

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

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN *ZIZIPHORA* L. (LAMIACEAE)
TAKSONLARININ MOLEKÜLER SİSTEMATİĞİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Görkem DENİZ

Balıkesir, Temmuz-2007

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

TÜRKİYE'DE YETİŞEN ZIZIPHORA L. (LAMIACEAE)
TAKSONLARININ MOLEKÜLER SİSTEMATIĞI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Görkem DENİZ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güleendam TÜMEN
Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR (İkinci Danışman)

Sınav Tarihi: 23.07.2007

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Güleendam TÜMEN (Danışman-BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Tuncay DIRMENCI(BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Selma SİNAN (BAÜ)

Balıkesir, Temmuz-2007

**Bu yüksek lisans çalışması Balıkesir Üniversitesi 2006 / 06 No'lu
Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.**

ÖZET

TÜRKİYE’DE YETİŞEN *ZIZIPHORA* L. (LAMIACEAE) TAKSONLARININ MOLEKÜLER SİSTEMATİĞİ

Görkem DENİZ

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilimdalı

Yüksek Lisans tezi / Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN
Yardımcı Danışman : Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR

Balıkesir, 2007

Ziziphora L. (Lamiaceae) cinsi ülkemizde *Ziziphora clinopodioides* Lam, *Ziziphora capitata* L., *Ziziphora taurica* Bieb, *Ziziphora persica* Bunge ve *Ziziphora tenuior* L. olmak üzere beş türle temsil edilmektedir. *Ziziphora taurica*; *Ziziphora taurica* subsp. *cleonioides* (Boiss.) ve *Ziziphora taurica* M. Bieb. subsp. *taurica* olmak üzere iki alt türe sahiptir. *Ziziphora clinopodioides* dışındaki tüm *Ziziphora* üyeleri tek yıllıktır. Çoğunlukla aromatik özellik gösterirler. Bu özellikleriyle Anadolu’ da halk arasında “nane ruhu” gibi isimlerle çay olarak kullanılmaktadır. Bu sebepten dolayı birçok kimyasal çalışmaya da konu olmuştur.

Ziziphora cinsi türleri ülkemizde oldukça zengin bir yayılış alanına sahiptir. Bu çalışmanın amacı *Ziziphora* cinsini oluşturan Türkiye’deki taksonların filogenetik ilişkilerini ve taksonomik pozisyonlarını net bir şekilde ortaya koymaktır. ITS (ITS1, ITS2 ve 5.8 geni) bölgesinin dizi analizi sonucu elde edilen bilgiler Paup 4.0 [1], BioEdit [2] ve Phyllip3.66 [3] gibi bilgisayar programları yardımıyla filogenetik ağaç oluşturmada kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlar genel olarak morfolojik anahtarla uyum içerisinde çıkmış ve *Ziziphora* cinsine ait türler yine kendi aralarında guplar oluşturmuşlardır. Van yöresinden toplanan *Ziziphora taurica* ssp. *clenioides* (E) örneğinin morfolojik olarak diğer *Ziziphora taurica* ssp. *clenioides* örneklerinden olan farkı moleküler yöntemlerle de açığa çıkartılmış ve bu örneğin bir alttür olduğunun düşünülmesini sağlamıştır.

Anahtar sözcükler: *Ziziphora*, Lamiaceae, ITS, Moleküler Sistematik

ABSTRACT

MOLECULAR SYSTEMATICS OF *ZIZIPHORA* L. (LAMIACEAE) TAXA DISTRIBUTED IN TURKEY

Görkem DENİZ

Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology

(Msc. Thesis / Supervisor: Prof. Dr. Güleendam TÜMEN)
Co Supervisor : Asist. Prof. Dr. Ekrem DÜNDAR

Balikesir-Turkey, 2007

The genus *Ziziphora* L. (Lamiaceae) is represented with 5 species and 6 taxa in Turkey's flora as *Ziziphora clinopodioides* Lam, *Ziziphora capitata* L., *Ziziphora taurica* Bieb, *Ziziphora persica* Bunge ve *Ziziphora tenuior* L. *Ziziphora taurica*; consists of 2 subspecies as *Ziziphora taurica* subsp. *cleonioides* (Boiss.) ve *Ziziphora taurica* M. Bieb. subsp. *taurica*. Except *Ziziphora clinopodioides*, the other *Ziziphora* taxa are annual. They mostly show aromatic features. For this reason, they are used in folk medicine as tea in Anatolia. This make them important to be a source of many chemical studies.

Taxa belong to *Ziziphora* are widely distributed in Turkey. The aim of the research is to determine the phylogenetic relationships and taxonomic positions of the taxa belong to *Ziziphora* which are distributed in Turkey. The obtained data by sequence analysing of ITS (ITS1, ITS2 ve 5.8 gene) region is used to construct phylogenetic tree by using Paup 4.0 [1], BioEdit [2] ve Phyllip3.66 [3].

The molecular results generally confirm to the morphological data and *Ziziphora* species forms groups among themselves. Because of its morphological differences, *Ziziphora clinopodioides* (E) from Van province shows variability in *clinopodioides* group and this may be a new subspecies.

Key Words: *Ziziphora*, Lamiaceae, ITS, Molecular Systematic

İÇİNDEKİLER

ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORD	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Türkiye’ de Labiatae (Lamiaceae) Familyası	2
1.1.1 Genel Özellikleri	2
1.2 Anadolu’da Yetişen <i>Ziziphora</i> Taksonları	3
1.2.1 <i>Ziziphora clinopodioides</i> Lam.	3
1.2.2 <i>Ziziphora capitata</i> L.	4
1.2.3 <i>Ziziphora persica</i> Bunge	5
1.2.4 <i>Ziziphora tenuior</i> L.	6
1.2.5 <i>Ziziphora taurica</i> Bieb.	8
1.2.5.1 subsp. <i>taurica</i>	8
1.2.5.2 subsp. <i>cleonioides</i> (Boiss.)	9
1.3 <i>Ziziphora</i> L. cinsinin Kimyasal Özellikleri	10
1.4 <i>Ziziphora</i> L. Cinsinin Ekonomik ve Tıbbi Önemi	15
1.5 Moleküler Filogeni	16
1.5.1 Moleküler Filogenide Kullanılan Yöntemler	17
1.5.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	17
1.5.1.2 RAPD	18
1.5.1.3 AFLP (Amplified Fragment Length polymorphism)	19
1.5.1.4 SSCP (single strand conformational polymorphism)	19
1.5.1.5 Mikrosatellit Markırlar (Short Sequence Repeats, SSR)	20
1.5.1.6 VNTR (Variable Number Tandem Repeat) (Mini Satellitler)	20
1.5.2 Moleküler Filogenide Kullanılan DNA Çeşitleri	20
1.5.2.1 Mitokondriyal DNA	21
1.5.2.2 Kloroplast DNA’sı	22
1.5.2.3 Çekirdek DNA’sı	23
1.5.2.3.1 İç Transkribe Olan Boşluklar (Internal Transcribed Spacers, ITS)	25
1.5.2.3.1.1 İç Transkribe Olan Bölgenin Filogenetik Kullanışlılığı	26
2. MATERYAL VE YÖNTEM	27
2.1 Materyal	27
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitki Örnekleri	27

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	29
2.1.2.1 Genomik DNA izolasyonunda Kullanılan Kimyasallar	29
2.1.2.2 PZR'da (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Kullanılan Kimyasallar	30
2.1.2.3 PZR' de kullanılan Primerler ve Özellikleri	31
2.1.2.4. Agaroz Jel Elektroforez Tamponları	31
2.2. YÖNTEM	32
2.2.1. Cam Malzeme ve Plastik Malzemenin Hazırlanması	32
2.2.2 Genomik DNA (gDNA) İzolasyon Yöntemi	32
2.2.3 PZR Amplifikasyonu (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	33
2.2.4 PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	34
3. BULGULAR	35
3.1 Ziziphora Taksonlarının Morfolojik Karakterlere Dayalı Taksonomi Anahtarı	35
3.2 ITS Bölgesinin Dizilenmesi	36
3.3 Verilerin Analizi ve Değerlendirilmesi	42
4.SONUÇ ve TARTIŞMA	54
5. KAYNAKLAR	57

KISALTMALAR

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
L.	Linne
Z.	<i>Ziziphora L.</i>
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
nrDNA	Nüklear Ribozomal DNA
mtDNA	Mitokondri DNA'sı
cpDNA	Kloroplast DNA'sı
bp	Base Pair (baz çifti)
ITS	Internal Transcribed Spacer
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dH ₂ O	Distile Su
dNTP	Deoksiribonükleosid trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EtBr	Etidyumbromür
gDNA	Genomik DNA
PAUP	Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)
SSCP	Single Strand Conformational Polymorphism (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi)
SSR	Simple Sequence Repeat (Basit Dizi Tekrarları)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Trisboratetilendiamintetraasetikasit
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages
UV	Ultraviyole
VNTR	Variable Numbers of Tandem Repeat
RUBISCO	1,5-bifosfatkarboksilaz/ oksijenaz
NOR	Nucleolar organizer regions

ETS	External Transcribed Spacer
S	Subunit
NaAc	Sodyum Asetat
TE	(Tris – EDTA)
EtOH	Etanol
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
NH ₄ SO ₄	Amonyum Sülfat
T _m	Erime sıcaklıkları
NCBI	National Center For Biotechnology Information

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1 <i>Ziziphora clinopodioides</i> Türünün Türkiye'deki Yayılış Alanları	4
Şekil 1. 2 <i>Ziziphora capitata</i> Türünün Türkiye'deki Yayılış Alanları	5
Şekil 1. 3 <i>Ziziphora persica</i> Türünün Türkiye'deki Yayılış Alanları	6
Şekil 1. 4 <i>Ziziphora tenuior</i> Türünün Türkiye'deki Yayılış Alanları	7
Şekil 1. 5 <i>Ziziphora taurica</i> subsp. <i>taurica</i> 'nın Türkiye'deki Yayılış Alanları	9
Şekil 1. 6 <i>Ziziphora taurica</i> subsp. <i>cleonioides</i> 'in Türkiye'deki Yayılış Alanları	10
Şekil 1. 7 Türkiye'de Yetişen <i>Ziziphora</i> L. Taksonlarının Yayılış Alanları	10
Şekil 1. 8 Çekirdek ribozomal DNA'sının tekrarlı üniteleri [97]	25
Şekil 3. 1 Jelden Geri Kazanmak İçin Yapılmış 8 Adet 50 µL Hacimde 7757 Nolu Örneğe Ait PCR Ürününün Jel Fotoğrafi	37
Şekil 3. 2 Jelden Geri Kazanmak İçin Yapılmış 8 Adet 50 µL Hacimde 3165 Nolu Örneğe Ait PCR Ürününün Jel Fotoğrafi	38
Şekil 3. 3 Jelden Geri Kazanmak İçin Yapılmış 8 Adet 50 µL Hacimde 3125 (Üstte), 3156 (altta) Nolu Örneğe Ait PCR Ürününün Jel Fotoğrafi	38
Şekil 3. 4 Jelden Geri Kazanmak İçin Yapılmış 8 Adet 50 µL Hacimde 3174 Nolu Örneğe Ait PCR Ürününün Jel Fotoğrafi	39
Şekil 3. 5 Jelden Geri Kazanmak İçin Yapılmış 8 Adet 50 µL Hacimde 16273 (Üstte), 3359 (altta) Nolu Örneğe Ait PCR Ürününün Jel Fotoğrafi	39
Şekil 3. 6 Jelden Geri Kazanmak İçin Yapılmış 8 Adet 50 µL Hacimde 3168 (Üstte), 3194 (altta) Nolu Örneğe Ait PCR Ürününün Jel Fotoğrafi	40
Şekil 4. 1 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 1 Numaralı Ağaç	43
Şekil 4. 2 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 2 Numaralı Ağaç	44
Şekil 4. 3 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 3 Numaralı Ağaç	45
Şekil 4. 4 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 4 Numaralı Ağaç	46
Şekil 4. 5 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 5 Numaralı Ağaç	47
Şekil 4. 6 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 6 Numaralı Ağaç	48
Şekil 4. 7 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 7 Numaralı Ağaç	49
Şekil 4. 8 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 8 Numaralı Ağaç	50
Şekil 4. 9 BOOTSTRAP Analizi	51
Şekil 4. 10 UPGMA Analizi Sonucu Oluşan Ağaç	52
Şekil 4. 11 Neighbor Joining (NJ) Analizi Sonucu Oluşan Ağaç	53

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge1. 1 <i>Ziziphora taurica</i> subsp. <i>clenioides</i> uçucu yağının bileşimi [33, 34]	11
Çizelge1. 2 <i>Ziziphora persica</i> 'nın esansiyel yağ kompozisyonu [35]	11
Çizelge1. 3 <i>Ziziphora taurica</i> sp. <i>taurica</i> 'nın esansiyel yağ kompozisyonu [36]	11
Çizelge1. 4 <i>Ziziphora tenuior</i> 'un esansiyel yağ kompozisyonu [37]	13
Çizelge1. 5 <i>Ziziphora clinopodioides</i> 'in esansiyel yağ kompozisyonu [38, 39]	14
Çizelge 2. 1 Çalışmada Kullanılan Bitki Örnekleri	27
Çizelge 2. 2 Genomik Dna İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler ve Özellikleri	29
Çizelge 2. 3 PZR'da (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Kullanılan Kimyasallar	30
Çizelge 2. 4 PZR'de Kullanılan Primerler ve Özellikleri	31
Çizelge 2. 5 (0,5)xTBE (Tris-Borate) Tampon	31
Çizelge 2. 6 PCR Reaksiyonları	34
Çizelge 3. 1 Morfolojik Veriler	36
Çizelge 3. 2 Jelden Geri Kazanılan Örnekler ve Gönderildikleri Dizi Analizi Şirketi	40
Çizelge 3. 3 PCR Ürünü Halinde Dizi Analizi İçin Gönderilen Örnekler ve Gönderildikleri Dizi Analizi Şirketi	41

ÖNSÖZ

Bilimsel faaliyetleri sevmemde büyük katkısı olan ve akademik hayata adım atmamı sağlayan, gerek çalışmalarım sırasında, gerekse özel yaşantımda karşılaştığım her türlü güçlükte her zaman yardım ve desteğiyle yanımda olan değerli danışmanım Prof. Dr. Gülendam TÜMEN'e,

Her türlü bilgi, deneyim ve donanımını hiç esirgmeden benimle paylaşan değerli hocam Ekrem DÜNDAR ve bitki örneklerini Türkiye'nin dört bir yanından toplayıp çalışmanın belkemiğini oluşturan Tuncay DIRMENCİ'ye

Çalışmam için gerekli laboratuvar imkanlarını sağlayan BÜTAM Müdürlüğü'ne, bu merkezde çalışan Ferit KARANFİL'e ve Mehmet UÇKUN'a,

Bu çalışmaya 2006/06 no'lu araştırma projesi ile maddi destek sağlayan Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Projeleri Birimi'ne

2210 Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı'ndan yüksek lisansım boyunca almış olduğum maddi destek için TÜBİTAK'a

Ders ve laboratuvar aşamasında deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarım, Doç. Dr. Feray KÖÇKAR, Doç. Dr. Yusuf TURAN Yard. Doç. Dr. Fatih COŞKUN, Yard. Doç. Dr. Fatih SATIL ve Yard. Doç. Dr. Tülin AŞKUN'a

Malzeme konusunda hiçbir zaman sıkıntı çekmememiz için elinden gelen her türlü fedarkârlığı yapan sevgili arkadaşım Arda KARAN ve ihtiyacım olan bilgisayar programlarında hiç sıklımadan destek olan Serdar SÖNMEZ'e

Yüksek lisans çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen, yorulduğum anlarda her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Nurten ÇANAKÇI, Sabiha PARLAK, Özlem KIZILKEÇİLİ, Sümeyye AYDOĞAN, Alp ALPER, Meltem AYDIN, Serpil UĞRAŞ, Semra IŞIK, Leyla YILDIRIMER, Pınar AYTAR, Öznur SUAKAR, Evrim ÇELEBİ ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyip, bu günlere gelmemi sağlayan canım AİLEME

en içten teşekkürlerimi sunarım.
İyi ki varsınız.

Balıkesir, 2007

Görkem DENİZ

1. GİRİŞ

Bitki moleküler sistematiği özellikle son 20 yıldır hızla gelişmektedir [4-6]. Bu gelişme dizi analizlerinin kullanılmasıyla [7] ve yeni filogenetik analiz metotlarının bulunmasıyla [8] moleküler sistematiğe de katkı sağlamaya başlamıştır. Filogenetik bilgi açısından morfolojik karakterlerin yetersiz olduğu zamanlarda dizi analizleri filogenetik analizler için çok faydalı olmaktadır [9]. Çünkü filogenetikçiler genellikle dizilerin filogenisinin organizmaların filogenisine çok yakın olduğunu farz etmektedirler [6]. Dizi analizi yöntemleri canlıların coğrafik orijinlerinin bulunmasından [10] canlıların filogenilerini moleküler olarak ispatlamaya kadar [11, 12] birçok alanda kullanılmaktadır.

Angiospermlerin moleküler filogenileri hakkında yapılan çalışmalarda genellikle kloroplast DNA'sı [13-15], mitokondriyal DNA [16] veya çok tekrarlı nüklear ribozomal DNA [17-22] genleri kullanılmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre bu üç genomdaki DNA dizileri farklı oranlarda değişime uğramışlardır. Nüklear genom daha hızlıyken mitokondriyal ve plastid genomlarının daha yavaş değiştiği tahmin edilmektedir [23]. Nüklear ribozomal DNA (nrDNA) bölgeleri arasındaki farklı mutasyon oranları birçok taksonomik seviyede filogenetik sonuç alınmasına olanak sağlar. ITS, (ITS1+ ITS2 +5.8 geni) nrDNA'nın en çok çeşitlilik gösteren bölümüdür [24, 25] ve bitki filogenetiğinin yeniden yapılanmasında önemli bir lokus olduğu kanıtlanmıştır [26, 27].

Bu çalışmada *Ziziphora* L. (Lamiaceae) cinsine ait Anadolu' da bulunan taksonların moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak ITS dizi analizi yöntemiyle filogenetik ilişkileri belirlenmiş ve elde edilen bilgiler ışığında bu cinsin revizyonuna katkı sağlanmıştır. Ülkemizde ve dünyada bu cinse ait taksonların moleküler taksonomisine ait herhangi bir çalışma bulunmadığından, bu çalışma ile *Ziziphora* L.cinsi taksonlarına ait ilk moleküler

sistematik bilgileri elde edilmiştir. Ayrıca daha önce Lamiaceae familyasına ait cinslerin revizyonlarında ITS dizileri sıklıkla kullanıldığından bu cinsin Anadolu'da yetişen taksonlarına ait doğru ve güvenilir taksonomik veriler elde edilecektir. Ayrıca ITS dizilerinin Lamiaceae familyasında revizyon amaçlı kullanımının [28, 29] uygunluğu bir örnekle daha teyid edilmiş bulunmaktadır.

1.1 Türkiye' de Labiatae (Lamiaceae) Familyası

1.1.1 Genel Özellikleri

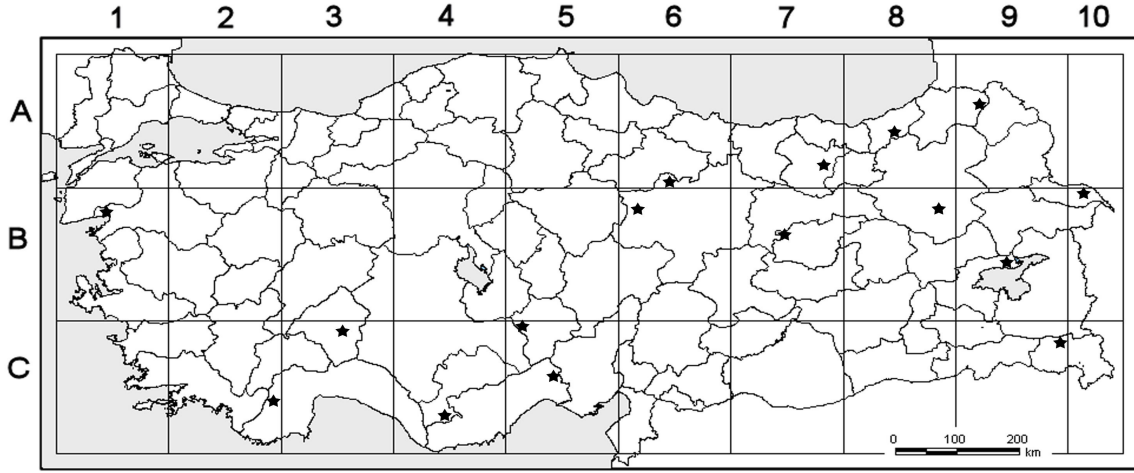
Otlar veya çalılar, genellikle glandular ve aromatik, gövdeler 4 köşeli veya değil. Yapraklar stipulasız, basit, bazen pennat, daima opposit, ovat, eliptik, rotundat. Temel çiçek durumu brakte veya floral yaprakların koltuğunda taşınan vertisillastrum şeklindedir. Ayrıca vertisillastrumlar spikai baş, rasemus veya simoz durumlar şeklinde düzenlenmiş olabilir. Çiçekler hermafrodit veya erkek sterildir. Brakteeler yapraklara benzer veya belirgin şekilde farklılaşmıştır. Brakteoller mevcut veya eksiktir. Kaliks genellikle 5 lopluk, üst lop 3, alt lop 2 dişlidir. Nadiren loplar veya dişler 1-1 veya 1-4 şeklindedir yada kaliks aktinomorftur. Damarlar 5-20 dir. Korolla gamopetal, zigomorfik ve bilabiata, tüpsü, genellikle üst dudak belirsiz 2 lopluk, dik ya da çok az konkav, alt dudak 3 lopluk, nadiren alt dudak indirgenmiş ve alt dudak 5 lopluk, ya da üstte 1 ve altta 4 lopluk, ya da korolla aktinomorfiktir. Stamenler korolla yüzeyine yapışık, 4 ve didinam ya da 2, üstteki çift genellikle alttaki çiftten daha kısa, anter tekaları 2 ya da 1 gözlü, paralel ya da divergent, nadiren (*Salvia*' da) konnektiflerin uzamasıyla birbirinden ayrılmıştır. Ovaryum üst durumlu, 2 karpelli ve 4 ovüllü, 4 lopluk. Stilus ginobazik, nadiren değil, tepede bifid. Meyve 4 (nadiren az) kuru (nadiren etli) [30, 31].

1.2 Anadolu'da Yetişen *Ziziphora* Taksonları

1.2.1 *Ziziphora clinopodioides* Lam.

Yarı çalimsı, genellikle sık dokulu bir oluşumlu, çok yıllık. Gövdesi yatık ile dik arasında değişir, birçoğu tabandan itibaren dallanmış, 30 cm, tüysüz veya tüylü. Yapraklar şekil ve büyüklük açısından oldukça farklılık gösterir, linear-lanseolat ile ovat-oblong, nadiren suborbikular, tüysüz , bazen tüylü, veya ülgerli. Brakteler genellikle yapraklardan daha geniş, sapsız. Çiçek düzeni yoğun bir uç baş şeklindedir. Kaliks 5-7 mm, tüysüz ile yoğun tüylü arasında değişen, yükseklerde bulunan formlarında sıklıkla morsudur. Dişilerde kalikte korolla tüpü bulunur veya hermafroditlerde kısaca dışarı çıkmıştır. Korolla açık mor ile soluk leylak arasında (bazen beyaz), (7)-10-12 mm, kalikte tüp bulunur veya bulunmaz. Tip: Sibirya

Güney ve İç Anadolu (Kuzeybatı Anadolu' da). A6 Sivas: Yıldız da., 1800-2300 m, A7 Gümüşhane: Kelkit' ten Gümüşhane' ye doğru, Yukarı Köse, 1750 m, A8 Rize:1500 m, A9 Kars: Yalnızçam Da., Yukarı Yalnızçam, 2100-2300 m, B1 Balıkesir: Baba Da., Kaz dağı' nın Kuzeydoğu' su 1100 m, B5 Niğde: Aksaray, Hasan Da., 1720 m., B6 Sivas: Ak Da. 2100 m, B7 Tunceli: Munzur Da., Aksu De., Yukarı Ovacık, 1700 m, B8 Erzurum:Karakaya Da., Hınıs' in kuzeyi, 2250 m., B9 Van: Süphan Da., 4100 m., B10 Ağrı: Ağrı Da., 2200 m, C2 Antalya: Ak Da., 1700 m., C3 Isparta: Dedegçl Da., 760 m., C4 Konya: Sara, Ermenek. C5 Niğde: Gülek- Maden. C9 Hakkari: Kara Da., 2745 m. Kafkasya, Kuzey Irak, İran (Güney İran hariç), Afganistan, Orta Asya [32].



Şekil 1.1 *Ziziphora clinopodioides* Türünün Türkiye’deki Yayılış Alanları

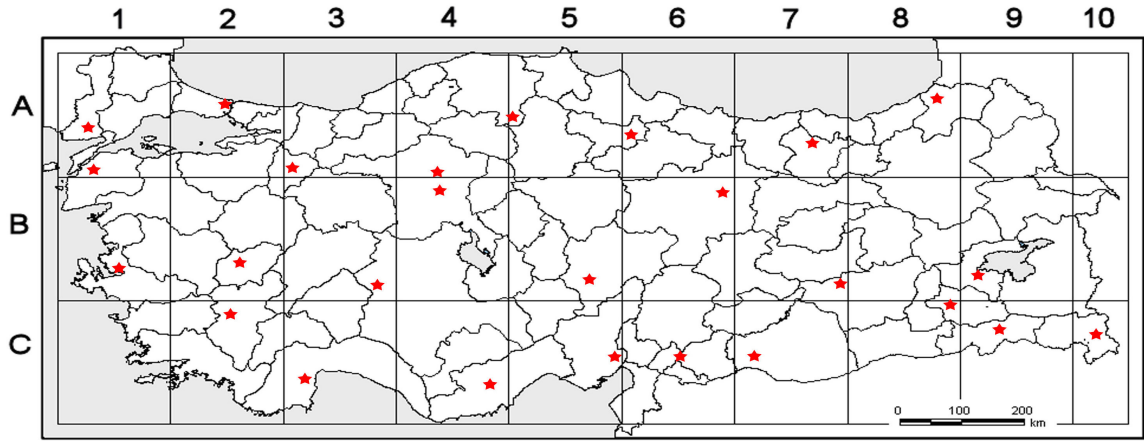
1.2.2 *Ziziphora capitata* L.

Tek yıllık. Gövde 4-15 cm, tek veya çok dallı. Yapraklar linear lanseolat, altta eliptik, üstte ovat-akuminat, en üsttekiler geniş ovat. Çiçek düzeni küre şeklinde terminal bir baş halinde, kısmen genişçe ovat brakteler tarafından kapatılmıştır. Kaliks 8-11 mm, tüylü veya dikenli. Korolla leylak, mor veya lavanta rengi (bazen pembe veya beyaz), 10-13 mm. Tip: Suriye

A1 Tekirdağ: 14 km Tekirdağ’ın doğusunda, A1 Çanakkale: Saraycık, A2 İstanbul: Büyükdere, A3 Bilecik: Karasu Vadisi, 400 m, A4 Ankara: 24 km Ankara’nın kuzeybatısında, 900 m, A5 Kastamonu: Tosya, A6 Samsun: Borabay-Taşova arası, 700 m, A7 Gümüşhane, A8 Çoruh, B1 İzmir:, B2 Uşak Uşak’ın 8 km batısından Güre’ye doğru 800 m, B3 Konya: Akşehir, 1000 m, B4 Ankara, B5 Kayseri: Erciyes Da., 2000 m, B6 Sivas: Zara’nın 5-8 km güneyi, 1500 m., B7 Diyarbakır: Maden-Ergani, 1000m, B8 Bitlis: Pelli Da., Gevaş-Reşadiye, 2200 m, C2 Denizli: Yeşilova’dan Denizli’ye doğru 2 km, 900 m, C3 Antalya: Tahtalı Da., C4 İçel: Mut’ un 25km doğusu, C5 Adana: Ceyhan, 25 m., C6 Gaziantep: Fevzipaşa-Gaziantep arası, 550 m., C7 Şanlıurfa: Birecik, Kefre, C8 Siirt: Ramana Da., Hasankeyf’ten Ramana’ya doğru 20 km, 730 m, C9 Mardin: Cizre-Hessana

arası, Cudi Dağı' nın etekleri, 500-700m., C10 Hakkari: Yüksekova'dan Şemdinli'ye doğru 10 km.

Balkanlar, Güney Rusya, Kafkasya, Kıbrıs, Batı Suriye, Kuzey Irak, İran (Güney İran hariç), Horasan. İran-Turan elementi. Pamir-Alai ve Tien-Shan Dağlarından *Z. capitellata* Juz ile yakın akraba [32].



Şekil 1.2 *Ziziphora capitata* Türünün Türkiye'deki Yayılış Alanları

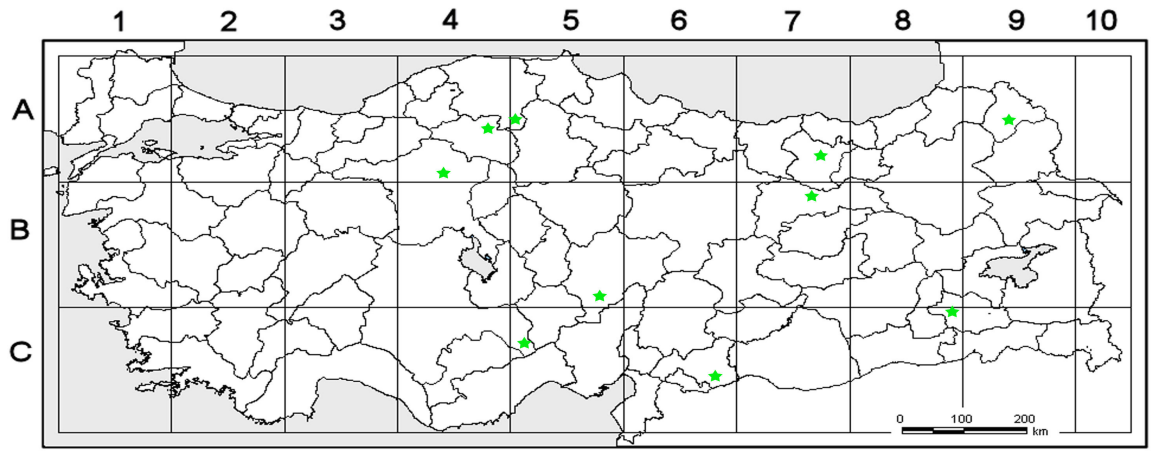
1.2.3 *Ziziphora persica* Bunge

Tek yıllık, kısa dikenli. Gövde 5-20 cm, genellikle her noda dallanmış. Yapraklar linear- lanseolat ile dar eliptik. Çiçek düzeni yoğun, subkapitat, yumurtamsı sivri bir uç şeklindedir. Altteki brakteler yapraklara benzer veya daha geniş, üsttekiler dar veya daha kısadır. Kaliks 8-10 mm. Korolla lavanta rengi veya soluk mavi, 10-12 mm.

İç Anadolu. A4 Çankırı: Koçhisar (Ilgaz), 100m., A5 Kastamonu: Tosya, Kavak Çeşme, A7 Gümüşhane: Taltaban, A9 Kars: Tuzluca'dan Kağızman'a doğru 15 km,

950m., B4 Ankara, B5 Kayseri: Güney Develi, B7 Erzincan: Erzincan' ın 13 km batısı, 1400 m., C5 Konya: Ereğli, Aydos Da., Delimahmurlu Köyü'nün yukarısı, 1750 m., C6 Gaziantep: Kızılhisar, Gaziantep'in güneyinden Kilis' e doğru, 750 m., C8 Siirt: Ramana Da., Hasankeyf'ten Batman' a doğru 20 km, 730m.

Transkafkasya, Kuzeybatı İran. İran-Turan elementi. *Z. tenuior* L. ile yakından ilgili. Çiçek düzeninin şekli bakımından farklılık gösterirler [32].



Şekil 1.3 *Ziziphora persica* Türünün Türkiye'deki Yayılış Alanları

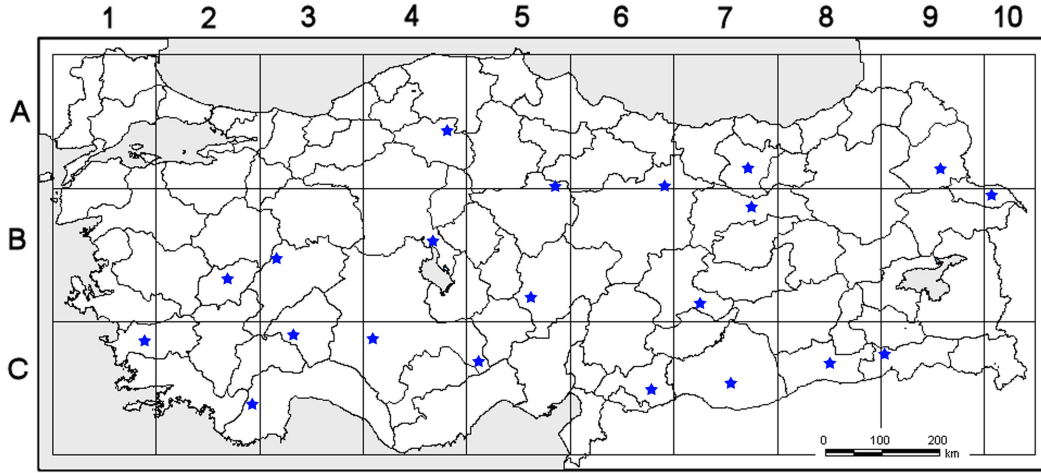
1.2.4 *Ziziphora tenuior* L.

Tek yıllık, kısa dikenli. Gövde 5-15 cm, tek veya çok dallı. Yapraklar linear veya linear lanseolat, belirgin damarlı. Çiçek düzeni yoğun, oblong sivri bir uç şeklindedir. Brakteler yapraklarla eşit veya yapraklardan daha uzun ve lineardir. Kaliks (5-) 6-8 mm. Korolla lavantarengi, açık mor veya lila, 8-10 mm, kalikte tüp bulunur, en fazla kaliksin 1.5 katı kadar uzar. Tip: Suriye

A4 Çankırı: Koçhisar (Ilgaz), 1000m., A5 Yozgat: Akdağmadeni' nin 17 km

batısı, 1200-1300 m., A6 Sivas: Zara' nın 20 km doğusu, 1650 m., A7 Gümüşhane:, A8 Çoruh: Peterek, 975 m., A9 Kars: Tuzluca'dan Kağızman'a doğru 15 km, 950 m., B2 Uşak:950 m., B3 Afyon/Kütahya:, B4 Ankara: Tuz Gölü' nün kuzey ucu, 900 m., B5 Kayseri: Niğde-Kayseri arası, 1370 m., B6 Malatya:, B7 Erzincan:, Erzincan'ın 13 km batısı, 1400 m., B10 Kars: Aras Vadisi, Iğdır, 900 m, C1 Aydın:, C2 Antalya: Elmalı Da., 1200-1400m., C3 Isparta, C4 Konya: Değirmen Köyü, Konya'nın 20 km batısı, C5 Konya: Ereğli-Ulukışla arası, 1200 m., C6 Gaziantep: Gaziantep'in 25 km güneyi, 750 m., C7 Şanlıurfa: Şanlıurfa-Akçakale arası 32 km, 450 m., C8 Mardin: Kızıltepe, 600m., C9 Mardin: 800-1000 m.

Güney Rusya, Kafkasya, Güneybatı ve Orta Asya. İran-Turan elementi [32].



Şekil 1.4 *Ziziphora tenuior* Türünün Türkiye'deki Yayılış Alanları

1.2.5 *Ziziphora taurica* Bieb.

Tek yıllık, kısa dikenli. *Ziziphora tenuior*'e benzer fakat gövdeleri genellikle daha uzundur (35 cm' ye kadar), uzun linear (3cm), linear-lanseolat yapraklı; kaliksler uzun(7-10 mm), kızıl viyole, lila veya beyaz. Çiçek düzeni yoğun, oblong sivri bir uç şeklindedir Korolla lavantarengi, açık mor veya lila, 8-10 mm, kalikste tüp bulunur, en fazla kaliksin 1.5 katı kadar uzar.

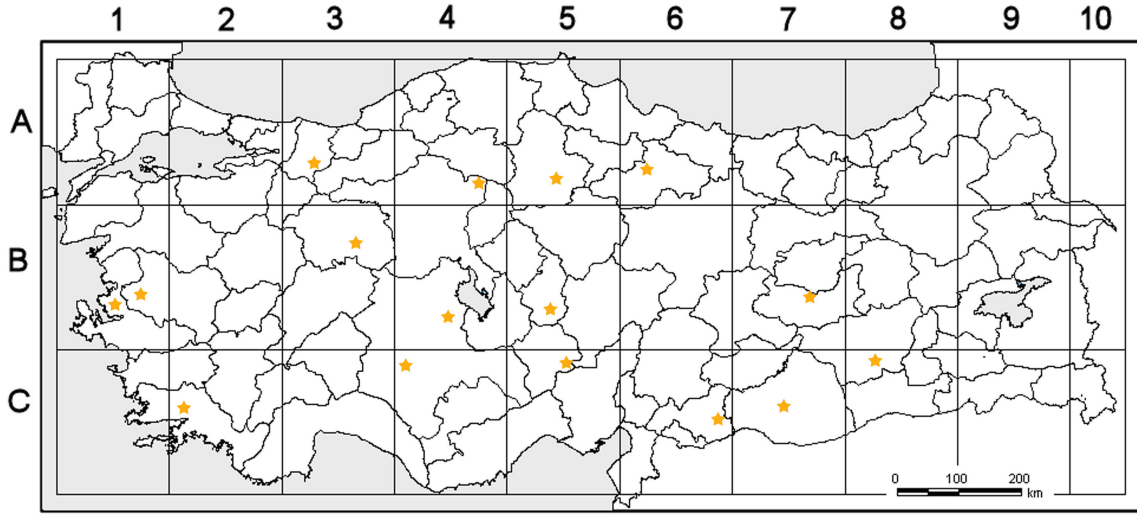
1-Uzun (35 cm' ye kadar), genellikle çok dallı, brakteler lanseolat, altta belirgin derecede damarlı subsp. *cleonioides*

2-Yavaş büyüyen (genellikle 15 cm' den az) seyrek dallı, brakteler linear, damarlar alt yüzeyde, belirgin değil subsp. *taurica*

Tip: Kırım

1.2.5.1 subsp. *taurica*

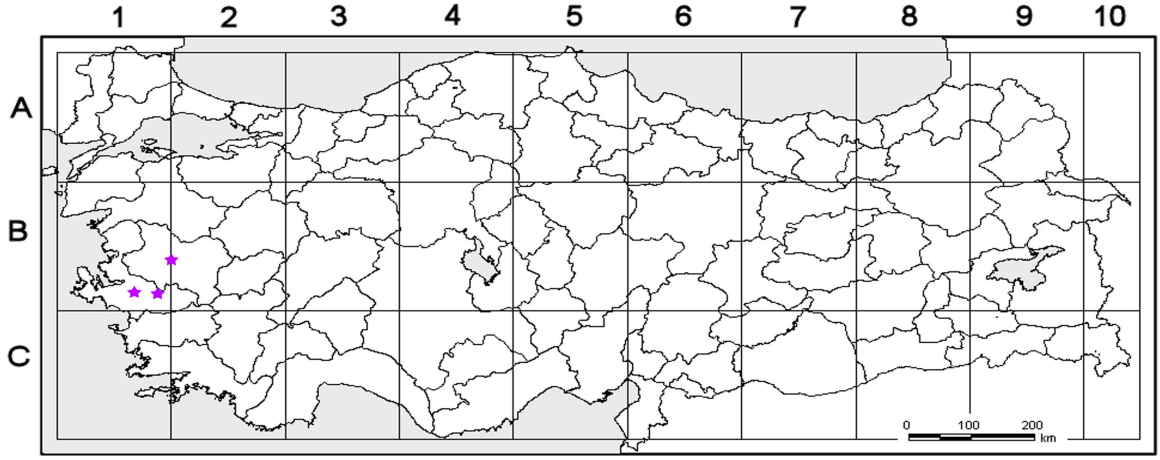
Genellikle İç Anadolu. A3 Sakarya: 100m., A4 Çankırı: Çankırı-Kalecik arası, A5 Çorum: Çorum-İskilip arası 34 km, 800m., A6 Tokat: Erbaa, 300m., B1 İzmir: Yukarı Pınarbaşı, B2 Manisa: 400m., B3 Eskişehir: Polatlı-Sivrihisar arası 30 km, 800m., B4 Konya: Yavşan, B5 Nevşehir: 1 km Ürgüp'ten Nevşehir'e doğru, B7 Elazığ: Harput, C2 Muğla: 25 km Milas'tan Muğla'ya doğru, 400m., C4 Konya: Meram' ın batısı, 1250 m., C5 Niğde: Ala Da., Çukurbağ-Narpiz arası, 1500-2060m., C6 Gaziantep: Gaziantep'ten Nizip' e doğru 36 km, 600 m., C7 Şanlıurfa: 550 m., C8 Diyarbakır: Diyarbakır'dan Çınar'a doğru 5 km, 700 m [32].



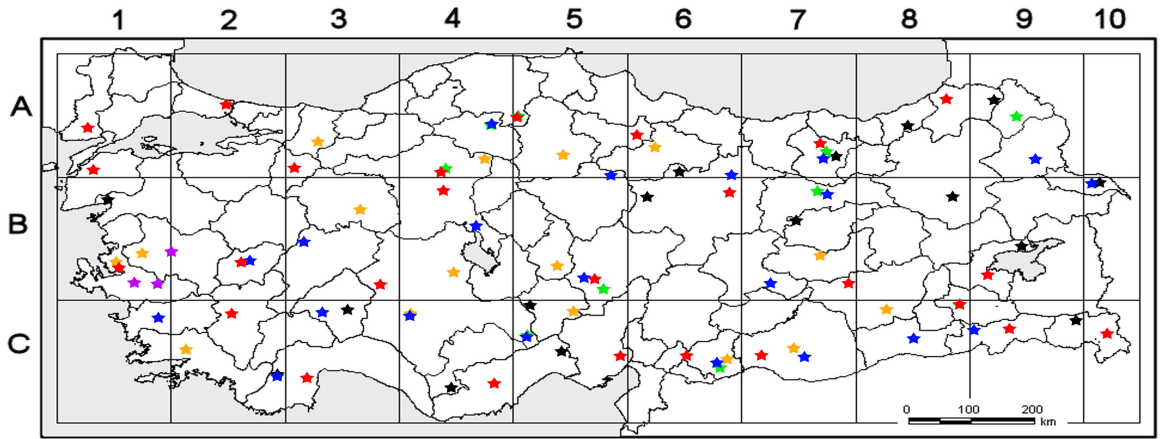
Şekil 1.5 *Ziziphora taurica* subsp. *taurica* 'nın Türkiye'deki Yayılış Alanları

1.2.5.2 subsp. *cleonioides* (Boiss.)

Batı Anadolu. B1 İzmir: Güme Da., Yukarı Tire, 500 m., B2 İzmir: Ödemiş, B1/2 Manisa Sart Harabeleri, 120 m. Endemik. Akdeniz elementi [32].



Şekil 1.6 *Ziziphora taurica* subsp. *cleonioides*'in Türkiye'deki Yayılış Alanları



Şekil 1.7 Türkiye'de Yetişen *Ziziphora* L. Taksonlarının Yayılış Alanları

1.3 *Ziziphora* L. cinsinin Kimyasal Özellikleri

Anadolu'da yetişen *Ziziphora* cinsine ait taksonların uçucu yağları ve miktarları aşağıdaki çizelgelerde belirtilmektedir.

Çizelge 1.1 *Ziziphora taurica* subsp. *clenioides* ' in uçucu yağının bileşimi [33, 34]

Bileşikler↓	RI	Relatif %
α-pinen	941	0.48
Kamfen	954	0.09
Sabinen	976	0.24
2-β-pinen	986	0.88
Mirsen	991	0.10
Limonen	1031	4.48
(+)-pulegon	1223	84.86
Piperitenon	1316	2.30

Çizelge1.2 *Ziziphora persica* ' nın esansiyel yağ kompozisyonu [35]

Bileşikler	R1	Rölatif (%)
α-Pinen	1036	0.60
Kamfen	1052	0.17
Sabinen	1057	0.33
β-Pinen	1069	Oca.88
β -Mirsen	1099	0.50
p-Simen	1110	0.32
Limonen	1130	28.642,00
γ-Terpinen	1155	0.20
Izomenton	1201	0.56
(+)-Pulegon	1253	79.33
cis-piperiton oxi	1269	0.32
Karvon	1284	0.57
Toplam		95.92

Çizelge 1.3 *Ziziphora taurica* sp. *taurica* ' nın esansiyel yağ kompozisyonu [36]

Bileşen	R1 ^b	SD		SWE		DTD	
		% ^c	RSD ^d	%	RSD	%	RSD
Etil Asetat	628	nd ^e	-	nd	-	0.22	2.13
Heptenon	873	nd	-	nd	-	0.30	3.12
α-Tuyen	938	nd	-	nd	-	10	4.52
α-Pinen	939	2.52	1.55	2.76	0.82	4.58	1.21

Çizelge 1.3' ün devamı

Kamfen	953	0.21	2.12	0.23	3.34	0.39	1.87
Benzaldehit	960	nd	-	0.11	2.98	nd	-
Sabinen	972	0.45	1.55	0.50	2.04	0.60	0.98
Oktenol	982	1.92	1.13	1.94	1.08	0.95	0.54
2-Karen	994	0.21	2.33	0.21	3.26	0.07	2.76
3-Oktanöl	1004	0.78	0.92	0.87	1.33	0.94	0.34
p-Simen	1027	1.57	0.95	1.65	1.47	2.00	3.12
Limonen	1030	0.98	2.37	1.03	0.85	1.28	1.76
1,8-Sineol	1033	0.68	2.58	0.64	1.16	0.26	4.32
cis-Sabinen hidrat	1073	1.25	1.76	1.50	2.43	2.40	2.54
γ -Terpinen	1074	0.23	3.89	0.20	3.32	0.20	4.21
(1R)-(+)-Norinon	0.90	nd	-	nd	-	0.30	3.49
Linalol	1100	1.28	1.35	1.54	1.28	1.60	1.21
α -Kamfolenal	1125	nd	-	nd	-	0.27	3.29
Limonen oksit	1132	3.18	0.38	3.94	1.06	3.82	1.22
Kamfor	1139	0.15	4.14	0.12	2.25	0.19	3.28
cis-Verbenol	1140	0.32	2.43	3.83	2.12	2.66	0.91
Sabino keton	1156	nd	-	nd	-	0.14	2.25
Borneol	1162	3.72	0.55	3.85	1.21	2.78	1.88
Terpinen-4-ol	1179	8.55	1119	9.80	0.54	8.15	1.13
Mirtenal	1194	nd	-	nd	-	0.25	3.35
α -Terpineol	1195	1.65	0.48	1.82	1.84	0.97	2.12
Verbenon	1204	4.12	1.12	4.42	2.31	3.60	0.44
Trans-Karveol	1217	6.90	2.01	6.90	0.79	6.45	0.35
Pulegon	1223	3720	0.33	33.14	0.95	30.67	0.47
Kumin aldehit	1224	nd	-	nd	-	0.29	2.70
cis-Karveol	1229	8.15	0.99	8.21	2.04	8.66	0.78
Nerol	1233	nd	-	0.11	4.40	0.39	1.19
Perilla alkol	1236	1.35	0.34	1.42	0.89	1.89	1.13
Karvon	1254	0.48	3.03	0.59	1.74	0.75	2.66
Karvakrol	1295	2.25	1.79	2.76	2.43	2.20	1.30
α -Kopaen	1377	nd	-	nd	-	0.41	1.21
Karyofillen	1426	nd	-	nd	-	0.14	4.14
Germakren D	1482	nd	-	nd	-	0.10	4.0
β -Bisabolen	1498	nd	-	nd	-	0.23	2.21
Nane furanon	1568	2.45	2.04	2.50	3.13	2.68	1.79
Karyofillen oksit	1573	0.22	3.36	0.26	2.12	0.99	0.97
Eikozan	2000	0.28	3.01	0.24	2.80	0.36	2.17
Bilinmeyen		3.75	-	2.93	-	4.77	-

Çizelge 1.4 *Ziziphora tenuior*' un esansiyel yağ kompozisyonu [37]

Bileşen	Yüzde Oran	
	Kazdağ (A)	Uludağ (B)
α -Pinen	0.75	0.58
Kamfen	0.03	0.05
β -Pinen	0.91	0.62
Sabinen	0.26	0.26
Mirsen	0.43	0.45
Limonen	5.49	4.36
1,8-Sineol	0.09	0.10
Bilinmeyen M ⁺ 98	0.01	0.01
γ -Terpinen	0.01	0.03
p-Simen	0.04	0.08
Bilinmeyen M ⁺ 136	0.03	0.02
6-Metilheptan-3-ol	0.05	0.04
Non-1-en-3-ol	0.24	0.14
Mentofuran	0.07	0.04
Bilinmeyen M ⁺ 162	0.14	0.04
İzopulegon-I	0.62	0.42
İzopulegon-II	0.38	0.30
3,7-Dimetilokt-1,5,7-trien-3-ol	1.68	3.00
Pulegon	87.06	86.29
Mirtenal	0.11	0.07
γ -Murolen	0.23	0.08
Geranial	0.25	0.30
(-) Karvon	0.09	0.24
Bilinmeyen M ⁺ 84	0.03	0.03
γ -Kadinen	0.07	0.02
2,3,3-trimetilnon	0.08	0.13
Bilinmeyen M ⁺ 109	0.04	0.02

Çizelge1.4'ün Devamı

Piperitenon	0.02	0.05
Bilinmeyen M ⁺ 154	0.03	0.04
İzopiperitenon	0.32	1.09
Pentadekanal	0.06	0.06
2-Metoksi-1-fenilprop-1-ene	0.04	0.03

Çizelge1.5 *Ziziphora clinopodioides* ' in esansiyel yağ kompozisyonu [38, 39]

Bileşen	Oran
Bilinmeyen (M ⁺ 85)	0.03
Etanol	0.15
α-Pinen	1.84
Kamfen	0.46
β-Pinen	5.40
Sabinen	3.33
Mirsen	0.82
α-felladren	0.03
α-terpinen	0.04
Limonen	8.19
1,8-sineol	14.05
β-fellandren	0.04
Cis- β-osimen	0.32
γ-Terpinen	0.07
Trans- β- osimen	0.28
Terpinolen	0.06
Bilinmeyen (M ⁺ 70)	0.09
Oktilasetat	0.44
6-metil-3-heptanol	0.36

Çizelge1.5'in Devamı

2,2-dimetil-hekzanol	0.25
Menton	5.44
İzomenton	2.00
Bilinmeyen (M ⁺ 161)	0.33
Bilinmeyen (M ⁺ 121)	0.05
Bilinmeyen (M ⁺ 136)	0.08
Linalil asetat	0.05
Mentil asetat	4.98
6-hidroksi-6-metil bisiklo (3,3,0) oktan-3-ol	0.47
Bilinmeyen (M ⁺ 154)	0.19
Neomentol	1.31
Pulegon	21.92
Bilinmeyen (M ⁺ 136)	0.15
Bilinmeyen (M ⁺ 136)	0.56
İzoborneol	0.77
β-guaien	0.83
Piperiton	6.84
2-öetoksi-1-fenil-1-propen	0.24
Trans-1.2:4,5-diepoksi-p-mentan	0.15
Bilinmeyen (M ⁺ 162)	0.15
Timol	0.08
Karvakrol	0.10

1.4 *Ziziphora* L. Cinsinin Ekonomik ve Tıbbi Önemi:

Bitkiler yüzyıllardır biyoaktif bileşik kaynağı olarak kullanılmaktadır. Türkiye florası, 10.000 takson ve % 30'luk endemizm oranıyla çok büyük bir biyoçeşitlilik ve tıbbi bitki potansiyeline sahiptir [40]. Bazı *Ziziphora* türleri sakinleştirici, gaz giderici ve

antiseptik etkilerinden dolayı Anadolu’da halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle “Filiskin otu” olarak adlandırılan *Z. taurica* subsp. *cleonioides*’in ve “Nane ruhu” (Mint spirit) olarak adlandırılan *Z. taurica* subsp. *taurica*, infüsyonları ve karın ağrısı gibi gastrointestinal semptomları tedavi etmede oldukça sık kullanılmaktadır. *Z. taurica* subsp. *taurica* yara iyileştirici özelliğinden dolayı harici olarak ta kullanılmaktadır [33, 41, 42]. Bunların yanında *Z. tenuior*, *Z. taurica* subsp. *taurica* ve *Z. taurica* subsp. *cleonioides*’ ten elde edilen esansiyel yağlar üzerine yapılan bir araştırmada bu üç *Ziziphora* türüne ait yağların akut letal toksisiteleri çalışılmış, ve fareler üzerinde yüzme performansında düşüşe neden oldukları dolayısıyla merkezi sinir sistemi depresan aktivitesi gösterdikleri, bu nedenle de halk arasında antistres ve merkezi sinir sistemi depresyonlarına karşı kullanıldıkları bulgularına ulaşılmıştır [43].

Ziziphora türlerinin biyolojik aktiviteleri hakkında çok fazla çalışma bulunmamaktadır [44]. %45.8 pulegon içeren *Z. clinopodioides* subsp. *rigida*’ nın antibakteriyel ve antioksidant aktivitesi belirlenmiştir.[45]. *Z. tenuior*’ un metanolik ekstraktları *Morganella morganii* ve *Candida albicans* üzerinde önemli derecede antimikrobiyal etki göstermiştir [44]. Bunun yanında endemik *Z. taurica* subsp. *cleonioides* ve *Z. taurica* subsp. *taurica* esansiyel yağlarının antioksidan enzim aktivitelerini araştırılmıştır [34, 46].

Ziziphora clinopodioides’in ve endemik *Ziziphora taurica* subsp. *clenoides*’in antibakteriyel özelliği belirlenmiştir [39, 44]

1.5 Moleküler Filogeni

Filogenetik analiz üzerine yeni metodların bulunmasıyla angiospermilerin erken evrimini netleştirmek mümkün hale gelmiştir[8]. 1960’lara kadar, sistematik bilgiler morfolojik ve davranışsal varyasyonlara dayanılarak elde edilmiştir. 1960’lardan sonra biyolojik makromoleküller evrimsel ve sistematik çalışmalarda oldukça artan bir rol

kazanmışlardır. Sistematik amaçlarla yapılan ilk moleküler çalışmalar büyük oranda proteinlerle ilgiliydi. İlk uygulamalarda tür içinde ve türler arasında protein varyasyonunu açığa çıkarmak için, protein elektroforezi ve histokimyasal boyama kullanılmıştır. İzoenzim ve alloenzim elektroforezleri moleküler sistematikte en sık kullanılan yaklaşımlardandır.

Aminoasit kompozisyonunun ve dizisinin belirlenmesi de aynı zamanda farklı türleri kıyaslamak için kullanılır [47]. Buna ek olarak, izoenzimler üzerine olan çalışmalar [48, 49], floral davranışlarla genetik ilişkiler arasında bazı cins ve cins altı sınırların suni olduğunu gösteren bir ilişki eksikliği olduğunu göstermektedir [19]. Bitkilerin alt seviyelerdeki filogenetik analizleri için sıklıkla kullanılan moleküler markırlar nükleer ribozomal DNA'nın ITS bölgesi [21, 50-52], kloroplast DNA'sı [13, 15, 17, 53], mitokondriyal DNA [54-56], ADH [57], PRK ve RPB2 gibi tek veya az kopyalı nükleer genlerdir [58, 59].

1.5.1 Moleküler Filogenide Kullanılan Yöntemler

1.5.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP), kıyaslama amacıyla, farklı organizmalara ait aynı veya homolog DNA bölgelerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi esasına dayanır. DNA parçaları agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezinde büyüklük esasına göre ayrılır. Jeldeki örnekler uygun bir boyama tekniğiyle görünür hale getirilir. Genellikle jellerdeki DNA nitro-selüloz veya naylon membranlar üzerine transfer edilir. DNA parçaları, jelin alkali ortamda ıslatılmasıyla denature edilir ve nitro-selüloz zar üzerine transfer edilerek radyoaktif olarak işaretlenmiş DNA probunun bulunduğu solüsyona daldırılır. Parçalarla probun hibridizasyonu otoradyografi ile açığa çıkartılır [60, 61].

Restriktion parça uzunluk analizleri (RFLP) günümüzde kara bitkilerinin evrimsel gelişiminde hem tür içinde hem de moleküler sistematik çalışmalarda oldukça önemli olarak görülmektedir. Çok kısa bir zamana kadar, kloroplast DNA'sı (cpDNA) ile yapılan RFLP çalışmaları taksonomi ve filogeni çalışmalarında kullanılsalarda, tür içi sınıflandırmada uygun olmayan genetik markırlar olarak geçiyorlardı. Bu görüş, tür içi yaygın olarak cpDNA-RFLP'lerin ilk kullanımlarından biri olan *Lupinus texensis*'in düşük seviyede polimorfizm göstermiş olmasına ve kloroplast DNA'sının nüklear DNA'ya göre çok daha yavaş olmasından kaynaklanmaktadır. 2001 yılı verilerine göre son beş yılda en az yirmi adet çalışma cpDNA-RFLP'nin filocoğrafya, hibrit bölgeler, ve angiospermiler ile ilgili çalışmalarda güvenle kullanılabileceğini göstermiştir [62, 63].

1.5.1.2 RAPD (Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

RAPD tekniği ilk olarak [64] Williams ve arkadaşları tarafından farklı bireylere ait insan DNA örneklerini ayırt etmek amacıyla kullanılmıştır. Rastgele primerler kullanılarak nükleotid dizisi hakkında herhangi bir bilgi olmaksızın uygulanabilmektedir. Bu analizden elde edilen amplifikasyon ürünleri polimorfizm göstermektedirler ve bu sebepten dolayı da genetik markır olarak kullanılırlar. Bir RAPD bantının bulunması hetero veya homozigotluk hakkında bir bilgi vermez ve protokolleri oldukça kolaydır [65].

Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PZR), moleküler sistematik ve bitki genom haritalarının çıkartılmasında başarıyla kullanılmaktadır [66]. RAPD yönteminin RFLP ve izozimlere göre birçok avantajları vardır. Bu yöntem yoğun laboratuvar çalışmaları ve Southern transferler, filtre hibridizasyonları, otoradyografi gibi pahalı yöntemler gerektirmez. Herhangi bir genomik kütüphane oluşturulmasına gerek duymaz. RFLP analizlerinde olduğundan çok daha az miktarda genomik DNA'ya ihtiyaç duyulur. RAPD yöntemi izozimlerden farklı olarak genom boyunca sınırsız sayıda işaretleyici elde edilmesini sağlar. Ayrıca türler arası ve tür içinde, RFLP ve izozimlerin sağladığından çok daha fazla polimorfizm belirler [67].

1.5.1.3 AFLP (Amplified Fragment Length polymorphism)

En son geliştirilmiş DNA parmakizi tekniklerinden birisidir. Bir çift özgün restriksiyon enzimi uygun adaptörler yardımı ile birlikte ve seçici polimeraz zincir reaksiyonu ile birleştirilerek nükleotid dizisi hakkında bir ön bilgi olmaksızın genetik çeşitliliği belirlemeyi mümkün kılar. AFLP markırları güvenilir, üretilebilir nitelikte ve yüksek seviyede polimorfizm gösterirler . Bunun yanında AFLP tekniği bitkilerde genetik haritalama ve parmakizi çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [68]. Buna ek olarak AFLP tabanlı mRNA parmakizi yöntemi gibi AFLP tabanlı yöntemler de geliştirilmiştir [69, 70]. Bu teknik bakteri, mantar, hayvan ve bitkileri de içeren çok geniş canlı grubunda tür altı kategorilerde genetik varyasyonu belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır [71]

1.5.1.4 SSCP (single strand conformational polymorphism)

Tek zincir konformasyonel polimorfizm, geçmişteki birçok metodun yetersizliklerini ortadan kaldırmıştır. PZR-SSCP analizleri PZR amplifikasyonu, restriksiyon enzimi ile kesim ve denatüre olmamış akrilamid jel elektroforezine dayanır [72]. DNA varyasyonu tek zincirli PZR ürünlerinin primer ve sekonder yapılarının değişmesinden dolayı göç mesafelerindeki farklılıkla belirlenir. SSCP, tek nükleotitten oluşan varyasyonlar da dahil olmak üzere %80'e kadar tüm DNA varyasyonlarına karşı hassastır [73].

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

1.5.1.5 Mikrosatellit Markırlar (Short Sequence Repeats, SSR)

Mikrosatellitler (Litt and Luty, 1989), kısa tekrarlı diziler (Short Tandem Sequences, STSs) veya kısa dizi tekrarları (SSRs) olarak bilinmekte olan tekrarlı nükleotid dizileri tüm ökaryot genomlarında bulunur ve genellikle 1-6 bç'nden oluşur. Yüksek oranda korunmuşlardır ve bu sayede PZR primer oligonükleotidleriyle amplifikasyona müsaitlerdir. Bu özelliklerinin yanında ko-dominant yapıları ve Mendel kurallarına uymaları mikrosatellitleri aranılan moleküler markırlar arasına sokmuştur [75]

1.5.1.6 VNTR (Variable Number Tandem Repeat) (Mini Satelitler)

Mini-satellitler genellikle 9-100 baz çiftinden oluşur [76]. Her hangi bir moleküler markırın yakın ilişkili taksonlar arasındaki farklılıkları belirleyebilme gücü, genetik polimorfizm olasılığını arttıracak lokusa özgü mutasyon hızına bağlıdır. Bu mutasyonlar arasındaki evrimsel mekanizmaları anlamak taksonlar ve nesiller arasındaki ilişki olasılığını belirlemek açısından oldukça önemlidir. Bu sebepten dolayı yüksek varyasyon gösteren markırlar ve bu lokuslardaki mutasyonlar dikkatli ve eksiksiz filogenetik hipotezler oluşturmak için gereklidir [77]

1.5.2 Moleküler Filogenide Kullanılan DNA Çeşitleri

Bitki moleküler sistematigi geçen yirmi yılda oldukça hızlı bir şekilde gelişmiştir [4]. Angiospermlerin moleküler filogenisi ile ilgili çalışmalar kloroplast DNA'sı [13, 14], mitokondriyal DNA [16] ve yüksek oranda tekrarlı nükleolar ribozomal DNA [17] üzerine yoğunlaşmıştır.

1.5.2.1 Mitokondriyal DNA

Mitokondriyal DNA (mtDNA) mitokondri içerisinde lokalize olmuş, halkasal DNA molekülüdür [78]. Mitokondri, proto-ökaryot hücrenin simbiyontu olarak günümüzden yaklaşık 1.5-2 milyar yıl önce ortaya çıkmıştır ve ardından genlerinin büyük bir kısmını hücrenin çekirdeğine aktarmıştır. Nükleer DNA'yı kodlayan nükleer-sitosolik sistem mitokondriyal genleri şifreler ve mitokondriyal sistem de şifrelenen genlerin ifade edilmesini sağlar [79]...

Mitokondride yüzlerce protein bulunmaktadır [80]. mtDNA 12S ve 16S rRNA'lar ile 22 adet tRNA ve sadece 13 adet polipeptid kodlar ve bunların hepsi oksidatif fosforilasyonun mitokondriyal enerji üreten enzimleri içindir [81-83].

Canlılarda Mitokondriyal DNA çoğunlukla maternal kalıtıma tabidir. İnsanda mtDNA anne tarafından kalıtılır. Çünkü mitokondri ve mitokondriyal DNA'nın sitoplazmik lokasyonu mitokondri ve mitokondriyal DNA'ların bir nesilden diğer bir nesile oosit sitoplazmasıyla geçtiğini göstermektedir. Spermin mtDNA'nın kalıtımıyla bir ilgisi bulunamamıştır [84].

mtDNA'nın büyüklüğü organizmalar arasında farklılık gösterir. Hayvanlarda mtDNA 16,000 -18,000 baz çiftinden oluşurken, bitkilerden mtDNA'lar daha büyük ve oldukça uç noktalardaki limitlerde çeşitlilik gösterirler. Angiospermlerde, mitokondriyal genomun büyüklük, yapı, gen sırası çeşitlilik gösterir. Nükleer ve ribozomal DNA'nın aksine, mtDNA anne tarafından kalıtılır. Replikasyonu yarı korunumludur. Mitokondriler kısmen otonomdur. Mitokondrilerin sayısı hücrenin enerji ihtiyacına göre değişir. Deneysel çalışmalar için gerekli olan hücre sayısı az olduğundan dolayı bu artış avantajlıdır. Hücredeki mtDNA hücrenin enerji gereksinimi ile ilgili olduğu için, mtDNA'nın mutasyon sıklığını artırır. Böylece aynı hücre içerisinde hem mutant hem de normal mtDNA bulunur. mtDNA çok yüksek oranda korunmuş evrimsel dizilere sahiptir. mtDNA

üzerinde yerleşmiş oldukça önemli genler bulunmaktadır. Eğer mutasyonlar kodlama yapan dizilerde meydana gelirse, organizma için ölümcül olabilir. Sistemik amaçlar için kullanılan diziler yüksek çeşitliliktedir ve kodlama yapmayan bölgede bulunurlar. Geçmiş yıllarda mtDNA ile ilgili yapılan çalışmalar özellikle sitokrom b geni üzerinde yoğunlaşmıştır [76].

mtDNA'dan elde edilen sistematik bilgiler ışığında yapılan çalışmalar, moleküler büyüklük, hibridizasyon örnekleri, restriksiyon parça analizleri, Southern blotting ve dizileri belirlenen ve kıyaslanan belirli bölgeler üzerine yapılır [85].

mtDNA'ların boyutunun küçük olması ve yüksek oranda korunmuş yapısının olması populasyonlar, türler ve daha üst taksonomik seviyelerin evrimsel ilişkilerini belirlemede oldukça uygun moleküller oldukları için sıkça tercih edilmişlerdir [86].

1.5.2.2 Kloroplast DNA'sı

Kloroplast DNA'sı (cpDNA), mtDNA gibi kapalı, halkasal bir moleküldür. cpDNA da yarı korunumlu olarak kendini eşler ve anne tarafından kalıtılır. Çiçekli bitkilerin kloroplast genomu 120-217 kilobaz uzunluğunda yüksek derecede korunmuştur. Çok fazla kodlanmayan bölge içermediği için nükleer genoma göre çok daha yavaş hızla evrimleşir [17, 87]. Bir çok türde genom küçük ve büyük eşsiz dizi bölgeleri içerir ve bunlar bir çift ters tekrarla birbirinden ayrılır [88].

Kloroplast tarafından kodlanan ribuloz 1,5-bifosfatkarboksilaz/ oksijenaz (RUBISCO) geninin büyük fragmenti rbcL, bitki filogenisi için kullanılmaktadır. RUBISCO enzimi Kalvin çemberinde karbondioksitin fiksasyonundan sorumludur ve dünyanın karbon döngüsünün bağlantı noktasında bulunur. İki sebepten dolayı rbcL' nin

sistemik çalışmalarında kullanılması avantajlıdır. Bunlardan birincisi *rbcL* genlerinin dizisi çok açıktır. İkincisi de yavaş bir hızla evrimleşmesidir. Böylece *rbcL* gen dizisi analizi bitki filogenisinde cins ve daha üst taksonomik seviyeler için yardımcı bir kaynaktır [89].

ndhF dizisinin sistemik çalışmalardaki ilk uygulamaları familyalar arasındaki ilişkiyi belirlemeye dayanır. Farklı familyalardan farklı dizilerle çalışmak mümkün oldukça *ndhF* dizilerinin uygulamalarının filogenetik sorulara familyalar arasında çok daha başarılı olduğu belirlenmiştir [90].

1.5.2.3 Çekirdek DNA'sı

Genom büyüklüğü farklı organizmalar arasında çeşitlilik gösterir. Bu, çekirdek genomunun kayda değer sistemik ve filogenetik bilgi verebileceğini gösterir. Fakat bazı durumlarda bilgiyi analiz etmek zor olabilir. Çekirdek genlerinin kalıtımı çift ataya aittir. Haploid genomdaki toplam DNA miktarına "C değeri" adı verilir. Bu değer farklı türler arasında çok büyük varyasyon gösterir. Toplam DNA'nın %5-10'undan daha azı proteinleri kodlamak için gereklidir. Çekirdek genomundaki bu fazlalığa C-değeri paradoksu adı verilir [76]

Kromozom sayısı ve karyotipteki varyasyonlar bitkilerin gelişiminin incelenmesi açısından oldukça önemli bir kaynaktır [91].

Ökaryotik ribozomal RNA genleri (ribozomal DNA veya rDNA) birbiri ardına gelen dizilerin bir parçası olan tekrarlı üniteler NOR (Nucleolar organizer regions) olarak bilinen kromozom bölgelerinde bulunur. Her tekrarlı ünite transkribe olan ve 18S, 5.8S ve 26S rRNA genlerini içeren bir bölge ve dış transkribe olan boşluk adı verilen ve ETS-1,

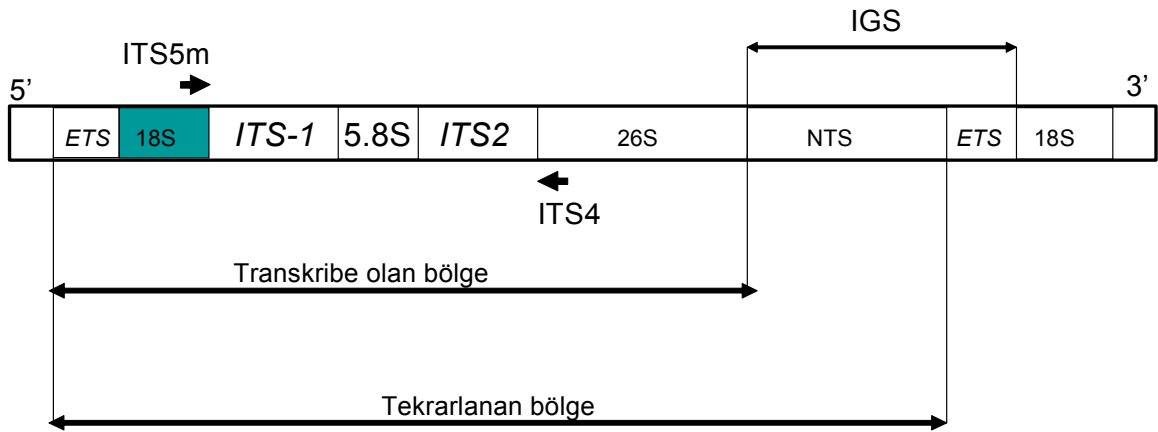
ETS-2 ve transkribe olmayan bölge non-transcribed spacer (NTS) adı verilen dış transkribe olan bölgeye sahiptir [92, 93].

Farklı türlerdeki çekirdek genom miktarının ölçülmesi oldukça kullanışlı bilgiler sağlasa da sistematik anlamda sınırlı değeri vardır. Çekirdek genomdaki DNA miktarı aynı cins içerisindeki türler arasında çeşitlilik gösterir ve bu bitkiler ile yapılan çalışmalarda sorunlara yol açar. Yani eğer bir bitki materyali çalışılacaksa, örnekleme alanı çok geniş olmalıdır.

Çekirdek DNA içeriğindeki intraspesifik varyasyonun sebebi açık uçlu bir sorudur. Bu durumun türlerin ekolojik tercihlerinin bolluğu, tek yada çok yıllık olup olmadıkları gibi belli başlı yaklaşımlarından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Çekirdek genomlar, her genomda bir tane olacak şekilde belli DNA dizileri içerirler. Bunlar tek kopya veya eşsiz-kopya DNA olarak adlandırılır. Diğer diziler genomda birçok kereden milyonlarca kereye kadar oluşabilir ve tekrarlı DNA olarak adlandırılır. Tek kopyalı ve tekrarlı dizilerin oranı genom kompleksliğini gösterir. Çünkü tek kopyalı diziler diğer tüm dizilerden farklıdır. Filogenetik amaçlar için yapılan DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarında, farklı türlerin DNA'ları belirtilen koşullarda hibridleşirler ve bu türler arasındaki benzerlikler araştırılır. Bu teknikte çekirdek genomdaki tek kopyalı ve tekrarlı DNA dizileri kullanılabilir ve hibridizasyon zamanları birbirleriyle karşılaştırılabilir. DNA-DNA hibridizasyonu sırasında tek kopyalı diziler yavaşça birbirlerini bulurken tekrarlı diziler oldukça hızlıdır. Böylece yavaş reaksiyonlar tek kopyalı DNA'ların genomdaki sayısı ile karakteristiktir. Eğer tek kopyalı DNA'nın konsantrasyonu fazlaysa, hibridizasyon reaksiyonları tekrarlı dizilere oranla çok daha uzun bir sürede meydana gelir. Belirli tekrarlı dizileri kromozomlar üzerine yerleştirme için kullanılan tekniklerden birisi *in situ* hibridizasyondur [76, 91, 94]. Bu metod radyoaktif olarak işaretlenmiş DNA parçalarının kromozomlardaki tek zincirli DNA ile hibridizasyonuna dayanır. Otoradyografi, işaretli parçaların kromozomlarda gözlenmesine olanak sağlar [95].

1.5.2.3.1 İç Transkribe Olan Boşluklar (Internal Transcribed Spacers, ITS)

İç transkribe olan boşluk (ITS) sayısız sistematik çalışmada çok geniş bitki çeşidinde cins ve tür seviyesinde kullanılmıştır. İki iç boşluk ITS-1 ve ITS-2, 5.8S, 18S ve 26S nükleer ribozomal RNA (nrRNA) alt ünitelerini kodlayan genlerin arasında yerleşmiştir ITS-1 ve ITS-2 boşlukları ve bunlara ek olarak 5.8 geni ITS bölgesi olarak adlandırılır. ITS-1 ve ITS-2 yaklaşık olarak 300 bp uzunluğunda, 5.8S alt ünitesi ise angiospermiler içerisindeki uzunluğu sabittir ve 163-164 bp uzunluğundadır [96].



Şekil 1.8 Çekirdek ribozomal DNA'sının tekrarlı üniteleri [97]

ITS-1 ve ITS-2 bölgeleri ribozomal transkripsiyonel ünitenin birer parçası olsa da bu diziler olgun ribozomların yapısına katılmazlar. ITS bölgesinin her iki tarafında da korunmuş diziler vardır böylece, evrensel primerler kullanılarak çoğaltılıp dizi analizleri yapılabilir. ITS bölgeleri, nükleer ribozomal RNA'ların (nrRNAs) ilerlemelerinde belirgin bir role sahiplerdir. ITS-1'in (18S-5.8S) belirli bölgelerinde meydana gelen delesyonlar, rRNA'ların küçük ve büyük alt ünitelerinin olgunlaşmasını engellediği belirlenmişken, ITS-2 (5.8S -26S) bölgesindeki belirli delesyonlar ve nokta mutasyonları rRNA'nın büyük alt ünitesinin gelişmesini engellediği gözlenmiştir. Bu, ITS bölgesinin ribozomal DNA'nın

intergenik boşluk ve dış transkribe olan boşluk bölgelerine oranla nispeten daha fazla korunduğunu gösterir [27, 98].

1.5.2.3.1.1 İç Transkribe Olan Bölgenin Filogenetik Kullanışlılığı

Birçok faktör ITS bölgesini filogenetik çalışmalarda kullanışlı kılmaktadır [99-105]. İlk olarak ITS bölgesi bitki nüklear genomunda oldukça fazla tekrarlı haldedir. nrDNA'nın yüksek kopya sayısı amplifikasyonunu ve dizilenmesini daha kolay hale getirmektedir. İkinci olarak homolog olmayan kopyaları nokta mutasyonu ve/veya insersiyon / delesyon (indel) şeklinde bulunabilmekte ve bir türün bireyleri arasında küçük varyasyonlara sebep olabilmektedir. Son olarak ITS bölgesi küçüktür (700 bp) ve yanında oldukça yüksek seviyede korunmuş 18S ve 26S nrDNA genleri gibi diziler bulunmaktadır [27]. Bu sebepten dolayı, ITS bölgesinin amplifikasyonu ve dizilenmesi için evrensel primerler kullanılabilir. Primerler fungal rRNA amplifikasyonu için orijinal olarak dizayn edilmiştir ve mantar (*Saccharomyces*), böcek (*Drosophila*), ve bitki (*Oryza sativa* and *Hordeum vulgare*) dizilerinden köken almıştır [106]. Birçok angiospermde ITS-1 bölgesi ITS-2 bölgesinden daha uzundur ve sonuç olarak ITS-1 bölgesindeki bilgi verici ve dizilenebilen nükleotid bölgeleri daha fazladır., ITS-1 bölgesi nükleotidleri % 29 çeşitlilik gösterdiği ve sinapomorfizm gösterdiği için ITS-2 bölgesine göre filogenetik olarak daha kullanışlıdır ITS-1 yada ITS-2 bölgelerinin dizi analizi sonuçlarına dayanan filogenetik ağaçlar diğer diziler tarafından desteklenmeyen sonuçlar ortaya çıkartabilir. Bu yüzden ITS-1 ve ITS-2 bölgelerinden elde edilen bilgilerin birleştirilmesi ile açığa çıkan sonuçlar daha doğru, sağlam ve tam ağaçlar ortaya çıkartır [27, 96].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitki Örnekleri

Çalışmada kullanılan bitki örneklerinden bazıları Yard. Doç. Dr Tuncay DİRMENCİ tarafından çeşitli lokalitelerden toplanmış, bazıları da Türkiye'deki çeşitli herbaryumlardan temin edilmiştir. Bu bitkilerin toplandığı lokaliteler Çizelge 2.1'de görülmektedir.

Çizelge 2.1 Çalışmada Kullanılan Bitki Örnekleri

Herbaryum Numarası	Türü	Toplandığı Lokalite	Toplandığı Yükseklik	Toplayan	Toplandığı Tarih
3852	<i>Ziziphora clinopodioides</i> (A)	Sivas/Celalli-Aktaş Köyü, Gürlevik Dağı, Kuzey yamacı		N. ÇELİK	13.08.1985
S.N.	<i>Ziziphora clinopodioides</i> (B)	Çankırı/Ilgaz Dağı T.V. kulesi çevresi	2100 m	Gülendam TÜMEN	16.07.1989
16273	<i>Ziziphora clinopodioides</i> (C)	Erzurum/Palandöken Dağı Kayak Merkezi Çevresi	2000 m	Bayram YILDIZ	13.08.2006
S.N.	<i>Ziziphora clinopodioides</i> (D)	Sivas/Suşehri Germin Deresi, Soğan Ovası Yaylası		Gülendam TÜMEN	
3174	<i>Ziziphora clinopodioides</i> (E)	Van/Bahçesaray	3000 m	Mehmet FIRAT	12.08.2002

Çizelge 2.1'in Devamı

3194	<i>Ziziphora taurica</i> subsp. <i>taurica</i> (A)	Balıkesir/Kazdağı Çamlıbel Köyü Üzeri	c.500 m	Tuncay DİRMENCİ	04.07.2006
3125	<i>Ziziphora taurica</i> subsp. <i>cleonioides</i> (A)	Ödemiş/ Bozdağ	750 m	Tuncay DİRMENCİ	20.06.2006
3154	<i>Ziziphora taurica</i> subsp. <i>cleonioides</i> (B)	Manisa/Sarıgöl-Kiraz arası 47. km	750 m	Tuncay DİRMENCİ	21.06.2006
3156	<i>Ziziphora taurica</i> subsp. <i>cleonioides</i> (C)	Manisa/Bozdağ-Birgi arası	750 m	Tuncay DİRMENCİ	21.06.2006
3166	<i>Ziziphora taurica</i> subsp. <i>cleonioides</i> (D)	Denizli/Babadağ	1200 m	Tuncay DİRMENCİ	21.06.2006
1397	<i>Ziziphora capitata</i> (A)	Dinar-Isparta Yolu, Dinar'dan 20 km uzakta bodur orman sahasında		Gülendam TÜMEN	11.06.1978
3168	<i>Ziziphora capitata</i> (B)	Denizli/Kaklık		Tuncay DİRMENCİ	21.06.2006
5059	<i>Ziziphora persica</i>	Nevşehir-Amanos	1150 m	T.EKİM, N. ADIGÜZEL, M. FIRAT, Ü.KOL	06.10.1989
1276	<i>Ziziphora tenuior</i> (A)	Kırıkkale/Keskin- Böbrek Dağı, Haydarsultan Köyü doğusu		Ü.GÜLER	28.09.1991
2272	<i>Ziziphora tenuior</i> (B)	Şanlıurfa/Ceylanpınar Afyon mah. Yamaçları		Nezaket ADIGÜZEL	03.05.1995
7757	<i>Ziziphora tenuior</i> (C)	Sivas/Celalli-Hafik arası	1500 m	Bayram YILDIZ	04.07.1986

Çizelge 2.1'in Devamı

3359	<i>Ziziphora tenuior</i> (D)	Akdağmadeni-Yozgat 17kmnAkdağmadeni'nin batısı	1200m	Tuncay DİRMENCİ	27.07.2006
------	------------------------------	--	-------	--------------------	------------

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Merck ve Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Moleküler biyoloji materyalleri, Applichem, Biolabs, Stratagene ve Fermentas firmalarından yerli kuruluşlar aracılığıyla temin edilmiştir.

2.1.2.1 Genomik DNA izolasyonunda Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan örneklerden sadece 3125 numaralı örnekten Dellaporta ve arkadaşları [107] tarafından geliştirilen ve modifiye edilen yöntemle genomik DNA elde edilmiştir. İzolasyon için kullanılan tüm kimyasallar Çizelge 2.2' de gösterilmiştir. Diğer örneklerden genomik DNA izolasyonu ise Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Almanya) protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

Çizelge 2.2 Genomik Dna İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler ve Özellikleri

Çözelti	Kompozisyonu
Ekstraksiyon tamponu (1L)	33,6 gr Üre 0,5 M EDTA (pH: 8) 1 M Tris-HCl (pH:8) 5 M NaCl %10 SDS
Fenol/Kloroform/İzoamil alkol	25 : 24 : 1

Çizelge 2.2'nin Devamı

NaAc	3 M pH : 5,2
İzopropil alkol	%100
TE (Tris – EDTA)	10 mM
RNaz A	10 mg / mL
Etanol (EtOH)	% 70'lik ve % 100 lük

2.1.2.2 PZR'de (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Kullanılan Kimyasallar

PZR'de kullanılan kimyasallar ve miktarları çizelge 2.3'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.3 PZR'de (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Kullanılan Kimyasallar

Kimyasalın Adı	Miktarı	Konsantrasyon
NH ₄ SO ₄ Tamponu	5 µL	10 X
DMSO	3 µL	-
MgCl ₂	3 µL	25 mM
ITS-4	5 µL	pmol / mL
ITS-5	5 µL	pmol / mL
dNTP	0.8 µL	10 mM
DNA	4 µL	-
Taq DNA Polimeraz	0.6 µL	5 Ünite
dH ₂ O	23.4 µL	-
Toplam	50 µL	

2.1.2.3 PZR' de kullanılan Primerler ve Özellikleri

PZR reaksiyonlarında kullanılan primerler Integrated DNA Technologies (A.B.D.) firmasından temin edildi. Primerler laboratuara gelir gelmez veya -20 °C buzdolabından çıkarıldıktan sonra yaklaşık 15 sn 12.000 rpm'de satrifüj yapılarak kuru çökeltinin tüpün dibinde toplanması sağlandı ve 1 ml dH₂O içerisinde çözülerek stok hazırlandı. Her bir primerin son konsantrasyonu 50 nmol olacak şekilde sulandırıldı. Çalışmada kullanılan primerlerin DNA dizileri, erime sıcaklıkları (T_m) Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.4 PZR'de Kullanılan Primerler ve Özellikleri

Primer	Nükleotid Dizisi(5'-3')	T _m Değeri
ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	52.1 °C
ITS-5	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAG	55.0 °C

2.1.2.4. Agaroz Jel Elektroforez Tamponları

Çizelge 2.5 (0,5)xTBE (Tris-Borate) Tampon

Stok solüsyon	Son Konsantrasyon
1M Tris-borate	0,045M
0.5M EDTA (pH 8)	0,001M

2.2. Yöntem

2.2.1. Cam Malzeme ve Plastik Malzemenin Hazırlanması

Isıya dayanıklı malzemeler, pipet uçları, ependorf tüpleri (mikrosantrifüj tüpleri), santrifüj tüpleri, solüsyonlar, ve cam malzeme 121°C' de 20 dakika (1 atm basınçta) otoklavda steril edildi. 2 saat 80°C' de kurutma amacıyla etüvde bekletildi.

2.2.2 Genomik DNA (gDNA) İzolasyon Yöntemi:

3125 numaralı *Ziziphora taurica* subsp. *clenoides* örneğinden yapılan DNA izolasyonu aşağıdaki metod kullanılarak Dellaporta ve arkadaşları [107] tarafından geliştirilen izolasyon metodu modifiye edilerek kullanıldı.

- 1- 5 adet yaprak -80' den çıkartılıp sıvı azot içinde ezildi, 4 tüpe paylaştırıldı.(Örnek miktarı 300 µL)
- 2- 600 µL tampon eklenerek her örneğe 5 dk alt üst edilir.
- 3- 500 µL Fenol/ Kloroform/ İzooamilalkol eklendi, 5 dk alt üst edildi.
- 4- 12000rpm' de 5 dk santrifüj yapıldı.
- 5- Süpernatant alındı.
- 6- Süpernatant miktarının 1/10' u kadar Sodyum Asetat (NaAc) eklendi alt üst edildi.
- 7- Süpernatant miktarı kadar izopropanol eklendi.
- 8- 1 dk max. 10000, min. 8000 rpm' de santrifüj edildi.
- 9- Tüm çözelti döküldü, pellet tutuldu.
- 10- Pellet 500µL TE' de çözüldü, 2 tüpe indirildi.
- 11- 5 µL RNaz eklendi. Alt üst edilir, 30 dk 37° C' de inkübe edilir, 15 dk arayla alt üst edildi.
- 12- 50 µL Sodyum Asetat (NaAc) eklenir alt üst edildi.
- 13- 1ml % 95' lik etanol eklenir, -80' de 10 dk eklendi.
- 14- 10 dk 13000rpm' de santrifüj edildi.
- 15- Pellet pipet ucuyla oynatıldı.

- 16- 1ml % 70' lik etanol eklendi.
- 17- 2 dk 12000 rpm' de santrifüj edildi.
- 18- Etanol pipet ucuyla uzaklaştırıldı.
- 19- 10 dk kurutuldu.µL
- 20- 50 µL TE' de çözüldü.

2.2.3 PZR Amplifikasyonu (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PZR toplam reaksiyon hacmi 50 µL olacak şekilde aşağıdaki bileşenler bir PZR tüpüne kondu. Reaksiyonda ITS4m (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), ITS5m (5'-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3') primerleri kullanıldı. Karışıma en son enzim eklendi. PZR'de kullanılacak malzemeler çalışma esnasında buz üzerinde muhafaza edildi.

PZR reaksiyonu aşağıdaki gibi düzenlendi:

Steril distile su	23.6 µL
dNTP (10mM)	0.8 µL
PZR buffer	5 µL
Primer Forward (50 pmol/µL)	5 µL
Primer Reverse (50 pmol/µL)	5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	3 µL
Kalıp DNA	4 µL
Taq DNA Polimeraz	0,6 µL
DMSO	3 µL

PZR tüpüne konan bileşenlerin iyice karışması için çok kısa bir süre (1-2 saniye) santrifüjleme yapıldı. Tüpler PZR aletine yerleştirildi. Uygun program seçilerek reaksiyon başlatıldı.

Çizelge 2.6 PZR Reaksiyonları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Devir Sayısı
Ön ısıtma	94 C °	5 dak.	1 devir
1. basamak	94 C °	45 sn.	35 devir
2. basamak	50 C °	45 sn.	
3. basamak	72 C °	2 dak.	
4. basamak	72 C °	10 dak.	1 devir
5. basamak	4 C °	25 saat	

2.2.4 PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi:

PZR sonuçlarına göre istenilen yoğunluktaki örnekler dizi analizine hazır hale getirilmek için Qiagen Jel ekasaksiyon kiti kullanılarak jelden geri kazanıldı.(Kat no: 27104) Jelden kazanmak için yeterli yoğunlukta DNA elde etmek için aynı örnekten 50 µL hacimde 8 adet PZR reaksiyonu yapıldı ve elde edilen ürün % 0.8'lik agaroz jel elektroforezinde görüntüledikten sonra elde edilen bantlar kesilerek ependorf tüplerinde biriktirildi ve tüm örnekler tek bir kolonda birleştirilerek jelden kazanıldı. Bazı örnekler jelden geri kazanılmadan direk PZR ürünü olarak dizi analizi için gönderildi. Örnekler dizi analizi elde etmek için hem ITS-4, Hem de ITS-5m primerleri (White et al. 1990) kullanılarak her iki taraftan da okundu. Örnekler, Düzen Laboratuvarı (İstanbul), Refgen (Ankara), Macrogen (Kore), İontek (İstanbul) gibi dizi analizi yapan ticari kuruluşlara gönderildi. Elde edilen dizi analizi verileri, Windows 95/98/NT/2000/XP için yazılmış olan BioEdit biyolojik dizi sıralama editörü ile kontrol edildi. Sol (5', forward) ve sağ (3' revers) primerler ile okunan diziler eşleştirildi, ve filogenetik ağaç oluşturmak için kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1 *Ziziphora* Taksonlarının Morfolojik Karakterlere Dayalı Taksonomi Anahtarı

Bir veya çok yıllık, genellikle keskin kokulu. Sillatlar aralıklı veya sık, çoğu kapitat veya spikat çiçeklenme düzenine sahiptir. Kaliks dar tüpsü, düz ve birbirine yaklaşan dişlere sahip, 9 damarlı, boğazda tüylü, nadiren subbilabiat. Korolla bilabiat, üst dudak tüm veya emerginat, alt dudak 3 loblu. Bazen ginodioik, fertil stamenleri 2, içeride veya dışarı çıkmış, serbest veya anterler birbirine yanal olarak yapışık.

1-Çok yıllık, çiçek düzeni kapitat 1.clinopodioides

1-Tek yıllık, çiçek düzeni spikat veya kapitat

2-Çiçek düzeni kapitat, kısmen geniş yumurtamsı braktelerle sarılmış

2. capitata

2-Çiçek düzeni spikat veya subspikat, brakteler dar, başları sarmaz

3-Korolla 12-15mm, c.2kaliks, kaliks 7-10mm

5-taurica

3-Korolla 8-13mm, 1.5kaliks' ten fazla olmayan, kaliks 5-8mm

4-Çiçek düzeni ovoid, subkapitat, yapraklar linear-lanseolat'tan dar eliptiğe doğru

3-persica

4-Çiçek düzeni dar yumurtamsı, spikat, yapraklar lineardan dar lanseolata doğru

4-tenuior

Çizelge 3.1 Morfolojik Veriler

ÖZELLİKLER	<i>Z. capitata</i>	<i>Z. tenuior</i>	<i>Z. subsp. taurica</i>	<i>Z. subsp. clenoides</i>	<i>Z. clinopodioides</i>	<i>Z. persica</i>
Yaşam Süresi	Tek yıllık	Tek yıllık	Tek yıllık	Tek yıllık	Çok yıllık	Tek yıllık
Gövde Uzunluğu	4-15 cm	5-15 cm	35 cm kadar	15 cm kadar	30 cm kadar	5-20 cm
Brakte Şekli	Geniş ovat	Linear	Linear	Linear	Ovat	Linear lanceolat ile dar eliptik
Çiçek Düzeni	Küre şeklinde kapitat	Dar yumurtamsı, spikat	Sivri uçlu spikat	Sivri uçlu spikat	Kapitat	Yumurtamsı ovoid
Kaliks	8-11 mm	5-8 mm	7-10 mm	7-10 mm	5-7 mm	8-10 mm
Korolla	10-13 mm	8-10 mm	8-10 mm	8-10 mm	(7)-10-12 mm	10-12 mm
Korolla Rengi	Leylak, mor, lavanta, beyaz, pembe,	Lavanta, açık mor, lila	Lavanta, açık mor, lila	Lavanta, açık mor, lila	Açık mor, lila	Lavanta, soluk mavi

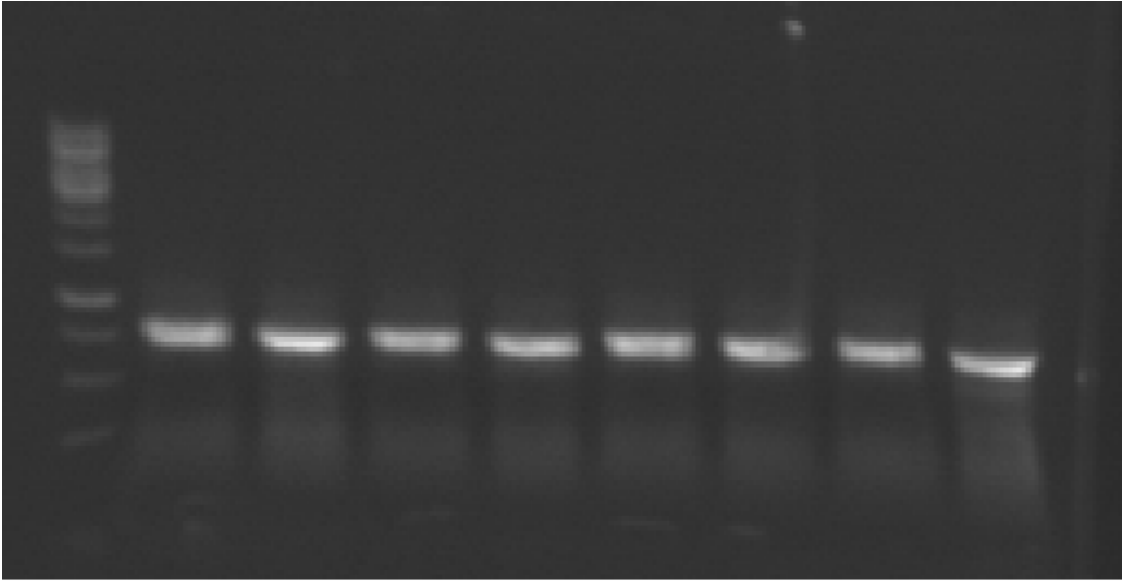
3.2 ITS Bölgesinin Dizilenmesi

Çalışmada kullanılan *Ziziphora* örnekleri Yard. Doç. Tuncay DİRMENCİ tarafından çeşitli lokalitelerden toplanmıştır. Dış grup olarak belirlenen *Mentha x villosa*, *Salvia ranzaniana*, *Acinos alpinus* ve iç grup olarak belirlenen *Ziziphora hispanica* örneğine ait ITS-1, 5.8 geni ve ITS-2 bölgelerinin kısmi dizileri NCBI veri tabanından

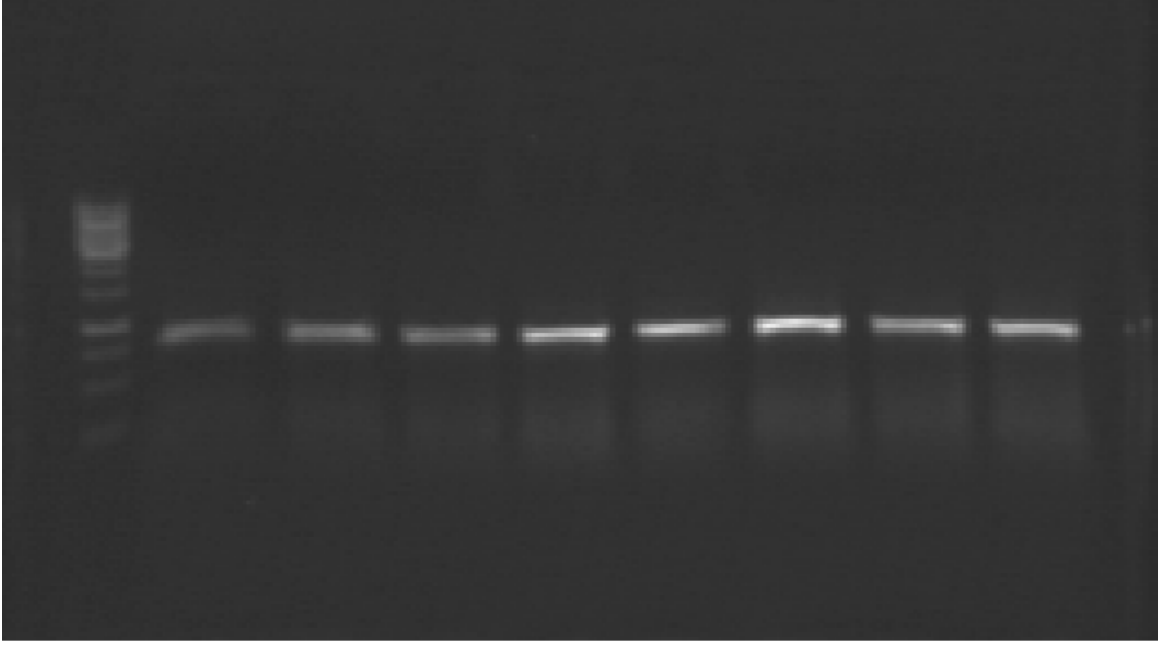
temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan *Ziziphora* cinsine ait örneklerin PZR reaksiyonuyla ITS bölgeleri çoğaltıldı. ITS bölgesinin dizi analizi için ticari şirketler seçildi. Dizi analizi için hazır hale getirilen örnekler Qiagen Jel Extraction Kitiyle (Katalog no 27104) jelden geri kazanılarak (bkz çizelge 3.2)ya da direk PZR ürünü şeklinde (bkz çizelge 3.3) dizi analizi şirketlerine gönderildi. Her bir örneğin DNA dizisi hem ITS4 (Forward) hem de ITS5 (Revers) primerleriyle (çift yönlü) okutuldu.

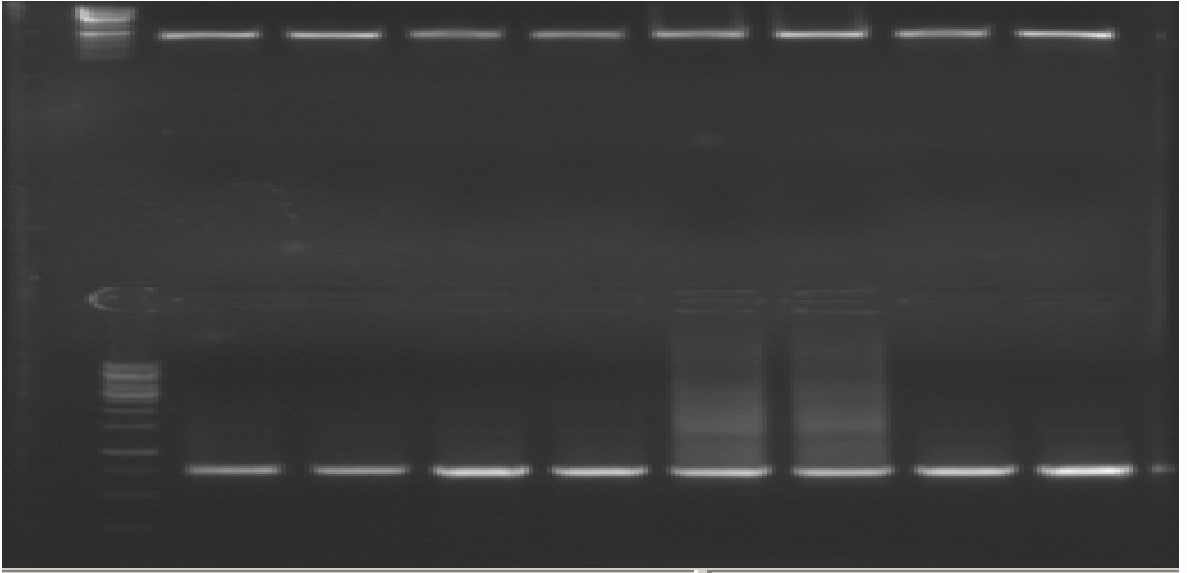
Dizi analizine gönderilmek üzere jelden kazanmak için hazırlanmış örneklerin PZR görüntüleri aşağıdaki şekillerde gösterimiştir (Şekil 3.1-3.6)



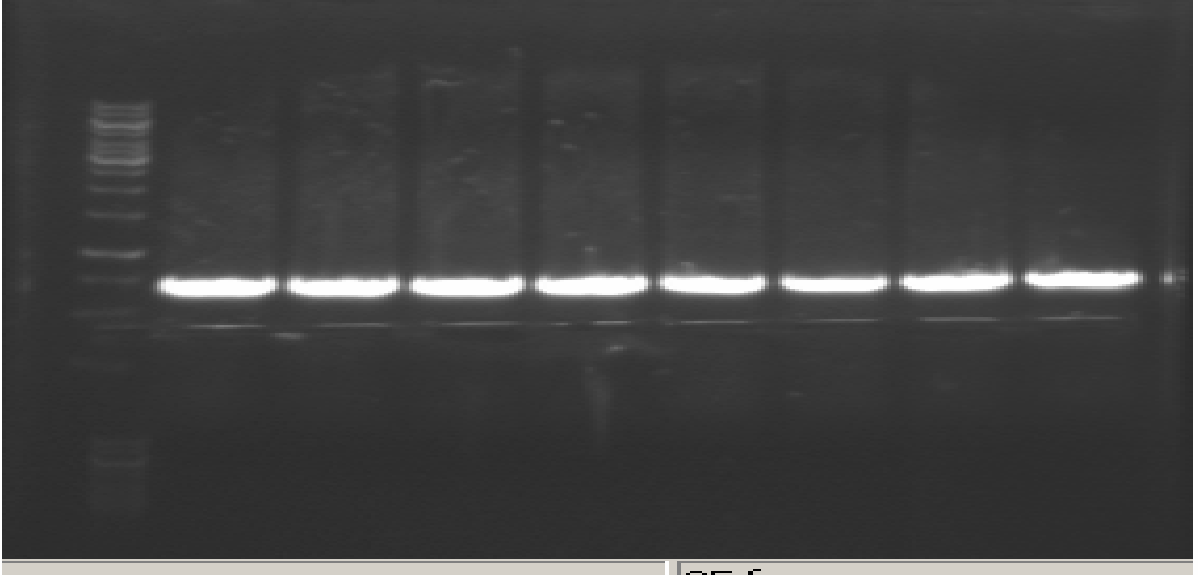
Şekil 3.1 Jelden Geri Kazanmak İçin Yapılmış 8 Adet 50 µL Hacimde 7757 Nolu Örneğe Ait PZR Ürününün Jel Fotoğrafı



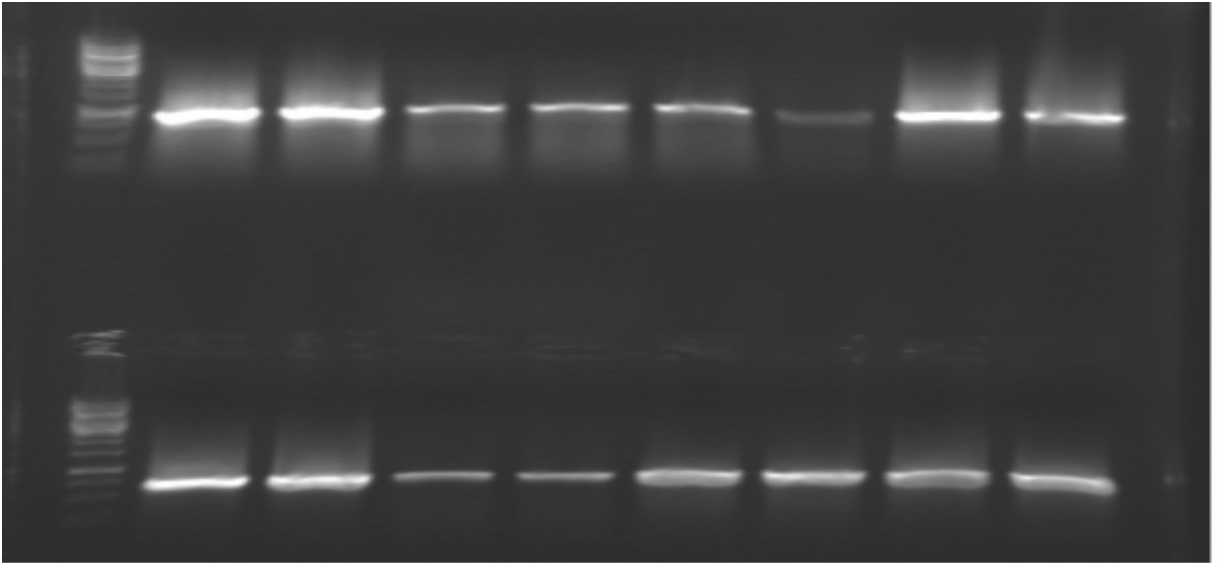
Şekil 3.2 Jelden Geri Kazanmak İçin Yapılmış 8 Adet 50 µL Hacimde 3165 Nolu Örneğe Ait PZR Ürününün Jel Fotoğrafi



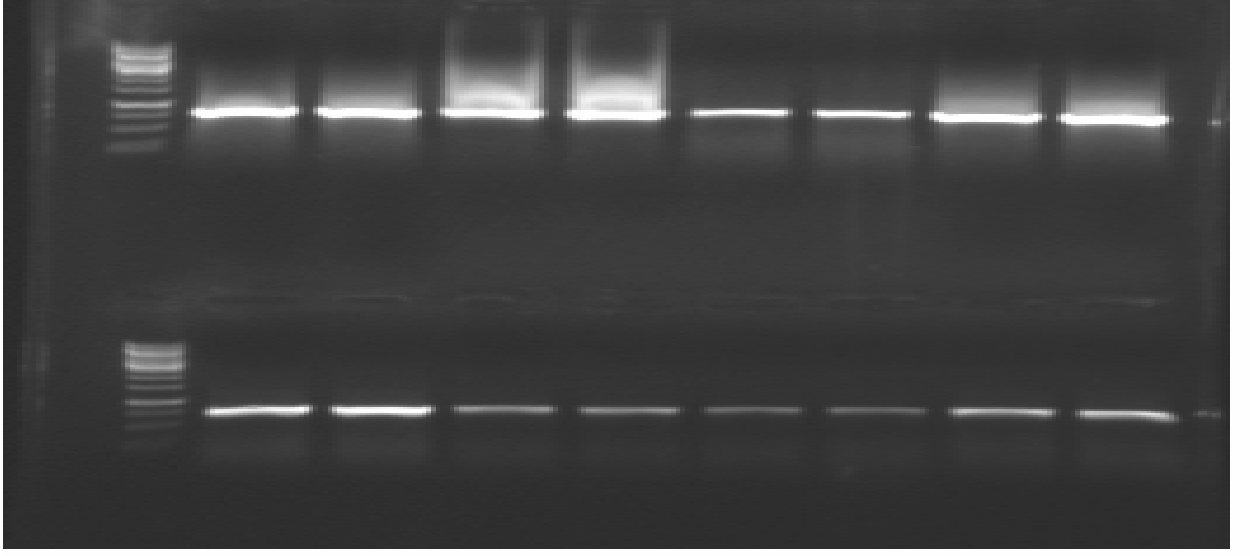
Şekil 3.3 Jelden Geri Kazanmak İçin Yapılmış 8 Adet 50 µL Hacimde 3125 (Üstte), 3156 (altta) Nolu Örneğe Ait PZR Ürününün Jel Fotoğrafi



Şekil 3.4 Jelden Geri Kazanmak İçin Yapılmış 8 Adet 50 µL Hacimde 3174 Nolu Örneğe Ait PZR Ürününün Jel Fotoğrafi



Şekil 3.5 Jelden Geri Kazanmak İçin Yapılmış 8 Adet 50 µL Hacimde 16273 (Üstte), 3359 (altta) Nolu Örneğe Ait PZR Ürününün Jel Fotoğrafi



Şekil 3.6 Jelden Geri Kazanmak İçin Yapılmış 8 Adet 50 µL Hacimde 3168 (Üstte), 3194 (altta) Nolu Örneğe Ait PZR Ürününün Jel Fotoğrafi

Çizelge 3.2 Jelden Geri Kazanılan Örnekler ve Gönderildikleri Dizi Analizi Şirketi

Bitki Materyali Herbaryum Numarası	Bitki Türü	Gönderildiği Dizi Analizi Şirketi
3125	<i>Ziziphora taurica</i> subsp. <i>cleonioides</i> (A)	Düzen laboratuvarı
3156	<i>Ziziphora taurica</i> subsp. <i>cleonioides</i> (C)	Refgen
3174	<i>Ziziphora clinopodioides</i> (E)	Refgen
16273	<i>Ziziphora clinopodioides</i> (C)	Refgen

Çizelge 3.2'nin Devamı

3168	<i>Ziziphora capitata</i> (B)	Refgen
3194	<i>Ziziphora taurica</i> subsp. <i>taurica</i> (A)	Refgen
7757	<i>Ziziphora tenuior</i> (C)	Macrogen
3359	<i>Ziziphora tenuior</i> (D)	Refgen

Çizelge 3.3 PZR Ürünü Halinde Dizi Analizi İçin Gönderilen Örnekler ve Gönderildikleri Dizi Analizi Şirketi

Bitki Materyali Herbaryum Numarası	Bitki Türü	Gönderildiği Dizi Analizi Şirketi
3852	<i>Ziziphora clinopodioides</i> (A)	Refgen
1276	<i>Ziziphora tenuior</i> (A)	Refgen
S.N.	<i>Ziziphora clinopodioides</i> (D)	Refgen
5059	<i>Ziziphora persica</i>	Refgen
3166	<i>Ziziphora taurica</i> subsp. <i>clenoides</i> (D)	Refgen
3154	<i>Ziziphora taurica</i> subsp. <i>clenoides</i> (B)	Refgen

Çizelge 3.3'ün Devamı

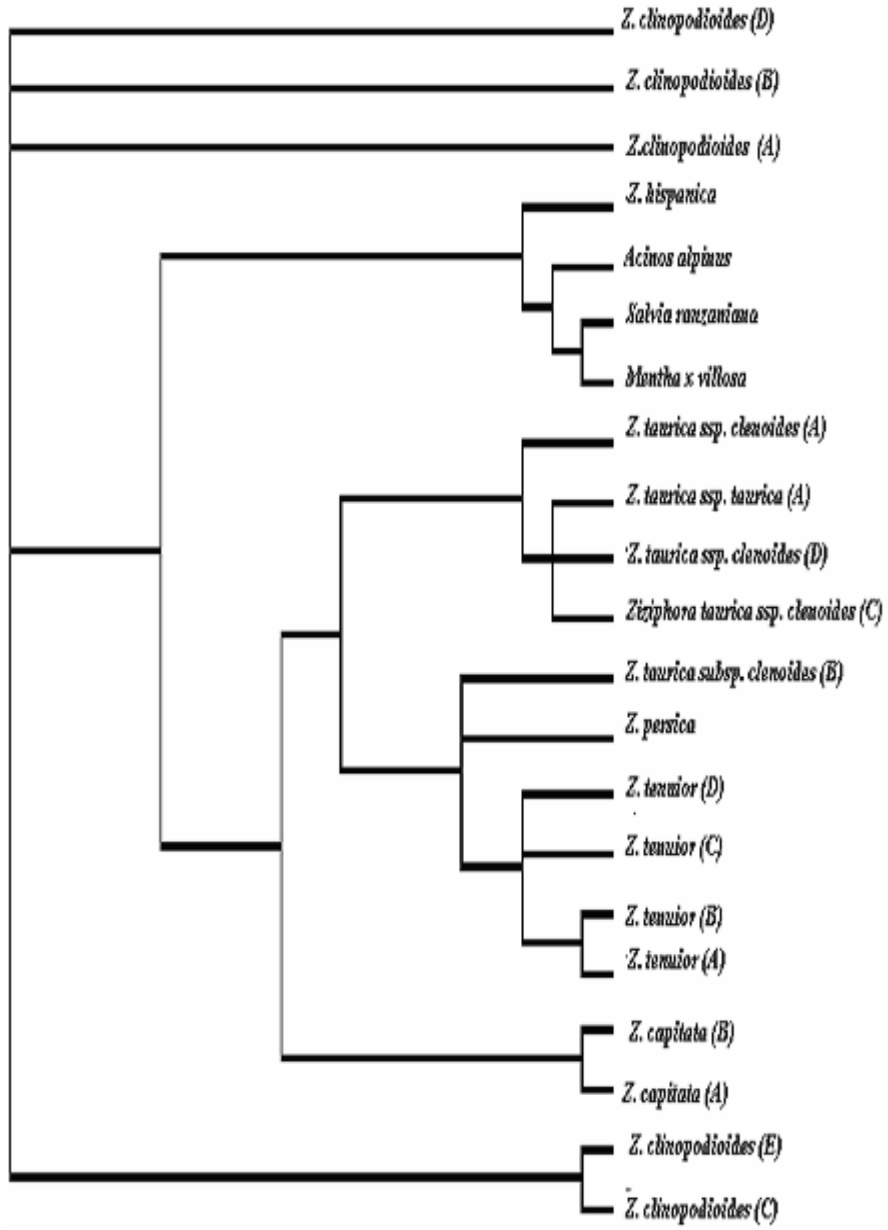
S.N.	<i>Ziziphora clinopodioides</i> (B)	Refgen
1397	<i>Ziziphora capitata</i> (A)	Refgen
2272	<i>Ziziphora tenuior</i> (B)	Refgen

3.3 Verilerin Analizi ve Değerlendirilmesi

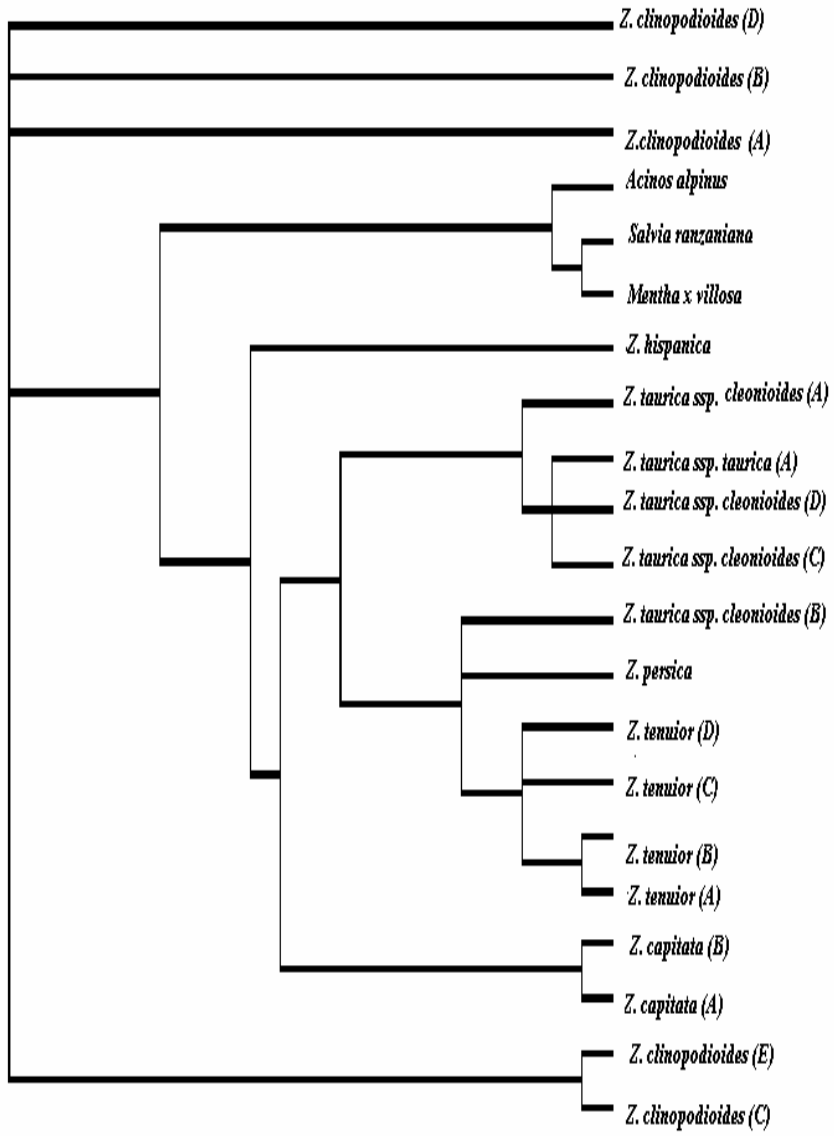
Sonuçların değerlendirilmesi amacıyla dizi analizi sonucu ilk olarak NCBI veri tabanında nükleotid BLAST yapılarak kontrol edildi. ITS-4 ve ITS-5 primerleri kullanılarak yapılan bir örneğe ait iki nükleotid dizisi ile elde edilen diziler Windows 95/98/NT/2000/XP BioEdit biyolojik dizi sıralama editörü ile kontrol edildi. Her iki nükleotid dizisi karşılaştırılarak gerçek dizi elde edildi (contig oluşturuldu). Elde edilen ITS bölgesi nükleotid dizilerinden, PAUP4.0, BioEdit ve PHYLIP 3.66 gibi bilgisayar programları yardımıyla filogenetik ağaç oluşturuldu.

Yaptığımız çalışmada Türkiye'de yetişen 6 *Ziziphora* taksonuna ait 17 adet örnek analiz edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan ITS (ITS1+ ITS2 + 5.8 geni) bölgesi için referans çalışmalarda sıklıkla rastlanan ITS4 ve ITS5 primerleri kullanılmıştır [10, 18, 29]. Veriler değerlendirildikten sonra filogenetik analiz PHYLIP3.66 ve PAUP4.0 programları yardımıyla yapıldı. Elde edilen ağaçların görüntülenmesi TreeV32 programı yardımıyla gerçekleştirildi.

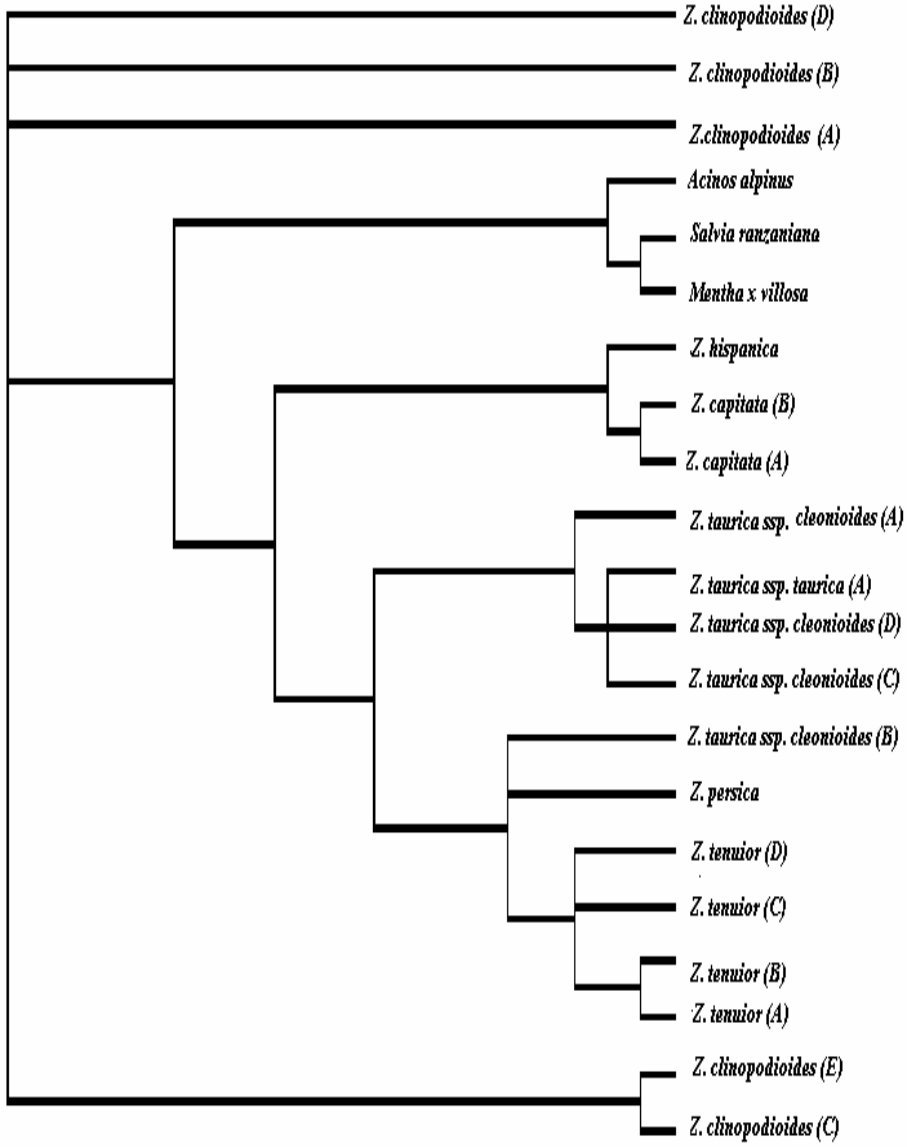
PHYLIP3.66 bilgisayar programı yardımıyla parsimoni metodu kullanılarak yapılan filogenetik analize dayalı ağaçlar şekil 4.1-4.8'de gösterilmiştir.



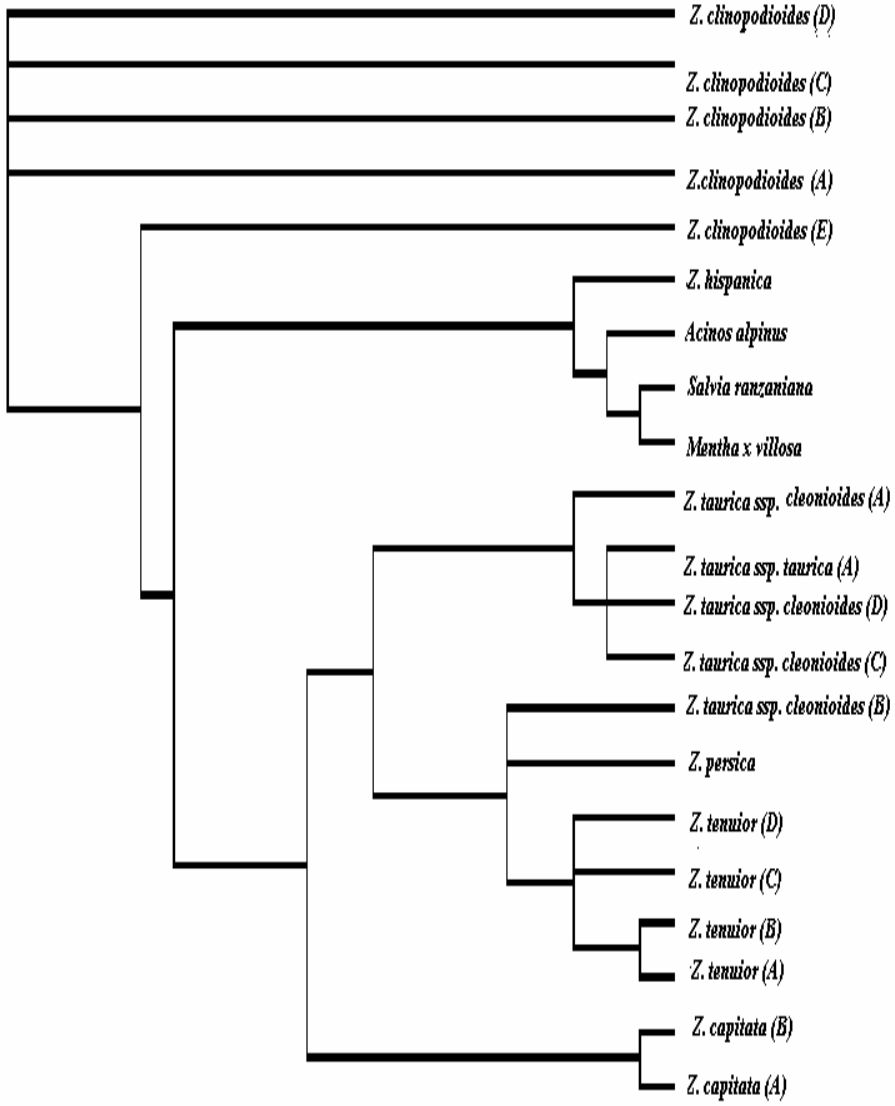
Şekil 4.1 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 1 Numaralı Ağaç



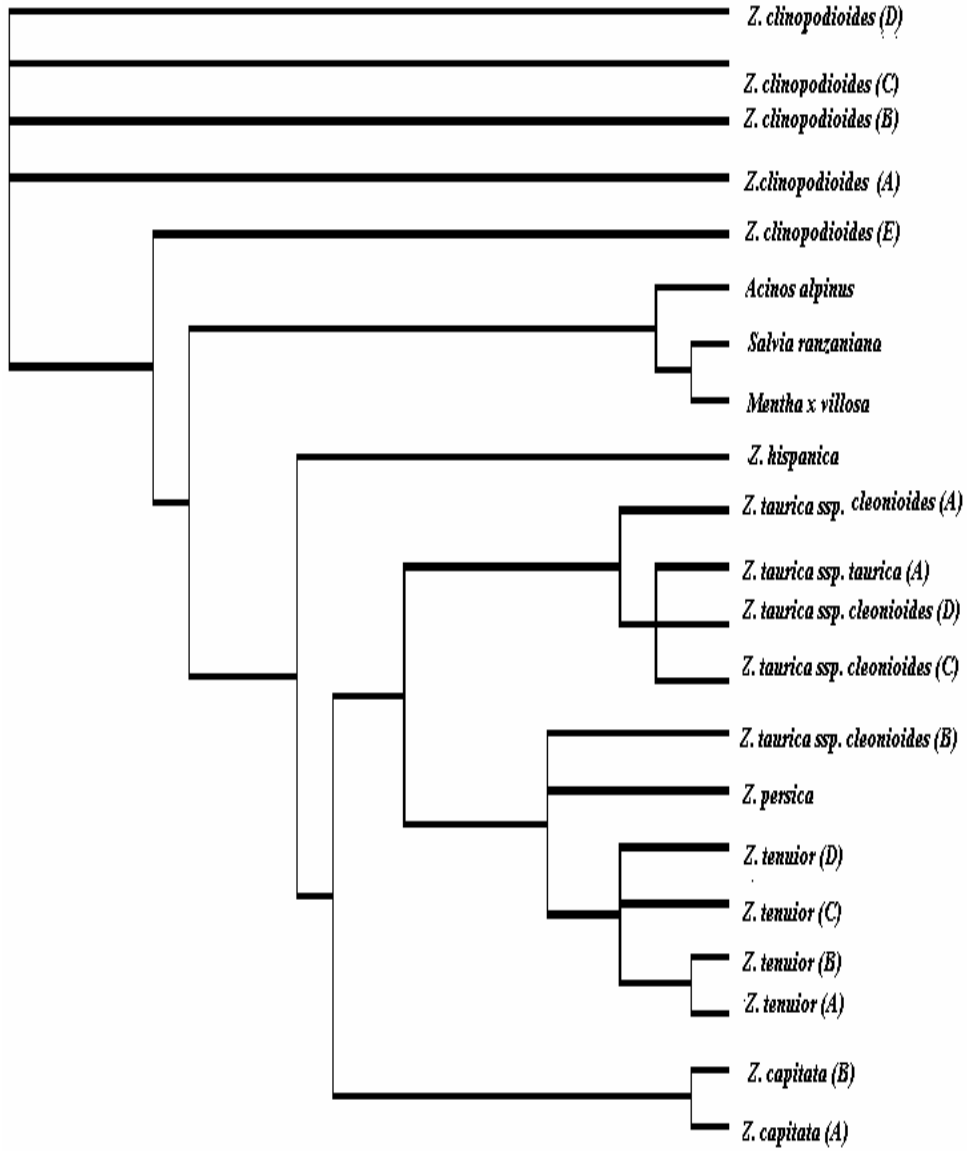
Şekil 4.2 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 2 Numaralı Ağaç



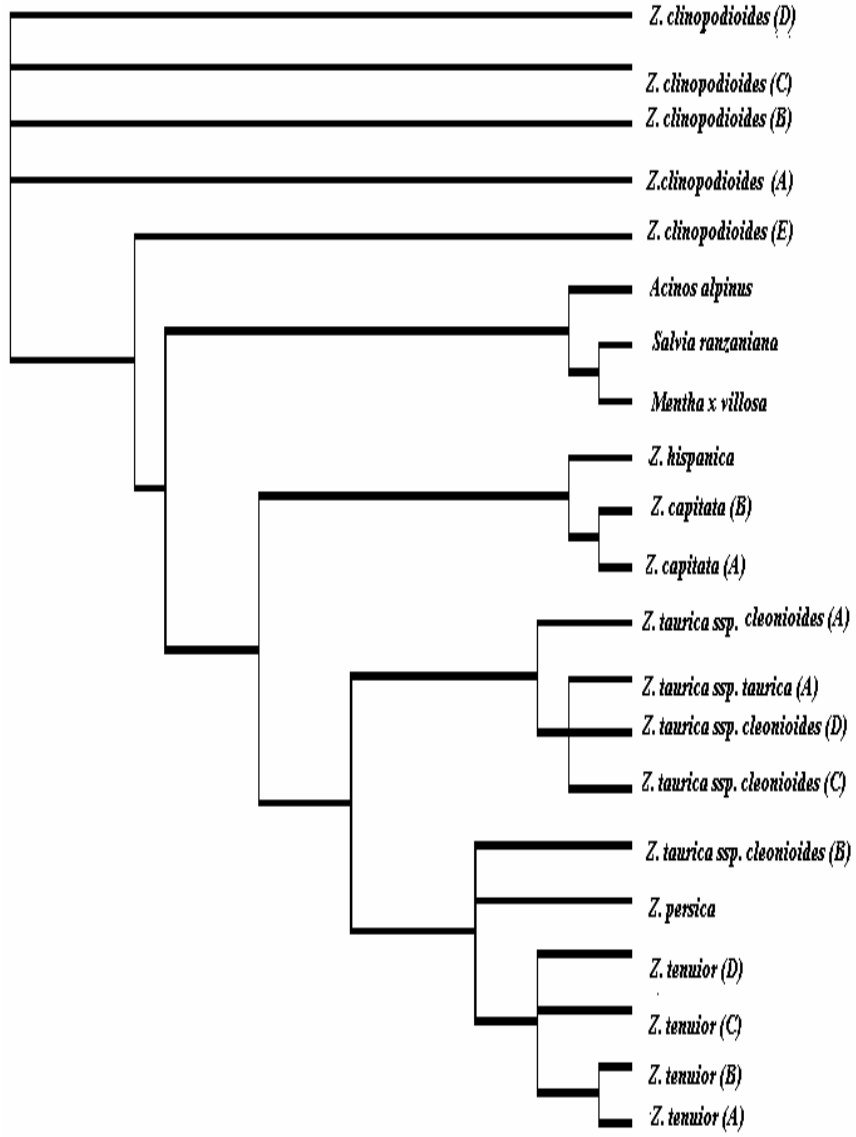
Şekil 4.3 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 3 Numaralı Ağaç



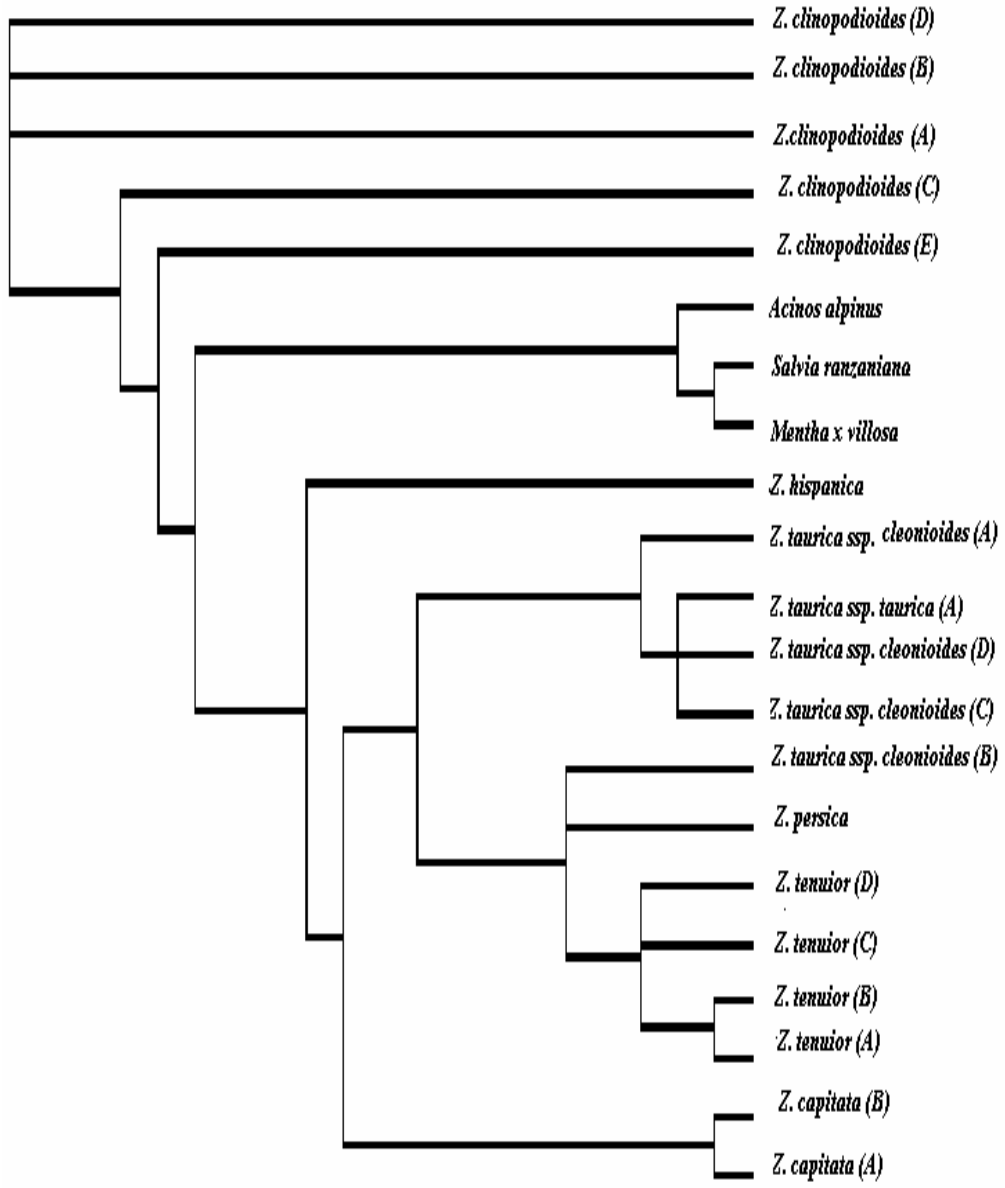
Şekil 4.4 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 4 Numaralı Ağaç



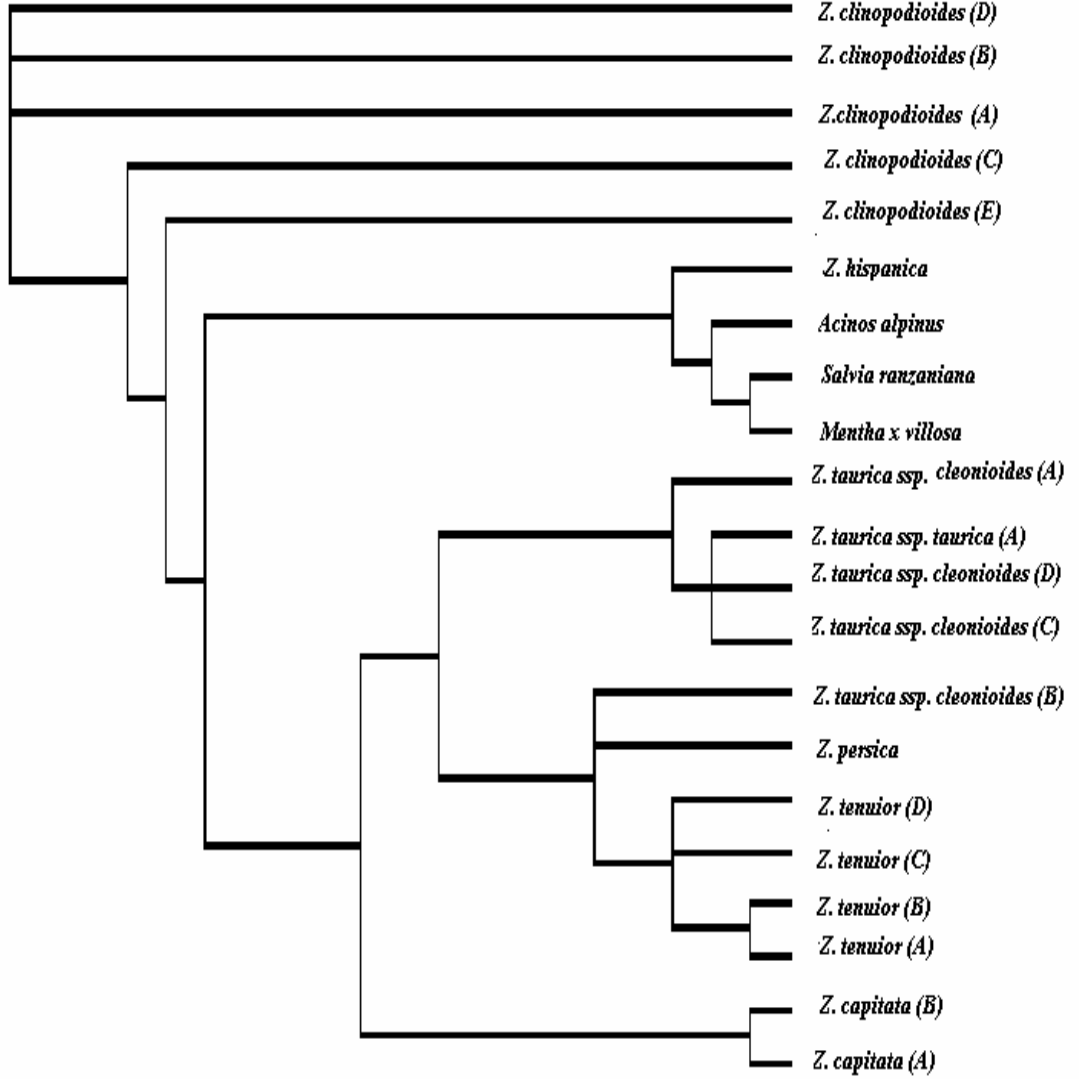
Şekil 4.5 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 5 Numaralı Ağaç



Şekil 4.6 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 6 Numaralı Ağaç

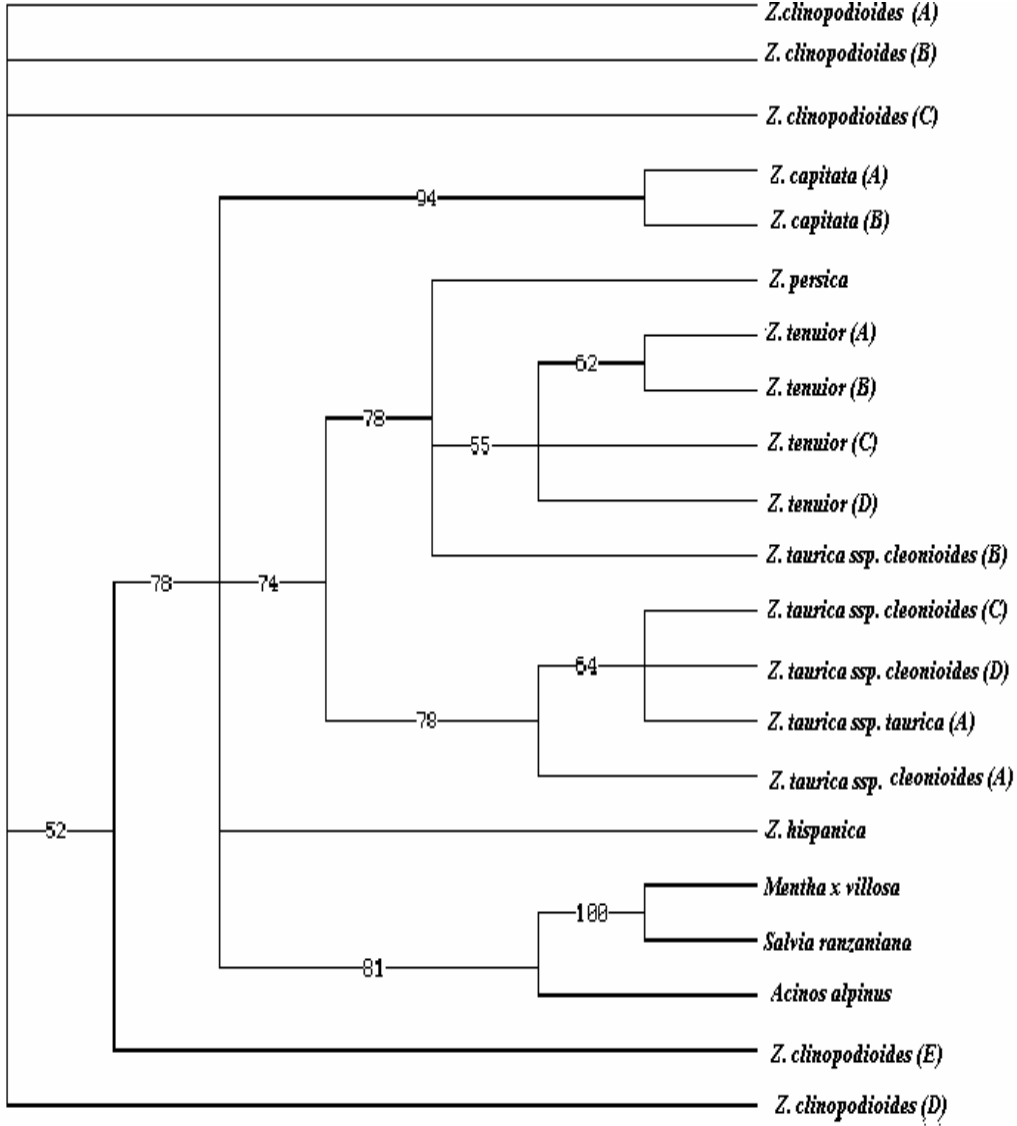


Şekil 4.7 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 7 Numaralı Ağaç



Şekil 4.8 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 8 Numaralı Ağaç

Phylip 3.66 programı kullanılarak yapılan parsimoni analizi sonucu elde edilen ağaçlardan en parsimonik olan ağacı belirlemek amacıyla PAUP 4.0 (Swofford 2000) programı kullanılarak bootstrap analizi yapılmıştır. Analiz sonucu şekil 4.9’da gösterilmektedir.

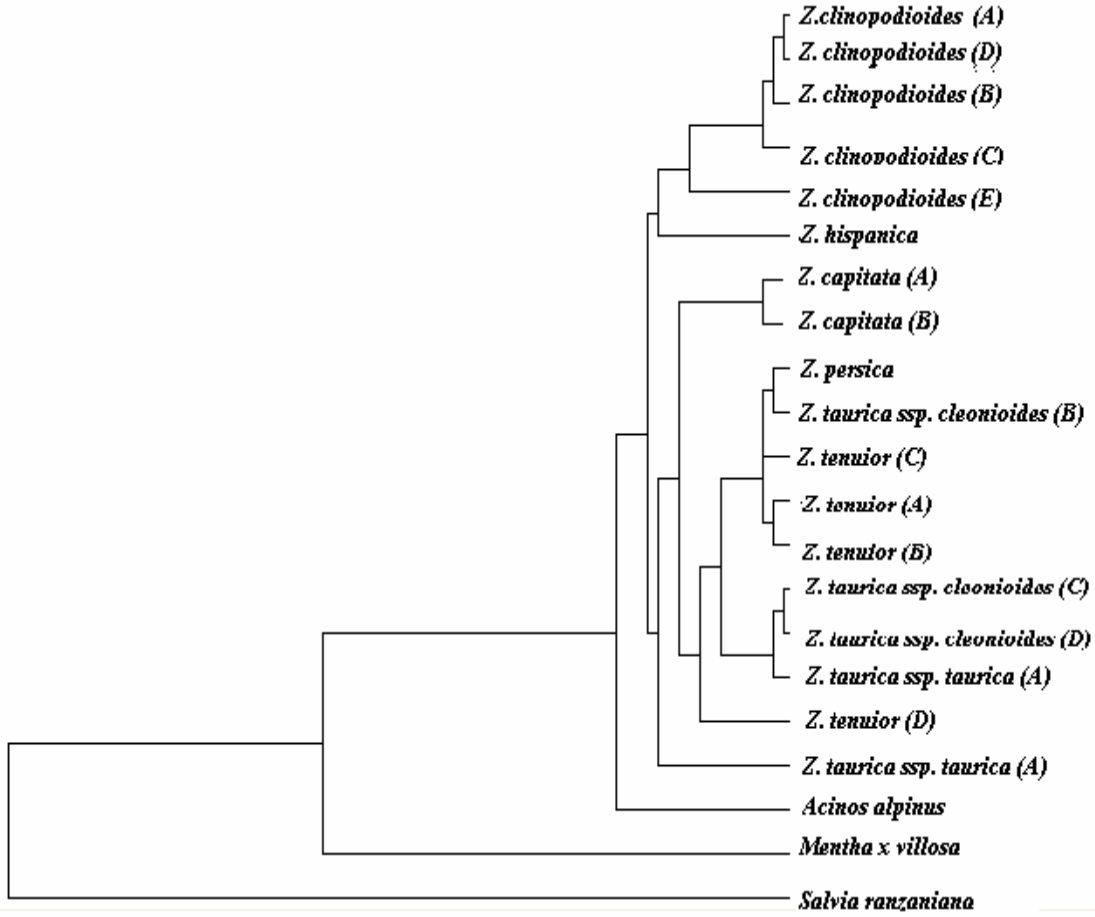


Şekil 4.9 BOOTSTRAP Analizi

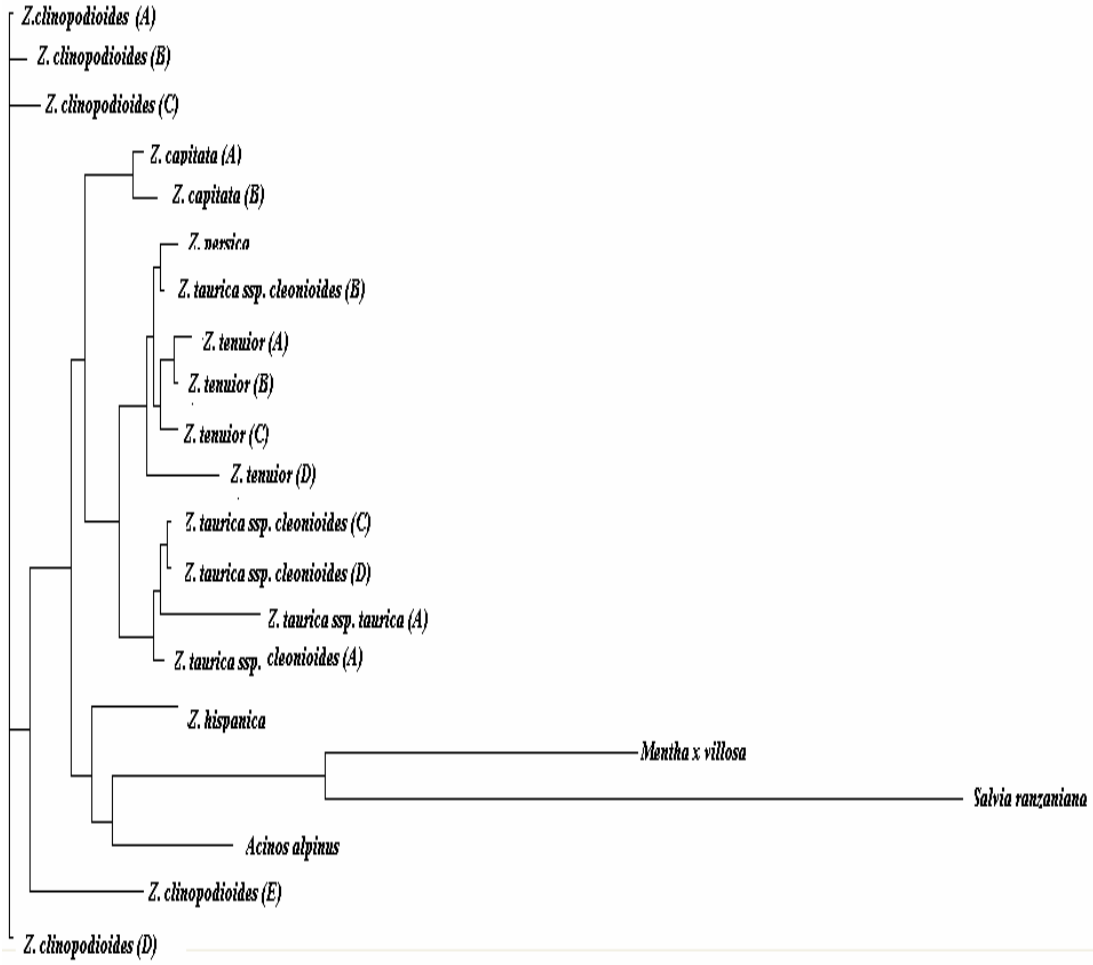
Yaptığımız Bootstrap analizinde, dış grup olarak kullandığımız *Mentha x villosa*, *Salvia ranzaniiana* ve *Acinos alpinus* grubunun % 81 desteklendiği gözlenmektedir. *Ziziphora capitata* (A) ve *Ziziphora capitata* (B) örneklerinin bulunduğu grubun %94 desteklendiği, *Ziziphora tenuior* türüne ait örneklerin bulunduğu dalın % 55 desteklendiği ve bunun yanında bu türe ait taksonları *Ziziphora persica* ve *Ziziphora taurica* subsp *cleonioides* (B) ile olan filogenetik ilişkisini gösteren dalın da % 78 desteklendiği gözlenmektedir. *Ziziphora clinopodioides* türüne ait örneklerin de çok net bir şekilde

birbirinden ayrıldığı buna ek olarak *Ziziphora clinopodioides* (E)' nin diğer *Ziziphora clinopodioides* örneklerinden ayrıldığı ortaya çıkmaktadır.

Parsimoni analizine ek olarak genetik uzaklığı belirlemek üzere UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) ve NJ (neighbor joining) analizleri yapılmıştır. Elde edilen verilerin parsimoni analizi sonucu elde edilen filogenetik ağaçları desteklediği belirlenmiştir.



Şekil 4.10 UPGMA Analizi Sonucu Oluşan Ağaç



Şekil 4.11 Neighbor Joining (NJ) Analizi Sonucu Oluşan Ağaç

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

ITS bölgesi dizi analizi sonucu elde edilen veriler ile Anadolu'da yetişen *Ziziphora* taksonlarına ait filogenetik analiz (genetik akrabalık) PAUP 4.0, PHYLIP 3.66 ve BioEdit programları yardımıyla yapıldı. Analiz için Parsimoni ve Genetik Uzaklık kriterleri kullanılmıştır.

Filogeninin çok yaygın olarak kullanılmasına bağlı olarak bunların yeniden yapılandırılması için birçok metod geliştirilmiştir. Parsimoni en sık çalışılan ve kullanılan filogenetik ağaçtır. Bu metod olası bütün ağaçları değerlendirme ve farklı ağaçlar arasından seçmeye yarayan her biri için bir kriter ya da bir skor verme esasına dayanır. Maksimum Parsimoni'de kriter, verilen ağaçtaki verileri açıklayabilmek için gerçek olduğu kabul edilen evrimsel değişimlerin sayısıdır. Parsimonisi en yüksek olan ağaç, en tutumlu olan yani genetik ilişkiyi en gerçekçi yansıtan ağaçtır.

Genetik uzaklık metodu, dizi çiftleri arasındaki farkın derecesine ve uzaklığına dayanır. Bu uzaklık taksonlar arasında uzaklık matrisi oluşturmak için kullanılabilir. Uzaklık metodunda iki farklı algoritma kullanılır. Bunlardan biri küme temelli diğeri ise optimalite (en iyilik) temelli algoritmalarıdır. Küme temelli algoritmalarda uzaklık matrisi en benzer dizi çiftlerinden başlanarak yapılır. UPGMA ve NJ olmak üzere iki çeşidi vardır. Optimalite temelli algoritmalarda ise birçok ağaç topolojisini kıyaslar ve ağaçlar arasında en iyi uyduğu düşünüleni seçer [108].

Bootstrap araştırması elde edilen ağaçların dallarının parsimoni kriteri kullanılarak istatistiksel yönden en güvenilir olan dalları belirlemede kullanılır [109]. Burada eldeki bilgiler değerlendirilerek bazı kopyalar üretilir ve herbir dalın yüzdelik olarak ne oranda desteklendiği belirlenir. Bootstrap değeri % 0 ile % 100 arasında değişir. Kress ve arkadaşlarının (2002) nin karakterize ettiği bootstrap destek kriterlerine göre, \geq % 85 güçlü, % 70-85 arası orta, %50-70 arası zayıf ve $<$ % 50 çok zayıf şeklinde tanımlanmıştır .

Bootstrap desteğinin % 70 ya da daha büyük oluşu genellikle doğru filogeninin tanımlanması ile ilişkilendirilir. Eğer, belli bir dal için bootstrap desteği % 50' nin altında ise; araştırmacı ağacın bu kısmındaki dallanma modelini belirleyemediği sonucuna varacak ve bunun sonucunda yayınladığı ağaçta, bu dalı tek düğümden çok çatallı olarak verecektir [110].

Çalışmamızda dış grup olarak belirlenen *Menta x vilosa*, *Salvia ranzaniana* ve *Acinos alpinus* örneklerinden *Ziziphora* cinsi taksonlarına en yakın *Acinos alpinus*, en uzak ise *Salvia ranzaniana* 'nın olduğu belirlenmiştir. İç grup olarak belirlenen *Ziziphora hispanica*'nın *Ziziphora* taksonlarına yakın çıkması analizimizin güvenilirliğini göstermektedir. *Ziziphora clinopodioides* A, B, C ve D örneklerinin birbirlerine morfolojik karakterler açısından benzer olması, parsimoni ve genetik uzaklığı belirlemek amacıyla yapılan NJ ve UPGMA analizleri sonucu elde edilen filogenetik ağaçlarda da bu sonucun desteklenmesi bu örneklerin birbirlerine yakın örnekler olduğu, ITS bölgesi dizi analizi sonucuna göre moleküler olarak ta birbirlerine benzediği sonucunu çıkarmıştır. *Ziziphora clinopodioides* (E) örneğinin 3000 m yükseklikte yetişmiş olması, bu ortama uyum gösterdiğinden dolayı diğer *Ziziphora clinopodioides* örneklerine nazaran daha dar ve yuvarlak yapraklara sahip olması, daha kısa olması ve diğer *Ziziphora clinopodioides* örneklerinin kaliksi yeşil renkte iken kaliksinin kırmızı-mor renkte olması bu örneğin yapılan filogenetik analizler sonucunda da diğer *Ziziphora clinopodioides* örneklerinden ayrılmasına sebep olmuştur. Bu sonuç *Ziziphora clinopodioides* (E)'nin yeni bir alttür olabileceği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. *Ziziphora capitata* (A) ve *Ziziphora capitata* (B) örneklerinin oluşturduğu monofiletik grup bu taksonların diğer *Ziziphora* örneklerinden ayrıldığını, ve kendi içlerinde de tutarlı bir dal oluşturduklarını göstermektedir. *Ziziphora taurica* subsp. *taurica* (A) ve *Ziziphora taurica* subsp. *cleonioides* C, D ve A'nın monofiletik grup oluşturması, bu alttürlerin diğer *Ziziphora* taksonlarından ayrıldığını fakat kendi içlerinde birbirlerine çok yakın olduklarını göstermektedir. *Ziziphora tenuior* cinsine ait örneklerin monofiletik grup oluşturmaları bu cinse ait taksonların diğer *Ziziphora* cinsine ait taksonlara göre farklarını ortaya koymuş, bu taksonun *Ziziphora persica* ile olan yaşam süresi, gövde uzunluğu, ve braktelerinin linear olması şeklindeki morfolojik benzerlikleri analizimizde de ortaya çıkmıştır. Bu monofiletik grupta yer alan *Ziziphora taurica* subsp. *cleonioides* (B) örneğinin boyunun

daha kısa olması, basit ve dallanmamış bir gövdeye sahip olması diğer *Ziziphora taurica* subsp. *cleonioides* örneklerinden ayrılmasına neden olmuştur.

5. KAYNAKLAR

- [1] Swofford, D.L., "Paup. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), Version 4. Sinauer", (2002).
- [2] Hall, T.A., "*Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analyses Program for Windows 95/98/Nt*", *Nucleic Acids Symp. Series*, 41 (1999) 95.
- [3] Felsenstein, J., "Phylip-Phylogeny Inference Packace (Version 3.2)", *Cladistics*, **5**: (1989) 164.
- [4] Wen, J., Vanek-Krebitz, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Breiteneder, H., "The Potential OfbetvIhomologues, a Nuclear Multigene Family, as Phylogenetic Markers in Flowering Plants", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **8/3**, (1997) 317.
- [5] Savolainen, V., Chase, M.W., "A Decade of Progress in Plant Molecular Phylogenetics", *Trends in Genetics*, **19/12**, (2003) 717.
- [6] Kellogg, E.A., "Who's Related to Whom? Recent Results from Molecular Systematic Studies", *Current Opinion in Plant Biology*, **1/2**, (1998) 149.
- [7] Ro, K.E., Keener, C.S., McPherson, B.A., "Molecular Phylogenetic Study of the Ranunculaceae: Utility of the Nuclear 26s Ribosomal DNA in Inferring Intrafamilial Relationships", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **8/2**, (1997) 117
- [8] Podoplelova, Y., Ryzhakov, G., "Phylogenetic Analysis of the Order Nymphaeales Based on the Nucleotide Sequences of the Chloroplast Its2-4 Region", *Plant Science*, **169/3**, (2005) 606.
- [9] Yokoyama, J., Suzuki, M., Iwatsuki, K., Hasebe, M., "Molecular Phylogeny of Coriaria, with Special Emphasis on the Disjunct Distribution", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **14/1**, (2000) 11.

- [10] Allan, G.J., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Boerner, E., Zimmer, E.A., "Molecular Phylogenetic Evidence for the Geographic Origin and Classification of Canary Island Lotus (Fabaceae: Loteae)", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32/1**, (2004) 123.
- [11] Cohen, B.L., Weydmann, A., "Molecular Evidence That Phoronids Are a Subtaxon of Brachiopods (Brachiopoda: Phoronata) and That Genetic Divergence of Metazoan Phyla Began Long before the Early Cambrian", *Organisms Diversity & Evolution*, **5/4**, (2005) 253.
- [12] Ogden, T.H., Whiting, M.F., "Phylogeny of Ephemeroptera (Mayflies) Based on Molecular Evidence", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37/3**, (2005) 625.
- [13] Graham, S.W., Olmstead, R.G., "Systematics - Utility of 17 Chloroplast Genes for Inferring the Phylogeny of the Basal Angiosperms", *American journal of botany*, **87/11**, (2000) 1712.
- [14] Savolainen, V., Chase, M.W., Hoot, S.B., Morton, C.M., Soltis, D.E., Bayer, C., "Phylogenetics of Flowering Plants Based on Combined Analysis of Plastid Atpb and Rbcl Gene Sequences", *Systematic Biology*, **49**, (2000) 306.
- [15] Lee, C., Wen, J., "Phylogeny of Panax Using Chloroplast Trnc-Trnd Intergenic Region and the Utility of Trnc-Trnd in Interspecific Studies of Plants", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **31/3**, (2004) 894.
- [16] Qui, Y.L., Lee, J.H., Bernasconi-Quadroni, F., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Zanis, M., Zimmer, E.A., Chen, Z.D., Savolainen, V., Chase, M.W., "The Earliest Angiosperms, Evidence from Mitochondrial, Plastid and Nuclear Genoms", *Nature*, **402**, (1999) 404.
- [17] Soltis, D.E., Soltis, P.S., Nicrent, D.L., Johnson, L.A., Hahn, W.J., Hoot, S.B., Sweere, J.A., Kuzoff, R.K., Kron, K.A., Chase, M.W., Swensen, S.M., Zimmer, E.A., Chaw, S.M., Gillespie, L.J., Kress, W.J., Sytsma, K.J., "Angiosperm Phylogeny Inferred from 18 S Ribosomal DNA Sequences", *Ann. Miissouri Bot. Garden*, **84**, (1997) 381.
- [18] Guzman, B., Vargas, P., "Systematics, Character Evolution, and Biogeography of Cistus L. (Cistaceae) Based on Its, Trnl-Trnf, and Matk Sequences", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37/3**, (2005) 644.

- [19] Aceto, S., Caputo, P., Cozzolino, S., Gaudio, L., Moretti, A., "Phylogeny and Evolution of Orchis and Allied Genera Based on Its DNA Variation: Morphological Gaps and Molecular Continuity", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **13/1**, (1999) 67.
- [20] Beier, B.A., Nylander, J.A.A., Chase, M.W., Thulin, M., "Phylogenetic Relationships and Biogeography of the Desert Plant Genus Fagonia (Zygophyllaceae), Inferred by Parsimony and Bayesian Model Averaging", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **33/1**, (2004) 91.
- [21] Bellarosa, R., Simeone, M.C., Papini, A., Schirone, B., "Utility of Its Sequence Data for Phylogenetic Reconstruction of Italian Quercus Spp.", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **34/2**, (2005) 355.
- [22] Steane, D.A., de Kok, R.P.J., Olmstead, R.G., "Phylogenetic Relationships between Clerodendrum (Lamiaceae) and Other Ajugoid Genera Inferred from Nuclear and Chloroplast DNA Sequence Data", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32/1**, (2004) 39.
- [23] Palmer, J., "Evolution of Chloroplast and Mitochondrial DNA in Plants and Algae. (Plenum Press)", *Molecular Evolutionary Genetics*, (1985) 131
- [24] Schweizer, M., Pawlowski, J., Duijnste, I.A.P., Kouwenhoven, T.J., van der Zwaan, G.J., "Molecular Phylogeny of the Foraminiferal Genus Uvigerina Based on Ribosomal DNA Sequences", *Marine Micropaleontology*, **57/3-4**, (2005) 51.
- [25] Jorgensen, R.A., Cluster, P.D., "Modes and Tempos in the Evolution of Nuclear Ribosomal DNA: New Characters for Evolutionary Studies and New Markers for Genetic and Population Studies", *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **75/75**, (1988) 1238.
- [26] Liston, A., Robinson, W.A., Pinero, D., Alvarez-Buylla, E.R., "Phylogenetics Ofpinus(Pinaceae) Based on Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Region Sequences", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **11/1**, (1999) 95
- [27] Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., C.S., C., Donoghue, M.J., "The Its Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny", *Ann. Mo. Bot. Gard.*, **82** , (1995) 247.
- [28] Barber, J.C., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Turner, K.G., Jansen, R.K., "Origin of Macaronesian Sideritis L. (Lamioideae: Lamiaceae) Inferred from Nuclear and Chloroplast Sequence Datasets", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **23/3**, (2002) 293.

- [29] Steane, D.A., Scotland, R.W., Mabberley, D.J., Olmstead, R.G., "Systematics - Molecular Systematics of Clerodendrum (Lamiaceae): Its Sequences and Total Evidence", *American Journal of Botany*, **86/1**, (1999) 98.
- [30] Davis, P.H., "Flora of Turkey and the East Aegean Islands", *University of Edinburgh Press*, Edinburgh, **7**, (1982) 297.
- [31] Metcalfe, C.R., Chalk, L., "Anatomy of the Dicotyledones", *Oxford University Press*, Londra, **2**, (1950), 1041.
- [32] Davis, P.H., "Flora of Turkey and the East Aegean Islands", *Edinburgh Univ.Press*, Edinburgh, **7**, (1982), 395.
- [33] Sezik, E., Tümen, G., "Ziziphora taurica subsp. cleonioides'in Uçucu YağıNIN Gaz Kromatografisi İle İncelenmesi", *VIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, İstanbul, (1989).
- [34] Elgin, G., Meral, S.K., Ozturk, B., "Essential Oil Composition and Antioxidant Activity of Endemic *Ziziphora Taurica* subsp. *cleonioides*", *Fitoterapia*, **73/7-8**, (2002) 716.
- [35] Ozturk, S., Ercisli, S., "The Chemical Composition of Essential Oil and in Vitro Antibacterial Activities of Essential Oil and Methanol Extract of *Ziziphora Persica* Bunge", *Journal of Ethnopharmacology*, **106/3**, (2006) 372.
- [36] Ozel, M.Z., Gogus, F., Hamilton, J.F., Lewis, A.C., "Analysis of Volatile Components from *Ziziphora Taurica* Subsp. *Taurica* by Steam Distillation, Superheated-Water Extraction, and Direct Thermal Desorption with Gcxcg-Tof/Ms", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **382/11**, (2005) 115.
- [37] Sezik, E., Tümen, G., Baser, K. H. C., "Ziziphora tenuior L., a New Source of Pulegone", *Flavour and Fragrance Journal*, **6/1**, (2006) 101.
- [38] Baser, K.H.C., Sezik, E., Tümen, G., "Composition of Essential Oil of *Ziziphora Clinopodioides* Lam." *J. Essent. Oil Res.*, **3**, (1991) 191.
- [39] Ozturk, S., Ercisli, S., "Antibacterial Activity and Chemical Constitutions of *Ziziphora clinopodioides*", *Food Control*, **18/5**, (2007) 535.
- [40] Baytop, T., "Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi", 2., *Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul*: (1999), 194.

- [41] Baser, K.H.C., Kurkcuoglu, M., Ozek, T., Tumen, G., Sezik, E., "The Volatile Constituents of *Ziziphora* Species Growing in Turkey", *Doğa-Turkish Journal Of Pharmacy*, **2**, (1992) 7.
- [42] Sezik E., Tümen, G., "Morphological and Anatomical Investigations on the Plant Used as Folk Medicine and Herbal Tea in Turkey Vi. *Ziziphora taurica* Bieb subsp. *cleonioides* (Boiss.) Davis." *Uludag University Journal Faculties of Education*, **3/2**, (1988) 65.
- [43] Öztürk, Y., Aydın, S., Tecik, B., Baser, K.H.C., "Effects of Essential Oils from Certain *Ziziphora* Species on Swimming Performance in Mice", *Phytotherapy Research*, **9(3)**, (2006) 225.
- [44] Elgin, G., Yavaşoğlu, N.Ü.K., Öztürk, B "Antimicrobial Activity of Endemic *Ziziphora taurica* subsp. *cleonioides* (Boiss) P. H. Davis Essential Oil", *Acta Pharmaceutica Scientia*, **48**, (2006) 55.
- [45] Salehi, P., Sonboli, A., Eftekhar, F., Nejad-Ebrahimi, S., Yousefzadi, M., "Pharmacognosy - Essential Oil Composition, Antibacterial and Antioxidant Activity of the Oil and Various Extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp.rigida (Boiss.) Rech. F from Iran", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **10**, (2005) 1892.
- [46] Konyalıoğlu, S., Oztürk, B., Gözde, M., "Comparison of Chemical Compositions and Antioxidant Activities of the Essential Oils of Two *Ziziphora* Taxa from Anatolia", *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)*, **44/2**, (2006) 121.
- [47] Bremer, K., "The Limits of Amino Acid Sequence Data in Angiosperm PhylogeneticReconstruction", *Evolution*, **42/4**, (1988) 795.
- [48] Rossi, W., Corrias, B., Arduino, P., Cianchi, R., Bulluni, L., "Gene variation and gene flow in *Orchis morio* (*Orchidaceae*) from Italy", *Plant Systematics and Evolution*, **79/1-2**, (1992) 43.
- [49] Schlegel, N., Steinbrük, G., hahn, K., Rötter, B., "Interspecific Relationship of Ten European Orchid Species as Revealed by Enzyme Electrophoresis", *Plant Systematics and Evolution*, **163**, (1989) 107.

- [50] Froslev, T.G., Matheny, P.B., Hibbett, D.S., "Lower Level Relationships in the Mushroom Genus *Cortinarius* (Basidiomycota, Agaricales): A Comparison of Rpb1, Rpb2, and Its Phylogenies", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37/2**, (2005) 602.
- [51] Gernandt, D.S., Liston, A., and Pinero, D., "Variation in the Nrdna Its of *Pinus* Subsection *Cembroides*: Implications for Molecular Systematic Studies of Pine Species Complexes", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **21/3**, (2001) 449.
- [52] Liu, J.-Q., Gao, T.-G., Chen, Z.-D., and Lu, A.-M., "Molecular Phylogeny and Biogeography of the Qinghai-Tibet Plateau Endemic *Nannoglottis* (Asteraceae)", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **23/3**, (2002) 307.
- [53] Brauchler, C., Meimberg, H., Abele, T. Heubl, G., "Polyphyly of the Genus *Micromeria* (Lamiaceae)-Evidence from Cpdna Sequence Data", *Taxon*, **54/3**, (2005) 639.
- [54] Markova, S., Dufresne, F., Rees, D.J., Cerny, M., Kotlik, P., "Cryptic Intercontinental Colonization in Water Fleas *Daphnia Pulicaria* Inferred from Phylogenetic Analysis of Mitochondrial DNA Variation", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44/1**, (2007) 42.
- [55] Garda, A.A., Cannatella, D.C., "Phylogeny and Biogeography of Paradoxical Frogs (Anura, Hylidae, Pseudae) Inferred from 12s and 16s Mitochondrial DNA", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44/1**, (2007) 104.
- [56] Lymberakis, P., Poulakakis, N., Manthalou, G., Tsigenopoulos, C.S., Magoulas, A., Mylonas, M., "Mitochondrial Phylogeography of *Rana* (Pelophylax) Populations in the Eastern Mediterranean Region", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44/1**, (2007) 115.
- [57] Small, R.L., Wendel, J.F., "Phylogeny, Duplication, and Intraspecific Variation of Adh Sequences in New World Diploid Cottons (*Gossypium* L., Malvaceae)", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **16/1**, (2000) 73.
- [58] Loo, A.H.B., Dransfield, J., Chase, M.W., Baker, W.J., "Low-Copy Nuclear DNA, Phylogeny and the Evolution of Dichogamy in the Betel Nut Palms and Their Relatives (Arecinae; Arecaceae)", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **39/3**, (2006) 598.

- [59] Oxelman, B., Yoshikawa, N., McConaughy, B.L., Luo, J., Denton, A.L., Hall, B.D., "Rpb2 Gene Phylogeny in Flowering Plants, with Particular Emphasis on Asterids", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32/2**, (2004) 462.
- [60] Angiolillo, A., Mencuccini, M., Baldoni, L., "Olive Genetic Diversity Assessed Using Amplified Fragment Length Polymorphisms", *Theor Appl Genet.*, **98**, (1999) 411.
- [61] Amane, M., Lumaret, R., Hany, V., Ouazzani, N., Debain, C., Vivier, G., Deguilloux, M. F., "Chloroplast-DNA Variation in Cultivated and Wild Olive (*Olea Europaea* L.)", *Theor Appl Genet*, **99**, (1999) 133.
- [62] Re' Mi A. Wattier, A.L.D., Barbara, A. W., Maggs, C.A., "cpDNA-Rflp in *Ceramium* (Rhodophyta): Intraspecific Polymorphism and Species-Level Phylogeny", *American Journal of Botany*, **88/7**, (2001) 1209.
- [63] Motomi Ito, T.Y., King, R. M., Watanabe K., Sanae Oshita, J.Y., Crawford, D.J., "Molecular Phylogeny of Eupatorieae (Asteraceae) Estimated from Cpdna Rflp and Its Implication for the Polyploid Origin Hypothesis of the Tribe", *Journal of Plant Research*, **113**, (2000) 91.
- [64] Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., "DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers", *Nucleic Acids Research*, **18**, (1990) 6531.
- [65] Babalola, O.O., "Molecular Techniques: An Overview of Methods for the Detection of Bacteria", *African Journal of Biotechnology*, **2/12**, (2003) 710.
- [66] Kochieva, E.Z., Khussein, I.A., Legkobit, M.P., Khadeeva, N.V., "The Detection of Genome Polymorphism in *Stachys* Species Using RAPD", *Russian Journal Of Genetics*, **38/5**, (2002) 516.
- [67] Babaoğlu, S., Açıık, L., Çelebi, A., Adıgüzel, N., "Molecular Analysis of Turkish *Alyssum* L. (Brassicaceae) Species by Rapd-PZR and Sds-Page Methods", *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, **17/3**, (2004) 25.
- [68] Pieter Vos, R.H., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., "Aflp: A New Technique for DNA Fingerprinting", *Nucleic Acids Research*, **23/21**, (1995) 4407.

- [69] Money, T., Reader, S., Qu, L.J., Dunford R.P., Moore, G., "Aflp-Based Mrna Fingerprinting", *Nucleic Acids Research*, **24/13**, (1996) 2616.
- [70] Xu, M., Li, X., Korban, S.S., "Aflp-Based Detection of DNA Methylation", *Plant Molecular Biology Reporter*, **18**, (2000) 361.
- [71] Perneel, M., Tambong, J.T., Adiobo, A., Floren, C., Saborio, F., Levesque, A., Hofte, M., "Intraspecific Variability of *Pythium Myriotylum* Isolated from Cocoyam and Other Host Crops", *Mycological Research*, **110/5**, (2006) 583.
- [72] Nishigaki, K., Sakuma, Y., "Introduction of Physicochemical Properties Termed Stickiness and Pseudostickiness to Quantification of Macromolecule-Interaction and Its Application to the Analysis of Lambda Genome DNA", *The Journal of Chemical Software*, **2/2**, (1994) 96.
- [73] Wang G.Z., Miyashita, N.T., Tsunewaki, K., "Plasmon Analyses of Triticum (Wheat) and Aegilops: PZR–Single-Strand Conformational Polymorphism (PZR-Sscp) Analyses of Organellar Dnas", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, (1997) 14570.
- [74] <http://138.23.152.128/protocols/SSCP%20protocol.pdf>, (25.05.2007)
- [75] E. Okogbenin, J.M., M. Fregene, "Development of Ssr Markers for the Cassava Molecular Genetic Map", *Euphytica*, **147**, (2006) 433.
- [76] Gülbitti Onarıcı S. "Protein and DNA in Systematic Biology", *Turkish Journal Of Biology*, **27**, (2003) 47.
- [77] Pearson, T., U'Ren, J.M., Schupp, J.M., Allan, G.J., Foster, P.G., Mayo, M.J., Gal, D., Low Choy, J., Daugherty, R.L., Kachur, S., Friedman, C.L.C., Leadem, B., Georgia, S., Hornstra, H., Vogler, A.J., Wagner, D.M., Keim, P., Currie, B.J., "Vntr Analysis of Selected Outbreaks of *Burkholderia Pseudomallei* in Australia", *Infection, Genetics and Evolution*, **7**, (2007) 416.
- [78] Kartavtsev, Y.P., Jung, S.O., Lee, Y.M., Byeon, H.K., Lee, J.S., "Complete Mitochondrial Genome of the Bullhead Torrent Catfish, *Liobagrus Obesus* (Siluriformes, Amblycipididae): Genome Description and Phylogenetic Considerations Inferred from the Cyt B and 16s Rrna Genes", *Gene*, **396/1**, (2007) 13.
- [79] Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Mondragon-Palomino, M., Procaccio, V., Gaut, B., Wallace, D.C., "Adaptive Selection of Mitochondrial Complex I Subunits During Primate Radiation", *Gene*, **378/11**, (2006) 111.

- [80] Gu, G., Deutch, A.Y., Franklin, J., Levy, S., Wallace, D.C., Zhang, J., "Profiling Genes Related to Mitochondrial Function in Mice Treated with N-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **308/1**, (2003) 197.
- [81] Wallace, D.C., "Mitochondrial Defects in Cardiomyopathy and Neuromuscular Disease", *Am. Heart J.*, **139**, (2000) 70.
- [82] Melov, S., Coskun, P.E., Wallace, D.C., "Mouse Models of Mitochondrial Disease, Oxidative Stress, and Senescence", *Mutation Research/DNA Repair*, **43/3**, (1999) 233.
- [83] Wallace, D.C., "A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine", *Annual Review of Genetics*, **39**, (2005) 359.
- [84] Wallace, D.C., Brown, M.D., Lott, M.T., "Mitochondrial DNA Variation in Human Evolution and Disease", *Gene*, **238/1**, (1999) 211.
- [85] Irwing, D.M., Kocher, T.D., Wilson, A.C., "Evolution of the Cytochrome B Gene of Mammals", *Journal of Molecular Evolution*, **32**, (1991) 128.
- [86] Su, B., Wang, Y.X., Lan, H., Wang, W., Zhang, Y., "Phylogenetic Study of Complete Cytochrome B Genes in Musk Deer (Genus *Moschus*) Using Museum Samples", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **12/3**, (1999) 241.
- [87] Pillay, M., Mazzella, C., "Chloroplast Genome Differences between *Paspalum Dilatatum* Poir and the Related Species *P. Notatum* Flugge", *Theoretical and Applied Genetics*, **95**, (1997) 696.
- [88] Doebley, J., Blanton, W.R., A., "Restriction Site Variation in the *Zea* Chloroplast Genome", *Genetics*, **117**, (1987) 139.
- [89] Lin, T., Lin, Y., and Ishiki, K., "Genetic Diversity of *Dimocarpus Longan* in China Revealed by Aflp Markers and Partial *Rbcl* Gene Sequences", *Scientia Horticulturae*, **103/4**, (2005) 489.
- [90] Olmstead, R.G., Kim, K.-J., Jansen, R.K., and Wagstaff, S.J., "The Phylogeny of the Asteridae Sensu Lato Based on Chloroplast *Ndhf* Gene Sequences", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **16/1**, (2000) 96.

- [91] Zhang, D., Sang, T., "Physical Mapping of Ribosomal Rna Genes in Peonies (Paeonia, Paeoniaceae) by Fluorescent in Situ Hybridization: Implications for Phylogeny and Concerted Evolution", *American Journal of Botany*, **86**, (1999) 735.
- [92] Dhar, M.K., Friebe, B., Kaul, S., Gill, B., "Characterization and Physical Mapping of Ribosomal Rna Gene Families in Plantago", *Annals of Botany*, **97/4**, (2006) 54.
- [93] Sharma, S., Rustgi, S., Balyan, H.S., Gupta, P.K., "Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences of Ribosomal DNA of Wild Barley and Their Comparison With ITS sequences in Common Wheat", *Barley Genetics Newsletter*, **32**, (2000) 38.
- [94] Krishnan, P., Sapra, V.T., Soliman, K.M., Zipf, A., "Fish Mapping of the 5s and 18s-28s Rdna Loci in Different Species of Glycine", *J Hered.*, **92/3**, (2001) 295.
- [95] Beskid, O., Binkova, B., Dusek, Z., Rossner, P., Solansky, I., Kalina, I., Zidzik, J., Popov, T.A., Farmer, P.B., Sram, R.J., "Chromosomal Aberrations by Fluorescence in Situ Hybridization (Fish)--Biomarker of Exposure to Carcinogenic Pahn", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **62/1-2**, (2007) 62.
- [96] Baldwin, B.G., "Phylogenetic Utility of the Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: An Example from the Compositae", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **1/1**, (1992) 3.
- [97] Dayle, E., Saar, N.O.P., Sørensen, P.D., Duvall, M.R., "Angiosperm DNA Contamination by Endophytic Fungi: Detection and Methods of Avoidance", *Plant Molecular Biology Reporter*, **19**, (2001) 249.
- [98] Goel, S., Raina, S.N., Ogihara, Y., "Molecular Evolution and Phylogenetic Implications of Internal Transcribed Spacer Sequences of Nuclear Ribosomal DNA in the Phaseolus-Vigna Complex", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **22/1**, (2002) 1.
- [99] Cerbah, M., Souza-Chies, T., Jubier, M.F., Lejeune, B., Siljak-Yakovlev, S., "Molecular Phylogeny of the Genus Hypochaeris Using Internal Transcribed Spacers of Nuclear Rdna: Inference for Chromosomal Evolution", *Mol. Biol. Evol.*, **15/3**, (1998) 345.
- [100] Lowell, E., Urbatsch, B.G.B., Donoghue, M.J., "Phylogeny of the Coneflowers and Relatives (Heliantheae: Asteraceae) Based on Nuclear Rdna Internal Transcribed Spacer (Its) Sequences and Chloroplast DNA Restriction Site Data", *Systematic Botany*, **25/3**, (2000) 539.

- [101] Meerow, A.W., "Phylogeny of the American Amaryllidaceae", *Systematic Botany*, **25/4**, (2000) 708.
- [102] Barker, N.P., Vanderpoorten, A., Morton, C.M., Rourke, J.P., "Phylogeny, Biogeography, and the Evolution of Life-History Traits in *Leucadendron* (Proteaceae)", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **33/3**, (2004) 845.
- [103] Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., "Age and Rate of Diversification of the Hawaiian Silversword Alliance (Compositae)", *Evolution*, **95**, (1998) 9402.
- [104] Bakker, H.C.D., "An Its Phylogeny of *Leccinum* and an Analysis of the Evolution of Minisatellite-Like Sequences within ITS1", *Mycologia*, **96/1**, (2004) 102.
- [105] Eddie, W.M.M., Gaskin, T.S.J., Haberle, R.C., Jansena, R.K., "Phylogeny of Campanulaceae S. Str. Inferred from Its Sequences of Nuclear Ribosomal DNA", *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **90/ 4**, (2003) 554.
- [106] White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., "*Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics*, *PZR Protocols: A Guide to Methods and Applications*", ed. Innis, M.A., Gelfand D.H., Sninsky, J.J., White T.J., Academic Press, New York, (1990), p.315
- [107] Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., "A Plant DNA Miniprep: Version II", *Plant Molecular Biology Reporter*, **1/4**, (1983) 19.
- [108] http://conferences.computer.org/Bioinformatics/CSB2005/PDF3/14_nakhlehl_parsimony.pdf, (03.07.2007)
- [109] Berry, V., Gascuel, O., Caraux, G., "Choosing the Tree Which Actually Best Explains the Data: Another Look at the Bootstrap in Phylogenetic Reconstruction", *Computational Statistics & Data Analysis*, **32/3-4**, (2000) 273.
- [110] Kress, W.J., Liu, A.Z., Newman, M., Li, Q.J., "The Molecular Phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): A Complex and Polyphyletic Genus of Gingers", *American Journal of Botany*, **92**, (2005) 167.