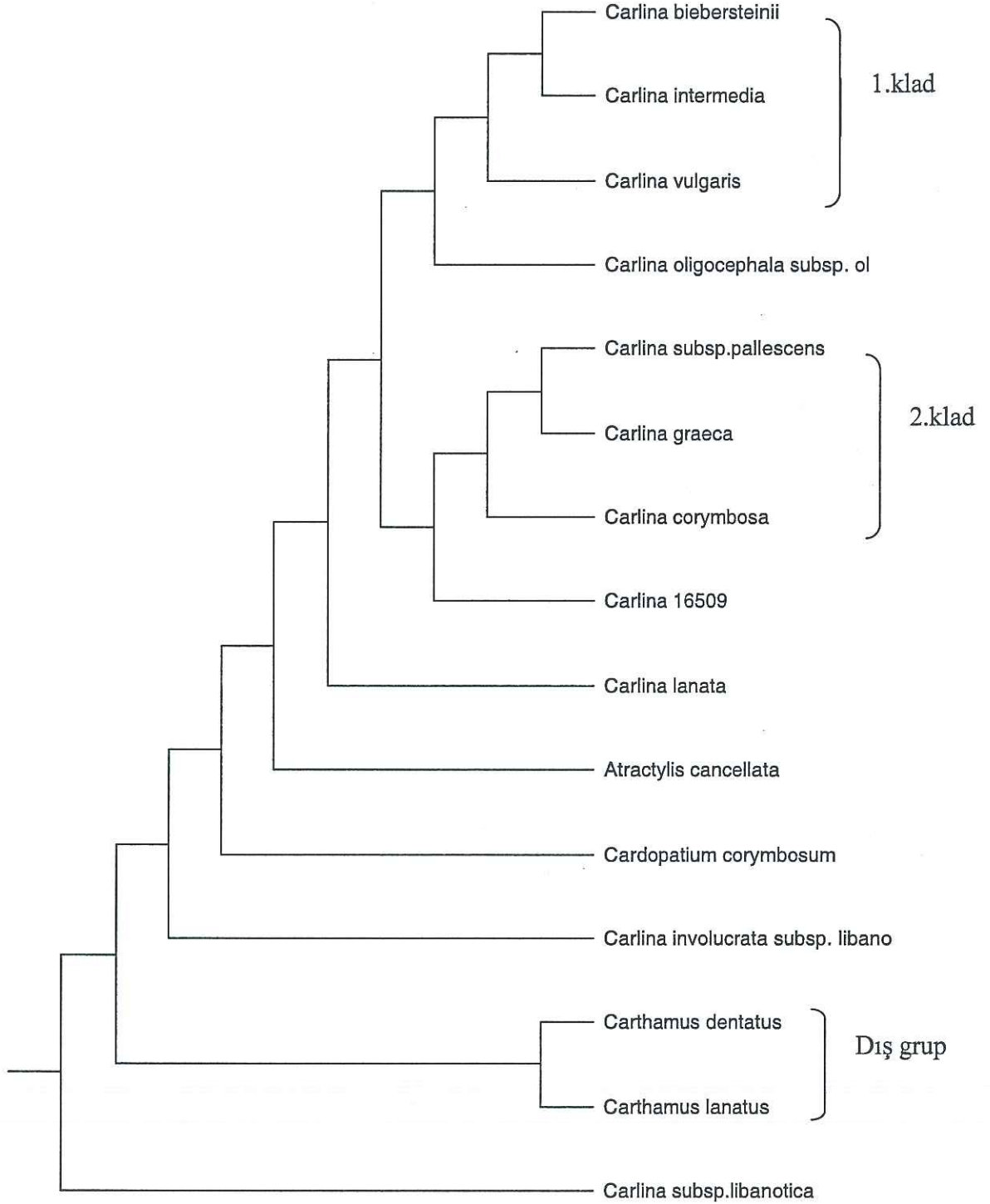


Şekil 3.50 Morfoloji ve ITS Verilerine Dayalı En İyi 568 Ağacın Strict Consensus Ağaç Topolojisi

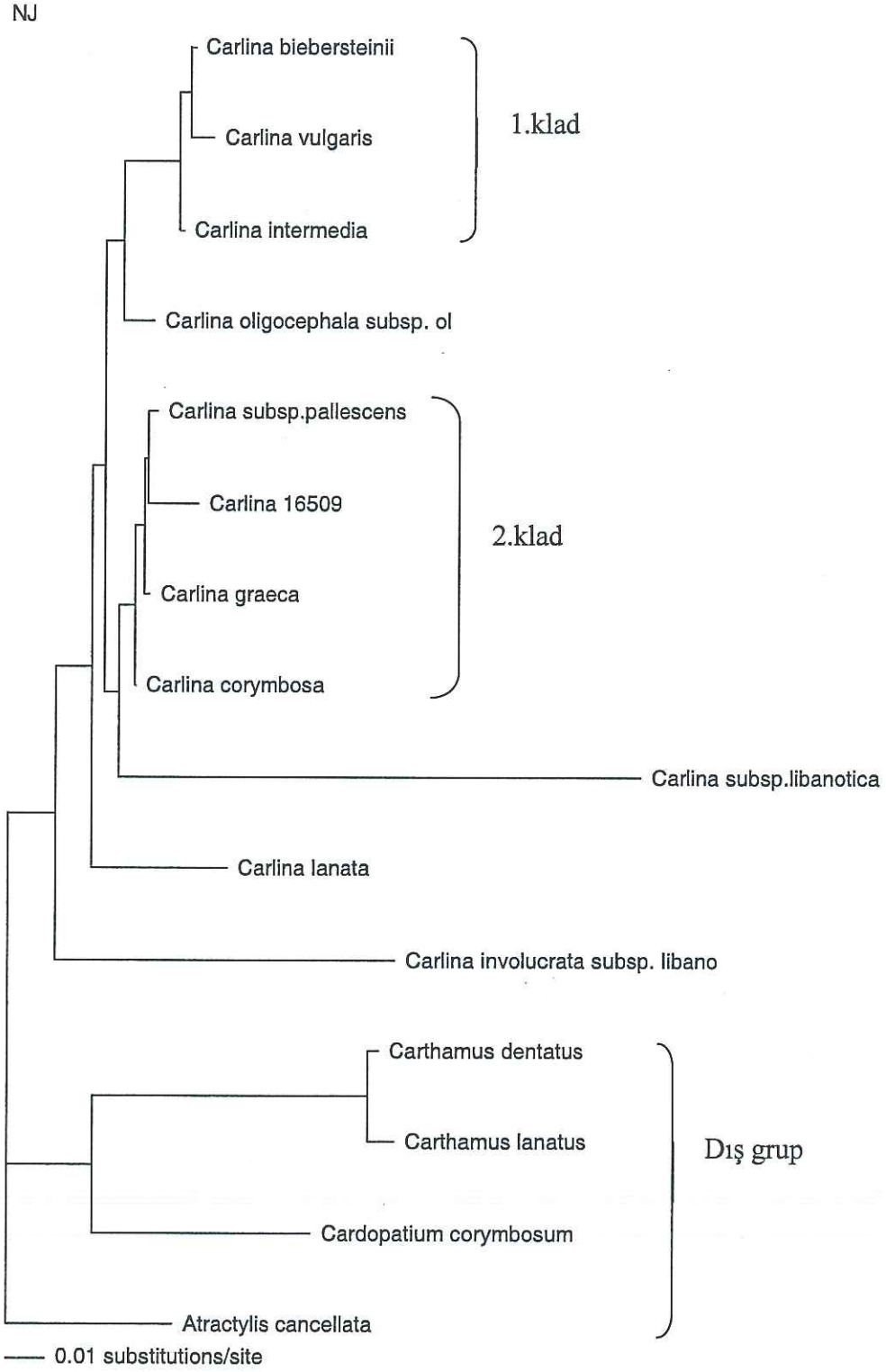


Şekil 3.51 Morfoloji ve ITS Verilerine Dayalı Bootstrap Ağaç Topolojisi

UPGMA



Şekil 3.52 Morfoloji ve ITS Verilerine Dayalı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Ağaç Topolojisi



Şekil 3.53 Morfoloji ve ITS Verilerine Dayalı NJ (Neighbour Joining) Ağaç Topolojisi

Morfoloji ve *trn*L-F Sonuçları Kullanılarak Yapılan PAUP Analizi

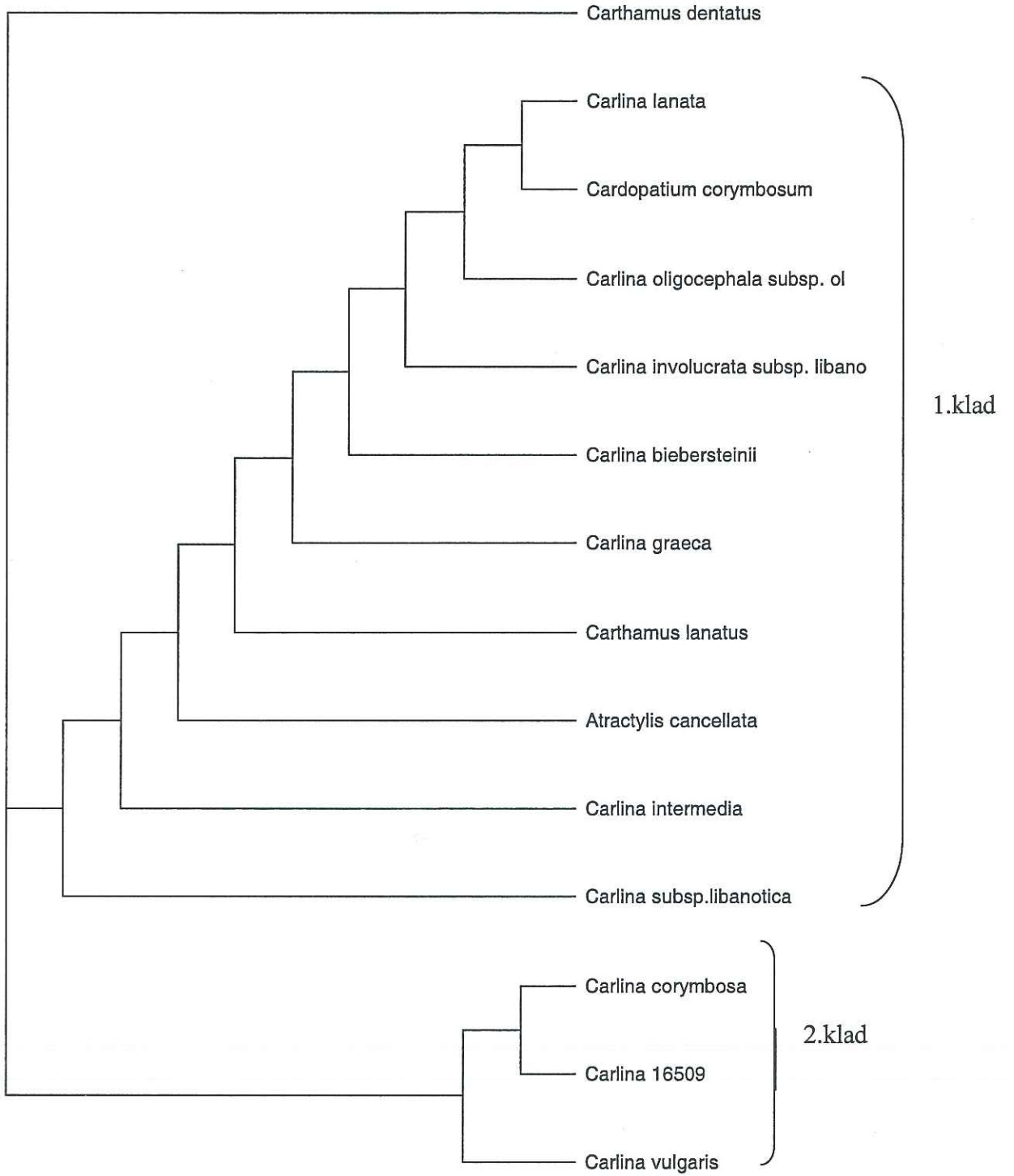
1000 ağaç seti seçilerek yapılan analizde; Branch-and-Bound algoritmasıyla parsimoni ağaçları oluşturulmuş ve total 562 ağaç oluşmuştur. değişmeyen (constant) değer 219, değişken (variable) değer 92, bilgi verici (informative) değer 251, en iyi ağaç sayısı 647 ve en güvenilir ağaç sayısı 1 bulunmuştur. Şekil 3.54'de analizin seçtiği iki ağaç topolojisi verilmiştir.

Heuristic Search yapılarak oluşturulan Strict Consensus ağacında; yine 1000 ağaç seti seçilerek 100 tekrarlı analiz yapıldığında ağaçla ilgili aynı verilere ulaşılmıştır. Yeniden düzenlenen (rearrangement) değer 1134 (Şekil 3.55).

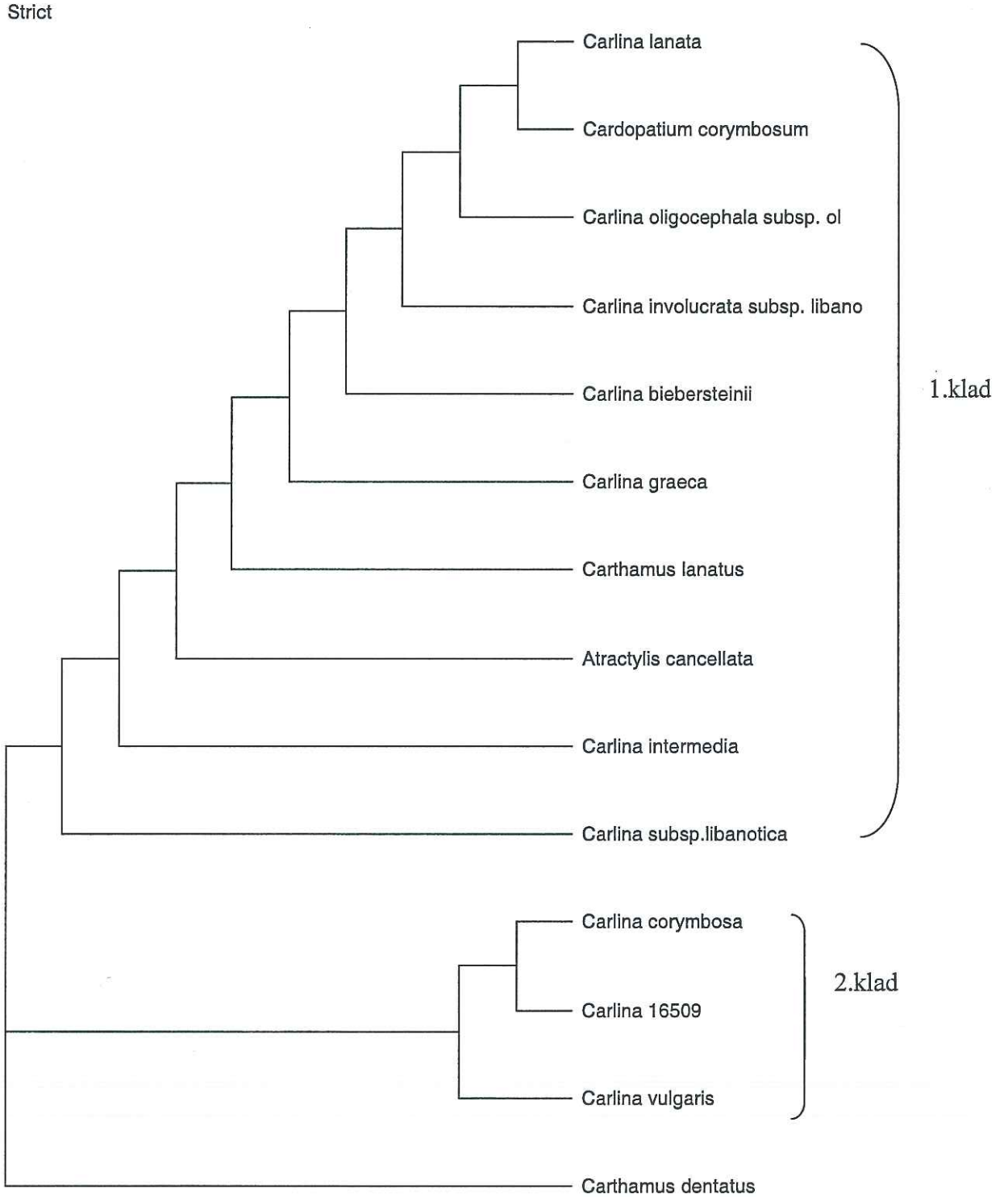
Bootstrap analizi için aynı kriterlerde seçilen ağaç topolojisinde total, değişmeyen (constant), değişken (variable), bilgi verici (informative) değerleri yine aynı olup en iyi ağaç skoru 557, yeniden düzenlene (rearrangement) değer 1601'dir (Şekil 3.56).

Mesafe temelli yapılan UPGMA ve NJ analizleride Şekil 3.57 ile Şekil 3.58'de verilmiştir. En yakın komşu ağaç topolojilerinin karşılaştırmalı istatistiksel analizi yapıldığında ağaç üzerinde belirtilen birim her taksonun birbirine göre ayrılma önceliğini belirtmektedir.

1

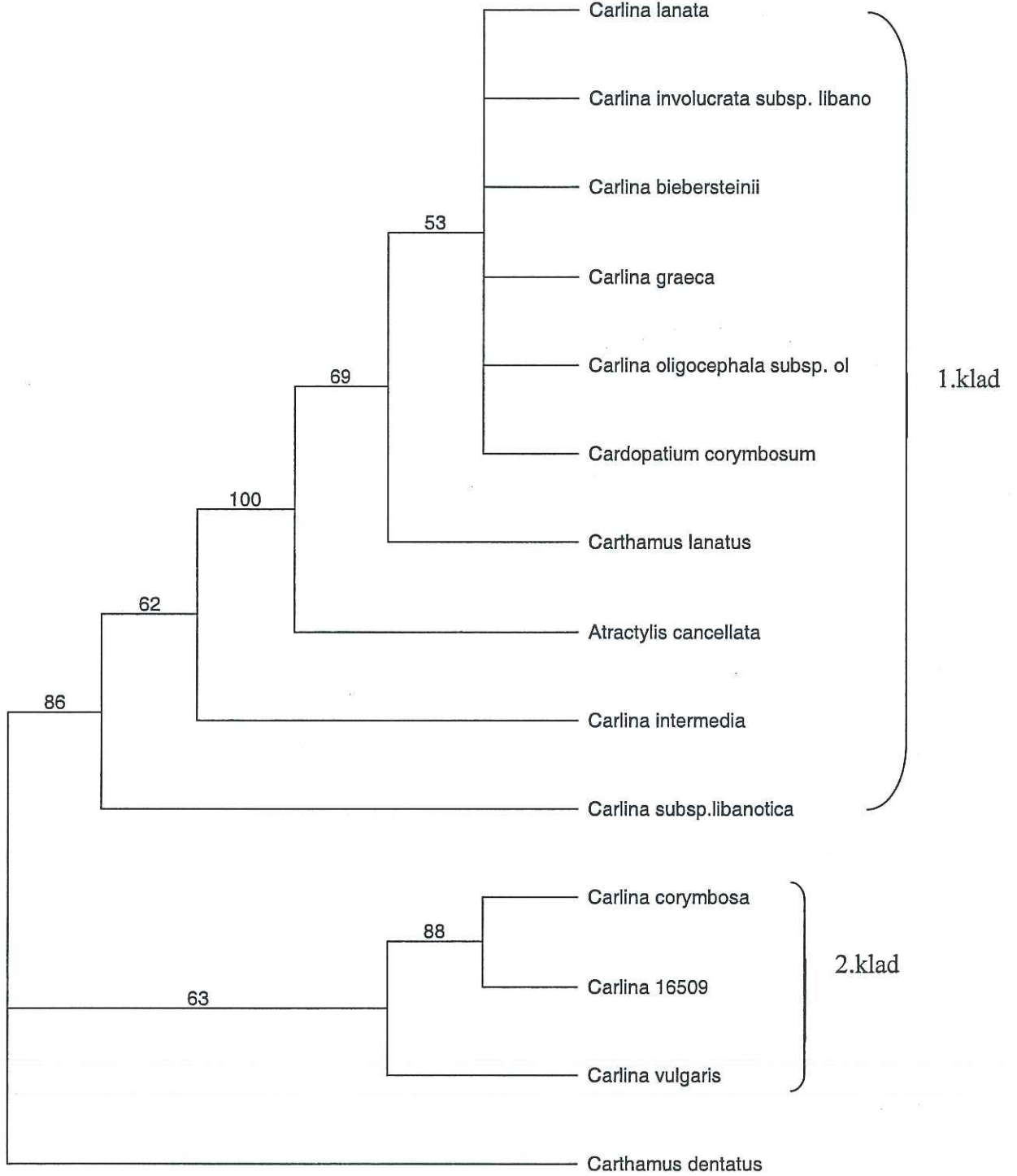


Şekil 3.54 Morfoloji ve *trnL-F* Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Ağaç Topolojisi



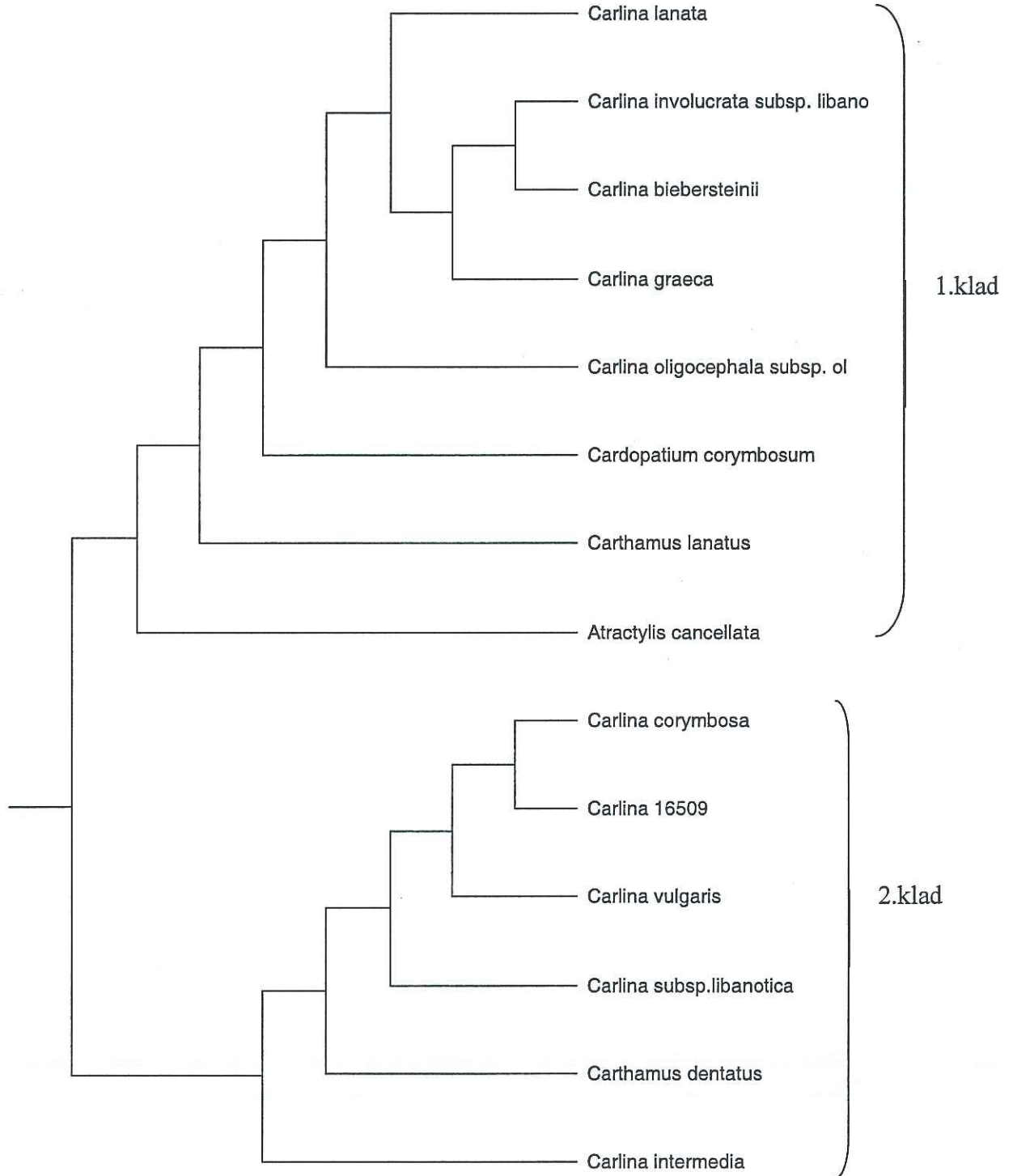
Şekil 3.55 Morfoloji ve *trnL-F* Verilerine Dayalı En İyi 547 Ağacın Strict Consensus Ağaç Topolojisi

Bootstrap



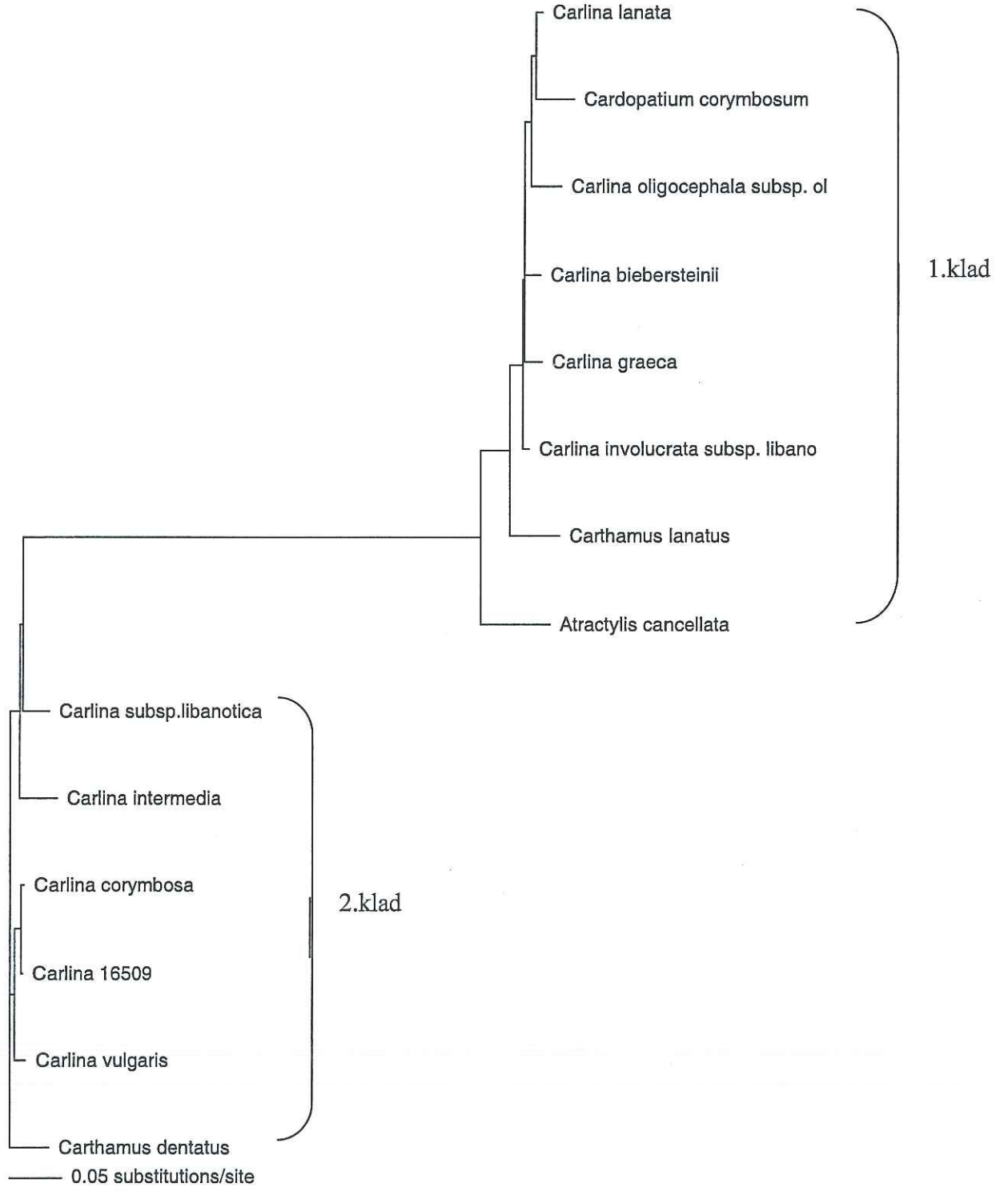
Şekil 3.56 Morfoloji ve *trnL-F* Verilerine Dayalı Bootstrap Ağaç Topolojisi

UPGMA



Şekil 3.57 Morfoloji ve *trnL-F* Verilerine Dayalı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Ağaç Topolojisi

NJ



Şekil 3.58 Morfoloji ve *trnL-F* Verilerine Dayalı NJ (Neighbour Joining) Ağaç Topolojisi

3.2.2.2.4 Morfoloji, ITS ve *trnL-F* Sonuçları Kullanılarak Yapılan PAUP Analizi

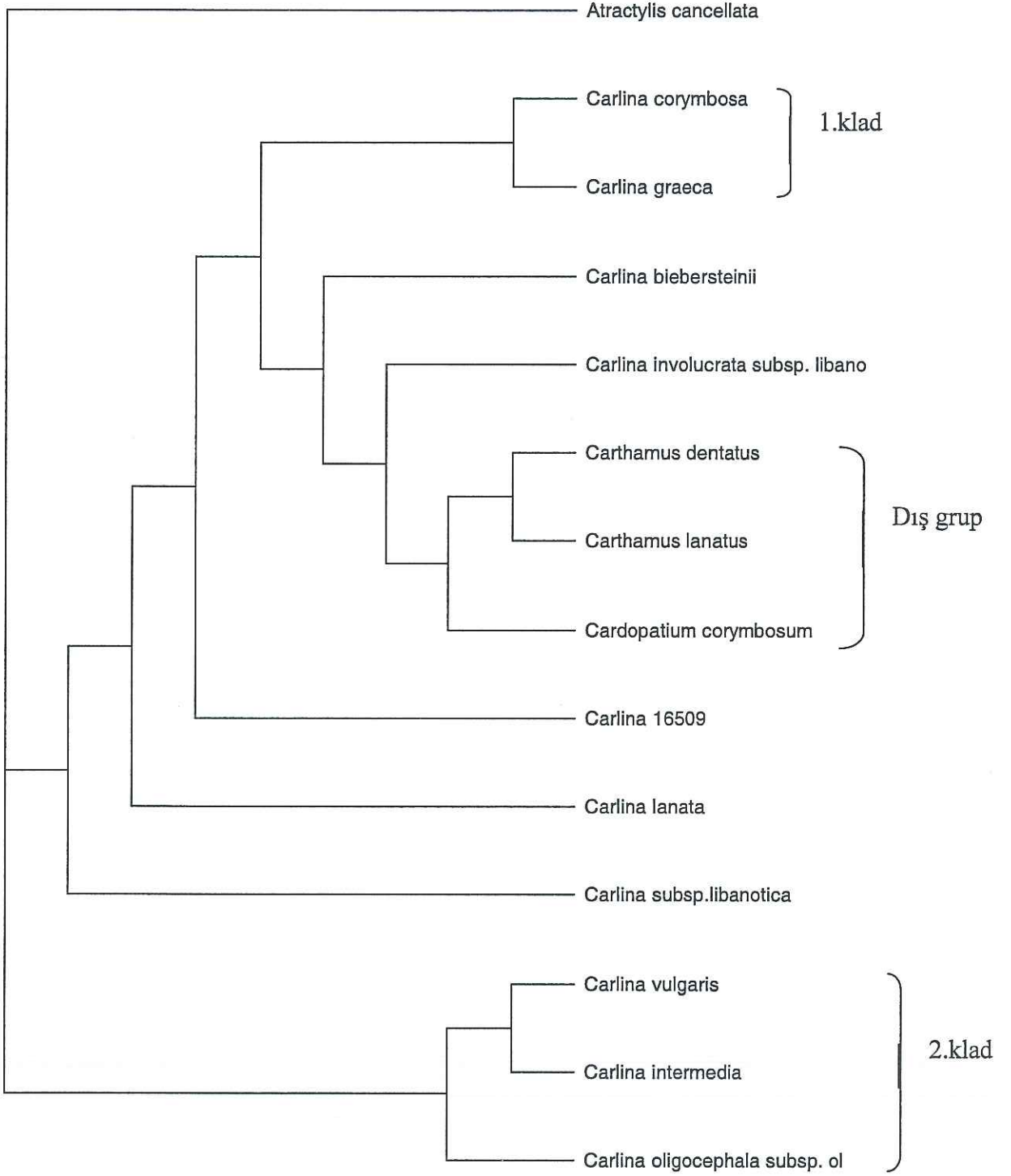
1000 ağaç seti seçilerek yapılan analizde; Branch-and-Bound algoritmasıyla parsimoni ağaçları oluşturulmuş ve total 1356 ağaç oluşmuştur. Değişmeyen (constant) değer 681, değişken (variable) değer 301, bilgi verici (informative) değer 374, en iyi ağaç sayısı 1070 ve en güvenilir ağaç sayısı 1 bulunmuştur. Şekil 3.59'de analizin seçtiği iki ağaç topolojisi verilmiştir.

Heuristic Search yapılarak oluşturulan Strict Consensus ağacında; yine 1000 ağaç seti seçilerek 100 tekrarlı analiz yapıldığında ağaçla ilgili aynı verilere ulaşılmıştır. Yeniden düzenlenen (rearrangement) değer 2630'dur (Şekil 3.60).

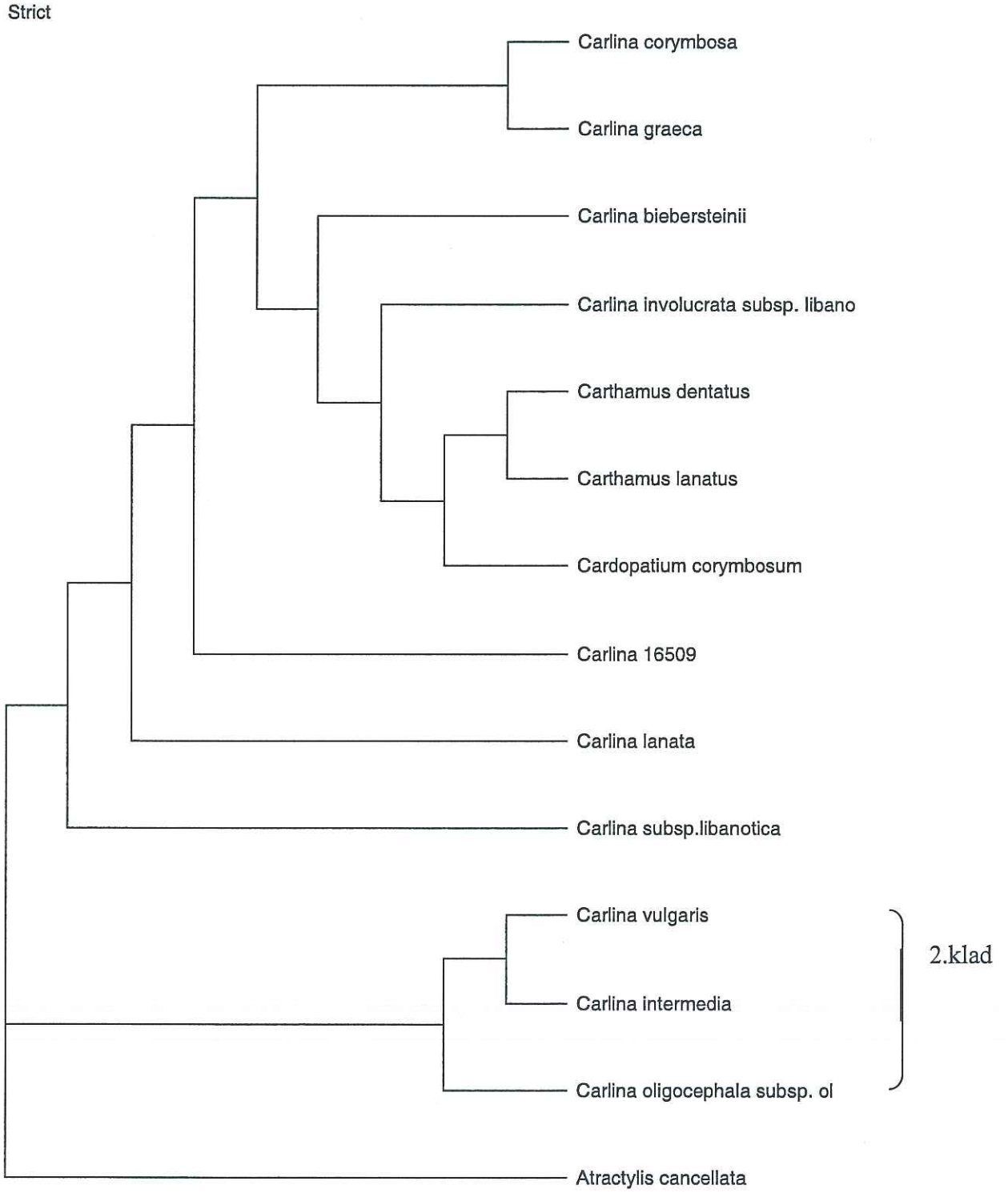
Bootstrap analizi için aynı kriterlerde seçilen ağaç topolojisinde total, değişmeyen (constant), değişken (variable), bilgi verici (informative) değerleri yine aynı olup en iyi ağaç skoru 1085, yeniden düzenlene (rearrangement) değer 866'dır. (Şekil 3.61)

Mesafe temelli yapılan UPGMA ve NJ analizleride Şekil 3.62 ile Şekil 3.63'de verilmiştir. En yakın komşu ağaç topolojilerinin karşılaştırmalı istatistiksel analizi yapıldığında ağaç üzerinde belirtilen birim her taksonun birbirine göre ayrılma önceliğini belirtmektedir.

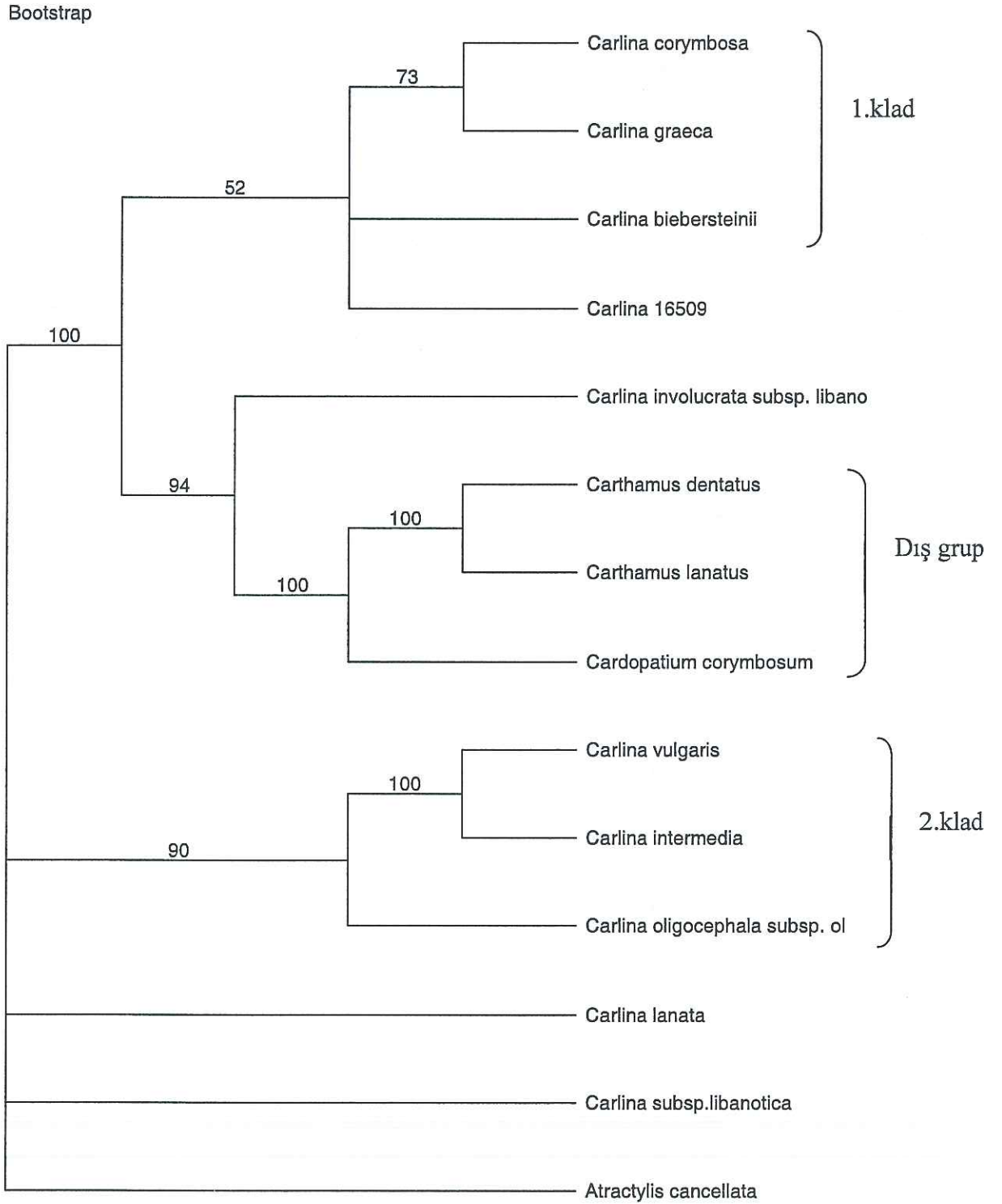
1



Şekil 3.59 Morfoloji, ITS ve *trnL-F* Verilerine Dayalı Branch-and-Bound Ağaç Topolojisi

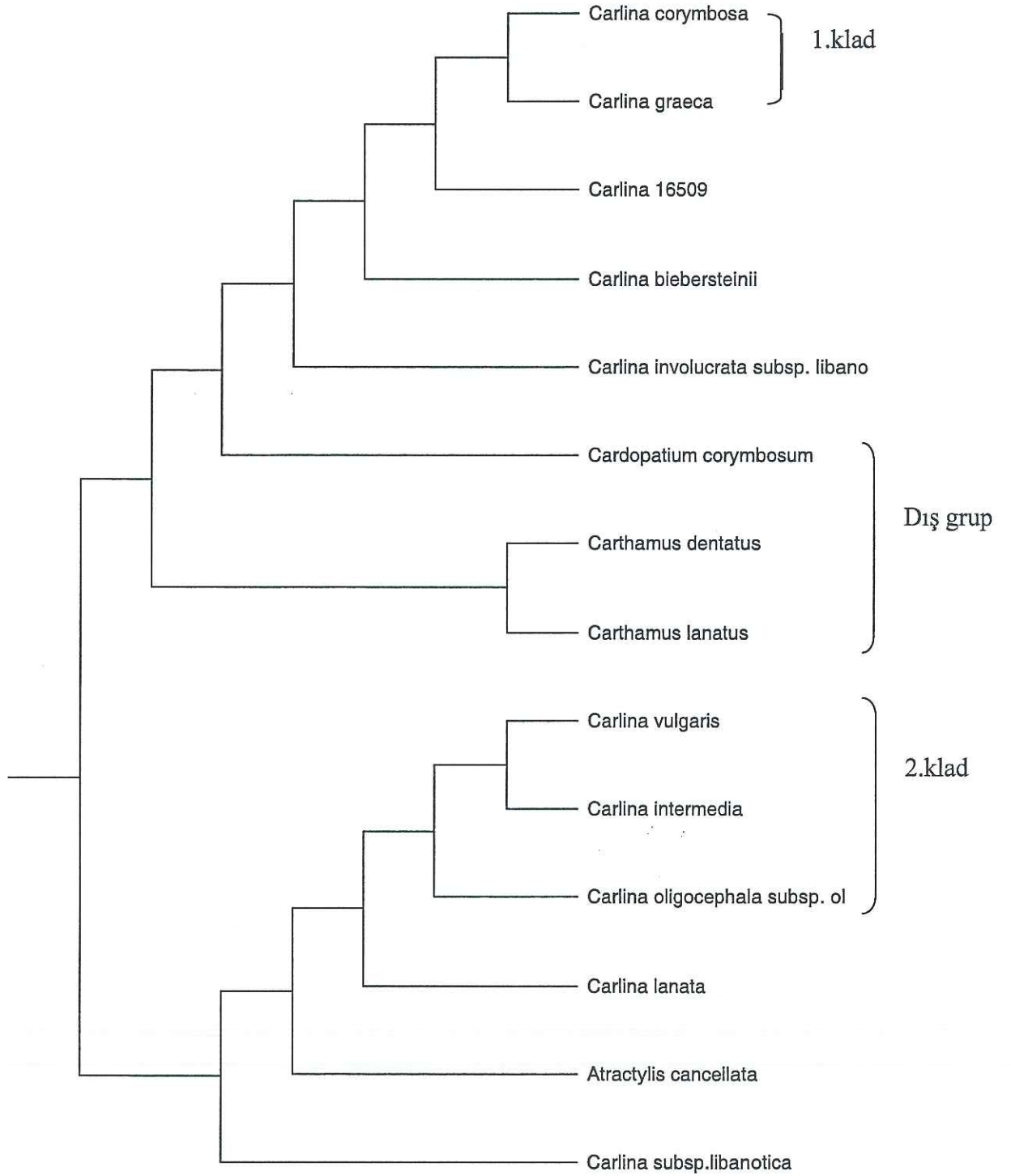


Şekil 3.60 Morfoloji, ITS ve *trnL-F* Verilerine Dayalı En İyi 1070 Ağacın Strict Consensus Ağaç Topolojisi



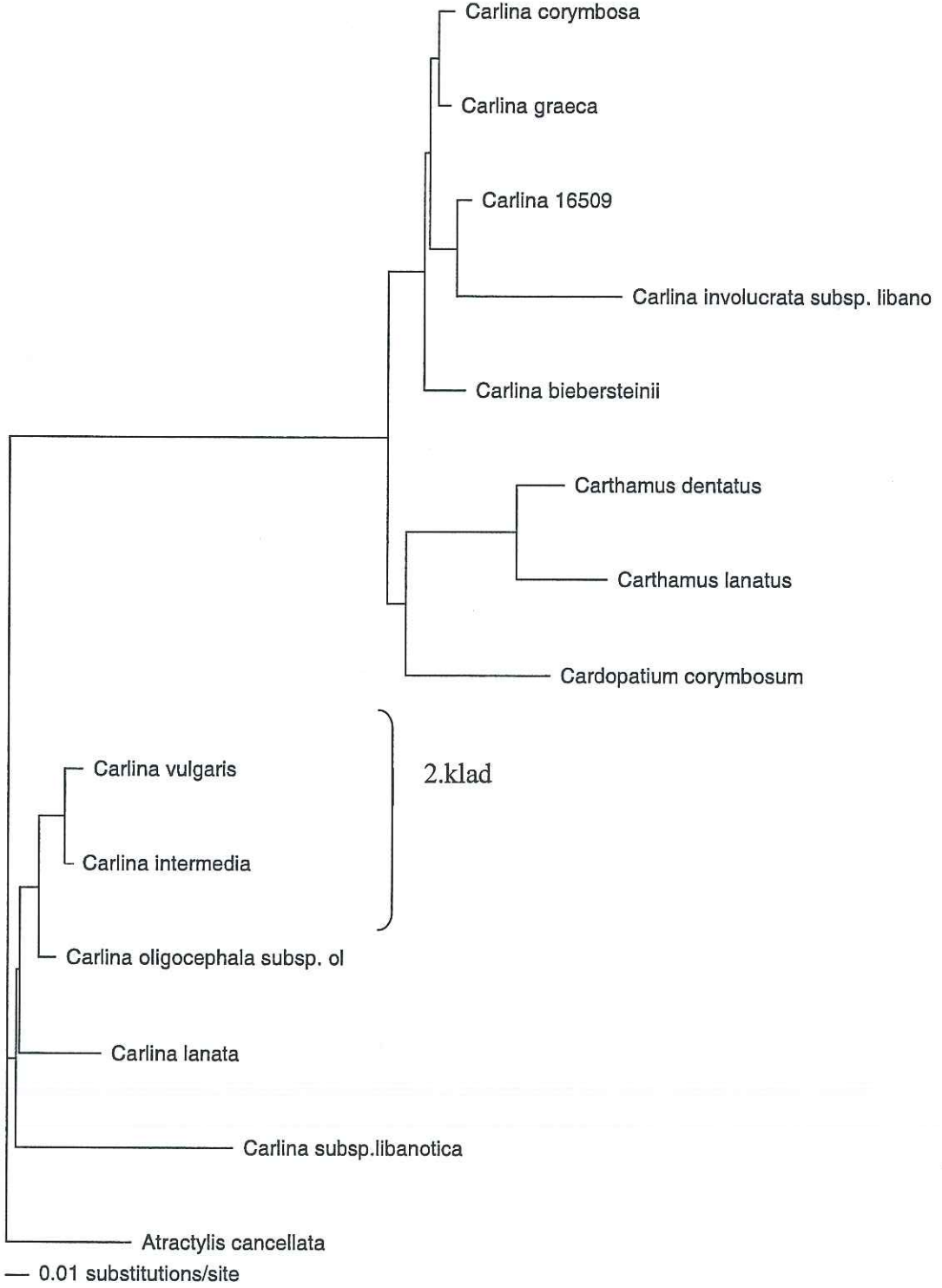
Şekil 3.61 Morfoloji, ITS ve *trnL-F* Verilerine Dayalı Bootstrap Ağaç Topolojisi

UPGMA



Şekil 3.62 Morfoloji, ITS ve *trnL-F* Verilerine Dayalı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Ağaç Topolojisi

NJ



Şekil 3.63 Morfoloji, ITS ve *trnL-F* Verilerine Dayalı NJ (Neighbour Joining) Ağaç Topolojisi

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Filogenetik analizler son yıllarda çok geniş bir kullanım alanına sahip olmuştur. Verilerin değerlendirilmesi için Parsimoni en sık kullanılan metottur. Olası bütün ağaçları değerlendirmek ve seçim yapmak için her birine farklı bir kriter ya da skor verme esasına dayanır. Maksimum parsimoni en tutumlu olan yani ilişkiyi en gerçekçi yansıtan ağacı belirlemektir.

Bu analizin dışında, genetik uzaklık metodu ise; dizi çiftleri arasındaki farklılık ve uzaklığın derecesine dayanır. Belirlenen uzaklık taksonlar arasında uzaklık matrisi oluşturulmasında kullanılır. Bu algoritmalarda küme temelli yani benzer dizi çiftleri kullanılarak yapılan UPGMA ve NJ ile birçok ağaç topolojisini karşılaştırarak en uygun olanı belirleyen optimalite temelli algoritmalar kullanılır.

Bootstrap çalışmasıyla elde edilen ağaçlarda ise; parsimoni kriterleri kullanılarak istatistiksel olarak en güvenilir dalı bulmak amaçlanır. Yapılan çalışma ile elde edilen dallarda yüzdeler olarak ne oranda desteklendiği analiz edilir. Bootstrap değeri %0-100 arasında değişen değerlerdir. Kress ve arkadaşlarının (2002) belirlediği bootstrap destek kriterlerine göre, ≥ 85 güçlü, %70-85 orta, %50-70 zayıf, < 50 çok zayıf olarak tanımlamışlardır.

Türkiye’de doğal yayılışa sahip olan *Carlina* taksonları üzerinde yapılan morfolojik gözlemler ve moleküler sistematik analizler bir araya getirilerek bu temel prensipler dahilinde filogenetik analiz yapılmıştır. Yapılan çalışmada oluşturulan farklı ağaçlarla, *Carlina* taksonlarının akrabalık dereceleri morfolojik karakterlerle beraber desteklenerek yorumlanmıştır.

ITS, *trnL-F* ve morfoloji ile ilgili matrisler kullanılarak ayrı ayrı PAUP analizi yapılmıştır. Branch- and –Bound araştırma setinde, ideal kriter (optimality criterion): Parsimony (MP), ek dizi (Addition sequence): furthest, çoklu ağaçlar

(Multrees) seçeneği etkili, baş (initial 'MaxTrees' setting) dizileme: 100, eğer maksimum dal uzunluğu sıfır ise dal çökmüş (collaps), kriter politomi (polytomies), topolojik sınırlama uygulanmamıştır (topological constraints not enforced), ağaç köksüz tanımlanmıştır.

Bootstrap analizi (Felsenstein) [116] 1000 tekrarlı olarak filogenetik analizi istatistiksel analizle destekleyen, dalların güvenilirliğini sunmaktadır.

PAUP analizlerinde önce karakter temelli yöntemlerden parsimoni kriterleri kullanılarak Heuristik arama analizleri yapıldı ve ortak karakter (consensus) ağaçları oluşturuldu. Heuristic analizler maksimum 10000 ağaç üzerinden olacak şekilde sınırlandırıldı. Oluşan dalları değerlendirmek için programda TBR (Tree- Bisection-Reconnection) seçildi. Tüm karakter tipleri sırasız (unordered) ve eşit ağırlık olacak şekilde belirlendi. Strict consensus, Bootstrap analizleri yapıldı. Mesafe (Distance) temelli yöntemlerde ise UPGMA aritmetik ortalama kullanarak yapılan ağırlıklı olmayan çift grup yöntemi ile komşu birleştirme yöntemini içeren NJ metotları kullanıldı.

ITS ve *trnL-F* primerleri için 15 taksonla dizileme yapıldı. PAUP analizinde Parsimoni ile yapılan heuristic search kriterlerine göre ağaç oluşturulmuştur. DNA dizilerine ilave olarak 28 morfolojik karakter kullanılmıştır. Yapılan Parsimoni ağaçlarının veri setleri ile ayrı ayrı birleştirilmiş parsimoni ağaçlarının veri setleri beraber olarak verilmiştir. (Tablo 4.1)

Tablo 4.1 Parsimoni Analizinde Temel ve Birleştirilmiş Veri Setlerinin Durum Özeti

	Temel veri setleri			Birleştirilmiş veri setleri			
	ITS	<i>trnL</i> -F	Morfo.	ITS+ <i>trnL</i> -F	ITS+ Morfo.	<i>trnL</i> - F+Morfo	ITS+ <i>trnL</i> F+ Morfo.
Toplam karakter	803	534	28	1337	831	562	1356
Bilgilendirici karakter (informative)	129	224	-	351	157	251	374
değişmeyen karakter (constant)	494	219	-	728	494	219	681
değişken karakter(variable)	180	91	-	258	180	92	301
en iyi ağaç sayısı	444	425	106	952	568	547	1070
en güvenilir ağaç sayısı	24	16	2	1	2	1	1
yeniden düzenlenen değer (rearrangement)	6412	17276	-	1709	2810	1134	2630

4.1 Temel Veri Setleri

4.1.1 Morfolojik Karakterlere Dayalı Yapılan Filogenetik Analiz

PAUP analizi için MP kriterlerinden “Kes-Bağla (Branch-and-Bound)” algoritması kullanılmıştır. Optimizasyonları birbirine çok yakın olan ağaç topolojileri arasından gerçeği en doğru yansıtan dallanmayı bulmayı amaçlayan bu analizde, belirlenen algoritmalarından elde edilen 106 tane en iyi parsimoni ağacından yararlanılmıştır. Bunlardan 2 tanesi en güvenilir ağaç topolojisine sahip ağaçtır (Şekil 3.25, Şekil 3.26).

Morfoloji için yapılan Parsimoni analizinde toplam 28 karakter kullanılmıştır. Şekil 3.25 ve Şekil 3.26’deki ağaç topolojilerine bakıldığında dış grup olarak seçilen *Cardopatum corymbosum*, *Carlina* taksonlarına en uzak tür olarak belirlenmiştir.

Carthamus ve *Atractylis* türleri *Carlina*'ya daha yakın türler olarak gözükmektedir. *Carlina* türleri ise kendi içinde beklendiği şekilde gruplaşmıştır (Şekil 3.25, 3.26).

Her iki ağaçta da *C. corymbosa*, *C. greaca* ve *C. involucrata* monofiletik bir grup olarak ayrılmıştır. Bu durum kalıcı roset yapraklara sahip olmamaları, kapitulalarının geniş ve saman renginde olması, parçalı yapraklı ve belirgin tepe dikenleri ile desteklenir. *C. lanata* özellikle 1. ağaçta diğer türlerden tek yıllık olması ve fillarilerinin pembe-mor olması ile daha iyi ayrılmıştır. *C. vulgaris*, *C. biebersteinii* ve *C. intermedia* her iki ağaç topolojisinde de monofiletik bir grup oluşturmuşlardır. Bu türlerin iki yıllık, saman rengi fillarilere sahip olmaları, gövde yapraklarının ovat-lanseolat, dereceli veya ani kısılması ile beyaz örümcek ağsı tüylenmenin ortak olarak gözlenmesiyle ağaç topolojisindeki ayrım desteklenmektedir. *C. oligocephala* subsp. *oligocephala* ile *C. oligocephala* subsp. *pallescens* taksonları monofiletik bir grup olarak ayrılmıştır. *C. oligocephala*'nın iki alttürü olan bu taksonlar benzer ortak özellik olarak genelde tabanda dallanmış, kalıcı roset yapraklı, saman rengi fillarili, sık örümcek ağsı tüylü lineer-lanseolat yapraklı olmalarıyla diğer taksonlardan ayrılmıştır. *Carlina* sp. (BY16509) olarak verilen her iki ağaç topolojisinde de diğer taksonlardan tamamen ayrı düşmüştür. Çok yıllık, tabanda genelde dallanmış, dış fillarilerin içtekileri geçmesi ve örümcek ağsı tüylenmenin belirgin olmasına rağmen ovat-oblong yapraklarıyla diğer yakın türlerden belirgin olarak ayrılmıştır. Bu durum ağaç topolojisinde de gözlenmektedir (Şekil 3.25, 3.26).

Şekil 3.27'da verilen heuristik search yapılarak belirlenen strict consensus ağacı bütün dalları karşılaştırarak en fazla oluşan dalların bir araya getirildiği, olabilecek en güvenilir ağaç topolojisini vermiştir. Bu ağaç incelendiğinde; dış grup olarak belirlenen türler ve *Carlina* sp. (BY16509) olarak verilen *Carlina* örnekleri belirgin olarak diğer *Carlina* taksonlarından ayrı düşmüştür. Bu dal ayrımı Branch-and-Bound analizinde tartışılan morfolojik gözlemlerle yine uygunluk göstererek desteklenmiştir. *C. oligocephala* subsp. *oligocephala* ve *C. oligocephala* subsp. *pallescens* taksonları monofiletik grup oluşturmuştur. *C. intermedia*, *C. biebersteinii* ve *C. vulgaris* türleride beraber monofiletik grup oluşturarak morfolojik veriler desteklenmiştir. *C. corymbosa* ile *C. greaca* ve *C. involucrata* ile *C. lanata* türleri

monofiletik gruplar oluştururken hepsi bir arada gözlemlendiğinde parafiletik bir grup oluşturmuşlardır. Bu kardeş gruplar yine yukarıda belirtilen morfolojik özelliklerle desteklenmiştir (Şekil 3.27).

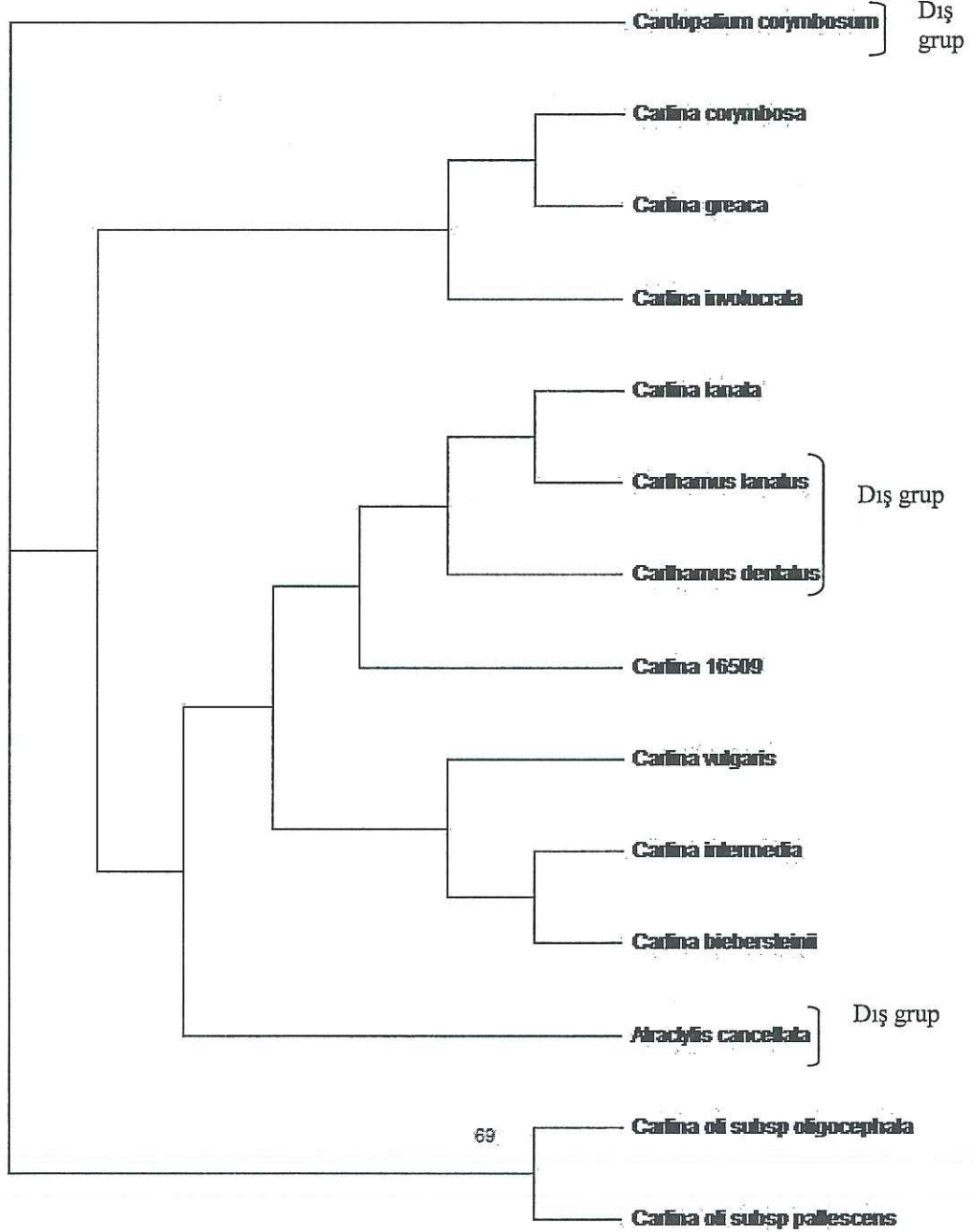
Sadece 1 dal bootstrap değerinde %69 ile %50'nin üzerinde anlamlı bir güvenilirlik vermiştir. Analizinde %69 ile *C. oligocephala* taksonları arasındaki monofiletiklik desteklenmiştir. *Carlina*'nın diğer türleri ve dış grup olarak belirlenen türler arasında istatistiksel veriler %50'nin çok altında kaldığından, ağaç topolojisinde görünür bir ayrıma imkan vermediğinden yorumlanamamıştır. Bu türler politomi göstermektedir (Şekil 3.28, Şekil 4.1).

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 3.29'da, NJ Analizi sonucu oluşan filogenetik ağaç Şekil 3.30'da gösterilmiştir.

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.

Filogenetik ağaçtaki uzun olan dallar günümüze en yakın olan atayı göstermektedir, kısa olan dallar ise en eski(ilkel) atayı göstermektedir. Şekil 3.31'deki UPGMA analizinde dal uzunlukları eşit olarak hesaplanmaktadır. Bu metod ilk kullanılan metod olup günümüzde kardeş taksonların aynı oranda mutasyona uğrama şartlarının geçerli kabul edilmemesinden dolayı Neighbour Joining (Komşu Katılım) metoduyla mesafelerin ölçülmesi gereğini ortaya çıkarmıştır ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Şekil 3.29). Şekil 3.30'da ise NJ

analizi sonucunda oluşan filogenetik ağaçtaki dal uzunluklarının birbirinden farklı olduğu gözlemlenmektedir. Filogramdaki bu dal uzunluklarının farklı olması türlerin hangisinin daha önce veya sonra evrimleştiğini gösterir.



Şekil 4.1 Morfoloji Verilerine Dayalı Branch-and-Bound 1 numaralı Ağaç Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş Ağaç Topolojisi

4.1.2 ITS Sonuçlarına Dayalı Yapılan Filogenetik Analiz

PAUP analizi için MP kriterlerinden “Kes-Bağla (Branch-and-Bound)” algoritması kullanılarak yapılan analizde 444 tane en iyi parsimoni ağacından yararlanılmıştır. Bunlardan 24 tanesi en güvenilir ağaç topolojisine sahip ağaçtır ve ilk üç ağaç seçilerek tartışılmıştır (Şekil 3.31, Şekil 3.32, Şekil 3.33) .

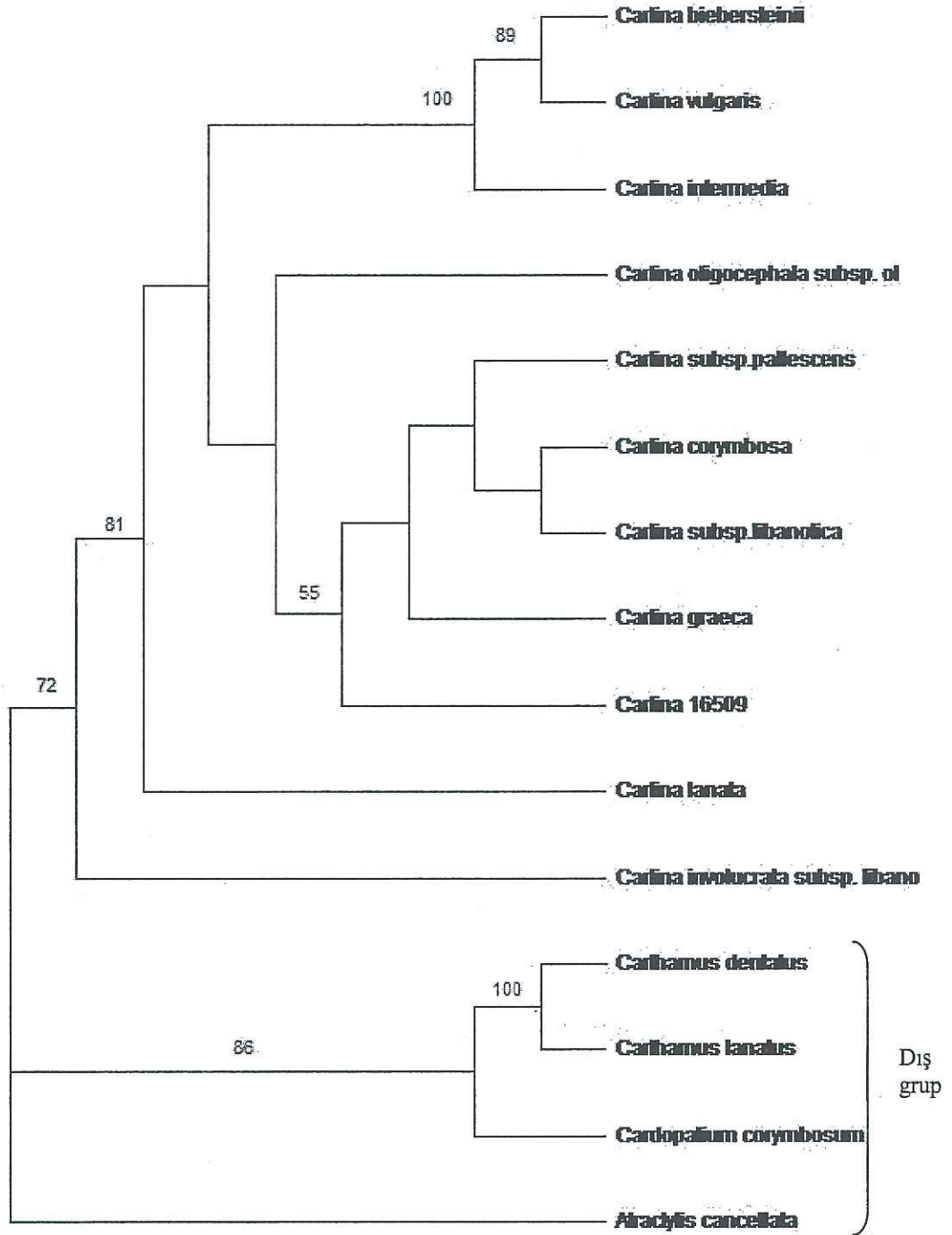
ITS için yapılan Parsimoni analizinde toplam 803 kriter kullanılmıştır. Şekil 3.31, Şekil 3.32 ve Şekil 3.33’deki ağaç topolojilerine bakıldığında dış grup olarak seçilen *Cardopatum corymbosum*, *Carthamus lanatus*, *Carthamus dentatus* ve *Atractylis cancellata* türleri *Carlina* taksonlarından beklendiği gibi ayrı düşmüştür.

Her üç ağaçta da *C. vulgaris*, *C. biebersteinii* ve *C. intermedia* ağaç topolojisinde de monofiletik bir grup oluşturmuşlardır. Bu türlerin iki yıllık, saman rengi fillarilere sahip olmaları, gövde yapraklarının ovat-lanseolat dereceli veya ani kısalması ile beyaz örümcek ağsı tüylenmenin ortak olarak gözlenmesiyle, ağaç topolojisindeki ayırım morfolojik olarakta desteklenmektedir. *C. lanata* üç ağaçta da diğer bütün *Carlina* taksonlarından ayrı bir dalda gözlemlenmektedir. Bu tür diğer türlerden morfolojik olarak tek pembe kapitulalı ve tek yıllık olmasıyla da ayrılmaktadır. *C. oligocephala* subsp. *oligocephala* ve *C. oligocephala* subsp. *pallescens* monofiletik bir grup olarak özellikle 2. ve 3. ağaç topolojilerine ayrılmıştır. Bu durum kalıcı roset yapraklara sahip olmamaları, kapitulalarının geniş ve saman renginde olması, parçalı yapraklı ve belirgin tepe dikenleri ile morfolojik olarak ta desteklenir. *Carlina* sp. (BY16509) olarak tanımlanan *Carlina* türü her üç ağaç topolojisinde de diğer taksonlardan tamamen ayrı düşmüştür. Ama *C. oligocephala* subsp. *pallescens*, *C. corymbosa*, *C. greaca* ve *C. involucrata* subsp. *libanotica* türlerine daha yakın durarak monofiletik grup içinde değerlendirilebilir. Çok yıllık, tabanda genelde dallanmış, dış fillarilerin içtekileri geçmesi ve örümcek ağsı tüylenmenin belirgin olmasına rağmen ovat-oblong yapraklarıyla diğer yakın türlerden belirgin olarak ayrılmıştır. Bu durum morfolojik olarakta desteklenmektedir (Şekil 3.31, Şekil 3.32, Şekil 3.33).

Şekil 3.34’de verilen heuristik search yapılarak belirlenen strict consensus ağacı bütün dalları karşılaştırarak en fazla oluşan dalların bir araya getirildiği olabilecek en güvenilir ağaç topolojisini vermiştir. Bu ağaç incelendiğinde; dış grup olarak belirlenen türler *Carlina* taksonlarından ayrı düşmüştür. *C. intermedia*, *C. biebersteinii* ve *C. vulgaris* türleri beraber monofiletik grup oluşturmuşlardır. Yukarıda verildiği gibi morfolojik verilerle de bu durum desteklenmiştir. *C. oligocephala* subsp. *oligocephala* türü bu üç türle monofiletik bir grup oluştururken içteki fillarilerin renginin saman rengi olması ve yaprakların lineer-lanseolat olması örümcek ağı tüy durumuyla da morfolojik olarak ta benzerlik göstermektedir. *C. lanata* beklenildiği gibi *Carlina* türlerinden ayrı düşmüştür. Tek pembe fillari durumuyla morfolojik olarak ayrılan bir tür olarak moleküler analizlerde de ayrılmıştır. *C. oligocephala* subsp. *pallescens*, *C. graeca*, *C. corymbosa* *C. involucrata* subsp. *libanotica* taksonları ve *Carlina* sp. (BY16509) örneği tek bir kökten dallanarak politomi oluşturmuştur. Bu durum yapılan analizlerde ortak bir dal yoğunluğuna ulaşamamasından olabilir (Şekil 3.34).

Bootstrap analizinde %89 ile *C. biebersteinii* ve *C. vulgaris* türleri %100 gibi tam bir değerle de bu iki türden çok iyi bir güvenilirlikle ayrılmıştır. *C. intermedia*’daki bu ayrım morfolojik olarak dış fillarilerin içtekilerden kısa ve yaprak boyutlarının iki türden farklı olmasıyla desteklenebilir. *C. oligocephala* subsp. *oligocephala* %59 ile desteklenmiştir. *C. oligocephala* subsp. *pallescens*, *C. graeca*, *C. corymbosa* *C. involucrata* subsp. *libanotica* ve *Carlina* sp. (BY16509) türleri %55 ile zayıf desteklenerek yine politomi göstermektedir. *C. oligocephala* türleri %81 ile kuvvetli desteklenerek ayrılmıştır. Dış grup olarak belirlenen *Carthamus* türleri %100 tam desteklenerek, bu türler %86 ile yine kuvvetli desteklenerek *Cardopatum corymbosum* ile *Atractylis cancellata*’dan ayrılmıştır. %72 ile *Carlina* taksonları dış gruplardan iyi derecede desteklenerek ayrılmıştır (Şekil 3.35, Şekil 4.2).

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 3.36’da, NJ Analizi sonucu oluşan filogenetik ağaç Şekil 3.37’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 ITS Verilerine Dayalı Branch-and-Bound 1 numaralı Ağaç Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş Ağaç Topolojisi

Filogenetik ağaçtaki uzun olan dallar günümüze en yakın olan atayı göstermektedir, kısa olan dallar ise en eski (ilkel) atayı göstermektedir. Şekil 3.36'daki UPGMA analizinde 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 ölçülmesi gereğini ortaya çıkarmıştır ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Şekil 3.37'de ise NJ analizi sonucunda oluşan filogenetik ağaçtaki dal uzunluklarının birbirinden farklı olduğu gözlemlenmektedir. Filogramdaki bu dal uzunluklarının farklı olması türlerin hangisinin daha önce veya sonra evrimleştiğini gösterir.

4.1.3 *trnL-F* Sonuçlarına Dayalı Yapılan Filogenetik Analiz

PAUP analizi için MP kriterlerinden "Kes-Bağla (Branch-and-Bound)" algoritması kullanılarak yapılan analizde 425 tane en iyi parsimoni ağacından yararlanılmıştır. Bunlardan 16 tanesi en güvenilir ağaç topolojisine sahip ağaçtır ve bu ağaçlardan en güvenilir tek bir ağaç oluşmuştur (Şekil 3.38).

trnL-F için yapılan Parsimoni analizinde toplam 534 kriter kullanılmıştır. Şekil 3.38'deki ağaç topolojisine bakıldığında *C. corymbosa*, *C. vulgaris* ve *Carlina* sp. (BY16509) türleri monofiletik bir grup oluşturmuştur. Bu türler saman rengi fillarilere ovat ya da ovat-lanseolat yapraklı olmaları ve seyrek tüylü olmalarıyla da morfolojik olarak desteklenmektedir. Diğer *Carlina* türleri ise dış gruplar ile monofiletik bir grup oluşturmaktadır. Sadece *Carthamus dentatus* bütün türlerden ayrı düşmüştür. Diğer dış grup türü olan *Carthamus lanatus*'dan pembe kapitulumlu olmasıyla morfolojik olarak da ayrılarak ağaç topolojisini desteklemektedir. (Şekil 3.38)

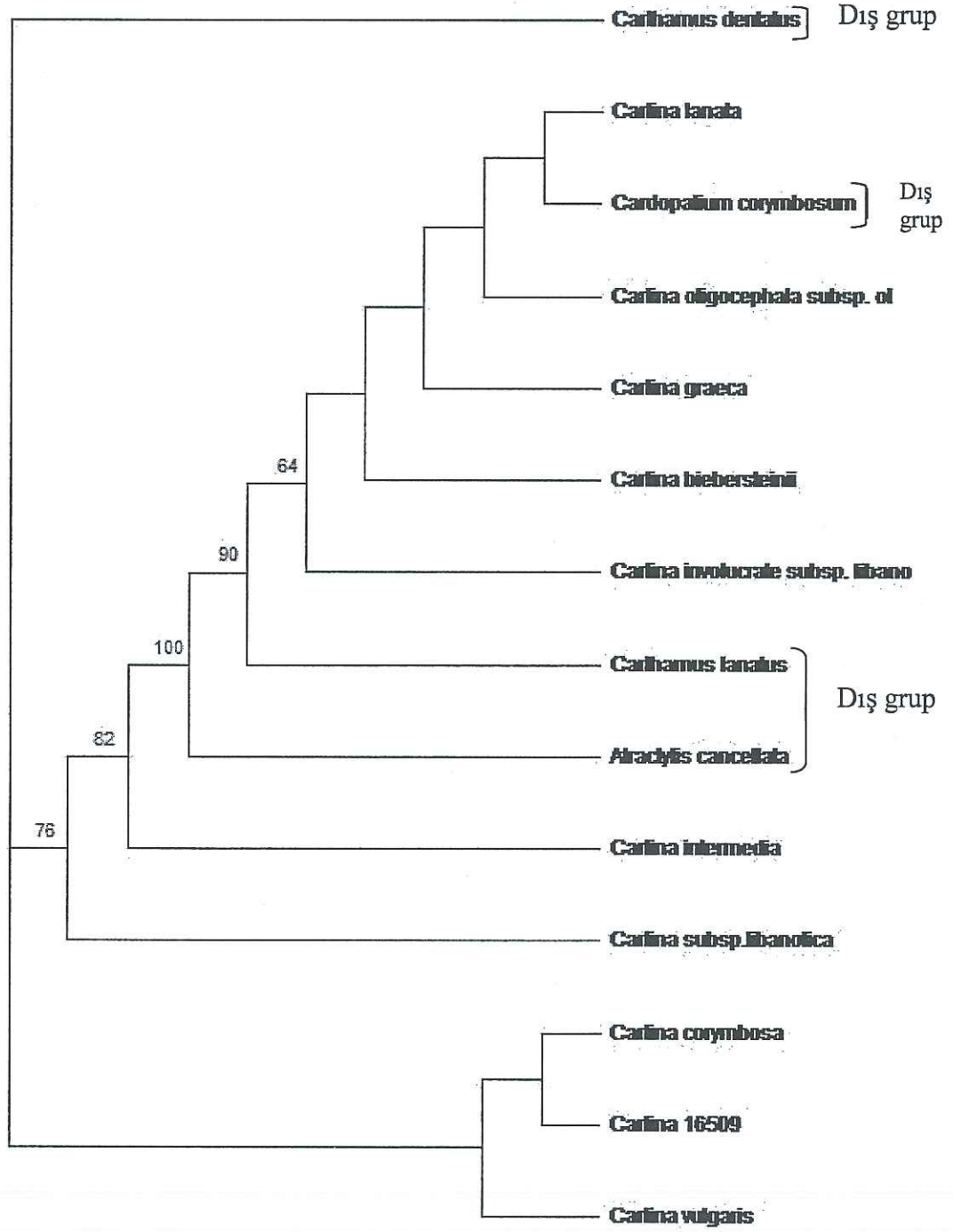
Şekil 3.39'de verilen heuristik search yapılarak belirlenen strict consensus ağacı bütün dalları karşılaştırarak en fazla oluşan dalların bir araya getirildiği olabilecek en güvenilir ağaç topolojisini vermektedir. Bu ağaç incelendiğinde; *C. corymbosa*, *Carlina* sp. (BY16509), *C. vulgaris*, *Carthamus dentatus*, *C. subsp. libanotica* gerekli sıklıkta aynı dalı vermediğinde ayrılamamış ve politomi

oluşturmuştur. Yine aynı şekilde *C. involucrata* subsp. *libanotica*, *C. biebersteinii*, *C. graeca* gerekli sıklıkta aynı dalı vermediğinde ayrılamamış ve politomi oluşturmuştur. *C.lanata Cardopatum corymbosum* ile *C. oligocephala* subsp. *oligocephala* monofiletik grup oluşturmuşlardır. *C.lanata* ile *Cardopatum corymbosum*'un pembe-mor yakın kapitulum rengine sahip olmaları morfolojik olarak ta bu dalı desteklemektedir.

Bootstrap analizinde %64 ile *C.lanata*, *C. involucrata* subsp. *libanotica*, *C. biebersteinii*, *C. graeca*, *C. oligocephala* subsp. *oligocephala*, *Cardopatum corymbosum*; *C. corymbosa*, *Carlina* sp. (BY 16509), *C. vulgaris*, *Carthamus dentatus* politomi göstermektedirler. Dolayısıyla zayıf desteklenmesi beklenmiştir. Bu grupla *Carthamus lanatus* %90 desteklenerek ayrılır, *Atractylis cancellata* ise bu grubun hepsinden %100 tam desteklenerek ayrılmıştır (Şekil 3.40, Şekil 4.3).

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 3.41'de, NJ Analizi sonucu oluşan filogenetik ağaç Şekil 3.42'de gösterilmiştir.

Filogenetik ağaçtaki uzun olan dallar günümüze en yakın olan atayı göstermektedir, kısa olan dallar ise en eski(ilkel) atayı göstermektedir. Şekil 3.41'deki UPGMA analizinde 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 ölçülmesi gereğini ortaya çıkarmıştır ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Şekil 3.42'de ise NJ analizi sonucunda oluşan filogenetik ağaçtaki dal uzunluklarının birbirinden farklı olduğu gözlemlenmektedir. Filogramdaki bu dal uzunluklarının farklı olması türlerin hangisinin daha önce veya sonra evrimleştiğini gösterir.



Şekil 4.3 *trnL-F* Verilerine Dayalı Branch-and-Bound 1 numaralı Ağaç Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş Ağaç Topolojisi

4.2 Birleştirilmiş Veri Setleri

4.2.1 ITS ve *trnL-F* Sonuçlarına Dayalı Yapılan Filogenetik Analiz

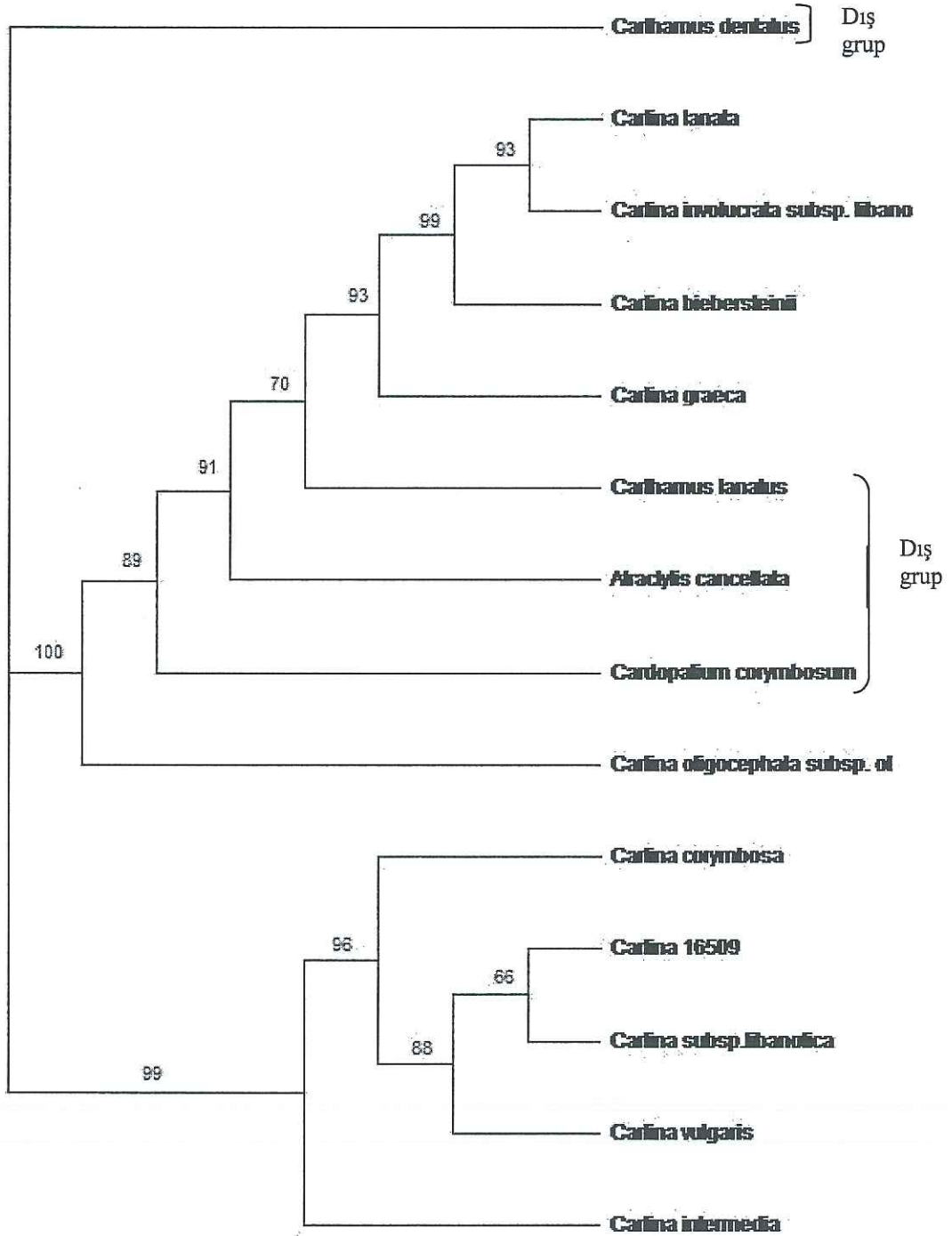
PAUP analizi için MP kriterlerinden “Kes-Bağla (Branch-and-Bound)” algoritması kullanılarak yapılan birleştirilmiş analizde 952 tane en iyi parsimoni ağacından yararlanılmıştır. Bunlardan 1 tanesi en güvenilir ağaç topolojisini vermiştir ve bu tartışılmıştır (Şekil 3.43).

ITS ve *trnL-F* için yapılan birleştirilmiş Parsimoni analizinde toplam 1337 kriter kullanılmıştır. Şekil 3.43 ve Şekil 3.44’de verilen heuristik search yapılarak belirlenen strict consensus ağacı incelendiğinde aynı ağaç topolojisiyle karşılaşılmıştır. Bu iki ağaç Bootstrap analizi ile beraber tartışıldığında dalların güvenilir ayrımı daha iyi yorumlanabilir. *C. lanata*, *C. involucrata* subsp. *libanotica*, *C. biebersteinii*, *C. greaca*, *Carthamus lanatus*, *Atractylis cancellata*, *Cardopatum corymbosum*, *C. oligocephala* subsp. *oligocephala* türleri diğer *Carlina* türlerinden %100 tam destekle ayrılarak monofiletik bir grup oluşturmuştur. Yine bu türler Bootstrap ağacında %70-99 arasında değişen çok iyi desteklenen dallar oluşturmuştur. Özellikle dış grup olarak belirlenen türler olan *Atractylis cancellata*, *Cardopatum corymbosum*, *Carthamus dentatus* ve *Carthamus lanatus* ağaçta iyi desteklenerek ayrılmıştır (Şekil 3.45).

C. corymbosa, *Carlina* sp. (BY 16509), *C.* subsp. *libanotica*, *C. vulgaris*, *C. intermedia* türleride %99 gibi yüksek bir güvenilirlikle diğer türlerden ayrılmıştır. Kendi aralarında monofiletik bir grup oluşturan bu türlerin kendi aralarında yine %66-96 arasında değişen bir iyi bir güvenilirlikle dal oluşturdıkları görülmektedir (Şekil 3.62). Bu türler morfolojik olarak da saman rengi fillarilere sahip olmaları, gövde yapraklarının ovat-lanseolat ya da lineer-lanseolat beyaz örümcek ağsı tüylü olmaları, kapitula büyüklüklerinin yakın olması dallanma göstermelerini desteklemektedir (Şekil 3.45, Şekil 4.4).

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 3.46'da, NJ Analizi sonucu oluşan filogenetik ağaç Şekil 3.47'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4 ITS ve *trnL-F* Verilerine Dayalı Branch-and-Bound 1 numaralı Ağaç Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş Ağaç Topolojisi

Filogenetik ağaçtaki uzun olan dallar günümüze en yakın olan atayı göstermektedir, kısa olan dallar ise en eski(ilkel) atayı göstermektedir. Şekil 3.46'daki UPGMA analizinde dal uzunlukları eşit olarak hesaplanmaktadır. Neighbour Joining (Komşu Katılım) metoduyla mesafelerin ölçülmesi ile Şekil 3.47'de filogenetik ağaçtaki dal uzunluklarının birbirinden farklı olduğu gözlemlenmektedir. Filogramdaki bu dal uzunluklarının farklı olması türlerin hangisinin daha önce veya sonra evrimleştiğini gösterir.

4.2.2 Morfoloji ve ITS Sonuçlarına Dayalı Yapılan Filogenetik Analiz

PAUP analizi için MP kriterlerinden "Kes-Bağla (Branch-and-Bound)" algoritması kullanılarak yapılan birleştirilmiş analizde 568 tane en iyi parsimoni ağacından yararlanılmıştır. Bunlardan 2 tanesi en güvenilir ağaç topolojisini vermiştir ve bu ağaçlar tartışılmıştır (Şekil 3.48, Şekil 3.49).

Morfoloji ve ITS için yapılan birleştirilmiş Parsimoni analizinde toplam 831 kriter kullanılmıştır. Şekil 3.48 ve Şekil 3.49'daki ağaç topolojilerine bakıldığında dış grup olarak seçilen *Cardopatum corymbosum*, *Carthamus lanatus*, *Carthamus dentatus* ve *Atractylis cancellata* türleri *Carlina* taksonlarından beklendiği gibi ayrı düşmüştür. *Carthamus* türleri kardeş grup olarak *Cardopatum corymbosum* ile monofiletik grup oluşturacak şekilde ağaç topolojilerinde yer almıştır. Her iki ağaçta da *C. vulgaris*, *C. biebersteinii* ve *C. intermedia* ağaç topolojisinde de monofiletik bir grup oluşturmuşlardır. Bu türlerin iki yıllık, saman rengi fillarilere sahip olmaları, gövde yapraklarının ovat-lanseolat dereceli veya ani kısalması ile beyaz örümcek ağsı tüylenmenin ortak olarak gözlenmesiyle ağaç topolojisindeki ayırım morfolojik olarakta desteklenmektedir. Ayrı PAUP analizlerinde de bu türler için aynı sonuçlara ulaşılmıştır. *C. lanata* iki ağaçta *C. vulgaris*, *C. biebersteinii*, *C. intermedia* ve *C. oligocephala* subsp. *oligocephala* ile monofiletik grup oluşturmuştur. Bu tür diğer türlerden morfolojik olarak tek pembe kapitulu ve tek yıllık olmasıyla da ayrılmaktadır. *C. involucrata*'nın farklı lokalitelerden toplanan türleri beklendiği gibi kardeş grup olarak bir araya düşmüştür. *Carlina* sp. (BY16509) türü diğer *Carlina*'lardan ayrılmış ve *C. involucrata* türü ile monofiletik grup oluşturmuştur. Kapıtula renginin saman rengi ve yakın büyüklükte olması, dış

fillarilerin içtekileri geçmesi ve örümcek ağsı tüylenmenin belirgin olmasına rağmen ovat-oblong yapraklarıyla diğer yakın türlerden belirgin olarak ayrılır. Bu özellikler *C. oligocephala* subsp. *pallescens*, *C. corymbosa*, *C. graeca* türlerinin hem kendi aralarında monofiletik grup olmasını hem de *C. involucrata* ve *Carlina* sp. (BY16509) türleri ile olan monofiletikliği desteklemektedir (Şekil 3.48, Şekil 3.49) .

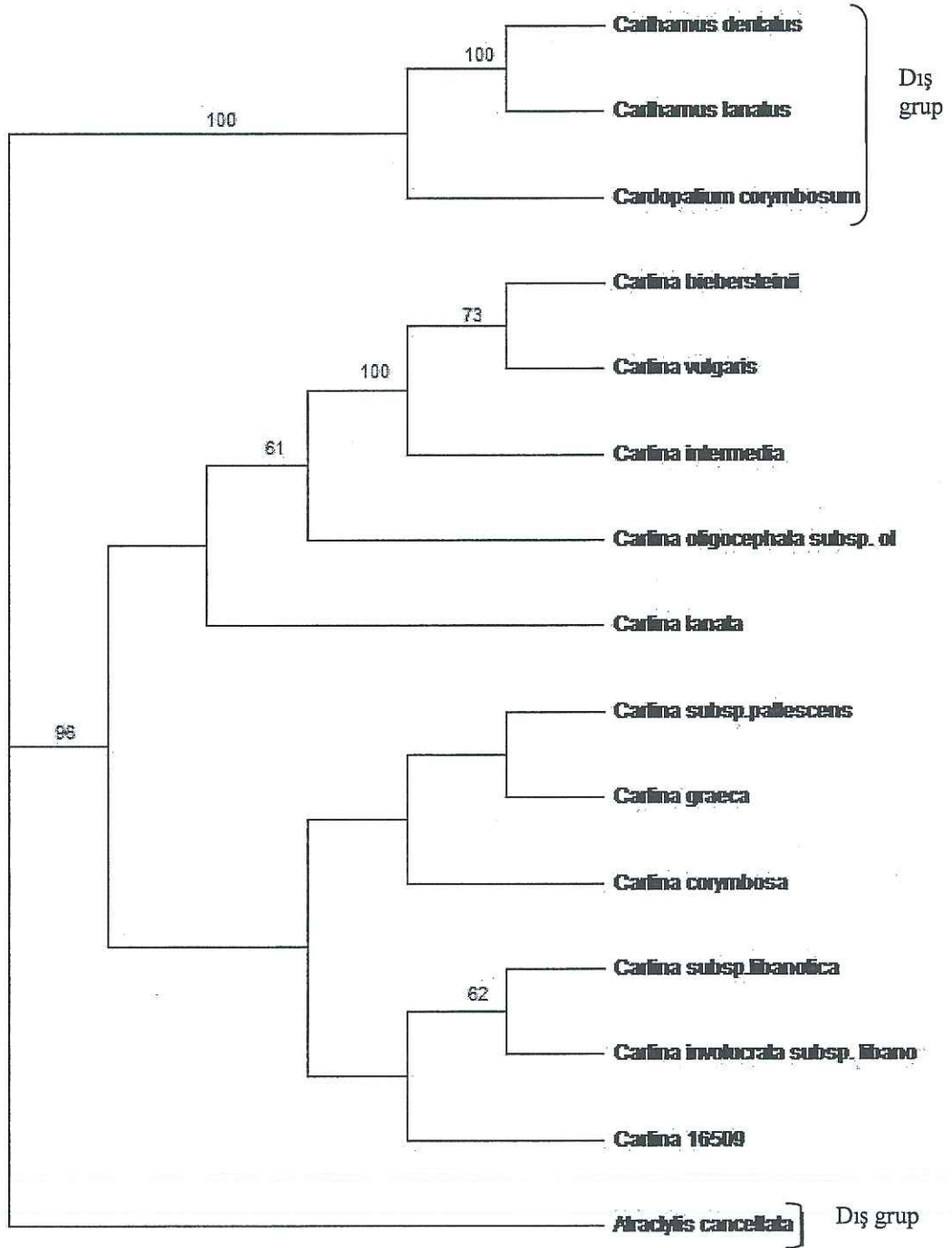
Şekil 3.50’de verilen heuristik search yapılarak belirlenen strict consensus ağacı incelendiğinde; ilk göze çarpan durum *C. oligocephala* subsp. *pallescens*, *C. graeca* ve *C. corymbosa*’nın politomi göstermesidir. Bu durum Bootstrap analizi ile de desteklenmiştir. *C. intermedia*, *C. biebersteinii* ve *C. vulgaris* türleri beraber monofiletik grup oluşturmuşlar ve Bootstrap analizinde bu monofiletiklik %100 desteklenmiştir. *C. involucrata* türleri *Carlina* sp. (BY16509) ile monofiletik grup oluşturmuş ve bu durum Bootstrap analizinde *C. involucrata* türlerinde %62 olarak orta derecede desteklenirken *Carlina* sp. (BY16509) ile olan durum %96’lık çok kuvvetli bir oranda desteklenmiştir (Şekil 3.51, Şekil 4.5) .

Dış grup olarak belirlenen türler *Carlina* taksonlarından ayrı düşmüştür. *Carthamus lanatus*, *Carthamus dentatus*, *Cardopatum corymbosum* ve *Atractylis cancellata* %100 desteklenerek *Carlina* türlerinden beklendiği gibi ayrılmıştır (Şekil 3.48, Şekil 3.49, Şekil 3.51).

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 3.52’de, NJ Analizi sonucu oluşan filogenetik ağaç Şekil 3.53’de gösterilmiştir.

Filogenetik ağaçtaki uzun olan dallar günümüze en yakın olan atayı göstermektedir, kısa olan dallar ise en eski (ilkel) atayı göstermektedir. Şekil 3.52’deki UPGMA analizinde dal uzunlukları eşit olarak hesaplanmaktadır. Neighbour Joining (Komşu Katılım) metoduyla mesafelerin ölçülmesi ile Şekil 3.53’de filogenetik ağaçtaki dal uzunluklarının birbirinden farklı olduğu

gözlemlenmektedir. Filogramdaki bu dal uzunluklarının farklı olması türlerin hangisinin daha önce veya sonra evrimleştiğini gösterir.



Şekil 4.5 Morfoloji ve ITS Verilerine Dayalı Branch-and-Bound 1 numaralı Ağaç Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş Ağaç Topolojisi

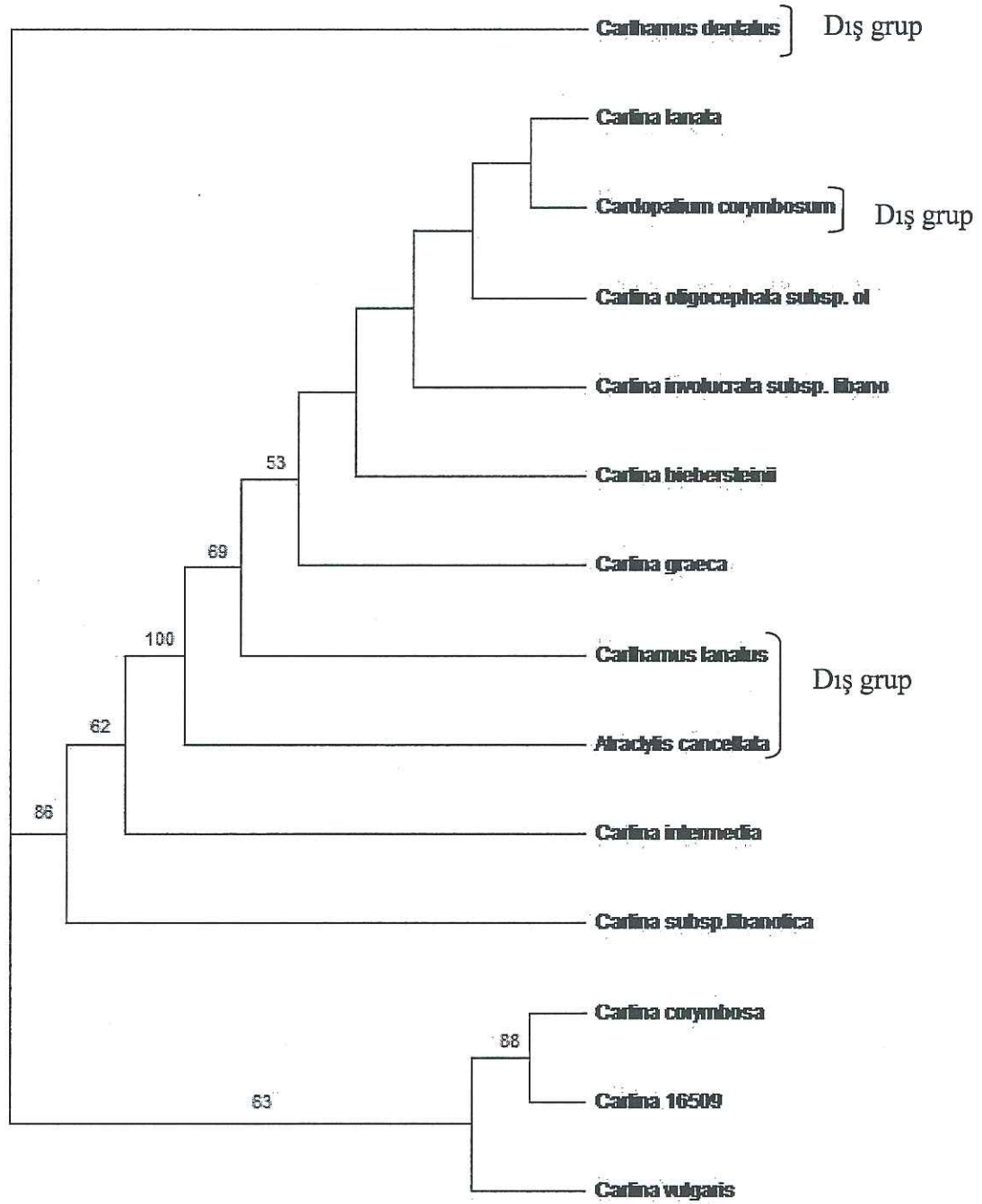
4.2.3 Morfoloji ve *trnL-F* Sonuçlarına Dayalı Yapılan Filogenetik Analiz

PAUP analizi için MP kriterlerinden “Kes-Bağla (Branch-and-Bound)” algoritması kullanılarak yapılan birleştirilmiş analizde 547 tane en iyi parsimoni ağacından yararlanılmıştır. Bunlardan 1 tanesi en güvenilir ağaç topolojisini vermiştir ve bu ağaç tartışılmıştır (Şekil 3.54).

Morfoloji ve *trnL-F* için yapılan birleştirilmiş Parsimoni analizinde toplam 562 kriter kullanılmıştır. Şekil 3.54’deki analiz ile Şekil 3.55’deki heuristik search yapılarak belirlenen strict consensus ağacı incelendiğinde; *C. corymbosa* ve *Carlina* sp. (BY16509) türleri ile *C. vulgaris* monofiletiktir. Bu durum üç türün de ovat-lanseolat yapraklı, saman rengi fillarilere sahip, benzer tüylenmenin olmasıyla morfolojik olarak ta desteklenir. *Carthamus dentatus* türü Şekil 3.54 ve Şekil 3.55’de aynı şekilde dış grup olması nedeniyle beklendiği gibi bütün *Carlina* türlerinden ayrı düşmüştür. Diğer bütün türler kendi aralarında monofiletik grup oluşturmuşlardır.

C. lanata, *C. involucrata* subsp. *libanotica*, *C. biebersteinii*, *C. greaca*, *C. oligocephala* subsp. *oligocephala* ile *Cardopatum corymbosum* Bootstrap analizinde politomi göstermiştir. Bu dalların zayıf olarak desteklendiği %53’lük orandan da belli olmaktadır (Şekil 3.56). Politomi oluşturan bu türler %100 tam destekle *Atractylis cancellata*’dan ayrılır. *C. corymbosa* ve *Carlina* sp. (BY 16509) türleri %88 gibi yüksek bir destekle monofiletik grup oluştururlar. Bu durum çokyıllık bitki olmaları, yapraklarının ovat ya da ovat-lanseolat olması ve tepe dikenlerinin yakın uzunlukta olmalarıyla da morfolojik olarak desteklenir. Ayrıca bu iki tür *C. vulgaris* türü ile %63 desteklenerek monofiletik bir grup oluşturmuştur (Şekil 3.56, Şekil 4.6).

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 3.57’de, NJ Analizi sonucu oluşan filogenetik ağaç Şekil 3.58’de gösterilmiştir.



Şekil 4.6 Morfoloji ve *trnL-F* Verilerine Dayalı Branch-and-Bound 1 numaralı Ağaç Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş Ağaç Topolojisi

Filogenetik ağaçtaki uzun olan dallar günümüze en yakın olan atayı göstermektedir, kısa olan dallar ise en eski (ilkel) atayı göstermektedir. Şekil 3.58'deki UPGMA analizinde dal uzunlukları eşit olarak hesaplanmaktadır.

Neighbour Joining (Komşu Katılım) metoduyla mesafelerin ölçülmesi ile Şekil 3.59'da filogenetik ağaçtaki dal uzunluklarının birbirinden farklı olduğu gözlemlenmektedir. Filogramdaki bu dal uzunluklarının farklı olması türlerin hangisinin daha önce veya sonra evrimleştiğini gösterir.

4.2.4 Morfoloji, ITS ve *trnL-F* Sonuçlarına Dayalı Yapılan Filogenetik Analiz

PAUP analizi için MP kriterlerinden “Kes-Bağla (Branch-and-Bound)” algoritması kullanılarak yapılan birleştirilmiş analizde 1070 tane en iyi parsimoni ağacından yararlanılmıştır. Bunlardan 1 tanesi en güvenilir ağaç topolojisini vermiştir ve bu ağaç tartışılmıştır (Şekil 3.59).

Morfoloji, ITS ve *trnL-F* ile yapılan birleştirilmiş Parsimoni analizinde toplam 1356 kriter kullanılmıştır. Şekil 3.59 ve Şekil 3.60'daki heuristik search yapılarak belirlenen strict consensus ağacı incelendiğinde; *C. vulgaris*, *C. intermedia* ve monofiletik bir grup oluşturmuşlardır. Saman rengi fillarilere sahip olmaları, lanseolat yapraklı, kuvvetli dikenli olmaları ve *C. oligocephala* subsp. *oligocephala*'nın dış fillarilerinin içtekileri geçmesiyle diğer iki türle olan morfolojik ayrımı ve kardeş grup olması desteklenmiştir. Bootstrap analizinde *C. vulgaris*, *C. intermedia* %100 tam, *C. oligocephala* subsp. *oligocephala* ile olan monofiletiklikte %90 kuvvetli desteklenerek dalın güvenilirliği açıklanabilir.

Ağaç topolojilerine bakıldığında dış grup olarak seçilen *Cardopatium corymbosum*, *Carthamus lanatus*, *Carthamus dentatus* ve *Atractylis cancellata* türleri *Carlina* taksonlarından beklendiği gibi ayrı düşmüştür. *Carthamus* türleri kardeş grup olarak Bootstrap analizinde %100, *Cardopatium corymbosum* ile monofiletik grup oluşturması da %100 tam desteklenerek ağaç topolojilerinde yer almıştır (Şekil 3.59, Şekil 3.60, Şekil 3.61, Şekil 4.7).

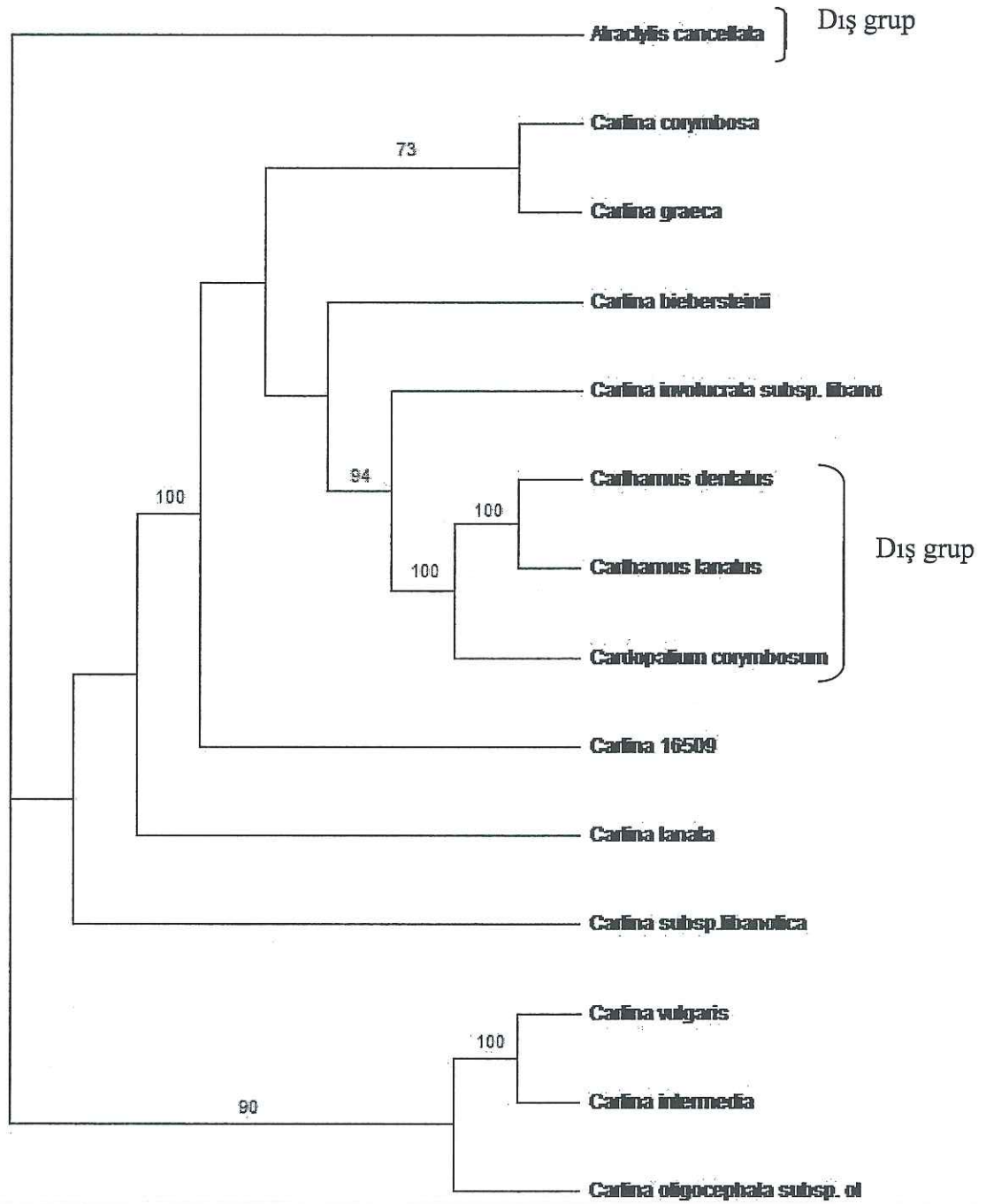
C. corymbosa ve *C. greaca* türleri Şekil 3.59 ve Şekil 3.60'daki ağaç topolojilerinde kardeş grup oluşturmuştur. Bu durum Bootstrap analizinde %73 ile orta derecede desteklenir (Şekil 3.61). Aynı şekilde bu monofiletiklik yaprakların

pinnatifit olması, kapitula renginin ve genişliğinin yakın olması, dış fillarilerin tabanda kalın olması ile de desteklenir. *C. biebersteinii* ve *Carlina* sp. (BY16509) türleri ise *C. corymbosa* ve *C. greaca* türleri ile politomi oluşturarak Şekil 3.61'de Bootstrap analizinde %52 zayıf ayırım ile desteklenmiştir.

Ayrı analizlerde *C. lanata*, *C. subsp. libanotica* ve *Atractylis cancellata* politomi göstererek çözümlenememiştir (Şekil 3.59). Yine *C. corymbosa*, *C. greaca*, *C. biebersteinii* ve *Carlina* sp. (BY16509) türleri ile *C. involucrata* subsp. *libanotica* %100 tam desteklenerek ayrılmıştır. Yaprakların pinnatisekt olması ve kapitula büyüklüğü ile fillarilerin geniş topuz tabanlı olması ile morfolojik olarak da bu durum desteklenmiştir.

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 3.62'de, NJ Analizi sonucu oluşan filogenetik ağaç Şekil 3.63'de gösterilmiştir.

Filogenetik ağaçtaki uzun olan dallar günümüze en yakın olan atayı göstermektedir, kısa olan dallar ise en eski (ilkel) atayı göstermektedir. Şekil 3.62'deki UPGMA analizinde dal uzunlukları eşit olarak hesaplanmaktadır. Neighbour Joining (Komşu Katılım) metoduyla mesafelerin ölçülmesi ile Şekil 3.63'de filogenetik ağaçtaki dal uzunluklarının birbirinden farklı olduğu gözlemlenmektedir. Filogramdaki bu dal uzunluklarının farklı olması türlerin hangisinin daha önce veya sonra evrimleştiğini gösterir.



Şekil 4.7 Morfoloji, ITS ve *trnL-F* Branch-and-Bound 1 numaralı Ağaç Üzerine Bootstrap Değerleri İşlenmiş Ağaç Topolojisi

Bu çalışmaya konu olan *Carlina* cinsi *Asteraceae* familyasının problemleri bir cinsidir. Çalışma Türkiye’de yayılış gösteren *Carlina* türleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *C. traganthifolia* türü sadece adalarda tanımlanan bir tür olduğundan çalışmaya dahil edilememiştir. Cinsin Türkiye’deki doğal yayılış alanlarına bakıldığında bütün bölgelere yayılmış olduğu görülmektedir. Gezilen herbaryumlarda gözlemlenen örneklerin lokaliteleri Flora of Turkey’de verilen lokalitelere ilave edilerek cinsin günümüzdeki yayılış sınırları daha net belirlenmeye çalışılmıştır. En geniş yayılışa *C. oligocephala* subsp. *oligocephala* taksonunun sahip olduğu anlaşılmıştır.

Carlina türleri arasında öncelikle morfolojik incelemeler yapılmıştır. Türlerin teşhislerindeki eksik görülen tanımlamalar yapılmıştır. Cinsin kapitulom, yaprak özellikleri ve tüylenme durumları yeniden gözden geçirilmiştir. Tüpsü çiçek ve aken özellikleri ilave edilmiştir. En fazla *C. corymbosa*, *C. graeca* ile *C. vulgaris*, *C. biebersteinii* türleri arasında güçlükler yaşandığı gözlenmiştir. Düzgün örneklemenin yapılmaması bunun en önemli nedenidir. Örneğin rozet ve gövde yapraklarındaki özellikler bu türlerin ayırımında önemli karakterlerdir. Bunların eksikliği türlerin ayırımında sorun yaratmaktadır.

Morfolojik verileri desteklemek amacıyla ITS ve trnL-F primerleri ile moleküler analizler yapılmıştır. ITS ve trnL-F ile yapılan moleküler analizler morfolojik veri setleri ile beraber yorumlanarak oluşturulan birleştirilmiş ağaç topolojisinde beklenen sonuçlara ulaşılmıştır.

Dış grup olarak belirlenen *Atractylis cancellata*, *Carthamus dentatus*, *Carthamus lanatus* ve *Cardopatum corymbosum* türleri beklendiği gibi *Carlina* türlerinden güçlü desteklenerek ayrılmıştır (Şekil 4.7).

C. lanata Türkiye Florası’nda tek bir yıllık, pembe çiçekli tür olarak morfolojik ve moleküler verilerle de desteklenerek diğer *Carlina* türlerinden ayrılmıştır.

Yine yapılan morfolojik gözlemler ve moleküler analizlerle de farklılığı desteklenen *Carlina* sp. (BY16509) olarak tanımlanan Kırklareli'den toplanan örnek birleştirilmiş ağaç topolojisinde %100 kuvvetli desteklenerek değer *Carlina* türlerinden ayrılmıştır (Şekil 4.7).

Morfolojik gözlemlerde özellikle kapitulum büyüklüğü, yaprak özellikleri ile belirgin olarak ayrılarak grup oluşturan türler birleştirilmiş ağaç topolojisinde de beklendiği gibi ayrılmıştır (Şekil 4.7).

C. vulgaris, *C. intermedia* ve *C. biebersteinii* beraberce gözlemlendiğinde; rozet yaprakları en kısa, gövde yaprakları geniş olan türün *C. vulgaris* olduğu görülür. *C. intermedia* bu türler arasında en küçük kapitulumuna sahip türdür. *C. biebersteinii* ise lineer-lanseolat yapraklara sahip olmasıyla bu türlerden daha farklı bir özelliğe sahiptir. Yakın benzerliklerin olmasında yayılış alanlarının yer yer çakışmasının da etkisi olabilir.

C. corymbosa ve *C. graeca*'nın morfolojik özelliklerine ilk bakıldığında birbirine çok benzediği görülür. Bu iki tür *C. corymbosa*'nın gövde yapraklarının az bölünmüş, tepe dikeninin belirgin ve daha kısa olmasıyla birbirinden ayrılabilir. Ayrıca *C. graeca*'nın gövde yapraklarının lineer-lanseolat olmasında ayrımı kolaylaştırır. Bu yakın benzerlik moleküler analizlerle de desteklenmiş (Şekil 4.7).

C. involucrata subsp. *libanotica* türü *C. corymbosa* ve *C. graeca*'ya yakın morfolojik özellikler göstermektedir. Kapitulumun büyüklüğü ve daha belirgin sert dikenlere sahip olması ile ayrılır. Bu ayırım moleküler veriler ile desteklenerek türlerin monofiletik ilişkisini desteklemiştir (Şekil 4.7).

C. involucrata subsp. *libanotica* Flora of Turkey'de C6 Adana'da tek lokalitede tanımlanmıştır. Gezilen herbaryumlardaki lokalitelerde ilave edildiğinde C3, C4 ve C6 da doğal yayılış gösterdiği görülmüştür. Yapılan çalışmaya C3 Antalya'dan toplanan örnek de ilave edilmiştir. Birleştirilmiş ağaç topolojisinde; bu örnek, Adana örneği ile uzak düşüyor gözüküyorsa da ağacın bütününe bakıldığında *Carlina*'nın yakın türleri ile monofiletik bir grup oluşturmuştur. Şekil 3.47'ye

bakıldığında örneklere ait sonuçların monofiletik grup oluşturduğu yine desteklenmektedir. Bu farklılığın lokalitelerin genişlemesi ile farklı ortamlara uyum sonucu oluşabilecek varyasyonlar sonucu olabileceği fikrini güçlendirmiştir.

Bu çalışmanın amacı, moleküler teknikler kullanılarak sistematik açıdan problemlili bir cins olan *Carlina*'nın diğer yakın gruplarla ve kendi içindeki taksonlarının filogenetik ilişkilerini araştırmaktır. Bulunan sonuçlarla; **Carlininae** alt tribusunun morfolojisini değerlendirmek, alt tribus içindeki geleneksel sınıflandırma ile moleküler filogeniyi karşılaştırmak, alt tribus taksonları arasındaki sınırları belirlemek ve varsa çelişkileri analiz etmek; dış grup olarak seçilen *Cardopatum*, *Atractylis* ve *Carthamus* cinslerinin **Cardueae** tribusundaki durumunu değerlendirmektir. Çünkü yapılan son sistematik çalışmalarda **Cardueae** tribusu içinde yer alan *Carlina* ve *Atractylis* **Carlininae** alt tribusuna yerleştirilmiştir [17-22]. Yine **Cardueae** tribusu içinde yer alan *Cardopatum* cinsinde **Carlininae** subtribusunda yer almıştır [17]. Bu taksonlar Türkiye Florası'nda **Cardueae** tribusunda yer alan cinslerdir. Bizim çalışmamız bu son düzenlemeleri desteklemekte olup, *Carlina* ile *Atractylis*'in çok yakın cinsler olduğunu göstermektedir (Şekil 4.7). *Atractylis*; *Carlina* türleri içinde *C. vulgaris*, *C. intermedia* ve *C. oligocephala* türlerine daha yakın bir cins olarak görülmektedir. *Cardopatum* cinsi yine diğer çalışmaları destekleyecek şekilde *Carlina* türlerine yakın olarak dış grup olarak kuvvetli desteklenerek ayrılmıştır. Yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçların karşılaştırılması ile cinslerin Türkiye Florası'ndaki yeri, yayılış alanları ve statülerinin netleştirilmesine katkıda bulunacaktır.

EKLER

ITS DNA Dizileri

>Carlina corymbosa

TGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCTGAAGCCTGCAAAGCAGAACGACCCGCGAACGCGTA
AAACACAACCGTCGGCGTGCGCCGTGGCCTCCCCCGGGGGTCCCGGGCGTTCCGTCG
TCACGTAAACAAACCCCGGCACAACACGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGCG
CGTCCCGTGTGCGCCCGTTCGCGGAGCGCGCATGGGCCGTGGCCTCTCTAGAACCACAAA
CGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAAATGCGA
TACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCC
GAAGCCATCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTCCCGACC
ACGCCTCCCCACGGGGCGGAGTGACGTGCGGGGCGGAGACTGGCCTCCCGTGCCCATG
GCGCGGCTGGCCCAAACAGGAGTCCCCTTCGACGGACGCACGACTAGTGGTGGTTGTAA
CGGCCCTCGTATCGAGCCGTGCGTCTTGAGCCGCAAGGGAAGCGCTCGACAAAGACCCC
AACGCGTCGCCTCGCGACGACGCTTCGACCGCGACCCCGGTCAGGCGGACCCT

>Carlina graeca

GTTTCCGGTAGGTGAACCTGCGGAGGATCATTGTCTGAAGCCTGCAAAGCAGAACGACCC
GCGAACGCGTAAAACACAACCGTCGGCGTGCGCCGTGGCCTCCCCCGGGGGTCCCG
GGCGTTCCGTCACGTAAACAAACCCCGGCACAACACGTGCCAAGGAAAACAAAACCT
TAAGAAGGGCGCGTCCCGTGTGCGCCCGTTCGCGGAGCGCGCATGGGCCGTGGCCTCTCT
AGAACCACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTA
GCAAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGC
AAGTTGCGCCCGAAGCCATCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGT
CGTCCCGACCACGCCTCCCCACGGGGCGGAGTGACGTGCGGGGCGGAGACTGGCCTC
CCGTGCCCATGGCGCGGCTGGCCCAAACAGGAGTCCCCTTCGACGGACGCACGACTAGT
GGTGGTTGTAACGGCCCTCGTATCGAGCCGTGCGTCTTGAGCCGCAAGGGAAGCGCTCG
ACAAAGACCCCAACGCGTCGCCTCGCGACGACGCTTCGACCGCGACCCAGGTCAGGCG
GGGA

>Carlina oligocephala subsp. oligocephala

GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCTGAAGCCTGCAAAGCAGAACGACCCGCGAACGCG
TAAAACACAACCGTCGGCGTGCCTCGTGGCCTCCCCTCGGGGTGCCTCGGGCGTTCCGT
CGTCACGTAAACAAACCCCGGCACAACACGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGG
CGCGTCACGTGTGCGCCCGTTCGCGGAGCGCGCACGGGCGTGGCCTCTCTAGAACCACAA
ACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAAATGCG
ATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCC
CGAAGCCATCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTCCCGACC
ACGCCTCCCCACGGGGTGGAGTGCCGTGCGGGGCGGAGACTGGCCTCCCGTGCCCATG
GTGCGGCTGGCCCAAACAGGAGTCCCCTTCGACGGACGCACGACTAGTGGTGGTTGTAA
CGACCCCTCGTATCGAGCCGTGCGTCTTGAGCCGCAAGGGAAGCGCTCGGCAAAGACCCC
AACGCGTCGCCTCGCGACGACGCTTCGACCGCGACCCAGGTCAGGCGGGACCT

>Carlina oligocephala subsp. pallescens

TCCTTATCATTTTTGAGAAGGAGAAGTGGTTACAAGGTTCCCGTAGGTGAACCTGCGGAA
GGATCATTGTCTGAAGCCTGCAAAGCAGAACGACCCGCGAACGCGTAAAACACAACCGTC
GGCGTGCGCCCGTGGCCTCCCCCGGGGGTCCCGGGCGTTCCGTCGTACGTAAACAAA
CCCCGGCACAACACGTGCCAAGGAAAACAAAACCTAAGAAGGGCGCGTCCCGTGTGCGC
CCGTTGCGGAGCGCGCATGGGCCGTGGCCTCTCTAGAACCACAAACGACTCTCGGCAA
CGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAAATGCGATACTTGGTGTGAA
TTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCCGGC
CGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTCCCGACCACGCCTCCCCACG
GGGCGGAGTGACGTGCGGGGCGGAGACTGGCCTCCCGTGCCCATGGCGCGGCTGGCCCA

AACAGGAGTCCCTTCGACGGACGCACGACTAGTGGTGGTTGTAACGGCCCTCGTATCGA
GCCGTGCGTCTTGAGCCGCAAGGGAAGCGCTCGACAAAGACCCCAACGCGTCGCCTCGC
GACGACGCTTCGACCGCGACCCAGGTCAGGCGGGAACCTACCTGGCTGAGTTAAGCAT
ATCATAAAAGCGGAGGA

>Carlina involucrate subsp. libanotica

CCTAATTAACCTTTTGGGGAAGGACATTGTCGAACCCAGCACCCAGCAGAACGACCCGC
GAACACGTAATCAAAGCCGGGCGTCGGGAGGATCGGGCGTGAGCCCGGTGCCCGGAAA
GCCCCCCCCGTCGACGTGCGTCCGCAATGCCCGTGGAGAGGCCTCGAGGGTGTCTGTC
GTCACCTAAACAAACCCCGGCACCCCATGTGCCAAGGAAAACAAAACATAAGGAGGACG
CGTCCCGTGTGCCCCGTTGCGGAGGGCGCATGGGCCGTGGCCTCTCAAGAACCAAAA
ACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCG
ATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCC
CGAAGCCATCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCAGAC
CACGCCTCCCAACGGGGAGGAGTGCCGTGGGGGCGGAGAATGGTCTCCCGTGCCCTT
GGCGTGGTTGGCCTAAACAGGAGTCCCCTTCGACGGACGCACGACTAGTGGTGGTTGTG
ACGGCCTTCGTATCGAGTCGTGCGTCTTGAGCCGCAAGGGAAGCGCTACCAAAGACCC
CAACGTGTCGCCTCGCGACGATGCTTCGACCGCAACCCCCAGGGTCAGGCGGGACTACC
CGCTGAGTTTAAGCATATCA

>Carlina subsp. libanotica

AACATGGTTTTCGTAGGGGACCGGGGAAGGTCATTTTCGAAGCCTGCAAAGCAGAACGA
CCCGCGAACGCTTAAACACAACCGTCGGGCGTGCCCCGTGGCCTCCCCCGGGGGGG
TCCCGGGCGTTCCGCTCTCCCGGCAAACAAACCCCGGCCACCCCGGGCAGGGAAAAC
AAAAATTTAAAAAGGGGGCGTCCGGGGTCCCCTGGGGAAGGGGGTGGGCCCGGG
CCTTCTTAAACCCCAAGAATTCTGGGCAACGATATTTTGGGTTTAGGCTTCGTTGA
AAAAGGAACCAAATGGGGATACTGGTGGGAAATGCAAATCCCGTGAACCTCCGAGTT
TTTGAACCCAAGTTGCGCCGAAGCCATCCGCCGAGGGCCACGCCTGCCTGGGCGTCACG
CATCGCGTCGCTCCCCGACCCCCCTCCCCACGGGCGAAGTGACGTCGGGGGGGAAA
ACTGGCCTCCCGTGGCCATGGCGCGGCTTGCCCAAACAGGAGTCCCCCTCGACGGACGC
ACGACTAGTGGTGGTTGTTAACGGCCCTCGTTTTGAGCCGGTGCCTTTGAGCCGCAAGG
GAAGCGCTCGGAAAAGACCCCAACGCGTCGCCTCGCGACGACGTTTTGACCGCGACCCC
AGTCAGGCGGACACCCCGC

>Carlina lanata

GTAGGTGAACTGCGGAAGGATCATTGTCGAAGCCTGCAAAGCAGAACGACCCGTGAACG
CGTAAAACACAACAGTCGCTGTGCGCCCGCGCCTCCCCTCGGGGGGGTCTGTGGCGTCA
CGTCGGCGCGTAAACAAACCCCGGCACAACACCGTGCCAAGGAAAACGAAACTTAAGAA
GGGTGCGTCCCGTGTGCCCCGTTGCGGAGCGCGCACGGGTGCTGGCCTCTCTGGAACC
ACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAA
TGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTG
CGCCGAAGCCATCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTCCC
GACCACGCCTCCCCATGGGGTGGAGTGACGTCGGGGGCGGAGACTGGCTCCCGTGCC
CACAGCGCGGCTGGCCAAACAAGAGTCCCCTTCGACGGACGCACGACTAGTGGTGGTT
GTAAGGCCCTCGTATCGAGCCGTGCGTCTTGAGCCGCAAGGGAAGCTCTCGACAAAGA
CCCCAACGCGTCGCCTTGCATGACGCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAGGCGG

>Carlina vulgaris

GGTTTTCGGGTAGGTGTACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAGCCTGCAAAGCAGAACGA
CCCGCGAACGTGTAACACAACCGGCGGCGTGCGCTTGTGGCCTCCCTTTGGGGTGCCT
CAGGTGTTTCGTGCCACGTAACAAACCCCGGCACAACACGTGCCAAGGAAAACAAAA
CTTAAGAAGGGCGGTCCCGTGTGCCCCGTTGCGGAGCGCGCACGGGCGTGGCTTCTC
TAGAACCACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGT
AGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACG
CAAGTTGCGCCGAAGCCATCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCG

TCGCTCCCGACCACGCCTCCCCACGGGGTGGAGTGCCGTGCGGGGCGGAGACTGGCCT
CCCGTGCCCATGGCGCGGCTGGCCCAAACAGGAGTCCCCTTCGACGGACGCACGACTAG
TGGTGGTTGTAACGGCCCTCGTATCGAGCCGTGCGTCTTGAGCCGCAAGGGAAGCGCTCG
ACAAAGACCCCAACGCGTCGCCTCGCGACGACGCTTCGACCGCGACCCAGGTCAGGCG
GGACTACCCGC

>Carlina intermedia

AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAGCCTGCAAAGCAGAACGACCCGCGAACGT
GTAAACACAACCGGCGGCGTGCCTTGTGGCCTCCCTTTGGGGTGCCTCGGGTGTTCG
TCGCCACGTAAACAAACCCCGGCACAACACGTGCCAAGGAAAACAAACTTAAGAAGG
GCGCGTCCCGTGTGCCCCGTTGCGGAGCGCGCACGGGCGTGGCCTCTCTAGAACCACA
AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGC
GATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGC
CCGAAGCCATCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTCCCGAC
CACGCCTCCCCACGGGGTGGAGTGCCGTGCGGGGCGGAGACTGGCCTCCCGTGCCCAT
GGCGCGGCTGGCCCAAACAGGAGTCCCCTTCGACGGACGCACGACTAGTGGTGGTTGTA
ACGGCCCTCGTATCGAGCCGTGCGTCTTGAGCCGCAAGGGAAGCGCTCGACAAAGACCC
CAACGCGTCGCCTCGCGACGACGCTTCGACCGCGACCCAGGTCAGGCGG

>Carlina biebersteinii

CCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAGCCTGCAAAGCAGAACGACCCGCGA
ACGTGTAAACACAACCGGCGGCGTGCCTTGTGGCCTCCCTTTGGGGTGCCTCAGGTGT
TTCGTGCCACGTAAACAAACCCCGGCACAACACGTGCCAAGGAAAACAAACTTAAGA
AGGGCGCGTCCCGTGTGCCCCGTTGCGGAGCGCGCACGGGCGTGGCTTCTCTAGAACC
ACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAA
TGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTG
CGCCGAAGCCATCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTCCC
GACCACGCCTCCCCACGGGGTGGAGTCCCGTCGCGGGGCGGAGACTGGCCTCCCGTGCC
CATGGCGCGGCTGGCCCAAACAGGAGTCCCCTTCGACGGACGCACGACTAGTGGTGGTT
GTAACGGCCCTCGTATCGAGCCGTGCGTCTTGAGCCGCAAGGGAAGCGCTCGACAAAGA
CCCCAACGCGTCGCCTCGCGACGACGCTTCGACCGCGACCCAGGTCAGGCGG

>Carlina sp. (BY 16509)

CACAACCGTCGGCGTGCGCCCGTGGCCTCCCCCGGGGGTCCCGGGGCGTTCCGTGCGT
AGGTAAACAAACCCCGGCACAACACGTGCCAAGGAAAACAAACTTAAGAAGGGCGCG
TCCCGTGTGCCCCGTTGCGGAGCGCGCATGGGCCGTGGCCTCTCTAGAACCACAAACG
ACTGTGCGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAAATGCGATA
CTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGA
AGCCATCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTCCCGACCACG
CCTCCCCACGGGGCGGAGTGACGTGCGGGGCGGAGACTGGCCTCCCGTGCCCATGGCG
CGGCTGGCCCAAACAGGAGTCCCCTTCGACGGACGCACGACTAGTGGTGGTTGTAACGG
CCTTGTATCGAGCCGTGCGTCTTGAGCCGCAAGGGAAGCGCTGAACAAACACCCCAAG
GCGTCGCCTCGCGACGACGCTTCG

>Carthamus dentatus

GGTTTCCGTAGGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAGCCTGCACAGCAGAACGAC
CCGTGAACATGTAATCACAACCGGGCGTGCCTTGGGATTGGGTGTGAGCCTTAGCCCTACGA
TGCTCGTCGGCATGCGTGAAGGTGCTTATCTTAGGCATCGTGGACGTTGTGTGCGGCAC
AAAAACAAACCCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAACTTAAGAAGGGTGCCT
TGTGTTCCCGTTTTCCGTGTGCACCGGGTGCCTGTCATTAACCAAAACGACT
CTCGGCAACCGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAAATGCGATACT
GGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAAGC
CATTGCGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCAGACCATGCTC
CCCCATGGGGACGTGTTTGGTCTGGGACGGAGACTGGTCTCCCGTGCTCATGGTGCGGTT
GGCCTAAAAGGAGTCCCCTTTGGCGGACGCACGGCTAGTGGTGGTTGTCAAGGCCTTCG

TATCGAGCCGTGCTGATGCTAGGGAATCGCTCTCTAAAGACCCTAACGTGTCGTCTTTAC
GACGATGCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAG

>*Carthamus lanatus*

AGAAGGAGAAGTCGTAAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGA
AGCCTGCACAGCAGAACGACCCGTGAACATGTAATCACAACCGGGCATCGTGGGATTGG
GTGTGAGCCTTAGCCCTACGATGCTCGTCGGCATGCGTGCAAGGTGCTTATCTCTAGGCA
TCGTGGATGTTGTGTCGGCACAAAAACAAACCCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACA
AAACTTAAGAAGGGTTCGTCTCGTGTTCGCCGTTTTTCGGTGTGCACACGGGTTCGTGGCC
TCTATTAACCACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAA
CGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGGTGAAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCCGAGTTTT
TGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGC
ATCGCGTCGCCCCAGACCATGCTCCCCATGGGGACGTGTTTGGTCTGGGACGGAGACTG
GTCTCCCGTGCTCATGGTGCAGTTGGCCTAAAAAGGAGTCCCCTTTGGCGGACGCACGGC
TAGTGGTGGTTGTCAAGGCCTTCGTATCGAGCCGTGCTGATGCTAGGGAATCGCTCTCAA
AAGACCCTAACGTGTCGTCTTTACGACGATGCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAGGCGGGA
CTACCCCG

>*Cardopatum corymbosum*

AAACAGGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAGCCTGCACAGCAGA
ACGACCCGTGAATACGTACGACAACCGGGCGTCGGGGGTATCGGGCGCGAGCTCGATGC
CTGCGATGCTTCGTCCGTGTGCGTTTCGTGGTTCGCCCTTCGGGACATCGTGGACGTCTCAT
CGGCACGAAAACAAACCCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAACTTAAGAAGGC
TTCGTCTCGTGTGCCCCGTTTCGCGGTGCGCGCGGGTTCGTGAGCTCTCTAGAACCACA
AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGC
GATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGC
CCGAAGCCATTCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCAAC
CACGCCTTCCCCTTTGGGGACGCGTCGAGCTGGGGGCGGAGATTGGCCTCCCCTGACTTT
GGAGCGCGGTTGGCCTAAAAAGGAGTCCCCTTCGGCGGACGCACGGCTAGTGGTGGTTG
TCAAGGCCCTCGTATCAAGCTGTGTGTCGTGAGCCGCGAGGAAGAGCTCTGCAAATACCC
CAACGCGTCGCCTCGCGACGACGCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAGGCGGGACTAACC
CG

>*Atractylis cancellata*

ATAGAGAAGTCGTAAACAGGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAT
CCTGCACAGCAGAACGACCCGCGAACAAGTAAACACAACCCGGGCGTCGCGACATCGGG
TGAGAGCCCGGTGCTCGGGGCCCTGTCCGGCGTGCACGCAAGGCGTCCCCTGGGGGCG
TCCAGAGCGTTCGGTCGGCACAAAAACAAACCCCGGCACAACACGTGCCAAGGAAAACA
AGACTTAAGAAGGGCGCGTTCGTGTGCCCCGTTTCGCGGTGCGCGCACGGGCCGTGGCC
TCTCTGGAACCACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGA
ACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTG
AACGCAAGTTGCGCCGAAGCCATTCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCAT
CGCGTCGCCCCGACCACGCCTCCCCTATGGGATCGCGTGACGTGCGGGGCGGATATTGGC
CTCCCCTGCCACGGTGCAGGCTGGCCTAAACAGGAGTCCCCTTCGACGGACGCACGGCTA
GTGGTGGTTGTAACGGCCCTCGTATCGAGCCGTGCGTTCGTTAGCCGCAAGGGAAGCGCTC
GTCAACGACCCCAACGCGTCGCCTCGCGACGACGCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAG
GCGGGACTACCCCGCTGAGTTAAGCATATATAA

trnL-F DNA dizileri

>Carlina corymbosa

ATTTTCAGTCCTCTGCTCTACCAACTGAGCTATCCCAACTATTCCCTGATGTCTCATCCTCAT
TTTCATTTTACTAGATAACTTGGGTCTATGTCAATTGAAAGGGTATTACAAAGCCTCATCC
AGGTCCTATAATTTGTCAAACAAAAGAACAACCTTTGTAAGTTTCAGTATGAATAAAAAAT
ATCGATCGTGAATCATTCAAATGGGGATTCCCTTGCTCAAAGATGTTTCATTTGTTATATATC
AAGAGAACAGCATTTCGCCAGATCCATTTGTATAAAGAGTAGTGAATGAGAAAGATA
AGGAATTTTGAACCGCTAACGAAAAAAGTATAAAATAAATAAAAAAGGATACGATAAAT
AATTAGGGAGTCAAATGGGGCCTTTTTGGGGATAGAGGGACTTGAACCA

>Carlina graeca

TGGTTCAAGTTCCTCTATCCCCAAAAAGGCCATTTGACTCCCTAATTATTTATCGTATC
CTTTTTATTTATTTTATACTTTTTTTCGTTAGCGGTTCAAATTCCTTATCTTTCTCATTAC
TACTCTTTATACAAATGGATCTGGGCGAAAATGCTGTTCTCTTGATATATAACAAATGAA
CATCTTTGAGCAAGGAATCCCCATTTGAATGATTCACGATCGATATTTTTATCATACTGA
AACTTACAAAGTTGTTCTTTTGTGTTTACAAATTATAGGACCTGGATGAGGCTTTGTAATA
CCCTTTCAATTGACATAGACCCAAGTTATCTAGTAAAATGAAAATGAGGATGAGACATCA
GGAATTAGTTTGGGAATTAGGTGAGTTGGGTGGAGCAGAGGACTGAAAATCCTCG

>Carlina biebersteinii

TGGTTCAAGTTCCTCTATCCCCAAAAAGGCCATTTGACTCCCTAATTATTTTATCGTATC
CTTTTTATTTATTTTATACTTTTTTTCGTTAGCGGTTCAAATTCCTTATCTTTCTCATTAC
TACTCTTTATACAAATGGATCTGAGCGAAAATGCTGTTCTCTTGATATATAACAAATGAA
CATCTTTGAGCAAGGAATCCCCATTTGAATGATTCACGATCGATATTTTTATCATACTGA
AACTTACAAAGTTGTTCTTTTGTGTTTACAAATTATAGGACCTGGATGAGGCTTTGTAATA
CCCTTTCAATTGACATAGACCCAAGTTATCTAGTAAAATGAAAATGAGGATGAGACATCA
GGAATAGTGGGGTTAGCTCAGTTGGGTAGAGCAGAGGAACTGAAA

>Carlina vulgaris

TATTTGAACTGGGGACACGAGGATTTTCAGTCCTCTGCTCTACCAACTGAGCTATCCCAA
CTATTCCTGATGTCTCATCCTCATTTCATTTTACTAGATAACTTGGGTCTATGTCAATTGA
AAGGGTATTACAAAGCCTCATCCAGGTCTATAATTTGTTCAAACAAAAGAACAACCTTT
GTAAGTTTCAGTATGAATAAAAAATATCGATCGGGAATCATTCAAATGGGGATTCCCTTGCT
CAAAGATGTTTCATTTGTTATTTATCAAGAGAACAGCATTTCGCTCAGATCCATTTGTATA
AAGAGTAGTGAATGAGAAAGATAAGGAATTTTGAACCGCTACCGAAAAAAGTATAAA
ATAAATAAAAAGGATACGATAAATAATTAGGGAGTCAAATTGGGA

>Carlina intermedia

GCTCTCCCAACTGAGCTATCCCAACTTTTCCTGATGTCTCATCCTCATTTCATTTCGCCTA
GATAACTGGGGTCTATGTCAATTCAAAGGGTATTACAAAGCCTCATCCAGGTCTATAAT
TTGTCAAACAAAAGAACAACCTTTGTAAGTTTCAGTATGAATAAAAAATATCGATCGTGAA
TCATTCAAATGGGGATTCCCTTGCTCAAAGATGTTTCATTTGTTATATATCAAGAGAACAGC
ATTTTCCCTCAGATCCATTTGTATAAAGAGTAGTGAAGGAGAAAGATAAGGAATTTTGAA
CCGCTAATGAAAAAAGATTAATAAATAAATAAAAAGGATACGGGATAAATAAATAGCG
GGGAGTCAAAGTGGCCTTCC

>Carlina oligocephala subsp. oligocephala

TGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAGGCCATTTGACTCCCTAATTATTTATCGTATCCT
TTTTATTTATTTTATACTTTTTTCGTTAGCGGTTCAAATTCCTTATCTTTCTCATTCACTA
CTCTTTATACAAATGGATCTGAGCGAAAATGCTGTTCTTTGATATATAACAAATGAACA
TCTTTGAGCAAGGAATCCCCATTTGAATTTGAATGATTCACGATCGATATTTTTATTTCATA
CTGAAACTTACAAAGTTGTTCTTTTGTGTTTGACAAATTATAGGACCTGGATGAGGCTTTGT
AATACCCTTTCAATTGACATAGACCCAAGTTATCTAGTAAAATGAAAATGAGGATGAGA
CATCAGGAATAGTTGGGGGAATTAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGGGACTTTGA

>Carlina lanata

TTGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAGGCCCTTCGACTCCCTAATTATTTATCGTATCC
TTTTATTTATTTTATCCTTTTTTCGTTAGCGGTTCAAATTCCTTATCTTTCTCATTCACT
ACTCTTTATACAAATGGATCTGAGCGAAAATGCTGTTCTTTGATATATAACAAATGAAC
ATCTTTGAGCAAGGAATCCCCATTTGAATGATTCACGATCGATATTTTTATTTCATACTGAA
ACTTACAAAGTTGTTCTTTTGTGTTTGACAAATTATAGGACCTGGATGAGGCTTTGTAATAC
CCTTTCAATTGACATAGACCCAAGTTATCTAGTAAAATGAAAATGAGGATGAGACATCA
GGAAAAGTTGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGGCAGAGGACTGAAAATCCT

>Carlina subsp.libanotica

ATTTTGAAGTGGGAACACCGAGGATTTCAAGTCTCTGCTCTACCAACTGAGCTATCCCA
ACTATTCCTGAGGTCTCATCCTCATTTCCTTTTCCTTAGATAAACTTGGGTCTATGTCAAT
TGAAAGGGTATTACAAAAGCCTCATCCAGGTCCTATAATTTGTCAAAAACAAAAGAACA
ACTTTGTAAGTTTCAGTATGAATAAAAATATCGATCGTGAATCATTCAAATGGGGATTCC
TTGCTCAAAGATGTTTCATTGTTATATATCAAGAGAACAGCATTTCCTCCAGATCCATTT
GTATAAAGAGTAGGGAATGAGAAAAGATAAAGGAATTTTGAACCGCTAACGAAAAAAAGT
AAAAATAAATAAAAAGGATACGATAAAAATTATAGGGGAGTCAATTGGGC

>Carlina involucrate subsp. libanotica

CCTCTATCCCCAAAAGGCCATTTGCCTCCCTAATTATTTATCGTATCCTTTTTATTTATTT
TATACTTTTTTCGTTAGCGGTTCAAATTCCTTATCTTTCTCATTCACTACTCTTTATACA
AATGGATCTGGGCGAAAATGCTGTTCTTTGATATATAACAAATGAACATCTTTGAGCAA
GGAATCCCCATTTGAATGATTCACGATCGATATTTTTATTTCATACTGAAACTTACAAAGTT
GTTCTTTTGTGTTTGACAAATTATAGGACCTGGATGAGGCTTTGTAATACCCTTTCAATTGA
CATAGACCCAAGTTATCTAGTAAAATGAAAATGAGGATGAGACATCAGGAATAGTTGGG
ATAGCTCAGTTGGTTAGAGCAGAGGACTGAAAATCCTCGTGTCAA

>Carlina sp. (BY16509)

TATTTGAACTGGTGACACGAGGATTTTCAGTCTCTGCTCTACCAACTGAGCTATCCCAA
CTATTCCTGATGCTCATCCTCATTTCATTTTACTAGATAACTTGGGTCTATGTCAATTGA
AAGGGTATTACAAAGCCTCATCCAGGTCCTATAATTTGTCAAAAACAAAAGAACAACCTTTG
TAAGTTTCAGTATGAATAAAAATATCGATCGTGAATCATTCAAATGGGGATTCTTTGCTC
AAAGATGTTTCATTTGTTATATATCAAGAGAACAGCATTTCGCCCAGATCCATTTGTATA
AAGAGTAGTGAATGAGAAAAGATAAAGGAATTTTGAACCGCTAACGAAAAAAAGTATAAA
ATAAATAAAAAGGATACGATAAATAATTAGGGGAGTCAAATGGGC

>Atractylis cancellata

CCTCTATCCCCAAAAGACCATTTGACTCCTTAATTATTTACCGGATCCTTTTTATTTATTT
TATCCTTTTTTCGTTTTATTTATTTTATCCTTTTTTCGTTAGCGGTTCAAATTCCTTATCTT
TCTCATTCACTACTCTTTATACAAATGGATCTGAGCGGAAATGCTGTTCTTTGATATATA
TGATAAATGAACATCTTTGAGCAAGGAATCCCCATTTGAATGATTCACGATCGATATTTT
TATTTCATACTGAAACTTACAAATACTGAAACTTACAAAGTTGTTCTTTTGTGTTTGACAAAT
TATAGGACCTGAATGAGGCTTTGTAATACCCTTTCAATTGACATAGACCCAAGTTATCTA

GTAAAATGAAAATGAGGATGAGACATTAGGAATAGTCGGGATAGCTCAGTTGGGTAGAA
GCAAAGAGGGGACTGAAAATCCTCGTGTCA

>*Carthamus dentatus*

TATTTGAACTGGGGACACGAGGATTTTCAGTCCTCTGCTCTACCAACTGAGCTATCCCAA
CTATTCCTGATGTCTCATCCTCATTTTCATTTTACTAGATGACTCGGGTCTATGTCAATTG
AAAGGGTATTACAAAGCCTCATCCAGGTCCTATAATTTGTCAAAAAGAACAACCTTTGTAAG
TTTCAGTATGAATAAAAAATATCGATCGTGAATCATTCAAATGGGGATTCCCTTGCTCAAAG
ATGTTTCATTTGTATATGTATCATATATATCACATGTGATAAGAGAACAGCATTTCCTGCTCA
CACCCATTTGTATAAAGAGTAGTGAATGAGAAAAGAAAAGATAAGGAATTTTGAACCGCT
AAGGAAAAGGATAAAAATAACAATAAAGGATAGGAGAAAATAATTAGGGAGTCAAAGG
GTCT

>*Carthamus lanatus*

GGGTTCAAGGTCCCTCTATCCCCAAAAGATTTTTGACTCCCTAATTATTTCTCCTATCCT
TTATTGTTTATTTTATCCTTTTTCTTAGCGGTTCAAATTCCTTATCTTTTCTTCTCATT
ACTACTCTTTATACAAATGGGTCTGAGCGGAAATGCTGTTCTTATCACATGTGATATAT
ATGATACATATACAAATGAACATCTTTGAGCCAAGGAATCCCCATTTGAATGATTCACGA
TCGATATTTTTATTACTGAACTTACAAAGTTGTTCTTTTGACAAATTATAGGACCTG
GATGAGGCTTTGTAATACCCTTTCAATTGACATAGACCCGAGTCATCTAGTAAAATGAAA
ATGAGGATGAGACATCAGGAATAGTTGGGATAGCTGCAGTAGATAGGAGCAGAGGACCT
GAAAATCCTCGTGTACACAGGTTCAAATTA

>*Cardopatum corymbosum*

TGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAGACCCATTTTTGAATCCCTAATATTTATCGTATC
CTTTTTATTTATTTTATCCTTTTTCGTTAGCGGTTCAAATTCCTTATCTTTCTCATTCACTA
CTCTTTATACAAATGGATCTGAGCGGAAATGCTGTTCTTATCAAATGAACATCTTTGA
GCAAGGAATCCCCATTTGAATGATTCACGATCGATATTTTTATTACTGAACTTACA
AAGTTGTTCTTTTGACAAATTATAGGACCTGGATGAGGCTTTGTAATACCCTTTCAATTGA
CATAGACCCAAGTTATCTAGTAAAATGAAAATGAGGATGAGACATCAGGAATAGTCGGG
ATAGCTCAGTTGGTAGAGGCCAGGAGGAACTGAAAATCCTCGTGTACACAGGTTCAAAT

KAYNAKLAR

- [1] Cracraft, J., "The Seven Great Questions of Systematic Biology: An Essential Foundation for Conservation and the Sustainable Use of Biodiversity", *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **89/2**, (2002) 127.
- [2] Wen, J., Vanek-Krebitz, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Breiteneder, H., "The Potential of Betv1 Homologues, a Nuclear Multigene Family, as Phylogenetic Markers in Flowering Plants", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **8**, (1997) 317.
- [3] Kellogg, E.A., Who's related to whom? Recent results from molecular systematic studies, *Current Opinion in Plant Biology*, **1**, (1998) 149.
- [4] Savolainen, V., Chase, M.W., A decade of progress in plant molecular phylogenetics, *Trends in Genetics*, **19**, (2003) 717.
- [5] Ro, K.E., Keener, C.S., McPherson, B.A., "Molecular Phylogenetic Study of the Ranunculaceae: Utility of the Nuclear 26S Ribosomal DNA in Inferring Intrafamilial Relationships", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **8**, (1997) 117.
- [6] Podoplelova, Y., Ryzhakov, G., "Phylogenetic analysis of the order Nymphaeales based on the nucleotide sequences of the chloroplast ITS2-4 region", *Plant Science*, **169**, (2005) 606.
- [7] Yokoyama, J., Suzuki, M., Iwatsuki, K., Hasebe, M., "Molecular Phylogeny of Coriaria, with Special Emphasis on the Disjunct Distribution", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **14**, (2000) 11.
- [8] Vilatersana, R., Brysting, A.K., Brochmann, C., "Molecular evidence for hybrid origins of the invasive polyploids *Carthamus creticus* and *C. turkestanicus* (Cardueae, Asteraceae)", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**, (2007) 610.
- [9] Allan, G.J., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Boerner, E., Zimmer, E.A., "Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island Lotus (Fabaceae: Loteae)", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32**, (2004) 123.

- [10] Cohen, B.L., Weydmann, A., "Molecular evidence that phoronids are a subtaxon of brachiopods (Brachiopoda: Phoronata) and that genetic divergence of metazoan phyla began long before the early Cambrian", *Organisms Diversity & Evolution*, **5**, (2005) 253.
- [11] Endress, P.K., "Morphology and Angiosperm Systematics in the Molecular Era", *The Botanical Review*, **68/4**, (2003) 545.
- [12] Schweizer, M., Pawlowski, J., Duijnste, I.A.P., Kouwenhoven, T.J., Van Der Zwaan, G.J. , "Molecular phylogeny of the foraminiferal genus *Uvigerina* based on ribosomal DNA sequences", *Marine Micropaleontology*, **57**, (2005) 51.
- [13] Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S. & Donoghue, M.J., "The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny", *Ann. Mo. Bot. Gard.*, **82**, (1995) 247.
- [14] Liston, A., Robinson, W.A., Pinero, D., Alvarez-Buylla, E.R., "Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) Based on Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Region Sequences", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **11**, (1999) 95.
- [15] Liu, J.Q., Gao, T.G., Chen, Z.D., Lu, A.M., " Molecular phylogeny and biogeography of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Nannoglottis* (Asteraceae)", *Molecular Phylogenetic and Evolution*, **23**, (2003) 307.
- [16] Panero, J. L., Funk, V.A., "The value of sampling anomalous taxa in phylonetic studies: Major clades of the Asteraceae revealed", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **47**, (2008) 757.
- [17] Garcia-Jacas, N., Garnatje, T., Susana, A., Vilatersana, R., "Tribal and Subtribal Delimitation and Phylogeny of the Cardueae (Asteraceae): A Combined Nuclear and Chloroplast DNA Analysis", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **22/1**, January, (2002) pp.51.
- [18] Funk, V.A., Susanna, A., Stuessy, T. F., Robinson, H., Classification of Compositae, (2009) 171. <http://hdl.handle.net/10088/11409> (15.09.2011)
- [19] Häffner, E., Hellwig, F.H., "Phylogeny of the tribe *Cardueae* (*Compositae*) with emphasis on the subtribe *Carduinae*: an analysis based on ITS sequence data", *Willdenowia*, **29**,(1999).

- [20] Meusel, H., Kastner, A., *Lebengeschichte der Gold- and Silberdisteln: Monographie der mediterran-mittleuropaischen Compositen-Gattung Carlina*, Band I. Österr. Akad. Wiss. Math.- Naturwiss. KI. Denkschr, (1990) 127.
- [21] Meusel, H., Kastner, A., *Lebengeschichte der Gold- and Silberdisteln: Monographie der mediterran-mittleuropaischen Compositen-Gattung Carlina*, Band II. Österr. Akad. Wiss. Math.- Naturwiss. KI. Denkschr, (1994) 128.
- [22] Kadereit, J.W., Jeffrey, C. (eds.), "Flowering Plants. Eudicots: Asterales. In Kubitzki K(ed.)", *The Families and Genera of Vascular Plants*, vol.8, Springer: Verlag Berlin Germany (2007).
- [23] Topashka- Ancheva, M., Taskova, R., Handjieva, N., Mikhova, B., Duddeck, H., "Clastogenic Effect of *Carthamus lanatus* L. (Asteraceae)", *Zeitschrift für Naturforschung*, **58**, (2003) 833.
- [24] Garnatje T., Garsia S., Vilatersana R., Vallès J., "Genome Size Variation in the Genus *Carthamus* (Asteraceae, Cardueae): Systematic Implications and Additive Changes During Allopolyploidization", *Annals of Botany*, **97**, (2006) 461.
- [25] Sehgal, D., Raina, S.N., Devarumath, R.M., Sasanuma, T., Sasakuma, T., "Nuclear DNA assay in solving issues related to ancestry of the demostricaled diploid safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and the polyploid (*Carthamus*) taxa, and phylogenetic and genomic relationships in the genus *Carthamus* L. (Asteraceae)", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **53**, (2009) 631.
- [26] Garcia- Jacas, N., Susana, A., Garnatje, T., Vilatersana, R., "Generic Delimitation and Phylogeny of the Subtribe Centaureinae (Asteraceae): A Combined Nuclear and Chloroplast DNA Analysis", *Annals of Botany*, **87**, (2001) 503.
- [27] Peng, S., Feng, N., Guo, M., Chen, Y., Guo, Q., "Genetic variation of *Carthamus tinctorius* L. and related species revealed by SRAP analysis", *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**, (2008) 531.
- [28] Vilatersana, R., Villodre, J.M., Susanna, A., Garsia-Jacas, N., Garnatje, T., "Pollen Studies in Subtribe Centaureinae (Asteraceae): The *Carthamus* Complex and the Genus *Aegialophila* Analyzed with Electron Microscopy", *Plant Biol.*, **3**, (2001) 607.
- [29] Heywood, V.H., *Flowering Plants of the World*, Equinox Ltd., Oxford, UK, (1985) 335, ISBN0709937784.

- [30] Yıldız, B., Aktoklu, E., Bitki Sistematiği (ilkin karasal bitkilerden bir çeneklilere), Palme Yayıncılık, Ankara, (2010).
- [31] Cronquist, A., The Evolution and Classification of Flowering Plants, The New York Botanical Garden Bronx, New York 10458, (1988) 183.
- [32] Linne, C., Species Plantarum, Holmia Impensis Laurentii Salvii., 1, (1753) <http://www.biodiversitylibrary.org> (01.03.2011)
- [33] Boissier, E., Flora Orientalis, vol:3, Soc. Phys. Genev., Soc. Linn. Londin, (1875) 447.
- [34] Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A., Flora Europea, Cambridge University Press, (1968).
- [35] Tutin, T., *Eclipta* L. – In: Tutin, T. & al. (eds), Flora Europaea, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 4, (1976) 141.
- [36] Strid A, Tan K, Mountain Flora of Greece, Edinburg University Pres, Volume2, (1991) 473.
- [37] [http:// www.efloras.org](http://www.efloras.org) (01.03.2011)
- [38] [http://en.wikipedia.org/wiki/list_of_native_plant_of_palestine_\(C-D\)](http://en.wikipedia.org/wiki/list_of_native_plant_of_palestine_(C-D)). (01.03.2011)
- [39] Dothan, N.F., Koppel, R., Huber, E., Benyamini, L., Ferber, I., Stein, Y., Flora Palaestina, The Israil Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem, (1977) 10.
- [40] [http:// www.tiuli.com](http://www.tiuli.com)(01.03.2011)
- [41] <http://luirig.altervista.org/flora/carlina.htm>(01.03.2011)
- [42] [http:// www.floracyberia.net](http://www.floracyberia.net)(01.03.2011)
- [43] <http://www.maltawilgplants.com>(01.03.2011)
- [44] Zareh, M.M., “Synopsis of the Family Asteraceae in Egypt (Review)”, *International Journal of Agriculture & Biology*, 1560-8530, (2005) 832.

- [45] Bobrov, E.G., Bochantsev, V.P., Hjin, M.M., Linchevskii, I.A., Liphits, S.Y., Sergievskaya, E.V., Cherneva, O.V., Cherepanov, S.K., Yuzepchuk, S.V., Flora of The U.S.S.R., Volume Editors Shishkin, B.K. and Bobrov, E.G., Vol:27, Bishen Singh Mahendra Pal Singh and Koeltz Scientific Books and printed at Shiva Offset Press, 14, Old Connaught Place, Dehra Dun-248 001, India, (1997) 98.
- [46] Rehinger, K.H., Flora Iranica, No: 139a, Akademische Druck-II, Verlangsanstalt Graz, Austria, (1979) 101.
- [47] Davis, P.H.(Ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Island, Edinb. Un. Press, Edinburg, 5, (1975) 597.
- [48] Davis. P.H., Kit Tan., M.R.D. (Eds.), Flora of Turkey and the East Aegean Island, (supplement 1), Edinb. Un. Press, Edinburg, 10, (1988).
- [49] Dordević, S., Petrović, S., Dobrić, S., Milenković, M., Vučićević, D., Žižić, S., Kukić, J., “ Antimikrobial, anti-inflammatory, anti- ulcer and antioxidant activies of *Carlina acanthifolia* root essential oil”, *Journal of Ethnopharmacology*, 109, (2007) 458.
- [50] <http://www.florahealth.com/flora/home> (01.05.2011)
- [51] Pieroni, A., Giusti, M.E., Pasquale, C., Lenzarini, C., Censorii, E., Gonzáles-Tejero, M.R., Sánchez-Rojas, P., Ramiro-Gutiérrez, J.M., Skoula, M., Johnson, C., Sarpaki, A., Della, A., Paraskeva-Hadijchambi, D., Hadjichambis, A., Hmamouchi, M., El-Jorhi, S., El- Demerdash, M., El- Zayat, M., Al-Shahaby, O., Houmani, Z., Scherazed, M., “Circus- Mediterranean cultural heritage and medicinal plant uses in traditional animal healthcare: a field survey in eight selected areas within the RUBIA Project”, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2/16, (2006) 2.
- [52] <http://pr.hec.gov.pk/chapters/2027-27>(01.05.2011)
- [53] Grace, B., Sindel, B.M., Sheppard, A.W., Whalley, R.D.B., Ecology And Management Of Saffron thistle (*Carthamus lanatus* L.) In New South Wales Pastures, Twelfth Australian Weeds Conferance, Australian, (2010) 13.
- [54] Simth, L., “ Physiological host range of *Ceratapion basicorne*, a prospective biological control agent of *Centaurea solstitialis* (Asteraceae)”, *Biological Control*, 41, (2007) 120.
- [55] Ancheva M.T., Taskova R., Handjieva N., “ Mitogenic Effect of *Carthamus lanatus* extracts, Fraction and Constituents”, *Fitoterapia*, 77, (2006) 608.

- [56] <http://www.znaturforsch.com>(01.04.2011)
- [57] Daniele, C., Dahamna, S., Firuzi, O., Sekfali, N., Saso, L., Mazzati, G., "Atractylis gummifera L. poisoning: an ethnopharmacological review", *Journal of Ethnopharmacology*, **97**, (2005) 175.
- [58] Wolfe, K.H, Li, W.H., Sharp, P.M., " Rates of nucleotide substitutions vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs", *Proc. Natl Acad* , (Sci) , USA, **84**, (1987) 9054.
- [59] Gruenstaeudl, M., Urtubey, E., Jansen, R. K., Samuel, R., Barfuss, M. H.J., Stuessy , T. F., "Phylogeny of Barnadesioideae (Asteraceae) inferred from DNA sequence data and morphology", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **51**, (2009) 572.
- [60] Herendeen, P.S., Lewis, G.P., Bruneau, A., "Floral Morphology in Caesalpinoid Legumes: Testing the Monophyly of the *Umtiza* clade", *Int. J. Plant Sci.*, **164/5**, (2003) 393.
- [61] Doyle, J.A., Eklund, H., Herendeen, P.S., " Floral Evolution in Chloranthaceae: Implications of a Morphological Phylogenetic Analysis", *Int. J. Plant Sci.*, **164/5**, (2003) 382.
- [62] Lewis, P.O., "A likelihood Approach to Estimating Phylogeny from Discrete Morphological Character Data", *Systematic Biology*, **50/6**, (2001) 913.
- [63] Bull, J.J., Huelsenbeck, P., Cunningham, C.W., Swofford, D.L., Waddell, P.J., "Partitioning and Combining Data in Phylogenetic Analysis", *Systematic Biology*, **42/3**, (1993) 384.
- [64] Hickey, L.J, Wolfe, J.A., "The Bases of Angiosperm Phylogeny: Vegetative Morphology", *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **62/3**, (1975) 538.
- [65] Batır B, Türkiye’de *Carlina* L. cinsine ait taksonların (*Asteraceae*) polen morfolojisi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Y.Lisans Tezi, (2009).
- [66] Punt, W., Hoen, P.P., " The Northwest European Pollen Flora, 70 Asteraceae-Asteroidae", *Review of Palaeobotany and Palynology*, **157**, (2009) 22.
- [67] Wortley, A.H., Funk, V.A., Robinson, H., Skvarla, J.J, Blackmore, S., " A search for pollen morphological synapomorphies to classify rogue genera in Compositae (Asteraceae)", *Review of Paleobotany & Palynology*, **146**, (2007) 169.

- [68] Osman, A.K., "Contribution to the polen morphology of Tribe Cardueae (Cichorioideae- Compositae)", *Feddes Repertorium*, **120**, (2009) 145.
- [69] Jong, T.J., Klinkhamer, P.G.L., Heiden, J.L.H., "The effect of water and mycorrhiza infection on the distribution of *Carlina vulgaris* on sand dunes", *Ecography*, **18**, (1995) 384.
- [70] Klinkhamer, P.G.L., Jong, T.J., Heiden, J.L.H., "An eight-year study of population dynamics and life-history variation of the "biennial" *Carlina vulgaris*", *Oikos*, **75**, (1996) 259.
- [71] Balos, M.M., Akan, H., "Flora of the Region between Zeytinbahçe and Akarçay (Birecik, Şanlıurfa, Turkey)", *Turk. J. Bot.*, **32**, (2008) 201.
- [72] Tuzlacı, E., Datça Yarımadası (Muğla) Florası ve Bu Yörede Halkın Yararlandığı Bitkiler, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir, Eds. K.H.C.Başer ve N. Kırimer Web'de, Haziran, (2004) ISBN 975-94077-2-8
- [73] Sheppard, A.W., Vitou, J., "The effect of a rosette-crown fly, *Botanophila turcica*, on growth, biomass allocation and reproduction of the thistle *Carthamus lanatus*", *Acta Oecologica*, **21/6**, (2000) 337.
- [74] Avise, J.C., *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman&Hall One Penn Plaza, New York, NY 10119, (1994).
- [75] Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B., *Moleküler Biyoloji (Protein Sentezi ve Yıkımı)*, Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi, yayın no:2, Fen ve Biyoloji yayınları Dizisi: **39**, (2007) 543.
- [76] Babalola O.O., "Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria (Minireview)", *African Journal of Biotechnology*, **2/12**, (2003) 710.
- [77] <http://www.flmnh.ufl.edu> (15.05.2011)
- [78] <https://www.msu.edu> (15.05.2011)
- [79] Baldwin, B. G., Kyhos D. V. & Dvorak, J., "Chloroplast DNA Evolution and Adaptive Radiation in the Hawaiian Silversword Alliance (Asteraceae)", *Annual Botanical Garden*, **77**, (1990) 96.

- [80] Baldwin, B.G., "Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants:an example from the *Compositae*", *Molecular Phylogenetic and Evolution*,1, (1992) 3.
- [81] Baldwin, B. G., & Markos, S., "Phylogenetic Utility of the External Transcribed Spacer (ETS) of 18S-26S rDNA. Congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae)", *Molecular Phylogeny Evolution*, 10, (1999) 449.
- [82] Stappen, V. J., Van Campenhout, S., Gama Lopez, S., Volckgert G., "Sequencing of the Internal Transcribed Spacer Region ITS1 as A Molecular Tool in Detecting Variation in the *Stylosanthes guianensis* Species Complex", *Theoretical Applied Genetics*, 96, (1998) 869.
- [83] Liu, J.S., Scharal, C.L., "A Conserved Sequence in the Internal Transcribed Spacer1 of Plant Nuclear rRNA Genes", *Plant Molecular Biology*, 26, (1994) 775.
- [84] Ohta, T., "Multigene families and the evolution of complexity", *Journal of Molecular Evolution*, 33, (1991) 34.
- [85] Polanco, C., Gonzalez, A.I., De La Fuente, A., Dover, G.A., "Multigene Family of Ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* Reveals Contrasting Patterns of Homogenization for IGS and ITS Spacer Regions: A Possible Mechanism to Resolve This Paradox", *Genetics*, 149, (1998) 243.
- [86] Li, W., *Molecular Evolution*, Sunderland, MA: Sinauer Assoc., Inc. (1997).
- [87] Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., "*Universal Primers for Amplification Three Non-coding Regions of Chloroplast DNA*", *Plant Molecular Biology*, 17, (1991) 1105.
- [88] Deniz, G., "Türkiye'de yetişen *Ziziphora* L. (*Lamiaceae*) taksonlarının moleküler sistematığı", Yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, Temmuz (2007).
- [89] www.dna-sequencing.org (15.05.2011)
- [90] Sambrook, J.F., E.F., Maniatis, T., *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory Press New York., (1989).
- [91] 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.
- [92] Notredame, C.a.H., D.G., "Saga: Sequence Alignment by Genetic Algorithm.", *Nucleic Acid Research*, **24/8**, (1996) 1515.
- [93] Freeman S. and Herron, J.C., *Evrimsel Analiz*. Çıplak, B., Basıbüyük. H. H., Karaytug. S. ve Gündüz. İ. (eds.), Palme Yayıncılık, **28-29**, (1999) 438.
- [94] Felsenstein, J., *Estimation of hominoid phylogeny from a DNA hybridization data set*. *Molecular Evolution*, **26**, (1987) 123.
- [95] Mount, D., *Bioinformatics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Chapter 7 Phylogenetic prediction, (2001) 281.
- [96] *TREEVIEW*. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>. (09.01.2011).
- [97] *PAUP* <http://paup.csit.fsu.edu/>, (09.01.2011).
- [98] *MR BAYES*. <http://mrbayes.csit.fsu.edu/>, (09.01.2011).
- [99] *PHYLIP*. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>, (09.01.2011)
- [100] Chapman, M.A., Chang, J.C., Weisman, D., Kesseli, R.V., Burke, J.M., "Universal markers for comparative mapping and phylogenetic analysis in the Asteraceae (Compositae)", *Theor Appl Genet*, **115**, (2007) 747.
- [101] Spaniols, S., Bazakos, C., Spano, T., Zoghby, C., Kalaitzis, P., "The potential of plastid *trnL* (UAA) intron polymorphisms for the identification of the botanical origin of plant oils", *Food Chemistry*, **122**, (2010) 850.
- [102] Coşkun, F., Parks, C.R., "A Molecular Phylogeny of *Cercis* L. (Fabaceae) Using the Chloroplast *trnL*-F DNA Sequences", *Pak. J. Botany*, **41/4**, (2009) 1587.
- [103] Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermaat, T., Corthier, G., Brochmann, C., Willerslev, E., "Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding", *Nucleic Acids Research*, **35/3**, (2007) 5.
- [104] Hidalgo, O., Garcia-Jacas, N., Garnatje, T., Susanna, A., "Phylogeny of *Rhaponticum* (Asteraceae, Cardueae- Centaureinae) and Related Genera

Inferred from Nuclear and Chloroplast DNA Sequence Data: Taxonomic and Biogeographic Implications”, *Annals of Botany*, **97**, (2006) 705.

- [105] Tsai, L.C., Yu, Y.C., Hsieh, H.M., Wang, J.C., Linacre, A., I Lee, J.C., “Species identification using sequences of the *trnL* intron and the *trnL-trnF* IGS of chloroplast genome among popular plants in Taiwan”, *Forensic Science International*, **164**, (2006) 193.
- [106] Wang, Y.J., Liu, J.O., “Phylogenetic analyses of *Saussurea* sect. *Pseudoeriocoryne* (Asteraceae: Cardueae) based on chloroplast DNA *trnL-F* sequences”, *Biochemical Systematics and Ecology*, **32**, (2004) 1009.
- [107] Drábková, L., Kirschner, J., Vlček, C., Pačes, V., “*TrnL-trnF* Intergenic Spacer and *trnL* Intron Define Major Clades Within *Luzula* and *Juncus* (Juncaceae): Importance of Structural Mutations”, *Journal of Molecular Evolution*, **59**, (2004) 1.
- [108] Fiz, O., Valcárcel, V., Vargas, P., “Phylogenetic position of Mediterranean Astereae and character evolution of daisies (*Bellis*, Asteraceae) inferred from nrDNA ITS sequences”, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **25**, (2002) 157.
- [109] Fernández, I.A., Aguilar, J.F., Panero, J.L., Feliner, G.N., “A phylogenetic Analysis of *Doronicum* (Asteraceae, Senecioneae) Based on Morphological, Nuclear Ribosomal (ITS), and Chloroplast (*trnL-F*) Evidence”, *Molecular Phylogenetic and Evolution*, **20/1**, (2001) 41.
- [110] Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Hidalgo, O., Vilatersana, R., Garnadje, T., “The Cardueae (Compositae) Revisited: Insights from ITS, *trnL-trnF*, and *matK* Nuclear and Chloroplast DNA Analysis”, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **93**, (2006) 150.
- [111] White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J., Amplifications and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In Innis M, Gelfand D, Sninsky J, and White T (eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, San Diego, California, USA(1990) 315.
- [112] Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., “A Plant DNA Miniprep: Version II”, *Plant Molecular Biology Reporter*, **1/4**, (1983) 19.
- [113] Çıplak, B., Taksonomi Yaz Okulu Ders Notları, Akdeniz Üniv. Fen- Edeb. Fak. Biyoloji Bölümü ve ODTÜ Fen-Edeb.Fak. Biyoloji Bölümü, 7-13 Eylül 1997, Antalya.

- [1143] Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., " CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acid Research* , **22**, (1994) 4673.
- [115] Wofford, D.L., Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods. In (PAUP* 4.0b10), Ed 4.0b10. Smithsonian Institution & Sinauer Associates, Washington, D.C. & Sunderland, MA, p Computer Program for Phylogenetic Analysis , (2005).
- [116] Felsenstein, J., "Confidence limits on phylogenies: An approach using bootstrap" *Evolution*, **39**, (1985) 783.
- [117] <http://www.linnean-online.org/cgi/search/simple> (17.09.2011)
- [118] Radford, A.E., Dickison, W.C., Massey, J.R., Bell, C.R. et.al, Vascular Plant Systematics, Seiler, M.S., Harper & Row Publishers, New York, Evanston, San Francisco, London, (1974) 565.
- [119] Benson, L., Plant Classification, Lauder milk, J., D.C. Heath and Company, Boston, (1957) 296.
- [120] Petit, D., "Generic interrelationships of the Cardueae (Compositae): a cladistic analysis of morphological data", *Pl. Syst. Evol.*, **207**, (1997) 173.