

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



**BAZI *CIRSİUM* MILL. TÜRLERİNİN VE HİBRİTLERİNİN DNA
BARKODLAMASI YOLUYLA MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

NAZLI ÖZKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üyesi Taner ÖZCAN (Tez Danışmanı)**
Prof. Dr. Serap DOĞAN
Prof. Dr. Turan ARABACI

BALIKESİR, ŞUBAT - 2021

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Bazı *Cirsium* Mill. Türlerinin ve Hibritlerinin DNA Barkodlaması Yoluyla Moleküler Karakterizasyonu**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Nazlı ÖZKAN

(imza)

ÖZET

BAZI *CIRSİUM* MILL. TÜRLERİNİN VE HİBRİTLERİNİN DNA BARKODLAMASI YOLUYLA MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAZLI ÖZKAN

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞRETİM ÜYESİ TANER ÖZCAN)

BALIKESİR, ŞUBAT - 2021

Bitkiler aleminin en zengin familyalarından biri olan Asteraceae (Compositae) familyasından *Cirsium* L. cinsine ait taksonlar Türkiye’de 3 seksiyon altında sınıflandırılmaktadır. *Cirsium* cinsinin *Epitrachys* seksiyonuna ait *C. macrobotrys* (C.Koch) Boiss. ve *C. ciliatum* Moench subsp. *szovitzii* (C.Koch) Petr. taksonları doğal alanlarında hibrit bireyler meydana getirebilmektedirler. Bu çalışmada, bu taksonların ve meydana getirdiği hibritlerin çekirdek genomuna ait iki farklı bölge (ITS ve ETS) ve kloroplast genomuna ait iki farklı bölge (trnL-F ve rpl32-trnL) çalışılmış; hibrit bireylerin ve atalarının morfolojik ve moleküler benzerlik ve farklılıkları tartışılıp hibritleşme mekanizması hakkında yorumlar yapılmıştır. Çalışılan hibritlerden Cm7 (TD4891) kodlu birey atalardan biri olan *C. macrobotrys* ile daha yakın ilişkiliyken, Cm4 kodlu (BY17228) bir diğer hibrit birey ise diğer ata olan *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* ile daha yakın akrabadır. Çalışma sonucunda elde edilen verilerden anlaşıldığı üzere cins içindeki hibrit bireylerin tümü aynı ataya benzememektedir. Ayrıca cins içindeki hibridizasyon mekanizması henüz tam olarak çözülemese de moleküler veriler hibrit bireylerin oluşmasında hibritleşmenin oldukça olağan olduğunu göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Cirsium*, hibritleşme, DNA dizileme, Türkiye.

Bilim Kod / Kodları : 20606, 20610

Sayfa Sayısı : 102

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SOME *CIRSIUM* MILL. SPECIES AND HYBRIDS VIA DNA BARCODING

MSC THESIS

NAZLI ÖZKAN

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. TANER ÖZCAN)

BALIKESİR, FEBRUARY - 2021

Taxa belonging to genus *Cirsium* L. from one of the richest family of the plant kingdom Asteraceae (Compositae) family are classified into the three sections in Turkey. *C. macrobotrys* (C.Koch) Boiss. and *C. ciliatum* Moench subsp. *szovitzii* (C.Koch) Petr. belonging to the *Epitrachys* section of the genus *Cirsium* can produce hybrid individuals in their natural distribution areas. In this study, two different regions (ITS and ETS) belonging to the nuclear genome and two different regions of the chloroplast genome (trnL-F and rpl32-trnL) of these taxa and their hybrids were studied; the morphological and molecular similarities and differences of hybrid individuals and their ancestors were discussed and comments have been made on the hybridization mechanism. Among the studied hybrids, the individual coded Cm7 (TD4891) was more closely related to one of the ancestors, *C. macrobotrys*, while another hybrid individual coded Cm4 (BY17228) was more closely related to the other ancestor *C. ciliatum* subsp. *szovitzii*. As can be understood from the data obtained as a result of the study, not all hybrid individuals in the genus resemble the same ancestor. In addition, although the hybridization mechanism within the genus has not been fully resolved yet, molecular data have shown that hybridization is quite common in the formation of hybrid individuals.

KEYWORDS: *Cirsium*, hybridization, DNA sequencing, Turkey.

Science Code / Codes : 20606, 20610

Page Number : 102

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|---|------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| İÇİNDEKİLER | iii |
| ŞEKİL LİSTESİ | v |
| TABLO LİSTESİ | vi |
| KISALTMALAR LİSTESİ | vii |
| ÖNSÖZ | ix |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Asteraceae (Compositae) Familyası ile İlgili Genel Bilgiler | 2 |
| 1.2 <i>Cirsium</i> Mill. Cinsi ile İlgili Genel Bilgiler | 4 |
| 1.2.1 <i>Cirsium</i> Cinsinin Morfolojik Özellikleri..... | 4 |
| 1.2.2 <i>Cirsium</i> Cinsinin Dünya Üzerindeki Yayılışı | 5 |
| 1.2.3 <i>Cirsium</i> Cinsinin Taksonomik Gelişimi..... | 6 |
| 1.2.4 <i>Cirsium</i> Cinsi Üzerine Yapılan Çalışmalar | 7 |
| 1.2.4.1 Morfolojik ve Anatomik Çalışmalar | 7 |
| 1.2.4.2 Kromozom Çalışmaları | 8 |
| 1.2.4.3 Palinolojik Çalışmalar | 10 |
| 1.2.4.4 Moleküler Çalışmalar | 11 |
| 1.2.4.5 Kimyasal Çalışmalar | 12 |
| 1.2.4.6 Etnobotanik Çalışmalar | 13 |
| 1.2.4.7 Sistemik Çalışmalar | 14 |
| 1.3 <i>Epitrachys</i> Seksiyonu..... | 15 |
| 1.4 Moleküler Sistemik | 17 |
| 1.4.1 Sistemikte Kullanılan Belirteçler (Markörler) | 17 |
| 1.4.1.1 Morfolojik Markörler | 17 |
| 1.4.1.2 Biyokimyasal Markörler..... | 18 |
| 1.4.1.3 Moleküler Markörler (DNA Belirteçleri)..... | 19 |
| 1.4.2 Moleküler Filogenide Bitki Genom Kaynakları ve Özellikleri..... | 20 |
| 1.4.2.1 Mitokondrial DNA (mt DNA)..... | 20 |
| 1.4.2.2 Kloroplast DNA (cpDNA) | 21 |
| 1.4.2.2.1 Transfer Ribonükleik Asit Bölgesi (tRNA)..... | 22 |
| 1.4.2.3 Çekirdek Genomu (nrDNA)..... | 23 |
| 1.4.2.3.1 İç Transkribe Olan Boşluk (ITS) Bölgesi..... | 24 |
| 1.4.2.3.2 Dış Transkribe Olan Boşluk (ETS) Bölgesi | 25 |
| 1.4.3 DNA Dizilemesi..... | 26 |
| 1.4.3.1 Maxam ve Gilbert'in DNA Kimyasal Kırılma Yöntemi..... | 27 |
| 1.4.3.2 Sanger-Coulson'un Zincir Sonlanma Yöntemi | 28 |
| 1.4.3.3 Otomatik DNA Dizileme..... | 28 |
| 1.4.4 Dizilerin Hizalanması..... | 29 |
| 1.4.5 Filogenetik Analiz..... | 30 |
| 1.4.5.1 Filogenetik Ağaç | 31 |
| 1.4.5.2 Filogenetik Ağaç Oluşturma Yöntemleri | 31 |

| | |
|--|------------|
| 2. ÇALIŞMANIN AMACI | 33 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM..... | 34 |
| 3.1 Materyal | 34 |
| 3.1.1 Bitki Örneklerinin Toplanması ve Teşhis Edilmesi | 34 |
| 3.1.2 Cam ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması | 35 |
| 3.1.3 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar..... | 35 |
| 3.1.3.1 QIAGEN Kit ile Yapılan DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar..... | 36 |
| 3.1.3.2 PZR İşlemlerinde Kullanılan Kimyasallar | 36 |
| 3.1.3.3 Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Kimyasallar..... | 36 |
| 3.2 Yöntem..... | 37 |
| 3.2.1 Genomik DNA İzolasyonu..... | 37 |
| 3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)..... | 39 |
| 3.2.3 Agaroz Jel Elektrofrezisi | 40 |
| 3.2.4 Dizileme ve Dizi Analizi..... | 41 |
| 3.2.5 Filogenetik Analiz..... | 41 |
| 4. BULGULAR..... | 43 |
| 4.1 Morfolojik Bulgular | 43 |
| 4.1.1 <i>Cirsium ciliatum</i> (Murr.) Moench, Meth. 227 (1802) subsp. <i>szovitzii</i> (C.Koch) Petr. in Trudy Tiflissk. Bot. Sada 12 (1):2 (1912)..... | 43 |
| 4.1.2 <i>Cirsium macrobotrys</i> (C.Koch) Boiss., Fl. Or. 3:532 (1875). | 44 |
| 4.1.3 <i>Cirsium</i> × <i>erzurumicum</i> Yıldız, Arabacı & Dirmenci nothosp. nov..... | 46 |
| 4.2 DNA İzolasyonu | 48 |
| 4.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)..... | 48 |
| 4.4 DNA Dizileme ve Dizi Analizi..... | 49 |
| 4.4.1 Dizilerin İşlenmesi | 49 |
| 4.4.2 Dizilerin Hizalanması..... | 51 |
| 4.4.3 Elde Edilen Diziler | 53 |
| 4.4.3.1 Elde Edilen nrITS Dizileri..... | 54 |
| 4.4.3.2 Elde Edilen nrETS Dizileri..... | 55 |
| 4.4.3.3 Elde Edilen <i>trnL-F</i> Dizileri | 55 |
| 4.4.3.4 Elde Edilen <i>rpl32</i> Dizileri | 58 |
| 4.5 Filogenetik Analiz..... | 59 |
| 4.5.1 ITS Bölgesinden Elde Edilen Filogenetik Ağaçlar | 60 |
| 4.5.1.1 Bootstrap Analizi Sonucunda Elde Edilen Ağaç..... | 60 |
| 4.5.1.2 Neighbour Joining (NJ) Analizi Sonucunda Elde Edilen Ağaç | 61 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 63 |
| 5.1 Morfolojik Bulguların Değerlendirilmesi | 63 |
| 5.2 ITS Bölgesi Dizilerine Dayalı Ağaçların Değerlendirilmesi | 64 |
| 6. KAYNAKLAR | 68 |
| ÖZGEÇMİŞ | 102 |

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Şekil 1.1: Kloroplast DNA'sına ait olan <i>trnT-F</i> bölgesi ve primer bağlanma alanları | 22 |
| Şekil 1.2: ITS bölgesi gösterimi ve primerlerin organizasyonu | 24 |
| Şekil 1.3: Bitkilerdeki rDNA bölgelerinin ve ITS ile ETS bölgelerinin şematik gösterimi | 25 |
| Şekil 1.4: Dış transkribe olan boşluğun (ETS bölgesi) çoğaltılması için sıklıkla kullanılan bazı primerler ve çoğaltma yönleri | 26 |
| Şekil 2.1: Çalışmada kullanılan iki ata ve hibritlerinin genel morfolojik yapıları ve kapitulumları (A- <i>Cirsium ciliatum</i> subsp. <i>szovitzii</i> , B- <i>Cirsium</i> × <i>erzurumicum</i> , C- <i>C. macrobotrys</i>) | 33 |
| Şekil 3.1: <i>C. macrobotrys</i> (mavi alan), <i>C. ciliatum</i> subsp. <i>szovitzii</i> (kırmızı alan) ve <i>Cirsium</i> × <i>erzurumicum</i> (★) bireylerinin Türkiye'deki yayılış haritası..... | 34 |
| Şekil 4.1: PZR işlemlerinde çoğaltılmış bazı örneklerin agaroz jel görüntüsü (nrITS) | 49 |
| Şekil 4.2: BioEdit programında elde edilmiş örnek bir kontig dizisi..... | 50 |
| Şekil 4.3: Sequencher programından elde edilmiş ve heterozigot bölgeleri gösteren bir örnek (BY17228 kodlu örneğin ITS dizileri) | 51 |
| Şekil 4.4: Henüz hizalanmamış ITS dizileri..... | 52 |
| Şekil 4.5: Hizalanmış fakat kesilmemiş ITS dizileri..... | 52 |
| Şekil 4.6: ITS verilerine göre elde edilmiş maksimum parsimoni ağacı | 61 |
| Şekil 4.7: ITS verilerine göre elde edilmiş Neighbour Joining (NJ) ağacı | 62 |

TABLO LİSTESİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Tablo 1.1: <i>Cirsium</i> taksonları ile ilgili yapılmış sistematik değişiklikler..... | 15 |
| Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan taksonlar ve lokaliteleri | 35 |
| Tablo 3.2: PZR reaksiyonunda kullanılan çözeltiler | 36 |
| Tablo 3.3: PZR’de kullanılan primerler ile ilgili bilgiler | 39 |
| Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan PZR programı ve süreleri (SHAW07 protokolü) | 40 |
| Tablo 4.1: Bu çalışmada DNA izolasyonu esnasında kullanılan bitki örnekleri ve kodları..... | 48 |
| Tablo 4.2: ITS verilerine göre farklılık gösteren nükleotid dizileri..... | 54 |
| Tablo 4.3: ETS verilerine göre farklılık gösteren nükleotid dizileri..... | 55 |
| Tablo 5.1: <i>Cirsium macrobotrys</i> ve <i>C. ciliatum</i> subsp. <i>szovitzii</i> atasal taksonları ve hibritlerinin morfolojik karşılaştırılması..... | 64 |



KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|-------------------|--|
| °C | : Santigrat |
| µM | : Mikromolar |
| 2n | : Diploit kromozom sayısı |
| ABD | : Amerika Birleşik Devletleri |
| AP1 | : Activator protein 1 |
| atpB | : ATPaz beta geni |
| Bç | : Baz çifti |
| c(ca) | : Circa, circiter, yaklaşık olarak |
| cm | : Santimetre |
| cpDNA | : Kloroplast DNA'sı |
| ddNTP | : Dideoksiribo Nükleozit Trifosfat |
| dH ₂ O | : Saf su |
| dk | : Dakika |
| DNA | : Deoksiribo Nükleik Asit |
| dNTP | : Deoksiribo Nükleozit Trifosfat |
| E | : Boylam |
| End. | : Endemik |
| EtBr | : Etidyum Bromid |
| ETS | : Dış transkripsiyon Boşluğu |
| FASTA | : Nükleotid veya peptid sekansların diziminde kullanılan |
| ft. | : Feet |
| g | : Gram |
| gDNA | : Genomik DNA |
| IGS | : Genler Arası Boşluk |
| ITS | : İç Trankripsiyon Boşluğu |
| kb | : Kilo baz |
| km | : Kilometre |
| m | : Metre |
| M | : Molar |
| matK | : Maturase K |
| mg | : Miligram |
| ML | : Maximum Likelihood (Maksimum Olasılık) |
| mL | : Mililitre |
| mM | : Milimolar |
| mm | : Milimetre |
| MP | : Maximum Parsimony (Maksimum Tutarlılık) |
| mtDNA | : Mitokondri DNA'sı |
| n | : Haploid kromozom sayısı |
| N | : Enlem |
| NADH | : Nikotinamid Adenin Dinükleotit |
| NCBI | : National Center of Biotechnology Information |
| ndhF | : Kloroplast NADH dehidrogenaz F geni |
| NJ | : Neighbour Joining (NJ- Komşu Birleştirme Metodu) |
| nmol | : Nanomol |
| nrDNA | : Çekirdek DNA'sı |

| | |
|-----------------------|---|
| OH⁻ | : Hidroksit |
| P/E | : Polar eksenin ekvatorial eksene oranı |
| PAUP* | : Phylogenetic Analysis Using Parsimony |
| PHYLIP | : PHYLogeny Inference Package |
| pmol | : Pikomol |
| PCR (PZR) | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| rbcl | : Ribulose-Bisphosphate Carboxylase Gene |
| rDNA | : Ribozomal DNA |
| RFLP | : Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi |
| RNaseA | : Sığır pankreatik ribonükleaz |
| rpl32 | : Ribozomal Protein L32 |
| rpl16 | : 60S ribosomal protein L16 |
| rpm | : Dakikadaki Devir Sayısı (devir/dakika) |
| rps16 | : 40S ribozomal protein S16 |
| S | : Svadberg katsayısı |
| ssp. (subsp.) | : Alt tür |
| Taq DNA | : Thermus aquaticus bakterisinden elde edilen DNA polimeraz |
| TBE | : Tris-Borik asit- EDTA |
| tRNA | : Transfer RNA |
| trnL-F | : tRNA Leusin-tRNA Phenilalanine |
| UV | : Ultra- viyole |
| µl | : Mikrolitre |

ÖNSÖZ

Bir öğretmen olarak “Benim manevi mirasım ilim ve akıldır” diyen Başöğretmen Ulu Önder Gazi Mustafa Kemal Atatürk’ün manevi mirasçısı olmam yolunda ilk başta bana alfabeyi, okuma yazmayı öğreten biricik ilkokul öğretmenim Hıdır Yıldırım’a,

Bu tez çalışmasının konu belirlenmesinden bitimine kadar olan süreçte gerekli materyallerin sağlanması konusunda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, akademik kimliğinin yanı sıra öğretmenliğini ve kişiliğini her zaman takdir ettiğim, lisans eğitimim boyunca yüksek lisans yapma isteğimin ve ilgi alanlarımın şekillenmesinde etkisi büyük olan Prof. Dr. Tuncay DİRMENCİ’ye,

Daha lisans döneminde Eğitim Fakültesi’nde yken dahi meraklarımızı gidermek adına ben ve diğer sınıf arkadaşlarımın hiçbir ricasını geri çevirmeyen, ilgim ve merakımdan dolayı bana bu dönemlerde Moleküler Biyoloji ve Genetik’te kullanılan bazı teknikleri öğretmek yüksek lisans yapma fikrimin ve alan tercihimin netleşmesini sağlayan, bu süreç başladıktan sonra da tez deneylerimi gerçekleştirmem için her türlü laboratuvar imkanını, malzeme teminini sağlayan, benden bilgi ve birikimlerini esirgemeyen, yeri geldiğinde kişisel sorunlarımla dahi ilgilenen danışman hocam Dr.Öğr.Üyesi Taner Özcan ve çok değerli ailesine,

Yüksek lisans ders aşamasında benimle değerli bilgilerini paylaşan kıymetli bölüm başkanımız Prof. Dr. Feray KÖÇKAR’a,

Yolumuzun bir şekilde kesişmesinden, örnek kişiliğinden ve eşsiz bilgi paylaşımlarından dolayı kendisini tanımaktan çok onur duyduğum yeri geldiğinde aile gibi hissettiren Prof. Dr. Serap DOĞAN’a,

Gerek lisans gerek lisansüstü eğitimimde bana fikirleri ve duruşlarıyla örnek olan birbirinden değerli bütün hocalarıma,

En çokta dünyaya gözlerimi açtığım andan beri şartsız koşulsuz her anımda yanımda olan, bana sevgiyi, saygıyı, merhameti, özveriyi öğreten, her işi hakkıyla yapmayı öğütleyen, hayatımın her anında desteklerini hissettiğim gibi bu zorlu tez sürecinde de desteklerini benden esirgemeyen, her zaman üstüme titreyen, güç ve mutluluk kaynaklarım, biricik Aileme,

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürü borç bilirim.

Balıkesir, 2021

Nazlı ÖZKAN

1. GİRİŞ

Cirsium Mill. Cinsi, bitkiler aleminin en zengin familyası olan Asteraceae (Compositae) familyasının *Centaurea* L. ve *Hieracium* L. cinslerinden sonra üçüncü büyük cinsidir [1]. Cins, Türkiye Florası'nda 23 taksonu endemik olan 71 takson (57 tür), 2 hibrit tür ve 7 şüpheli kayıt ile temsil edilmektedir. *Cirsium* cinsine ait türler *Cirsium*, *Epitrachys* DC. ve *Cephalonoplos* (Neck.) DC. olmak üzere üç seksiyon altında toplanmıştır [2-4]. Son revizyon çalışmaları sonucunda ülkemizde yayılış gösteren *Cirsium* cinsine ait tür sayısı 68, takson sayısı ise 80'e ulaşmıştır. Bu 80 taksonun 50 türü (52 takson) *Epitrachys* seksiyonuna, 17 türü (27 takson ve 2 hibrit) *Cirsium* seksiyonuna ve 1 tür de (1 takson) *Cephalonoplos* seksiyonuna ait olup, 80 taksonun 33 tanesi (% 41) Türkiye'ye endemiktir [4-9].

Cirsium cinsi üyeleri ile ilgili yapılmış birçok morfolojik, sitotaksonomik, moleküler ve karyolojik çalışma mevcuttur [2,6,8,9-24]. Buna rağmen, *Cirsium* cinsinin sınıflandırılmasında taksonomik açıdan bazı problemler bulunmaktadır. *Cirsium* cinsine ait türlerin büyük çoğunluğunun dikenli olması, bu bitkilerin arazi gezileri esnasında yeterince toplanamamasına ve sonrasında dikkatli bir şekilde incelenememesine neden olmaktadır. Ayrıca bitkilerin benzer dönemlerde veya yıllarda toplanmamış olması, çevresel değişimlerden etkilenerek fizyolojik ihtiyaçlarının değişebilmesi de morfolojik karakterlerin doğru şekilde kullanılabilmesini yetersiz hale getirmektedir. Bu yüzden bazı türlerin betimlemelerinde eksikler bulunmaktadır. Bunların yanı sıra morfolojik olarak çok yakın gruplar moleküler çalışmalarda farklılık gösterebilmektedir [6-8,10-13,16]. Bu nedenlerden dolayı bu cinsin sınıflandırılmasında son yıllarda morfolojik karakterler ile moleküler karakterler beraber kullanılmaya başlanmıştır [25].

Sistematikte son yıllarda filogenetik yaklaşımlar hızla yaygınlaşmaktadır. DNA dizilerinin ve filogenetik analiz yöntemlerinin kullanılmasıyla bu yaklaşım sistematığe katkı sağlamaya başlamıştır [16]. Fakat bütün canlı gruplarında olduğu gibi bitkilerde de henüz kesin sonuçlar verip güvenle kullanılacak standart bir DNA dizisi mevcut olmayıp, daha çok taksonomik gruplara özel DNA dizileri (belirteç) tespit edilmiş ya da birden fazla belirteci kombine edip kullanmak gerekmiştir [26-49]. Çekirdek genomuna ait ribozomal DNA'nın (nrDNA) ITS bölgesi (ITS1 + ITS2 + 5.8S geni) en çok çeşitlilik gösteren ve bitkilerle yapılan filogenetik çalışmalarda da önemli ve kullanışlı olan bir bölgedir [50-51].

Asteraceae familyası için ITS bölgelerinin kullanışlılığı Baldwin tarafından kanıtlanmıştır [52-53]. Ayrıca çekirdek genomuna ait dizilerin ve bilhassa ITS dizilerinin organel DNA dizilerine göre (kloroplast ve mitokondri), cinse ait olan türler üzerinde veya yakın akraba olan cinsler arasındaki filogenetik ilişkiyi araştırmada kullanılmasının daha iyi sonuç verdiği çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir [50,52,54-56]. Ek olarak, ETS dizileri de bazı Asteraceae cinsleriyle ilgili önemli filogenetik çalışmalarda kullanılmış ve filogenetik açıdan bilgi verici sonuçlara ulaşılmıştır [25,51,54-63].

Bu çalışmanın amacı *Cirsium* cinsinin *Epitrachys* seksiyonuna ait iki atasal taksonun ve bunların meydana getirdiği hibrit bireylerin çekirdek DNA'sı (nrDNA) üzerinde bulunan iç transkripsiyon boşluğu (ITS) ve dış transkripsiyon boşluğu (ETS) ile kloroplast DNA'sı (cpDNA) üzerinde bulunan genler arası boşluk (*trnL-F*) ve ribozomal protein (*rpl32*) bölgelerini PCR ile çoğaltıp, baz polimorfizmlerine bakarak taksonlar arasındaki akrabalık derecelerini belirlemek ve morfolojik veriler ile karşılaştırma yaparak taksonomik problemlerin çözümüne katkıda bulunmaktır.

1.1 Asteraceae (Compositae) Familyası ile İlgili Genel Bilgiler

Asteraceae (Compositae) familyası; bu çalışmanın da konusunu oluşturan *Cirsium* cinsini içeren, aynı zamanda çiçekli bitkiler arasında tür sayısı en fazla olan familyadır. Dünyada 1620 cins ve 25040 tür [64], ülkemizde ise 152 cins altında, 1230 tür, 133 alttür ve 75 varyete olmak üzere toplam 1438 takson ile temsil edilmektedir [65]. Asteraceae familyasının gen merkezinin, Bremer tarafından 1993 yılında yapılan kladistik çalışmalara göre Güney Amerika ve Pasifik olduğu ileri sürülmüştür [66].

Familyanın büyük bölümünü, ılıman bölgelerde yayılış gösteren otsu formlar meydana getirir. Familya üyeleri Antartika bölgesi hariç, yeryüzünün hemen hemen her yerinde yayılış göstermektedir [67-68]. Bu familyaya ait bazı taksonlar Orta ve Güneybatı Asya, Meksika, Güneydoğu Brezilya, Güney Afrika, Avustralya gibi değişik bölgelerde geniş oranlarda yayılış gösterirken bazı taksonlar ise çok nadir alanlarda yayılış göstermektedirler [69-70].

Asteraceae Türkiye'de 447 endemik tür bulundurmakla birlikte, % 37 endemizm oranı ile en çok endemik türe sahip olan familyadır [2,5,71]. Asteraceae familyası *Asteroideae*, *Barnadesioideae*, *Carduoideae*, *Cichorioideae* ve *Mutisioideae* olmak üzere 5 alt

familyadan oluşmaktadır ve *Carduoideae* alt familyasının ise *Gochnatieae*, *Hecastocleideae* *Tarchonantheae*, *Dicomeae*, *Pertyeae* ve *Cynareae* olmak üzere 6 tribusu bulunmaktadır. *Cirsium* cinsinin de dahil olduğu *Cynareae* tribusu ise 5 alt tribusa ayrılmış olup 73 cins ve 2360 türden oluşmaktadır. *Cirsium* cinsi bu tribusun *Carduinae* alt tribusunun bir üyesidir [70]. *Cynareae* tribusu çok sayıda üyesi bulunan ve iyi bilinen cinsleri barındırmaktadır. Bu cinslerden *Cousinia* Cass. dünyada 662, *Centaurea* L. 400, *Saussurea* DC. yaklaşık 300, *Cirsium* 250-300, *Centaurea* L. 400, ve *Carduus* L. 90 takson ile temsil edilmektedir [72-77].

Ülkemizde *Cynareae* tribusu 36 cins ile temsil edilmekte ve *Centaurea* cinsi tribus içinde 215 takson (%61,6'sı Türkiye için endemik) ile en fazla takson bulunduran cins olup *Cirsium* cinsi ise 80 takson ile ikinci sırada gelmektedir. Bu tribusta yukarıda da adı geçen cinslerden *Cousinia* ülkemizde 37, *Carduus* 29 ve *Saussurea* ise 1 takson ile temsil edilmektedir [2,4,78].

Asteraceae'nin morfolojik betiminden bahsedecek olursak, bu familya üyeleri, bir, iki veya çok yıllık, otsu, çalimsı, tırmanıcı veya nadiren ağaçsı formdaki bitkilerden oluşur. Dokularında her ne kadar çoğu cinste lateks (sütsü akışkan sıvı) kanalları mevcut ve karakteristik olsa da bazılarında bulunmamaktadır. Yapraklar almaşlı veya karşılıklı; nadiren stipullu (kulakçık), yaprak ayası bazen basit ve parçalanmamış ama sıklıkla loblu veya dişli şeklinde parçalanmıştır. Çiçek sayısı genellikle fazla, nadiren tek ve çiçekler sapsızdır. Çiçek durumu kapitulumdur -ki bu familyanın en karakteristik yapısıdır- ve kapitulumun etrafı tek veya çok sıralı involukrum ile örtülmüştür. Kapitulumlar zaman zaman psödosefalum adı verilen ikinci bir kapitulumla benzer baş şekline sahip olabilmektedir. Çiçekler ışımsal ya da tek simetridir. Çiçek tablası çıplak, üzerinde palealar (dilsiz çıkıntılar) mevcut ya da uzun tüylüdür. Çiçekler epigin (alt durumlu ovaryum), hermafrodit, dişi, erkek ya da verimsizdir. Çiçeğin dış halkası olan kaliks ovaryumun ucunda pappus şeklinde indirgenmiş, pappus tüy, kıl ya da diken halini almış veya bazen tamamen ortadan kalkmıştır. Korolla, birleşik, tüpsü, tüysü, dilsiz, nadiren iki dudaklı, genellikle 3-5 dişli veya bazen mevcut değildir. Erkek organlar (stamenler) 4-5, epipetal (stamenleri petal veya korollaya bağlı olan erkek organlar topluluğu) yapıda, filamentler genellikle serbest, anterler lateral olarak stilus çevresinde silindir halinde birleşmiş (singenezis), nadiren serbest ve iç yüzeylerden açılan yapıdadır. Dişi organlar (pistiller) bir tane, ovaryum alt durumlu, tek lokulus mevcut, iki karpelli, bazal (tabansal)

yapıda anatrop ovül tek, plasentalanma bazal; boyuncuk genellikle iki parçalı, bazen tüylüdür. Meyva alt durumlu, iki karpelli bir pistilden meydana gelir (aken=sipsela) ve ucunda genellikle bir pappus veya kaliks kalıntısı taşır [79].

Asteraceae familyası ekonomik yönden de dünyada ve ülkemizde önemli yeri olan bir familyadır. Bu familya, gıda olarak tüketilen bitkileri; *Lactuca* L. (Marul), *Cynara* L. (Enginar), yağ hammadde kaynaklarını; *Helianthus annuus* L. (Ay çiçeği), kauçuk hammadde kaynaklarını; *Taraxacum bicorne* Dahlst. (Karahindiba), tıbbi ve ilaç bitkilerini; *Artemisia* L. (Pelin otu), *Anthemis* L. (Papatya), *Achillea millefolium* L. (Civanperçemi), *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Gümüşdüğme) ve *Arnica montana* L. (Arnika), süs bitkilerini; *Aster* L. (Yıldız patı), sukulentleri; *Kleinia* Mill., yabancı otları; *Cirsium* Mill. (Devedikeni-Köygöçüren), *Sonchus* L. (Eşekgevreği) ve zehirli bitkileri; *Senecio* L. (Kanaryaotu) içerir [80-82].

12 *Cirsium* Mill. Cinsi ile İlgili Genel Bilgiler

1.2.1 *Cirsium* Cinsinin Morfolojik Özellikleri

Cirsium (devedikeni) cinsindeki bazı türlerin, *Cnicus* (Topdiken), *Carduus* (Eşekdikeni) gibi diğer cinslerin bazı türlerinden kolayca ayırt edilemeyen benzer özellikler göstermesi nedeni ile *Cirsium* kompleks ve zor bir cins olarak bilinmektedir. *Cynareae* tribusunda bazı cinslerin sınıflandırılmasında taksonomik sorunlar görülmektedir. Bu tribustaki cinslerden biri olan *Cirsium*; yaprak şekilleri, kapitulum yapısı, ve gövdelerinin dikenli oluşu gibi bazı morfolojik özellikleriyle, aynı tribusta bulunan *Onopordum* L. (Kangal) ve özellikle de *Carduus* ile aynı alanda yayılış gösteren populasyonlarda yakın benzerlikler göstermektedir [73-74].

Cirsium türleri çok yıllık, iki yıllık, nadiren tek yıllık otsu bitkiler olup nadiren iki evcikli; gövde kısmı dikenli-kanatlı veya dikensiz, dallanmış veya dallanmamıştır. Yapraklar geniş rozet şeklinde, almaşlı dizilişli, üst yüzeyi kıl şeklinde tüylü ve küçük dikenli, kenarları dikenli, yaprak ayasının kenarları tam veya tüysü derin parçalı (pinnatisekt). Kapitulumda çiçekler aynı anda olgunlaşır, tablamsı yapıda, tek veya çok sayıda. Fillariler (brakte) çok sıralı, kiremit şeklinde dizilmiş, üst kısımlarda yatık veya bazen dik, uç kısmın hemen altında salgı cebi var veya yok, genellikle uçta bir iğne, kenarları düz-küçük dikenli veya çıkıntılı. Çiçek tablası uzun tüylü. Çiçekler tüp şeklinde, çoğunlukla iki nadiren tek eşeyli, genellikle eşit olmayan 5 parçalı, beyazdan morumsu-kırmızımsı bazen de sarımsıya kadar;

korolla tüpünün tabanı hafifçe geniŐlemiŐ yapıda. Pappus çok sıralı, kuŐ tüyü gibi yumuŐak, tabanda bir halka üzerinde bağlı, kalıcı veya d Ő c , i  taraftaki tüyler daha uzun, çoğunlukla p r zli veya tepede kalınlaŐmıŐ; çok nadiren tamamen p r zli. Polen yapıları iki kutuplu, ekvatorial ve küreseldir. Akenler az çok dikdörtgenimsi, yassı, pürüzsüz, çıplak, az çok yarık remsi t mse ekli, ov l  plesantaya bağlayan uzantının ovule birleŐtiėi yer (hilum) oval, tabandan az yukarda [4,12,15,83-84].

1.2.2 *Cirsium* Cinsinin Dünya  zerindeki Yayılışı

Cirsium cinsine ait tek yıllık dikenli türler Kuzey yarımküre ve subtropikal bölgelerde yayılış göstermekte olup bunların çoğunluğu Avrasya'da yayılış göstermektedir. Avrupa, Kuzey Afrika, Sibirya, Asya'nın güneybatısı, Afrika'nın doğu ve batısı ile Amerika'da sıklıkla çok yıllık veya iki yıllık türler yayılış gösterirken, tek yıllık türlere ender rastlanır. Avrupa'nın güneybatısı, Kafkas dağları, Asya'nın güneyi,  in'in güneybatısı, Japonya, Kuzey Amerika'nın batısı *Cirsium* cinsi için tür çeşitliliğinin en fazla olduğu alanlardır [73, 85-87].

Cinsin türleri deniz seviyesinden Alpler'e ve Kanada'nın kuzey bölgelerinden Orta Amerika'nın tropiklerine kadar yayılış gösterir. Cinsin  yeleri genellikle ormanlık alanlar, otlak alanlar,  ayır, bozkır, mera, kumlu bölgeler, yol kenarları, hendekler, g l, dere, nehir,  l gibi pek çok habitatta yetiŐir. Nemli toprakları seven bir cinistir. Türkiye'de ise bu cinsin üyelerinin özellikle Doğu ve Kuzeydoğu Anadolu'da dağılım göstermiŐ olduğu görülmektedir ve cinsin ana merkezinin Trabzon ve Artvin arasında olduğu düşünülmektedir. Bu alan Türkiye'nin ana endemik merkezlerinden biridir [4,70,85,87-91].

Cirsium cinsi dünya genelinde yaklaşık 250 tür ile temsil edilirken Türkiye'de günümüzde 68 tür (33'  endemik olan 80 takson) ve 2 hibrit takson ile temsil edilmektedir. 50 tür, 52 takson *Epitrachys* DC. seksiyonuna, 17 tür, 27 takson ve 2 hibrit *Cirsium* seksiyonuna ve 1 tür de *Cephalonoplos* (Neck.) DC. seksiyonuna aittir [5,7,8,92]. Bununla birlikte, Rusya Florasında (USSR) 7 seksiyon ve 16 alt seksiyon altında olmak üzere 111 tür [85], Avrupa Florasında 3 seksiyon altında 60 tür [86], İnan Florasında 5 seksiyon ve 7 alt seksiyon altında olmak üzere 36 tür [87], Kuzey Amerika florasında 62 tür [88], Suriye, Filistin ve Sina Florasında 14 tür [93],  in Florasında 46 tür [94], Tayvan florasında 12 tür [95],

Japonya Florasında 55 tür [96] bulunmaktadır. Görüldüğü üzere yayılış gösteren tür sayısı açısından ülkemiz oldukça zengin bir yapıya sahiptir.

1.2.3 *Cirsium* Cinsinin Taksonomik Gelişimi

Cirsium cinsi ile ilgili ilk çalışmaların Linnaeus öncesi yazarlardan, Tournefort, Bauhin ve onların çağdaşı olan yazarlar tarafından yapıldığı anlaşılmaktadır [97-98]. Cinsin otörü bazı eserlerde Adanson [87], bazılarında ise Miller [4, 85] olarak verilmektedir. Cinsin otörü ile ilgili literatür bilgilerine göre:

Linnaeus (1753) “Species Plantarum” adlı eserinde dikenli bitkileri *Carduus* ve *Cirsium*, *Sonchus* ve *Centaurea* olmak üzere 4 genel gruba ayırmıştır. Başlangıçta bu dikenli bitkilerin çoğunluğu *Cirsium* cinsine dahil edilmiş, sonraları birçok *Cirsium* türü *Cnicus* cinsi içinde işlenmiştir [99-100].

Miller 1754 yılında yayınlanan “The Gardens Dictionary” adlı eserinde *Cirsium* ismini kullanmış ve cinsin 13 türünü polinomial adları ile listeleterek ilk kapsamlı bilgileri vermiş olup, cinsin türleri için genel vejetasyon dönemleri ile Avrupa’daki yayılışından da kısaca bahsetmiştir [101].

Adanson ise 1763 yılında yayınlanan “Families Des Plantes” adlı eserinde *Cirsium* ismini kullanmış ve cinsin özelliklerini çok kısa vermiş, tür listesi vermemiştir. Ayrıca, bu eserde *Cirsium* isminin ilk kez Tournefort tarafından kullanıldığı anlaşılmaktadır [102].

Cinsle ilgili ilk kapsamlı çalışmalardan biri olan “*Prodromus Systematis Naturalis*” adlı eserinde De Candolle (1838) cinsin 137 türünü 6 seksiyon içerisinde vermiştir. Ayrıca bu çalışmaya göre *Lopholepis* Cass. seksiyonu 4 tür, *Eriolepis* Cass. seksiyonu 38 tür, *Orthocentron* Cass. seksiyonu 6 tür, *Corynotrichum* DC. seksiyonu 3 tür, *Cephalonoplos* (Necker) DC. seksiyonu 5 tür ve *Onotrophe* Cass. seksiyonu 81 türden oluşmaktadır [103]. Türkiye’de yayılış gösteren *Cirsium* cinsi, Boissier (1875, 1888) tarafından “Flora Orientalis” adlı eserde 4 seksiyon (*Epitrachys* DC., *Chameleon* DC., *Lamyra* Cass. ve *Breea* Less.) altında işlemiş ve 74 tür tanımlanmıştır [104-105].

Sommier and Levier (1895) ise Türkiye türlerinin de yer aldığı “*Cirsium del Caucaso*” adlı eserinde seksiyonlarını belirtmeden 53 türü betimleriyle birlikte vermiştir [106].

Petrak (1917) tarafından Kuzey Amerika *Cirsium* türleri üzerine yapılan kapsamlı bir çalışmada ise *Eucirsium* alt cinsi altında 6 seksiyon, 17 alt seksiyon ve 84 tür verilmiştir [107]. Yeni Dünya *Cirsium* türleriyle ilgili kapsamlı bir çalışmaya 62 tür ile Kuzey Amerika Florası'nda yer verilmiştir [88].

Petrak (1979) İran Florası'nda 5 seksiyon, 7 alt seksiyon, 4 seride 36 türe yer vermiştir [87].

Charadze (1963), Flora USSR'de yer alan 112 türü 7 seksiyon, 21 alt seksiyon ve 22 seriye ayırmıştır [85].

Werner (1976) Avrupa Florası'nda 60 türü 3 seksiyon altında vermiştir [86].

Türkiye Florası'nda ise son revizyon çalışmaları sonucunda *Cirsium* cinsine ait tür sayısı 68, takson sayısı ise 80 olarak verilmiştir. 80 taksonun 50 türü (52 takson) *Epitrachys* seksiyonuna, 17 türü (27 takson ve 2 hibrit) *Cirsium* seksiyonuna ve 1 tür de (1 takson) *Cephalonoplos* seksiyonuna ait olup, bu taksonlardan 33 tanesi (% 41) Türkiye'ye endemiktir [4-9].

1.2.4 *Cirsium* Cinsi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Daha eski tarihlere uzanan morfolojik verilere dayalı taksonomik problemlerin çözülmesi çalışmaları artık günümüzde çok farklı karakterlerin kullanılması ile desteklenmektedir. Bitki türleri ile yapılan kimyasal, sitolojik, anatomik, embriyolojik, palinolojik, fizyolojik, moleküler vb. karakterlere dayalı çalışmalar, bu türlerin sınıflandırılmasında ve özelliklerinin daha doğru şekilde ifade edilmesinde ve ayrıca cins içi veya dışı filogenetik akrabalıkların ortaya koyulmasında günümüz taksonomisinde sıklıkla kullanılmaktadır. *Cirsium* cinsi ile ilgili yapılan bazı önemli çalışmalar şu şekilde özetlenebilir:

1.2.4.1 Morfolojik ve Anatomik Çalışmalar

Morfolojik çalışmalar Asteraceae familyasına ait üyelerde, taksonların arazi gözlemlerinde kolayca ayırt edilebilmelerini sağlamaktadır. Bilhassa Asteraceae familyasına ait meyve tipi olan akenlerin morfolojisi ve anatomisi sistematik anlamda oldukça bilgi vericidir ve türler arasındaki akrabalık ilişkilerini ortaya koyabilmek için yaygın şekilde

kullanılmaktadır [108-122]. Elde edilen karakter sayısı ne kadar fazla olursa elde edilen bulgular da o derece bilgi vericidir.

Cirsium cinsinin *Cirsium* seksiyonundan Türkiye’de yayılış gösteren 15 türün (21 takson) aken morfoloji ve mikromorfolojileri incelenip analiz edilmiştir. Bu çalışmada 59 morfolojik ve mikromorfolojik karakter incelenmiştir. Aken yüzeylerinin özellikleri ilk kez ortaya çıkarılmış ve ayrıca aken özelliklerinin, türlerin morfolojik benzerliklerine katkıları da tartışılmıştır [12]. Yine *Cirsium* seksiyonuna ait 14 türün (21 takson) aken morfolojisi çalışılmış ve aken yüzey özellikleri 7 ana başlığa ayrılmıştır [123].

Bu çalışmada kullanılan taksonların da ait olduğu *Epitrachys* seksiyonundan 17 türün aken morfolojileri, mikromorfolojileri ve anatomik yapıları detaylı şekilde çalışılmış ve elde edilen UPGMA dendrogramları ile de türler arasındaki ilişkiler tartışılmıştır [124]. Bir başka çalışmada ise yine *Epitrachys* seksiyonuna ait 15 türün aken morfolojisi ve anatomisi araştırılmış olup aken yüzey yapıları ile perikarp ve testa anatomisinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu üç özelliğin türlerin ayırt edilmesindeki önemi tartışılmıştır [125].

Asteraceae üyeleri ile alakalı anatomik çalışmalar çok sayıda olmayıp bilhassa kök ve rizom anatomisinin önemli olduğu, 59 tür çalışılarak gösterilmiştir [126]. Bir diğer çalışmada, Kuzeydoğu Anadolu’da yayılış gösteren 26 taksonun yaprak anatomileri karşılaştırılmış ve türlerin ayırt edilmesinde anatomik karakterlerin ne denli önemli olduğu tartışılmıştır [127]. Bir başka çalışmada ise Artvin’de yayılış gösteren *Cirsium caucasicum* (Adams) Petrak, *C. kosmelii* (Adams) Fisch. ex Hohen., *C. rigidum* DC ve *C. pseudopersonata* Boiss. & Bal. subsp. *kusnezowianum* (Somm. & Lev.) Petrak taksonlarının kök anatomileri karşılaştırılmış ve önemli bulgular elde edilmiştir [128]. İran’da yayılış gösteren 17 *Cirsium* türünün kullanıldığı bir diğer çalışmada ise türler 33 anatomik karakter (18’ i yaprağa ve 15’ i köke ait) açısından incelenmiştir [20].

1.2.4.2 Kromozom Çalışmaları

Cirsium cinsi üzerinde yapılan kromozom çalışmaları cinsin hibritleşmesi ile ilgili önemli bilgiler sunmakta olup bu çalışmalardan bazılarını şöyle sıralayabiliriz: Yapılan bir çalışmada Orta Amerika (Meksika) ve Batı Hindistan’da yayılış gösteren *Cirsium* türlerinin revizyon çalışmasında kromozomal veriler elde edilmiştir. Bu çalışmaya göre

Amerika kıtasına ait *Cirsium* türlerinin haploid kromozom sayıları $n = 9$ 'dan $n = 17$ 'ye kadar değişiklik göstermektedir. Bu kromozom sayılarının neden değişiklik gösterdiğine dair bir bilgi verilmemiştir. Ayrıca bazı türlere ait kromozom sayılarında bir veya daha fazla ekstra kromozomların bulunması, bu cinsin türleşme mekanizmasını daha da karmaşıklaştırır. Meksika'da yayılış gösteren *C. ehrenbergii* Sch.Bip. ve *C. ochrocentrum* A.Gray türleri, bu şekilde ekstra kromozom sayılarına sahip olarak sunulmuştur. Bu iki türün kök uçlarından elde edilen kromozom sayıları ise $2n = 38$ olarak rapor edilmiştir. Morfolojik verilere ek olarak kromozom bilgisinin de sunulması *Cirsium* cinsinin taksonomisine fayda sağlamaktadır. [128-129].

Yapılan pek çok çalışmada *Cirsium* cinsi içinde en çok görülen kromozom sayısı $2n = 34$ olarak tespit edilmiştir. Bu da çalışmalarda kullanılan türlerin %69'una tekabül etmektedir. Tetraploid yapıya sahip türlerin %10'unda kromozom sayıları $2n = 68$ şeklindedir. Daha az olmakla beraber $2n = 30$ ve 32 kromozom sayısına sahip türler de belirlenmiştir. Çok daha nadir de olsa $2n = 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 52$ ve 102 kromozom sayısına sahip türler de bulunmaktadır [20-21,24,86,130-144]. Ayrıca Hindistan, Slovakya ve İran'da yayılış gösteren bazı *Cirsium* türlerinde de kromozom sayısı $2n = 34$ olarak raporlanmıştır [145-147].

Türkiye'de yayılış gösteren 12 takson ile yapılan bir kromozom çalışmasında *Cirsium* cinsine ait 6 taksonun (*C. pseudopersonata* Boiss & Bal. subsp. *pseudopersonata*, *C. simplex* subsp. *armenum* (DC.) Petrak, *C. munitum* (Bieb.) Fischer, *C. macrobotrys* (C.Koch) Boiss., *C. sommieri* Petrak ve *C. trachylepis* Boiss.) kromozom sayıları $2n = 34$ olarak ilk kez bilime kazandırılmıştır [20]. Kuzeydoğu Anadolu *Cirsium* türleriyle yapılan başka bir çalışmada 11 takson ve 1 hibritin kromozom sayıları bilime ilk kez kazandırılmış olup, 1 taksonda yeni poliploidi seviyesi belirlenmiştir [21].

Bir diğer çalışmada *Cirsium* cinsinin *Epitrachys* seksiyonuna ait olan *C. sintenisii*, *C. boluense*, *C. baytopae*, *C. poluninii* ve *C. ellenbergii* türlerinin kromozom sayıları ilk kez raporlanmıştır. Ayrıca 5 türün daha detaylı karyotip analizi yapılmış ve kromozom sayıları $2n = 32, 34, 36, 60$ ve 68 olarak tespit edilmiştir [132].

Genel olarak Türkiye'de doğal yayılış gösteren *Cirsium* türleriyle ilgili yapılan çalışmalarda, bu cinse ait kromozom sayıları $2n = 32, 34, 60$ ve 68 olarak raporlanmıştır

[20-21,132]. Bu elde edilen kromozom sayısı verileri, cinsin kromozom sayısının üç temel haploid sayı üzerine ($x = 12, 17$ ve 18) oturduğunu göstermekte ve cinsin türleri arasında kromozom sayılarının anöploidi ve poliploidi şeklinde farklılaşmış olabileceğini akla getirmektedir [148].

1.2.4.3 Palinolojik Çalışmalar

Polen morfolojisi bilhassa son yıllarda cinslere ait üyelerin sınıflandırılmasında ve filogenetik ilişkilerinin açığa çıkarılmasında oldukça fazla başvurulan bir alandır [149-153].

Asteraceae familyası “euopalynos” yapıda palinolojik özelliklere sahip bir familyadır. İlk olarak Wodehouse tarafından palinolojik olarak incelenmiştir [154]. Polenler genellikle trikolporat, kolpuslar geniş ve belirgindir. Polenler genellikle oblat-sferoidal-prolat polen şekline sahiptir. Asteraceae familyasının polen morfolojisi ile ilgili yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır [80,149,155-157] .

Ülkemizde *Cirsium* cinsi ile ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen palinolojik bulgulara göre *Cirsium* cinsine ait farklı polen tipleri ve alt tipleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *Cirsium* cinsinin elektron mikroskobu verilerine göre polenleri isopolar, trizonokolporat; P/E oranı 0.77-1.56 arasındadır. Polen şeklinin suboblattan prolata kadar çeşitlilik gösterdiği tespit edilmiştir [148].

Epitrachys seksiyonunda yer alan *Cirsium sivasicum* Yıldız, Arabacı & Dirmenci ve *C. peshmenianum* Yıldız, Dirmenci & Arabacı türleri ve bunlara yakın akraba bazı taksonlar ile aralarındaki farklılıklar polen morfolojilerine bakılarak değerlendirilmiş, türler polen tiplerine göre 3 kategoriye ayrılmıştır [16]. Bir diğer çalışmada *C. baytopae* P.H.Davis & Parris ve *C. bulgaricum* DC morfolojik ve palinojik olarak detaylı olarak incelenmiş ve farklılıklarına değinilmiştir [158]. 2016 yılında yayımlanan bir çalışmada Hakkari’den *C. semzinanicum* Fırat adında yeni bir tür tanımlanmış ve türün *C. karduchorum* Petrak ile morfolojik ve palinolojik karakterler açısından benzerlik ve farklılıkları tartışılmıştır. Bu çalışmada, tektum ve kolpus özellikleri iki türün ayırt edilmesinde yardımcı karakterler olarak kullanılmıştır [92]. Bir başka çalışmada Kuzey Doğu Anadolu’da yayılış gösteren 3 *Cirsium* taksonunun polen morfolojileri ilk kez detaylı olarak çalışılmıştır [14].

Bir başka çalışmada, *Cirsium* cinsine ait olan; İran'da yayılış gösteren *Cirsium*, *Cephalonoplos*, *Echenais*, *Epitrachys* ve *Pseudoepitrachys* seksiyonlarındaki 23 adet türün polen morfolojileri ilk kez analiz edilmiş ve çalışmalar sırasında ışık mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. Çalışma sonucuna göre polen tanelerinin radyal simetrik, izopalar, trizonokolporat yapıda ve ekzin yapılarının ekinat olduğu, polen şeklinin ekvatorial ekseninde suboblattan oblat-sferoidale kadar, polar ekseninde circularardan triangularda kadar çeşitlilik gösterdiği belirtilmiştir [159].

1.2.4.4 Moleküler Çalışmalar

Cins ve türler arası sınıflandırmalarda veya hibritlerin belirlenmesinde genom büyüklüğü karşılaştırmaları önemli faydalar sağlamaktadır [160-162]. Bitkilerin iklimsel değişiklikler ve farklı coğrafik bölgelerdeki dağılımları durumunda DNA miktarındaki farklılıklar flow sitometri analizleriyle ortaya çıkarılmış, yakın ilişkili türlerin uzak ilişkili türlere göre genom büyüklüklerinde daha az varyasyon görülmüştür [163]. Bu da yakın türlerin genetik açıdan da benzer olması durumunu açıklar niteliktedir.

Cirsium cinsinin bazı hibritlerinde gerçekleştirilen flow sitometrik analizler sonucu hibrit genomlarının DNA miktarlarının iki ebeveyn arasında bir yerde yer aldığı görülmüş, aynı zamanda tek yıllık türlerle çok yıllık türlerin involukrum, kapitulum uzunluğu ve iğne yapıları ile genom büyüklükleri arasındaki ilişki incelenmiştir [130].

Cirsium ve *Carduus* cinsleri bazı moleküler filogenetik çalışmalara göre monofiletik cinslerdir. Bunun yanında *Carduus* cinsi, kabuklu (pul pul) veya sakallı pappus ve genellikle kanatlı gövde görüntüsüyle, tüysü pappuslu ve daha az dallanmış gövdeli *Cirsium*'dan ayrılır [25,60,75,87,164-165]. Kelch ve Baldwin tarafından yapılan moleküler filogenetik çalışmalar, *Cirsium* cinsinin çeşitliliğinin Avrasya'dan gelen tek bir başlangıç girişine dayanan hızlı evrimsel farklılaşmanın bir sonucu olduğunu göstermektedir. *Cirsium* cinsinin Kuzey Amerika'da rDNA gelişimi oldukça korunmuştur ya da hızlı bir ekolojik radyasyona maruz kalmıştır. Kuzey Amerika *Cirsium* türleri arasındaki ilişkiler karmaşık olduğundan moleküler çalışmalar bu türlerin filogeni taslağını sağlamak amacıyla başlatılmıştır [25,60,78,88,90,166].

1.2.4.5 Kimyasal Çalışmalar

Cirsium cinsi çeşitli toplumlarda halk arasında sıklıkla kullanılmaktadır. Ülkemizde de bazı türlerinin yenilebilir nitelikte olması ve bağışıklığı destekleyici özelliklerinin olması, kimyasal içeriği hakkında çeşitli araştırmacılarda merak uyandırmıştır. Cins ile ilgili yapılan bazı kimyasal çalışmalar şu şekilde özetlenebilir:

Cirsium cinsi türlerinin kimyasal analiz çalışmaları sonucunda flavonoid, asetilen, poliasetilen, sterol, triterpenler, alkaloidler, alkinler, hidrokarbonlar, seskuiterpen laktonları, fenolik asit ve lignin bileşimlerini içerdiği görülmüş, bu bileşimler arasında en yoğun flavonoidlerin bulunduğu belirtilmiştir [15,167-175]. Ayrıca *Cirsium* türlerinin kersetin, vanilik asit, *p*-hidroksi benzoik asit ve kumarik asit içerdiği de bildirilmiştir [176-180].

Cirsium türlerinin özütlerinde yüksek oranda bulunan mikro elementler (Fe, Zn, Mn, Cu, Co, B), metanol özü, total fenol içeriği ile etil asetat özü antioksidan aktive edicidir. Kolesterol dengesini düzenlemede sterol ve triterpenlerin ve iştah kesici etki göstermede alkinlerin önemli bir rolü vardır. Cinsin tüm türlerinde bulunan Linanın ve Pektolinanın'ın iltihaplara karşı önleyici anti-inflamatuvar etkisi bulunmaktadır. Öte yandan diosmetin, vicenin-2, skullerin ve rutin ise anti-mikrobiyal etkisi bulunan çok önemli kimyasallardır. Yazın maksimum seviyede oksin ve gibberellin hormonu ile birlikte Indol bileşimlerinden; Indolasetikasit, Indolaldehit, Indolkarboksilikasit, Indolasetonitril ve triptofan belirli oranlarda *Cirsium* köklerindeki büyümeyi teşvik edici ve büyümeyi engelleyici hormonlar ve kimyasallardır.

Cirsium türlerinin genelinde büyümeyi teşvik edici gibberellin hormonu 5 farklı varyetede (gibberellin A3, A7, A1, A4 ve gibberellin A8) kategorize edilmiştir. Kışın en yüksek seviyede büyümeyi engelleyici olarak etkili hormon ise ABA (Absisik asit)'dir [181-190]. Çeşitli ülkelerde yayılış gösteren farklı *Cirsium* üyeleri ile ilgili yapılan çalışmalarda da hispidulin 7-neohesperidozid [191], luteolin 5-O-b-D-glukopiranozid ve aglycone luteolin flavonoid [192], isokempferid 7-O-d-(6-methylglukuronid) [193] yeni elde edilen bazı flavonoidlerdendir. Türkiye'de yayılış gösteren bazı *Cirsium* türleri ile ilgili kimyasal çalışmalar da yapılmıştır ve bilhassa çeşitli flavonoidlerin zenginliğinden bahsedilmiştir [83,194].

1.2.4.6 Etnobotanik Çalışmalar

“*Cirsium*” ismi Türkçe “şişmiş damar” anlamına gelen Yunanca kökenli “Cirsos” kelimesinden türetilmiştir [85,195]. *Cirsium* türlerinin varis iyileştirici olarak kullanıldığı birçok bilimsel araştırmada belirtilmiştir [196]. Halk arasında “köy göçerten, kangal diken, eşek diken, çarık kesen, hamur kesen, su diken, kazan kulpu, körkenger” olarak bilinen *Cirsium* türlerinin bazıları yiyecek veya çay olarak tüketilebilmektedir [197-199].

Anadolu’da bu türlerin çiçekleri peptik ülsere ilaç olarak, gövde kısmı ise öksürük ve bronşit tedavisinde kullanılır. *Cirsium italicum* Mill. tohumlarının anal fissür tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. [200-203]. *Cirsium arvense* (L.) Scop. (Köy göçüren = Köy göçerten) türünün çiçekli dal kısımları ve kökleri kuvvet verici ve istah açıcı olup tohumları anne sütünü ve safra salgılarını artırır. Yaprakları verem ve çeşitli solunum hastalıklarına karşı tedavi edicidir, aynı zamanda homeostatik denge bozukluğuna neden olan bağırsak hastalıkları için şifalı bir bitkidir. Çiçekli kısımları çiğ tüketilerek diyabet tedavisinde (kan şekerini düşürücü) olarak kullanıldığı gibi; kök ve çiçeklerinden hazırlanan çay, kalp hastalıkları ve damar tıkanıklığı tedavisinde kullanılmaktadır [15,200-205].

Yapılan bazı çalışmalarda ise Türkiye’ye endemik *C. yildizanium* Arabacı & Dirmenci bitkisinin bazı çözeltilerinin asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz inhibitörleri içeriğinden dolayı alzheimer, myastenia gravis, demans, ataksi ve parkinson gibi asetilkolin seviyesinin azalması ile ilişkilendirilen hastalıklara, tirozinaz inhibitörleri içeriğinden dolayı ise hiperpigmentasyona karşı kullanılabileceği saptanmıştır [19,206]. İlaç sanayinde ağız yaralarını iyileştirici ve çocuklar için kurt döktürücü ilaç yapımında kullanılmaktadır. Geleneksel tıpta kullanılan başlıca devedikeni türleri: Tarla devedikeni, köygöçüren devedikeni, beyaz devedikeni, sivri devedikeni, yünlü devedikeni, sapsız devedikeni ve bataklık devedikenidir. *C. vulgare* (Savi) Ten. (boğa devedikeni) bitkisinin köklerinin kaynatılmasıyla elde edilen lapa; ağız yaralarında, tüm bitkinin sıcak infüzyonu romatizmal eklem tedavisinde bitkisel buhar olarak ve yine tüm bitkinin kaynatılması, kanayan bağırsak tedavisinde internal ve eksternal olarak kullanılmaktadır [207]. Taze yapraklarının kaynatılması ile elde edilen şurup; soğuk algınlığı önleyici ve ateş düşürücü olarak, çiçeği; egzama, sarılık, kaşıntı ve sivilcelere kullanılır [15]. *Cirsium arvense*, *C. vulgare* ve *C. palustre* (L.) Scop. şifalı bitkiler olmalarına rağmen, saldırgan özellikleri nedeniyle tarım alanları için zararlı, hatta tek yıllık bitkiler üzerinde öldürücü

etki gösteren, tahıl tarlalarında verimi düşürücü etkiler teşkil eden, çiftçiler için büyük problem yaratan çok yıllık tarla yabancı otlarıdır. Dünya çapında yayılış gösterdiği tarım alanlarında; mahsul geliri bakımından %15- %20'lik ürün kaybına sebep olurken; bu oran ülkemizde %24-%30'dur [208-210]. Bazı *Cirsium* türlerinin gövdedeki dal ve yaprakları da hayvancılıkta yem olarak kullanılır [211]. Yapraklardaki yüksek protein içeriği ve kökteki nişastanın inülin zenginliği, sindirimi kolaylaştırıcı etkiye sahiptir. Yakıt olarak kullanıldığı gibi endüstride kumaş boya yapımında ve iç kabuğundan elde edilen lifler kağıt yapımında kullanılır [212]. Kurutulmuş çiçekleri, bitki sütlerini katılaştırmak için bir mayadır [213]. Devedikenlerinin tüm türlerinin çekirdeklerinden sıkma yoluyla iyi yağ üretilir [214-215]. Türlerin diğer bir özelliği de bal üretimi için kullanılan en iyi bitkiler arasında yer almalarıdır. Bazı *Cirsium* türlerinden elde edilen bileşiklerin farelerde mevcut kulak ödemini inhibe ettiği bir çalışmada bildirilmiştir [216-218].

Farklı ülkelerde bazı *Cirsium* türleri halk arasında karaciğer ve böbrek iltihaplanması, karın ve bağırsak ağrısı gibi hastalıkların tedavisinde [172,192,219-220], antiinflamatuvar etkilerinden dolayı ise geleneksel tıpta kullanılmaktadır [193,221]. Bazı türlerinin taze yaprak ve gövdesi kalsiyum, protein ve A vitamini açısından zengindir ve yenilebilmektedir. Ayrıca, kanamayı durdurma, idrarda kan görülmesi, kan kusma ve hipertansiyon gibi hastalıkların tedavisinde kullanılır [170,215,222-236]. Farklı türleri osteoartrit, kıkırdak kaybı ve menapoz dönemindeki kadınlarda kemik kaybına karşı önleyici olarak kullanılabilir [237-241]. Bazı türleri halk arasında akciğer, rahim ve kan kanseri tedavisinde kullanımının yanı sıra iyi huylu prostatın gelişimi ile ilgili olarak idrarda kan görülmesinin tedavisinde kullanılan düşük toksisite ve yan etkili dekoksionun bileşimine girer. Aynı zamanda akut sinüzit tedavisinde hazırlanan bitki karışımlarının dekoksionunda kullanılan bitkilerdendir [242-244]. Ayrıca ağız kokusu gidermede de kullanılan türleri bulunmaktadır [245]. Bazı türlerinin kökleri yenilir, turşu olarak tüketilir, salamurası yapılır ve etli yemeklerde kullanılır [232,246-247].

1.2.4.7 Sistematik Çalışmalar

Türkiye'de yayılış gösteren bazı *Cirsium* türleri üzerine yapılan çalışmalar, son zamanlarda çok sayıda yeni türün ülkemizin florasına kazandırılmasını sağlamış ve bununla birlikte bazı taksonların sistematikteki yerleri değiştirilmiş olup bu değişiklikler Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1: *Cirsium* taksonları ile ilgili yapılmış sistematik değişiklikler

| SİNONİMİ OLANLAR | | KAYNAK |
|--|-------------------------------------|--------|
| <i>Cirsium eliasianum</i> | <i>Cirsium frickii</i> | [7] |
| <i>Cirsium polycephalum</i> | <i>Cirsium byzantinum</i> | [248] |
| YENİDEN DÜZENLENENLER | | |
| <i>Cirsium alatum</i> subsp. <i>alatum</i> | <i>Cirsium elodes</i> | [7] |
| <i>Cirsium elodes</i> | <i>Cirsium subinerme</i> | [7] |
| <i>Cirsium munitum</i> | <i>Cirsium pugnax</i> | [248] |
| <i>Cirsium alatum</i> subsp. | <i>Cirsium pseudocreticum</i> | [248] |
| <i>Cirsium congestum</i> | <i>Cirsium sorocephalum</i> subsp. | [248] |
| <i>Cirsium candelabrum</i> | Türkiye florası için yeni bir kayıt | [249] |
| <i>Cirsium laniflorum</i> | Türkiye’de yayılış göstermemektedir | [148] |
| YENİ TÜRLER | | |
| TÜR ADI | SEKSİYON | |
| <i>Cirsium ekimianum</i> | <i>Epitrachys</i> | [13] |
| <i>Cirsium handaniae</i> | <i>Epitrachys</i> | [11] |
| <i>Cirsium sivasicum</i> | <i>Epitrachys</i> | [16] |
| <i>Cirsium peshmenianum</i> | <i>Epitrachys</i> | [16] |
| <i>Cirsium yildizianum</i> | <i>Epitrachys</i> | [10] |
| <i>Cirsium balikesirensense</i> | <i>Epitrachys</i> | [6] |
| <i>Cirsium nerimaniae</i> | <i>Epitrachys</i> | [6] |
| <i>Cirsium semzinanicum</i> | <i>Epitrachys</i> | [92] |
| <i>Cirsium bozkirensis</i> | <i>Epitrachys</i> | [8] |
| <i>Cirsium ayasii</i> | <i>Epitrachys</i> | [250] |
| HİBRİTLER | | |
| TÜR ADI | SEKSİYON | |
| <i>Cirsium</i> × <i>erzincanicum</i> | <i>Epitrachys</i> | [9] |
| <i>Cirsium</i> × <i>kelkitensis</i> | <i>Epitrachys</i> | [9] |
| <i>Cirsium</i> × <i>nezaketiae</i> | <i>Epitrachys</i> | [9] |
| <i>Cirsium</i> × <i>prativagum</i> | <i>Cirsium</i> | [7] |
| <i>Cirsium</i> × <i>woronowii</i> | <i>Cirsium</i> | [7] |

13 *Epitrachys* Seksiyonu

Cirsium cinsinin üç seksiyonundan biri olan *Epitrachys* seksiyonu; yapraklarının üst yüzeylerinin setalı ya da dikencikli, nadiren tüyler tarafından gizlenmiş olmasıyla diğer seksiyonlardan ayrılmaktadır. Ülkemizde az bilinen ve endemik türlerin sık bulunduğu bu seksiyonda bazı örnekler farklı türler arasında geçiş oluşturduğundan sistematik anlamda çeşitli problemler ortaya koymaktadır [4,12,84,166].

Epitrachys seksiyonunun sistematikteki yeri ise şu şekildedir [12,69-70].

Alem: Bitkiler

Alt alem: Tracheobionta

Şube: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Alt sınıf: Asteridae

Üst takım: Asterales

Takım: Asterales

Aile: Asteraceae

Alt aile: Carduoideae

Tribus: Cynareae

Alt tribus: Carduinae

Cins: *Cirsium*

Seksiyon: *Epitrachys*

Son yapılan çalışmalara göre, *Epitrachys* seksiyonu 50 türden (52 taksondan) oluşmaktadır [2,4-5,9]. Ülkemizde yayılış gösteren *Epitrachys* seksiyonuna ait türler aşağıda verilmiştir:

Cirsium adjaricum Sommier & Levier, *C. aduncum* Fisch. & C.A.Mey ex DC., *C. aggregatum* Ledeb, *C. amani* Post (**End.**), *C. aristatum* DC., *C. aytachii* H. Duman & R.R. Mill (**End.**), *C. balikesirense* Yıldız, Arabacı & Dirmenci (**End.**), *C. baytopae* P.H.Davis & Parris (**End.**), *C. boluense* P.H.Davis & Parris (**End.**), *C. bozkirensis* H. Duman, Dirmenci & Tugay (**End.**), *C. bracteosum* DC., *C. bulgaricum* DC., *C. byzantinum* Steud. (**End.**), *C. cassium* P.H.Davis & Parris (**End.**), *C. caucasicum* Petr., *C. cephalotes* Boiss., *C. ciliatum* (Murray) Moench, *C. davisianum* Kit Tan & Sorger (**End.**), *C. dirmilense* R.M.Burton (**End.**), *C. ekimianum* Yıldız & Dirmenci (**End.**), *C. ellenbergii* Bornm. (**End.**), *C. eriophorum* (L.) Scop., *C. hakkaricum* P.H. Davis & Parris (**End.**), *C. handaniae* Yıldız, Dirmenci & Arabacı (**End.**), *C. haussknechtii* Boiss., *C. italicum* (Savi) DC., *C. karduchorum* Petr., *C. kosmelii* (Adams) Fisch. ex Hohen., *C. leucocephalum* (Willd.) Spreng., *C. leuconeurum* Boiss. & Heldr. (**End.**), *C. ligulare* Boiss., *C. macrobotrys* (C.Koch) Boiss., *C. nerimaniae* Yıldız, Dirmenci & Arabacı (**End.**), *C. osseticum* (Adams) Petr., *C. vulgare* (Savi) Ten., *C. peshmenianum* Yıldız, Dirmenci & Arabacı (**End.**), *C. poluninii* P.H.Davis & Parris (**End.**), *C. pseudobracteosum* P.H.Davis & Parris (**End.**), *C. pugnax* Sommier & Levier, *C. rigidum* DC., *C. semzinanicum* Fırat (**End.**), *C. sintenisii* Freyn (**End.**), *C. sipyleum* O. Schwarz (**End.**), *C. sivasicum* Yıldız, Arabacı & Dirmenci (**End.**), *C. sommieri* Petr., *C. sorocephalum* Fisch. & C.A.Mey. ex DC. subsp. *congestum* (Fisch. & C.A.Mey. ex DC.) Yıldız, Dirmenci & Arabacı, *C.*

steirolepis Petr. (**End.**), *C. tomentosum* C.A.Mey., *C. trachylepis* Boiss., *C. yıldızianum* Arabacı & Dirmenci (**End.**).

14 Moleküler Sistematik

Moleküler filogeni, organizmalar ve genler arasındaki evrimsel süreci DNA ve protein dizilerinin benzerliklerini karşılaştırarak inceler [251-256]. Moleküler filogenetiğin yaygın kullanım alanlarından biri de son yıllarda hızla gelişmekte olan bitki moleküler sistematığıdır. Bitki grupları arasındaki evrimsel ilişkilerin belirlenmesinde morfolojik karakterlerin yetersiz olduğu, indirgenmiş veya körelmiş olduğu zamanlarda dizi analizleri güvenilir ve faydalı olmaktadır [256-260].

Bitki moleküler sistematığı çalışmalarında kloroplast (plastit), mitokondri DNA'sı veya çok tekrarlı nükleer ribozomal DNA (nrDNA) yaygın olarak kullanılan gen bölgeleridir. Bu üç ayrı genom arasından çekirdek genomu (nrDNA) bölgeleri en hızlı değişimi göstermektedir. Nükleer ribosomal DNA'ların çok sayıda tekrarlayan birimleri içermesi, kodlanan ve kodlanmayan bölgeler arasındaki farklı mutasyon oranlarının (kodlanmayan ara bölgelerde daha yüksek) çeşitli taksonomik seviyelerde sonuç alınmasını sağlaması sebebiyle tercih sebebidir [53,259,261-262].

1.4.1 Sistematikte Kullanılan Belirteçler (Markörler)

Sistematikte kullanılan başlıca belirteçler; morfolojik belirteçler, biyokimyasal belirteçler ve DNA belirteçleri olmak üzere 3 tiptir.

1.4.1.1 Morfolojik Markörler

Bitki grupları arasındaki akrabalık ilişkilerini belirlemede, tür, çeşit ve tip tanımlamada kullanılan geleneksel markörlerdir [263].

Morfolojik karakterler, canlıların sınıflandırılmasında kullanılan, tek genle kontrol edilebilen, baskın veya çekinik özellikte, gözle görülür, nitel özelliklerdir. Sistematikte kullanılan başlıca morfolojik karakterler; bitkinin hayat formu, kök, gövde, yaprak, çiçek ve meyve tipi, çiçek ve tüy durumları gibi dış görünüşle alakalı fenotipik özelliklerdir [264]. Bu markörlerin en büyük avantajı analizlerinin kolay olması, araç gereç, ekstra bir ön hazırlık gerektirmemesidir. Fakat morfolojik markörlerin bu avantajlarının yanında

bitkinin yaşından, ekolojik koşullardan etkilenmeleri, sayılarının sınırlı olması, bir çoğunun mutasyonlar sonucu oluşması, alel sayılarının nispeten az olması, fenolojik durumların markör kaynaklarına erişimini zorlaştırabilmesi (örneğin; bitkinin betimi için yaprak ve meyvenin bir arada bulunması gerekirken, meyveli dönemde bitkinin yaprakları kurumuş ise bu durum yanlış teşhislere neden olabilir) gibi olumsuz özelliklerden dolayı kullanımları kısıtlıdır. Morfolojik özelliklerin değişkenlik gösterebilen durumlarla ilişkisi nedeniyle, sistematikte yalnız başına kullanılmaları net sonuçlar vermeyip bazı yanlışlıklara sebep olabilir. Bu nedenle morfolojik belirteçler mutlaka diğer belirteçlerle desteklenmelidir [265-269].

1.4.1.2 Biyokimyasal Markörler

Biyokimyasal markörler, doğal populasyonlarda genetik değişkenliğin anlaşılması, farklı bitki çeşitlerinin tanımlanması, gen akışı, tür sınırlarının tespiti, gen işleyişinin belirlenmesi, bitki ıslahı gibi çalışmalarda kullanılan, morfolojik markörlere göre çok daha fazla polimorfik bölgeye sahip, aynı zamanda çevresel faktörlerden etkilenmedikleri için daha hızlı ve kesin sonuç veren belirteçlerdir. Protein markörleri, sistematikte genetik analizler için geliştirilen ikinci genetik markör grubunu oluşturmaktadır olup, aynı zamanda ilk biyokimyasal markörlerdir. İzoenzimler, tohum kabuğu proteinleri, yapraklarda bulunan kimyasallar, ikincil metabolitler, vs. biyokimyasal markörler sınıfına girer. Fakat en yaygın kullanılanları, izoenzimler ve depo proteinleridir (gliadin ve glutenin gibi). Tohum depo proteinlerinin elektroforetik profilleri her tür için özel ve doğrudan doğruya genotipe bağlı olduğundan, taksonomik ve evrimsel problemlerin çözümünde kullanılmaktadır. Proteinler moleküler yük ve amino asit bileşimi farklılıklardan dolayı, jel elektroforez yöntemi kullanılarak kolaylıkla elde edilebilir ve genetik markör olarak kullanılabilirler. Ancak bu belirteçlerin sayılarının az olması, depo enzim ve proteinlerinin az olması sebepleriyle kullanımları kısıtlıdır [267,270-276].

Sıklıkla kullanılan biyokimyasal markörlerin enzim grubunun bir diğer elemanı da alloenzimlerdir. Alloenzimler aynı gen lokusunun farklı allelleri olarak değerlendirilirken, izoenzimler farklı genler veya bir genin farklı allelleri tarafından kodlanan, aminoasit dizilimleri ve elektroforetik hareketleri farklı fakat aynı aktiviteye sahip alternatifleridir. İzoenzimler, türler arası veya nispeten uzak bitkiler arasındaki varyasyonları çalışmada yararlı olsalar da yakın akraba ilişkilerinin tespiti için uygun değildir. En büyük avantajı kolay, hızlı, tekrarlanabilir ve güvenilir olmalarıdır. Ancak bazı izoenzimlerin belirli

dokulara ve belirli gelişme dönemlerinde bulunması, izoenzim lokus sayısının az olması, translasyon sonrası modifikasyonlara uğramaları, bu belirteçlerin kullanımını sınırlandırmaktadır [267,277-278].

1.4.1.3 Moleküler Markörler (DNA Belirteçleri)

Moleküler markörler, genom içinde bir DNA parçasının eklenmeler, silinmeler, yer değiştirmeler veya duplikasyonlardan kaynaklanan farklılıklarını temsil eden ve bireyler arasındaki DNA dizi farklılıklarını ortaya çıkarmakta kullanılan araçlardır [279]. Moleküler markör, genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçası olarak ifade edilebilir. Bitki sistematğinde tür içi ve türler arası genetik farklılıkların saptanması, filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bu markörler; kaynağını kendi üretildikleri bitki DNA'larından aldıkları için popülasyondaki çeşitlilik ya da o popülasyon içindeki bitki genotipleri arasındaki ilişkilerin tespitinde %100'e yakın güvenirlilikle değerlendirilirler. Ayrıca DNA dizileri arasındaki farklılıklar, türlerin evrimsel uzaklığının tespiti için en güvenilir ölçüt olarak kabul görmektedir.

Sistematikte kullanılan diğer markörlerle karşılaştırıldığında moleküler markörlerin birçok avantajı vardır. Morfolojik belirteçlere göre allel frekansları daha yüksektir, polimorfik lokus sayıları çok daha fazladır, basit kalıtım gösterirler ve karakterleri kontrol eden genlerle doğrudan ilişkileri vardır. Çevresel faktörlerden etkilenmezler, genetik değişiklikleri daha çok yansıttıkları için daha az pleiotrofikler (bir genin birden fazla karakteri kontrol etmesi). Çekirdek ve kloroplast, mitokondri gibi maternal kalıtım şekline sahip organel genomları ayrı ayrı çalışılabilir, her bir ebeveynden gelen farklı karakterler tespit edilebildiği için bitkilerin genetik kökeni de tespit edilebilir. Moleküler markörler ile, protein markörlere göre daha fazla polimorfizm elde edilir ve DNA örnekleri daha stabildir. Aynı zamanda moleküler markörler, protein markörlerden farklı olarak genomun sadece anlatım yapan kısımlarını değil, her noktasını temsil ederler [280-288].

Temelde iki farklı moleküler markör bulunmaktadır. Bunlardan birincisi DNA-DNA hibridizasyonuna dayalı teknik olan Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) tekniği, diğeri ise PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) temelli tekniklerdir. PZR temelli teknikler ise başlıca Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Basit Dizi Tekrarları (SSR), Basit Dizi Tekrarları Arası Diziler (ISSR), Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler (SCARs), Tek Zincirli

Konformasyonel Polimorfizm (SSCP), Kesilmiş Çoğaltılmış Polimorfik Diziler (CAPS), Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm (SRAP), İşaretili İfade Edilen Diziler (ESTs), Tek Nükleotid Polimorfizimleri (SNPs), Dizisi Etiketlenmiş Alanlar (STS) olarak sıralanabilmektedir [267,289-290].

Bir DNA belirtecinde aranan özellikler; türleri ayırt edebilecek yeterliliğe sahip, polimorfik, eşbaskın (kodominant), tekrarlanabilir, güvenilir, çevreden ve diğer lokuslardan etkilenmeyen, genom boyunca dağılım gösteren, PZR ve dizileme için uygun, kolay ve hızlı analiz edilebilir, ekonomik ve çok farklı bitki taksonları için kullanılacak standart bir DNA bölgesi olmasıdır [291-292].

1.4.2 Moleküler Filogenide Bitki Genom Kaynakları ve Özellikleri

Günümüzde teknolojinin hızla gelişmesiyle birlikte sistematikçiler, morfolojik benzerlik ve farklılığa dayanan klasik taksomik yöntemlerle tam olarak aydınlatılmayan sistematik problemlerin çözümü için moleküler verileri kullanarak, farklı taksonomik kategorilerde bitkileri yeniden düzenlemek için revizyon çalışmalarına yönelmişlerdir [293-294]. Bitki genom kaynaklarının moleküler filogenide kullanımı biyolojik çeşitliliğin ve türlerin belirlenmesinde standart DNA bölgelerinin kullanılmasına dayalı yeni ve faydalı bir yöntem olarak görülmektedir [269].

Moleküler sistematik çalışmalarda genellikle çok tekrarlı nüklear ribozomal DNA (nr DNA), mitokondri DNA'sı (mtDNA) ve kloroplast DNA'sı (cpDNA) genom veri kaynağı olarak kullanılmaktadır. Mitokondri ve kloroplast (plastit) genomuna göre çekirdek genomunun daha hızlı değişime uğradığı düşünülmektedir [295-298].

1.4.2.1 Mitokondrial DNA (mt DNA)

Mitokondriler, ökaryot hücrelerde metabolik enerjinin üretiminden sorumlu organellerdir. İki katmanlı zarla çevrili mitokondrilerde dıştaki zar düz iken, iç zar oksijenden yararlanma kapasitesini artırabilmek için kıvrımlı yapıdadır. Aynı zamanda iç zar üzerinde oksijenli solunumun olmazsa olmazı olan elektron taşıma sistemi elemanlarını bulundurur. Mitokondriler hücre genomundan ayrı ve farklı olarak kendilerine ait DNA, RNA ve ribozomlar içerirler. Mitokondride bazı bölgeler son derece korunurken bazı bölgeler farklı taksonomik seviyelerin analizine imkân verecek şekilde hızla değişmektedir [299-300].

Bitki mitokondrial DNA'ları yaklaşık %5 oranında solunumda görev alan sitokrom c-oksidad, sitokrom b-c, NADH dehidrogenaz, ATP sentetaz gibi enzimlerin alt birimi olarak görev yapan proteinleri kodlayan bölgelere sahiptirler.

Bir hücrede toplam genetik materyalin %0.3'ünü oluşturan mitokondrial DNA'lar bitkilerde diğer organizmalara göre daha büyük ve çeşitlidir. Öyle ki en küçük kapalı tohumlu mitokondri DNA'sı dahi 200 kb'den daha büyüktür. Ayrıca diğer organizmalardan farklı olarak bitki mitokondri genomlarının nükleotit dizileri çok yavaş değişir, kloroplast DNA'sı dizileri de dahil çok sayıda yabancı DNA dizileri ve kısa serpilmiş tekrar dizileri içerirler [301-303].

1.4.2.2 Kloroplast DNA (cpDNA)

Fotosentezin gerçekleştiği organel olan kloroplastlar; tıpkı mitokondriler gibi iki zarla çevrili olup, yine kendi genetik sistemleri olan organellerdir. Kloroplast genomları, her organelde çok sayıda kopya halinde bulunan halkasal DNA'lardan oluşmaları sebebiyle mitokondri genomuna benzerler fakat mitokondri genomundan farklı olarak daha büyük ve karmaşıklardır. Aynı zamanda kloroplast genomu, mitokondri genomunda da olduğu gibi; prokaryot DNA'larına benzer şekilde çift iplikli olma, halkasal olma, yarı korunumlu (semikonservatif) replike olma ve proteinlerle çevrili olmama gibi birçok özelliğe sahiptir. Kloroplast genomu 100-225 kb arasında olup, yaklaşık 150 gen içermektedir. Kloroplast DNA'sı ile çekirdek DNA'sının genetik sistemi birbirlerinden farklı olmalarına rağmen bitkide fotosentezden sorumlu genler iki ayrı genom tarafından paylaşılmaktadır.

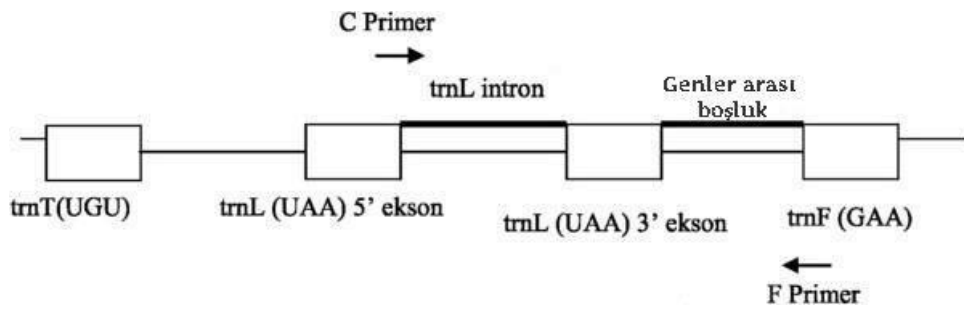
Kloroplastın içerdiği proteinlerden 100 tanesi kendi genomu tarafından, diğerleri ise çekirdek genomu kontrolünde kodlanmaktadır [304-305]. Çok fazla kodlanmayan bölge içermediğinden, kloroplast genomu çekirdek genomuna göre daha yavaş evrimleşir; mutasyon oranları çok daha düşüktür [306-308]. Ayrıca kloroplast DNA'sının izole edilmesi, kodlayıcı genlerinin klonlanması ve dizilemesi, çekirdek genomunkinden daha pratiktir [309].

Kloroplast DNA'sının intronları ve genler arası kesim bölgeleri gibi kodlanmayan kısımları, kodlanan kısımlarına göre değişime daha yatkın oldukları için taksonlar arası filogenetik çalışmalarda daha popülerdir [310-311]. İntron, kodlanan bölge, intergenik bölge olmak üzere kloroplast DNA'sının *atpB*- *rbcL*, *matK*, *ndhF*, *rpl16*, *rps4-trnS*, *rps16*, *trnH-psbA*, *trnL-F*, *trnS-G* gibi bölgeleri moleküler sistematikçiler tarafından çeşitli

taksonomik düzeylerde çalışılmaktadır [312-313]. Bitkilerde kloroplast genomunun yapısal kararlılığı, haploid (n kromozom) olması, genelde uniparental (tek ebeveyn) aktarılması (angiospermlerde genelde maternal), rekombinant olmaması, sahip olduğu boyut, yapı, gen içeriği ve genlerin doğrusal sırası bakımından yüksek derecede korunmuş olması gibi özellikleri, son yıllarda özellikle tür seviyesinde olmakla birlikte yaygın olarak popülasyonlar, cins ve bazen daha yüksek taksonomik kategorilerin filogenetik ve evrimsel analizlerinde tercih sebebidir [314-316].

1.4.2.2.1 Transfer Ribonükleik Asit Bölgesi (tRNA)

Yukarıda bahsedildiği gibi kloroplast DNA'sı üzerinde oldukça kullanışlı ve filogenetik açıdan bilgi verici bölgeler bulunmaktadır. Protein olarak kodlanmayan bölgeler, çok yüksek oranda mutasyona maruz kaldıklarından dolayı evrimsel akrabalıkların analiz edilmesinde verimli bir şekilde kullanılmaktadır. Bu kodlanmayan bölgelerden en çok çalışılanlarından bir tanesi transfer ribonükleik asit bölgesidir (tRNA). Bu bölgeye ait olan *trnT* ve *trnF* aralığı, en çok tercih edilen bölgeler arasında gelmektedir. Bahsi geçen bölge, lösin aminoasidini taşıyacak transfer RNA'yı kodlayan *trnL* (UAA) geni ile yan yana iki genler arası bölgeyi (intergenik bölge-IGS) yani *trnT-L* ve *trnL-F*'yi kapsamaktadır [306,317]. *trnF* geni ise fenilalanin aminoasidini taşıyacak olan RNA'ları kodlamaktadır. Bu iki gen arasındaki kodlanmayan bölgeler ise filogenetik açıdan oldukça bilgi vermektedir (Şekil 1.1) [318-319].



Şekil 1.1: Kloroplast DNA'sına ait olan *trnT-F* bölgesi ve primer bağlanma alanları [320]

Bu bölgenin tercih edilme nedenleri arasında ayrıca şunlar da sayılabilir: *trnL-trnF* bölgesinin, *rbcl* (RubisCO) bölgesine göre evrimleşme hızının yaklaşık olarak 3 kat daha fazla olması, korunmuş *trn* genleri ve kodlanmayan bölgelerin yüzlerce baz çifti içermesi, tek kopya bölgelerindeki mutasyon oranının yüksek olması, genler arası boşluklarının çok

kolay bir şekilde çoğaltılıp dizilenebilmesi, uzunluk olarak çok kısa olmamasından dolayı farklılık gösteren karakter sayısı da oldukça yeterli olmasıdır [284,306,319,321-331].

1.4.2.3 Çekirdek Genomu (nrDNA)

Hücrelerin yaşam faaliyetlerini devam ettirebilmelerini sağlayan çekirdek yapısının ana bileşenlerinden biri de DNA molekülüdür. Bitki hücre çekirdeğinde bulunan DNA (nüklear DNA), ana kalıtım kaynağı olduğundan ve yeni nesillere aktarıldığından, nesiller boyunca süre gelen poliploidi, gen duplikasyonu veya silinmesi, mutasyonlar, genetik sürüklenme gibi nedenlerden kaynaklanan çok büyük bir çeşitliliğe sahiptir. Kromozom sayısı ve yapısındaki değişimler, bitkilerin incelenmesi açısından oldukça önemlidir. Tüm angiospermiler (kapalı tohumlu bitkiler) çok sayıda kromozom içerirler. Diğer bitki türlerinin az sayıda kromozomu olmasına rağmen genomları büyüktür. Bilindiği üzere, genom büyüklüğü çiçekli bitkilerde kromozom büyüklüğü ile ilişkili değildir [332-333].

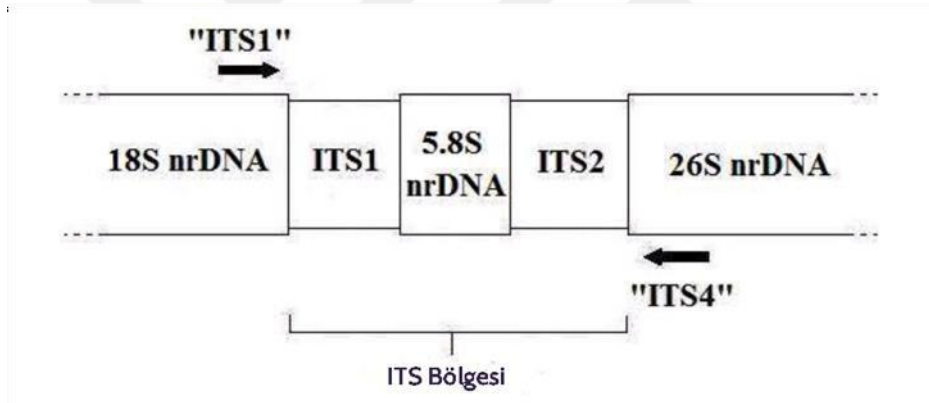
Çoklu genlerden oluşan ve ardışık sıralanmış tekrarlı diziler şeklinde bulunan, rRNA'ları kodlayan çekirdek rDNA genleri, çekirdek genomik DNA'sının NOR (Nükleolar Organizer Region) ismi verilen bölgelerinde yer almaktadır. Tekrarlı her ünite; transkripsiyona uğrayan ve 18S, 5.8S ve 26S rRNA korunmuş genlerini içeren bir bölge ve dış transkribe olan boşluk adı verilen ETS-1 ve ETS-2 ile, transkribe olmayan bölge non-transcribed spacer (NTS) adı verilen bölgelere sahiptir [334-336]. ETS ve NTS bölgeleri birlikte intergenik boşluk (IGS) yani genler arası kodlanmayan boşluklar olarak tanımlanırlar [50].

Çekirdek genomu, tüm canlı hücre formlarında bulunmaktadır ve çok sayıda gen içermesi ve farklılaşmış genlere sahip olmasından dolayı; angiospermelerde filogenetik yapının yeniden oluşturulmasında, türden en üst taksonomik kategorilere kadar filogenetik ilişkilerin tespit edilmesinde ve populasyon düzeyindeki analizlerde oldukça kullanışlıdır. Bilhassa büyük ölçüde korunmuş kodlayıcı bölgeler içeren çekirdek genomu bölgeleri (18S, 26S ve 5.8S rDNA bölgeleri) familya ve üst seviyede problemlerin çözülmesine yardımcı olurken, yakın akraba cinslerin ilişkilerinin ortaya çıkarılmasında ve tür düzeyindeki analizlerde, hızlı bir biçimde evrimleşen ITS ve ETS bölgeleri kullanılmaktadır [337-344].

1.4.2.3.1 İç Transkribe Olan Boşluk (ITS) Bölgesi

İki ITS (iç transkribe olan boşluk) bölgesi (ITS1 ve ITS2), 5.8S, 18S ve 26S nükleer ribozomal RNA (nrDNA) alt birimlerini kodlayan genler arasında bulunan ve protein olarak kodlanmayan kısımlardır [254-255,345-346]. ITS1, 18S (küçük alt birim- SSU) ile 5.8S arasında yer alırken; ITS2 bölgesi, 5.8S ile 26S (büyük alt birim- LSU) genlerini ayırır. ITS-1, ITS-2 ve 5.8S nrDNA bölgeleri hep birlikte, ITS bölgesi olarak adlandırılır ve filogenetik çalışmalarda sıklıkla kullanılır [347].

İç transkribe olan boşluk (ITS), rDNA gen bölgelerine göre daha değişken olup, iki ITS bölgesini de kendi aralarında kıyaslayacak olursak; ITS1 bölgesi, ITS2 bölgesinden daha fazla farklılık göstermektedir. Bu değişkenlik aileye altı seviyelerde, özellikle türler ve alttürler arası ya da tür içi ve populasyonlar arası farklılığın ortaya çıkarılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [251-252,254-255,345-346,348].



Şekil 1.2: ITS bölgesi gösterimi ve primerlerin organizasyonu [349]

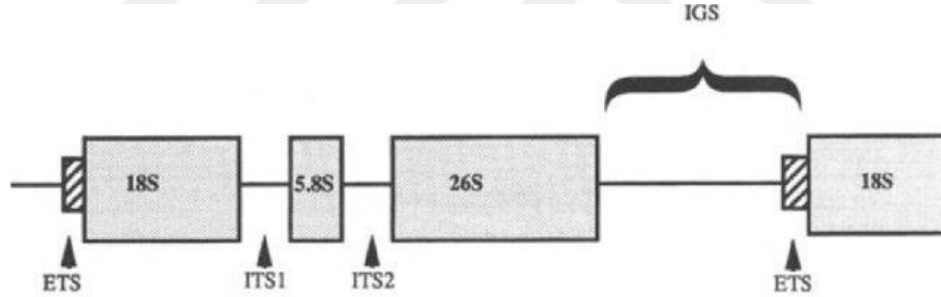
Yapılan araştırmalar sonucunda ITS dizilerinin, cpDNA dizilerinden çok daha fazla değişkenlik gösterdiği ve daha bilgilendirici olduğu anlaşılmıştır. ITS bölgesi ribozomal DNA'nın intergenik boşluk ve dış transkribe olan boşluk bölgelerine kıyasla daha fazla korunmuştur. Özellikle angiospermlerde cins ve tür düzeyinde sınıflandırma çalışmalarında ITS dizi analizi 1990 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır [50,350-351].

ITS bölgesinin filogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmasının nedenlerini şöyle sıralayabiliriz: Yaklaşık 500–900 baz çifti (bç) olan ITS bölgesi evrensel bir primer çifti

kullanılarak PZR ile kolaylıkla çoğaltılabilir. Bu çoğaltma sırasında primerler rRNA alt birimleri içindeki korunmuş bölgelere bağlanır (Şekil 1.2). rDNA birimlerinin ve ITS bölgesinin çok sayıda kopyasının olması; çok kaliteli olmayan, kısa veya seyreklik DNA örneklerine bile primerlerin bağlanma sıklığını artırarak ITS bölgesinin çoğaltılmasını kolaylaştırmak açısından avantaj sağlar. Morfolojik açıdan farklı türler arasında ITS bölgesinin yüksek seviyede değişken olduğu görülmektedir. Ayrıca filogenetik ve sistematik analizler için çok sayıda farklı karakterler sağlayabilir. ITS'in tür içinde benzer olma eğiliminden dolayı türe özgü problemlerin geliştirilmesine ve PZR ile hızlı bir şekilde üretilmesine imkan sağlar [256,258,345-346,352].

1.4.2.3.2 Dış Transkribe Olan Boşluk (ETS) Bölgesi

ITS bölgesi gibi ETS bölgesi de filogenetik çalışmalarda son yıllarda oldukça sık başvurulan bir çekirdek DNA bölgesidir. Dış transkribe boşluk ismi verilen ETS bölgesi, ITS bölgesinin aksine 18S ile 26S rDNA gen bölgelerinin iç kısmında değil 26S ile 18S rDNA gen bölgelerinin dışında kalan bir alandır (Şekil 1.3).

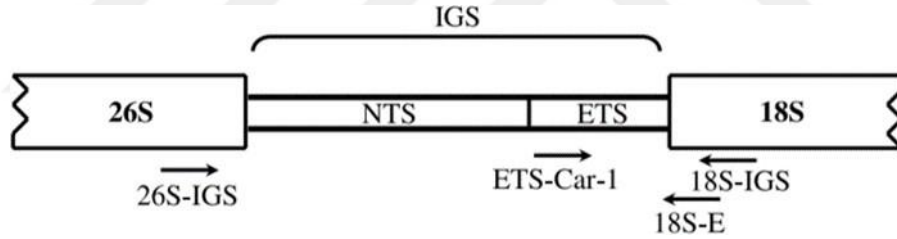


Şekil 1.3: Bitkilerdeki rDNA bölgelerinin ve ITS ile ETS bölgelerinin şematik gösterimi [353]

ETS bölgesi, daha önce bahsedilen genler arası boşluk yani IGS bölgesi ile tekrar eden 18S-5.8S-26S rDNA gen dizilerini birbirinden ayırmaktadır. 5' ETS ve 3' ETS olmak üzere iki ETS parçası bulunmaktadır ve ETS dizileri 18S ve 26S genlerinin sınırlarında bulunmaktadır. Literatürdeki bazı çalışmalarda, ETS bölgesi de ITS bölgesi gibi 1 ve 2 olarak isimlendirilir. 5' ETS bölgesinden ETS1, 3' ETS bölgesinden ise ETS2 olarak bahsedilmekte olup ETS1 bölgesi filogenetik çalışmalarda daha çok tercih edilir ve daha bilgi vericidir (Şekil 1.4). Ayrıca ETS1 bölgesinin baz uzunluğu 425-575 bp aralığında olup [354-357] dizileme işlemi de çok daha kolaydır. ETS bölgesi ITS bölgesine göre daha

kısa olmasına rağmen elde edilen ayırt edici karakter sayısı filogenetik açıdan oldukça yeterlidir. Bu yüzden bu bölge kullanışlıdır.

ETS bölgesi, yeni yeni kullanılmaya başlayan bir bölgedir ve henüz Asteraceae [9,57,60,62], Fabaceae [358] ve Myrtaceae [359] familyasına ait bazı türlerin filogenetik analizlerinde kullanılmıştır. rDNA'ların bitişiklerinde bulunan ETS dizileri ile ITS dizileri karşılaştırıldığında, ETS bölgesinin ITS bölgesine eş bilgiler verdiği hatta daha kullanılabilir olduğu görüşüne varılmıştır. Ayrıca ETS bölgesi yüksek kopya sayısına sahiptir. Yapılan bazı çalışmalarda, ETS bölgesinin ITS bölgesi ile karşılaştırıldığında tür altı seviyelerde filogenetik açıdan daha bilgi verici olduğu ve daha değişken olduğu gösterilmiştir [9,57,352]. Dizi sayısına oranla ITS dizilerine göre daha fazla nükleotit değişikliği gösterdiği de sunulmuştur. ITS bölgesi ile aynı lokusa sahip olması nedeniyle, ITS bölgesi ile beraber güzel sonuçlar vermektedir. Ayrıca, ETS ve ITS veri setlerinin birleştirilerek kullanılmasının ve bu dizilerin daha yüksek karakter ve istatistiksel destekle birlikte oldukça verimli olduğu raporlanmıştır [57,59,63,359-360].



Şekil 1.4: Dış transkribe olan boşluğun (ETS bölgesi) çoğaltılması için sıklıkla kullanılan bazı primerler ve çoğaltma yönleri [60]

1.4.3 DNA Dizilemesi

DNA dizilemesi ya da literatürdeki adıyla sekanslama özetle, bir DNA parçasında bulunan A, C, G, T nükleotid baz dizilim sırasının belirlenmesi olarak tanımlanmaktadır. DNA nükleotid sıralarının belirlenmesi; DNA bölgesinin hangi proteini kodlayabileceğine ilişkin bilgilerin elde edilmesinde, genomik DNA dizisi ile tamamlayıcı DNA'ya ait dizi bilgilerinin karşılaştırılarak ekson ve intronların ortaya çıkarılmasında, gen aktivitesini kontrol eden bölgelerin tanımlanmasında, spesifik DNA dizilerinin belirlenmesi ile evrimsel akrabalık ilişkilerinin tanımlanmasında, gen mutasyonları (nükleotid eksilmesi, nükleotid eklenmesi vb.) tespiti ya da rekombinant DNA oluşum yapılarının tayininde,

preimplantasyon tanısı, kalıtsal hastalık tayininde, gen düzenlenmesinde görevi olan genetik kontrol bölgelerini belirlemede, konsensus dizileri, epistatik genler ve bu genlerin etkilerini belirlemede sıklıkla kullanılmaktadır [361].

Robert Holley [362] tarafından, 1965 yılında bir maya hücresinden izole edilmiş tRNA molekülünün nükleotit sekansı analiz edilmiştir. Daha sonraki yıllarda, daha büyük parçaları daha verimli, hızlı ve doğrudan bunların nükleotid dizilerine yönelik yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır [363]. 1977 yılında hemen hemen aynı zamanlarda Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi [364] ve Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi [365] olmak üzere iki farklı DNA dizileme yöntemi yaygın kullanım alanı bulmuştur. Her iki geleneksel yöntem de DNA'nın hazırlanması, çeşitli reaksiyonlar ve yüksek voltajlı jel elektroforezi olmak üzere 3 aşamadan meydana gelmektedir. İki analiz sırasında da tek iplikçikli DNA parçaları kullanılır ve bu iki metot arasındaki temel fark, DNA parçalarının üretilme şeklidir [363]. Bu iki teknik dışında artık günümüzde daha doğru sonuçlar veren ve çok daha büyük dizilerin elde edilmesini sağlayan yöntemler de bulunmaktadır. Pyrosequencing, nanopore sequencing, gibi hızlı fakat yüksek maliyetli yöntemler kullanılmakla birlikte en çok otomatik DNA dizileme metodu kullanılmaktadır.

1.4.3.1 Maxam ve Gilbert'in DNA Kimyasal Kırılma Yöntemi

“Çok yönlü dizileme” olarak da bilinen Maxam ve Gilbert tarafından geliştirilen kimyasal kırılma yönteminin temel prensibi hidrazin, dimetil sülfat ya da formik asit gibi kimyasallar kullanılarak, DNA'da bulunan nükleotitlerin özgün olarak değiştirilmesine ve daha sonra eklenen piperidinin değişikliğe uğramış nükleotitlerin bulunduğu noktalardan zinciri kırmasına dayanır. İlk olarak, dizisi saptanacak DNA parçası 5' ucundan radyoaktif bir izotop olan ^{32}P (Fosfor) ya da floresan bir boya ile işaretlenir. İşaretleme sonrası DNA molekülleri dört tüpe dağıtılır. Her bir örneğe A, G, C ya da T nükleotitlerden birini tahrip edebilecek yukarıda bahsi geçen kimyasallar eklenir. Sonuçta kırılmanın olduğu pozisyona göre hepsi 5' ucundan işaretli ancak boyları farklı DNA dizi parçacıkları elde edilir. Boyları gittikçe kısalan DNA dizileri, jel elektroforezi ile büyüklüklerine göre ayrılır ve elektroforez sonunda X-ışını duyarlı film ile kaplanarak otoradyograma alınır. Otoradyografik bantlar 5'-3' yönünde en alttan en üste doğru okunduğunda bize 5'-3' yönündeki DNA baz dizilimini verir [363-364,366].

1.4.3.2 Sanger-Coulson'un Zincir Sonlanma Yöntemi

Bu yöntem, günümüzde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Sanger ve Coulson tarafından geliştirilen zincir sonlanma yöntemi aynı zamanda dideoksi ya da zincir sonlanması reaksiyonları olarak da bilinmektedir. Bu yöntem temel olarak DNA'nın kontrollü şekilde bazı enzimatik reaksiyonlarla uzatılması prensibine dayanmaktadır. DNA'nın tek ipliği kalıp DNA olarak kullanılır, ayrıca reaksiyonların gerçekleşebilmesi için dNTP'ler, ddNTPler, DNA polimeraz ve serbest OH grubu içeren primer gereklidir. Sanger-Coulson yönteminde dizisi belirlenecek DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. DNA sentezini sağlamak için Klenow DNA polimeraz enzimi, Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz, sekuenaz gibi enzimlerden biri kullanılabilir. Yöntemin temeli; DNA polimeraz enziminin, dNTP'ler (deoksiribonükleozit trifosfat) yerine deoksiribozun 3' pozisyonunda OH⁻ grubu taşımayan modifiye ddNTP'leri de (dideoksiribonükleozit trifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanır. Normalde DNA'nın 3' OH ucuna bir dNTP bağlanması durumunda uzayacak olan DNA molekülü, serbest bir 3' OH grubu taşımadığı için yapıya yeni nükleotid ilavesini engelleyen ddNTP'nin katılmasıyla uzamayı durdurur. Elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde yanyana yürütülür. DNA parçacıkları uygulanan elektriksel alanın etkisi ile en kısası en önde olmak üzere jel üzerinde bir merdiven görüntüsü oluşturur. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP'nin çeşidine göre okunur. Otoradyogramdaki bu bant verilerinden yararlanılarak 5'-3' yönüne doğru olan baz dizilimi belirlenmiş olur. Sanger yöntemi, tehlikeli kimyasallardan uzak ve daha hızlı bir yöntem olması sebebiyle Maxam-Gilbert yöntemine tercih edilir [363,365].

1.4.3.3 Otomatik DNA Dizileme

Smith ve ark. [367] tarafından geliştirilen otomatik DNA dizi analizi metodunda, Sanger-Coulson'un "zincir sonlanma" yöntemi kullanılır. Sanger-Coulson yönteminden farklı olarak bu yöntemde radyoaktif izotop yerine floresan boyalar kullanılmaktadır. Otomatik dizileme yöntemleri manual yöntemlere göre hem daha güvenilir sonuçlar verir hem de zamandan tasarruf sağlar. Yöntemde dört farklı renkte floresan boya kullanılır. Sonuçta, dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkte (Timin bazı kırmızı, Guanin bazı siyah, Adenin bazı yeşil, Sitozin bazı mavi) piklerin olduğu bir görüntü (kromatogram) ortaya çıkar.

Otomatik DNA dizileme cihazları, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sisteminden meydana gelir. Elektroforetik birimlerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik (tek bir dalga boyuna sahip) bir ışık oluşturulur. DNA' nın bulunduğu jel matrisi bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez boyunca DNA' ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılmaktadır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyundaki ışığı geri yansıtır. Bir dedektör tarafından yansıyan ışık demeti kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar yazılımlarıyla değerlendirilip, sonuçlar grafiksel veya matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. Sağlıklı sonuçların elde edilmesi için çalışılan baz uzunluğunun ortalama 500–800 bp olması tercih edilir [366,368-370].

1.4.4 Dizilerin Hizalanması

DNA, RNA ya da protein dizilerinin düzenlenerek benzer bölgelerinin tespit edilmesi; diziler arasındaki fonksiyonel, yapısal veya evrimsel ilişkiler nedeniyle oluşan benzerlikleri göstermek ve düzenlemek, türlerin karşılaştırılması, gen ailelerinin belirlenmesi ve akrabalık derecelerinin tespit edilmesi amacıyla yapılır. Bir DNA dizi parçası nesilden nesile geçerken değişikliklere (mutasyonlar veya varyasyonlar) uğrayabilmektedir. Hizalama işlemi (alignment), karakterler arasında oluşturulacak işlemlerde homolog diziler arasında var olabilecek bir nükleotidin başka bir nükleotide yer değiştirmesi (süstitüsyon), dizi parçasından bir nükleotidin silinmesi (delesyon) veya dizi parçasına nükleotid eklenmesi (insersiyon) gibi dizi (karakter) değişiklikleri (mutasyonlar), aynı dizi üzerinde farklı kısımlarda bulunan düzenleyici dizilerin varlığı veya yokluğu, değişim oranlarının farklılıkları, dizilerin birbirlerine paralog, ortolog olabilmeleri, homoplasi durumlarının varlığı nedeni ile oldukça önemlidir.

Dizilerin hizalanması ile dizilerin hangi kısımlarının korunmuş ve hangi kısımlarının ortak diziden farklılaşmış olduğu belirlenir. Farklılaşmanın miktarı ile ortak atadan uzaklaşmaya başlama noktasının uzaklığı doğru orantılıdır. Hizalama işlemi için ikili ya da çoklu hizalama programları kullanılır. Çoklu hizalama; ikiden daha fazla dizi içermesiyle ikili hizalamanın bir uzantısı kabul edilir. Çoklu hizalama yöntemleri sorgu grubundaki tüm dizileri hizalamaya çalışır. Çoğu zaman birbiriyle evrimsel ilişkisi olduğu varsayılan bir grup dizideki korunmuş bölgeleri tespit etmek ve filogenetik ağaç oluşturarak evrimsel ilişkiyi ortaya koymak için kullanılır. Çoklu dizi hizalama, ikili dizi hizalamadan çok daha bilgi vericidir. Çoklu dizi hizalamada en çok kullanılan yöntem aşamalı hizalama yöntemi

olup bu yöntemi kullanan yazılımların en yaygını CLUSTAL W yazılımıdır [371]. Bu yazılımla dizilerin ikili benzerlikleri kullanılarak önce tahmini bir filogenetik ağaç oluşturulur, sonrasında ise bu bilgilerin ışığında, aşamalı olarak diziler hizalanır. Bu yöntemin en büyük dezavantajı, problemi doğru şekilde açıklayacak parametrelerin belirlenmesinin zorluğudur [259,304,347,371].

1.4.5 Filogenetik Analiz

Filogenetik, genomik bilgi kullanılarak ve organizmaların evrimsel süreçlerinden yararlanılarak akrabalık ilişkilerinin değerlendirildiği araştırma dalıdır. Amacı çeşitli canlı grupları (örneğin türler veya topluluklar) arasındaki evrimsel ilişkileri (filogeniyi) araştırmaktır. Filogenetik analiz ise, mevcut karakterlerin değişik kriterler kullanılarak değerlendirilmesi sonucu taksonlar arasındaki akrabalık ilişkilerinin ortaya çıkarılmasıyla soy ağaçlarının elde edilmesidir. Çeşitli faktörlerden dolayı zaman içerisinde değişime uğramış ve böylece birbirine yakınlaşmış türlerin akrabalık ilişkileri filogenetik ağaçların çizilmesiyle belirlenir.

Genellikle filogenetik ağaçlar, fosil verilerine ve morfolojik gözlemlere dayandırılarak çizilir. Fakat fosil verilere ulaşmadaki zorluk ve fenotipik özelliklerin belirlenmesinde aynı anda birden fazla genin etkili olması, ağaç oluşturma çalışmalarını moleküler verilerin kullanımına yönlendirmiştir. Moleküler veri olarak DNA ve protein dizilerinin kullanımı daha kesin ilişkilendirmeler yaparak kuvvetli filogenetik ağaçların oluşturulmasını mümkün kılmıştır. Moleküler filogenetik, genlerin ve diğer biyolojik moleküllerin dizilerindeki mutasyonları analiz ederek evrimsel yakınlığı ve bu değişikliklerin hızını ve düzenini saptayarak genlerin ve dolayısıyla organizmaların evrimsel tarihlerini ortaya çıkarmaya çalışır [304,372].

Filogenetik analizlerde öncelikle incelenecek dizi elde edilir. Sonrasında bu diziler istenirse veritabanlarındaki referans dizi adı verilen daha önce belirlenmiş ve doğruluğuna karar verilmiş dizilerle karşılaştırılabilir. Çeşitli türlerden elde edilen nükleik asit dizilerinin ham verileri GenBank NCBI (ABD), The European Molecular Biology Laboratory (EMBL), The DNA Data Bank of Japan (DDBJ) gibi veritabanı sistemlerinde depolanarak kullanıcıların hizmetine sunulmuştur [373-376].

1.4.5.1 Filogenetik Ağaç

Bir canlı grubunun evrimsel tarihinin grafiksel özeti olan filogenetik ağaçlardan, türler arasındaki ilişkilendirmeyi yapmak, zaman içinde değişime uğrayan türlerin ortak atalarını belirlemek için yararlanılır. Filogenetik ağaçlar oluşturulurken; her bir takson çifti arasındaki mesafelerin bir matrisinin oluşturulmasında, dizilerin hizalanması sonucu elde edilen hesaplanmış genetik uzaklık kullanılır [377]. Bu ağaçlar dallanma olaylarının modelini, bazı durumlarda zamanını ve zaman aralığını tanımlar, türleşme sırasını kaydeder, hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını gösterir.

Filogenetik ağaç, dallardan (klad) ve düğümlerden (nod) oluşur. Dallar; türler arasındaki popülasyonun zaman içerisindeki uyumunu gösterirken, düğümler; bir türün iki ya da daha fazla türev popülasyona ayrıldığı noktaya karşılık gelir. Filogenetik ağaçlar köklü (rooted) ya da köksüz (unrooted) olabilir. Köklü ağaçlar; incelenen soy hattının nereden köklendiğini tanımlamaları sebebiyle ayrılma olaylarının açığa çıkma sırasını da ortaya koyarlar. Bu ağacı oluşturan her bir çizgi dal (hat) olarak isimlendirilir. Her bir dalın ucu, günümüzde var olan türü ya da geni ifade etmektedir. Ağaçta dış dallar dış grup taksonları, iç dallar ve düğümler ise taksonlar arası ilişkiyi yansıtır. Yakın ilişkili türler ağaçta birbirine komşu dallarda yer almaları ile ayırt edilirler. Ağaçlardaki düğümler günümüzde varlığını sürdüren türlerin ortak atasını belirler. Ağacın en sonundaki birleşme yeri olan kök bu ağaca ait tüm türlerin ortak atasını temsil eder. Türler ya da genler için çizilen filogenetik ağaçların dal uzunlukları, türler ya da genler arasındaki evrimsel farklılığın derecelerini gösterir. Köksüz ağaçlar sadece genlerin ya da türlerin birbiri ile olan ilişkisini gösterir, hangi düğüm ya da dalların tarihte önce veya sonra açığa çıktığını belirtmedikleri için evrimsel süreçteki yönler ve ortak atalar hakkında bilgi vermezler [378-381].

1.4.5.2 Filogenetik Ağaç Oluşturma Yöntemleri

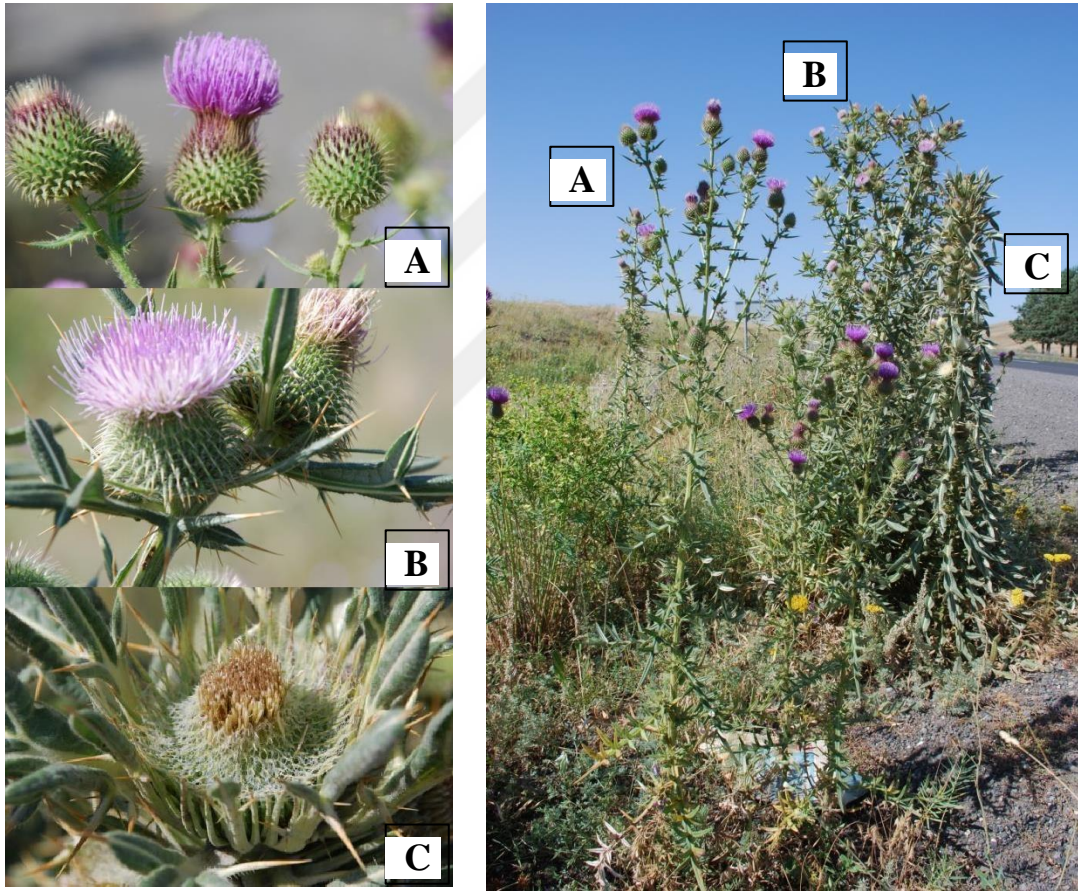
Günümüzde filogenetik ağaç oluşturulurken karakter temelli ve mesafe temelli yaklaşımlar kullanılır. Karakter temelli yöntemler; Maximum Parsimony (MP- Maksimum Tutarlılık), Maximum Likelihood (ML- Maksimum Olasılık) ve Mr. Bayes olmak üzere üç metottan oluşurken, mesafe temelli yöntemler ise; Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA- Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu) ve Neighbour Joining (NJ- Komşu Birleştirme Metodu) metotlarından oluşmaktadır. Filogenetik ağaç oluşturmada PAUP*, PHYLIP, TREE-PUZZLE, PHYML, MRBAYES

ve BAMBE gibi programlar kullanılmakta olup, bunlardan en yaygın kullanılanı PAUP* programıdır [304,382-387].



2. ÇALIŞMANIN AMACI

Bu çalışmada, Türkiye’de doğal olarak yayılış göstermekte olan *Cirsium* cinsine ait bazı türler üzerinde moleküler çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı, *Cirsium* cinsinin *Epitrachys* seksiyonuna ait *C. macrobotrys* ve *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* taksonları ve bu taksonlar arasında meydana gelen hibritleşmenin (Şekil 2.1) moleküler filogenetik analizini yapmak, benzer ve farklı karakterleri belirleyerek türler arası düzeyde bazı sistematik veriler elde edip, hibritleşmelerinin mekanizması hakkında yorumlar yapmaktır. Bu amaçla iki farklı çekirdek genomuna ait bölge (ITS ve ETS) ve iki farklı kloroplast genomuna ait bölge (*trnL-F* ve *rpl32-trnL*) çalışılmış olup, filogenetik veriler elde edilmiştir.



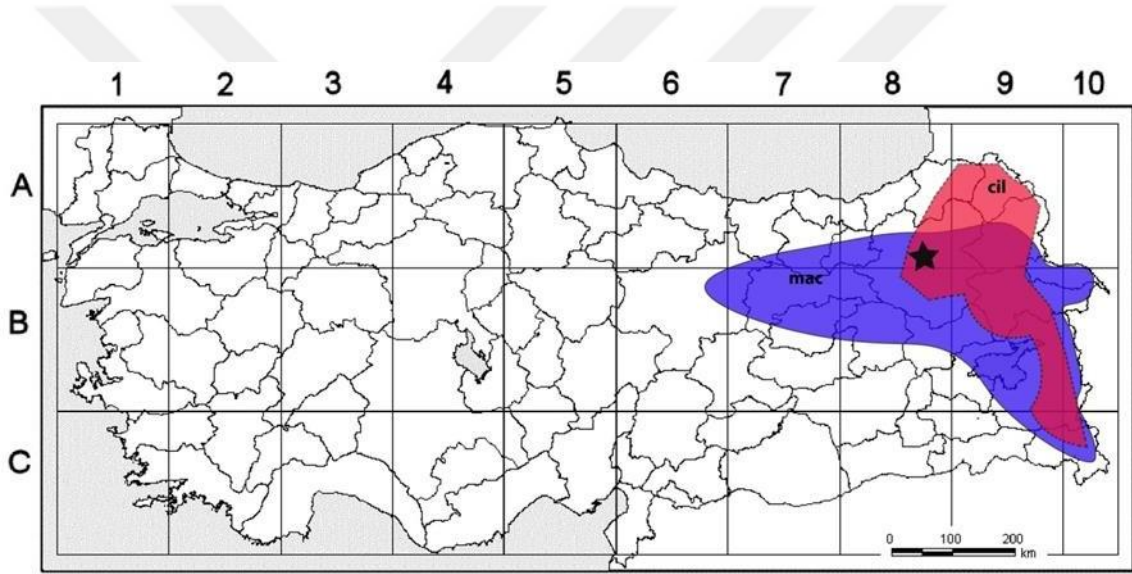
Şekil 2.1: Çalışmada kullanılan iki ata ve hibritlerinin genel morfolojik yapıları ve kapitulumları (A- *Cirsium ciliatum* subsp. *szovitzii*, B- *Cirsium* × *erzurumicum*, C- *C. macrobotrys*)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki Örneklerinin Toplanması ve Teşhis Edilmesi

Bu çalışmada kullanılan *Cirsium* cinsinin *Epitrachys* seksiyonuna ait *C. macrobotrys* ve *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* taksonları ile bunlar arasında meydana gelen bazı hibrit birey materyalleri 2006-2017 yılları arasında Prof. Dr. Bayram YILDIZ, Prof. Dr. Tuncay DİRMENCİ ve Prof. Dr. Turan ARABACI tarafından toplanmış ve teşhis edilmiştir. Şekil 3.1’de Türkiye’deki yayılışı verilen bu örneklerin büyük çoğunluğu TÜBİTAK 106T167 numaralı proje kapsamında elde edilmiş olup, herbaryum örnekleri Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi Herbaryumu’nda saklanmaktadır.



Şekil 3.1: *C. macrobotrys* (mavi alan), *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* (kırmızı alan) ve *Cirsium* × *erzurumicum* (★) bireylerinin Türkiye’deki yayılış haritası

Moleküler çalışmalar için ayrıca arazi esnasında bazı örnekler silika jel taneleri barındıran küçük kilitli poşetler içerisinde muhafaza edilmiştir ve diğer bazı örnekler için ise herbaryum örneği haline getirilmiş bitki örneklerinden yararlanılmıştır. DNA izolasyonları için öncelikli olarak silika jel tanecikleri içerisinde nemi alınmış örnekler tercih edilmiştir. Kullanılan bitki örnekleri ve lokaliteleri Tablo 3.1’de gösterildiği gibidir.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan taksonlar ve lokaliteleri

| Takson Adı | Lokasyon bilgileri |
|--|--|
| <i>C. ciliatum</i> subsp. <i>szovitzii</i> | Cm6: Erzurum'dan Çat'a 22-23. km, 1990 m, 09.08.2017, <i>T. Dirmenci, T. Arabacı</i> (TD 4892), Cm9: Posof-Türközü sınır kapısı arası, Eminbey Köyü'nden 2 km sonra, 1461 m, 04.08.2015, <i>T. Dirmenci, T. Arabacı</i> (TD 4446), Cm1, Cm5: Göle, Oltu yolu, 5 km, step, 2100 m, 17. 8. 2006, N 40 4500, E 042 34 00, <i>B. Yıldız & T. Dirmenci</i> (BY 16278) (BY 16308), Cm2: Şemdinli-Yüksekova arası, 18. km, 1700 m, 05.09.2007, <i>T. Dirmenci, M. Fırat</i> (TD 3588). |
| <i>Cirsium</i> × <i>erzurumicum</i> | Cm3: Pasinler'den Erzurum'a 28. Km, yol kenarı, step, 1950 m, <i>T. Dirmenci, T. Arabacı</i> (TD 3538) (Paratip örneği), Cm4: Oltu, Gaziler yolu, Çakırbaba geçidi, step, 2450 m, 28.08.2010, <i>B. Yıldız & T. Dirmenci</i> (BY 17228) (Paratip örneği). Cm7: Erzurum'dan Çat'a 22-23. km, 1990 m, 09.08.2017, <i>T. Dirmenci, T. Arabacı</i> (TD 4891) (Holotip örneği), |
| <i>C. macrobotrys</i> | Cm8: Erzurum'dan Çat'a 22-23. km, 1990 m, 09.08.2017, <i>T. Dirmenci, T. Arabacı</i> (TD 4890). |

3.1.2 Cam ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan tüm kapaklı tüpler, PZR tüpleri, pipet uçları, cam malzemeler ve ısıya dayanıklı diğer malzemeler çalışmaya başlamadan önce 121 °C de 20 dakika süreyle 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası malzemelerin 60 – 70 °C' de kuruması sağlanmıştır. Ayrıca çalışmalar esnasında kullanılan saf sular da iki kez saflaştırılmış şekilde kullanılmıştır.

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddelerin çoğu çeşitli tedarikçi firmalar ile anlaşarak ithal olarak getirilmiştir. DNA izolasyon işlemleri için Qiagen (Valencia-California, ABD) mini bitki DNA izolasyon kitleri, Taq polimeraz enzimi olarak Fermantas (Vilnius, Litvanya), GoTaq DNA Polymerase (Madison-Wisconsin, ABD) ya da Qiagen (Valencia-Kaliforniya, ABD) markalarına ait ürünler kullanılmıştır. Diğer malzemeler ise, Merck (Darmstadt, Almanya), Sigma Aldrich (St. Louis-Missouri, ABD) ve bazı yerli kuruluşlardan temin edilmiştir.

3.1.3.1 QIAGEN Kit ile Yapılan DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar

Bitki materyallerinden genomik DNA izolasyonu Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (mini bitki izolasyon kiti) kullanılarak yapılmıştır. Kit ile birlikte AP1, AP2, AP3, AW1 ve AW2 ile AE solüsyonları gelmiş olup, protokolde belirtildiği şekilde izolasyon yapılmıştır. AP1 tamponu parçalayıcı çözelti, AP2 tamponu protein ve diğer molekülleri çöktürücü, AP3 solüsyonu DNA çöktürücü, AW solüsyonları yıkama çözeltisi ve AE ise DNA'yı kolondan süzmeye yarayan çözelti olarak bilinir. Ayrıca AW yıkama çözeltilerine kullanmadan önce talimata uygun olarak saf etil alkol eklenmiştir.

3.1.3.2 PZR İşlemlerinde Kullanılan Kimyasallar

PZR reaksiyonlarında kullanılan dNTP karışımı, yükleme boyası katkılı tampon ve Taq DNA polimeraz, çeşitli firmalardan tedarik edilmiş olup, her bir örnek için kullanılan miktarları ve konsantrasyonlara dair bilgiler Tablo 3.2'de verilmiştir. PZR reaksiyonlarında kullanılan primerler ise Oligomer (Ankara, Türkiye) firması tarafından evrensel primer dizi bilgileri kullanılarak sentezlenmiştir. Primerler laboratuvara gelmez veya -20 °C buzdolabından çıkarıldıktan sonra yaklaşık 15 sn, 12.000 rpm'de santrifüj yapılarak kuru çökeltinin tüpün dibinde toplanması sağlandı ve 1 ml dH₂O (çoğunlukla ultra dH₂O- iki kez distile edilmiş su) içerisinde çözülerek stok hazırlandı. Her bir primerin son konsantrasyonu 5 nmol/ ml (5 µM) olacak şekilde sulandırıldı.

Tablo 3.2: PZR reaksiyonunda kullanılan çözeltiler

| Kimyasal | Miktarı | Konsantrasyonu |
|----------------------------|--------------|----------------|
| dH ₂ O (saf su) | 9.8 µl | - |
| Taq Tamponu | 2.5 µl | 10X |
| CoralLoad Tamponu | 2.5 µl | - |
| Q Çözeltisi | 2.5 µl | - |
| Geri Primer | 2.5 µl | pmol / mL |
| İleri Primer | 2.5 µl | pmol / mL |
| dNTP | 0.4 µl | 10 mM |
| Taq DNA Polimeraz | 0.3 µl | 5 ünite |
| gDNA | 2 µl | - |
| Toplam | 25 µl | |

3.1.3.3 Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Kimyasallar

Agaroz jel elektrofrezinde kullanılan agaroz, yerel tedarikçi firma tarafından Sigma Aldrich (St. Louis-Missouri, ABD)' den temin edilmiştir. Agaroz jel elektrofrezinde 0.5X'lik TBE (Tris-Borik asit-EDTA) kullanılmış olup, bu çözelti 5X TBE'nin 10 kat

seyreltilmesi ile elde edilmiştir. 5X TBE ise şöyle elde edilmiştir: Tris bazından 54g, borik asitten 27.5 g ve 0,5 M'lık EDTA'dan 20 ml alınmış, beherde karıştırılarak üzerine toplam hacim 1 litre olana kadar saf su ilave edilmiş ve iyice çözünmesi sağlanmıştır.

Agaroz jel kuyucuklarına yüklenen PZR ürünlerinin boyutlarının karşılaştırılması için DNA markörü (büyüklük belirleyici) olarak ise Fermantas markasına ait kimyasal kullanılmış ve UV ışık altında bantların gözlenebilmesi için de jele Applichem (Darmstad, Almanya) marka etidyum bromid (EtBr) yüklenmiştir.

32 Yöntem

Türkiye'de doğal olarak yayılış gösteren *Cirsium* cinsinin *Epitrachys* seksiyonuna ait *C. macrobotrys* ve *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* taksonları ile bunların doğal ortamlarında meydana getirdikleri hibrit bireylerin moleküler filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Moleküler filogenetik çalışmalar için, çekirdek genomuna ait olan ve ribozomal RNA'ları kodlayan ITS (İç Transkribe Olan Boşluk) bölgesinin tamamı (ITS1 + 5.8S rRNA kodlayan DNA + ITS2), ETS bölgesi (Dış Transkribe Olan Boşluk), kloroplast genomu içerisinde yer alan *trnL-F* ve *rpl32* DNA bölgeleri çoğaltılmıştır. Bu çalışmada böylelikle, 4 farklı fakat birbirini destekleyici bölgeler kullanılmıştır. Bu çalışmaların gerçekleştirilebilmesi için öncelikle DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonundan elde edilen örnekler PZR çalışmalarında kalıp olarak kullanılmıştır. PZR işlemleri sonucunda agaroz jel elektroforezinde yürütüldüğünde uygun bantlaşmalara sahip olan örnekler dizileme işlemlerinin gerçekleştirilebilmesi için hizmet alımı yoluyla Genoks firmasına gönderilmiş ve firma tarafından diziletilmiştir. Son aşamada, uygun şekilde diziletilmiş ve dizileri elde edilmiş olan DNA verileri çeşitli bilgisayar programları tarafından incelenip analiz edilerek filogenetik ağaçların elde edilmesi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 Genomik DNA İzolasyonu

Arazide toplanıp silika jel tanelerinin içerisinde muhafaza edilen bitki yapraklarından ve Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi Herbaryumu'nda bulunan bitki örneklerinden olmak üzere *C. macrobotrys* ve *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* taksonları ve bunların doğal ortamlarında meydana getirdiği hibrit bireylerin DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler esnasında çekirdek genomu veya kloroplast genomu ayrı ayrı saflaştırılmamış, tüm DNA genomları aynı tüp içerisinde muhafaza edilmiştir. DNA izolasyonu için Qiagen firması tarafından üretilen DNeasy Plant Mini Kiti kullanılarak, kitin içerisindeki protokole uygun bir şekilde izolasyon yapılmıştır. İzolasyon sonucunda

elde edilen DNA izolatları, kullanılacakları zamana kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

DNA izolasyon prosedür işlemleri şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. DNA izolasyonu yapılacak bitki materyali havan içerisinde sıvı azot ile toz haline gelinceye kadar parçalanarak, steril kapaklı tüpe aktarıldı.
2. Sıvı azot uçar uçmaz üzerine 400 µl AP1 (tampon) ve 4 µl RNase A (100 mg/ml) eklenerek 2-3 dk nazikçe karıştırıldı.
3. Tüp 65 °C’de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon esnasında tüp 2-3 kez alt üst edildi.
4. 130 µl AP2 (buffer) eklendi ve 5 dk buzdolabında (-20 °C) bekletildi. Daha sonra 14000 rpm’de 5 dk santrifüj yapıldı.
5. Santrifüj sonrası çöken pellete dokunmadan temiz lizat spin kolona aktarıldı. Spin kolon 2 dk 14000 rpm’de santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası spin kolondan alt kısma inen süpernatant yine pellete dokunmadan yeni bir kapaklı tüpe aktarıldı.
7. Süpernatantın 1.5 katı kadar AP3 tamponu eklendi ve yavaşça pipetaj yapıldı.
8. Süpernatantın kirlilik içermeyen kısmından 650 µl alınarak mini spin kolona aktarıldı. 8000 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldı. Buradaki aşamadan sonra kolondan süzülen çöküntü direkt olarak atıldı.
9. Süpernatantın kalan kısmı aynı mini spin kolonun üzerine kondu ve 8000 rpm’de tekrar 1 dk boyunca santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası toplama kabı atıldı.
10. Mini spin kolon yeni bir 2 ml’lik koleksiyon tüpüne kondu. Daha sonra kolonun içerisine 500 µl AW1 yıkama tamponu eklendi ve 8000 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süzüntü atıldı.
11. Mini spin kolon içerisine bu sefer sırasıyla iki kez 500 µl AW2 tamponu eklendi ve 14000 rpm’de 2 dk santrifüj yapıldı. Her santrifüjden sonra altta kalan süzüntü atıldı. Santrifüj işlemleri sonrası kolon toplama kabından ayrıldı ve yeni bir 1.5 ml’lik kapaklı tüp içerisine kondu.
12. En son aşamada kolon içerisine 100 µl AE tampon eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 8000 rpm’de 1 dk santrifüj sonrası DNA kolondan ayrıldı.
13. Bu aşamada 1. elüsyon izolatlar elde edildi. 2. elüsyon izolatları elde etmek için 12. basamaktaki işlemler tekrarlandı.
14. İzolatlar kullanılana kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), temel olarak hücre içinde (*in vivo*) çekirdekte meydana gelen replikasyon işleminin *in vitro* ortamda taklit edilmesi mantığına dayanmaktadır. İzolasyon işlemi sonucunda elde edilmiş DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı ve DNA polimeraz enziminin DNA polimerleştirme özelliği vasıtasıyla gerçekleşen bir DNA çoğaltma işlemidir. Genellikle standart bir DNA polimeraz enzimi ile 0.2-2.0 kb aralığındaki parçaların çoğaltımı yapılmakla birlikte, özel bazı enzimlerin kullanılmasıyla daha büyük 15-20 kb uzunluğuna kadar DNA parçacıklarının çoğaltımı yapılabilmektedir. Bu yöntem aslında ortam sıcaklığının hızlı bir şekilde değiştirilmesiyle meydana gelir ki PZR işlemleri için kullanılan cihaz termal döngü cihazı olarak isimlendirilir.

Bu çalışmada kullanılan çekirdek genomuna ait primerler ITS (ITS-1, 5.8S gen ve ITS-2) bölgesi için ITS-4 [388] ve ITS-I [389] primerleri, ETS bölgesi için 18S-ETS ve ETS-Car-1 [57] primerleri, kloroplast DNA'sı içinde yer alan kodlanmayan *trnA* bölgesi (*trnL-trnF*) için *trnL-c* [306] ve *trnL-f* [306] primerleri ve *rpl32* DNA bölgesi için de *rpl32-F* ve *trnL* (UAG) primerleri kullanılarak (Tablo 3.3) PZR işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.3: PZR' de kullanılan primerler ile ilgili bilgiler

| Bölge | Primer Adı | Primer Nükleotid Dizisi (5'-3') | T _m Sıcaklığı | Kaynak |
|------------------|-----------------------|---------------------------------|--------------------------|--------|
| ITS | ITS 1 (İleri) | TCCGTAGGTGAACCTTGCGG | 57 °C | [389] |
| | ITS 4 (Geri) | TCCTCCGCTTATTGATATGC | 53 °C | [388] |
| ETS | 18S-ETS (İleri) | ACTTACACATGCATGGCTTAA | 58 °C | [57] |
| | ETS-Car-1(Geri) | TTCGTATCGTTCGGT | 52 °C | [60] |
| <i>trnL-trnF</i> | <i>trnL-c</i> (İleri) | CGAAATCGGTAGACGCTACG | 56 °C | [306] |
| | <i>trnL-f</i> (Geri) | ATTTGAACTGGTGACACGAG | 52 °C | [306] |
| <i>rpl32</i> | <i>rpl32-F</i> | CAGTTCCAAAAAACGTA CTTC | 59 °C | [390] |
| | <i>trnL</i> (UAG) | CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT | 67 °C | [390] |

PZR işlemlerinde verimi artırmak için çeşitli Taq DNA polimeraz kitleri kullanılmıştır. Hangi kit olursa olsun PZR tüplerinin toplam hacimleri 25 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Tablo 3.2'de verilen PZR tüplerine eklenen kimyasallar ve DNA miktarı değerleri sadece 1 PZR tüpü için geçerlidir. Ayrıca, her PZR uygulamasında olası bir kontaminasyonu engellemek için, kalıp DNA içermeyen negatif kontroller de kullanılmıştır. Bu örnekler kalıp DNA içeriği hariç çalışılacak PZR tüpleri ile aynı içeriğe sahiptir ve hacmi diğer PZR tüplerinden kalıp DNA miktarı kadar eksiktir. Bu yüzden her çalışmada, verilen değerler toplam çalışılacak örnek sayısının bir fazlası ile çarpılmıştır. Elde edilen miktar kadar çözeltilerden alınmış ve karışım tüpü hazırlanmıştır. Karışım tüpüne bütün çözeltiler

eklendikten sonra en son Taq polimeraz eklenerek pipetaj yapılmıştır. Hazırlanan karışım, DNA çözeltisi bulunmayan her bir tüpe 23 µl olacak şekilde eşit olarak dağıtılmış ve en son 200 µl'lik bu PZR tüplerinin üzerlerine 2 µl DNA çözeltileri ilave edilmiştir. Toplam hacmi 25 µl olan bu çözelti, Techne Prime (Staffordshire, Birleşik Krallık) marka termal döngü cihazı ile Tablo 3.4'te ayrıntıları verilen program ile çoğaltılmıştır.

Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan PZR programı ve süreleri (SHAW07 protokolü [390])

| Aşama | Sıcaklık | Zaman | Döngü Sayısı |
|-----------------|--|-----------------|--------------|
| Ön Denatürasyon | 80 °C | 5 dakika | 1 döngü |
| Denatürasyon | 95 °C | 60 saniye | |
| | 50 °C | | |
| Bağlanma | (65 °C'ye saniyede 0.3 °C artarak çıkacak) | 60 saniye | 30 Döngü |
| Uzama | 65 °C | 4 dakika | |
| Son Uzatma | 65 °C | 5 dakika | 1 döngü |
| Bekleme | 4 °C | Kullanana kadar | |

Her bir döngünün; denatürasyon aşaması, primerlerin bağlanma aşaması ve uzama aşaması olmak üzere 3 aşamada gerçekleştiği PZR işlemi, çok sayıda döngüden meydana gelir (Tablo 3.4). Birinci aşama olan denatürasyon aşamasında, 94-96 °C'de DNA zincirleri birbirinden ayrılır. Yapışma aşaması ikinci aşamadır ve bu esnada, ayrılan (denatüre olan) zincirlerin karşısına çoğaltacağımız gen bölgesini bulmaya yarayan primerler (kısa DNA parçaları) uygun gen bölgesine yapışırlar. Son olarak uzama aşamasında ise kaplıcalarda yaşayan *Thermus aquaticus* Brock & Freeze bakterisinden elde edilen Taq DNA polimeraz enzimi ile, kalıp DNA zincirinin karşısına yeni zincir sentezlenir.

3.2.3 Agaroz Jel Elektrofrez

%0,8'lik agaroz jelde yürütülen PZR ürünleri jel dokümantasyon cihazında görüntülendi. Agaroz jeli hazırlamak için 0,8 g agarozun 100 ml 0,5 X TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında kaynatılarak çözülmesi sağlandı. Ilıdıktan sonra karışıma 1 µl etidyum bromid çözeltisi (1 mg/mL) eklendi. Hazırlanan tampon çözelti, tarakları önceden yerleştirilmiş olan jel kaseti içerisine dökülüp, polimerleşmesi için yaklaşık 30 dakika beklendi. Polimerleşen jel, elektroforez tankına konuldu ve üzeri kaplanıncaya kadar 0,5 X TBE tamponu ile dolduruldu.

Termal döngü cihazında amplifiye edilen (çoğaltılan) örnekler, hazırlanan jeldeki kuyucuklara tek tek yüklendi. Jele yükleme işleminde PZR'de kullanılan CoralLoad

tamponunun boyalı olmasından dolayı yükleme boyası kullanılmayıp, sadece PZR ürünlerinden 5 µl pipet yardımıyla alınarak boş kuyucuklara yükleme yapıldı. Çalışmada olası bir DNA kontaminasyonunu belirlemek amacıyla her uygulamada genomik DNA içermeyen bir negatif kontrol ve bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla da elektroforez işlemlerinde moleküler büyüklüğü bilinen bir DNA büyüklük belirleyici (1kb DNA ladder) kullanıldı. Örnekler 100 voltta 45 dakika yürütüldükten sonra jel görüntüleme cihazında bilgisayar programı yardımıyla jelin fotoğrafı çekilip kaydedildi. Çoğaltma işleminin başarılı olduğu, jel incelenerek tespit edilen PZR ürünleri ve hazırlanan primerler dizileme işlemlerinin yapılması için Genoks firmasına gönderildi.

3.2.4 Dizileme ve Dizi Analizi

PZR ile çoğaltılan ve saflaştırılan DNA'ların ITS, ETS, *rpl32* ve *trnL-F* bölgelerinin, DNA dizilerine dönüştürülmesi işlemleri için Genoks firmasından hizmet alımı yapıldı. Hizmet alımı ile temin edilen DNA dizileri ilk olarak Sequencher 5.4.6 [391] programı kullanılarak gözden geçirilip, hatalı dizilenmiş nükleotitler kontrol edilerek düzeltildi. Sequencher programından metin belgesine aktarılan DNA dizileri, BioEdit 7.2.5 [392] programında alt alta açılıp hizalandıktan sonra, taksonlar arasındaki dizi farklılıkları yeniden kontrol edildi, gerekli düzeltmeler yapıldı ve FASTA formatında bu dosya kaydedildi. Kaydetmiş olduğumuz bu dosya ile internet üzerinden ücretsiz erişilebilen MUSCLE (Multiple Sequence Alignment) programı kullanılarak diziler yeniden hizalandı [393]. *Cirsium* cinsinin *Epitrachys* seksiyonuna ait taksonların ITS, ETS, *rpl32* ve *trnL-F* bölgelerinin çoğaltılması sonucu gerçekleşen DNA dizileme ve dizi analizi işlemleri neticesinde dizileri elde edilen taksonlar işlendi. Dizileri yeterli düzeyde temiz çıkmayan, sinyalleri güçlü olmayan taksonların PZR'ı yeniden yapıldı.

3.2.5 Filogenetik Analiz

Dizileri elde edilmiş olan *Cirsium* cinsinin *Epitrachys* seksiyonuna ait taksonların akrabalık derecelerini belirleyebilmek ve filogenetik ağaçlar oluşturmak için dünyada çok yaygın olarak kullanılan PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) 4.0a.144 programı [383] kullanılmıştır. PAUP* programı nexus formatında çalıştığından, hazırlanan FASTA formatındaki dosya http://sequenceconversion.bugaco.com/converter/biology/sequences/fasta_to_nexus.php internet adresinden ücretsiz olarak nexus formatına çevrilerek filogenetik analiz için hazır hale getirilmiştir.

Dizileri hizalanan *Cirsium* türlerinin ITS ve ETS bölgelerinin filogenetik analizi PAUP* programında gerekli komutlar verilerek yapılmıştır. Karakter temelli metotlardan Parsimoni yönteminde en iyilik kriteri (optimality criterion) seçilip, arama algoritması olarak heuristic araştırma ve bootstrap seçilmiştir. Yapılan analizlerde kullanılan kriterler ve karakterlerle ilgili veriler, bulgular ve tartışma bölümünde ayrıntılı olarak verilmiştir. Ayrıca mesafe temelli yöntemlerden NJ ve UPGMA metotları seçilerek filogenetik analizleri de yapılmıştır.

Dış grup olarak seçilen türlerin ITS ve ETS bölgelerinin DNA dizileri <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> adresinden alınarak analize dahil edilmiştir (Tablo 4.2 ve 4.3).



4. BULGULAR

4.1 Morfolojik Bulgular

Bu çalışmanın konusunu oluşturan *Cirsium ciliatum* subsp. *szovitzii* ve *C. Macrobotrys*, daha önce belirtildiği gibi *Epitrachys* seksiyonuna ait taksonlardır. *Epitrachys* seksiyonu, ülkemizde yayılış gösteren *Cirsium* cinsine ait üç seksiyondan biri olup en fazla takson sayısına sahip olan seksiyondur. Aşağıda iki atasal taksonun ve meydana gelen hibritlerin betimleri verilmiştir.

4.1.1 *Cirsium ciliatum* (Murr.) Moench, Meth. 227 (1802) subsp. *szovitzii* (C.Koch) Petr.
in Trudy Tiflissk. Bot. Sada 12 (1):2 (1912).

Sinonimler: *Epitrachys szovitsii* C. Koch in Lennaea 24:397 (1851);

Cirsium szovitsii (C. Koch) Boiss., Fl. Or. 3:527 (1875); Charadze in Fl. USSR 28:133 (1963).

Tip Örneği: [Transcaucasia] Azerbaycan: Karabagh, *Szovits* 575 (holo B, iso LE, E, K).

Kaynak: [104].

İki yıllık, bazen birinci yılda çiçeklenir, 90-120 cm. Gövde kanatsız, çok az arachnoid, dallanmış. Gövde yaprakları gövdeyi kısmen sarı, oblong, pinnatisekt, yanal loblar iki parçalı, üç köşeliden lanseolat'a kadar, 3-7 çift, yanal ve terminal loblar genellikle ince 2-13 mm uç dikenli, üst yüzü dikenli-strigoz, seta 0.3-1.3 mm, tüysüz; alt yüzü arachnoid. Yan dallar 2-8, 1-8 kapitulumlu, üst yapraklar 1-4 biraz geriye kıvrık, involukrumdan kısa. İnvolutkumlar dik, basık-küresimsiden geniş-ters yumurtamsıya kadar, 30-40 mm. Fillariler tüysüz, 9-16 seri; dıştakiler geri kıvrık düz alt yüzünün kenarında 0.4-1 küçük dikenli uç dikenli, geriye kıvrıldığı noktada c. 2 mm genişliğinde; ortadakiler dıştakilere benzer fakat bazen geriye kıvrıktan ziyade dikey-yayı, iki renkli (ortası az çok morumsu kırmızı, kenarı saman sarısı), 1.5-3 mm saman sarısı uç dikenini dahil 11.5-16 × 1.5-3 mm; içtekiler kısa dikencikli, darca, ucu dikey-yayıktan yayığa kadar, genellikle az çok morumsu kırmızı. Korolla pembe ya da morumsu kırmızı, 28-40 mm. Aken 4.5 × 5.5, papus 27-29 mm.

Çiçeklenme Zamanı: Temmuz-Ağustos.

Yetiştirme Ortamı: Tarla ve yol kenarları, hendek boyları, 1600-2500 m.

Türkiye'de Yayılış: **A8 Erzurum:** Oltu, Başbağlar köyü doğusu, step, 1500-1600 m, 16. 8. 2006, B. Yıldız & T. Dirmenci (BY 16 293), **A9 Artvin:** Ardanuç, Peynirli köyünden

Çukurçayırılar mevkine, 1700 -3300 m, 11.8.1984, N. Demirkuş, 2586 (HUB) **Kars:** Sarıkamış- Mescitli köyü arası, sarı çam ormanı, 1800-2200 m, 10. 8. 1981, O. Güneş 2011 (HUB) Kağızman, Camuslu köyü, Aladağ, 2000-2500 m, 7.11.1980, A. Güneş, 1781 (HUB) Çıldır, Çıldır gölü, doğu kıyısı, step, 1950 m, 17. 8. 2006, *B. Yıldız & T. Dirmenci* (BY 16 323) **Kars:** Yalnızçam, 1800 m, 19.08.1957, *Davis & Hedge* (D. 32548) (E, K, BM) **B8 Erzurum:** 4 km N. of Erzurum, in plain, 1800 m, 29.07.1966, *Davis* 47486 (E, K) Çat güneyi, dere kenarı, 2100 m, 11.08.2007, *T.Dirmenci & T.Arabacı* (3527) Aşkale, Bayburt yolu, 8-10. km, 1650 m, yol kenarı, 4.8.2008, *B. Yıldız* (BY 16848) Pasinler-Erzurum arası, 28. km, 6400 ft, 12.08.2007, *T.Dirmenci, T.Arabacı* (3536) **B9 Ağrı:** between Ağrı (Karaköse) and Horasan, 2000-2500 m, *Rech.* 32864 (W) Diyadin, c. 3 miles from Diyadin on road to Ağrı & Doğubayazıt, c. 600 ft, 09.08.1970, *Hewitt* 296 (K) Ağrı-Doğubayazıt arası, 68. km, 1900 m, 12.08.2007, *T.Dirmenci & T.Arabacı* (TD 3550) **Van:** Fallow fields and ditches, 28.07.1954, *Davis & Polninin* (D. 23274) (K) Erçiş-Patnos, 30 km, 2050 m, 13.08.2007, *T.Dirmenci* 3563, *T.Arabacı* Erçiş-Patnos, 15 km, 1800, 13.08.2007, *T.Dirmenci & T.Arabacı* (TD 3561) Van: Gürpınar-Hoşap arası, Çavuştepe, 1 km doğusu, tarla kenarı, 1700, 15. 8. 2008, N 38 21 900; E 043 32 500, *B. Yıldız, Dirmenci & M. Fırat* (BY 16904), Bitlis: Corgih to Bitlis, 2286 m, *Tong* 232 (E) Edremit-Akdamar adası, 21. 9. 1974, A. ve T. Baytop (ISTE 31050)! **C9 Hakkâri:** Şemdinli-Yüksekova arası, Durak köyü, 1650 m, 15. 8. 2008, *B. Yıldız, T. Dirmenci & M. Fırat* (BY 16921).

İncelenen Örnekler: **A8 Erzurum:** Erzurum'dan Çat'a 22-23. km, 1990 m, 09.08.2017, *T. Dirmenci, T. Arabacı* (TD 4892)! **A9 Ardahan:** Posof- Türközü sınır kapısı arası, Eminbey Köyü'nden 2 km sonra, 1461 m, 04.08.2015, *T. Dirmenci, T. Arabacı* (TD 4446)! **Ardahan:** Göle, Oltu yolu, 5 km, step, 2100 m, 17. 8. 2006, N 40 4500, E 042 34 00, *B. Yıldız & T. Dirmenci* (BY 16278)! Göle, Oltu yolu, 5 km, step, 2100 m, 17. 8. 2006, N 40 4500, E 042 34 00, *B. Yıldız & T. Dirmenci* (BY 16 307)!

C9 Hakkâri: Şemdinli-Yüksekova arası, 18. km, 1700 m, 05.09.2007, *T. Dirmenci M. Fırat* (TD 3588)!

4.1.2 *Cirsium macrobotrys* (C. Koch) Boiss., Fl. Or. 3:532 (1875).

Sinonim: *Epitrachys macrobotrys* C. Koch in *Linnaea* 24:399 (1851).

Tip örneği: [**B8 Erzurum**] im armenischen Hochlande, in den Gauen 'Gokssu und Chynys', C.Koch (B).

Kaynak: [104]

İki ya da çok yıllık, c. 30-200(-300) cm. Gövde dik, kalın, kuvvetli, kanatsız, oluklu, yoğun örümcek ağı tüylü, beyaz tomentoz, dallanmamış. Taban yaprakları 30×10 cm'ye kadar, oblong pinnatisekt, üst yüzü tüysüz yoğun setalı, alt yüzü pannoz; orta gövde yaprakları sapsız, 45^0 açı ile geriye dönük, hafif dekurrent, gövdeyi kısmen sarı, oblong, pinnatisekt, yanal loblar iki parçalı, üç köşeliden darca üç köşeliye kadar, 3-8 çift, lineer-lanseolat, lanseolat, yanal ve terminal loblar zayıftan orta derecede sağlama kadar 3-16 mm uç dikenli, üst yüzü dikenli-strigoz, seta 0.2-2.5 mm, tüysüz; alt yüzü arachnoid. İnvolukral yapraklar, çok indirgenmiş, 6-10, involukrumdan uzun. Kapitulumlar gövdelerin ucunda spikat dizilmiş, sapsız. İnvolukrumlar dik, spika şeklinde, gövde ucunda (3-)5-12 adet, küremsi-yumurtamsı ya da köşeli-yumurtamsıdan geniş-ters-yumurtamsıya kadar, 20-35 mm. Fillariler alt kısmında tüysüz, uç kısmı arachnoid, c. 8-10 seri; dıştakiler ortadakilere boyca eşit ya da uzun; ortadakiler c. 1.2×0.1 mm zayıf geriye kıvrık, geriye kıvrık ya da \pm dik uç dikenini dahil c. 13-19 mm. Korolla sarımsı beyaz, 23 mm. Aken c. 5.56×3 mm, kahverengi; papus 22-24 mm.

Çiçeklenme zamanı: Temmuz-Eylül.

Yetiştirme ortamı: Yazın kuruyan çayırıklar, tarım alanları, 1600-3200 m.

Türkiye'deki yayılışı: Doğu Anadolu Bölgesi. **A7 Erzincan:** Sipikör, *Sint.* 1890:3293 (G) **Gümüşhane:** Şirvan-Alucra arası, step, 2100 m, 22. 08. 2006, *B. Yıldız & T. Dirmenci* (BY 16380) **A8 Erzurum:** Erzurum to Bayburt, 1750 m, *Buttler* 15924. **Erzurum:** Kop Dağ pass, 8000 ft., 10.08.1962, *Furse* 3835 (K) **Bayburt:** Kop Da, Aşağıkop köyü üzeri, 1800-2000 m, step, 12. 8. 2006, N 40 03 600, E 40 26 500, *B. Yıldız & T. Dirmenci* (BY 16259) **Gümüşhane:** Bayburt, 1067 m, *Balls* 2035. 58 km WEW of Ezurum, ad viam versusu Tercn, 6.9.1957, *Rechinger*, 15134 (W) İspir, Rize yolu, il sınırı, step, 2150 m, 19. 08. 2006, N 40 35 000, E 040 51 000, *B. Yıldız & T. Dirmenci* (BY 16356) Oltu, Abussar Da., *Koenig*. **A9 Kars:** Yağmurlu Dağ, above Sarıkamış, 2250 m, 23.08.1957, *Davis & Hedge* (D. 32610) (K, BM) **B7 Sivas:** İmranlı, 5 km batısı, çayırık, 1600 m, 11. 8. 2006, *B. Yıldız & T. Dirmenci* (BY 16237) **B8 Muş:** 24 km E. of Muş, *D.* 24779 (E) Palandöken Da, Kayak merkezi çevresi, dağ stepi, 2000 m, 13. 8. 2006, *B. Yıldız & T. Dirmenci* (BY 16272) **B9 Van:** Çuk, 1900 m, *Nábélek* s.n.

İncelenen Örnekler: A8 Erzurum: Erzurum'dan Çat'a 22-23. km, 1990 m, 09.08.2017, *T. Dirmenci*, *T. Arabacı* (TD 4890)! **B7 Erzincan:** Erzincan ve Kelkit arası, Pöske geçidi, 2100 m, 09.08.2017, *T. Dirmenci*, *B. Yıldız & T. Arabacı* (TD 4910)!

4.1.3 *Cirsium* × *erzurumicum* Yıldız, Arabacı & Dirmenci nothosp. nov.

(*Cirsium macrobotrys* (C. Koch) Boiss. × *C. ciliatum* (Murray) Moench subsp. *szovitzii* (C. Koch) Petr.)

Tip Örnekleri: Erzurum: Erzurum'dan Çat'a 22-23. km, 1990 m, 09.08.2017, *T. Dirmenci* 4891 & *T. Arabacı* (**Holotip:** ISTE)

Paratipler: Erzurum: Pasinler'den Erzurum'a 28. km, yol kenarı, step, 1950 m, *T. Dirmenci* 3538 & *T. Arabacı* (GAZI). Erzurum: Oltu, Gaziler yolu, Çakırbaba geçidi, step, 2450 m, 28.08.2010, *B. Yıldız* 17228 & *T. Dirmenci* (ANK).

Diagnosis: *Cirsium* × *erzurumicum* is similar to its parents, *Cirsium ciliatum* subsp. *szovitzii* and *C. macrobotrys*. It can be distinguished from *Cirsium ciliatum* subsp. *szovitzii* as follows: its involucre leaves as long as or longer than involucre (not shorter than involucre), its median phyllaries not ciliate, arachnoid at apex and recurved (not ciliate, glabrous and erecto-patent), lengths of phyllaries are 15–21 (not 11.5-16 mm), its corolla measurement is 25–27 mm (not 28-40 mm). It differs from *C. macrobotrys* in its inflorescence raceme to paniculate, capitula distinctly pedunculate (not spicate, sessile and 5–12 capitula aggregate at stem apex), involucre leaves as long as or longer than involucre (not clearly longer than involucre), corolla pink to pinkish-purple and 25-27 mm (not ochroleucous and 21-23 mm),

Description: Biennial herbs. Stem to 150 cm long, stout and single, few branched above; lateral branches 5-10 cm long and 1-3 capitulate, unwinged, striate, densely arachnoid with sparsely to densely multicellular hairs, greyish-green. Basal leaves unknown. Stem leaves diminishing from base to inflorescence, spinose-strigose above, setae more than 5 in 2 mm², erecto-patent, otherwise glabrous, arachnoid-tomentose at beneath; lower cauline leaves 18-30 × 8-15 cm, pinnatisect, oblong in outline, lateral lobes oblong to lanceolate, apical spine to 1 cm long; middle cauline leaves pinnatisect, 8-15 × 4-8 cm, oblong in outline, lateral lobes oblong to triangular, apical spine to 1 cm long, robust; upper cauline leaves oblong-lanceolate in outline, pinnatifid to pinnatisect, 8-12 × 3-5 cm, apical spine to 1 cm long, robust. Involucre leaves 4-5, involucre, as long as or clearly longer than capitula. Involucre 25-35 × 30-35 mm, ±globose, clearly pedunculate, peduncle 5-10 cm long; phyllaries ovate-lanceolate, sparsely to densely arachnoid at apex, imbricate, 7-10

seriate; outer phyllaries 10-15 mm long with 1.5-3 mm long apical spined, recurved; median phyllaries 15-21 mm long with 2.5-4 mm long apical spine, recurved; inner phyllaries 25-33 mm long with 2-3 mm long apical spine, recurved to slightly recurved. Corolla pinkish to pinkish-purple, 25-27 mm long, unequally 5-lobed to 1/5, 4 lobes \pm equal c. 5 mm long, other lobe c. 7 mm long; anthers 10-12 mm long, glabrous; filaments densely hairy; style 3-5 mm exerted from corolla, 2-lobed, glabrous. Pappus 20-25 mm long, dirty white, plumose. Achene 5-6 \times 2.2-2.5 mm, blackish, white-striate.

Betim: İki yıllık. Gövde 150 cm'ye kadar uzunlukta, kalın ve tek, yukarı dallanmış, yan dallar 5-10 cm uzunlukta, 1-3 kapitulumlu, kanatsız, çizgili, yoğun örümcekağsı tüylü, seyrek ila yoğun çok hücreli tüylü, grimsi-yeşil. Taban yaprakları bilinmiyor. Gövde yaprakları tabandan itibaren kapitulumlara doğru kademeli olarak küçülmüş, üst yüzü dikenli-strigoz, 2 mm²'de 5'ten fazla, seta dik-yayık, diğer yandan üst yüzü tüysüz, alt yüzü örümcekağsı- kaba tüylü; alt gövde yaprakları 18-30 \times 8-15 cm, derin teleksi, dikdörtgensi, yanal loblar dikdörtgensiden mızraksıya kadar, 1 cm'ye kadar uç dikenli; orta gövde yaprakları derin teleksi, 8-15 \times 4-8 cm, dikdörtgensi, yanal loblar dikdörtgensiden üç köşeliye kadar, 1 cm' ye kadar uç dikenli, sağlam, üst gövde yaprakları dikdörtgensiden mızraksıya kadar, az teleksi ila derin teleksi, 8-12 \times 3-5 cm, 1 cm'ye kadar uç dikenli, sağlam. İnvolutkral yapraklar 4-5, kapitulum kadar ya da daha uzun, involukrumlar 25-35 \times 30-35 mm, \pm küremsi, açıkça saplı, pedunkullar 5-10 cm uzunluğunda, fillariler yumurtamsı- mızraksı, tepede seyrek ila yoğun örümcekağsı, kiremitvari, 7-10 seri; dış fillariler 1.5-3 mm uç diken dahil 10-15 mm uzunluğunda, kıvrık; orta fillariler 2.5-4 mm uç diken ile birlikte 15-21 mm, kıvrık; içtekiler 2-3 mm uç diken dahil 25-33 mm, kıvrık ila hafif kıvrık. Korolla pembemsi ila pembemsi-mor, 25-27 mm uzunluğunda, eşit olmayan 5 loblu 1/5, diğer dört lob hemen hemen eşit, diğer lob c. 7 mm uzunluğunda; anterler 10-12 mm uzunluğunda, tüysüz; filamentler yoğun tüylü; Situlus taç yaprakları 3-5 mm kadar geçer, 2 loblu, tüysüz. Pappus 20-25 mm, kirli beyaz, tüylü. Aken 5-6 \times 2.2-2.5 mm, siyahımsı, beyaz çizgili.

Çiçeklenme Zamanı: Temmuz-Eylül.

Etimoloji: Bu yeni hibrit bireyin epiteti yetiştiği yer olan Erzurum iline ithafen verilmiştir.

Yetiştirme Alanı: Tarla kenarları, yol kenarları, kuru çayırliklar, step alanlar.

42 DNA İzolasyonu

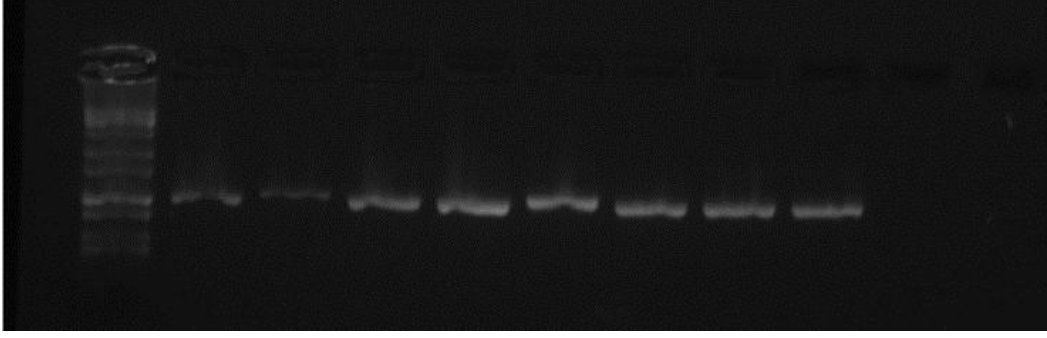
Bu çalışmada *Cirsium ciliatum* subsp. *szovitzii*, *C. macrobotrys* ve bu iki atasal takson arasında meydana gelen melezler (*Cirsium* × *erzurumicum*) çalışıldı. Atasal taksonlardan *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* taksonundan 5 birey, *C. macrobotrys* taksonundan 1 birey ve 3 birey de melez taksondan olmak üzere DNA izolasyonu işlemleri başarı ile gerçekleştirildi. Atasal türlerden biri olan *C. macrobotrys* ile ilgili daha önceki çalışmalardan elde edilmiş 3 farklı DNA dizisi de aynı alandan olmamakla beraber, daha önceden dizilenmiş olan çalışmalardan kullanılıp, bu çalışmaya dahil edilip birlikte analiz edildi. Tüm taksonların DNA izolasyonları, öncelikle silika tanecikleri içerisinde nemi alınmış bitki yaprakları kullanılarak veya herbaryum örneklerinden, Qiagen firmasına ait Dneasy Plant Mini kiti ile bir önceki bölümde anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 4.1: Bu çalışmada DNA izolasyonu esnasında kullanılan bitki örnekleri ve kodları

| Takson | İzolasyon kodu | Toplayıcı kodu |
|---|----------------|----------------|
| <i>Cirsium ciliatum</i> subsp. <i>szovitzii</i> | Cm1 | BY16278 |
| | Cm2 | TD3588 |
| | Cm5 | BY16307 |
| | Cm6 | TD4892 |
| | Cm9 | TD4446 |
| <i>Cirsium</i> × <i>erzurumicum</i> | Cm3 | TD3538 |
| | Cm4 | BY17228 |
| | Cm7 | TD4891 |
| <i>C. macrobotrys</i> | Cm8 | TD4890 |

43 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Bu çalışmada daha önceden bahsi geçen ve Tablo 4.1’de izolasyon kodları verilen 3 farklı taksona ait 9 farklı örneğin ve daha önceden farklı bir yayında çalışılmış olan *Cirsium macrobotrys* taksonuna ait 3 farklı örneğin çekirdek genomuna ait ribozomal DNA iç transkribe olan boşluk (ITS) bölgesi ve dış transkribe olan boşluk (ETS) bölgesi çalışıldı. Ayrıca kloroplast DNA’sına ait olan *trnL-F* ile *rpl32* DNA bölgeleri çalışıldı. Tablo 3.2’de yer alan kimyasallar ve Tablo 3.3’te verilen primer dizileri Techne Prime markalı termal döngü cihazında Tablo 3.4’te verilen PZR programı kullanılarak çoğaltıldı. PZR’de çoğaltılan örneklerden bazılarının Agaroz jel görüntüleri Şekil 4.1’de verilmiştir.



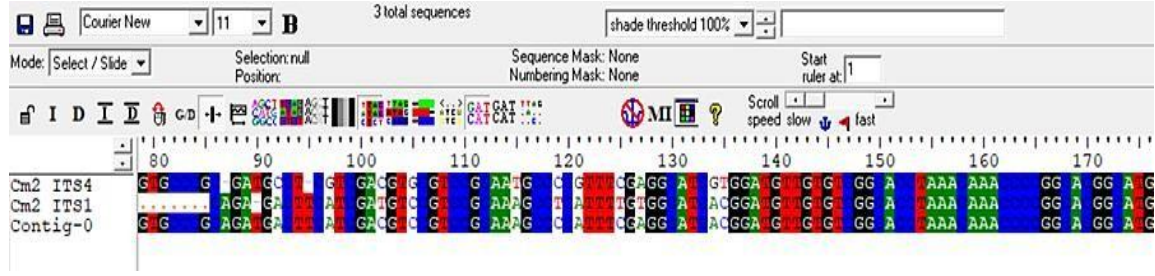
Şekil 4.1: PZR işlemlerinde çoğaltılmış bazı örneklerin agaroz jel görüntüsü (nrITS)

44 DNA Dizileme ve Dizi Analizi

Cirsium ciliatum subsp. *szovitzii* ve *C. macrobotrys* taksonları ve meydana gelen hibritlerin ITS, ETS, *trnL-F* ve *rpl32* bölgeleri PZR işlemleri ile çoğaltıldıktan sonra, kendi üniversitemiz bünyesinde otomatik DNA dizileyicisi olmadığından, dizileme reaksiyonları için GENOKS firmasından hizmet alımı yapıldı. Gerçekleştirilen dizileme reaksiyonlarının sonuçları kromatogramlar halinde genbank (.gb) formatındaki dosyalar halinde gönderildi. Herbir örnekten daha doğru sonuçlar elde etmek için iki yönlü dizileme yapılmış olup, bunun için de ileri ve geri primerler kullanılarak ayrı ayrı dizilenmiş diziler tarafımıza gönderildi.

4.4.1 Dizilerin İşlenmesi

DNA dizileme firması tarafından elektronik ortamda elimize ulaşan AB1 formatındaki işlenmemiş DNA dizileri, öncelikle Sequencher 5.4.6 veya BioEdit 7.2.5 programları kullanılarak incelendi. Bu formatta gelen dosyalardan ileri ve geri primer dosyaları birlikte kullanılarak kontig oluşturuldu. Dizileme işlemleri esnasındaki yanlış okuma vb. hataların kontrolü için, kontigleri oluşturulmuş dizilerin kromatogramlarındaki bazlara ait olan sinyal güçlerine (piklere) ve ham dizilerin genel temizliğine bakılarak kontigler tek tek Sequencher 4.5.6 veya BioEdit 7.2.5 programı ile görsel olarak incelenip düzeltildi ve sonuç olarak kontig ya da ortak karar dizileri elde edildi (Şekil 4.2).

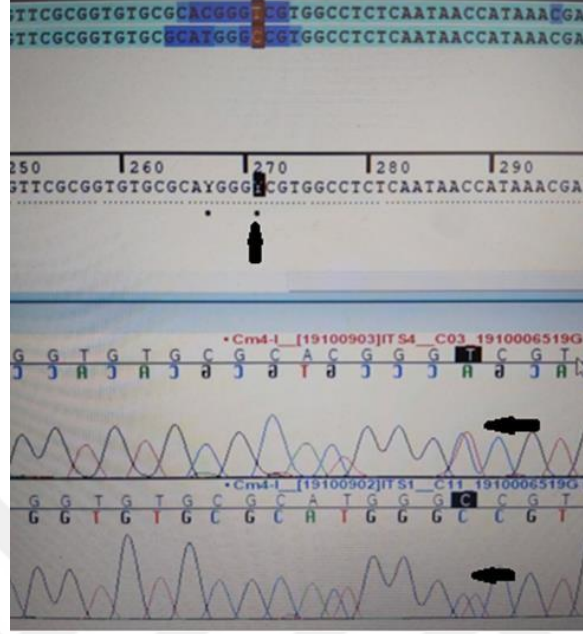


Şekil 4.2: BioEdit programında elde edilmiş örnek bir kontig dizisi

Epitrachys seksiyonunda bulunan ve bu çalışmaya konu olan *Cirsium ciliatum* subsp. *szovitzii* taksonundan beş farklı birey ve *C. macrobotrys* türünden de biri bu çalışmada elde edilmiş olmak üzere beş farklı birey analiz edilmiştir. Bu taksonlar atasal karakterdedir ve *Cirsium* × *erzurumicum* hibritinin ataları olduğu, arazi çalışmaları esnasında tespit edilmiştir. *Cirsium ciliatum* subsp. *szovitzii* taksonuna ait bireyler bu çalışmada ilk kez çalışılmıştır. *Cirsium macrobotrys* türünün popülasyonlarının *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* popülasyonları ile çakıştığı alanlardan bir örnek çalışılabilmiş (Cm8) ve ayrıca daha önceki çalışmalarda kullanılmış olan ve gen bankasına (N.C.B.I.) yüklenmiş bulgulardan da üç farklı *C. macrobotrys* bireyi çalışmamızda elde edilen bulgulara dahil edilmiştir. *Cirsium* × *erzurumicum* hibritlerinden de 3 farklı birey analiz edilmiş ve bunların atasal taksonları ile filogenetik ilişkileri analiz edilmiştir (Tablo 4.1).

DNA izolasyonları gerçekleştirilen farklı bireylerin PZR çalışmaları en olumlu sonuçlananlar ve sonrasında dizileme işlemlerinde olumlu veriler elde edilenler ITS ve ETS bölgeleridir. Ayrıca, çekirdek genomuna ait olan bu bölgeler türemiş nükleotid karakterleri hakkında bilgi vermektedir. Şekil 4.3, *Cirsium* × *erzurumicum* (BY17228) hibritine ait Sequencher programından alınmış örnek bir şekildir. Elde edilen kontig verilerine göre, 271. nükleotide (ok ile gösterilen) DNA dizisinde bir heterozigotluk durumu görülmektedir (aynı durum 267. nükleotit sırasında (Y (C/T) olan konumda da görülmektedir). Bu gibi durumlarda kontigler dikkatli bir şekilde elde edilmiş ve bu bölgeler bilhassa not edilmiştir. Daha sonraki aşamalarda, hibritler ve ataları beraber hizalandığında polimorfik bölgelerin karşılaştırılması oldukça faydalı olmuştur. Diğer ITS dizileri de incelendiğinde, *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* taksonuna ait olan BY16278 kodlu birey ile TD3538 toplayıcı kodlu hibrite ait dizileme sonucunda temiz veriler elde edilememiştir. Bu bireylerin PZR çalışmaları olumlu sonuçlanmış olsa bile ham dizilerinin kalitesi %60'lar civarında kalmıştır. Bundan dolayı, filogenetik analizlere dahil

edilememişlerdir. Elde edilen ham DNA dizileri ortalama olarak 700 nükleotitten oluşmaktadır.



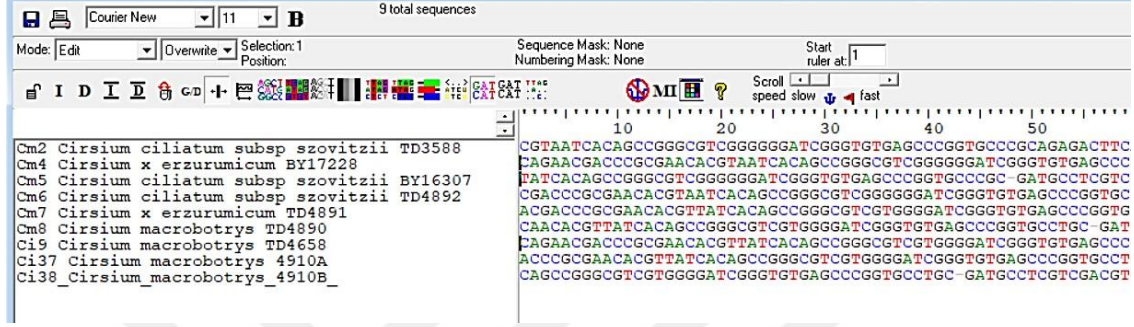
Şekil 4.3: Sequencher programından elde edilmiş ve heterozigot bölgeleri gösteren bir örnek (BY17228 kodlu örneğin ITS dizileri)

ETS DNA dizileri de daha önce belirtildiği gibi, hibritler ve ataları arasındaki polimorfik bölgeler yani türemiş bölgeler hakkında bilgi vermektedir. ITS dizilerinde olduğu gibi *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* BY16278 kodlu bireyden ETS dizilemesinde de olumlu sonuç alınamamıştır. Yine ITS dizilerinde olduğu gibi TD3538 toplayıcı kodlu hibrite ait veriler elde edilememiştir, ayrıca TD4891 kodlu ETS dizileri de analiz edilmek için oldukça kirliydi. Elde edilen ham dizi sayısı ortalama olarak 580-585 civarında olmuştur. Tüm incelenmiş ve işlenmiş dizilerin kontigleri metin dosyası şeklinde kaydedilip, hizalama programı için uygun hale getirildi. Kloroplast DNA genomundan ise *trnL-F* ve *rpl32* bölgeleri çalışılmış olsa bile iki kez dizileme işlemi yapılmasına rağmen maalesef büyük çoğunlukla olumlu sonuç alınamamıştır.

4.4.2 Dizilerin Hizalanması

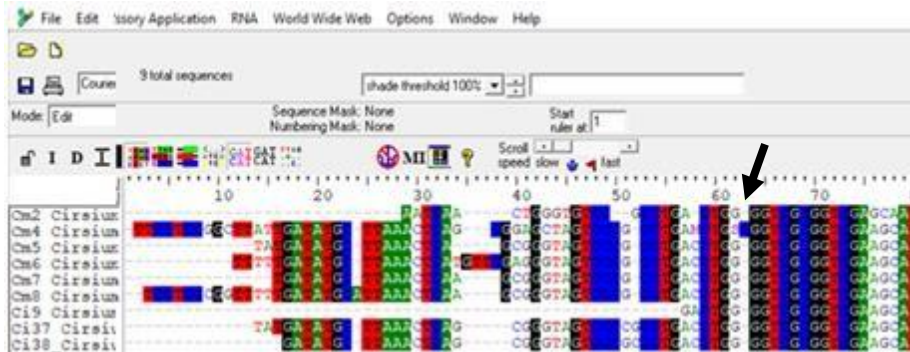
Filogenetik ağaçların elde edilmesinden önce önemli bir basamak da bu elde edilen işlenmiş dizilerin alt alta getirilerek hep beraber hizalanması ve bunların beraber analiz edilmesidir. Daha önce bahsedildiği gibi, Genoks firmasından elimize ulaşan ham diziler Sequencher veya BioEdit programlarıyla analiz edildi ve düzenlendi. Bir önceki aşamada

metin dosyası şeklinde kaydedilmiş olan farklı taksonlara ait aynı bölge BioEdit programında açıldı. Bu işlem için öncelikle tek bir kontig dizisi dosyası BioEdit ile açıldı. Daha sonra, aynı bölgeye ait diğer taksonların dizileri “import” komutuyla aynı dosya içerisine getirildi. Bu şekilde alt alta getirilmiş diziler artık hizalanma için hazır konuma gelmiş oldu. Şekil 4.4’te hizalanmamış ve kesilmemiş DNA dizilerine ait bir görüntü bulunmaktadır.



Şekil 4.4: Henüz hizalanmamış ITS dizileri

Bu haliyle çalışmalarımızda anlamlı sonuçlar elde edilemeyeceğinden ve diziler doğru bir şekilde alt alta gelemeyeceğinden Şekil 4.5’teki gibi BioEdit programı ile hizalandılar. Hizalama işlemi için programda “Clustal W multiple alignment” komutu kullanıldı. Şekil 4.5’te verilen diziler, 64. nükleotid pozisyonuna kadar henüz tam olarak hizalanmış değildir. Bu bölge bizim çalışmalarımız için kirlilik içeren bir bölgedir bundan dolayı elde edilen hizalanmış diziler 5’ kısmından 64. nükleotid pozisyonuna kadar (ok ile gösterilen yer), 3’ ucundan ise 641. nükleotitten sonra 70-80 bazlık bir bölge yine aynı şekilde kesilmiştir.



Şekil 4.5: Hizalanmış fakat kesilmemiş ITS dizileri

Gerekli hizalama ve ardından kesme işlemi yapıldıktan sonra, alt alta doğru bir şekilde getirilmiş DNA dizilerinin arasındaki tek nükleotitik değişimlerin kontrolü için tekrar Sequencher veya BioEdit programlarına başvuruldu. ITS DNA dizisi için, çalışılan grubun filogenetik pozisyonunu daha doğru bir şekilde görebilmek adına *Epitrichys* seksiyonuna ait olan ve atasal türlere diğer taksonlara göre daha yakın olan bazı taksonlar da kullanıldı. Bunun için gen bankasından alınan (N.C.B.I) örneklerin gen bankası kodları Tablo 4.2 ve 4.3'te hemen takson isimlerinden sonra verilmiştir. Tüm örnekler, BioEdit programına eklendikten sonra yine Şekil 4.4 ve 4.5'te olduğu gibi hizalama işlemlerine tabi tutuldu. Dış gruplar eklendikten sonra gerekli incelemeler ve hizalamalar yapıp, yine 5' ve 3' uçlarından gereksiz diziler kesildikten sonra elde edilen nükleotid sayısı ortalama olarak 622 oldu. Dış gruplarla beraber toplam çalışılan takson sayısı da 25'e yükseldi.

ITS verileri daha önce bahsedildiği üzere türemiş karakterler açısından en bilgi verici bölgeydi. Bununla beraber ETS verileri de günümüzde ve bu çalışmada başvuru önemli bir alandır. ETS dizilerini daha doğru yorumlayabilmek için yine ITS'de olduğu gibi gen bankasından dış gruplar seçildi. Bununla ilgili elde edilen bulgular bir sonraki bölümde verilmiştir.

Hizalama işlemleri tamamlanıp gerekli düzeltmeler de yapıldıktan sonra elde edilen dosya Fasta formatında (.fas) kaydedildi (Fasta formatında kaydedilen bu dosyanın üzerinde kolaylıkla değişiklik yapılabilir ve sonraki aşamalarda kullanılacak olan filogenetik ağaçlar için temel oluşturuyor). Fasta formatında kaydedilen bu incelenmiş dosya bir kez daha doğrulama yapmak için internet üzerinden ücretsiz olarak kullanılabilen MUSCLE (Multiple Sequence Alignment) programı ile yeniden hizalandı ve son kez kontrol edildi.

4.4.3 Elde Edilen Diziler

Çalışmamızda önceden de bahsedildiği üzere 4 farklı bölge çalışıldı. Çalışılan taksonların ITS ve ETS bölgeleri çoğunlukla uygun bir şekilde çoğaltılıp dizilendi. Ancak, *trnL-F* ve *rpl32* DNA bölgelerinde aynı sonuçlar elde edilemedi. Her iki bölgede de PZR işlemleri olumlu sonuçlanmasına rağmen *trnL-F* dizilerinden sadece üç örnek elde edilirken, *rpl32* dizileri ise elde edilmesine rağmen analiz işlemleri için sadece bir tanesi uygun uzunlukta olacak şekilde temiz olarak elde edildi. Diğer örneklerden ikisinin dizileri 150 baz civarında temizlik gösterdi fakat diğerleri analiz edilecek kadar temiz değildi. Bu yüzden *trnL-F* ve *rpl32* dizileri ile filogenetik ağaçlar elde edilemedi.

4.4.3.1 Elde Edilen nrITS Dizileri

Tablo 4.2’de çalışılan taksonlar ile gen bankasından alınan verilerin karşılaştırılması verilmiştir. Dış gruplar ve *C. macrobotrys* türüne ait olan gen bankası kodları görüldüğü üzere iki büyük harf ile 6 rakamdan oluşmaktadır. Diğer taksonların kodları ise bizim verdiğimiz toplayıcı kodlarıdır. Elde edilen verilere göre, 13 nükleotid dizisinde, çalışılan tüm gruplar ele alındığında ayırt edici karakterler elde edilmiştir. Bu 13 nükleotitlik dizilerin olduğu lokuslar 25, 43, 69, 94, 109, 223, 227, 430, 453, 460, 595, 618 olarak belirlenmiştir. Tablo 4.2’de verilen A (Adenin), G (Guanin), C (Sitozin) ve T (Timin) standart nükleotitlerinin yanında bazı harf kodları da bulunmaktadır. Bunların açılımı ise şu şekildedir: Y: C/T, R: A/G, M: A/C, W: A/T, K:G/T.

Tablo 4.2: ITS verilerine göre farklılık gösteren nükleotid dizileri

| Takson | Gen Bankası Kodları/ Toplayıcı Numaraları (TD, BY ile başlayanlar) | 2 | 4 | 6 | 9 | 9 | 1 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | 5 | 6 |
|---|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 5 | 3 | 9 | 4 | 7 | 0 | 2 | 2 | 3 | 5 | 6 | 9 | 1 |
| | | | | | | | 9 | 3 | 7 | 0 | 3 | 0 | 4 | 8 |
| <i>Cirsium ciliatum</i> | MN335061 | A | G | C | C | A | C | C | C | C | C | A | C | A |
| <i>Cirsium ciliatum</i> subsp. <i>szovitzii</i> | TD4892 | A | G | C | C | A | C | C | C | C | C | A | C | A |
| | TD3588 | A | G | C | C | A | C | C | C | C | C | A | C | A |
| | BY16307 | A | G | C | C | A | C | C | C | C | C | A | C | A |
| | MK298336 | A | G | C | C | A | C | C | C | C | C | A | C | A |
| <i>Cirsium</i> × <i>erzurumicum</i> | TD4891 | W | K | Y | Y | R | Y | Y | Y | M | Y | R | Y | M |
| | BY17228 | W | K | Y | Y | R | Y | Y | Y | M | Y | R | Y | M |
| <i>Cirsium macrobotrys</i> | TD4890 | T | T | T | T | G | T | T | T | A | T | G | T | C |
| | MK298347 | T | T | T | T | G | T | T | T | A | T | G | T | C |
| | MK298345 | T | T | T | T | G | T | T | T | A | T | G | T | C |
| | MK298346 | T | T | T | T | G | T | T | T | A | T | G | T | C |
| | MN335091 | T | T | T | T | G | T | T | T | A | T | G | T | C |
| <i>Cirsium sintenisii</i> | MN335098 | A | G | C | C | A | C | C | C | C | C | A | C | A |
| <i>Cirsium rigidum</i> | MN335096 | A | G | T | C | G | T | T | C | T | T | G | C | C |
| <i>Cirsium handaniae</i> | MN335085 | A | T | T | C | G | T | T | - | T | C | A | C | C |
| | MN335103 | A | T | T | T | G | T | T | T | A | T | G | T | C |
| <i>Cirsium yildizianum</i> | MN335100 | A | G | C | C | G | C | C | C | C | C | G | T | C |
| <i>Cirsium steirolepis</i> | MN335084 | A | G | T | C | A | C | C | C | - | C | A | C | A |
| <i>Cirsium eriophorum</i> | MN335074 | A | G | C | C | A | C | C | C | C | C | A | C | A |
| <i>Cirsium boluense</i> | KT249782 | A | A | T | T | G | T | C | T | C | C | G | T | C |
| <i>Cirsium arvense</i> | MN335081 | A | A | C | T | G | C | C | T | C | C | G | T | T |
| <i>Cirsium creticum</i> | MN335088 | A | A | C | T | G | C | C | C | C | C | G | T | C |
| <i>Cirsium leucopsis</i> | KU221043 | A | A | T | T | G | T | C | T | C | T | G | C | C |
| Diğer cinsler | <i>Carduus amarus</i> | A | A | T | T | G | T | C | T | C | T | G | C | C |
| | <i>Carduus candicans</i> | A | A | T | T | G | T | C | T | C | T | G | C | C |
| | <i>Carduus argentatus</i> | A | A | T | T | G | T | C | T | C | T | G | C | C |

4.4.3.2 Elde Edilen nrETS Dizileri

ETS çalışmalarından şu örneklere ait diziler elde edilmiştir: 4 farklı *Cirsium ciliatum* subsp. *szovitzii* örneği (TD3588, TD4446, TD4892 ve BY16307) ve TD4890 toplayıcı kodlu *C. macrobotrys* örneği. Bu beş örneğin ETS dizileri ilk kez bu çalışmada elde edilmiştir. Diğer yandan, diğer ata olan *C. macrobotrys* için ise yine ITS karşılaştırmasında olduğu gibi daha önce elde edilen veriler kullanılmıştır. Bu örneklerin de gen bankası kodları Tablo 4.3’ de verilmiştir. Dizilerin 5’ ve 3’ uçlarındaki anlamsız diziler kesildikten sonra hizalanıp eşitlenmiş dizilerde, kullanılabilir ve bizim için anlamlı baz uzunluğu 584-585 olmuştur. Tablo 4.3 incelendiğinde, 4 lokusta (223, 318, 342 ve 468) çalışılan taksonlar arasında farklılıklar gösterilmiştir. Buna göre, hibrit birey *C. ciliatum* bireylerinden ziyade *C. macrobotrys* bireylerine benzer diziler içermektedir. 585 dizide sadece 4 lokusun farklı olmasından dolayı, elde edilen filogenetik ağaçlar filogeniyi çözmediği için filogenetik ağaçlar eklenmemiştir.

Tablo 4.3: ETS verilerine göre farklılık gösteren nükleotid dizileri (bu çalışmada elde edilenler “*” ile gösterilmiştir).

| Takson | Kod | 2 | 3 | 3 | 4 |
|---|----------|---|---|---|---|
| | | 2 | 1 | 4 | 6 |
| | | 3 | 8 | 2 | 8 |
| <i>Cirsium ciliatum</i> subsp. <i>szovitzii</i> | TD3588* | G | T | C | T |
| | TD4446* | G | T | C | T |
| | TD4892* | G | T | C | T |
| | BY16307* | G | T | C | T |
| <i>Cirsium macrobotrys</i> | TD4890* | - | A | T | C |
| | MK301499 | - | A | T | C |
| | MK301500 | - | A | T | C |
| | MK301498 | - | A | T | C |

4.4.3.3 Elde Edilen *trnL-F* Dizileri

Çalışılan örneklerden PZR numuneleri daha önce de bahsedildiği üzere uygun bir şekilde elde edilmiştir. Agaroz jel elektroforezinde kontrol edilen örnekler dizileme işlemleri için uygun görülüp, bu numuneler dizileme firmasına gönderilmiştir. Fakat, hemen hemen bütün örnekler ikişer kez diziletilmesine rağmen ancak beş örnekte anlamlı ve işlenebilir diziler elde edilmiştir. Bu beş örnekten üçü *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* (TD3588, TD4446 ve TD4892), bir tanesi *Cirsium* × *erzurumicum* (TD4891) melezine ait örnek ve son olarak da bir örnek *C. macrobotrys* (TD4890) örneğidir. Bu örneklere ek olarak, *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* ve *C. macrobotrys* taksonlarına ait olan ve daha önce çalışılıp gen

bankasına yüklenmiş iki örneğe ait diziler de analize dahil edilmiştir. İşlenmiş fakat hizalanmamış dizilerin uzunluğu 831-850 arasında değişiklik gösterirken, hizalanmış dizi uzunlukları ise 831-841 arasındadır. 10 bazlık farklılığın nedeni ise *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* TD4892 kodlu bireyinde bulunan 728-738 nükleotitleri arasındaki 10 bazlık insersiyondan kaynaklanmıştır. Dizi sayısının fazla olmasına rağmen maalesef çalışılan taksonlar için ayırt edici bir sonuç elde edilememiştir. 5 örneğin dizileri ise şu şekildedir:

Cirsium ciliatum subsp. *szovitzii* TD3588:

AAACTTACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCCTGGAATTAATAAAA
ATGGGCAATCCTGAGCCAAATCACGTTTTCCGAAAACAAACAAAGGTTTCAGAA
AGCGAAAATCAAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCGATGGAAGCTGTTCTAACG
AATGGAGTTGATTGTCTTACGTTGGTAAAGGAATCCTTCTATTGAAACTTCATA
AAAGATGAAGGATAAACCTGTATACATAATATAGAAGAATTGTTGTGAATCGA
TTCCATATTGAAGAAAGAATCGAATATTCATTGCTCAAACAATTCACTCCATAA
TCTGATAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTC
CCGTTCTACATGTCAATACCGGCAACAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAATC
CGTCGATTTAAAAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAAGACCA
TTTGACTCCCTAATTATTTCTCGTATCCTTTTTATTTATTTTATCCTTTTTTTCCTT
AGCGGTTCAAAATTCCTTATCTTTTCTTTCATTCACTACTCTTTATACAAATG
GATCTCAGCGGAAATGCTGTTCTTATCACATATGATATATATGATACATGTA
CAAATGAACATCTTTGAGCAAGGAATCCCCATTTGAATGATTCACGATCGATA
TTTTTATTCATACTGAACTTACAAAGTTGTTATTATAGGACCTGGATGAGGCT
TTGTAATACCCTTTCAATTGACATAGACCCAAGTTATCTAGTAAAATGAAAATG
AGGATGAGACATCAGGAATAGTCGGGA

Cirsium ciliatum subsp. *szovitzii* TD4446:

TATCCTCATTTTCATTTTACTAGATAACTTGGGTCTATGTCAATTGAAAGGGTA
TTACAAAGCCTCATCCAGGTCCTATAATTTGTCAAAGAACAACCTTTGTAAGTT
TCAGTATGAATAAAAATATCGATCGTGAATCATTCAAATGGGGATTCCTTGCTC
AAAGATGTTTCAATTTGTACATGTATCATATATATCATATGTGATAAGAGAACAG
CATTTCCGCTGAGATCCATTTGTATAAAGAGTAGTGAATGAGAAAGAAAAGAT
AAGGAATTTTGAACCGCTAAGGAAAAAAGGATAAAATAAATAAAAAGGATAC
GAGAAATAATTAGGGAGTCAAATGGTCTTTTTGGGGATAGAGGGACTTGAACC
CTCACGATTTTTTAAATCGACGGATTTTCTCTTACTATAAATTCATTGTTGCC

GGTATTGACATGTAGAACGGGACTCTATCTTTATTCTCGTCCGATTAATCAGTT
CTTCAAAAGATCTATCAGATTATGGAGTGAATTGTTTGAGCAATGAATATTCG
ATTCTTTCTTCAATATGGAATCGATTCACAACAATTCTTCTATATTATGTATAACA
GGTTTATCCTTCATCTTTTATGAAGTTTCAATAGAAGGATTCTCTACCAACGT
AAGACAATCAACTCCATTCGTTAGAACAGCTTCCATCGAGTCTCTGCACCTATC
CTTTTTGATTTTCGCTTTCTGAACCTTTGTTTGTTCGGAAAACGTGATTTGGC
TCAGGATTGCCCATTTTTATTAATTCCAGGGTTTCTCTGAATTTGAAAG

Cirsium ciliatum subsp. *szovitzii* TD4892:

AAACTTACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCCTGGAATTAATAAAA
ATGGGCAATCCTGAGCCAAATCACGTTTTCCGAAAACAACAAAGGTTTCAGAA
AGCGAAAATCAAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCGATGGAAGCTGTTCTAACG
AATGGAGTTGATTGTCTTACGTTGGTAGAGGAATCCTTCTATTGAAACTTCATA
AAAGATGAAGGATAAACCTGTATACATAATATAGAAGAATTGTTGTGAATCGA
TTCCATATTGAAGAAAGAATCGAATATTCATTGCTCAAACAATTCACTCCATAA
TCTGATAGATCTTTTGAAGAAGTGAATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTC
CCGTTCTACATGTCAATACCGGCAACAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAATC
CGTCGATTTAAAAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAAGACCA
TTTGACTCCCTAATTATTTCTCGTATCCTTTTTATTTATTTATCCTTTTTTCTT
AGCGGTTCAAATTCCTTATCTTTTCTTCTCATTCACTACTCTTTATACAAATG
GATCTCAGCGGAAATGCTGTTCTTATCACATATGATATATATGATACATGTA
CAAATGAACATCTTTGAGCAAGGAATCCCCATTTGAATGATTCACGATCGATA
TTTTTATTCATACTGAAACTTACAAAGTTGTTCTTTTGACAAATTATAGGACCT
GGATGAGGCTTTGTAATACCCTTTCAATTGACATAGACCCAAGTTATCTAGTAA
AATGAAAATGAGGATGAGACATCAGGAATAGTCGGGA

Cirsium × *erzurumicum* TD4891:

AAACTTACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCCTGGAATTAATAAAA
ATGGGCAATCCTGAGCCAAATCACGTTTTCCGAAAACAACAAAGGTTTCAGAA
AGCGAAAATCAAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCGATGGAAGCTGTTCTAACG
AATGGAGTTGATTGTCTTACGTTGGTAAAGGAATCCTTCTATTGAAACTTCATA
AAAGATGAAGGATAAACCTGTATACATAATATAGAAGAATTGTTGTGAATCGA
TTCCATATTGAAGAAAGAATCGAATATTCATTGCTCAAACAATTCACTCCATAA
TCTGATAGATCTTTTGAAGAAGTGAATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTC

CCGTTCTACATGTCAATACCGGCAACAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAATC
CGTCGATTTAAAAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAAGACCA
TTTGACTCCCTAATTATTTCTCGTATCCTTTTTATTTATTTATCCTTTTTTCCTT
AGCGGTTCAAATTCCTTATCTTTTCTTTCTCATTCACTACTCTTTATACAAATG
GATCTCAGCGGAAATGCTGTTCTCTTATCACATATGATATATATGATACATGTA
CAAATGAACATCTTTGAGCAAGGAATCCCCATTTGAATGATTCACGATCGATA
TTTTTATTCATACTGAAACTTACAAAGTTGTTATTATAGGACCTGGATGAGGCT
TTGTAATACCCTTTCAATTGACATAGACCCAAGTTATCTAGTAAAATGAAAATG
AGGATGAGACATCAGGAATAGTCGGGA

C. macrobotrys TD4890:

AACTTACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCCTGGAATTAATAAAAA
TGGGCAATCCTGAGCCAAATCACGTTTTCCGAAAACAAACAAAGGTTTCAGAAA
GCGAAAATCAAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCGATGGAAGCTGTTCTAACGA
ATGGAGTTGATTGTCTTACGTTGGTAGAGGAATCCTTCTATTGAAACTTCATAA
AAGATGAAGGATAAACCTGTATACATAATATAGAAGAATTGTTGTGAATCGAT
TCCATATTGAAGAAAGAATCGAATATTCATTGCTCAAACAATTCCTCCATAAT
CTGATAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCC
CGTTCTACATGTCAATACCGGCAACAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAATCC
GTCGATTTAAAAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAAGACCAT
TTGACTCCCTAATTATTTCTCGTATCCTTTTTATTTATTTATCCTTTTTTCCTTA
GCGGTTCAAATTCCTTATCTTTTCTTTCTCATTCACTACTCTTTATACAAATGG
ATCTCAGCGGAAATGCTGTTCTCTTATCACATATGATATATATGATACATGTAC
AAATGAACATCTTTGAGCAAGGAATCCCCATTTGAATGATTCACGATCGATAT
TTTTATTCATACTGAAACTTACAAAGTTGTTCTTTTGACAAATTATAGGACCTG
GATGAGGCTTTGTAATACCCTTTCAATTGACATAGACCCAAGTTATCTAGTAAA
ATGAAAATGAGGAT

4.4.3.4 Elde Edilen *rpl32* Dizileri

Çalışmalara başlamadan önce *rpl32* bölgesinin seçilme nedeni bu bölgenin daha önceki çalışmalarda çok fazla çalışılmaması ve gen bankasında (NCBI) da sadece 17 kaydının -ki bunlar da tam kloroplast genomu şeklinde- bulunmasıydı. Fakat, DNA izolasyonları ve PZR çalışmaları uygun şekilde tamamlansa bile dizilenen örnekler elimize kirli ulaştı. Sonuç olarak, sadece bir diziye uygun boyutlarda ulaşabildik. *Cirsium macrobotrys*

türünün TD4890 kodlu örneğinden elde edilen işlenmiş dizi boyutu 988 baz olarak elde edildi.

Elde edilen dizi şu şekildedir:

Cirsium macrobotrys TD4890

```
CTTGCTCGAACTCATAATAGGCCTATTTATATTCCAATCGTCGAGATTGAACCA
AGTCAATTCCAATCAAATAAGTTTTTTTAGCAAAGATTA AAAATTGATAAAAAAA
ATGAGTTCAAAGTAAATTTCAAGGTTTCATTAGTTTCTTAGGGTGTCCGGTTTA
TTTATCTTAGGGCTTTGACGTAGTTTATCCTAGTCTAAAATCCAACCTTTTGCAA
CTAGAGAATTCTATCCATAGAATAAAAAAAAAAATGTTTTTCATATTGATACTTA
ATTATTTCTCGTTTATCTGATTTTCATAAATTTGAAACAAAAAATAAATTTTCTC
AATGAATCCAAAATAGCCATATTTTGGATTACTCCAAATTGACACCTTATTTGT
ACATAATATCTCAACAATTAAGTTCTTTTATTGAGTGGGCTGAAAATTGGAGAT
ATATAGGAAATCCATATAGTAATTCCGATAAATTAAGAAGTCAGAAAGTTATC
AAAAAGAAAAATTTTTTAACATGGAATCAATTAGTTTCAACAATTCATTAATTT
TAACGAAAAATATTATATCTGCCCTTCTCGAGAAAGATAAAAATTTTTCATTAT
TGTAAGGTTCGATGGGGAAAATAAGACTCCCCACCACCACAATGTGAGTGAA
AATATACGAAAAATAAATAAAAAAATCTTGTATTTTTTTCTTTATTCGTTTTTTTA
GAATTGAGAAAACAGAAGAATTATTCTTTTAGACATCTTAGAAGATTAAGATT
GAAACCTGGTCTATTTTCATATTGATTAGAATAGGGACTACCAATTGTGAATTTT
ATATTAACAAATTACTGAGCCAATTTTTCGAGTAAAATCCATTCCGATTATTCC
AATATTTTAGGACTTATTTGTTTGTTCGTACAAAAAACTTTTTGAATTCCCGGT
AGAAAGAGATTTCCCTAATGACAAAGCTTTTAACGCCGCCCAATATCCTTTCCT
TTTCCAAAATATTTTTATCGA
```

45 Filogenetik Analiz

Yukarıda da bahsedildiği gibi, nrITS dizileri yeterli miktarda elde edildi. Fakat, nrETS dizilerinin az sayıda ve filogenetik ilişkiyi çözmemesinden, ek olarak kloroplast genomundan çalışılan bölgelerin de yeterli sayıda elde edilememesinden dolayı filogenetik ağaçların elde edilmesinde ve yorumlanmasında elverişli olmadıkları için kullanılmamışlardır.

nrITS DNA dizileri ise hizalandıktan sonra .nexus formatındaki bir dosya olacak şekilde dönüştürüldü. Yöntemlerde bahsedildiği gibi bu formata dönüştürülen dosya PAUP*

programında kullanılabilir hale getirilmiş oldu. Nexus formatındaki dosya PAUP* programına yüklenerek maksimum parsimoni ve maksimum likelihood analizleri yapıldı.

4.5.1 ITS Bölgesinden Elde Edilen Filogenetik Ağaçlar

Bu çalışmada kullanılan *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* ve *C. macrobotrys*, cinsin *Epitrachys* seksiyonuna ait olan bireylerdir. Tablo 4.2’de gösterildiği gibi, nrITS verilerinde filogenetik pozisyonu daha iyi görebilmek için ayrıca *Cirsium* ve *Cephalonoplos* seksiyonuna ait bazı taksonlar da dış grup olarak kullanılmıştır. Ayrıca, en dış grup olarak da *Carduus* cinsine ait örnekler kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan örneklerin toplayıcı kodları ile dış grup olarak seçilen ve daha önceki çalışmalarda kullanılıp dizileri gen bankasına yüklenmiş örneklerin gen bankası erişim kodları da tabloda verilmiştir.

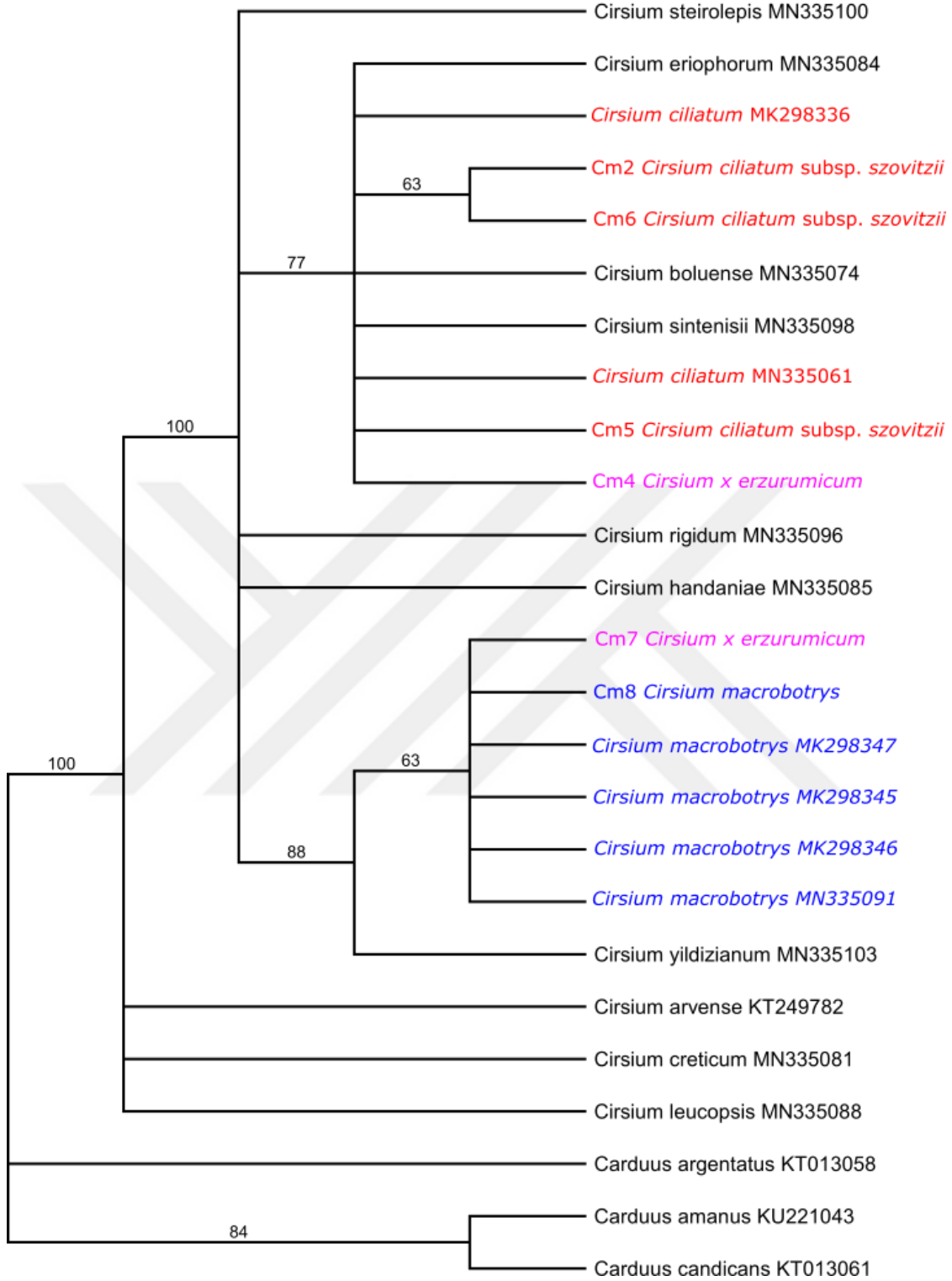
Filogenetik analizler için, karakter temelli metotlardan Parsimoni yönteminde en iyilik kriteri (optimality criterion) seçilip bootstrap analizi yapılmıştır, ek olarak maksimum benzerlik (maksimum likelihood) metoduna göre de aynı analizler yapıp sonuçları karşılaştırılmıştır. Ayrıca mesafe temelli yöntemlerden NJ (Neighbor Joining) metodu seçilerek fenetik analizleri de yapılmıştır.

4.5.1.1 Bootstrap Analizi Sonucunda Elde Edilen Ağaç

PAUP* programına öncelikle nexus formatındaki nrITS dizilerini içeren dosya yüklendi ve analiz kısmında yer alan karakter temelli metotlardan Parsimoni yöntemi en iyilik kriteri (optimality criterion) seçilip, arama algoritması olarak full heuristic araştırma ile bootstrap metodu seçilerek analiz yapıldı. Filogenetik ağacın optimizasyonu için ACCTRAN (Accelerated transformation) seçilmiş, globoff kriterinin K değeri de 2 olarak ayarlanmıştır. Toplam döngü sayısı 10000 olacak şekilde ayarlanmış ve analiz yapılmadan önce dış grup olarak çalışılan grup programda dış grup olarak el ile seçilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen ağacın tutarlık indeksi (CI): 0,728, koruma indeksi (RI): 0,841 ve homoplazi (türememiş karakter-analoji) indeksi (HI): 0,272’dir. Bu değerler ise dış gruplarla beraber toplam 25 bireyden elde edilen 622 karakterden elde edilmiştir. Bunların 534 tanesi sabit karakter (0,85), geri kalanlardan 32 tanesi parsimonik açıdan bilgi verici olmayan değişken karakter, 56 tanesi ise parsimonik açıdan bilgi verici karakterdir.

Şekil 4.6’da verilen filogenetik ağaçtaki dallarda görülen iki rakamlı değerler o ağacın bootstrap analizi sonucu elde edilmiş değerleridir. Bir değer 100’e ne kadar yakınsa o dalın elde edilme olasılığı o kadar yüksektir. Yani bu değerlerin analizinin yüzde oran olarak hangi sıklıkla çıkacağını bize göstermektedir.

Bootstrap consensus tree

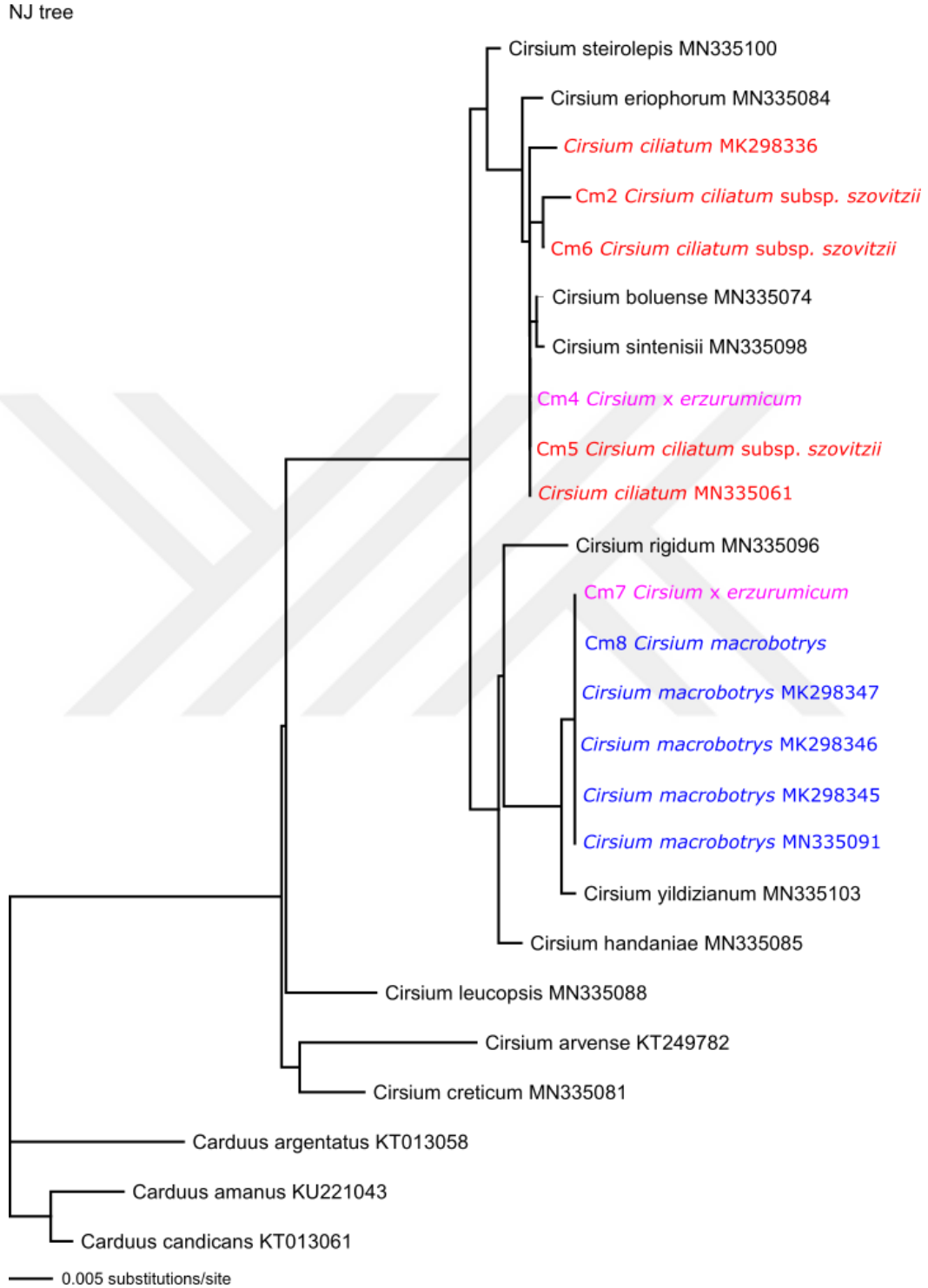


Şekil 4.6: ITS verilerine göre elde edilmiş maksimum parsimoni ağacı

4.5.1.2 Neighbour Joining (NJ) Analizi Sonucunda Elde Edilen Ağaç

Neighbour Joining (NJ) ağaçlarını elde etmek için yine PAUP* programına yüklenmiş olan nexus formatındaki dosya kullanılmıştır. Kullanılan 622 karakter için PAUP* programında

tüm karakterler eşit ağırlıktadır ve mesafe uzaklığı düzeltilmemiş olarak seçilmiştir. Mesafe temelli yöntemlerden olan bu yöntemden elde edilen ağaç Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7: ITS verilerine göre elde edilmiş Neighbour Joining (NJ) ağacı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 Morfolojik Bulguların Değerlendirilmesi

Şekil 2.1 ve Tablo 5.1 incelendiğinde, atasal taksonlar olan *Cirsium macrobotrys* ve *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* bireyleri ile bu taksonlar arasında meydana gelen hibritler, morfolojik olarak birbirine benzeyen bazı karakterlere sahipken aynı zamanda ayırt edilebilmelerinde kullanılabilen karakterler de mevcuttur. Aynı ortamı paylaşabilmeleri (Şekil 2.1) üç farklı bireyin birbirine morfolojik olarak daha da yaklaşmasını sağlayabilirken (bilhassa hibrit bireylerin sayısının, populasyonunun ve çeşitli formlarının artmasıyla beraber), birbirlerinden daha uzak alanlarda yayılış gösteren atasal taksonlardaki morfolojik farklılıklar daha bariz ve dikkat çekici hale gelmektedir.

Hayat formundaki farklılıklar genel olarak *Cirsium* cinsinde bazı yakın akraba türlerin ayırt edilmesi için kullanılabilir. Bu çalışmada kullanılan taksonlardan biri olan *C. macrobotrys* her ne kadar çok yıllık bir forma sahip olsa da iki yıllık yaşam döngüsüne sahip olan bireyler de gözlenebildiğinden tam olarak hayat formları bu çalışmada kullanılan bireyleri ayırmada kullanılacak bir karakter olarak değerlendirilemez. Diğer yandan, *C. macrobotrys* türünün gövdelerinin dallanmamış olması bu türü *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* ve hibrit bireylerden ayırt etmede kullanılabilir (Şekil 2.1, Tablo 5.1). İvoluklar yaprakların involukrumdan kısa olması açısından değerlendirildiğinde ise *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* taksonu *C. macrobotrys* ve hibrit bireylerden ayırt edilmektedir. Çiçek düzenleri incelendiğinde, kapitulumların belirgin olarak sapsız olması yine *C. macrobotrys* türlerinin diğer bireylerden ayrılmalarına olanak sağlamaktadır. Fillari özellikleri incelendiğinde (Tablo 5.1), üç farklı bireyin de ayırt edilmesinde kullanılacak oldukça önemli bir karakterdir. Diğer yandan orta fillarilerin uzunlukları ve uç dikenlerinin uzunlukları açısından *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* daha kısa orta fillari ve uç dikenlerine sahiptir. Korolla renginin ise *C. macrobotrys* türünde sarımsı beyaz olması en ayırt edici karakterlerden birisidir. Papus karakterlerine bakacak olunursa, papus uzunluklarının hibrit bireylerde daha çok iki atasal taksonun arasında bir uzunluğa sahip olduğu görülmüştür.

Tabloda verilen özelliklere ek olarak taksonların betimleri incelenecek olursa, atasal bireyler ile hibritleri arasında farklı ara karakterlerin ya da uzunlukların olduğunu da görebilmekteyiz. Örneğin, *C. macrobotrys* bireyleri 300 cm boylarına kadar nadiren olsa

da uzayabilse de *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* bireyleri daha çoğunlukla 120 cm boylarına kadar uzayabilmektedir. Oysaki, hibrit bireylerin 150 cm boylarına ulaşabildiği gözlenmiştir. Bu da hibritlerin boy uzunluğu açısından iki atasal taksonun ara boylarında olduğunu göstermektedir. *Cirsium macrobotrys* bireyelerinin gövdeleri yoğun şekilde araknoid tüylü ve hatta tomentoz (pamuksu) tüylü iken *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* bireyelerinin çok seyrek araknoid oldukları görülmektedir. Diğer yandan, hibrit bireylerin tüylenmesi ne *C. macrobotrys* kadar yoğun ne de *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* kadar seyrek değildir (Şekil 2.1).

Tablo 5.1: *Cirsium macrobotrys* ve *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* atasal taksonları ve hibritlerinin morfolojik karşılaştırılması

| | <i>C. macrobotrys</i> | <i>C. × erzurumicum</i> | <i>C. ciliatum</i> subsp. <i>szovitzii</i> |
|------------------------------|--|--|--|
| Hayat formu | İki yıllık | İki yıllık | İki yıllık |
| Genel görünüş/Gövde | Gövde tek, dallanmamış | Gövde tek, yukarıda dallanmış | Gövde tek, yukarıda birkaç veya çok sayıda dallanmış |
| İnvolutkral yapraklar | involutkrumdan uzun | involutkrum kadar ya da daha uzun | involutkrumdan kısa |
| Birleşik çiçek düzeni | Kapitula sapsız, gövdenin ucuna doğru 5-12 adeti sık bir şekilde toplanmış | Kapitulular belirgin saplı, dalların ucunda genellikle tek | Kapitulular belirgin saplı, ve dalların uç kısmında genellikle tek |
| Fillari | Alt kısım tüysüz, kenarları silsiz, uç kısım yoğun örümcek ağı tüylü | Kenarları silsiz, uç kısımlarda seyrek ila yoğun örümcek ağı tüylü | Tüysüz, kenarları belirgin silli, uç kısımlar tüysüz |
| Orta fillari | 2.5-4 mm uç dikenini dahil 13-19 mm, geriye kıvrık ya da dik | 2.5-4 mm uç dikenini dahil 15-21 mm geriye kıvrık | 1.5-3 mm uç dikenini dahil 11.5-16 dik-yayık |
| Korolla | sarımsı beyaz, | pembe ila pembemsi-mor, | pembe ya da morumsu-kırmızı, |
| Papus | 21-23 mm 22-24 mm | 25-27 mm 20-25 mm | 28-40 mm 27-29 mm |

52 ITS Bölgesi Dizilerine Dayalı Ağaçların Değerlendirilmesi

Şekil 4.6 ve 4.7’de görüldüğü üzere, çalışılan 2 melez birey aynı filogenetik özellikte değildir. Cm7 (TD4891) kodlu birey atalardan biri olan *C. macrobotrys* ile daha yakın bir ilişkiye sahiptir. Daha önce de belirtildiği gibi aynı alandan bu atasal türe ait bireyler toplanamamıştı. Fakat buna rağmen, bu ataya ait bireyler farklı alandan ve zamandan olsa da, iki melez birey *C. macrobotrys* ile daha yakın bir akrabalık göstermiştir. Her ne kadar dalın bootstrap değeri çok yüksek olmayıp 57 olsa da, bu muhtemelen daldaki *C. macrobotrys* örneklerinin daha önceki çalışmalara ait olmasından kaynaklanabilir. Diğer yandan bu örnekler halihazırda gen bankasına yüklenmiş örnekler olsa da (kodları için bkz.

Tablo 4.1) çalışmamızda kullanılan hibritlerle aynı dalı paylaşımları oldukça güzel bir sonuç olmuştur. Yani aynı alandan toplanmasına gerek olmadan bile (daha önce hibritlerin toplandığı alandan *C. macrobotrys* bireyelerine ulaşılamadığı belirtilmişti) genetik bilgi akışının olduğu ve doğal olarak bu hibritlerin ata türden olan fakat farklı populasyonlardan toplanmış bireylerle bile benzerlik taşıdığını göstermektedir.

Cm4 kodlu (BY17228 toplayıcı numaralı) bir diğer hibrit ise Şekil 4.6 ve 4.7’de görüleceği üzere *C. macrobotrys* ile değil diğer ata olan *C. ciliatum* subsp. *szovitzii* ile daha yakın bir akrabalığa sahiptir. Yine görüleceği üzere *C. macrobotrys*/hibrit grubu, seksiyonun diğer üyelerinden bağımsız bir dala sahipken *C. ciliatum*/hibrit grubunda ise *Epitrachys* seksiyonundan iki tür (*C. eriophorum* ve *C. boluense*) de bulunmaktadır. Bootstrap değeri 82 olan bu ortak dalda politomi denilen yani filogenetik ilişkinin tam çözülememesi durumu olmasına rağmen, aslında hibritlerle ilgili şu iki önemli bilgiyi vermiştir: 1- Tüm hibritler aynı ataya daha çok benzemek durumunda değildir, 2- cins içindeki hibridizasyon henüz tam olarak çözülememiştir ve hibrit bireylerin elde edilmesinde çok eski zamanlarda, aynı seksiyona ait, atalarla benzerlik gösteren farklı türler de rol oynamış olabilir.

Morfolojik ve moleküler veriler birlikte değerlendirildiğinde, birbirine uzak morfolojiye sahip iki atasal birey arasında meydana gelen hibritlerin, iki ata arasında bazı ara morfolojik uzunluk ölçülerine, tüylenme karakterlerine veya benzeri bazı ara formda morfolojik karakterlere sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılan incelemelerde, hibritlerin atalarıyla beraber olduğu bazı alanlarda, hibrit bireylerin belli bir süre sonra o alana hakim olabilecek kapasitede olduğu görülmektedir. Moleküler veriler de morfolojik veriler gibi benzer bazı özelliklere sahiptir. Hibritlerden bazıları bir atasına yakınken diğer hibrit bireyler bir diğer atasına daha yakın olabilir. Bu yakınlığın daha net gösterilebilmesi için tabiki çok daha fazla DNA bölgesi çalışılması gerekmektedir. Fakat, her ne kadar ITS bölgesi tek başına yetersiz kalabilse de bu çalışmada elde edilen verilerde olduğu gibi, ITS verileri hibritlerle ataları arasındaki geçişlerin gösterilmesi açısından morfolojik verileri destekler niteliktedir.

Bu çalışmanın da ana konusunu oluşturan ve morfolojik ve moleküler verilerle ortaya konmaya çalışılan hibritleşme yoluyla türleşme, bitkilerde oldukça yaygın bir mekanizma olarak bilinmektedir. Bitkiler aleminin en geniş familyalarından biri olan Asteraceae

familyasının *Cirsium* cinsinde de türler ve alttürler arası hibridizasyona sık sık rastlanmaktadır [394]. Cins içerisinde türlerin aynı veya yakın yayılış alanlarında bulunduğu fakat ekolojik farklılıklar nedeniyle üreme bariyerlerinin oluşabildiği simpatrik oluşumlar yüksek oranda gözlemlense de bazı durumlarda doğanın sürekli değişmesi sebebiyle ata türlerden biri veya hibrit bireylerin yaşam alanları değişip fiziksel-coğrafi engellerin oluşumuyla allopatrik türleşmeler de meydana gelebilir [395]. Hibritleşmenin fazlaca görüldüğü bitkiler aleminde polenlerin tozlaşma veya böcekler vasıtasıyla taşınabilmesi sebebiyle genellikle bu coğrafi bariyerler üreme izolasyonu oluşturmaya yetmemekte ve farklı habitatlarda yaşayan farklı türler hibritler oluşturmaya devam etmektedir.

Hibrit ve olası atalarının aynı alanı paylaşmaları durumunda, bu çalışmada da görüldüğü gibi hibrit bireylerin morfolojik yapıları ata bireylerden birine daha benzer gözüktense de ara karakterler de fazlaca gözlemlenmekte olup, bazı karakterler açısından hibrit bireyler ata bireylerden tamamen farklı özelliklerde de olabilmektedir [396-399]. Hibrit bireylerin tekrar ata bireylerden biriyle geri çaprazlama yoluyla yavru üretebilmesine imkan verecek şekilde aynı habitatı paylaşmaları, bu farklılıkların nedeninin intogresyon olabileceğini akıllara getirmektedir [400].

Ata bireyler ve hibritlerini moleküler anlamda kıyasladığımızda çalışılan hibritlerin ikisi de aynı lokuslarda farklı ebeveynlere yakınlık göstermekte olup, hibrit birey ve atalardan biri olan *C. macrobotrys* örneklerine aynı alanlardan ulaşamayıp farklı alanlardan elde edilmelerine rağmen bu benzerlik hibritleşmede allopatrik bir oluşum olarak değerlendirilebilir.

Bitki türlerinin evrimleşmesinde poliploidi önemli bir yere sahiptir [401]. Bunun yanı sıra poliploidi ve anöploidi olmak üzere iki tür hibritleşme olup poliploid türlerin uyumsal avantajları nedeniyle poliploidi daha sık görülmektedir [402]. *Cirsium* türlerinin kromozom sayılarına bakıldığında; normalde tür içi kromozom sayısı korunurken, cins içerisinde ata bireylerden sapmalar olduğu görülmektedir ve ancak farklı iki türün hibritleşmesiyle gözlemlenebilecek poliploid bireylerin varlığı da cins içerisinde hibritleşmeyle türleşmenin yoğunluğunu desteklemektedir [148].

Sonuç olarak bu tez çalışması ile, çekirdek genomuna ait ITS DNA bölgesinin, diğer çalışmalarda olduğu gibi DNA barkodlama yöntemi için oldukça kullanışlı olduğu ve hibrit bireyler ve olası atalarının tespitinde kullanılacak bölgeler arasında oldukça önemli bir yeri olduğu, ayrıca moleküler verilerin morfolojik verileri destekler nitelikte olduğu ve bu iki farklı yaklaşımın beraber kullanılmasının, hibritler ile atalarını incelemede avantaj sağladığı gösterildi. Bunun yanında moleküler filogenetik analiz ile hibritlerin atasal taksonlarla ilişkisini ve yakınlığını göstererek çalışmamızın amaçlarından önemli bir kısmına ulaştık. Bu çalışmada, hibrit bireylerin hepsinin aynı DNA dizilerine sahip olmadığı ve bazı hibritlerin bir ataya yakınken, bazılarının diğer atayla daha benzer olduğu sonucuna vardık. DNA verilerinde olan bu benzerlikler morfolojik verilerde de gözlenmektedir. Bu da cins içindeki hibritleşmenin hala devam ettiğini ve hibridizasyon ile ilgili daha kesin sonuçlara ulaşabilmemiz için daha farklı yaklaşımların ve daha fazla bireyin kullanılması gerekliliğini göstermiştir. Bu tez çalışmasının ileride daha da genişletilerek, cins içindeki türler arasında meydana gelen hibridizasyon ile alakalı olarak daha detaylı bilgilere ulaşılacağı umut edilmektedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler ile *Cirsium × erzurumicum* ilk kez tanımlanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] F. Abak, H. Akan, "The flora of Asteraceae family in Şanlıurfa/Turkey," *BioDiCon*, cilt. 7, sayı. 1, ss. 68-78, 2014.
- [2] P. H. Davis, M.R.D. Kit Tan (Eds.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol.10 (supplement 1), Edinb. Un. Press, Edinburgh, 1988, pp. 164-165.
- [3] A. Güner, N. Özhatay, T. Ekim, K.H.C. Başer (Eds.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol.11 (supplement 2), Edinb. Un. Press, Edinburgh, 2000, pp. 161-163.
- [4] P. H. Davis ve S. B. Parris, "*Cirsium* Mill.," in P.H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 5, Edinburgh University Press, Edinburgh, 1975, pp. 370-414.
- [5] B. Yıldız, "*Cirsium* Mill." in Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), A. Güner, S. Aslan, T. Ekim, M. Vural ve M.T. Babaç (Eds.), İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği yayınları, 2012, pp. 141-146.
- [6] B. Yıldız, T. Arabacı ve T. Drmenci, "Two new species of *Cirsium* (Asteraceae) and notes on allies from Turkey", *Turk J Bot*, c. 37, sayı. 6, ss. 1045-1054, Haz. 2013.
- [7] B. Yıldız, T. Arabacı, T. Dirmenci ve S. Köstekçi, "A taxonomic revision of the genus *Cirsium* Mill. sect. *Cirsium* (Asteraceae: Cardueae) in Turkey," *Turk J Bot*, vol. 40, pp. 514–530, 2016.
- [8] H. Duman, O. Tugay, T. Drmenci ve K. Ertuğrul, "A new species of *Cirsium* sect. *Epitrachys* (Asteraceae: Cardueae) from the south of Turkey", *Turk J Bot*, c. 41, sayı. 4, ss. 375-382, Ağu. 2017
- [9] T. Drmenci, T. Özcan, T. Arabacı, S. Çelenk, G. İsmaylova ve B. Yıldız, "Hybridization among three *Cirsium* (Asteraceae) species and important evidence for three new hybrids from Turkey", *Turk J Bot*, c. 43, sayı. 3, ss. 366-385, May. 2019
- [10] T. Arabacı ve T. Dirmenci, "*Cirsium yildizianum* (Asteraceae: Cynareae), a New Species from East Anatolia, Turkey," *Ann Bot Fennici*, vol. 48, no. 6, pp. 503–506, 2011, doi: 10.5735/085.048.0610.
- [11] B. Yıldız, T. Dirmenci ve T. Arabacı, "*Cirsium handaniae* (Asteraceae), a new species from Turkey," *Ann Bot Fennici*, 46: (2009) 239-243.

- [12] S. Köstekçi, "Türkiye'de yayılış gösteren *Cirsium* Mill. sect. *Cirsium* türleri üzerinde karşılaştırmalı morfolojik araştırmalar", Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 2010.
- [13] B. Yıldız ve T. Dirmenci, "A new species of *Cirsium* section *Epitrachys* (Asteraceae: Cardueae) from Turkey," *Bot J Lin Soc*, 158: (2008) 669–673.
- [14] F.E. Bak ve M. Ozcan, "Pollen morphology of endemic ne anatolian *Cirsium* taxa (Asteraceae)," *Pak J Bot*, vol. 50, no. 3, pp. 1181–1185, 2018.
- [15] N. Polat, "Türkiye'de yetişen bazı *Cirsium* Miller (Asteraceae) türlerinin sitotaksonomik ve karyolojik yönden incelenmesi", Yüksek lisans tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ, 2011.
- [16] B. Yıldız, T. Arabacı, T. Dirmenci ve S. Çelenk, "*Cirsium sivasicum* sp. nov. and *C. peshmenianum* sp. nov. (Asteraceae) and their allies from Turkey," *NORD J BOT*, vol. 29, no. 1, pp. 26–37, 2011.
- [17] M. Sheidai, E. Seif, M. Nouroozi ve Z. Noormohammadi, "Cytogenetic and molecular diversity of *Cirsium arvense* (Asteraceae) populations in Iran," *J Jpn Bot*, vol. 87, no.3, pp. 193-205, 2012.
- [18] M. Nouroozi, M. Sheidai, E. Seif, F. Attar ve Z. Noormohammadi, "ISSR and RAPD analyses of species and their relationships in the genus *Cirsium* (Asteraceae) in Iran," *Phytologia Balcanica: International Journal of Balkan Flora and Vegetation*, vol. 19, no. 2, pp. 225–232, 2013.
- [19] E. J. Llorent-Martínez vd., "Impact of different extraction solvents and techniques on the biological activities of *Cirsium yildizianum* (Asteraceae: Cynareae)," *Ind Crop Prod*, vol. 144, p. 112033, 2020.
- [20] O. Melahat, S. Hayirlioglu-Ayaz ve H. Inceer, "Chromosome counts of some *Cirsium* (Asteraceae, Cardueae) taxa from Turkey," *Caryologia*, vol. 61, no. 4, pp. 375–382, 2008.
- [21] O. Melahat, S. Hayirlioglu-Ayaz ve H. Inceer, "Chromosome reports in some *Cirsium* (Asteraceae, Cardueae) taxa from north-east Anatolia," *Caryologia*, vol. 64, no. 1, pp. 55–66, 2011.
- [22] M. Ozcan, "Türkiye'de Bulunan *Cirsium aggregatum* Ledeb. Üzerinde Sistemantik Araştırmalar", *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, c. 16, sayı. 2, ss. 198-204, Nis. 2016.
- [23] R. Daskin, O. Yilmaz ve G. Kaynak, "Presence of *Cirsium eriophorum* (L.) Scop. (Asteraceae) in Turkey," *Turk J Bot*, vol. 30, no. 6, pp. 461–465, 2007.

- [24] N. Polat, Y. Kiran, A. Sahin, B. Yildiz ve T. Arabaci, "Chromosome counts and karyotype analysis of some representatives of genus *Cirsium* Mill. (Asteraceae) in Turkey," *Caryologia*, vol. 71, no. 2, pp. 133–138, 2018.
- [25] T. A. B. Slotta, D. P. Horvath ve M. E. Foley, "Phylogeny of *Cirsium* spp. in North America: Host Specificity Does Not Follow Phylogeny," *Plants (Basel, Switzerland)*, vol. 1, no. 2, pp. 61–73, 2012.
- [26] I. Jedrzejczyk, "Study on genetic diversity between *Origanum* L. species based on genome size and ISSR markers," *Ind Crop Prod*, vol. 126, pp. 201–207, 2018, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.10.010.
- [27] O. Kolören ve S. Eker, "Ordu İli'nde *Urtica* türlerinin kloroplast DNA trnL-F gen bölgelerini kullanarak genetik çeşitliliğinin belirlenmesi", *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, c. 33, sayı. 3, ss. 202-208, Eki. 2018, doi:10.7161/omuanajas.395875
- [28] M. Ajmal Ali, D. L. Van ve S.-Y. Kim, "Molecular systematic study of *Cardamine glechomifolia* Levl. (Brassicaceae) using internal transcribed spacer sequence of nuclear ribosomal DNA (ITS) and chloroplast trnL and trnL-F sequences," *Saudi J Biol Sci*, vol. 17, no. 4, pp. 275–290, 2010, doi: 10.1016/j.sjbs.2010.06.001.
- [29] H. Hayakawa vd., "Phylogeography based on the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region of native *Miscanthus sinensis* (Poaceae) populations in Japan," *Weed Biol Manag*, vol. 14, no. 4, pp. 251–261, 2014, doi: 10.1111/wbm.12053.
- [30] O. Koloren, Z. Koloren ve S. Eker, "Molecular phylogeny of *Artemisia* species based on the internal transcribed spacer (ITS) of 18S-26S rDNA in Ordu Province of Turkey," *Biotechnol Biotec Eq*, vol. 30, no. 5, pp. 929-934, 2016, doi:10.1080/13102818.2016.1188674.
- [31] L. Liu, B. Zhao, D. Tan ve J. Wang, "Phylogenetic relationships of Brassicaceae in China: Insights from a non-coding chloroplast, mitochondrial ve nuclear DNA data set," *Biochem Syst Ecol*, vol. 39, no. 4-6, pp. 600–608, 2011.
- [32] S. Marghali, I. Fadhlaoui, M. Gharbi, N. Zitouna ve N. Trifi-Farah, "Utility of ITS2 sequence data of nuclear ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic reconstruction of *Lathyrus* spp," *Sci Hortuc-Amsterdam*, vol. 194, pp. 313–319, 2015, doi: 10.1016/j.scienta.2015.08.030.
- [33] T. S. Rana, D. Narzary ve D. Ohri, "Molecular differentiation of *Chenopodium album* complex and some related species using ISSR profiles and ITS sequences," *Gene*, vol. 495, no. 1, pp. 29–35, 2012.

- [34] C. S. Reid, R. Carter ve L. E. Urbatsch, "Phylogenetic insights into New World *Cyperus* (Cyperaceae) using nuclear ITS sequences," *Brittonia*, vol. 66, no. 3, pp. 292–305, 2014.
- [35] M. Agarwal, N. Shrivastava ve H. Padh, "Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences," *Plant Cell Rep*, vol. 27, no. 4, pp. 617–631, 2008.
- [36] B. Desplanque, P. Boudry, K. Broomberg, P. Saumitou-Laprade, J. Cuguen ve H. van Dijk, "Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers," *Theor Appl Genet*, vol. 98, no. 8, pp. 1194–1201, 1999.
- [37] J. Hu ve B. A. Vick, "Target region amplification polymorphism: A novel marker technique for plant genotyping," *Plant Mol Biol Rep*, vol. 21, no. 3, pp. 289–294, 2003.
- [38] S. P. Joshi, V. S. Gupta, R. K. Aggarwal, P. K. Ranjekar ve D. S. Brar, "Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*," *Theor Appl Genet*, vol. 100, no. 8, pp. 1311–1320, 2000.
- [39] R. V. Kantety, M. La Rota, D. E. Matthews ve M. E. Sorrells, "Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat," *Plant Mol Biol*, vol. 48, 5- 6, pp. 501- 510, 2002.
- [40] M. S. Kesawat ve B. Das Kumar, "Molecular markers: It's application in crop improvement," *J Crop Sci Biotechnol*, vol. 12, no. 4, pp. 169–181, 2009, doi: 10.1007/s12892-009-0124-6.
- [41] A. Konieczny ve F. M. Ausubel, "A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers," *The Plant journal: for cell and molecular biology*, vol. 4, no. 2, pp. 403–410, 1993.
- [42] G. Li ve C. F. Quiros, "Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica," *Theor Appl Genet*, vol. 103, 2-3, pp. 455–461, 2001.
- [43] M. A. R. Mian, A. A. Hopkins ve J. C. Zwonitzer, "Determination of Genetic Diversity in Tall Fescue with AFLP Markers," *Crop Sci*, vol. 42, no. 3, pp. 944–950, 2002.

- [44] J. C. Miller ve S. D. Tanksley, "RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*," *Theor Appl Genet*, vol. 80, no. 4, pp. 437–448, 1990.
- [45] J. D. Palmer, "Mitochondrial DNA in Plant Systematics: Applications and Limitations," in *Molecular Systematics of Plants*, P. S. Soltis, D. E. Soltis ve J. J. Doyle, Eds., Boston, MA: Springer US, 1992, pp. 36–49.
- [46] W. Powell, G. C. Machray ve J. Provan, "Polymorphism revealed by simple sequence repeats," *Trends Plant Sci*, vol. 1, no. 7, pp. 215–222, 1996.
- [47] Provan, Russell, Booth ve Powell, "Polymorphic chloroplast simple sequence repeat primers for systematic and population studies in the genus *Hordeum*," *Mol Ecol*, vol. 8, no. 3, pp. 505–511, 1999.
- [48] V. D. Soleimani, B. R. Baum ve D. A. Johnson, "Efficient validation of single nucleotide polymorphisms in plants by allele-specific PCR, with an example from barley," *Plant Mol Biol Rep*, vol. 21, no. 3, pp. 281–288, 2003.
- [49] D. E. Soltis, P. S. Soltis ve B. G. Milligan, "Intraspecific Chloroplast DNA Variation: Systematic and Phylogenetic Implications," in *Molecular Systematics of Plants*, P. S. Soltis, D. E. Soltis ve J. J. Doyle, Eds., Boston, MA: Springer US, 1992, pp. 117–150.
- [50] B. G. Baldwin, M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell ve M. J. Donoghue, "The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny," *Ann Mo Bot Gard*, vol. 82, no. 2, pp. 247–277, 1995.
- [51] A. Liston, W. A. Robinson, D. Piñero ve E. R. Alvarez-Buylla, "Phylogenetics of *Pinus* (Pinaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences," *Mol Phylogenet Evol*, vol. 11, no. 1, pp. 95–109, 1999.
- [52] B. G. Baldwin, "Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the compositae," *Mol Phylogenet Evol*, vol. 1, no. 1, pp. 3–16, 1992.
- [53] B. G. Baldwin, "Molecular Phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) Based on ITS Sequences of Nuclear Ribosomal DNA: Chromosomal and Morphological Evolution Reexamined," *Am J Bot*, vol. 80, no. 2, p. 222, 1993.
- [54] R. D. Noyes ve L. H. Rieseberg, "ITS sequence data support a single origin for North American Astereae (Asteraceae) and reflect deep geographic divisions in *Aster* s.l.," *Am J Bot*, vol. 86, no. 3, pp. 398–412, 1999.

- [55] J. F. Bain ve J. L. Golden, “A phylogeny of *Packera* (Senecioneae; asteraceae) based on internal transcribed spacer region sequence data and a broad sampling of outgroups,” *Mol Phylogenet Evol*, vol. 16, no. 3, pp. 331–338, 2000.
- [56] R. D. Noyes, “Biogeographical and evolutionary insights on *Erigeron* and allies (Asteraceae) from ITS sequence data,” *Plant Syst Evol*, vol. 220, 1-2, pp. 93–114, 2000, doi: 10.1007/BF00985373.
- [57] B. G. Baldwin ve S. Markos, “Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae),” *Mol Phylogenet Evol*, vol. 10, no. 3, pp. 449–463, 1998.
- [58] R. Chan, B. G. Baldwin ve R. Ornduff, “Goldfields Revisited: A Molecular Phylogenetic Perspective on the Evolution of *Lasthenia* (Compositae: Heliantheae sensu lato),” *Int J Plant Sci*, vol. 162, no. 6, pp. 1347–1360, 2001.
- [59] J. A. Clevinger ve J. L. Panero, “Phylogenetic analysis of *Silphium* and subtribe Engelmanniinae (Asteraceae: Heliantheae) based on ITS and ETS sequence data,” *Am J Bot*, vol. 87, no. 4, pp. 565–572, 2000.
- [60] D. G. Kelch ve B. G. Baldwin, “Phylogeny and ecological radiation of New World thistles (*Cirsium*, Cardueae- Compositae) based on ITS and ETS rDNA sequence data,” *Mol Ecol*, vol. 12, no. 1, pp. 141–151, 2003.
- [61] J. Lee, B. G. Baldwin ve L. D. Gottlieb, “Phylogeny of *Stephanomeria* and related genera (compositae-lactuceae) based on analysis of 18S-26S nuclear rDNA ITS and ETS sequences,” *Am J Bot*, vol. 89, no. 1, pp. 160–168, 2002.
- [62] C. R. Linder, L. R. Goertzen, B. V. Heuvel, J. Francisco-Ortega ve R. K. Jansen, “The complete external transcribed spacer of 18S-26S rDNA: amplification and phylogenetic utility at low taxonomic levels in asteraceae and closely allied families,” *Mol Phylogenet Evol*, vol. 14, no. 2, pp. 285–303, 2000.
- [63] S. Markos ve B. G. Baldwin, “Higher-Level Relationships and Major Lineages of *Lessingia* (Compositae, Astereae) Based on Nuclear rDNA Internal and External Transcribed Spacer (ITS and ETS) Sequences,” *Syst Bot*, vol. 26, no. 1, 2001.
- [64] P. F. Stevens. Angiosperm Phylogeny Website. [Online]. Available: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> (accessed: Dec. 19 2020).
- [65] Ş. Yıldırım, “The chorology of the Turkish species of Asteraceae family,” *Ot Sistematik Botanik Dergisi*, cilt. 6, no. 2, ss. 75–123, 1999. [Online] Erişim adresi: <https://app.trdizin.gov.tr/publication/paper/detail/TWpVeE1USXk>

- [66] K. Bremer, "Ancestral Areas: A Cladistic Reinterpretation of the Center of Origin Concept," *Syst Biol*, vol. 41, no. 4, pp. 436–445, 1992, doi: 10.2307/2992585.
- [67] T. Arabacı, "Türkiye'de Yetişen *Achillea* L. (Asteraceae) Cinsinin Revizyonu," Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Malatya, 2006.
- [68] M. Atar, "*Centaurea kilaea* Boiss. ve *Centaurea cuneifolia* Sm. Üzerinde Morfolojik ve Palinolojik Araştırmalar," Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, 2006
- [69] K. Bremer, *Asteraceae: Cladistics and Classification*, Timber Press, Portland, Oregon, USA, 1994.
- [70] J. W. Kadereit ve C. Jeffrey, *The families and genera of vascular plants: Asterales*, vol. 8, Berlin: Springer, 2007. [Online]. Available: <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10185608>
- [71] N. Ozhatay ve S. Kultur, Check-list of additional taxa to the supplement flora of Turkey III, *Turk J Bot*, vol. 30, no. 4, pp. 281–316, 2006.
- [72] J. P. Smith, *Vascular plant families*, Eureka, Calif.: Mad River Press, 1977.
- [73] A. Cronquist, "*Cirsium*." in *Intermountain Flora*, 5, Asterales. Bronx, NY: New York Botan. Garden, 1995, 338-415.
- [74] W. B. Zomlefer, *Guide to flowering plant families*, Chapel Hill: University of North Carolina Press, 1994.
- [75] N. Garcia-Jacas, T. Garnatje, A. Susanna ve R. Vilatersana, "Tribal and subtribal delimitation and phylogeny of the Cardueae (Asteraceae): a combined nuclear and chloroplast DNA analysis," *Mol Phylogenet Evol*, vol. 22, no. 1, pp. 51–64, 2002.
- [76] K. Romaschenko, K. Ertuğrul, A. Susanna, N. Garcia-Jacas, T. Uysal ve E. Arslan, "New chromosome counts in the *Centaurea Jacea* group (Asteraceae, Cardueae) and some related taxa," *Bot J Linn Soc*, vol. 145, no. 3, pp. 345–352, 2004.
- [77] S. M. Ghaffarı, N. Garcia-Jacas ve A. Susanna, "New chromosome counts in the genus *Cousinia* (Asteraceae) from Iran," *Bot J Linn Soc*, vol. 151, no. 3, pp. 411–419, 2006.
- [78] F. Yaltırık ve A. Efe, *Otsu Bitkiler Sistematigi*, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yayınları, 1989, p. 433.
- [79] D. F. Chamberlain, "*Scorzonera* L." in *Flora of Turkey and East Aegean Island*, vol. 5, P.H. Davis (ed), Edinburg, 1975, pp. 632-657.

- [80] S. Saday, “*Jurinea Cass.* (Compositae) Üzerinde Morfolojik, Palinolojik ve Anatomik Araştırmalar,” Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, 2005.
- [81] V. H. Heywood, *Flowering Plants of the World*, Oxford, UK: Oxford University Press, 1978, pp. 263-268.
- [82] N. Küçükboyacı ve D. Şahan, “Allergic Contact Dermatitis Caused by Asteraceae Family Plants”, *J Lit Pharm Sci*, vol. 9, no. 1, pp. 1-10, 2020, doi: 10.5336/pharmsci.2019-66397.
- [83] H. Çalışkan, “Trakya Bölgesinde Yetişen *Cirsium italicum* (Savi) Dc. (Asteraceae) Bitkisinin Fitokimyasal İncelenmesi, Antibakteriyel ve Antifungal Aktivitesinin Tayini“, Yüksek lisans tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ, 2018.
- [84] N. Şafak, “*Cirsium baytopae* davis & parris (compositae) üzerinde morfolojik ve palinolojik araştırmalar”, Yüksek lisans tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul, 2001.
- [85] A. L. Charadze, “*Cirsium* Mill.”, in *Flora of the SSSR*, vol. 28, pp. 63-270, 1963. In: E. G. Bobrov and SK. Cherepanov Leningrad, Izdatel'stvo Akademiya Nauk SSSR. Translated from Russian Israel Program for Scientific Translations. Jerusalem: Israel P. Sci Tms 1976.
- [86] K. Werner, “*Cirsium* Miller” in *Flora Europaea*, vol. 4, T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters and D. A. Webb (eds), Cambridge: Cambridge University Press, 1976, pp. 232–242.
- [87] F. Petrak, “*Cirsium* Mill” in *Flora Iranica: Compositae III Cynareae*, vol. 139a, K. H. Rechinger (ed), Graz: Akademische Druck-u Verlagsanstalt, 1979 pp. 231-285.
- [88] D. J. Keil, “*Cirsium*” in *Flora of North America Editorial Committee*. Flora of North America North of Mexico, Vol. 19. New York, NY, USA: Oxford University Press, 2006, pp. 95-164.
- [89] T. M. Barkley, L. Brouillet ve J. L. Strother, "Asteraceae", in *Flora of North America*, vol. 19, 20 and 21 Page 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 70. Oxford University Press. Online at EFloras.org.
- [90] Y. T. Hsi, “Taxonomy, Distribution and Relationships of the Species of *Cirsium* Belonging to the Series *Undulata*”, Ph. D. dissertation, University of Minnesota, USA, 1960.
- [91] A. Richards, *Plant breeding systems*, 2nd ed. London: Chapman & Hall, 1997.
- [92] M. Firat, “*Cirsium semzinanicum* (Asteraceae), a new species from Hakkâri, Turkey,” *PhytoKeys*, vol. 68, no. 68, pp. 65–72, 2016, doi: 10.3897/phytokeys.68.8745.

- [93] G.E. Post (Ed.), *Flora of Syria, Palestina and Sina*, vol. 2, Beirut, Lebanon: American Press, 1933.
- [94] S. Zhu, W. Greuter, “*Cirsium* Mill.” in *Flora of China*, vol. 20–21, Z. Y. Wu, P. H. Raven, D. Y. Hong (eds.), St. Louis, MO, USA: Science Press (Beijing) and Missouri Botanical Garden Press, 2001, pp. 160-175.
- [95] http://www.efloras.org/browse.aspx?flora_id=101&start_taxon_id=107139
- [96] A. Zoku, “*Cirsium* Adans” in *Flora of Japan*, F. G. Meyer, E. H. Walker (eds.), Washington DC, USA: Smithsonian Institution, 1965, pp. 902-912.
- [97] G. Bauhin, *Phytopinax seu enumeration plantarum tome 1*, Basel, Switzerland: Per Sebastianum Henricpetri (in Latin), 1596.
- [98] J. P. Tournefort, *Elements de Botanique Tome 1*, Paris, France: Masson et Cie (in French), 1694.
- [99] A. L. Charadze, *Cirsium* Mill. emend. Scop. In E. G. Bobrov & S. K. Cherepanov (eds.), *Flora of the USSR*, vol. 28, Bishen Singh Mahendra Pal Singh and Koeltz Scientific Books, 1998, 52-214.
- [100] C. Linnaeus, *Species Plantarum*, Vol. 2. Stockholm, Sweden: Laurentii Salvii, 1753.
- [101] P. Miller, *The Gardens Dictionary*. Arb. Ed. 4, London, 1754.
- [102] M. Adanson, *Families Des Plantes*, vol. 2, Paris, 1763, pp. 115-116.
- [103] A. P. de Candolle, *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*, vol. 6. Paris, France: Treuttel et Würtz (in Latin), 1838.
- [104] E. Boissier, *Flora Orientalis*, Volumen Tertium, Genevae et Basileae, 1875, 523- 553.
- [105] E. Boissier, *Flora Orientalis*, Supplementum, Genevae et Basileae, 1888, 308-309.
- [106] S. Sommier, E. Levier (eds.), I *Cirsium* del Caucaso, *Nuovo Giornale Botanico Italiano*, vol. 2, 1895, pp. 1-20.
- [107] F. Petrak, *Die nordamerikanischen Arten der Gattung Cirsium*, vol. 35, Beihefte zum Botanischen Centralbla, 1917, pp. 223- 273.
- [108] T. Bean, “Pappus morphology and terminology in Australian and New Zealand thistles (Asteraceae, tribe Cardueae)”, *Austrobaileya*, vol. 6, no. 1, pp. 139–152, 2001.
- [109] J. J. Bruhl and C. J. Quinn, “Cypsela anatomy in the ‘Cotuleae’ (Asteraceae-Anthemideae),” *Bot J Linn Soc*, vol. 102, no. 1, pp. 37–59, 1990.
- [110] E. J. H. Corner, *The seeds of dicotyledons*, Cambridge: Cambridge University Press, 1976.

- [111] R. d. O. Franca, O. C. De-Paula, R. Carmo-Oliveira ve J. Marzinek, “Embryology of *Ageratum conyzoides* L. and *A. fastigiatum* R.M. King & H. Rob. (Asteraceae),” *Acta Bot Bras*, vol. 29, no. 1, pp. 8–15, 2015, doi: 10.1590/0102-33062014abb3609.
- [112] J. Marzinek, O. C. De-Paula ve D. M. T. Oliveira, “The ribs of *Eupatorieae* (Asteraceae): of wide taxonomic value or reliable characters only among certain groups?” *Plant Syst Evol*, vol. 285, 1-2, pp. 127–130, 2010.
- [113] M. Z. Haque ve M. B. E. Godward, “New records of the carpodium in Compositae and its taxonomic use,” *Bot J Linn Soc*, vol. 89, no. 4, pp. 321–340, 1984, doi: 10.1111/j.1095-8339.1984.tb02564.x.
- [114] J. L. A. Hood ve J.C. Semple, “Pappus variation in *Solidago* (Asteraceae: Astereae),” *SIDA*, vol. 20, no. 4, pp. 1617- 1630, 2003.
- [115] M. Källersjö, “Fruit structure and generic delimitation of *Athanasia* (Asteraceae-Anthemideae) and related South African genera,” *Nord J Bot*, vol. 5, no. 6, pp. 527–542, 1985.
- [116] P. Lavialle, Recherches sur le developpement de l’ovaire en fruit chez les Composées, *Ann Sci Nat Bot*, Ser 9, 39–149, 1912.
- [117] J. Marzinek ve D. M. T. Oliveira, “Structure and ontogeny of the pericarp of six *Eupatorieae* (Asteraceae) with ecological and taxonomic considerations,” *An Acad Bras Cien*, vol. 82, no. 2, pp. 279–291, 2010, doi: 10.1590/S0001-37652010000200004.
- [118] J. H. Pak, J.-K. Park ve S. S. Whang, “Systematic Implications of Fruit Wall Anatomy and Surface Sculpturing of *Microseris* (Asteraceae, Lactuceae) and Relatives,” *Int J Plant Sci*, vol. 162, no. 1, pp. 209–220, 2001.
- [119] A. Pandey ve R. Singh, “Development and structure of seeds and fruits in the Compositae, tribe Senecioneae Taxonomic diagnostic features,” *Botanische Jahrbuch er fur Systematik Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, vol. 103, no. 3, pp. 413–422, 1982.
- [120] I. Roth, *Fruits of angiosperms*. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1977, p.675.
- [121] T. D. G. Silva, J. Marzinek, E. K. O. Hattori, J. N. Nakajima ve O. C. De-Paula, “Comparative cypsela morphology in *Disynaphiinae* and implications for their systematics and evolution (*Eupatorieae*: Asteraceae),” *Bot J Linn Soc*, vol. 186, no. 1, pp. 89–107, 2018.
- [122] G. L. Stebbins, “A New Classification of The Tribe Cichorieae, Family Compositae, *Madroño*, vol. 12, no. 3, pp. 65–81, 1953.

- [123] S. Köstekci ve T. Arabacı, "Cypsel morphology of *Cirsium* sect. *Cirsium* (Asteraceae) taxa in Turkey," *Biologia*, vol. 66, no. 6, pp. 988–995, 2011.
- [124] M. Ozcan, "Cypsel morphology and anatomy in *Cirsium* sect. *Epitrachys* (Asteraceae, Carduoideae) and its taxonomic implications," *Nord J Bot*, vol. 35, no. 6, pp. 653–668, 2017.
- [125] B. Ghimire, G. U. Suh, C. H. Lee, K. Heo and M. J. Jeong, "Cypsel morphology of *Cirsium* species (Asteraceae) and its taxonomic implications," *Flora*, vol. 249, pp. 40–52, 2018.
- [126] E. Ginko, C. Dobeš ve J. Saukel, "Suitability of Root and Rhizome Anatomy for Taxonomic Classification and Reconstruction of Phylogenetic Relationships in the Tribes Cardueae and Cichorieae (Asteraceae)," *Scientia pharmaceutica*, vol. 84, no. 4, pp. 585–602, 2016.
- [127] M. Ozcan, M. Demiralay ve A. Kahrman, "Leaf anatomical notes on *Cirsium* Miller (Asteraceae, Carduoideae) from Turkey," *Plant Syst Evol*, vol. 301, no. 8, pp. 1995–2012, 2015.
- [128] W. P. Stoutamire ve J. H. Beaman, "Chromosome Studies of Mexican Alpine Plants," *Brittonia*, vol. 12, no. 3, pp. 226-230, 1960, doi: 10.2307/2805056.
- [129] G. B. Ownbey, "Cytotaxonomic Notes on Eleven Species of *Cirsium* Native to Mexico," *Brittonia*, vol. 20, no. 4, pp. 336-342, 1968, doi: 10.2307/2805691.
- [130] P. Bures, Y.-F. Wang, L. Horova ve J. Suda, "Genome size variation in Central European species of *Cirsium* (Compositae) and their natural hybrids," *Ann Bot-London*, vol. 94, no. 3, pp. 353–363, 2004.
- [131] O. Rotreklová, O. Bureš, V. Grulich, Chromosome numbers for some species of vascular plants from Europe, *Biologia*, 59: 425- 433, 2004.
- [132] E. Yüksel, Y. Kiran, A. Şahin, B. Yıldız ve T. Arabacı, "Karyological studies of 10 *Cirsium* sect. *Epitrachys* (Asteraceae) species from Turkey," *Turk J Bot*, vol. 37, pp. 1085–1092, 2013, doi: 10.3906/bot-1302-1.
- [133] C. Frankton and R. J. Moore, Cytotaxonomy, Phylogeny ve Canadian Distribution of *Cirsium undulatum* and *Cirsium flodmanu*, *Can J Bot*, vol. 9, no. 1, pp. 21-33, 1961, <https://doi.org/10.1139/b61-003>
- [134] C. Frankton ve R. J. Moore, "Cytotaxonomy of *Cirsium muticum*, *Cirsium discolor* ve *Cirsium altissimum*," *Can J Bot*, vol. 41, no. 1, pp. 73–84, 1963, doi: 10.1139/b63-008.

- [135] R. J. Moore ve C. Frankton, "Cytotaxonomic Studies in The Tribe Cynareae (Compositae)," *Can J Bot*, vol. 40, no. 2, pp. 281–293, 1962, doi: 10.1139/b62-027.
- [136] R. J. Moore ve C. Frankton, "Cytotaxonomy and Canadian Distribution of *Cirsium edule* and *Cirsium brevistylum*," *Can J Bot*, vol. 40, no. 9, pp. 1187–1196, 1962, doi: 10.1139/b62-109.
- [137] R. J. Moore ve C. Frankton, "Cytotaxonomic Notes on Some *Cirsium* Species of The Western United States," *Can J Bot*, vol. 41, no. 11, pp. 1553–1567, 1963, doi: 10.1139/b63-137.
- [138] R. J. Moore ve C. Frankton, "An Evaluation of The Status of *Cirsium pumilum* and *Cirsium hillii*," *Can J Bot*, vol. 44, no. 5, pp. 581–595, 1966, doi: 10.1139/b66-070.
- [139] R. J. Moore ve C. Frankton, "Cytotaxonomy of Foliose Thistles (*Cirsium* spp. Aff. *C. Foliosum*) of Western North America," *Can J Bot*, vol. 45, no. 9, pp. 1733–1749, 1967, doi: 10.1139/b67-180.
- [140] R. J. Moore ve C. Frankton, "Cytotaxonomy of some *Cirsium* species of the eastern United States, with a key to eastern species," *Can J Bot*, vol. 47, no. 8, pp. 1257–1275, 1969, doi: 10.1139/b69-177.
- [141] R. J. Moore ve C. Frankton, "The *Cirsium arizonicum* complex of the southwestern United States," *Can J Bot*, vol. 52, no. 3, pp. 543–551, 1974, doi: 10.1139/b74-070.
- [142] A. A. Fedorov (ed.), *Chromosome Numbers of Flowering Plants*, Leningrad, Nauka, 1969.
- [143] P. Goldblatt, P, ed., 1981, 1984, 1985, 1988. Index to Plant Chromosome Number, 1975-1978 (1981), 1979 -1981 (1984), 1982-1983 (1985), 1984-1985 (1988), Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- [144] P. Goldblatt ve D. E. Johnson, eds. 1990, 1991, 1994, 1996, 1998. Index to Plant Chromosome Number 1986-1987 (1990), 1988-1989 (1991), 1990-1991 (1994), 1992-1993 (1996), 1994-1995 (1998). Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- [145] S. M. Ghaffari, Chromosome studies in the Iranian Asteraceae II, *Iran J Bot*, vol.8, no.1, pp. 91-104, 1999.
- [146] B. Druskovic ve M. Lovka, In IOPB chromosome data 9. International Organization of Plant Biosystematists Newsletter, 24, 1995, pp. 15-19.
- [147] S. S. Bır ve M. Sıdhu, Cyto-palynological studies on weed flora of cultivable lands of Patiala district (Punjab), *Journal of Palynology*, vol. 16, pp. 85-105, 1980.

- [148] B. Yıldız, A. Şahin, T. Dirmenci, T. Arabacı D. G. Kelch ve S. Celenk, Türkiye’de yetişen *Cirsium* Mill. (Asteraceae) Türleri Uzerinde Taksonomik, Molekuler, Karyolojik ve Palinolojik Araştırmalar. TUBİTAK 106T167 nolu proje (2010).
- [149] G. Erdtman, *Pollen morphology and plant taxonomy*, Vol. IV. Labiatae, Verbenaceae ve Aviceniaceae. Svensk Botanisk Tidskrift 39: 279-285, 1945.
- [150] S. CARLQUISTS, Pollen morphology of Rapataceae, *Aliso*, vol. 5, no. 1, pp. 39- 66, 1961.
- [151] F. Oldfield, The pollen morphology of some of the West European Ericales, *Pollen et Spores*, vol. 1, pp. 19-48, 1959.
- [152] B. Raj, Pollen morphological studies in the Acanthaceae, *Grana palyn*, vol. 3, no. 1 pp. 3-108, 1961.
- [153] M. L. Tardieu-Blot, a: Sur les spores de Lind saeaceae et de Dennstaedtiaceae de Madagascar et des Mascareignes, étude de palynologie appliquée à la sys tématique, *Pollen et Spores*, vol. 5, pp. 69-.86, 1963.
- [154] R. P. Wodehouse, “*Pollen grains*,” McGraw-Hill Book Company, New York, 1935.
- [155] E. Jafari and G. Ghanbarian, “Pollen Morphological Studies on Selected Taxa of Asteraceae,” *J of Plant Sciences*, vol. 2, no. 2, pp. 195–201, 2007.
- [156] H. Akyalçın, T. Arabacı ve B. Yıldız, "Pollen morphology of six *Achillea* L. sect. *Achillea* (Asteraceae) species in Turkey", *Turk J Bot*, c. 35, sayı. 2, ss. 183-201, Şub. 2011.
- [157] J. J. Skvarla ve D. A. Larson, “An Electron Microscopic Study of Pollen Morphology in the Compositae with Special Reference to the Ambrosiinae,” *Grana Palynologica*, vol. 6, no. 2, pp. 210–269, 1965.
- [158] N. Şafak ve E. Özhatay, “Morphological and palynological studies on *Cirsium baytopae* Davis & Parris and *Cirsium bulgaricum* DC. (Asteraceae),” *Analele Ştiinţifice ale Universităţii 'Al I Cuza' din Iaşi. (Serie Nouă) Secţiunea II a. Biologie Vegetală*, vol. 58, no. 2, pp. 51–60, 2012.
- [159] M. Nouroozi, M. Sheidai, F. Attar ve Z. Noormohammadi, “Pollen morphological studies on the genus *Cirsium* Mill. (Asteraceae) in Iran,” *Journal of Japanese Botany*, vol. 87, no. 4, pp. 268–279, 2012.
- [160] J. H. Butendijk, E. J. Boon ve M. S. Ramanna, “Nuclear DNA Content in Twelve Species of *Alstroemeria* L. and Some of their Hybrids,” *Ann Bot-London*, vol. 79, no. 4, pp. 343–353, 1997.

- [161] C. Thalmann, R. Guadagnuolo ve F. Felber, “Search for spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) in agricultural zones and evaluation of the genetic diversity of the wild species,” *Bot Helv*, vol. 111, no. 2, pp. 107–119, 2001.
- [162] D. Ohri ve T. N. Khoshoo, “Genome size in gymnosperms,” (in En; en), *Plant Syst Evol*, vol. 153, 1-2, pp. 119–132, 1986.
- [163] S. E. Hall, W. S. Dvorak, J. S. Johnston, H. J. Price ve C. G. Williams, Flow Cytometric Analysis of DNA Content for Tropical and Temperate New World Pines, *Ann Bot-London*, vol. 86, no. 6, pp. 1081-1086, 2000.
- [164] E. Haffner, “On the Phylogeny of the Subtribe Carduinae (Tribe Cardueae, Compositae),” *Englera*, no. 21, pp. 3–208, 2000, doi: 10.2307/3776757.
- [165] W. L. Bruckart, D. J. Politis, G. Defago, S. S. Rosenthal ve D. M. Supkoff, “Susceptibility of *Carduus*, *Cirsium* ve *Cynara* species artificially inoculated with *Puccinia carduorum* from musk thistle,” *Biological control : theory and applications in pest management (USA)*, vol.6, no.2, pp. 215–221, 1996.
- [166] J. Ackerfield *Et Al.* , "A prickly puzzle: Generic delimitations in the *Carduus-Cirsium* group (Compositae: Cardueae: Carduinae)," *TAXON* , vol.69, no.4, pp.715-738, 2020
- [167] M. Da Jeong, H. A. Jung ve J. S. Choi, “Comparative antioxidant activity and HPLC profiles of some selected Korean thistles,” *Arch Pharm Res*, vol. 31, no. 1, pp. 28–33, 2008.
- [168] I. E. Jordon-Thaden ve S. M. Louda, “Chemistry of *Cirsium* and *Carduus*: a role in ecological risk assessment for biological control of weeds?,” *Biochem Syst Ecol*, vol. 31, no. 12, pp. 1353–1396, 2003.
- [169] H. B. Lee, J. H. Kwak, O. P. Zee ve S. J. Yoo, “Flavonoids from *Cirsium rhinoceros*,” (in En; en), *Arch Pharm Res*, vol. 17, no. 4, pp. 273- 277, 1994.
- [170] A.K. Chung, H.C. Kwon, S.Z. Choi, Y.D. Min ve K.R. Lee, “Norisoprenoids from *Cirsium rhinoceros*,” *Korean Journal of Pharmacognosy*, vol. 33, no. 2, pp. 81–84, 2002.
- [171] S.-H. Yim, H. J. Kim ve I.-S. Lee, “A polyacetylene and flavonoids from *Cirsium rhinoceros*,” *Arch Pharm Res*, vol. 26, no. 2, pp. 128–131, 2003.
- [172] R. Aquino, I. Behar, D. F. Simone ve F. Menichini, Preliminary investigation on *Cirsium vallis demoni*, *Fitoterapia*, vol. 58, no. 6, pp. 428–429, 1987.

- [173] N. R K S, F. T M ve R. T R, “A pyrrolizidine alkaloid from *Cirsium wallichii* DC,” *Indian Journal of Chemistry. Section B: Organic including Medicinal*, vol. 28, no. 6, pp. 524–525, 1989.
- [174] A. I. Syrchina, A. L. Vereshchagin, Y. A. Kostyro, A. G. Gorshkov ve A. A. Semenov, “Contents of some flavonoid compounds and syringin in different parts of *Cirsium setosum* (Willd.) Bess,” (in Russian), *Rastitel'nye Resursy*, vol. 36, no. 2, pp. 73–79, 2000.
- [175] S. Takano ve S. Kawaminami, “Cyperenyl acetate and cyperenal from *Cirsium dipsacolepis*,” *Phytochemistry*, vol. 27, no. 4, pp. 1197–1199, 1988.
- [176] M. Kozyra ve K. Główniak, “Phenolic acids in extracts obtained from the flowering herbs of *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. growing in Poland,” *Acta Soc Bot Pol*, vol. 82, no. 4, pp. 325–329, 2013.
- [177] Y. Lu, S. Duan, J. Pan, P. Yu, “Phytochemical investigation of *Cirsium japonicum* DC”, *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, vol. 21, no. 4, pp. 563-565, 2009.
- [178] S. G. McGowan and J. W. Wallace, “Flavonoids and phenolic acids from *Cirsium lanceolatum*,” *Phytochemistry*, pp. 1503-1504, 1972.
- [179] K. Pan, Y. Yin, L. Kong, “Chemical constituents of *Cirsium setosum* (Willd.)”, *Zhongguo Xiandai Zhongyao*, 8, 7-9. 2006.
- [180] Y. Zhang, H. L. Ruan, Y. H. Zhang, H. F. Pi ve J. Z. Wu, “Studies on the chemical constituents of *Cirsium henryi*,” *Natural Product Research and Development*, vol. 22, pp. 58–59, 2010, doi: 10.1142/9789814282635_0007.
- [181] W. B. Beskow, K. C. Harrington ve J. Hodgson, “Dispersal of weed seeds in goat dung”, *Proceedings of 15th Australian Weed Conference*, C. Preston, J. H. Watts and N. D. Crossman, eds, Adelaide, South Australia, Sep. 2006, p. 894.
- [182] J. Nazaruk, “Antioxidant activity and total phenolic content in *Cirsium* five species from north-east region of Poland,” *Fitoterapia*, vol. 79, no. 3, pp. 194–196, 2008.
- [183] T. Iwashina, Y. Kadota, T. Ueno ve S. Ootani, Foliar flavonoid composition in Japanese *Cirsium* species (Compositae) ve their chemotaxonomic significance, *The Journal of Japanese Botany*, vol. 70, no. 5, pp. 280–290, 1995.
- [184] N. Morita, M. Fukuta, M. Shimizu, Studies on the medicinal resources XXIII, Flavonoids of *Cirsium* plants (Compositae) in Japan. Components of the leaves of *Cirsium microspicatum* Nakai var. *kiotense* Kitam., *C. dipsacolepis* Matsum., *C. brevicaulis* A. Gray, *C. matsumurae* Nakai, *C. yakusimense* Masamune, *C. amplexifolium* Kitam., *C. spinosum* Kitam., *C. tanakae* Matsum. subsp. *aomorense*

- Kitam. and *C. arvense* scop. var. *setosum* Ledeb. *Yakugaku Zasshi*, vol. 18, pp. 9-11, 1964.
- [185] N. Morita, M. Shimizu ve M. Arisawa, “Two new flavone glycosides from *Cirsium lineare*,” *Phytochemistry*, vol. 12, no. 2, pp. 421–423, 1973, doi: 10.1016/0031-9422(73)80032-9.
- [186] F. A. Rasulov, S. V. Serkerov, N. M. Ismailov ve E. N. Novruzov, 1989, Chemical investigation of *Cirsium echinus*. *Izv Akad Nauk Az SSR, Izvestiya Akademii Nauk Azerbaidzhanskoi SSR, Seriya Biologicheskikh Nauk* 6, 14–16 CA 116, 55515.
- [187] Y. Takaishi, T. Okuyama, K. Nakano, K. Murakami ve T. Tomimatsu, “Absolute configuration of a triolacetylene from *Cirsium japonicum*,” *Phytochemistry*, vol. 30, no. 7, pp. 2321–2324, 1991.
- [188] Y. Takaishi, T. Okuyama, K. Nakano, K. Murakami, T. Tomimatsu ve J. Yamahara, “Polyolefinic compounds from *Cirsium nipponicum* roots”, *Phytochemistry*, vol. 30, no. 5, pp. 1539–1542, 1991.
- [189] R. G. Binder, M. Benson, W. F. Haddon ve R. C. French, “Aplotaxene derivatives from *Cirsium arvense*,” *Phytochemistry*, vol. 31, no. 3, pp. 1033–1034, 1992.
- [190] K. Sawaguchi, K. Nakao, T. Shimamura ve K. Ohsawa, “A new antimicrobial and antioxidative component of extracts from the rhizomes of *Cirsium brevicaule* A. Gray var. *irumtiense* Kitam,” vol. 22, pp. 271–275, 1994.
- [191] J. C. Park, J. H. Lee ve J. S. Choi, “A flavone diglycoside from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*,” *Phytochemistry*, vol. 39, no. 1, pp. 261–262, 1995.
- [192] H. A. Jung, Y. S. Kim ve J. S. Choi, “Quantitative HPLC analysis of two key flavonoids and inhibitory activities against aldose reductase from different parts of the Korean thistle, *Cirsium maackii*”, *Food Chem Toxicol: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, vol. 47, no. 11, pp. 2790–2797, 2009.
- [193] J. Nazaruk ve P. Jakoniuk, “Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. flowers,” *J Ethnopharmacol*, vol. 102, no. 2, pp. 208–212, 2005.
- [194] U. Özgen, T. Arabacı, R. Aliyazıcıoğlu, L. Baykal Selçuk, T. Dirmenci, Türkiye’nin Endemik *Cirsium* Mill. (Asteraceae) Türleri Üzerinde Fitokimyasal ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları, TUBİTAK 116Z475 nolu proje (2019).
- [195] W. A. Weber, *Colorado Flora: Western Slope*, Boulder, CO: Colorado Associated University Press, 530 s, 1987.

- [196] S. Lund ve E. Rostrup, Marktidsele, *Cirsium arvense*. En monografi. Dem Kongelige Danske Videnskaberne Selskabs Skrifter, Raekke 6. Naturvidenskabelig og Mathematisk Afdeling, (Danish with French summary),10, 149-316, 1901.
- [197] J. Pojar ve A. MacKinnon, *Plants of the Pacific Northwest Coast: Washington, Oregon, British Columbia & Alaska*. Vancouver: Lone Pine, 1994.
- [198] E. Haber, Fact sheet no. 8- Canada Thistle. In: *Invasive Plants of Canada: Guide to Species and Methods of Control*, National Botanical Services, Ottawa, 1997.
- [199] M. Boğa, “*Cirsium leucopsis* ve *Cirsium siphyleum* Bitkilerinden Sekonder Metabolitlerin Saflaştırılması, Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivitelerinin Belirlenmesi”, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2012.
- [200] E. Yeşilada vd., “Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains,” *J Ethnopharmacol*, vol. 46, no. 3, pp. 133–152, 1995.
- [201] D. D. Orhan, F. Ergun, E. Yeşilada, K. Tsuchiya ve K. Kawazoe, “Antioxidant activity of two flavonol glycosides from *Cirsium hypoleucum* DC. through bioassay-guided fractionation,” *Turkish J Pharm Sci*, vol. 4, no. 1, pp. 1-14, 2007. [Online].
- [202] E. Yeşilada, E. Sezik, G. Honda, Y. Takaishi, Y. Takeda ve T. Tanaka, “Traditional medicine in Turkey IX,” *J Ethnopharmacol*, vol. 64, no. 3, pp. 195–210, 1999.
- [203] E. Sezik et al., “Traditional medicine in Turkey VIII. Folk medicine in east anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdir provinces,” *Econ Bot*, vol. 51, no. 3, pp. 195–211, 1997, doi: 10.1007/BF02862090.
- [204] T. Baytop, *Türkiye’ de bitkiler ile tedavi, geçmişte ve bugün*, 2nd ed. Çapa, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1999.
- [205] M. Küçük, Kürtün (Gümüşhane)- Örumcek Ormanlarının Florası ve Saf Meşcere Tiplerinin Floristik Kompozisyonu, T. C. Orman Bakanlığı Doğu Karadeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü, 1992.
- [206] A. Rahman, M. I. Choudhary, “Bioactive natural products as a potential source of new pharmacophores. A theory of memory,” *Pure Appl Chem*, vol. 73, no. 3, pp. 555– 560, 2001, doi: 10.1351/pac200173030555.
- [207] D. E. Moerman, *Native American Ethnobotany*. Portland, Or.: Timber Press, 1998.
- [208] A. Çınar ve N. Uygun, *Bitki Koruma. Çukurova Üniv. Zir. Fak. Ders Kitabı*, Adana, 1987, 285 s.
- [209] Z. Özer, İ. Kadıoğlu, H. Önen ve N. Tursun, *Herboloji*. Gaziosmanpaşa Üniv. Zir. Fak. Yayınları No: 20, Kitaplar Serisi 10, Tokat, 2003. 314 s.

- [210] A. Güncan, Erzurum Karasu Kanal Bölgesi Organik Topraklardaki Yabancıotlar ve En Önemlileri üzerinde Mücadele İmkanlarının Araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Araştırma 1967 Yıllığı, pp. 141- 143, 1967.
- [211] D. D. Austin and P. J. Urness, “Overwinter Forage Selection by Mule Deer on Seeded Big Sagebrush-Grass Range,” *The Journal of Wildlife Management*, vol. 47, no. 4, pp. 1203, 1983, doi: 10.2307/3808194.
- [212] L. A. Bell, *Plant fibers for papermaking*. McMinnville, Or.: Liliaceae Press, 1995.
- [213] S. Facciola, *Cornucopia: A source book of edible plants*. Vista, CA: Kampong Publications, 1990.
- [214] J. J. Craighead, F. C. Craighead ve R. J. Davis, *A Field guide to Rocky Mountain wildflowers: Northern Arizona and New Mexico to British Columbia*. Boston: Houghton Mifflin, 1963.
- [215] Q.-H. Zeng, J.-B. Zhao, J.-J. Wang, X.-W. Zhang ve J.-G. Jiang, “Comparative extraction processes, volatile compounds analysis and antioxidant activities of essential oils from *Cirsium japonicum* Fisch. ex DC and *Cirsium setosum* (Willd.) M.Bieb,” *Lwt-Food Sci Technol*, vol. 68, pp. 595–605, 2016, doi: 10.1016/j.lwt.2016.01.017.
- [216] K. Yasukawa, T. Akihisa, Y. Inoue, T. Tamura, S. Yamanouchi ve M. Takido, “Inhibitory effect of the methanol extracts from compositae plants on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced ear oedema in mice,” *Phytother Res*, vol. 12, no. 7, pp. 484–487, 1998, doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199811)12:7<484::AID-PTR341>3.0.CO;2-L.
- [217] S. K. Windels ve P. A. Jordan, “Winter Use of Senescent Herbaceous Plants by White-Tailed Deer in Minnesota,” *The American Midland Naturalist*, vol. 160, no. 1, pp. 253–258, 2008.
- [218] G. Hatfield, “The thistles of Scotland”, in *The Lore of Scotland*, J. Westwood & S. Kingshill, eds, London, UK: RandomHouse Books, 2009, pp. 252–253.
- [219] J. C. Park vd., “Effects of methanol extract of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* and its principle, hispidulin-7-O-neohesperidoside on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in ethanol-treated rats,” *Phytother Res*, vol. 18, no. 1, pp. 19–24, 2004.
- [220] K.-L. Ku, C.-T. Tsai, W.-M. Chang, M.-L. Shen, C.-T. Wu ve H.-F. Liao, “Hepatoprotective effect of *Cirsium arisanense* Kitamura in tacrine-treated hepatoma

- Hep 3B cells and C57BL mice,” *The American journal of Chinese medicine*, vol. 36, no. 2, pp. 355–368, 2008.
- [221] J.C. Park, J. H. Lee ve J. W. Choi, Isolation and biological activity of flavone glycosides from the aerial part of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* in Korea, *Journal of The Korean Society of Food and Nutrition (Korea Republic)*, vol. 24, no. 6, pp. 906-910, 1995.
- [222] Y.-M. Yoo, J.-H. Nam, M.-Y. Kim, J. Choi ve H.-J. Park, “Pectolinarin and Pectolinarigenin of *Cirsium setidens* Prevent the Hepatic Injury in Rats Caused by D-Galactosamine via an Antioxidant Mechanism,” *Biol Pharm Bull*, vol. 31, no. 4, pp. 760–764, 2008.
- [223] M. Miyazawa, C. Yamafuji, K. Kurose ve Y. Ishikawa, “Volatile components of the rhizomes of *Cirsium japonicum* DC,” *Flavour Fragr J*, vol. 18, no. 1, pp. 15–17, 2003, doi: 10.1002/ffj.1135.
- [224] M. Ganzera, A. Pöcher ve H. Stuppner, “Differentiation of *Cirsium japonicum* and *C. setosum* by TLC and HPLC-MS,” *Phytochem Anal: PCA*, vol. 16, no. 3, pp. 205–209, 2005.
- [225] X. Yang et al., “In renal hypertension, *Cirsium japonicum* strengthens cardiac function via the intermedin/nitric oxide pathway”, *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, vol. 101, pp. 787–791, 2018.
- [226] Y. Lu, W. Song, X. Liang, D. Wei ve X. Zhou, “Chemical Fingerprint and Quantitative Analysis of *Cirsium setosum* by LC,” *Chroma*, vol. 70, 1-2, pp. 125–131, 2009.
- [227] L. B, A traditional Chinese medicine composition for treating diabetic peripheral neuropathy, CN 105168534 A, 23 December 2015.
- [228] X. S. Wang, Chinese medicinal composition containing *Lysimachia* and *Taraxacum* and others for treating diabetes urinary tract infection, CN 101112594 A, 30 January 2008.
- [229] X. Li vd., “Bioassay-Guided Isolation of Triterpenoids as α -Glucosidase Inhibitors from *Cirsium setosum*,” *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 24, no. 10, p. 1844, 2019, doi: 10.3390/molecules24101844.
- [230] Li. Hualin, Oral solution for treating prostatitis, Faming Zhuanli Shenging Gongkai Shuomingshu, CN 1903338 A 20070131, 2007.

- [231] H. Lim, K. H. Son, H. W. Chang, K. Bae, S. S. Kang ve H. P. Kim, “Anti-inflammatory activity of pectolarigenin and pectolarin isolated from *Cirsium chanroenicum*,” *Biol Pharm Bull*, vol. 31, no. 11, pp. 2063–2067, 2008.
- [232] T. Nakasugi, M. Nakashima ve K. Komai, “Antimutagens in *Cirsium maritimum*,” *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, vol. 10, no. 1, pp. 19–28, 2003, doi: 10.1300/J044v10n01_03.
- [233] A. Paluch, *Ziolołecznictwo ludowe w Polsce w XIX i początku, XX wieku*, Wrocław: Polskie Towarzystwo Ludoznawcze, 1989, pp. 98–99.
- [234] J. Nazaruk, S. K. Czechowska, R. Markiewicz ve M. H. Borawska, “Polyphenolic compounds and in vitro antimicrobial and antioxidant activity of aqueous extracts from leaves of some *Cirsium* species,” *Nat Prod Res*, vol. 22, no. 18, pp. 1583–1588, 2008.
- [235] G. H. Jeong, E. K. Park ve T. H. Kim, “New anti-glycative flavonoids from *Cirsium setidens* with potent radical scavenging activities,” *Phytochem Lett*, vol. 26, pp. 115–119, 2018.
- [236] M. R. Loizzo, G. A. Statti, R. Tundis, F. Conforti, S. Andò ve F. Menichini, “Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Cirsium tenoreanum*,” *Fitoterapia*, vol. 75, no. 6, pp. 577–580, 2004.
- [237] Y. M. Shen and Q. Z. Mu, “New Furans from *Cirsium chlorolepis*,” *Planta Med*, vol. 56, no. 5, pp. 472–474, 1990.
- [238] Y.-H. Noh et al., “Natural Substance MS-10 Improves Women's Health via Regulation of Estrogen Receptor,” *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, vol. 45, no. 6, pp. 903–910, 2016, doi: 10.3746/jkfn.2016.45.6.903.
- [239] Y. O. Kim, J. S. Kim, S. W. Lee, I. H. Jo ve S. W. Na, “Osteoprotective effect of extract from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* in ovariectomized rats,” *Korean J Med Crop Sci*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2015.
- [240] C. Cho vd., “*Cirsium japonicum* var. *maackii* and apigenin block Hif-2 α -induced osteoarthritic cartilage destruction,” *J Cell Mol Med*, vol. 23, no. 8, pp. 5369–5379, 2019.
- [241] Y. Takaishi, T. Okuyama, A. Masuda, K. Nakano, K. Murakami ve T. Tomimatsu, “Acetylenes from *Cirsium japonicum*,” *Phytochemistry*, vol. 29, no. 12, pp. 3849–3852, 1990.
- [242] S. Liu vd., “Anticancer activity and quantitative analysis of flavone of *Cirsium japonicum* DC,” *Nat Prod Res*, vol. 21, no. 10, pp. 915–922, 2007.

- [243] L. Yaping, Oral Chinese medicines decoction for treating hematuria associated with benign prostatic hyperplasia and its preparation, Faming Zhuanli Shenging Gongkai Shuomingshu, CN 101301324 A 20081112, 2008.
- [244] Y. Aixian, F. Junjun ve Y. Zhiqun, Manufacture of traditional Chinese medicine decoction for treating acute sinusitis, Faming Zhuanli Shenging Gongkai Shuomingshu, CN 1916299 A 20070221, 2007.
- [245] W. Yuejin, Herbal toothpaste for treating halitosis, Faming Zhuanli Shenging Gongkai Shuomingshu, CN 101305976 A 20081119, 2008.
- [246] A. B. J. Bracca ve T. S. Kaufman, "An alternative and convenient synthesis of oct- 7-enal, a naturally-occurring aldehyde isolated from the Japanese thistle *Cirsium dipsacolepis*," *J Braz Chem Soc*, vol. 19, no. 6, pp. 1125–1128, 2008.
- [247] S. Takano ve S. Kawaminami, "Eight aliphatic aldehydes from *Cirsium dipsacolepis* and their stereoselective synthesis," *Phytochemistry*, vol. 26, no. 2, pp. 435–438, 1987.
- [248] B. Yıldız, T. Arabacı, T. Dirmenci ve S. Köstekçi, "*Cirsium* (Asteraceae) Cinsinin Revizyonu", *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012, s.104-105.
- [249] B. Yıldız, T. Dirmenci ve T. Arabacı, "A new record for the flora of Turkey: *Cirsium candelabrum* Griseb. (*Cirsium* Sect. *Cirsium*, Asteraceae, Cynareae)", *Turk J Bot*, 33, ss. 47- 51, 2009.
- [250] T. Dirmenci , H. Duman ve T. Arabaci , "Türkiye'den Yeni Bir Köygöçüren [*Cirsium* Mill. (Papatyagiller / Asteraceae)] Türü ve Cinsin Şüpheli Bir Türünün Yeniden Keşfi", *Bağbahçe Bilim Dergisi*, c. 7, sayı. 3, ss. 35-44, Ara. 2021, doi:10.35163/bagbahce.730726
- [251] M. Grube ve S. Kroken, "Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi," *Mycol Res*, vol. 104, no. 11, pp. 1284–1294, 2000.
- [252] P. T. DePriest, "Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986-2001*," *Annu Rev Microbiol*, vol. 58, pp. 273–301, 2004, doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123730.
- [253] F. Högnabba, "Phylogenetic studies of cyanobacterial lichens", Ph. D. Thesis, Plant Biology Department of Biological and Environmental Sciences University of Helsinki, Finland, 2007.

- [254] R. H. Nilsson, E. Kristiansson, M. Ryberg, N. Hallenberg ve K.-H. Larsson, “Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification,” *Evolutionary Bioinformatics Online*, vol. 4, pp. 193–201, 2008.
- [255] M. Kılıçoğlu ve İ. Özkoç, "Fungal Sistematikteki Moleküler Gelişmeler", *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, c. 23, sayı. 1, ss. 65-72, Şub. 2008, doi:10.7161/anajas.2008.23.1.65-72
- [256] S. R. Amit Roy, “Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review,” *J Phylogenet Evol Biol*, vol. 02, no. 02, 2014, doi: 10.4172/2329-9002.1000131.
- [257] J. I. Cohen, “A phylogenetic analysis of morphological and molecular characters of Boraginaceae: evolutionary relationships, taxonomy ve patterns of character evolution,” *Cladistics*, vol. 30, no. 2, pp. 139–169, 2014, doi: 10.1111/cla.12036.
- [258] A. A. Jenks, J. B. Walker ve S.-C. Kim, “Phylogeny of New World *Salvia* subgenus *Calosphace* (Lamiaceae) based on cpDNA (psbA-trnH) and nrDNA (ITS) sequence data,” *J Plant Res*, vol. 126, no. 4, pp. 483–496, 2013.
- [259] B. Açıkgöz, *Ramalina* cinsine ait bazı liken türlerinin rDNA ITS dizi analizine göre moleküler filogenisi: Marmara Üniversitesi, 2011. [Online].
- [260] M. Yaratanakul Güngör, F. Gücin, Z. Aydın Sinirlioğlu ve F. Akbaş, “*Terfezia claveryi* Chatin. (Keme Mantarı) Üzerinde Moleküler Sistematik Çalışmalar”, *Biyolojik Çeşitlilik Sempozyumu*, Marmaris, Muğla, 22-23 Mayıs. 2013, s. 121.
- [261] Y. Shen, H. J. Newbury ve B. V. Ford-Lloyd, “Identification of Taxa in the Genus *Beta* using ITS1 Sequence Information,” (in En;en), *Plant Mol Biol Rep*, vol. 16, no. 2, pp. 147–155, 1998, doi: 10.1023/A:1007416817736.
- [262] G. Yatkın ve N. Güz, “Entomolojide DNA Barkodlama Tekniğinin Kullanımı,” *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, cilt. 28, sayı. 1, ss. 126–134, 2018, doi: 10.29133/yyutbd.350146.
- [263] Ç. Nacar, V. Aras, N. Denli, ve D. Keleş, “Kabak (*Cucurbita pepo* L.) Hatlarının Morfolojik Karakterizasyonu ve Akrabalık Derecelerinin Belirlenmesi”, *Alatarım*, cilt. 10, sayı. 1, ss. 13-18, 2011.
- [264] M. Dığrak, A. İlçim, *Sistematikğin Esasları*, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Kahramanmaraş, 2002, 71s.
- [265] P. K. Bretting ve M. P. Widrlechner, “Genetic markers and horticultural germplasm management,” *HortScience*, vol. 30, no. 7, pp. 1349–1356, 1995.

- [266] S. R. Draper, "ISTA Variety Committee Report of the working group for biochemic al tests for cultivar identification 1983-1986," in *Seed science and technology (Switzerland)*, 1987.
- [267] B. H. Liu, *Statistical genomics: Linkage, mapping ve QTL analysis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1998.
- [268] H. Ulutaş, "Bazı ümitvar taze fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşit adaylarının morfolojik ve moleküler karakterizasyonu", Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, 2016.
- [269] P. Y. Sancar, "Türkiye'de yetişen *Anthriscus* pers. (Apiaceae) türlerinin genetik yapısının ve filogenetik akrabalık ilişkilerinin kloroplast genomunun kodlanmayan" trn" bölgelerine göre araştırılması", Doktora tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ, 2017.
- [270] L. S. Kumar, "DNA markers in plant improvement," *Biotechnol Adv*, vol. 17, 2-3, pp. 143–182, 1999.
- [271] A. Yıldırım, N. Kandemir, "Genetik Markör ve Analiz Metodları", *Bitki Biyoteknolojisi II* (Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları), Ed. Sebahattin Özcan, Ekrem Gürel, Mehmet Babaoğlu, Konya, S.Ü. Vakfı Yayınları, 2002, ss. 334-363.
- [272] D. Svetleva, "Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) improvement," (in En; en), *Euphytica*, vol. 131, no. 2, pp. 189–200, 2003, doi: 10.1023/A:1023983831582.
- [273] Ahmet ve B. YANMAZ, "Bazı Taze Fasulye Çeşit Adayları ile Ticari Çeşitlerin Morfolojik Özellikler ve Protein Markörler Yoluyla Tanımlanmaları," *Tarım Bilimleri Dergisi*, vol. 9, no. 2, pp. 182–188, 2003, doi: 10.1501/Tarimbil_0000000788.
- [274] Z. G. Altun, DNA işaretleyiciler (Markör) ve Türkiye'de orman ağaçları ıslahında kullanımı, *Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Dergisi*, (295):20-36, 2006.
- [275] A. Ghafoor, Z. Ahmad, A. S. Qureshi ve M. Bashir, "Genetic relationship in *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. radiata* (L.) R. Wilczek based on morphological traits and SDS-PAGE," (in En; en), *Euphytica*, vol. 123, no. 3, pp. 367–378, 2002, doi: 10.1023/A:1015092502466.
- [276] R. W. Murphy, J. W. Sites, D. G. Buth ve C. H. Haufler, "Proteins I: Isozyme Electrophoresis", in *Molecular Systematics*, D. M. Hillis, C. Moritz (eds), Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc., 1990, pp. 45-126.
- [277] J. E. Staub, F. C. Serquen ve M. Gupta, "Genetic Markers, Map Construction ve Their Application in Plant Breeding," *Hort Sci*, vol. 31, no. 5, pp. 729–741, 1996, doi: 10.21273/HORTSCI.31.5.729.

- [278] D. G. Buth, "The Application of Electrophoretic Data in Systematic Studies," *Annu Rev Ecol Syst*, vol. 15, no. 1, pp. 501-522, 1984, doi: 10.1146/annurev.es.15.110184.002441.
- [279] E. Filiz ve İ. Koç, Bitki biyoteknolojisinde moleküler markörler, *Ziraat Fakültesi Dergisi*, cilt. 28, sayı. 2, ss. 207-214, 2011.
- [280] O. Gülşen ve N. Mutlu, Bitki biliminde kullanılan genetik markırlar ve kullanım alanları, *Alatarım*, vol. 4, no. 2, pp. 27–37, 2005.
- [281] N. G. Çetiner, "Türkiye'deki *Lupinus* L. (Fabaceae) türlerinin moleküler sistematik analizi", Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, 2013.
- [282] A. H. Paterson, "Making Genetic Maps," in *Genome Mapping in Plants*, A.H. Paterson, Ed., R.G. Landes Company, San Diego, California, Academic Press, Austin, Texas, 1996, 23–39.
- [283] B. C. Y. Collard, M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer ve E. C. K. Pang, "An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts," (in En; en), *Euphytica*, vol. 142, 1-2, pp. 169–196, 2005, doi: 10.1007/s10681-005-1681-5.
- [284] K.H. Wolfe, W.H. Li, P.M. Sharp, Rates of nucleotide substitutions vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast ve nuclear DNAs, *Proc Nati Acad Sci*, vol. 84, pp. 9054-9058, 1987.
- [285] J. C. Avise, *Molecular markers, natural history ve evolution*, 2nd ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 2004.
- [286] S. K. Behura, "Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues," *Mol Ecol*, vol. 15, no. 11, pp. 3087–3113, 2006.
- [287] D. G. Heckel, "Genomics in pure and applied entomology," *Annu Rev Entomol*, vol. 48, pp. 235–260, 2003, doi: 10.1146/annurev.ento.48.091801.112624.
- [288] H. D. Loxdale, G. Lushai, Molecular markers in entomology, *B Entomol Res*, vol.88, pp. 577–600, 1998.
- [289] J. L. Weber ve P. E. May, "Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction," *Am J Hum Genet*, vol. 44, no. 3, pp. 388–396, 1989.
- [290] J. Antoni Rafalski ve S. V. Tingey, "Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines," *Trends Genet*, vol. 9, no. 8, pp. 275–280, 1993.

- [291] S. Parlak, Marmara Bölgesinde yetiştirilen bazı zeytin (*Olea europaea* L.) kültürlerinin moleküler sistematik analizi, Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, 2007.
- [292] P. Taberlet vd., “Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding”, *Nucleic Acids Res*, vol. 35, no. 3, e14, 2007, doi: 10.1093/nar/gkl938.
- [293] J. Felsenstein, “CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP,” *Evolution; international journal of organic evolution*, vol. 39, no. 4, pp. 783–791, 1985.
- [294] K. Bremer, B. Bremer ve M. Thulin, *Introduction to phylogeny and systematics of flowering plants*. Uppsala: Univ, 2003.
- [295] Y. Cho, J. P. Mower, Y.-L. Qiu ve J. D. Palmer, “Mitochondrial substitution rates are extraordinarily elevated and variable in a genus of flowering plants,” *P Natl Acad Sci Usa*, vol. 101, no. 51, pp. 17741–17746, 2004.
- [296] S. W. Graham ve R. G. Olmstead, “Utility of 17 chloroplast genes for inferring the phylogeny of the basal angiosperms,” *Am J Bot*, vol. 87, no. 11, pp. 1712–1730, 2000.
- [297] Y. L. Qiu vd., “The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes,” *Nature*, vol. 402, no. 6760, pp. 404–407, 1999, doi: 10.1038/46536.
- [298] J. D. Palmer, “Comparative organization of chloroplast genomes,” *Annual Rev Genet*, vol. 19, pp. 325–354, 1985, doi: 10.1146/annurev.ge.19.120185.001545.
- [299] D. R. Wolstenholme ve C. R. Fauron, “Mitochondrial genome organization”, in *The Molecular Biology of Plant Mitochondria*, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995, 3, 1–60.
- [300] C. Simon, F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu ve P. Flook, “Evolution, Weighting ve Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers,” *Ann Entomol Soc Am*, vol. 87, no. 6, pp. 651–701, 1994.
- [301] P. S. Soltis ve J. J. Doyle, *Molecular systematics of plants*. New York: Chapman & Hall; International Thomson Publishing, 1992.
- [302] A. Başaran, *Tıbbi biyoloji: (ders kitabı)*, 7. Baskı. Bursa: Güneş & Nobel Tıp Kitapevleri, 2004.
- [303] A. Rokas, E. Ladoukakis ve E. Zouros, “Animal mitochondrial DNA recombination revisited,” *Trends Ecol Evol*, vol. 18, no. 8, pp. 411–417, 2003.

- [304] M. Karataş, Ed., *Moleküler biyoloji*. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık, 2012.
- [305] M. Sugiura, “The chloroplast genome,” *Essays Biochem*, vol. 30, pp. 49–57, 1995.
- [306] P. Taberlet, L. Gielly, G. Pautou ve J. Bouvet, “Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA,” *Plant Mol Biol*, vol. 17, no. 5, pp. 1105–1109, 1991.
- [307] D. E. Soltis vd., “Angiosperm Phylogeny Inferred from 18S Ribosomal DNA Sequences,” *Ann Mo Bot Gard*, vol. 84, no. 1, pp. 1–49, 1997.
- [308] M. Pillay ve C. Mazzella, “Chloroplast genome differences between *Paspalum dilatatum* Poir and the related species *P. notatum* Flugge,” *Theor Appl Genet*, vol. 95, no. 4, pp. 696–701, 1997.
- [309] M. T. Clegg, “Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution,” *Proc Nati Acad Sci USA*, vol. 90, no. 2, pp. 363–367, 1993.
- [310] S. R. Downie, D. S. Katz-Downie ve M. F. Watson, “A phylogeny of the flowering plant family Apiaceae based on chloroplast DNA *rpl16* and *rpoC1* intron sequences: towards a suprageneric classification of subfamily Apioideae,” *Am J Bot*, vol. 87, no. 2, pp. 273–292, 2000.
- [311] D. H. Xu, J. Abe, M. Sakai, A. Kanazawa ve Y. Shimamoto, “Sequence variation of non-coding regions of chloroplast DNA of soybean and related wild species and its implications for the evolution of different chloroplast haplotypes,” *Theor Appl Genet*, vol. 101, 5-6, pp. 724–732, 2000, doi: 10.1007/s001220051537.
- [312] Xing Gao, Yu-Ping Zhu, Bao-Cheng Wu, Ya-Mei Zhao ve Yue-Yu Hang, “Phylogeny of *Dioscorea* sect. *Stenophora* based on chloroplast *matK*, *rbcL* and *trnL-F* sequences,” *International Symposium on the Tree of Life*, vol. 46, pp. 315–321, 2008, doi: 10.3724/SP.J.1002.2008.08007.
- [313] C. A. Wilson, “Phylogenetic Relationships Among the Recognized Series in *Iris* Section *Limniris*,” *Syst Bot*, vol. 34, no. 2, pp. 277–284, 2009.
- [314] E. Ç. Şahin, “Türkiye florasına ait *Colchicum* l. genusunun morfolojik parametreler ve dna barkodlama sistemiyle tanımlanması”, Doktora tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul, 2016.
- [315] R. L. Small, R. C. Cronn ve J. F. Wendel, “Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants,” *Aust Systematic Bot*, vol. 17, no. 2, p. 145, 2004, doi: 10.1071/SB03015.

- [316] C. Brinegar, “Assessing Evolution And Biodiversity In Plants At The Molecular Level,” *Kathmandu University Journal of Science, Engineering And Technology*, vol. 5, no. 2, pp. 149–159, 2009.
- [317] S. A. Kelchner, “The Evolution of Non-Coding Chloroplast DNA and Its Application in Plant Systematics,” *Ann Mo Bot Gard*, vol. 87, no. 4, p. 482, 2000, doi: 10.2307/2666142.
- [318] U. R. Böhle, H. Hilger, R. Cerff ve W. F. Martin, “Non-coding chloroplast DNA for plant molecular systematics at the infrageneric level,” *EXS*, vol. 69, pp. 391–403, 1994, doi: 10.1007/978-3-0348-7527-1_23.
- [319] L. Gielly ve P. Taberlet, “The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences,” *Mol Biol Evol*, vol. 11, no. 5, pp. 769–777, 1994.
- [320] Y. Bakış vd., “Testing robustness of relative complexity measure method constructing robust phylogenetic trees for *Galanthus* L. using the relative complexity measure,” *BMC Bioinformatics*, vol. 14, no. 1, p. 20, 2013, doi: 10.1186/1471-2105-14-20.
- [321] T. Scharaschkin ve J. A. Doyle, “Phylogeny and historical biogeography of *Anaxagorea* (Annonaceae) using morphological and non-coding sequence data,” *Syst Bot*, vol. 30, no. 4, pp. 712–735, 2005.
- [322] L. A. McDade, T. F. Daniel, C. A. Kiel ve K. Vollesen, “Phylogenetic Relationships among Acantheae (Acanthaceae): Major Lineages Present Contrasting Patterns of Molecular Evolution and Morphological Differentiation,” *Syst Bot*, vol. 30, no. 4, pp. 834–862, 2005.
- [323] S. Chen, T. Xia, Y. Wang, J. Liu ve S. Chen, “Molecular systematics and biogeography of *Crawfordia*, *Metagentiana* and *Tripterospermum* (Gentianaceae) based on nuclear ribosomal and plastid DNA sequences,” *Ann Bot-London*, vol. 96, no. 3, pp. 413–424, 2005.
- [324] S. B. Rønning, K. Rudi, K. G. Berdal ve A. Holst-Jensen, “Differentiation of important and closely related cereal plant species (Poaceae) in food by hybridization to an oligonucleotide array,” *J Agr Food Chem*, vol. 53, no. 23, pp. 8874–8880, 2005.
- [325] J. Ward, R. Peakall, S. R. Gilmore ve J. Robertson, “A molecular identification system for grasses: a novel technology for forensic botany,” *Forensic Sci Int*, vol. 152, 2-3, pp. 121–131, 2005.

- [326] L. Gielly ve P. Taberlet, "A phylogeny of the European gentians inferred from chloroplast trnL (UAA) intron sequences," *Bot J Linn Soc*, vol. 120, no. 1, pp. 57–75, 1996.
- [327] D. Quandt ve M. Stech, "Molecular evolution of the trnL (UAA) intron in bryophytes," *Mol Phylogenet Evol*, vol. 36, no. 3, pp. 429–443, 2005.
- [328] D. Quandt vd., "Molecular evolution of the chloroplast TRNL-F region in land plants," in *Monogr Syst Bot Missouri Bot Gard*, vol. 98, 2004, pp. 13–37.
- [329] K. Shinozaki vd., "The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression," *The EMBO Journal*, vol. 5, no. 9, pp. 2043–2049, 1986.
- [330] J. D. Palmer, "Plastid Chromosomes: Structure and Evolution," in *The Molecular Biology of Plastids: Elsevier*, 1991, pp. 5–53.
- [331] R. W. Davies, R. B. Waring, J. A. Ray, T. A. Brown ve C. Scazzocchio, "Making ends meet: a model for RNA splicing in fungal mitochondria," *Nature*, vol. 300, no. 5894, pp. 719–724, 1982.
- [332] M. D. Bennett ve I. J. Leitch, "*Plant DNA C-value database.*" Release 2.0., Kew, West Sussex, U.K: Royal Botanical Gardens, 2003.
- [333] D. Zhang ve T. Sang, "Physical mapping of ribosomal RNA genes in peonies (*Paeonia Paeoniaceae*) by fluorescent in situ hybridization: implications for phylogeny and concerted evolution," *Am J Bot*, vol. 86, no. 5, pp. 735–740, 1999.
- [334] M. K. Dhar, B. Friebe, S. Kaul ve B. S. Gill, "Characterization and physical mapping of ribosomal RNA gene families in *Plantago*," *Ann Bot-London*, vol. 97, no. 4, pp. 541–548, 2006.
- [335] S. Sharma, S. Rustgi, H. Balyan ve P. Gupta, "Internal transcribed spacer (ITS) sequences of ribosomal DNA of wild barley and their comparison with ITS sequences in common wheat," *Barley Genet Newslett*, vol. 32, pp. 38–45, 2002.
- [336] J. Vander Stappen, S. van Campenhout, S. Gama Lopez ve G. Volckaert, "Sequencing of the internal transcribed spacer region ITS1 as a molecular tool detecting variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex," (in En; en), *Theor Appl Genet*, vol. 96, 6-7, pp. 869–877, 1998.
- [337] R. Appels ve J. Dvořák, "The wheat ribosomal DNA spacer region: Its structure and variation in populations and among species," *Theor Appl Genet*, vol. 63, no. 4, pp. 337–348, 1982.

- [338] R. Appels ve R.L. Honeycutt, “rDNA: evolution over a billion years,” in *DNA Systematics*, S.K. Dutta (ed), Volume II: Plants pp. 81-135, 1985. [Online].
- [339] M. S. Bobola, D. E. Smith ve A. S. Klein, “Five major nuclear ribosomal repeats represent a large and variable fraction of the genomic DNA of *Picea rubens* and *P. mariana*,” *Mol Biol Evol*, vol. 9, no. 1, pp. 125–137, 1992.
- [340] D. R. Govindaraju ve C. A. Cullis, “Ribosomal DNA variation among populations of a *Pinus rigida* Mill. (pitch pine) ecosystem: I. Distribution of copy numbers,” (in En;en), *Heredity*, vol. 69, no. 2, pp. 133–140, 1992.
- [341] K.R. Hamby, E. A. Zimmer, “Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics” in *Molecular Systematics of Plants*, P. Soltis, D. Soltis and J. Doyle, eds., New York: Chapman&Hall, 1992, pp. 50- 91.
- [342] R. A. Jorgensen ve P. D. Cluster, “Modes and Tempos in the Evolution of Nuclear Ribosomal DNA: New Characters for Evolutionary Studies and New Markers for Genetic and Population Studies,” *Ann Mo Bot Gard*, vol. 75, no. 4, p. 1238, 1988.
- [343] C. J. Rivin, C. A. Cullis ve V. Walbot, “Evaluating quantitative variation in the genome of *Zea mays*,” *Genetics*, vol. 113, no. 4, pp. 1009–1019, 1986.
- [344] S. O. Rogers ve A. J. Bendich, “Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer,” *Plant Mol Biol*, vol. 9, no. 5, pp. 509–520, 1987.
- [345] T. J. White, T. D. Bruns, S. B. Lee, J. W. Taylor ve J. J. Sninsky, “Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics,” in *PCR Protocols*, 1990, pp. 315–322.
- [346] M. Gardes ve T. D. Bruns, “ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts,” *Mol Ecol*, vol. 2, no. 2, pp. 113–118, 1993.
- [347] N. Şahin, Türkiye’de yetişen *Serratula* L. (Asteraceae) cinsine ait taksonların ITS nrDNA ve TRNL-F cpDNA dizileriyle moleküler sistematik analizi, Yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 1-76, 2011.
- [348] M. Korabecna, “The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2 ve 5. 8 S rRNA Gene): its biological meaning and application in medical mycology,” pp. 783–787, 2007.
- [349] Y. He, P. Hou, G. Fan, Z. Song ve Y. Zhang, “Internal transcribed spacers (ITS) identification of *Angelica anomala* Lallemand Chuanbaizhi (in Chinese) cultivars

- collected in Sichuan and their molecular phylogenetic analysis with other *Angelica* L. species,” *Journal of Medicinal Plant Research*, vol. 5, no. 16, pp. 3653–3659, 2011.
- [350] S. Malyshev, N. Kartel, “Molecular markers in mapping plant genome”, *Mol Biol*, vol. 31, 1997, pp. 163-171.
- [351] S. Goel, S. N. Raina ve Y. Ogihara, “Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA in the *Phaseolus-Vigna* complex,” *Mol Phylogenet Evol*, vol. 22, no. 1, pp. 1–19, 2002, doi: 10.1006/mpev.2001.1037.
- [352] P. Poczai ve J. Hyvönen, “Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects,” *Mol Biol Rep*, vol. 37, no. 4, pp. 1897–1912, 2010.
- [353] D. E. Soltis ve P. S. Soltis, “Choosing an Approach and an Appropriate Gene for Phylogenetic Analysis,” in *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*, D. E. Soltis, P. S. Soltis ve J. J. Doyle, Eds., Boston, MA: Springer US, 1998, pp. 1–42.
- [354] D. Tremousaygue, M. Laudie, F. Grellet ve M. Delseny, “The *Brassica oleracea* rDNA spacer revisited,” *Plant Mol Biol*, vol. 18, no. 5, pp. 1013–1018, 1992.
- [355] F. Cordesse, R. Cooke, D. Tremousaygue, F. Grellet ve M. Delseny, “Fine structure and evolution of the rDNA intergenic spacer in rice and other cereals,” *J Mol Evol*, vol. 36, no. 4, pp. 369–379, 1993.
- [356] M. D. McMullen, B. Hunter, R. L. Phillips ve I. Rubenstein, “The structure of the maize ribosomal DNA spacer region,” *Nucleic Acids Res*, vol. 14, no. 12, pp. 4953–4968, 1986.
- [357] K. Schiebel, G. von Waldburg, J. Gerstner ve V. Hemleben, “Termination of transcription of ribosomal RNA genes of mung bean occurs within a 175 bp repetitive element of the spacer region,” *Molecular & general genetics: MGG*, vol. 218, no. 2, pp. 302–307, 1989.
- [358] G. T. Chandler, R. J. Bayer ve M. D. Crisp, “A molecular phylogeny of the endemic Australian genus *Gastrolobium* (Fabaceae: Mirbelieae) and allied genera using chloroplast and nuclear markers,” *Am J Bot*, vol. 88, no. 9, pp. 1675–1687, 2001.
- [359] S. D. Wright, C. G. Yong, S. R. Wichman, J. W. Dawson ve R. C. Gardner, “Stepping stones to Hawaii: a trans-equatorial dispersal pathway for *Metrosideros* (Myrtaceae) inferred from nrDNA (ITS+ETS),” *J Biogeogr*, vol. 28, no. 6, pp. 769– 774, 2001.

- [360] K. King, R. A. Torres, U. Zentgraf ve V. Hemleben, "Molecular evolution of the intergenic spacer in the nuclear ribosomal RNA genes of cucurbitaceae," *J mol evol*, vol. 36, no. 2, pp. 144–152, 1993.
- [361] M. Türктаş, DNA Dizi Analizi. Floresan Temelli Yeni nesil genetik analiz uygulamaları: DNA dizi analizi, moleküler markörler uygulamaları ve çoklu gen anlatım analizleri uygulamalı eğitimi kitapçığı, TÜBİTAK, 2011.
- [362] R. W. Holley vd., "Structure of A Ribonucleic Acid," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 147, no. 3664, pp. 1462–1465, 1965.
- [363] W. S. Klug, M.R. Cummings, *Genetik Kavramlar*, 6. Baskıdan Çeviri, Editör: C. ÖNER, Ankara: Palme Yayıncılık, 2003, 816 s.
- [364] A. M. Maxam ve W. Gilbert, "A new method for sequencing DNA," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 74, no. 2, pp. 560–564, 1977.
- [365] F. Sanger, S. Nicklen ve A. R. Coulson, "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467, 1977.
- [366] Dizi Analizi (Sekans) Teknikleri, 2010. [Online].
- [367] L. M. Smith et al., "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis," *Nature*, vol. 321, no. 6071, pp. 674–679, 1986.
- [368] B. K. Nunnally, "Introduction to DNA Sequencing: Sanger and Beyond", in *Analytical techniques in DNA sequencing*, Boca Raton, FL: Taylor & Francis, 2005, 1-12.
- [369] M. A. Özcel, M. Tanyüksel ve H. Een, Eds., *Moleküler parazitoloji*. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği, 2009. 407-424.
- [370] J. Sambrook, E. F. Fritsch ve T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [371] J. D. Thompson, D. G. Higgins ve T. J. Gibson, "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice," *Nucleic Acids Res*, vol. 22, no. 22, pp. 4673–4680, 1994.
- [372] N. Saitou ve T. Imanishi, "Relative Efficiencies of the Fitch-Margoliash, Maximum-Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution ve Neighbor-joining Methods of Phylogenetic Tree Construction in Obtaining the Correct Tree," *Mol Biol Evol*, vol. 6, no. 5, p. 514, 1989.

- [373] D. A. Benson, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell ve D. L. Wheeler, “GenBank,” *Nucleic Acids Res*, vol. 34, 16-20, 2006, doi: 10.1093/nar/gkj157.
- [374] R. H. Nilsson, E. Kristiansson, M. Ryberg ve K.-H. Larsson, “Approaching the taxonomic affiliation of unidentified sequences in public databases--an example from the mycorrhizal fungi,” *BMC Bioinformatics*, vol. 6, no. 1, p. 178, 2005.
- [375] J. Xiong, *Essential bioinformatics*. New York: Cambridge University Press, 2006.
- [376] D. W. Mount, “Dot matrix pairwise sequence comparison,” *CSH protocols*, vol. 2007, no. 12, pdb. top 31, 2007.
- [377] N. Saitou ve M. Nei, “The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees,” *Mol Biol Evol*, vol. 4, no. 4, pp. 406–425, 1987, doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- [378] H. H. Basibuyuk, R. Belshaw, F. Bardakçı ve D. Quicke, *Phylogenetic Systematics: Önder Matbaa*, 2000.
- [379] S. Freeman ve J. C. Herron, “*Evrimsel Analiz*”, B. Çıplak, H. H Basıbüyük, S. Karaytuğ ve İ. Gündüz, eds., Ankara, Palme Yayıncılık, 1999.
- [380] A. Özad, “Bazı Scorzonerea L. (Asteraceae) Taksonlarının nrDNA ITS Bölgelerinin Karşılaştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniv., Rize, Türkiye, 2010.
- [381] D. Mount, “Chapter 7 Phylogenetic prediction”, in *Bioinformatics*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [382] MR BAYES. <http://mrbayes.csit.fsu.edu/tr.>, (2011).
- [383] D. L. Swofford, PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. 0 a. 144 Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2002.
- [384] J. D. Retief, “Phylogenetic analysis using PHYLIP”, in *Bioinformatics methods and protocols*, Totowa, NJ, USA: Humana Press, 2000, pp. 243-258.
- [385] H. A. Schmidt, K. Strimmer, M. Vingron ve A. von Haeseler, “TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing,” *Bioinformatics (Oxford, England)*, vol. 18, no. 3, pp. 502–504, 2002.
- [386] S. Guindon, F. Lethiec, P. Duroux ve O. Gascuel, “PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference,” *Nucleic Acids Res*, vol. 33, Web Server issue, W557-9, 2005.
- [387] D. Simon ve B. Larget, Bayesian Analysis in Molecular Biology, BAMBE (Department of Mathematics and Computer Science, Duquesne University, Pittsburgh, PA, 1999).

- [388] T. J. White, T. Bruns, S. Lee ve J. Taylor, Amplification and direct sequencing of fungal ribozomal RNA genes for phylogenetics, in *PCR Protocols Aguide to methods and application*, M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky ve T. J. White, eds., San Diego, USA: Academic Pres Inc, 1990.
- [389] L. E. Urbatsch, B. G. Baldwin ve M. J. Donoghue, “Phylogeny of the *Coneflowers* and Relatives (Heliantheae: Asteraceae) Based on Nuclear rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences and Chlorplast DNA Restriction Site Data,” *Syst Bot*, vol. 25, no. 3, p. 539, 2000.
- [390] J. Shaw, E. B. Lickey, E. E. Schilling ve R. L. Small, “Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III,” *Am J Bot*, vol. 94, no. 3, pp. 275–288, 2007.
- [391] Sequencher® version 5.4.6 DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA <http://www.genecodes.com>
- [392] T. A. Hall, “BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT,” in *Nucleic acids symposium series*, vol. 41, 1999, pp. 95–98.
- [393] MUSCLE (Multiple Sequence Alignment) <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>
- [394] J. G. Segarra-Moragues, L. Villar, J. López, E. Pérez-Collazos ve P. Catalán, “A new Pyrenean hybrid *Cirsium* (Asteraceae) as revealed by morphological and molecular analyses,” *Bot J Linn Soc*, vol. 154, no. 3, pp. 421–434, 2007.
- [395] J. A. Coyne, “Genetics and speciation,” *Nature*, vol. 355, no. 6360, pp. 511–515, 1992.
- [396] P. Bures vd., “Pollen viability and natural hybridization of Central European species of *Cirsium*,” *Preslia -Praha-*, vol. 82, pp. 391–422, 2010.
- [397] T. Dirmenci, T. Özcan, T. Yazıcı, T. Arabacı ve E. Martin, “Morphological, cytological, palynological and molecular evidence on two new hybrids from Turkey: an example of homoploid hybridization in *Origanum* (Lamiaceae),” *Phytotaxa*, vol. 371, no. 3, p. 145, 2018.
- [398] T. Dirmenci, T. Yazıcı, T. Özcan, S. Çelenk ve E. Martin, “A new species and a new natural hybrid of *Origanum* L. (Lamiaceae) from the west of Turkey,” *Turk J Bot*, vol. 42, no. 1, pp. 73–90, 2018.

- [399] M. Jazwa , E. Jedrzejczak , E. Klichowska ve A. Pliszko , "Predicting the potential distribution area of *Solidago xniederederi* (Asteraceae)", *Turk J Bot*, c. 42, sayı. 1, ss. 51-56, Şub. 2018.
- [400] S. C. Harland, "Introgressive Hybridization," *Nature*, vol. 166, no. 4215, pp. 243–244, 1950, doi: 10.1038/166243b0.
- [401] J. M. J. Wet, "Polyploidy and Evolution in Plants," *Taxon*, vol. 20, no. 1, pp. 29– 35, 1971, doi: 10.2307/1218531.
- [402] L. H. Rieseberg ve J. H. Willis, "Plant speciation," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 317, no. 5840, pp. 910–914, 2007.



