

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN *Achillea* L. (ASTERACEAE)
TÜRLERİNİN MOLEKÜLER FİLOGENETİK ANALİZİ**

Gizem UZAY

**FARMASÖTİK BOTANİK
ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Turan ARABACI
Yükseklisans Tezi – 2017**

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DE YETİŞEN *Achillea* L. (ASTERACEAE)
TÜRLERİNİN MOLEKÜLER FİLOGENETİK ANALİZİ

Gizem UZAY

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı
Yükseklisans Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Turan ARABACI

Bu Araştırma TÜBİTAK Tarafından
115Z022 Proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA
2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Gizem UZAY**'ın “ **Türkiye’de Yetişen Achillea L. (Asteraceae) Türlerinin Moleküler Filogenetik Analizi**” konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/05/2017



Doç. Dr. Turan ARABACI
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Şemsettin CİVELEK
Fırat Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Birol MUTLU
İnönü Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/..../2017 tarih ve 2017/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖZET | vi |
| ABSTRACT | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | ix |
| TABLolar DİZİNİ | x |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1. Asteraceae Familyası ile İlgili Genel Bilgiler | 3 |
| 2.1.1. Asteraceae Familyasının Betimi | 3 |
| 2.1.2. Asteraceae Familyasının Ülkemizdeki Durumu | 5 |
| 2.2. <i>Achillea</i> Cinsinin Betimi | 5 |
| 2.3. <i>Achillea</i> Cinsinin Ülkemizdeki Durumu | 5 |
| 2.4. <i>Achillea</i> Cinsinin Moleküler Filogenisi ile İlgili Yapılmış Çalışmalar | 8 |
| 3. MATERYAL VE METOT | 9 |
| 3.1. Literatür Taraması | 9 |
| 3.2. Materyal | 9 |
| 3.2.1. <i>Achillea</i> Cinsine Ait Bitki Materyallerinin Temini | 9 |
| 3.2.2. Dış Gruplara Ait Bitki Materyalinin Temini | 13 |
| 3.2.3. Cam ve Plastik Malzeme | 13 |
| 3.2.4. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar | 14 |
| 3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonlarında (PCR) Kullanılan Kimyasallar | 15 |
| 3.2.6. Agaroz Jel Elektforezinde Kullanılan Kimyasallar | 16 |
| 3.3. Metot | 16 |
| 3.3.1. Bitkilerden nrDNA İzolasyonu | 16 |
| 3.3.2. PCR Uygulamaları | 17 |
| 3.3.3. Agaroz Jel Elektforezi | 18 |
| 3.3.4. Dizileme ve Dizilerin Hizalanması | 19 |
| 3.3.5. Filogenetik Analizlerin Yapılması..... | 19 |
| 4. BULGULAR | 20 |

| | |
|---|----|
| 4.1. Bitkilerden nrDNA İzolasyonu Sonucu Elde Edilen Bulgular | 20 |
| 4.2. PCR Uygulamaları Sonucu Elde Edilen Bulgular | 22 |
| 4.3. Filogenetik Analiz | 28 |
| 5. TARTIŞMA | 35 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 42 |
| KAYNAKLAR | 44 |
| EKLER | 48 |
| EK.1. ÖZGEÇMİŞ | 48 |
| EK.2. ITS nrDNA Dizisinin Veri Matrisi..... | 49 |
| EK.3. Etik Kurul Onayı Gerekmediğine Dair Yazı..... | 58 |

TEŐEKKÜR

Bu araştırmanın başlangıcından bitimine kadar her aşamasında çok değerli bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Turan ARABACI'ya,

Çalışma boyunca laboratuvarlarını kullanıma aan Eczacılık Fakóltesinin değerli Öğretim üyelerine,

Bitki moleküler çalışmaları ile ilgili değerli birikimlerini benimle paylaşan Sayın Dr. Serkan KÖSTEKCI'ye,

Çalışma esnasında herbaryumunun imkanlarından yararlanmamı sağlayan INU herbaryumu sorumlusu ile materyal örneği gönderen EGE ve ISTE herbaryumu sorumlularına,

Çalışmaya maddi yönden kaynak sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK-Proje No: 115Z022),

Ayrıca benden desteklerini esirgemeyen değerli AİLEM'e

Teőekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Türkiye'de Yetişen *Achillea* L. (Asteraceae) Türlerinin Moleküler Filogenetik Analizi

Amaç: Bu çalışmanın amacı, Türkiye'de yayılış gösteren *Achillea* L. cinsine ait taksonların çekirdek DNA'sının (nrDNA) ITS bölgelerinin filogenetik bakımdan analiz edilerek, taksonların akrabalık ilişkilerinin belirlenmesidir.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada kullanılan bitki materyalinin büyük bir bölümü İnönü Üniversitesi Herbaryumunda (INU) mevcut herbaryum ve silika-jelde kurutulmuş örneklerden temin edilmiştir. Bununla beraber, yapılan arazi çalışmaları ile de bazı örnekler toplanmıştır. Bitkilerin nrDNA'ları izole edilmiş, ITS bölgeleri ITS5A ve ITS4 primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. ITS bölgelerinin DNA dizileri belirlenmiştir. Elde edilen veriler ile analizler yapılmış ve türlerin filogenetik ilişkilerini gösteren ağaçlar elde edilmiştir.

Bulgular: Bu çalışmada, Türkiye'de yayılış gösteren *Achillea* cinsine ait 49 türe ait 61 örnek çalışılmıştır. Türlerin taksonomisi morfolojik ve moleküler filogenetik açıdan değerlendirilmiştir. *Achillea*'nın cins, seksiyon ve tür düzeyinde taksonomik durumu tartışılmıştır. Cins düzeyinde *A. maritima* (L.) Ehrend.& Y.P.Guo subsp. *maritima* türünün tekrar *Otanthus* cinsi altında *O. maritimus* (L.) Hoffmanns. & Link şeklinde yer alması gerektiği görülmüştür. Seksiyon düzeyinde ülkemiz *Achillea* türlerinin 4 seksiyon (*A. sect. Achillea*, *A. sect. Babounya* (DC.) O. Hoffm., *A. sect. Anthemoideae* (DC.) Heimerl. ve *A. sect. Ptarmica* (Mill.) W. D. J. Koch) altında sınıflandırılması gerektiği saptanmıştır. Tür düzeyinde ise *A. sivasica* Çelik & Akpulat türünün, *A. gypsicola* Hub.-Mor. subsp. *sivasica* (Çelik & Akpulat) Arabacı & G.Uzay *comb. et stat. nova* olarak *A. gypsicola* Hub.-Mor. türünün bir alt türü olarak düzenlenmesi gerektiği belirlenmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak, ülkemizde yayılış gösteren *Achillea* cinsinin 4 seksiyona ait 48 tür ve 54 takson olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Compositae, ITS, nrDNA, revizyon, taksonomi.

ABSTRACT

Molecular Phylogenetic Analysis of *Achillea* L. (Asteraceae) Species Grown in Turkey

Aim: The aim of this study is determine the relationship of the *Achillea* L. taxa distributed in Turkey by phylogenetical analyzing of the ITS regions of the nuclear DNA (nrDNA)

Material and Method: The main plant materials used in this study were obtained from herbarium and silica-gel dried samples deposited in Herbarium of İnönü University (INU). In addition, some examples were collected from the field studies. The nrDNA of the plant specimens were isolated, and amplified ITS regions with ITS5A and ITS4 primers by using PCR. DNA sequences of ITS regions have been determined. The analyzes were made with the obtained data and trees showing phylogenetic relationships of the species were made.

Results: In this study, 61 samples belonging to 49 species of genus *Achillea* growing in Turkey were studied. The taxonomy of species are evaluated in terms of morphology and molecular phylogenetic. The taxonomy of *Achillea* at the genus, section and species level is discussed. In genus level, the species *A. maritima* is replaced under the genus *Otanthus* as *O. maritimus* (L.) Hoffmanns. & Link. The Turkish *Achillea* species should be classified under 4 sections (*A. sect. Achillea*, *A. sect. Babounya* (DC.) O. Hoffm., *A. sect. Anthemoideae* (DC.) Heimerl. and *A. sect. Ptarmica* (Mill.) W. D. J. Koch) at the section level. In species level, the species *A. sivasica* Çelik & Akpulat should be given in subspecies level under *A. gypsicola* Hub.-Mor. as *A. gypsicola* Hub.-Mor. subsp. *sivasica* (Çelik & Akpulat) Arabacı & G.Uzay *comb. et stat. nova*.

Conclusion: As a result, the genus of *Achillea* is represented by 48 species (54 taxa) belonging to 4 sections in Turkey.

Key Words: Compositae, ITS, nrDNA, revision, taxonomy.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BM: Birol Mutlu

BY: Bayram Yıldız

CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide

DNA: Deoksiribonükleik Asit

EGE: Ege Üniversitesi Herbaryumu

INU: İnönü Üniversitesi Herbaryumu

ISTE: İstanbul Üniversitesi Herbaryumu

ITS: Internal Transcribed Spacer

K: Timin veya Guanin

M: Sitozin veya Adenin

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NJ: Neighbor Joining

nrDNA: Nuclear Ribosomal DNA

PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

R: Adenin veya Guanin

S: Guanin veya Sitozin

subsp.: Subspecies

TA: Turan Arabacı

UPGMA: Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average

W: Adenin veya Timin

Y: Sitozin veya Timin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No

Sayfa No

- Şekil 4.1.** *Achillea* taksonlarının nrDNA izolasyonuna ait jel fotoğrafı (M: Marker).
1- *A. hamzaoglui* TA 2954, 2- *A. gypsicola* TA 2221, 3- *A. teretifolia* BY 8035,
4- *A. sivasica* TA 1755, 5- *A. sivasica* TA 2208, 6- *A. aleppica zederbaueri*
TA 2620, 7- *A. aleppica* subsp. *aleppica* TA 1388, 8- *A. millefolium* TA 1429,
9- *A. cappadocica* TA 1567, 10- *A. setaceae* TA 2133, 11- *A. gonioccephala*
TA 2957, 12- *A. coarctata* TA 2671.....20
- Şekil 4.2.** *Achillea* taksonlarının nrDNA izolasyonuna ait jel fotoğrafı (M: Marker).
1- *A. schischkinii* TA 2959a, 2- *A. lycanica* TA 1377, 3- *A. membranacea*
TA 1385, 4- *A. filipendulina* TA 1625, 5- *A. boissieri* TA 2594,
6- *A. cucullata* TA 2083, 7- *A. siehenana* TA 1527,
8- *A. nobilis* subsp. *kurdica* TA 1409, 9- *A. membranacea* TA 2951,
10- *A. brachyphylla* BY 15136, 11- *A. nobilis* subsp. *neilreichii* TA 2129,
12- *A. maritima* subsp. *maritima* EGE 396.....20
- Şekil 4.3.** *Achillea* taksonlarının nrDNA izolasyonuna ait jel fotoğrafı (M: Marker).
1- *A. santolinoides* subsp. *wilhelmsii* TA 2231, 2- *A. magnifica* TA 2958,
3- *A. oligocephala* TA 1635, 4- *A. cretica* BY 15634, 5- *A. clypeolta* TA 1546,
6- *A. tenuifolia* TA 1427, 7- *A. sivasica* TA 2964, 8- *A. ketenoglu* TA 2219,
9- *A. milliana* TA 1600, 10- *A. pseudoallepica* TA 2244,
11- *A. formosa* subsp. *amanica* TA 2253, 12- *A. armenorum* TA 1968.....21
- Şekil 4.4.** *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün nrDNA izolasyonuna
ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *Achillea grandifolia* TA 2254, 2- *A. nobilis*
subsp. *denissima* TA 2062, 3- *A. cretica* BY 15634, 4- *A. falcata* TA 2558,
5- *A. oligocephala* TA 1635, 6- *A. spinulifolia* TA 2189, 7- *A. fraasii* TA 2525,
8- *A. multifida* BM 5003, 9- *A. phrygia* TA 2962, 10- *A. nobilis*
subsp. *syphilea* BY 15750, 11- *Anacyclus clavatus* EGE 24127,
12- *Achillea vermicularis* TA 2559, 13- *A. sipikorensis* TA 2206,
14- *A. kotschyii* subsp. *canescens* TA 2627.....21
- Şekil 4.5.** *Achillea* taksonlarının nrDNA izolasyonuna ait jel fotoğrafı (M: Marker).
1- *A. salicifolia* subsp. *salicifolia* TA 2092, 2- *A. monocephala* TA 1584,

- 3- *A. crithmifolia* TA 1552, 4- *A. sintenisii* TA 2080, 5- *A. biserrata* BY 16676,
6- *A. formosa* subsp. *formosa* TA 2991, 7- *A. sivasica* TA 2208, 8- *A. arabica*
TA 1440, 9- *A. latiloba* TA 1614, 10- *A. pannonica* TA 2131, 11- *A. maritima*
TA 1947, 12- *A. gypsicola* TA 1560.....21
- Şekil 4.6.** *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün nrDNA izolasyonuna ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *Achillea formosa* subsp. *amanica* TA 2253,
2- *A. cretica* BY 15634, 3- *A. multifida* BY 15889, 4- *Anacyclus clavatus*
ISTE 73889.....22
- Şekil 4.7.** *Achillea* taksonlarının ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *A. aleppica* subsp. *aleppica* TA 1388,
2- *A. aleppica zederbaueri* TA 2620, 3- *A. brachyphylla* BY 15136,
4- *A. formosa* subsp. *formosa* TA 2991, 5- *A. hamzaoglu* TA 2954,
6- *A. cappadocica* TA 1567, 7- *A. setaceae* TA 2133, 8- *A. goniocephala*
TA 2957 (K: Kontrol).....22
- Şekil 4.8.** *Achillea* taksonlarının ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *A. latiloba* TA 1614, 2- *A. siehenana* TA 1527,
3- *A. membranacea* TA 2951, 4- *Anacyclus clavatus* EGE 24127, 5- *A. biserrata*
BY 16676, 6- *A. maritima* subsp. *maritima* EGE 396, 7- *A. filipendulina* TA 1625,
8- *A. oligocephala* TA 1635, 9- *A. schischkinii* TA 2959a, 10- *A. nobilis*
subsp. *kurdica* TA 1409, 11- *A. maritima* TA 1947, 12- *A. grandifolia* TA 2254,
13- *A. millefolium* TA 1429 (K: Kontrol).....23
- Şekil 4.9.** *Achillea* taksonlarının ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *A. latiloba* TA 1614, 2- *A. sivasica* TA 1755,
3- *A. nobilis* subsp. *denissima* TA 2062, 4- *A. sivasica* TA 2208, 5- *A. gypsicola*
TA 2221 (K: Kontrol).....23
- Şekil 4.10.** *Achillea* taksonlarının ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *A. nobilis* subsp. *kurdica* TA 1409, 2- *A. maritima*
TA 1947, 3- *A. grandifolia* TA 2254, 4- *A. millefolium* TA 1429, 5- *A. aleppica*
subsp. *aleppica* TA 1388, 6- *A. coarctata* TA 2671, 7- *A. teretifolia* BY 8035,
8- *A. sintenisii* TA 2080, 9- *A. formosa* subsp. *amanica* TA 2253, 10- *A. cretica*
BY 15634, 11- *A. brachyphylla* BY 15136, 12- *A. multifida* BM 5003,
13- *A. siehenana* TA 1527 (K: Kontrol).....23

- Şekil 4.11.** *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *Achillea siehenana* TA 1527, 2- *A. latiloba* TA 1614, 3- *A. siehenana* TA 1527, 4- *A. membranacea* TA 2951, 5- *Anacyclus clavatus* EGE 24127, 6- *A. biserrata* BY 16676, 7- *A. maritima* subsp. *maritima* EGE 396, 8- *A. santolinoides* subsp. *wilhelmsii* TA 2231, 9- *A. oligocephala* TA 1635, 10- *A. schischkinii* TA 2959a (K: Kontrol).....24
- Şekil 4.12.** *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *Achillea sintenisii* TA 2080, 2- *A. biserrata* BY 16676, 3- *Anacyclus clavatus* EGE 24127, 4-5- *A. multifida* BM 5003, 6- *A. formosa* subsp. *amanica* TA 2253, 7- *A. aleppica zederbaueri* TA 2620, 8- *Anacyclus clavatus* EGE 24127 (K: Kontrol).....24
- Şekil 4.13.** *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *Anacyclus clavatus* EGE 24127, 2- *Achillea. cretica* BY 15634, 3- *A. multifida* BM 5003, 4- *Anacyclus clavatus* EGE 24127, 5- *Achillea formosa* subsp. *amanica* TA 2253, 6- *A. cretica* BY 15634 (K: Kontrol).....24
- Şekil 4.14.** *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *Achillea grandifolia* TA 2254, 2- *A. nobilis* subsp. *denissima* TA 2062, 3- *A. cretica* BY 15634, 4- *A. falcata* TA 2558, 5- *A. oligocephala* TA 1635, 6- *A. spinulifolia* TA 2189, 7- *A. fraasii* TA 2525, 8- *A. multifida* BM 5003, 9- *A. phrygia* TA 2962, 10- *A. nobilis* subsp. *sypilea* BY 15750, 11- *Anacyclus clavatus* EGE 24127, 12- *Achillea vermicularis* TA 2559 (K: Kontrol).....25
- Şekil 4.15.** *Achillea* taksonlarının ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *A. sipikorensis* TA 2206, 2- *A. kotschyii* subsp. *canescens* TA 2627, 3- *A. salicifolia* subsp. *salicifolia* TA 2092, 4- *A. monocephala* TA 1584, 5- *A. crithmifolia* TA 1552, 6- *A. sintenisii* TA 2080, 7- *A. biserrata* BY 16676, 8- *A. formosa* subsp. *formosa* TA 2991, 9- *A. sivasica* TA 2208, 10- *A. arabica* TA 1440, 11- *A. latiloba* TA 1614, 12- *A. pannonica* TA 2131 (K: Kontrol Şekil 16'da verilmiştir).....25
- Şekil 4.16.** *Achillea* taksonlarının ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *A. pannonica* TA 2131, 2- *A. maritima* TA 1947, 3- *A. gypsicola* TA 1560, 4- *A. santolinoides* subsp. *wilhelmsii* TA 2231, 5- *A. magnifica* TA 2958, 6- *A. clypeolta* TA 1546, 7- *A. tenuifolia* TA 1427,

- 8- *A. sivasica* TA 2964, 9- *A. ketenoglu* TA 2219, 10- *A. milliana* TA 1600,
 11- *A. pseudoallepica* TA 2244, 12- *A. formosa* subsp. *amanica* TA 2253
 (K: kontrol).....26
- Şekil 4.17.** *Achillea* taksonlarının ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *A. armenorum* TA 1968, 2- *A. schischkinii* TA 2959a, 3- *A. lycaonica* TA 1377, 4- *A. membranacea* TA 1385, 5- *A. filipendulina* TA 1625, 6- *A. boissieri* TA 2594, 7- *A. cucullata* TA 2083, 8- *A. siehenana* TA 1527, 9- *A. nobilis* subsp. *kurdica* TA 1409, 10- *A. membranacea* TA 2951, 11- *A. brachyphylla* BY 15136, 12- *A. nobilis* subsp. *neilreichii* TA 2129 (K: Kontrol Şekil 16’da verilmiştir).....26
- Şekil 4.18.** *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1-3- *Achillea formosa* subsp. *amanica* TA 2253, 4-6- *A. cretica* BY 15634, 7-9- *A. multifida* BM 5003, 10-12- *Anacyclus clavatus* ISTE 73889 (K: Kontrol).....26
- Şekil 4.19.** *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1-2- *Achillea kotschyii* subsp. *kotschyii* TA 1734, 3-4- *A. formosa* subsp. *amanica* TA 2253, 5-6- *A. multifida* BM 5003, 7-8- *Anacyclus clavatus* ISTE 73889 (K: Kontrol).....27
- Şekil 4.20.** *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *Achillea multifida* BM 5003, 2- *Anacyclus clavatus* ISTE 73889, 3-4- *Achillea kotschyii* subsp. *kotschyii* TA 1734 (K: Kontrol).....27
- Şekil 4.21.** *Achillea multifida* ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *Achillea multifida* BM 5003, 2- *Anacyclus clavatus* ISTE 73889 (K: Kontrol).....27
- Şekil 4.22.** *Achillea* cinsinin ülkemizde yayılış gösteren 48 türü ve 7 adet dış grubun ITS bölgesinin Maksimum Parsimoni ile elde edilen Strict Konsensus ağacı (I: sect. *Othantus*, II: sect. *Babounya*, III: sect. *Ptarmica*, IV: *Anthemoideae*, V: sect. *Achillea*).....28
- Şekil 4.23.** *Achillea* cinsinin ülkemizde yayılış gösteren 48 türü ve 7 adet dış grubun ITS bölgelerinin Bootstrap analizi sonucu oluşan ağacı (I: sect. *Othantus*, II: sect. *Babounya*, III: sect. *Ptarmica*, IV: *Anthemoideae*, V: sect. *Achillea*).....29

| | |
|--|----|
| Şekil 4.24. <i>Achillea</i> cinsinin ülkemizde yayılış gösteren 48 türü, 18 yurt dışı türü ve 7 adet dış grubun ITS bölgelerinin Bootstrap analizi sonucu oluşan ağacı (I: sect. <i>Othantus</i> , II: sect. <i>Babounya</i> , III: sect. <i>Ptarmica</i> , IV: <i>Anthemoideae</i> , V: sect. <i>Achillea</i>)..... | 30 |
| Şekil 4.25. <i>Achillea</i> cinsinin ülkemizde yayılış gösteren 48 türü ve 7 adet dış grubun ITS bölgelerinin UPGMA analizi sonucu oluşan ağacı (I: sect. <i>Othantus</i> , II: sect. <i>Babounya</i> , III: sect. <i>Ptarmica</i> , IV: <i>Anthemoideae</i> , V: sect. <i>Achillea</i>)..... | 31 |
| Şekil 4.26. <i>Achillea</i> cinsinin ülkemizde yayılış gösteren 48 türü, 18 yurt dışı türü ve 7 adet dış grubun ITS bölgelerinin UPGMA analizi sonucu oluşan ağacı (I: sect. <i>Othantus</i> , II: sect. <i>Babounya</i> , III: sect. <i>Ptarmica</i> , IV: <i>Anthemoideae</i> , V: sect. <i>Achillea</i>)..... | 32 |
| Şekil 4.27. <i>Achillea</i> cinsinin ülkemizde yayılış gösteren 48 türü ve 7 adet dış grubun ITS bölgelerinin NJ (Neighbor Joining) analizi sonucu oluşan ağacı (I: sect. <i>Othantus</i> , II: sect. <i>Babounya</i> , III: sect. <i>Ptarmica</i> , IV: <i>Anthemoideae</i> , V: sect. <i>Achillea</i>)..... | 33 |
| Şekil 4.28. <i>Achillea</i> cinsinin ülkemizde yayılış gösteren 48 türü, 18 yurt dışı türü ve 7 adet dış grubun ITS bölgelerinin NJ (Neighbor Joining) analizi sonucu oluşan ağacı (I: sect. <i>Othantus</i> , II: sect. <i>Babounya</i> , III: sect. <i>Ptarmica</i> , IV: <i>Anthemoideae</i> , V: sect. <i>Achillea</i>)..... | 34 |
| Şekil 5.1. <i>A. falcata</i> (A) ve <i>A. spinulifolia</i> (B)'nin çiçek durumları..... | 38 |
| Şekil 5.2. <i>A. membranacea</i> (A) ve <i>A. oligocephala</i> (B)'nin kapitulumları..... | 39 |
| Şekil 5.3. <i>A. gypsicola</i> (A), <i>A. sivasica</i> (B) ve <i>A. phrygia</i> (C)'nin kapitulumları..... | 41 |

TABLolar DİZİNİ

| Tablo No | Sayfa No |
|--|----------|
| Tablo 2.1. Türkiye Florası'nda yer alan seksiyonlar ve içerdikleri tür sayıları..... | 7 |
| Tablo 2.2. Ülkemizde yayılış gösteren 50 türün, moleküler veriler sonucu düzenlenen seksiyonlar düzeyindeki dağılımı..... | 7 |
| Tablo 3.1. Tez kapsamında çalışılan taksonlar, toplayıcı numaraları, herbaryum demirbaş numaraları ve lokaliteleri..... | 9 |
| Tablo 3.2. Fenol-Kloroform-İzoamilalkol yönteminde kullanılan kimyasallar..... | 14 |
| Tablo 3.3. Macherey Nagel Kitinde kullanılan solüsyonlar..... | 14 |
| Tablo 3.4. PCR'da (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) kullanılan kimyasallar..... | 15 |
| Tablo 3.5. 2X Master Mix ile kullanılan kimyasallar..... | 15 |
| Tablo 3.6. PCR' de kullanılan ITS Primerlerinin dizilimi..... | 16 |
| Tablo 3.7. ITS Primerleri için kullanılan PCR programı..... | 18 |
| Tablo 5.1. <i>Achillea</i> , <i>Otanthus</i> ve <i>Leucocyclus</i> cinsine ait türlerin seksiyon düzeyindeki dağılımları..... | 36 |
| Tablo 6.1. Türkiye'de yayılış gösteren <i>Achillea</i> seksiyonları ve içerdikleri türler..... | 42 |

1. GİRİŞ

Ülkemiz, yeryüzünde 3 farklı floristik bölgenin hüküm sürdüğü ve o bölgelere ait iklimlerin gözlemlendiği bir yer olması nedeniyle, ılıman iklim kuşağında biyolojik çeşitlilik bakımından en zengin ülkelerden biridir (1). Son yapılan çalışmalara göre ülkemizdeki doğal tür sayısı 9753 olarak kaydedilmiştir (2). Son zamanlarda yayınlanan yeni türlerle bu sayı artmaya devam etmektedir.

Ülkemiz florası ile ilgili yazılmış olan en kapsamlı eser ilk cildi 1965'te basılan ve 1988'de tamamlanan ve eki ile birlikte 10 cilt olan "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" adlı eserdir. (3, 4). Ülkemizde floristik çalışmalar ve botanikçi sayısı yakın dönemde hızla artmıştır ve yoğun olarak yapılan bölgesel floristik çalışmalarla bol miktarda materyal toplanmış ve yeni taksonlar tanımlanmıştır. Türkiye Florası ile ilgili çalışmaların artması sonucu 2000 yılında Türk botanikçiler tarafından ikinci ek cilt (11. cilt) yayınlanmıştır (5). Geçen 15 yılı aşkın bir süre içerisinde pek çok yeni ya da sinonim taksonların yayınlanması ile Türkiye Florası'nın tam listesini oluşturmaya yönelik "Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)" hazırlanmıştır (2). Ülkemiz Florasını bir bütün halinde ortaya koyabilmek için Resimli Türkiye Florası adlı eserin yazılmasına başlanmış ve ilk cildi Güner ve Ekim editörlüğünde yazılmıştır (1). Resimli Türkiye Florası'nın hazırlanması sürecinde ülkemizde yayılış gösteren çok sayıda cinsin revizyonunun tamamlanıp bu eserde yer alması amaçlanmaktadır. Cinslerin yeniden gözden geçirilmesi sırasında sadece morfolojik açıdan değil, karyolojik, kimyasal, palinolojik ve moleküler filogenetik bakımdan da incelenerek cinsin bir bütün halinde ele alınması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu amaçla çok sayıda botanikçi ülkemiz cinslerinin revizyonunu tamamlamak için çalışmalar yapmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda ülkemizin floristik biyoçeşitliliği bir bütün halinde ortaya konulması planlanmaktadır.

Achillea türleri eczacılıkta iştah açıcı, yaralar üzerinde iyileştirici, diüretik, karın ağrısı ve menstrasyon düzenleyici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kozmetik ve parfümeri sanayinde de kullanım alanlarına sahiptir. Yaygın olarak "civanperçemi" ismi ile bilinmesine karşın, değişik yörelerde "akbaşı", "barsamotu", "binbiryaprakotu", "marsamaotu", "kandilçiçeği" ve "baytaran" isimleri ile de bilinirler. *A. millefolium* L. dünya'nın birçok yerinde kültürü yapılan ve bitkisel çay olarak oldukça yaygın kullanılan bir türdür. Çay olarak

içilmesinin yanı sıra merhem, bitki tendürü ya da oturma banyoları şeklinde de kullanılmaktadır. *Achillea*, ekonomik öneme sahip bir cinstir. Bazı türlerinin ticareti yapılmakta, bazıları ise halk arasında kullanılmaktadır (6-9).

Bu tez, ülkemizde yayılış gösteren *Achillea* L. türlerinin kapsamlı revizyonuna önemli bir katkı yapacaktır. Çalışma konusunu oluşturan türlerin mevcut morfolojik özelliklerine moleküler düzeyde yapılacak bu katkı ile türlerin akrabalık derecelerinin belirlenmesinde bir bütünlük sağlanacaktır. *Achillea* ve ona yakın olan cinslerin (*Leucocyclus* ve *Otanthus*) taksonomik durumu aydınlatılmaya çalışılacaktır. Bu tez kapsamında yapılacak moleküler çalışmalar ve mevcut Morfolojik, Palinolojik, Karyolojik ve Kimyasal çalışmalarla birlikte Türkiye'nin *Achillea* türlerinin kapsamlı Revizyonuna önemli bir katkı sağlanacaktır.

Bu tez ile ulaşılması planlanan hedefler şunlardır;

1. *Achillea* cinsinin geleneksel sınıflandırması ile nrDNA'sının ITS bölgelerinin moleküler filogenisini karşılaştırmak,
3. *Leucocyclus* ve *Otanthus* cinslerinin *Achillea* cinsine aktarılıp aktarılmaması durumunu aydınlatmak,
2. Seksiyonlara ait türlerin dağılımlarını belirlemek ve seksiyonların mevcut problemlerini çözmek,
4. Yapılacak bu çalışma ile morfolojik verileri karşılaştırmak ve taksonların statülerinin netleşmesine katkıda bulunmak, morfolojik olarak benzerlik gösteren türlerin taksonomik durumlarını açığa çıkarmak,
5. Edilen bilimsel sonuçları değerlendirerek uluslar arası saygın dergilerde nitelikli yayınlar yapmak temel hedeflerimizdir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Asteraceae Familyası ile İlgili Genel Bilgiler

Asteraceae familyası tek yıllık ya da çok yıllık, otsu, çalimsı ya da odunsu 1911 cins ve 32913 tür ile tohumlu bitkilerin yeryüzündeki en büyük familyasıdır. Familya kozmopolit bir yayılışa sahiptir. Yeryüzünde Antartika hariç hemen hemen her bölgede familyayı temsil eden üyelerine rastlamak mümkündür. Filogenetik olarak Güney Amerika'dan kökenlendiğine dair çalışmalar mevcuttur (10-11).

2.1.1. Asteraceae Familyasının Betimi

Tek yıllık otsu, iki yıllık (monokarpik ya da çok yıllık ve polikarpik ya da bazen monokarpik) ya da çok yıllık, yarı çalimsı, çalimsı ya da nadiren ağaç, ince gövdeli ya da bazen kalın gövdeli, sıklıkla özellikle otsu ya da yarı çalimsı olduğu zaman yumru köklü ya da rizomlu ya da odunsu yumru rizomlu, bazen tırmanıcı, genellikle karasal, nadiren epifitik ya da sucul, bazen sukkulent, genellikle bir veya çok çeşitli tipte salgılı ve salgısız tüylü, çoğunlukla salgılı olanlar iki sıralı ve salgısız olanlar tek sıralı; dokularda şizogen salgı kanallı (reçine kanallı) ve/veya eklemli latisiferler bulunur; nodlar (1-)3-'ten çok lakünlüye kadar. **Yapraklar** alternat veya karşılıklı, nadiren dairesel, genellikle basit ama sıklıkla loblu veya parçalanmış, stipülsüz; stomalar anizositik veya anomositik. Birleşik çiçek durumundan oluşan kapitulumlu (baş), çok az istisna dışında bir veya daha çok sıralı koruyucu brakteler topluluğundan (fillarilerden) oluşan involukrum tarafından çevrelenmiş, kapitulum bazen az çok yapraksız gövdelerin (skapus) ucunda tek fakat genellikle değişik tiplerdeki korimbus şeklinde simöz birleşik bir çiçek durumunda birkaç tane veya daha fazla sayıda, bazen ikinci hatta üçüncü derecede involukrat kapitulum şeklinde birleşik başlar halinde kümelenmişlerdir. Çiçek tablası çiçekçiklerin tümünü ya da bazılarını çevreleyen, kalıcı ya da düşücü damarlı pullu palealı, çiçeklerin tabanını çevreleyen damarsız saçaklardan oluşan saçaksı ya da pula benzer yapıdan oluşmuş, çiçeklerin bağlandığı noktada setalı, tüylü ya da çıplak ve sonradan düz, çok köşeli alancıklı ya da bal peteği gibi çukurcuklu. **Çiçekler** (çiçekçikler) küçük, her kapitulumda 1-500 adet ya da daha çok, sapsız veya kısmen sapsız; ovaryum alt durumlu, 2 (nadiren 3) birleşik karpelli, tek gözlü 1 adet dik bazal ovüllü; ovül anatrop, tenuinucellate, tek integümentli; kaliks bir ya da daha fazla sıralı, (1-)2'den çok sayıya kadar kılçiksı, pulsü, setamsı ya da tüysüpapustan oluşur, homomorfik veya heteromorfik ya da az çok taç şeklinde veya kulakçıklı yapıda ya da tamamen yok, asla yeşil ve otsu değil; korolla (3-)5(-6) birleşik

petalli, az çok düzenli (aktinomorf) ve eşit ya da eşit olmayan (3-)5(-6) loblu ya da dişli, loblar ya da dişler birbirine değer durumda veya indirgenmiş loblarda oluşan ipliksi ya da yok ya da küçük kollu ya da çeşitli şekillerde zigomorf, içte iki loblu dudaklı ve dışta 3 loblu dudaklı bilabiat, içte lobsuz dudaklı ve dışta 4 loblu dudaklı yalancı bilabiat, uç kısımda 5 dişli dilsli ligulat, ya da dışta 0-3(-4) kollu radiate, çiçekçikler ya hepsi birbirine benzer (homomorfik, izomorfik, homogam kapitulum) ve hepsi düzenli (diskoid kapitulum), hepsi ligulat (ligulat kapitulum), ya da hepsi bilabiat, ya da birden fazla tipte (heteromorfik, anizomorfik, heterogam kapitulum), içeride düzenli (disk çiçekçikler ya da nadiren bilabiat) ve tam (iki eşeyli, hermafrodit) ya da fonksiyonel olarak staminat (erkek) ve dışarıda (dilsli çiçek) radiat, sıklıkla pistillat (dişi) ya da bazen steril (nötr), bir ya da çok sıralı (radiat kapitulum), ya da dıştakiler ipliksi pistilli, genellikle çok sayıda sıralı ve içtekiler düzenli, tam ya da fonksiyonel staminat (diskiform kapitulum), nadiren pistillatçiçekçiklerde korolla yok, zaman zaman tüm çiçekçikler pistillat ya da staminat ve bitkiler dioik ya da monoik, nadiren çiçekçikler başka değişik şekillerde düzenlenmiş. Stamenlerfilamentlerle birlikte korolla tüpünün içinde, sayıca korolla loblarına eşit; korolla loblarına bağlı; filamentler genellikle serbest, nadiren birleşik, filamentin üst kısmı genellikle kalınlaşmış çeperli hücreli, parçalı silindirik ya da parmaklık şeklinde anter halkasından oluşmuş; anterler stilusu çevreleyen tüp şeklinde, çok nadiren serbest, iki tekalı, 4 sporangiyumlu ya da nadiren iki sporangiyumlu, iç yüzeyden açılır, boyuna yarıklarla açılır, genellikle ucu apendageli, tabanda yuvarlak, sagitat ya da kuyruklu; polenler çoğunlukla trikolporat, genellikle ekinat (dikenli), bazen ekinolobat, ya da lobat (kabarık çizgili şekilli) ya da spinülat (mikroekinat, dikencikli), sıklıkla kaveat; nektaryum stilusu tabanda saran bir kalınlaşmış pul ya da çanak şeklinde; stilus tek, anter tüpü boyunca uzamış, uç kısmı iç yüzeyinde stigma bölgesini bulunduran 2 (veya nadiren 3) kısıdan uzuna kadar kollara bölünmüş (stilus kolları), stilus kollarının ucu akuttan yuvarlağa kadar, trunkat ya da çeşitli şekillerde apendageli; stigma kuru, papillalı. **Meyve** tek lokuluslu, 1 tohumlu, açılmaz, genellikle sipsela, çok nadir drupa, tepesinde taç şeklinde kalıcı bir papuslu ya da papuslar düşücü veya yok; absisyon izi bir karpodyum tarafından çevrelenmiştir, yüzeyi ile hücre yapısı ve tekstürü farklılık gösterir, 1'den çok sıralıya kadar hücrelerden oluşur, belirsizden çok belirgine kadar, bazen görünüşte yoktur; embriyo dik; endosperm çok az miktarda ve embriyonun etrafında ince bir tabaka şeklindedir (11).

2.1.2. Asteraceae Familyasının Ülkemizdeki Durumu

Asteraceae, ülkemizde yayılış gösteren familyalar arasında en büyüğüdür. Türkiye Florası'nda 133 cins ve 1195 tür ile temsil edilmektedir. Familyanın en büyük cinsleri arasında *Centaurea* L.(180 tür), *Hieracium* L. (103 tür) ve *Cirsium* Mill. (57 tür) gelmektedir. Aynı zamanda, 446 endemik tür ile en çok endemik türe sahip familyadır (3-5). "Türkiye Bitkileri Listesi" adlı eserde familyanın 1365 türe sahip olduğu belirtilmiştir (2).

2.2. *Achillea* Cinsinin Betimi

Çok yıllık otsu ya da yarı çalimsı bitki, kalın ya da ince odunsu rizomlu, rizomlar bazen sürünücü. Gövde dik ya da yükselici, silindirik ya da köşeli, düz, boyuna çizgili ya da derin oluklu. Yapraklar tamdan 3-4 pinnatipartite kadar, alternat. Kapitula heterogam, radiate, saplı ya da sapsızca, küçük ya da orta büyüklükte, genellikle uç kısımda korimbus şeklinde düzenlenmiş, çok nadiren tek, bazen basit şemsiye. İnvolutrum oblong-silindirik, ovoid, yarı küremsi ya da genişçe yarı küremsi. Fillariler 3-4 sıralı, dıştakiler içtekilere göre daha küçük, dar ya da genişçe şeffaf kenarlı. Çiçekler beyaz ya da sarı, bazen pembe; dilsi çiçekler dişi, tek bir daire halinde, laminanın uç kısmı ± loblu; tüpsü çiçekler hermafrodit, düzenli 5-dişli, korolla tüpü ± basık, tabanı akenin tepesini saran bir torba şeklinde. Reseptakulum ± düz ya da konveks, palealı, palea lanseolat ya da oblong, zarsı, paleanın ucuna kadar uzamayan orta damarlı. Aken oblong, oblanseolat ya da oblong-obovat, tüysüz, lineolat, lineat ya da sukrobikulat, sırttan basık, kanatsız, ucu nispeten daha geniş, bazen kalın dudak şeklinde kanatlı, kahverengimsi-beyaz. Papus bulunmaz (8).

2.3. *Achillea* Cinsinin Ülkemizdeki Durumu

Achillea cinsinin dünyada yaklaşık 110-140 türü bulunmaktadır (12). Ülkemizde, Türkiye Florası adlı eserde ve ekinde toplam 42 türü (47 takson) yer almaktadır (13, 14). Son yapılan çalışmalarda 6 tür (*A. sivasica* Çelik & Akpulat, *A. hamzaoglu* Arabacı & Budak, *A. adenii* Aytaç & M.Ekici ve *A. baltai* H.Duman & Aytaç, *A. pannonica* Scheele, *Achillea salicifolia* Besser subsp. *salicifolia*) daha ülkemiz florasına eklenmiştir. *Achillea* ve yakın cinslerle ilgili yapılan moleküler çalışmalar sonucu *Leucocyclus* Boiss. (1 tür, 2 takson) ve *Otanthus* Hoffm. & Link (1 tür) cinsleri de *Achillea* cinsine dahil edilmiştir. Sonuç olarak *Achillea* cinsi ülkemizde 50 tür (56 takson) ile temsil edilmektedir (12, 15-20).

Türkiye Flora'sında *Achillea* cinsi 6 seksiyon altında incelenmiştir. Bu seksiyonlar ve betimleri şöyledir (13):

I. Seksiyon: *Ptarmica* (DC.) W.Koch.

Ligulalar beyaz, (5-)6-25, yapraklar bölünmemiş ya da segmentler ne enine nede kiremit dizilişli.

II. Seksiyon: *Arthrolepis* Boiss.

Ligulalar 8-15, sarı ya da beyaz, 4-12 mm, fillariler tabanda eklemli, sonradan düşücü, yapraklar lineer, pinnatisekt, küçük, enine kiremit dizilişli segmentli.

III. Seksiyon: *Babounya* Boiss.

Kapitula diskoid yada 4-9 sarı ligulalı, yapraklar parçalanmamış, lineer-oblon'dan ovata kadar, tarağa benzer şekilde parçalı testere dişli, dişler nasırlı.

IV. Seksiyon: *Santolinoideae* DC.

Yapraklar çoğunlukla lineer, pinnatisekt, küçük, enine, kiremit dizilişli ya da aralıklı dizilişli, fillariler kalıcı, tabanda eklemli değil.

V. Seksiyon: *Millefolium* (DC.) W.Koch.

Ligulalar 4-6, fildişi-beyaz ya da üst kısımlarında soluk sarı (kısmen *A. nobilis* ve *A. crithmifolia*), yaprak segmentleri ne enine ne de kiremit dizilişli.

VI. Seksiyon: *Filipendulinae* (DC.) Boiss.

Ligulalar (2-)4-6, her iki yüzünde de sarı, yaprak segmentleri ne enine ne de kiremit dizilişli.

Türkiye Florası'nda yer alan seksiyonlar ve içerdikleri tür sayıları Tablo 2.1'de verilmiştir (13, 14).

Tablo 2.1. Türkiye Florası'nda yer alan seksiyonlar ve içerdikleri tür sayıları.

| Seksiyon | Tür sayısı |
|--|------------|
| sect. <i>Ptarmica</i> (DC.) W.Koch. | 3 |
| sect. <i>Arthrolepis</i> Boiss. | 4 |
| sect. <i>Babounya</i> Boiss. | 1 |
| sect. <i>Santolinoidea</i> DC. | 24 |
| sect. <i>Millefolium</i> (DC.) W.Koch. | 7 |
| sect. <i>Filipendulinae</i> (DC.) Boiss. | 5 |
| Toplam | 42 |

Son çalışmalarla birlikte ülkemizde yayılış gösteren 50 türün, moleküler veriler sonucu düzenlenen seksiyonlar düzeyindeki dağılımı Tablo 2.2'de verilmiştir (12, 15-20).

Tablo 2.2. Ülkemizde yayılış gösteren 50 türün, moleküler veriler sonucu düzenlenen seksiyonlar düzeyindeki dağılımı.

| Seksiyon | Tür sayısı |
|---|------------|
| sect. <i>Ptarmica</i> (DC.) W.Koch. (<i>A. salicifolia</i> buraya dahil edilmiştir) | 2 |
| sect. <i>Anthemoideae</i> (DC.) Heimerl (<i>A. fraasii</i> ve <i>A. multifida</i> buraya dahil edilmiştir) | 2 |
| sect. <i>Babounya</i> Boiss. (sect. <i>Arthrolepis</i> , sect. <i>Santolinoidea</i> ile <i>A. adenii</i> , <i>A. baltai</i> , <i>A. hamzaoglui</i> , <i>A. sivasica</i> , ve <i>Leucocyclus formosus</i> buraya dahil edilmiştir) | 32 |
| sect. <i>Achillea</i> (sect. <i>Millefolium</i> (DC.) W.Koch., sect. <i>Filipendulinae</i> (DC.) Boiss. buraya dahil edilmiş, <i>A. millefolium</i> subsp. <i>pannonica</i> tür düzeyine yükseltilmiştir) | 13 |
| sect. <i>Otanthus</i>(Hoffmanns. & Link) Ehrend. & Y.-P.Guo (yeni tanımlanan seksiyon, <i>Otanthus maritimus</i> buraya dahil edilmiştir) | 1 |
| Toplam | 50 |

Türkiye'nin *Achillea* türlerinin morfolojik revizyonu Arabacı tarafından 2006 yılında doktora tezi olarak yapılmıştır (8). Cinsin palinolojik özellikleri Tübitak projesi olarak çalışılmış ve konu ile ilgili yayınlanmış çalışmalar bulunmaktadır (21-23). Bunlara ilaveten 26 taksonun kromozom özellikleri belirlenmiştir (24-28). Cinsin kimyasal özelliklerine ait çok sayıda çalışma da bulunmaktadır (29-33).

2.4. *Achillea* Cinsinin Moleküler Filogenisi ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Cinsin dünyada yayılış gösteren türleri üzerinde son zamanlarda yapılan moleküler çalışmalar sonucunda *Achillea* cinsinin taksonomisi ile ilgili önemli değişiklikler yapılmıştır. *Leucocyclus* ve *Otanthus* cinsleri *Achillea*'ya dahil edilmiş, ayrıca seksiyon düzeyinde önemli düzenlemeler gerçekleştirilmiştir (12, 16, 34-35).

Ehrendorfer ve Guo (2006), *Achillea* altında yeni bir seksiyon düzenlenmiş (sect. *Otanthus* (Hoffmanns. ve Link) Ehrend. ve Y.-P.Guo) ve *Otanthus* cinsinin tek türü *Achillea maritima* (L.) Ehrend. ve Y.-P.Guo olarak burada yer almıştır (12). Yine bu çalışma da *Achillea*'nın *Arthrolepis* Boiss. ve *Santolinoideae* DC. seksiyonları *Babounya* (DC.) O.Hoffm seksiyonu altında birleştirilmiş ve *Leucocyclus* cinsi *Babounya* seksiyonunun altında *Achillea formosa* (Boiss.) Sch.Bip. olarak yer almıştır. Ülkemizde yayılış gösteren *A. fraasii* Sch.Bip. ve *A. multifida* (DC.) Griseb. türleri *A. sect. Anthemoideae* altında verilmiştir. Ayrıca *Achillea*'nın *Filipendulinae* (DC.) Boiss. ve *Millefolium* (DC.) W.Koch. seksiyonları da *Achillea* sect. *Achillea* altında birleştirilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan türlerden 20'si ülkemizde de yayılış göstermektedir (12).

Türkiye'de yayılış gösteren bazı *Achillea* taksonlarının moleküler karakterizasyonu adlı çalışmada 19 tür moleküler olarak çalışılmıştır (36). Diğer Türkiye türleri üzerinde kapsamlı bir moleküler araştırma bulunmamaktadır.

Achillea cinsinin (*Leucocyclus* ve *Otanthus* dahil) Türkiye'de toplam 50 türü (56 takson) vardır. Bu türlerden 26'sı endemiktir. *Santolinoidea* DC. seksiyonunun gen merkezi Anadolu'dur (12, 15-20). Türlerin moleküler analizi cinsin filogenetik sınıflandırması hakkında önemli bir veri oluşturacaktır. Bu türlerin moleküler filogenisinin bu tez kapsamında çalışılması planlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Literatür Taraması

Tezin başlangıç aşamasında konu ile ilgili literatürler basılı ve elektronik veri tabanlarından taranmıştır. Tez süresince en son güncel literatürler elde edilmiş ve tezin gerçekleştirilmesinde bu kaynaklardan faydalanılmıştır. Kaynaklar ilgili kısımlarda verilmiştir.

3.2. Materyal

3.2.1. *Achillea* Cinsine Ait Bitki Materyallerinin Temini

Çalışmalarda kullanılan bitki materyalinin büyük bir bölümü İnönü Üniversitesi Herbaryumunda (INU) mevcut herbaryum ve silika-jelde kurutulmuş örneklerden temin edilmiştir. Bazı örneklerden taze materyal elde edebilmek için arazi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda Şanlıurfa, Sivas, Kahramanmaraş ve Kırşehir illerine tez kapsamında, Antalya iline ise başka bir çalışma kapsamında arazi çalışması yapılmış ve bitkilere ait herbaryum ve silika-jelde kurutulmuş örnekler toplanmıştır. Dış grup olarak çalışılan *Anacyclus clavatus* türüne ait örnekler ise EGE ve ISTE herbaryumlarından, herbaryum materyallerine ait örneklerden temin edilmiştir. Tez kapsamında çalışılan taksonlar, bu taksonların toplayıcı numaraları, herbaryum demirbaş numaraları ve lokaliteleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Tez kapsamında çalışılan taksonlar, toplayıcı numaraları, herbaryum demirbaş numaraları ve lokaliteleri

| No | Takson | Toplayıcı numarası | Demirbaş no | Lokalise |
|----|--|--------------------|-------------|--|
| 1 | <i>Anacyclus clavatus</i> Pers. | - | ISTE 73889 | Balıkesir: Ayvalık, Çıplak Ada, 20m, 27 iv 1997. |
| 2 | <i>Anacyclus clavatus</i> Pers. | - | EGE 24127 | İzmir: Bornova, Ege Üniversitesi kampüsü, viii 1975. |
| 3 | <i>Achillea salicifolia</i> Besser subsp. <i>salicifolia</i> | TA 2092 | INU 5926 | Ardahan-Posof arası, 4. km, Sazara Gölü, su içi ve ıslak alanlar, 1903 m, 11 vii 2005. |
| 4 | <i>A. biserrata</i> M.Bieb. | BY 16676 | INU 5855 | Artvin: Borçka, Maçahel yolu, 29. km, orman açıklığı, 1700 m, 16 ix 2007. |

| | | | | |
|----|--|----------|-----------|---|
| 5 | <i>A. fraasii</i> Sch.Bip. | TD 2525 | INU 10688 | Balikesir: Edremit, Kaz Da., Sarıkız tepe, 1700 m, kalker, 26 vi 2002. |
| 6 | <i>A. multifida</i> (DC.) Griseb. | BM 5003 | INU 9102 | Bursa: Uludağ, Volfram Madeni karşısı, 2100 m, 24 vi 1999. |
| 7 | <i>A. formosa</i> (Boiss.) Sch.Bip. subsp. <i>formosa</i> | TA 2991 | - | Antalya: Alanya-Hadim arası, Gökbel yaylası yol ayrımından sonra 6. km, 1500 m, 22 viii 2015. |
| 8 | <i>A. formosa</i> (Boiss.) Sch.Bip. subsp. <i>amanica</i> (Rech.f.) Ehrender. & Y.P.Guo | TA 2253 | INU 10135 | Osmaniye: Yarpuz-Yağlıpınar arası 7. km, 1400 m, 03 vii 2007. |
| 9 | <i>A. membranacea</i> (Labill.) DC. | TA 1385 | INU 10685 | Şanlıurfa: Birecik, Kelaynak Üretim Çiftliği çevresi, kireçtaşı, 300 m, 06 vi 2002. |
| 10 | <i>A. membranacea</i> (Labill.) DC. | TA 2951 | | Şanlıurfa: Birecik, Kelaynak Üretim Çiftliği çevresi, kireçtaşı, 300 m, 27 v 2015. |
| 11 | <i>A. brachyphylla</i> Boiss.& Hausskn. | BY 15136 | INU 10681 | Şanlıurfa: Viranşehir-Şanlıurfa arası, 43. km, kalker kayalıklar, 600 m, 07 vi 2002. |
| 12 | <i>A. oligocephala</i> DC. | TA 1635 | INU 10762 | Ceylanpınar-Akçakale arası, 22. km, DTÜ Çiftliği, 300 m, 23 iv 2004. |
| 13 | <i>A. sipikorensis</i> Hausskn.& Bornm. | TA 2206 | INU 5841 | Sivas: Alacahan'ın 2 km güneyi, 1600 m, çayırılık alanlar, 04 vi 2007. |
| 14 | <i>A. maritima</i> (L.) Ehrend.& Y.P.Guo subsp. <i>maritima</i> | BM 1947 | INU 4379 | Muğla: Dalaman, kıyı kumulu, 29 iv 1998. |
| 15 | <i>A. maritima</i> (L.) Ehrend.& Y.P.Guo subsp. <i>maritima</i> | | EGE 396 | İzmir: Çeşme, Ilıca plajı, kumullar, <i>Regel.</i> |
| 16 | <i>A. sieheana</i> Stapf | TA 1527 | INU 10700 | Konya: Cihanbeyli, Eslık çevresi, tuz stepi, 900 m, 16 vi 2003. |
| 17 | <i>A. santolinoides</i> Lag. subsp. <i>wilhelmsii</i> (K.Koch) Greuter | TA 2231 | INU 5803 | Kayseri: Kayseri-Pınarbaşı arası, 1500 m, 06 vi 2007. |
| 18 | <i>A. falcata</i> L. | TA 2558 | INU 5825 | Niğde: Bolkar Dağı, Arslanköy, 1850 m, 04 vii 2007. |
| 19 | <i>A. cucullata</i> Bornm. | TA 2083 | INU 9937 | Sivas: Ulaş, Akkaya köyünün 1 km batısı, Tecer yolu, tarla kenarları, 1300 m, 03 vii 2005 |
| 20 | <i>A. vermicularis</i> Trin. | TA 2559 | INU 10133 | Bingöl: Karlıova yolu, Hacılar köyüne 1 km kala, 14 vii 2007. |
| 21 | <i>A. monocephala</i> Boiss.&Balansa | TA 1584 | INU 10168 | Adana: Pozantı, Eski Anahsa Kalesi batısındaki zirve, 1250 m, 04 vii 2003. |
| 22 | <i>A. boissieri</i> Hausskn.ex Boiss. | TA 2594 | INU 9947 | Kahramanmaraş: Elbistan, Kabaktepe-Sarıgüzel arası, 8. km, 1600 m, 08 viii 2007. |
| 23 | <i>A. schischkinii</i> Sosn. | TA 2959a | - | Malatya: Hekimhan-Hasançelebi arası, 1200 m, kalker kayalıklar, 17 vi 2015. |
| 24 | <i>A. lycaonica</i> | TA 1377a | INU 3252 | Antalya: Korkuteli-Fethiye arası, 29. km, |

| | | | | |
|----|--|----------|-----------|---|
| | Boiss.&Heldr. | | | 1300 m, 01 vi 2002. |
| 25 | <i>A. magnifica</i> Heimerl ex Hub.-Mor. | TA 2958 | - | Malatya: Yazıhan-Arguvan yol ayrımı, 790 m, tarla kenarları, 17.vi.2015. |
| 26 | <i>A. tenuifolia</i> Lam. | TA 1427 | INU 9328 | Kars: Digor-Tuzluca arası, 38. km, 1200 m, 09.vi.2002. |
| 27 | <i>A. phrygia</i> Boiss.&Balansa | TA 2962 | - | Sivas: Kangal-Ulaş arası 3-5. km, 1550 m, 17.06.2015. |
| 28 | <i>A. sivasica</i> Çelik & Akpulat | TA 1755 | INU3219 | Sivas: Gürün-Kangal arası Kuşkayası yol ayrımı, marn, 1600 m, 09 vi 2004. |
| 29 | <i>A. sivasica</i> Çelik & Akpulat | TA 2208 | INU 5840 | Sivas: Gürün-Kangal arası Kuşkayası yol ayrımı, marn, 1600 m, 04 vi 2007. |
| 30 | <i>A. sivasica</i> Çelik & Akpulat | TA 2964 | - | Sivas: Gürün-Kangal arası Kuşkayası yol ayrımı, marn, 1600 m, 17.06.2015. |
| 31 | <i>A. gypsicola</i> Hub.- Mor. | TA 1560 | INU 3227 | Çankırı: Çankırı-Kalecik arası, 3.km, jipsli alanlar, 850 m, 20 vi 2003. |
| 32 | <i>A. gypsicola</i> Hub.- Mor. | TA 2221 | INU 5849 | Yozgat: Keskin-Çerikli, 5. km, 1100 m, step, 05 vi 2007. |
| 33 | <i>A. aleppica</i> DC. subsp. <i>aleppica</i> | TA 1388 | INU 5929 | Şanlıurfa-Viranşehir arası, 49. km, Çobanboğazı geçiti, 600 m, kayalıklar 07 vi 2002. |
| 34 | <i>A. aleppica</i> DC.subsp. <i>zederbaueri</i> (Hayek) Hub.-Mor. | TA 2620 | INU 9472 | Niğde: Kayseri-Adana yolu, Avanos yol ayrımı, 950 m, 04 vi 2008. |
| 35 | <i>A. pseudoaleppica</i> Hauskn. ex Hub.- Mor. | TA 2244 | INU 5865 | Erzincan: Arapgir-Kemaliye arası, 30. km, 850 m, Fırat nehri kenarı, kayalıklar, 09 vi 2007. |
| 36 | <i>A. teretifolia</i> Willd. | BY 8035 | INU 5865 | Sivas: Zara, Deredam köyü çevresi, 1400 m, 07 vii 1986. |
| 37 | <i>A. cretica</i> L. | BY 15634 | INU 10147 | Muğla:Datça, Knidos, 0-520 m, 19 vi 2004. |
| 38 | <i>A. armenorum</i> Boiss.& Hauskn. | TA 1968 | INU 10699 | Kahramanmaraş: Göksun, Berit Dağı, Yedigardaşlar, kayalıklar, 2800-3000 m, 24 vii 2004. |
| 39 | <i>A. sintenisii</i> Hub.- Mor. | TA 2080 | INU 10176 | Sivas: Ulaş, Akkaya köyü çevresi, jipsli alanlar, 03 vii 2005. |
| 40 | <i>A. milliana</i> H.Duman | TA 1600 | INU 10144 | C6 Osmaniye: Düziçi, Düldül Dağı, zirve, 2200 m, 28 vii 2003. |
| 41 | <i>A. ketenoglui</i> H.Duman | TA 2219 | INU 5853 | Kırıkkale: Delice, vericinin olduğu tepe, jipsli alanlar, 700-800 m, 05 vi 2007. |
| 42 | <i>A. hamzaoglui</i> Arabacı & Budak | TA 2954 | - | Kırşehir: Kırşehir Mucur arası, Bahçecik yol ayrımından sonra 4. km, kalkerli step, 09 vi 2015. |
| 43 | <i>A. gonioccephala</i> Boiss.& Balansa | TA 2957 | - | Kahramanmaraş: Göksun-Pınarbaşı arası, Keklikoluk yol ayrımı, step, 09 vi 2015. |
| 44 | <i>A. spinulifolia</i> Fenzl ex Boiss. | TA 2189 | - | Niğde: Pozantı-Çiftahan arası, 19. km, 27 v 2006. |
| 45 | <i>A. latiloba</i> Ledeb. | TA 1614 | - | Trabzon:İkizdere-ispir arası, 30. km, Ovidik |

| | | | | |
|----|---|----------|----------|--|
| | | | | Da. , 2200 m, 01 viii2003 |
| 46 | <i>A. grandifolia</i> Friv. | TA 2254 | INU 5801 | Osmaniye: Yarpuz-Yağlıpınar arası 7. km, 1400 m, 03 vii 2007. |
| 47 | <i>A. millefolium</i> L. subsp. <i>millefolium</i> | TA 1429 | INU 5799 | Iğdır: Iğdır-Tuzluca arası, 10. km, 900 m, 13 vi 2002. |
| 48 | <i>A. pannonica</i> Scheele | TA 2131 | - | Kırklareli: Kırklareli-Dereköy arası, 10. km, 200 m, 18 vii 2005. |
| 49 | <i>A. setacea</i> Waldst.&Kit. | TA 2133 | - | Kırklareli: Kırklareli-Dereköy arası, 10. km, 200 m, 18 vii 2005. |
| 50 | <i>A. crithmifolia</i> Waldst.&Kit. | TA 1552 | INU 9966 | Edirne: Pınarhisar-Vize arası, Sergen yol ayrımından sonra 1. km, tarla kenarları, 270 m, 19 vi 2003. |
| 51 | <i>A. kotschy</i> Boiss. subsp. <i>kotschy</i> | TA 1734 | INU 9349 | Kahramanmaraş: Andırın, Çokak-Geben arası 2. km, 29 v 2004. |
| 52 | <i>A. kotschyii</i> Boiss. subsp. <i>canescens</i> Bassler | TA 2627 | - | Isparta: Dedegöl Dağı, Pınargözü mevki üzeri, 1650-1700 m, 05 vi 2008. |
| 53 | <i>A. nobilis</i> L. subsp. <i>neilreichii</i> (A.Kern) Velen. | TA 2129 | INU 4312 | Kırklareli: Kırklareli-Dereköy arası, 10. km, 200 m, 18 vii 2005. |
| 54 | <i>A. nobilis</i> L. subsp. <i>densissima</i> (O.Schwarz ex Bassler | TA 2062 | INU 5904 | Denizli/Muğla:Çal Dağı, Fethiye-Çameli arası, 35. km, Kırkpınar mevki, serpantin, 1600 m, 13 vii 2005. |
| 55 | <i>A. nobilis</i> L. subsp. <i>sipylea</i> (O.Schwarz) Bassler | BY 15750 | INU 5906 | Manisa: Sipil Dağı, Aatalanı mevki, <i>Pinus nigra</i> orman açıklıkları, 1200 m, 5 vii 2004. |
| 56 | <i>A. nobilis</i> L. subsp. <i>kurdica</i> Hub.-Mor. | TA 1409 | INU 5925 | Hakkari: Yüksekova Şemdinli arası, 31. km, step, 1700 m, 09 vi 2002. |
| 57 | <i>A. filipendulina</i> Lam. | TA 1625 | INU 3245 | Muş: Güloymak-Muş arası, 2. km, tarla kenarları, 1600 m, 02 viii 2003. |
| 58 | <i>A. clypeolata</i> Sibth.&Sm. | TA 1546 | INU 3230 | Kırklareli-Dereköy arası, 21.km, orman açıklıkları, 480 m, 19 vi 2003. |
| 59 | <i>A. coarctata</i> Poir. | TA 2671 | INU 9677 | Erzurum: İspir-İkizdere arası, 10 km, 1600 m, 27 vi 2008. |
| 60 | <i>A. arabica</i> Kotschy | TA 1440 | INU 5800 | Malatya: Malatya-Darendede arası, 35. km, 950 m, 17 vi 2002. |
| 61 | <i>A. cappadocica</i> Hauskn.&Bornm. | TA 1567 | INU 3211 | Karaman: Gülnar-Ermenek arası, Bereketliköyü çevresi, 1100 m, 03 vii 2003. |

Yaptığımız laboratuvar çalışmalarında *Anacyclus clavatus* türünün nrDNA'sı başarılı bir şekilde izole edilmesine rağmen, bu DNA'nın ITS bölgesi PCR ile elde edilememiş, elde edilen ürünlerden de başarılı bir dizileme elde edilememiştir. Bununla birlikte çalışılan

Achillea türlerinden *A. multifida* türü ile *A. kotschyii* subsp. *kotschyii* taksonundan da benzer şekilde net başarılı diziler elde edilememiştir. Bu üç taksondan *Anacyclus clavatus* ve *Achillea multifida* türüne ait diziler Gen Bankasından (NCBI) temin edilerek filogenetik analizlere dahil edilmiştir. *A. kotschyii* türünün ise diğer alt türü subsp. *canescens* taksonundan gen dizilimi başarılı bir şekilde elde edildiği için bu türü temsilen *canescens* alt türü kullanılmış ve sonuçların eksiksiz olarak elde edilmesi sağlanmıştır.

Filogenetik ağaçlar oluşturulken, ülkemizde yayılış göstermeyen 18 yurtdışı *Achillea* türü de analizlere dahil edilmiştir. Bu türlere ait gen dizileri Gen Bankasından (NCBI) temin edilmiştir. Bu türler: *Achillea impatiens* L., *A. pyrenaica* Sibth. ex Godr., *A. abrotanoides* (Vis.) Vis., *A. erbarotta* All., *A. moschata* Wulfen, *A. ligustica* All., *A. nana* L., *A. pindicola* Hausskn. subsp. *integrifolia* (Halácsy) R. Franzén, *A. schurii* Sch. Bip., *A. ceretanica* Sennen, *A. wilsoniana* (Heimerl) Heimerl ex Hand.-Mazz., *A. asiatica* Serg., *A. atrata* L., *A. oxyloba* (DC.) Sch. Bip., *A. clusiana* Tausch, *A. clavennae* L., *A. fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip. ve *A. pseudoaleppica* Hausskn. ex Hub.-Mor'dır.

3.2.2. Dış Gruplara Ait Bitki Materyalinin Temini

Filogenetik analizlerde dış grup olarak *Achillea* cinsine en yakın cinslere ait 7 farklı takson kullanılmıştır. Bu taksonlar *Chamaemelum nobile* All., *Santolina oblongifolia* Boiss., *Chrysanthemum lavandulifolium* Makino var. *lavandulifolium*, *Leucanthemum vulgare* Lam. *Anacyclus clavatus* Pers., *Anthemis arvensis* L. ve *Tanacetum millefolium* Aitch.'dur. Bu dış grupların dizileri Gen Bankasından (NCBI) alınmıştır. Ayrıca Ülkemizde yayılışı olmayan 18 *Achillea* türüne ait diziler de gen bankasından alınarak ağaçlar oluşturulmuş ve sonuçları tartışılmıştır.

3.2.3. Cam ve Plastik Malzeme

Tez çalışmalarında kullanılan pipet uçları, mikropipetler, ependorf tüpleri, PCR tüpleri, çözeltiler, cam malzemeler ve ısıya dayanıklı diğer malzemeler 121 °C de 20 dakika süreyle 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

3.2.4. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmalarında bitki materyallerinin bir kısmının çekirdek DNA'sı (nrDNA) Fenol- Kloroform-İzoamilalkol yöntemiyle izole edilmiştir (37). Bu yöntemde kullanılan kimyasallar Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo3.2.Fenol-Kloroform-İzoamilalkol yönteminde kullanılan kimyasallar

| Solüsyonlar | Kompozisyonu |
|-------------------------------|---|
| Ekstraksiyon tamponu (1L) | 33,6 gr. Üre, 0,5 M EDTA (pH: 8), 1 M. Tris-HCl (pH:8), 5 M NaCl%10 SDS |
| Fenol/Kloroform/İzoamil alkol | 25 : 24 : 1 |
| NaAc | 3 M pH : 5,2 |
| İzopropil alkol | %100 |
| TE | 10mM |
| RNaz A | 10 mg/mL |
| EtOH | % 70, % 99 |

Bitki materyallerinin büyük çoğunluğunun nrDNA'sıMachereyNagel Kiti (Ref:740770.50) ile izole edilmiştir. Bu kitte yer alan CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) metodu kullanılmıştır. Kitte yer alan solüsyonlar Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo3.3.Macherey Nagel Kitinde kullanılan solüsyonlar

| Solüsyonlar | Miktarı (50 örnek için) |
|---|-------------------------|
| Lysis Buffer PL1 | 25 ml |
| Precipitation Buffer PL3 | 5 ml |
| Binding Buffer PC | 30 ml |
| Wash Buffer PW1 | 30 ml |
| Wash Buffer PW2 | 25 ml |
| Elution BufferPE | 15 ml |
| RNase A | 6 mg |
| Nucleo Spin Filters (violetrings) | 50 adet |
| Nucleo Spin Plant II Columns (greenrings) | 50 adet |
| Collection Tubes (2ml) | 100 adet |

3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonlarında (PCR) Kullanılan Kimyasallar

İzolasyon sonucu elde edilen nrDNA'nın PCR'da çoğaltılması için kullanılan kimyasallar Tablo 3.4'de verilmiştir. Ayrıca PCR kiti olarak 2X Master Mix (One Taq 2X Master Mix with Standart Buffer 100rxn/50 µl) kullanılmıştır. Bu kit ile yapılan çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve miktarı Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3.4. PCR'da (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) kullanılan kimyasallar

| Kimyasal Adı | Miktarı | Konsantrasyon |
|-------------------|---------|---------------|
| Buffer | 2.5 µl | 10 X |
| MgCl ₂ | 1.5 µl | 25 mM |
| DMSO | 2.5 µl | - |
| ITS4 | 2.5 µl | 1 pmol / ml |
| ITS5A | 2.5 µl | 1 pmol / ml |
| dNTP | 0.4 µl | 10 mM |
| Taq DNA Polimeraz | 0.3 µl | 5 ünite |
| nrDNA | 2 µl | |
| dH ₂ O | 10.8 µl | |
| Toplam | 25 µl | |

Tablo 3.5. 2X Master Mix ile kullanılan kimyasallar

| Kimyasal Adı | Miktarı | Konsantrasyon |
|-------------------|---------|---------------|
| Buffer | 12.5 µl | 1 X |
| ITS4 | 0.5 µl | 1 pmol / ml |
| ITS5A | 0.5 µl | 1 pmol / ml |
| nrDNA | 2 µl | |
| dH ₂ O | 9.5 µl | |
| Toplam | 25 µl | |

ITS bölgelerinin PCR amplifikasyonu için daha önce başarılı sonuçlar vermiş primerlerden ITS5A (Forward) ve ITS4 (Reverse) kullanılmıştır (38). Bu Primerlere ait diziler Tablo 3.6 da verilmiştir.

Tablo 3.6. PCR’ de kullanılan ITS Primerlerinin dizilimi

| Kullanılan Primerler | Nükleotid dizisi | Erime sıcaklığı Tm (°C) | Uzunluk (bp) |
|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| ITS5A | 5’ - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3’ | 62 | 22 |
| ITS4 | 5’ - TCCTCCGCTTATTGATATGC -3’ | 58 | 20 |

3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Kimyasallar

Agaroz jel hazırlanmasında 0.5X TBE, 1µl Etidyum Bromür ve %0,8’lik Agaroz kullanılmıştır.

3.3. Metot

3.3.1. Bitkilerden nrDNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda Fenol-Kloroform-İzoamilalkol protokolü veya Macherey Nagel Kit protokolü uygulanmıştır. Her iki protokolde de toz halindeki bitki materyalleri kullanılmıştır. Bunun için, slika jel içerisinde bulunan yada herbaryum materyaline ait bitkilerin yapraklarından 20-100 mg alınarak sıvı azotla havanda toz haline getirilmiştir.

Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Protokolü: Bitki örnekleri havandan ependorf tüplere aktararak üzerine 600 µl izolasyon tamponu eklenip vorteks ile karıştırılmıştır. Tüpe 500 µL fenol kloroform-izoamil alkol eklenmiş, 5 dakika alt-üst edildikten sonra 5dk 12000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Tüpteki süpernatant alınarak temiz bir tüpe aktarılmıştır. Süpernatant hacminin %10’u kadar (50 µl) 3M NaAc (pH: 5.2) eklenmiş ve alt-üst edilmiştir. Süpernatant hacmi kadar (500 µl civarında) izopropanol eklenmiş ve bu işlem sonucunda DNA çıplak gözle görülmüştür. DNA 2 dk 12000 rpm’de santrifüj yapılarak çöktürülmüş ve DNA pelletinin oluşması sağlanmıştır. Üst kısımdaki çözelti mikro pipetle çekilerek atılmıştır. Oluşan pellete 500 µL TE (10mM, pH: 8) eklenmiş, pellete dokunmadan pipetaj yaparak pelletin çözülmesi sağlanmıştır. 5 µl RNaz A (10mg/ml) pipetaj yapılarak eklenmiş ve

RNase A'nın homojen dağılması için tüp alt-üst edilmiştir. 30 dk 37°C'de inkübasyon yapılarak RNA'nın uzaklaştırılması sağlanmıştır. 50 µl NaAc (3M) eklenip alt üst edilmiştir. Daha sonra 1 ml %90'lık ETOH eklenip alt üst edilmiştir. -80°C'de 10 dk bekletildikten sonra 10 dk 13000 rpm'de santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlanmıştır. Üstteki süpernatant uzaklaştırılmış, altta kalan pellet %70' lik ETOH ile pipetaj yapılarak yıkanmıştır. 2 dk 12000 rpm'de santrifüj edilindikten sonra oluşan çökeltiden etanol dikkatlice uzaklaştırıldıktan ve 20-30 sn 12000 rpm'de tekrar santrifüj yapılmıştır. Ependorf tüpler kâğıt üzerine yan yatırılarak etanol kalıntılarının uçması sağlanmıştır. Oluşan nrDNA çökeltisi, 50 µl TE veya 200 µl saf su eklenerek pellet kayboluncaya kadar çözülmüş ve DNA kullanıma hazır hale getirilmiştir (37).

Macherey Nagel Kit Protokolü: Toz halindeki bitki materyali tüpe aktarılmış ve üzerine 400 µl Buffer PL1 eklenip vorteksle karıştırılmıştır. Üzerine 10 µl RNase A solüsyonu eklenmiş ve örnek iyice karıştırıldıktan sonra 65°C de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Karışım NükleoSpinfilter (mor halka) tüpe eklenmiş, 2dk 11,000xg de santrifüj edildikten sonra içindeki filtre atılmış ve dipte kalan kısma 450 µl Buffer PC eklenerek 5 kez aşağı yukarı pipetlenip iyice karışması sağlanmıştır. Elde edilen karışımdan 700 µl alınıp NükleoSpinPlant II Column'a (yeşil halka) eklenmiştir. Nükleo SpinPlant II Column'u sırasıyla; 11,000xg de 1 dk santrifüj edilmiş ve dip kısmı dökülmüş, üzerine 400µl Buffer PW1 eklenip 11,000xg de 1 dk santrifüj edilmiş ve dip kısmı dökülmüş, üzerine 700µl BufferPW2 eklenip 11,000xg de 1 dk santrifüj edilmiş ve dip kısmı dökülmüştür. Washbuffer'ı uzaklaştırmak ve tamamen kuru bir silika membranı elde etmek için NükleoSpinPlant II Columna 200µl Buffer PW2 eklenip. 11,000xg de 2 dk santrifüj edilmiş ve dip kısmı dökülmüştür. NükleoSpinPlant II Column filtresi 1.5 ml'lik yeni bir ependorf mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve fitrenin üzerine 50µl Buffer PE eklenerek 5 dk 65°C derecede inkübe edilmiştir. DNA'nın filtreden tamamen kurtulması için tüp 1 dk 11,000xg de santrifüj edilmiştir. Daha sonra fitrenin üzerine tekrar 50µl Buffer PE eklenerek 5 dk 65°C derecede inkübe edilmiş ve tüp 1 dk 11,000xg de santrifüj edilmiştir. Sonuçta 100 µl nrDNA içeren solüsyon elde edilmiştir. Bu solüsyon bir sonraki çalışmaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.3.2. PCR Uygulamaları

İzolasyon sonucu elde edilen nrDNA'nın PCR'da çoğaltılması için iki farklı yöntem takip edilmiştir. Birinci yöntemde Tablo 2.4'de verilen kimyasallar ve primerler, tabloda

verildiği miktar ve sıra ile 200 µl'lik PCR tüplerine eklenmiştir. İkinci yöntemde ise Tablo 2.5'de verilen kimyasallar ve primerler, tabloda verildiği miktar ve sıra ile 200 µl'lik PCR tüplerine eklenmiştir. Her iki yöntemde de çalışma ortamı olarak buz kullanılmıştır. Kontaminasyon olup olmadığını kontrol edebilmek için, her uygulamada nrDNA içermeyen negatif kontroller hazırlanmıştır. PCR sonucu çoğalma gözlenmeyen örnekler için tekrar yapılmıştır. Bu tekrarlar sırasında kullanılan nrDNA miktarı değiştirilmiş ve her defasında toplam solüsyon dH₂O ile 25 µl'ye tamamlanmıştır. PCR sonucu elde edilen ürünler dizileme aşamasına kadar 4°C'de saklanmıştır (38). ITS Primerleri için kullanılan PCR programı Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo3.7. ITS Primerleri için kullanılan PCR programı

| Basamak | Sıcaklık | Zaman | Döngü Sayısı |
|----------------------|----------|------------------------|--------------|
| Ön Denatürasyon | 94°C | 5dk | 1 döngü |
| Denatürasyon | 94°C | 30sn | 35 döngü |
| Bağlanma (Annealing) | 51°C | 45sn | |
| Uzama (Extension) | 72°C | 1dk | |
| Son Uzama | 72°C | 10dk | 1 döngü |
| Bekleme | 4°C | cihazdan alınana kadar | |

3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

İzolasyon ve PCR sonucunda oluşan bantları gözlemlemek amacıyla %0,8'lik agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Bunun için 20X TBE stok çözeltisi seyreltilerek 0.5X TBE hazırlanmıştır. Daha sonra 0,8 gr agaroz 100 ml 0.5X TBE tamponu içinde, hotplate ile kaynatılarak çözülmüş, karışım 50°C'ye kadar soğutulmuş, içerisine 1µl Etidyum Bromür boyası ilave edilmiştir. Elde edilen karışım, tarakları önceden yerleştirilmiş jel kasetine dökülmüş ve polimerleşmesi ve donması için 15 dk beklenmiştir. Jel polimerleştikten sonra kasetten taraklar çekilerek çıkartılmış, hazırlanan jel elektroferez tankına yerleştirilip üzerine jelin üzerini örtecek kadar 0.5X TBE tamponu ilave edilmiştir.

Her bir kuyucuğa 3 µl PCR ürünü ve 3 µl yükleme boyası (6X DNA loadingdye) olmak üzere toplam 6 µl karışım pipet yardımıyla yüklenmiştir. İlk kuyucuğa Marker, son kuyucuğa da kontrol ürünü konmuştur. Örnekler 120 voltta 30 dk yürütüldükten sonra jel görüntüleme cihazına konmuş ve bilgisayarda görüntüsü gözlemlenmiştir (39).

3.3.4. Dizileme ve Dizilerin Hizalanması

PCR uygulamalarında uygun bant elde edilen ITS bölgelerinin DNA dizilemeleri hizmet alımı şeklinde Genoks firmasında Sanger yöntemi ile yapılmıştır. Her bir örneğe ait DNA dizisi hem ileri (forward) hem de geri (revers) primerleriyle çift yönlü olarak okutulmuştur.

Dizileme sonuçları Bioedit programında hizalanarak düzenlenmiş, DNA dizilerinin kirlilik düzeyine bakılarak istenilen saflık düzeyinde olan diziler işlenmiştir (40). İstenilen düzeyde elde edilemeyen diziler ise tekrar PCR'da çoğaltılarak dizileme işlemi tekrarlanmıştır. Öncelikle örneklere ait ileri ve geri diziler birleştirilerek kontigler oluşturulmuştur. Bu kontigler dizilere ait kromatogramlarla karşılaştırılmış, piklerin temizliğine bakılıp gerekli düzeltmeler elle yapılmıştır.

Dizilerin hizalanması için yine Bioedit programı kullanılmıştır. Bu programda yer alan ClustalW komutu ile hizalama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Taksonlara ait bu diziler yayın aşamasında gen bankasına yüklenerek kodları alınacaktır.

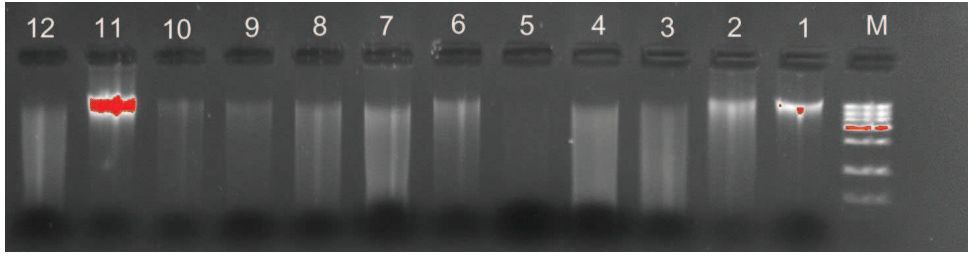
3.3.5. Filogenetik Analizlerin Yapılması

Bioedit programında hizalaması ve düzenlenmesi yapılan diziler nexus formatına getirildikten sonra PAUP 4.0a146 programı kullanılarak filogenetik analizler yürütülmüştür (40-41). Bu çalışma sonucu elde edilen dizilerden filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Analizlerde karakter temelli yöntemlerden parsimoni kriteri kullanılarak Maksimum Parsimoni ve Bootstrap analizi, mesafe temelli yöntemlerden UPGMA ve NJ analizleri yapılmıştır.

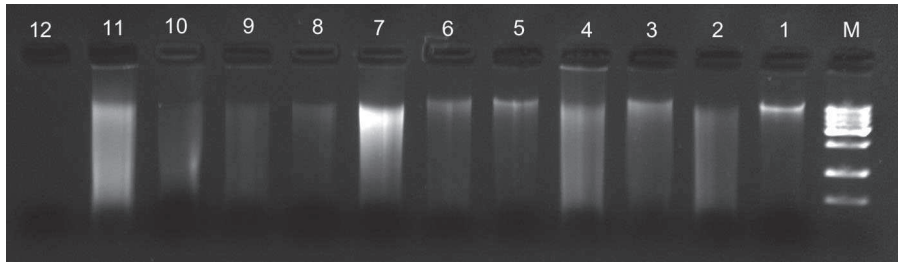
4. BULGULAR

4.1. Bitkilerden nrDNA İzolasyonu Sonucu Elde Edilen Bulgular

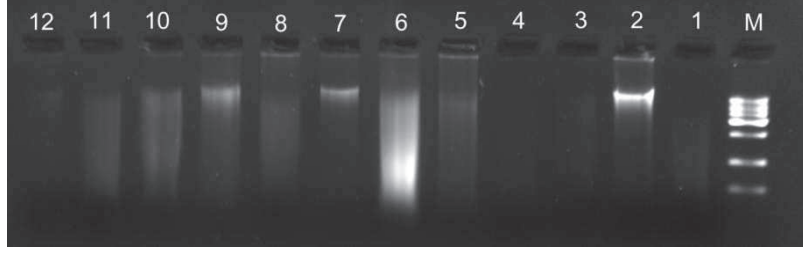
nrDNA izolasyonunda Fenol- Kloroform-İzoamilalkol yöntemi ve Macherey Nagel Kiti kullanılmıştır. Kullanılan bu iki yöntemde en iyi DNA izolasyonu Macherey Nagel Kitinde yer alan CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) metodu ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyon ürünü solüsyonlarda DNA'nın varlığını belirleyebilmek için Agaroz Jel Elektroforezi yapılmış ve elde edilen sonuçlar görüntülenmiştir. Çalışılan taksonlarının nrDNA izolasyonuna ait jel fotoğrafı Şekil 4.1-6'da verilmiştir.



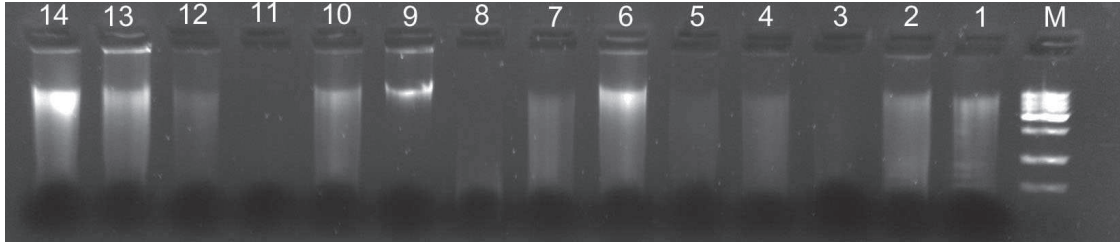
Şekil 4.1. *Achillea* taksonlarının nrDNA izolasyonuna ait jel fotoğrafı(M: Marker).1- *A. hamzaoglu* TA 2954, 2- *A. gypsicola* TA 2221, 3- *A. teretifolia* BY 8035, 4- *A. sivasica* TA 1755, 5- *A. sivasica* TA 2208, 6- *A. aleppica zederbaueri* TA 2620, 7- *A. aleppica* subsp. *aleppica* TA 1388, 8- *A. millefolium* TA 1429, 9- *A. cappadocica* TA 1567, 10- *A. setaceae* TA 2133, 11- *A. goniocephala* TA 2957, 12- *A. coarctata* TA 2671.



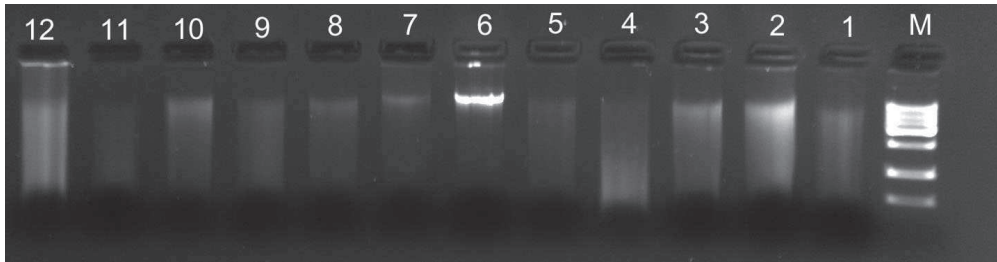
Şekil 4.2. *Achillea* taksonlarının nrDNA izolasyonuna ait jel fotoğrafı (M: Marker).1- *A. schischkinii* TA 2959a, 2- *A. lycaonica* TA 1377, 3- *A. membranacea* TA 1385, 4- *A. filipendulina* TA 1625, 5- *A. boissieri* TA 2594, 6- *A. cucullata* TA 2083, 7- *A. siehenana* TA 1527, 8- *A. nobilis* subsp. *kurdica* TA 1409, 9- *A. membranacea* TA 2951, 10- *A. brachyphylla* BY 15136, 11- *A. nobilis* subsp. *neilreichii* TA 2129, 12- *A. maritima* subsp. *maritima* EGE 396.



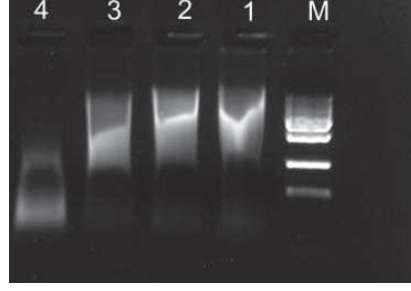
Şekil 4.3. *Achillea* taksonlarının nrDNA izolasyonuna ait jel fotoğrafı (M: Marker).1- *A. santolinoides* subsp. *wilhelmsii* TA 2231, 2- *A. magnifica* TA 2958, 3- *A. oligocephala* TA 1635, 4- *A. cretica* BY 15634, 5- *A. clypeolta* TA 1546, 6- *A. tenuifolia* TA 1427, 7- *A. sivasica* TA 2964, 8- *A. ketenoglui* TA 2219, 9- *A. milliana* TA 1600, 10- *A. pseudoallepica* TA 2244, 11- *A. formosa* subsp. *amanica* TA 2253, 12- *A. armenorum* TA 1968.



Şekil 4.4. *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün nrDNA izolasyonuna ait jel fotoğrafı (M: Marker).1- *Achillea grandifolia* TA 2254, 2- *A. nobilis* subsp. *denissima* TA 2062, 3- *A. cretica* BY 15634, 4- *A. falcata* TA 2558, 5- *A. oligocephala* TA 1635, 6- *A. spinulifolia* TA 2189, 7- *A. fraasii* TA 2525, 8- *A. multifida* BM 5003, 9- *A. phrygia* TA 2962, 10- *A. nobilis* subsp. *syplea* BY 15750, 11- *Anacyclus clavatus* EGE 24127, 12- *Achillea vermicularis* TA 2559, 13- *A. sipikorensis* TA 2206, 14- *A. kotschyii* subsp. *canescens* TA 2627.



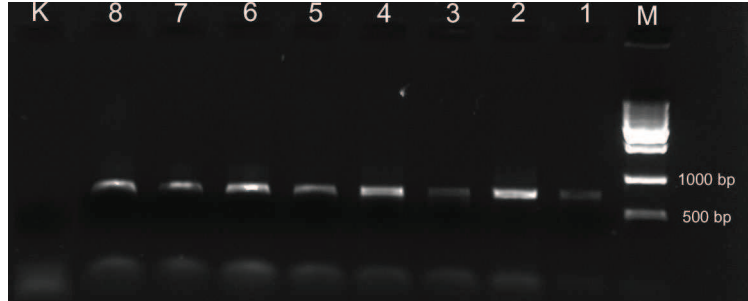
Şekil 4.5. *Achillea* taksonlarının nrDNA izolasyonuna ait jel fotoğrafı (M: Marker).1- *A. salicifolia* subsp. *salicifolia* TA 2092, 2- *A. monocephala* TA 1584, 3- *A. crithmifolia* TA 1552, 4- *A. sintenisii* TA 2080, 5- *A. biserrata* BY 16676, 6- *A. formosa* subsp. *formosa* TA 2991, 7- *A. sivasica* TA 2208, 8- *A. arabica* TA 1440, 9- *A. latiloba* TA 1614, 10- *A. pannonica* TA 2131, 11- *A. maritima* TA 1947, 12- *A. gypsicola* TA 1560.



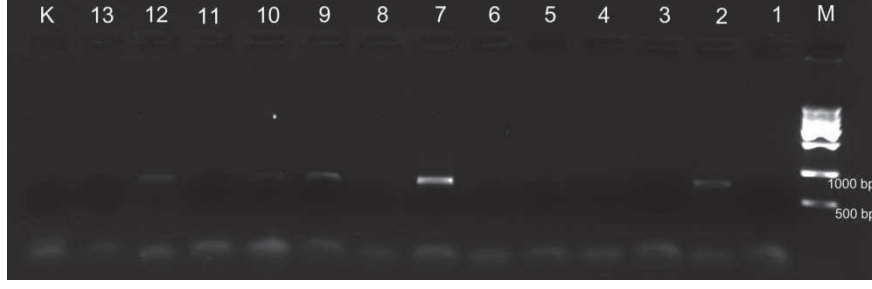
Şekil 4.6. *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün nrDNA izolasyonuna ait jel fotoğrafı (M: Marker).1- *Achillea formosa* subsp. *amanica* TA 2253, 2- *A. cretica* BY 15634, 3- *A. multifida* BY 15889, 4- *Anacyclus clavatus* ISTE 73889.

4.2. PCR Uygulamaları Sonucu Elde Edilen Bulgular

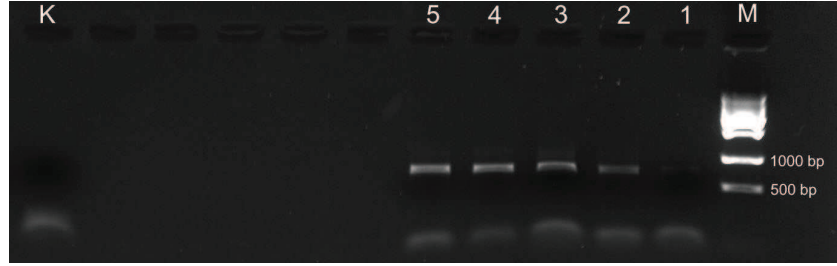
İzolasyon sonucu elde edilen nrDNA'nın PCR amplifikasyonu ile ITS bölgeleri çoğaltılmıştır. Bant elde edilemeyen örnekler tekrardan PCR amplifikasyonuna tabi tutulmuştur. Her tekrar aşamasında nrDNA miktarı değiştirilerek en uygun bant elde edilmeye çalışılmıştır. Elde edilen bant görüntüleri Şekil 4.7-21'de verimiştir.



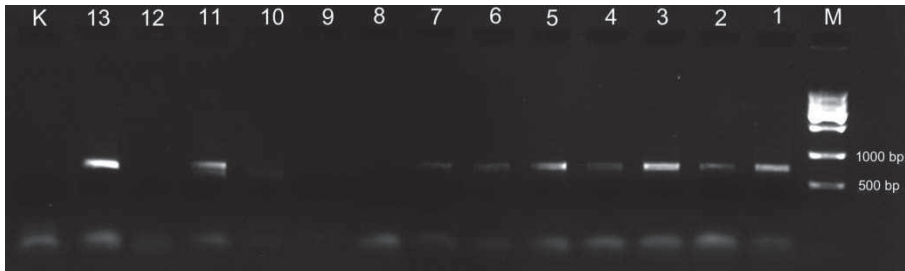
Şekil 4.7. *Achillea* taksonlarının ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *Achillea aleppica* subsp. *aleppica* TA 1388, 2- *A. aleppica zederbaueri* TA 2620, 3- *A. brachyphylla* BY 15136, 4- *A. formosa* subsp. *formosa* TA 2991, 5- *A. hamzaoglui* TA 2954, 6- *A. cappadocica* TA 1567, 7- *A. setaceae* TA 2133, 8- *A. goniocephala* TA 2957 (K: Kontrol).



Şekil 4.8. *Achillea* taksonlarının ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *A. latiloba* TA 1614, 2- *A. siehenana* TA 1527, 3- *A. membranacea* TA 2951, 4- *Anacyclus clavatus* EGE 24127, 5- *A. biserrata* BY 16676, 6- *A. maritima* subsp. *maritima* EGE 396, 7- *A. filipendulina* TA 1625, 8- *A. oligocephala* TA 1635, 9- *A. schischkinii* TA 2959a, 10- *A. nobilis* subsp. *kurdica* TA 1409, 11- *A. maritima* TA 1947, 12- *A. grandifolia* TA 2254, 13- *A. millefolium* TA 1429 (K: Kontrol).



Şekil 4.9. *Achillea* taksonlarının ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *A. latiloba* TA 1614, 2- *A. sivasica* TA 1755, 3- *A. nobilis* subsp. *denissima* TA 2062, 4- *A. sivasica* TA 2208, 5- *A. gypsicola* TA 2221 (K: Kontrol).



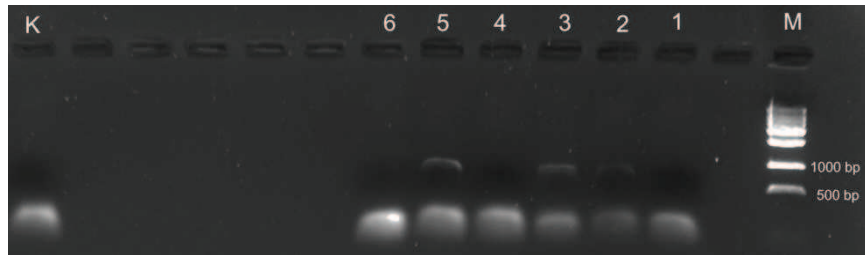
Şekil 4.10. *Achillea* taksonlarının ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *A. nobilis* subsp. *kurdica* TA 1409, 2- *A. maritima* TA 1947, 3- *A. grandifolia* TA 2254, 4- *A. millefolium* TA 1429, 5- *A. aleppica* subsp. *aleppica* TA 1388, 6- *A. coarctata* TA 2671, 7- *A. teretifolia* BY 8035, 8- *A. sintenisii* TA 2080, 9- *A. formosa* subsp. *amanica* TA 2253, 10- *A. cretica* BY 15634, 11- *A. brachyphylla* BY 15136, 12- *A. multifida* BM 5003, 13- *A. siehenana* TA 1527 (K: Kontrol).



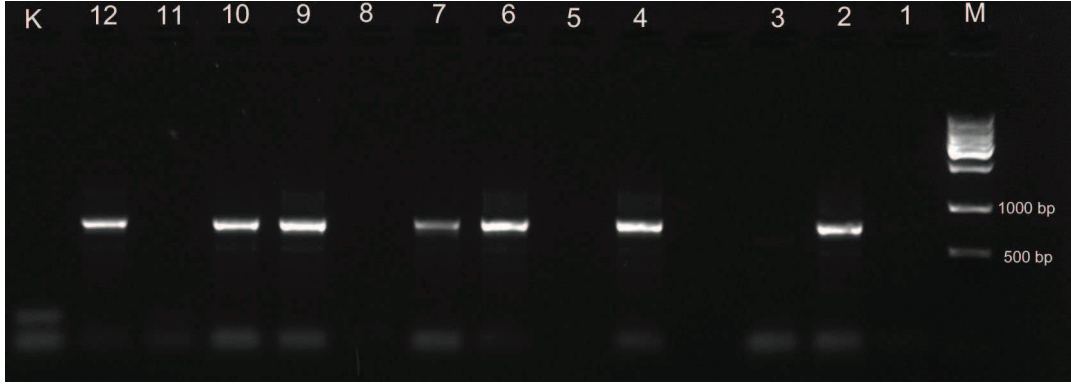
Şekil 4.11. *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *Achillea siehenana* TA 1527, 2- *A. latiloba* TA 1614, 3- *A. siehenana* TA 1527, 4- *A. membranacea* TA 2951, 5- *Anacyclus clavatus* EGE 24127, 6- *A. biserrata* BY 16676, 7- *A. maritima* subsp. *maritima* EGE 396, 8- *A. santolinoides* subsp. *wilhelmsii* TA 2231, 9- *A. oligocephala* TA 1635, 10- *A. schischkinii* TA 2959a (K: Kontrol).



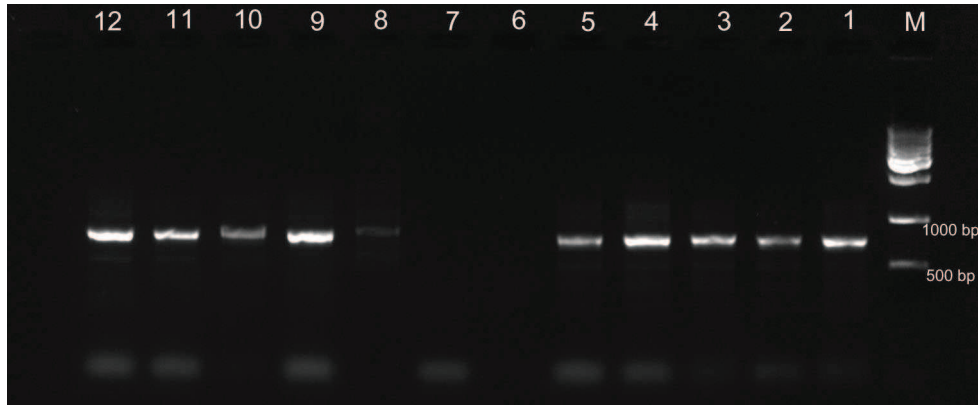
Şekil 4.12. *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *Achillea sintensisii* TA 2080, 2- *A. biserrata* BY 16676, 3- *Anacyclus clavatus* EGE 24127, 4-5- *A. multifida* BM 5003, 6- *A. formosa* subsp. *amanica* TA 2253, 7- *A. aleppica zederbaueri* TA 2620, 8- *Anacyclus clavatus* EGE 24127 (K: Kontrol).



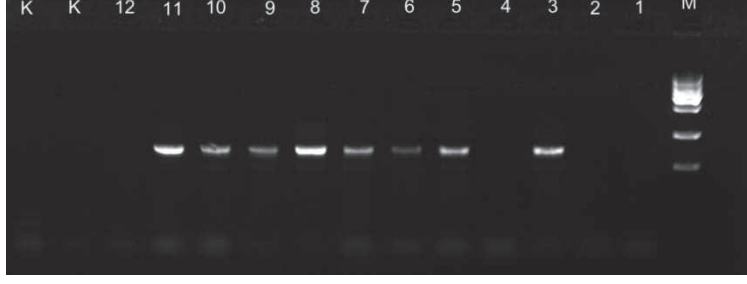
Şekil 4.13. *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *Anacyclus clavatus* EGE 24127, 2- *Achillea cretica* BY 15634, 3- *A. multifida* BM 5003, 4- *Anacyclus clavatus* EGE 24127, 5- *Achillea formosa* subsp. *amanica* TA 2253, 6- *A. cretica* BY 15634 (K: Kontrol).



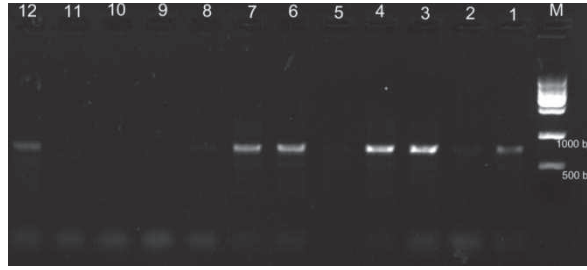
Şekil 4.14. *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *Achillea grandifolia* TA 2254, 2- *A. nobilis* subsp. *denissima* TA 2062, 3- *A. cretica* BY 15634, 4- *A. falcata* TA 2558, 5- *A. oligocephala* TA 1635, 6- *A. spinulifolia* TA 2189, 7- *A. fraasii* TA 2525, 8- *A. multifida* BM 5003, 9- *A. phyrigia* TA 2962, 10- *A. nobilis* subsp. *sypilea* BY 15750, 11- *Anacyclus clavatus* EGE 24127, 12- *Achillea vermicularis* TA 2559 (K: Kontrol).



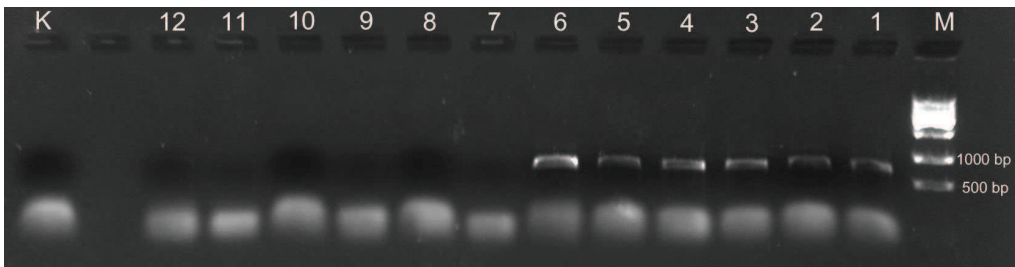
Şekil 4.15. *Achillea* taksonlarının ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *A. sipikorensis* TA 2206, 2- *A. kotschyii* subsp. *canescens* TA 2627, 3- *A. salicifolia* subsp. *salicifolia* TA 2092, 4- *A. monocephala* TA 1584, 5- *A. crithmifolia* TA 1552, 6- *A. sintenisii* TA 2080, 7- *A. biserrata* BY 16676, 8- *A. formosa* subsp. *formosa* TA 2991, 9- *A. sivasica* TA 2208, 10- *A. arabica* TA 1440, 11- *A. latiloba* TA 1614, 12- *A. pannonica* TA 2131 (K: Kontrol Şekil 16'da verilmiştir).



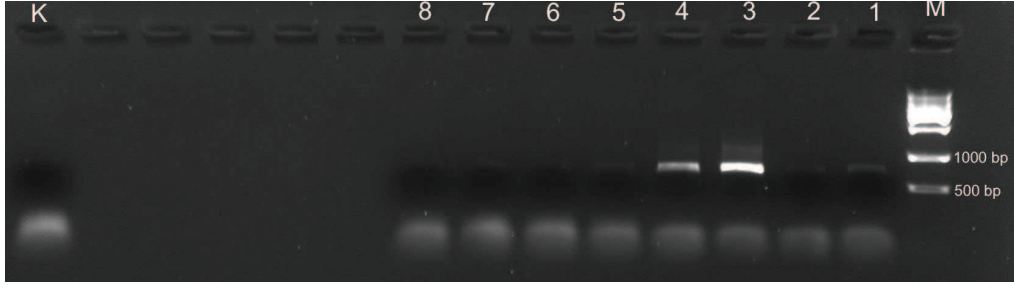
Şekil 4.16. *Achillea* taksonlarının ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *A. pannonica* TA 2131, 2- *A. maritima* TA 1947, 3- *A. gypsicola* TA 1560, 4- *A. santolinoides* subsp. *wilhelmsii* TA 2231, 5- *A. magnifica* TA 2958, 6- *A. clypeolta* TA 1546, 7- *A. tenuifolia* TA 1427, 8- *A. sivasica* TA 2964, 9- *A. ketenoglui* TA 2219, 10- *A. milliana* TA 1600, 11- *A. pseudoallepica* TA 2244, 12- *A. formosa* subsp. *amanica* TA 2253 (K: Kontrol).



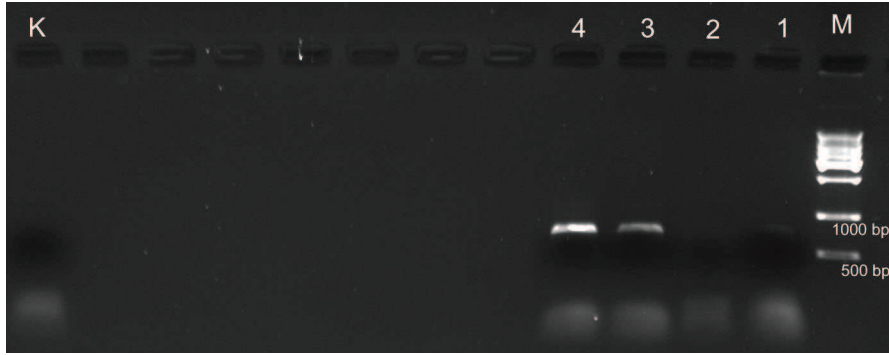
Şekil 4.17. *Achillea* taksonlarının ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *A. armenorum* TA 1968, 2- *A. schischkinii* TA 2959a, 3- *A. lycaonica* TA 1377, 4- *A. membranacea* TA 1385, 5- *A. filipendulina* TA 1625, 6- *A. boissieri* TA 2594, 7- *A. cucullata* TA 2083, 8- *A. siehenana* TA 1527, 9- *A. nobilis* subsp. *kurdica* TA 1409, 10- *A. membranacea* TA 2951, 11- *A. brachyphylla* BY 15136, 12- *A. nobilis* subsp. *neilreichii* TA 2129 (K: Kontrol Şekil 16'da verilmiştir).



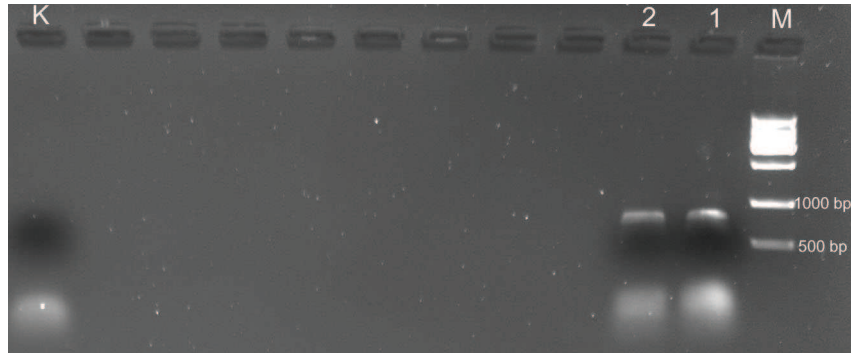
Şekil 4.18. *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1-3- *Achillea formosa* subsp. *amanica* TA 2253, 4-6- *A. cretica* BY 15634, 7-9- *A. multifida* BM 5003, 10-12- *Anacyclus clavatus* ISTE 73889 (K: Kontrol).



Şekil 4.19. *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1-2- *Achillea kotschyii* subsp. *kotschyii* TA 1734, 3-4- *A. formosa* subsp. *amanica* TA 2253, 5-6- *A. multifida* BM 5003, 7-8- *Anacyclus clavatus* ISTE 73889 (K: Kontrol).



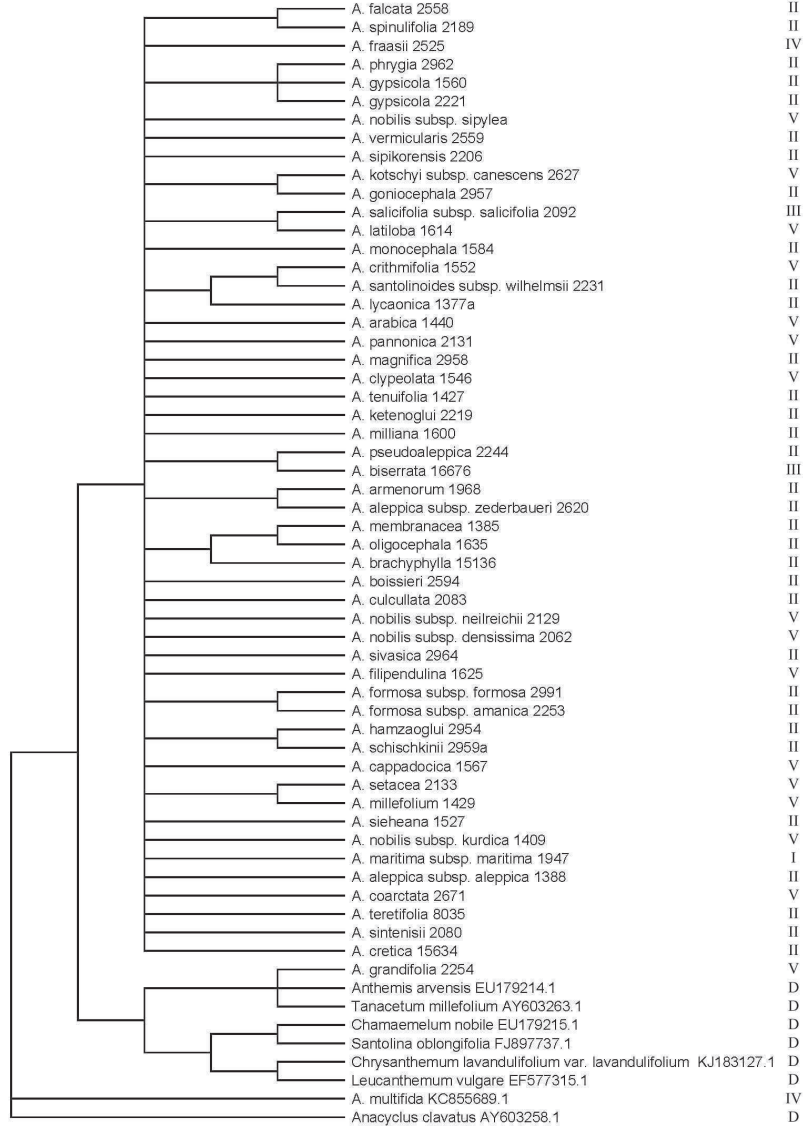
Şekil 4.20. *Achillea* taksonlarının ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *Achillea multifida* BM 5003, 2- *Anacyclus clavatus* ISTE 73889, 3-4- *Achillea kotschyii* subsp. *kotschyii* TA 1734 (K: Kontrol).



Şekil 4.21. *Achillea multifida* ve *Anacyclus clavatus* türünün ITS Primerleriyle yapılan PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı (M: Marker). 1- *Achillea multifida* BM 5003, 2- *Anacyclus clavatus* ISTE 73889 (K: Kontrol).

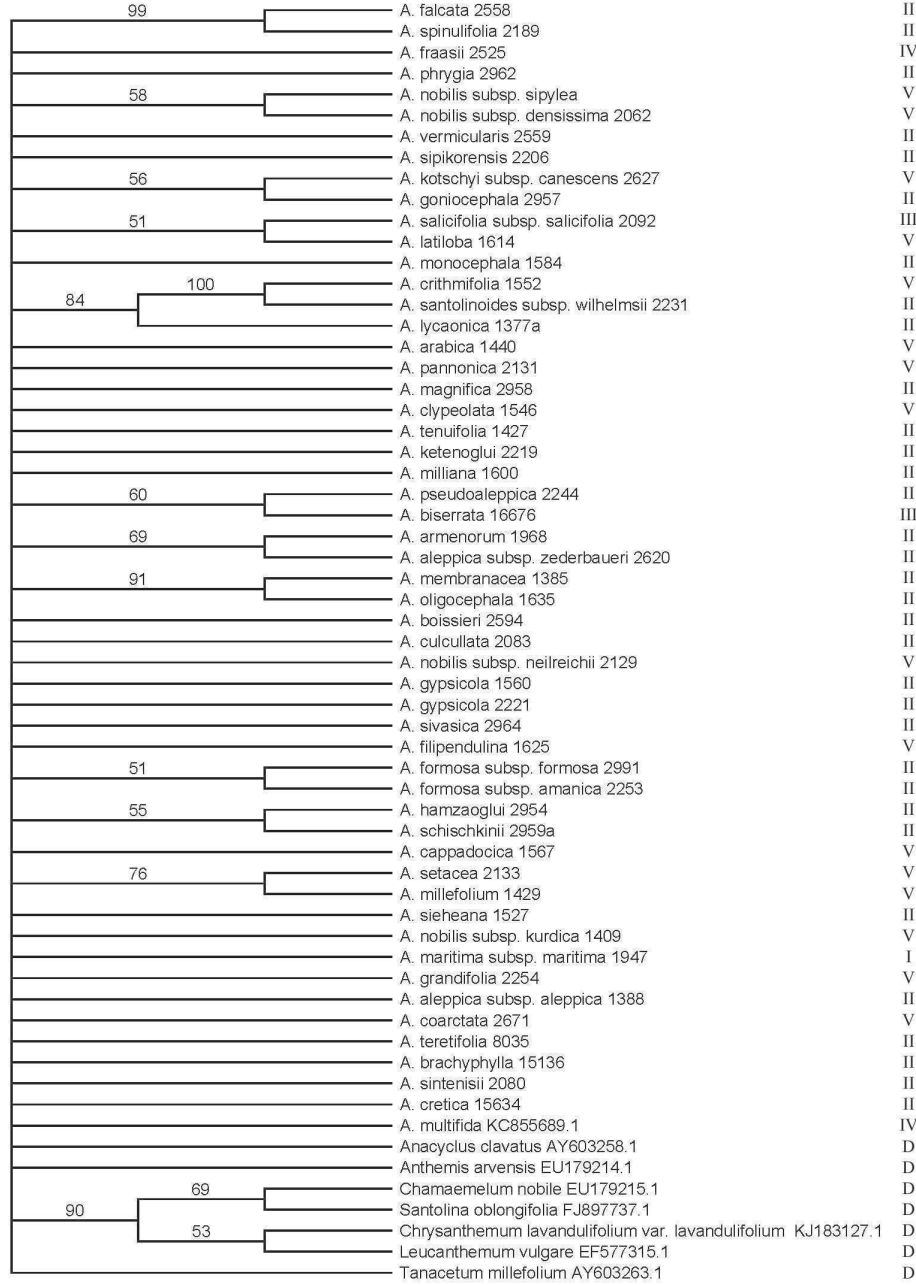
4.3. Filogenetik Analiz

Karakter temelli yöntemlerden Maksimum Parsimoni kriteri kullanılarak ortak uyumluluk (consensus) ağaçlarından strict consensus ağacı oluşturulmuştur (Şekil 4.22). Bu ağaç oluşturulurken 531 karakter incelenmiş ve bunlardan 363'sü sabit, 86'sının parsimonik açıdan önemli olmayan, 82'sinin ise parsimonik açıdan önemli değişken karakterler olduğu tespit edilmiştir.



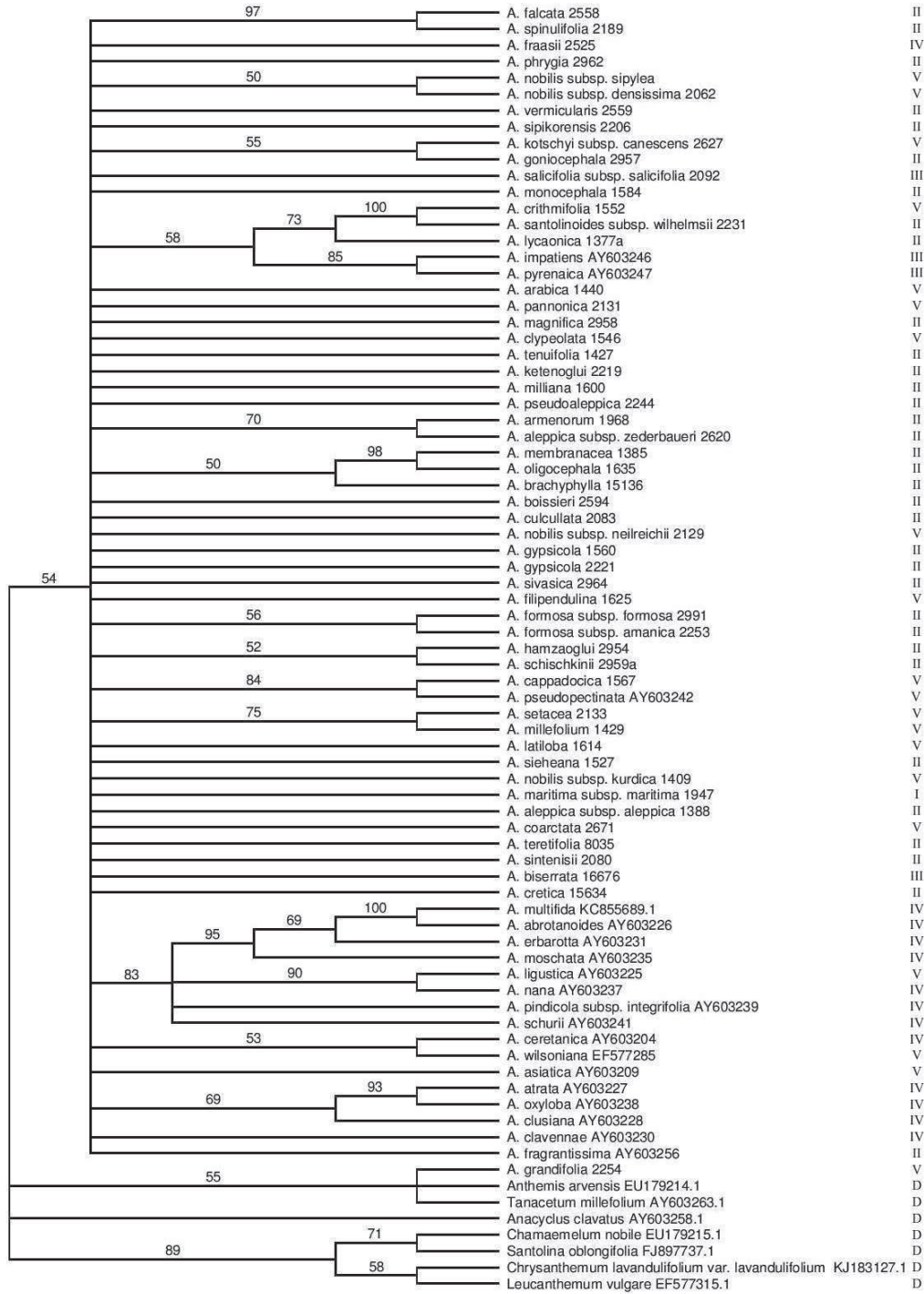
Şekil 4.22. *Achillea* cinsinin ülkemizde yayılış gösteren 48 türü ve 7 adet dış grubun ITS bölgesinin Maksimum Parsimoni ile elde edilen Strict Konsensus ağacı (I: sect. *Othantus*, II: sect. *Babounya*, III: sect. *Ptarmica*, IV: *Anthemoideae*, V: sect. *Achillea*).

Parsimoni kriteri kullanılarak Bootstrap analizi yapılmıştır. *Achillea* ve dış grup olarak 7 cinse ait ITS bölgelerinin bootstrap analizi sonucu oluşan ağacı Şekil 4.23’de verilmiştir. Bu ağaç, maksimum ağaç sayısı 1000 ve 100 tekrar yapılarak elde edilmiştir.



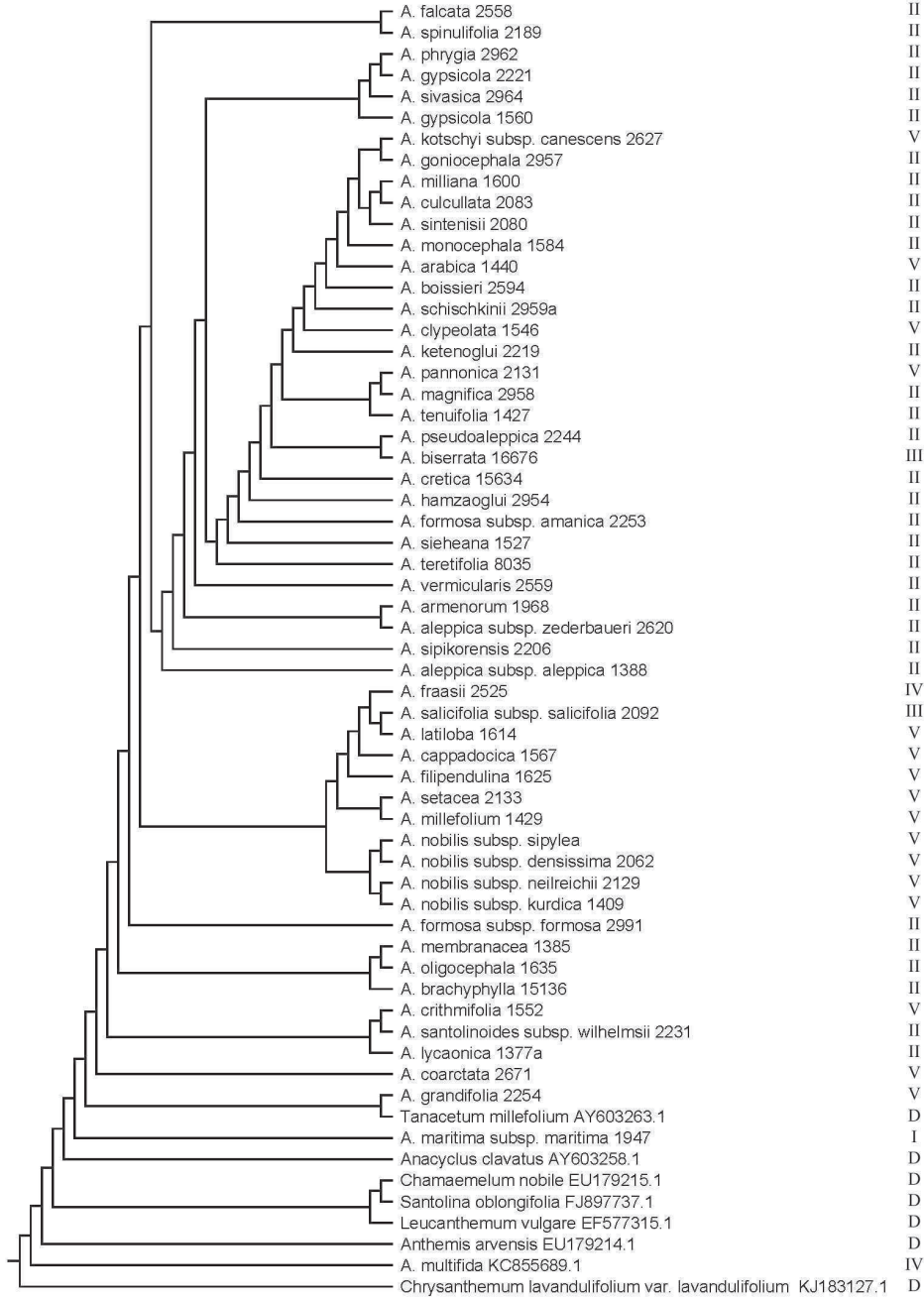
Şekil 4.23. *Achillea* cinsinin ülkemizde yayılış gösteren 48 türü ve 7 adet dış grubun ITS bölgelerinin Bootstrap analizi sonucu oluşan ağacı (I: sect. *Othantus*, II: sect. *Babounya*, III: sect. *Ptarmica*, IV: *Anthemoideae*, V: sect. *Achillea*).

Bazı yurt dışı *Achillea* türlerinin de dahil edildiği Bootstrap analizi sonucu oluşan ağacı Şekil 4.24’de verilmiştir. Bu ağaçta Ülkemizde yayılışı olmayan 18 *Achillea* türü yer almaktadır.



Şekil 4.24. *Achillea* cinsinin ülkemizde yayılış gösteren 48 türü, 18 yurt dışı türü ve 7 adet dış grubun ITS bölgelerinin Bootstrap analizi sonucu oluşan ağacı (I: sect. *Othantus*, II: sect. *Babounya*, III: sect. *Ptarmica*, IV: *Anthemoideae*, V: sect. *Achillea*).

Parsimoni analizine ek olarak mesafe temelli yöntemlerden UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) ve NJ (Neighbor Joining) analizleri yapılmıştır. UPGMA analizi sonucu elde edilen ağaç Şekil 4.25’de verilmiştir.



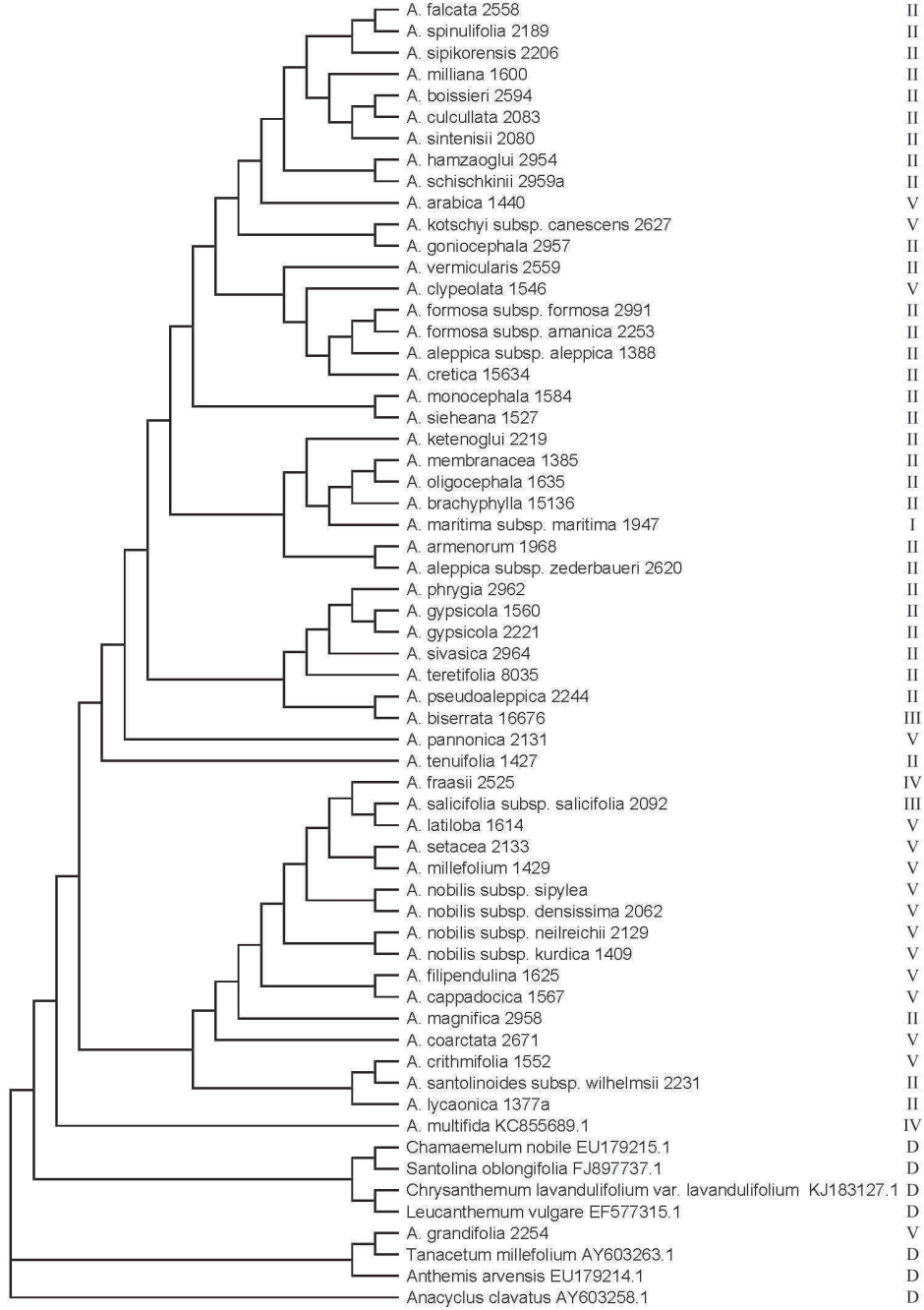
Şekil 4.25. *Achillea* cinsinin ülkemizde yayılış gösteren 48 türü ve 7 adet dış grubun ITS bölgelerinin UPGMA analizi sonucu oluşan ağacı (I: sect. *Othantus*, II: sect. *Babounya*, III: sect. *Ptarmica*, IV: *Anthemoideae*, V: sect. *Achillea*).

Bazı yurt dışı *Achillea* türlerinin de dahil edildiği ve dış gruplara ait ITS bölgelerinin UPGMA analizi sonucu oluşan ağaç Şekil 4.26'da verilmiştir.



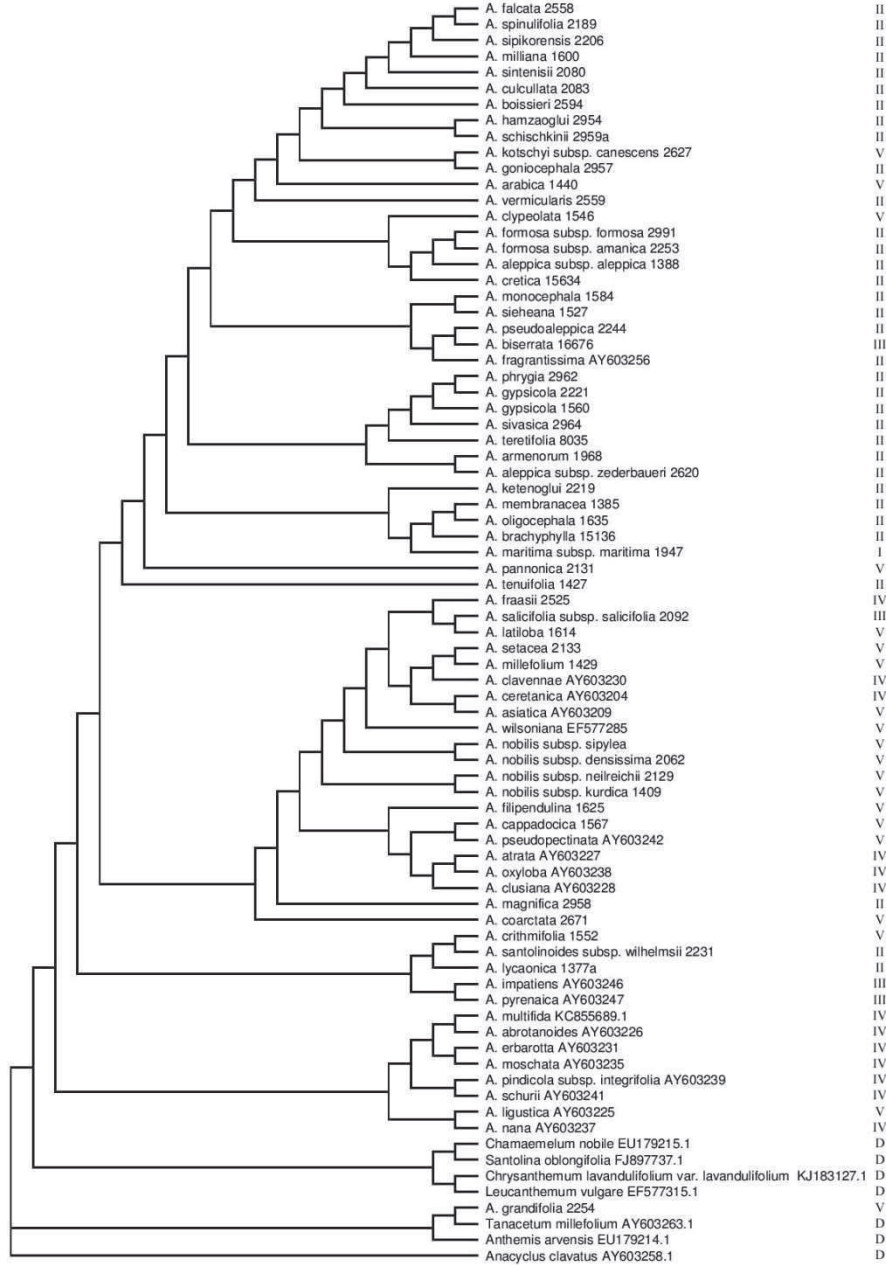
Şekil 4.26. *Achillea* cinsinin ülkemizde yayılış gösteren 48 türü, 18 yurt dışı türü ve 7 adet dış grubun ITS bölgelerinin UPGMA analizi sonucu oluşan ağacı (I: sect. *Othantus*, II: sect. *Babounya*, III: sect. *Ptarmica*, IV: *Anthemoideae*, V: sect. *Achillea*).

Genetik uzaklılığı belirlemek üzere NJ (Neighbor Joining) analizi de yapılmıştır (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. *Achillea* cinsinin ülkemizde yayılış gösteren 48 türü ve 7 adet dış grubun ITS bölgelerinin NJ (Neighbor Joining) analizi sonucu oluşan ağacı (I: sect. *Othantus*, II: sect. *Babounya*, III: sect. *Ptarmica*, IV: *Anthemoideae*, V: sect. *Achillea*).

Bazı yurt dışı *Achillea* türlerinin de dahil edildiği ve dış gruplara ait ITS bölgelerinin NJ (Neighbor Joining) analizi sonucu oluşan ağacı Şekil 4.28’de verilmiştir.



Şekil 4.28. *Achillea* cinsinin ülkemizde yayılış gösteren 48 türü, 18 yurt dışı türü ve 7 adet dış grubun ITS bölgelerinin NJ (Neighbor Joining) analizi sonucu oluşan ağacı (I: sect. *Othantus*, II: sect. *Babounya*, III: sect. *Ptarmica*, IV: *Anthemoideae*, V: sect. *Achillea*).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, ülkemizde yayılış gösteren *Achillea* cinsine ait taksonların nrDNA'sının ITS bölgeleri filogenetik bakımdan analiz edilerek, taksonların akrabalık ilişkileri belirlenmiştir. Aytaç vd. tarafından 2016 yılında yeni tür olarak yayınlanan *Achillea adenii* Aytaç & M.Ekici ve *Achillea baltai* H.Duman & Aytaç türlerine ait bitki örneklerine ulaşamadığı için bu iki yeni türün moleküler filogeneti analizi bu çalışma kapsamında yapılamamıştır (20).

ITS bölgesi, ITS1 ve ITS2 bölgelerinden oluşmaktadır ve filogenetik açıdan iyi korunmuş bölgelerdir. Bu bölgeler arasındaki farklar türler arası ve tür içi taksonomik ayrımlarda bazı cinslerde oldukça iyi sonuçlar vermektedir.

Achillea türleri Türkiye Florasında 6 seksiyon altında toplanmaktadır. Bu seksiyonların ayırım anahtarı aşağıda verilmiştir (13).

Seksiyon Anahtarı

1. Yapraklar tam

2. Dilsî çiçekler beyaz..... **Ptarmica**

2. Dilsî çiçekler sarı..... **Babounya**

1. Yapraklar parçalı

3. Yapraklar lineer, genişliği 0.4 cm'den az; segmentler küçük-enine-imbrikat ya da bazen aralıklı segmentlere bölünmüş, eni boyundan uzun

4. Fillariler tabanda eklemlî, çabuk düşücü..... **Arthrolepis**

4. Fillariler tabanda eklemlî değil, kalıcı.....**Santolinoideae**

3. Yapraklar lineer, lanseolat ya da oblong'dan genişçe ovat'a kadar, genişliği 0.4 cm'den fazla; segmentler imbrikat değil, eni boyundan kısa

5. Dilsî çiçekler 4-6, beyaz, üst kısımlarında soluk sarı yada fildişi.....**Millefolium**

5. Dilsî çiçekler (2-)4-6 adet, sarı**Filipendulinae**

Huber-Morath (1975) tarafından verilen seksiyonlarda türler yukarıdaki anahtarda da yer alan morfolojik özellikleri göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır (13). *Achillea* türlerinin seksiyonları daha sonra Ehrendorfer ve Guo (2006) tarafından moleküler veriler ışığında yeniden düzenlenmiştir (12). Bu çalışmada da *Achillea*'nın *Arthrolepis* Boiss. ve

Santolinoideae DC. seksiyonları *Babounya* (DC.) O.Hoffm seksiyonu altında, *Filipendulinae* (DC.) Boiss. ve *Millefolium* (DC.) W.Koch. seksiyonları da *Achillea* seksiyonu altında birleştirilmiştir. Ayrıca *Otanthus* cinsinin tek türü *Achillea maritima* (L.) Ehrend. ve Y.-P.Guo olarak sect. *Otanthus* (Hoffmanns. ve Link) Ehrend. ve Y.-P.Guo altında, *Leucocyclus* cinsi ise *Achillea formosa* (Boiss.) Sch.Bip. olarak *Babounya* seksiyonunun altında yer almıştır. *Ptarmica* seksiyonu altında yer alan *Achillea fraasii* Sch.Bip. ve *A. multifida* (DC.) Griseb. türleri ise *A. sect. Anthemoideae* altında verilmiştir.

Ülkemizde yayılış gösteren *Achillea*, *Otanthus* ve *Leucocyclus* cinslerine ait türlerin Ehrendorfer ve Guo (2006) tarafından moleküler veriler ışığında yapılan ve Huber-Morath (1975) tarafından Türkiye Florasında verilen seksiyon düzeyindeki dağılımı Tablo 5.1’de verilmiştir (12, 13).

Tablo 5.1. *Achillea*, *Otanthus* ve *Leucocyclus* cinslerine ait türlerin seksiyon düzeyindeki dağılımları.

| Seksiyonlar (Ehrendorfer ve Guo 2006) | Seksiyonlar (Huber-Morath 1975) | Türler |
|---|------------------------------------|---|
| <i>A.sect.Othantus</i> | <i>Otanthus</i> cinsi altında | 1. <i>A. maritima</i> subsp. <i>maritima</i> |
| <i>A. sect. Babounya</i> | <i>Leucocyclus</i> cinsi altında | 1. <i>A. formosa</i> subsp. <i>formosa</i> <i>A. formosa</i> subsp. <i>amanica</i> |
| | <i>A. sect. Babounya</i> | 1. <i>A. sieheana</i> |
| | <i>A. sect. Arthrolepis</i> | 1. <i>A. membranacea</i> 2. <i>A. brachyphylla</i> 3. <i>A. oligocephala</i> 4. <i>A. sipikorensis</i> |
| | <i>A. sect. Santolinoidea</i> | 1. <i>A. santolinoides</i> subsp. <i>wilhelmsii</i> 2. <i>A. falcata</i> 3. <i>A. cucullata</i> 4. <i>A. vermicularis</i> 5. <i>A. monocephala</i> 6. <i>A. schischkinii</i> 7. <i>A. lycaonica</i> 8. <i>A. magnifica</i> 9. <i>A. sivasica</i> 10. <i>A. tenuifolia</i> 11. <i>A. phrygia</i> 12. <i>A. gypsicola</i> 13. <i>A. boissieri</i> 14. <i>A. aleppica</i> subsp. <i>aleppica</i> <i>A. aleppica</i> subsp. <i>zederbaueri</i> 15. <i>A. pseudoaleppica</i> 16. <i>A. teretifolia</i> |

| | | |
|------------------------------|--------------------------------|--|
| | | 17. <i>A. cretica</i> 18. <i>A. armenorum</i> 19. <i>A. baltai</i> 20. <i>A. sintenisii</i> 21. <i>A. adenii</i> 22. <i>A. milliana</i> 23. <i>A. ketenoglui</i> 24. <i>A. hamzaoglui</i> 25. <i>A. goniocephala</i> 26. <i>A. spinulifolia</i> |
| <i>A. sect. Ptarmica</i> | <i>A. sect. Ptarmica</i> | 1. <i>A. biserrata</i> 2. <i>A. salicifolia</i> subsp. <i>salicifolia</i> |
| <i>A. sect. Anthemoideae</i> | | 1. <i>A. fraasii</i> 2. <i>A. multifida</i> |
| <i>A. sect. Achillea</i> | <i>A. sect. Millefolium</i> | 1. <i>A. latiloba</i> 2. <i>A. grandifolia</i> 3. <i>A. millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> 4. <i>A. pannonica</i> 5. <i>A. setacea</i> 6. <i>A. crithmifolia</i> 7. <i>A. kotschyi</i> subsp. <i>kotschyi</i> <i>A. kotschyi</i> subsp. <i>canescens</i> 8. <i>A. nobilis</i> subsp. <i>neilreichii</i> <i>A. nobilis</i> subsp. <i>densissima</i> <i>A. nobilis</i> subsp. <i>sipylea</i> <i>A. nobilis</i> subsp. <i>kurdica</i> |
| | <i>A. sect. Filipendulinae</i> | 1. <i>A. filipendulina</i> 2. <i>A. clypeolata</i> 3. <i>A. coarctata</i> 4. <i>A. arabica</i> 5. <i>A. cappadocica</i> |
| Toplam | | 50 |

Bu çalışma sonucu elde edilen dizilerden filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Bu ağaçlar oluşturulurken karakter temelli yöntemler ve genetik uzaklık kriterlerinden yararlanılmıştır. Karakter temelli yöntemlerden parsimoni kriteri kullanılmıştır. Parsimoni (tutumluluk) ilkesine göre doğa hakkındaki bir teori mevcut durumlar ile uygunluk gösteren en basit açıklamaya sahip olmalıdır (42).

Ortak uyumluluk (consensus) ağaçlarından strict consensus ağacı incelendiği zaman dış grupların ayrı bir grup oluşturduğu ancak *Achillea grandifolia* ve *A. multifida* türlerinin de bu dış gruplar arasında yer aldığı gözlenmektedir. Bu iki türün dışındaki *Achillea* taksonlarının ise monofiletik olduğunu görmekteyiz (Şekil 4.22).

Achillea ve dış gruplara ait ITS bölgelerinin bootstrap analizi yapılmıştır (Şekil 4.23). Bootstrap yöntemi, ağaçların %0 ve %100 arasındaki güvenilirlik derecelerini vermektedir ve

güvenirlilik oranı %50'nin üzerinde konsensus ağacı oluşturmaktadır. Çözülme veya karışık veriler sunan soy ağacında tek bir ortak atadan gelen 3 veya daha fazla nesil politomi olarak adlandırılır (43). *A. falcata* ve *A. spinulifolia* %99 bootstrap değeri ile diğer taksonlara göre daha yakın akrabadır. Aynı seksiyonda yer alan bu iki türün yayılış alanı Toros'lardır ve birbirine yakındır. Morfolojik olarak; *A. falcata*'nın çiçek durumu sapı 1-20 mm, kapitulum sayısı 1-40 ve dilsî çiçekler sarı renkte iken, *A. spinulifolia*'nın çiçek durumu sapı 5-70 mm, kapitulum sayısı 3-12 ve dilsî çiçekler beyaz renktedir. Bu taksonlar monofiletiktirler (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. *A. falcata* (A) ve *A. spinulifolia* (B)'nin çiçek durumları.

Birbirine yakın akraba olan ve aynı seksiyonda yer alan *Achillea membranacea* ve *A. oligocephala*'nın bulunduğu dal ise %91 oranında desteklenmiştir (Şekil 4.23). Bu türler morfolojik olarak birbirine yakın ve ülkemizde sadece Şanlıurfa çevresinde yayılış göstermektedirler. *A. membranacea* involukrumlarının büyük, dilsî çiçeklerinin uzun olması ile *A. oligocephala*'dan ayrılmaktadır. Bu iki türün monofiletik türler olduğu gözükmemektedir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. *A. membranacea* (A) ve *A. oligocephala* (B)'nin kapitulumları.

Achillea formosa'nın iki alt türünün bulunduğu dal da %51 oranında desteklenmiştir. Aynı seksiyonda yer alan *A. armenorum* ve *A. aleppica* subsp. *aleppica*'nın bulunduğu dal %69, *A. hamzaoglui* ve *A. schischkinii* % 55, *A. millefolium* ve *A. setacea* %76 oranında desteklenmiştir. *A. nobilis* türünün *sipylea* ve *densissima* alt türlerinin bulunduğu dal %58 oranında desteklenirken, diğer iki alt türünde (subsp. *kurdica* ve subsp. *neilreichii*) dal destek oranı %50'nin altında olmuş ve politomi gerçekleşmiştir. Dış grubu oluşturan türlerden 4'ü (*Chamaemelum nobile*, *Santolina oblongifolia*, *Chrysanthemum lavandulifolium* ve *Leucanthemum vulgare*) aynı dal üzerinde % 90 desteklenirken, diğer 2'sinde (*Anacyclus clavatus*, *Anthemis arvensis* ve *Tanacetum millefolium*) ise politomi görülmektedir (Şekil 4.23).

Şekil 4.23 incelendiğinde %50'nin üzerinde desteklenen *Achillea kotschyi* subsp. *canescens* ile *A. goniocephala* (%56), *A. salicifolia* subsp. *salicifolia* ile *A. latiloba* (%51), *A. crithmifolia* ile *A. santolinoides* subsp. *wilhelmsii* (%100) ve *A. pseudoaleppica* ile *A. biserrata* (%60) türlerinin morfolojik bakımdan farklı seksiyonlarda yer aldığı görülmektedir. Ağaçta güvenilirlik değeri %50'nin altında kalan dallarda politomi oluşmuştur. Bu dallarda dallanma modeli belirlenemediğinden taksonlar arasında bir yorum yapılamamıştır.

Bootstrap yöntemi ile elde edilen ağaçta iyi ayrılmayan türler görülmektedir. Bu türler arasında muhtemelen gen alış-verişi yani hirtleşme olabilir. Bunların tür sınırları henüz tam olarak izole olmamıştır.

Bazı yurt dışı *Achillea* türlerinin de dahil edildiği Bootstrap analizi sonucu oluşan ağaç incelendiğinde türlerin büyük oranda kendi seksiyonları içinde dağılım gösterdikleri görülmektedir. Türkiye türlerinin ağaç üzerinde dallanma şekilleri ise büyük oranda değişmeden kalmıştır (Şekil 4.24).

Mesafe temelli yöntemlerden UPGMA analizi sonucu elde edilen ağaç Şekil 4.25’de, bazı yurt dışı *Achillea* türlerinin de dahil edildiği ve dış gruplara ait ITS bölgelerinin UPGMA analizi sonucu oluşan ağaç ise Şekil 4.26’da verilmiştir. Her iki ağaçta da ülkemiz türleri benzer bir dağılım gösterirken, yurt dışı türleri ise genellikle kendi seksiyonunda yer alan türlerle birlikte gruplanmışlardır.

Bu ağaçlar incelendiğinde dış grupların kendi içinde gruplandığı görülmektedir. Ancak *Achillea maritima* subsp. *maritima* ve *A. multifida* dış grupların arasında yer almaktadır. *A. maritima* Türkiye Florası’nda *Otanthus* altında ayrı bir cins olarak yer almaktadır (44). *Achillea* cinsinin moleküler filogenisi ile ilgili yapılan çalışmalarda *Otanthus* cinsi *Achillea* cinsine dahil edilmiştir (16). *Achillea* cinsinde kapitulumlar (*Achillea fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip. hariç) heterogam-radiat iken, *Otanthus* cinsinin kapitulumu homogam-diskoiddir. Bu morfolojik fark Asteraceae familyasının cinslerinin ayrımında kullanılan önemli bir karakterdir. Bu çalışmadan elde edilen veriler morfolojik özelliklerle birlikte değerlendirildiğinde *A. maritima* türünün tekrar cins seviyesine yükseltilerek, *Otanthus* cinsi altında yer alması gerektiğini önermekteyiz.

Achillea multifida yapraklarının pinnatisekt ve loblarının aralıklı olması ile *Anthemis* türlerine benzerlik göstermektedir. Ağaçta da dış grup olan *Anthemis arvensis* türü *Achillea multifida*’ya yakın çıkmıştır (Şekiller 4.25, 4.26). *Achillea* cinsi papus’unun olmaması, tüpsü çiçeklerin tabanının akeni sarması ve palea özellikleri ile *Anthemis* cinsden ayrılmaktadır.

Achillea grandifolia türü *Tanacetum millefolium* ile aynı dalda yer almaktadır. *Achillea* cinsi morfolojik bakımdan reseptakulumda palea bulundurması ile *Tanacetum* cinsinden ayrılmaktadır. Bu karakter familya içinde pek çok cinsin ayrımında kullanılan önemli bir özelliktir. Bununla birlikte *Achillea grandifolia* gerek yaprak gerekse çiçek morfolojisi bakımından incelendiğinde *Tanacetum* türlerine oldukça benzer olan bir türdür.

Achillea türleri temelde yapraklarının küçük segmentli, kiremit dizilişli (1-2-pinnatisekt) olması yada segmentlerin geniş ve aralıklı (3-4-pinnatisekt) olması ile birbirinden ayrılmaktadır. UPGMA analizi sonucu elde edilen ağaç incelendiğinde yaprakları kiremit dizilişli türlerin genellikle ağacın üst kısmında (sect. *Babounya*), kiremit dizilişli (imbricate) olmayan türlerin ise alt kısımda yer aldığı görülmektedir (sect. *Ptarmica*, sect. *Anthemoideae*, sect. *Achillea*). Türler seksiyon bazında da genellikle kendi grupları içinde dağılım göstermişlerdir. Ehrendorfer ve Guo (2006) tarafından moleküler veriler sonucu yapılan *Achillea* türlerinin seksiyonlara göre dağılımı ile bizim elde ettiğimiz ağaç büyük oranda uyum içerisinde yer almaktadır. Ehrendorfer ve Guo (2006) tarafından verilen *Babounya*

seksiyonu yaprakları kiremit dizilişli olan türleri, *Achillea* seksiyonu ise yaprak segmentleri geniş ve aralıklı olan türleri içermektedir (12).

UPGMA analizi sonucu elde edilen ağaç incelendiğinde *Achillea sivasica* türünün *A. phrygia* ve *A. gypsicola*'nın farklı lokalitelerden toplanan iki örneği (1560 ve 2221) ile yakın dallarda yer aldığını görmekteyiz (Şekiller 4.25, 4.26). Benzer durum NJ ağacında da görülmektedir (Şekiller 4.27, 4.28). *A. sivasica*, çiçek durumu sapının uzun, korimbusun dar, kapitulumun büyük ve az sayıda olması ile *A. gypsicola*'ya da benzerlik göstermektedir. Fakat yaprak ve fillari özellikleri ile farklılık göstermektedir. *A. sivasica*'nın *A. phrygia*'dan farkı; çiçek durumu sapının uzun, kapitulum sayısının az, involukrum ve fillarilerinin daha büyük olmasıdır. Yaprak ve kapitulum özellikleri ise aynıdır (Şekil 5.3). *A. sivasica*, morfolojik olarak *A. gypsicola*'ya oldukça benzerdir. Aralarındaki morfolojik farklılıklar bu iki taksonun ayrı birer tür olarak değerlendirilmesi için yeterli değildir. Moleküler sonuçlarda bu morfolojik benzerliği desteklemiştir. Bu nedenle, morfolojik ve moleküler veriler sonucunda *A. sivasica*'nın *A. gypsicola* türünün, *A. gypsicola* subsp. *svasica* (Çelik & Akpulat) Arabacı & G.Uzay şeklinde bir alt türü olması gerektiği belirlenmiştir.



Şekil 5.3. *A. gypsicola*(A), *A. sivasica* (B) ve *A. phrygia* (C)'nin kapitulumları.

NJ (Neighbor Joining) analizi ile elde edilen ağaçlarda *Achillea* türlerinin dallanması UPGMA analizi sonucu elde edilen ağacı desteklemektedir. Dış gruplar kendi arasında dallanırken, *Achillea grandifolia* türü *Tanacetum millefolium* ile aynı dalda yer almıştır (Şekiller 4.27, 4.28).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma sonucunda, Türkiye’de yayılış gösteren *Achillea* cinsine ait türler moleküler filogenetik açıdan değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar cinsin mevcut morfolojik özellikleri ile karşılaştırılarak *Achillea*’nın cins, seksiyon ve tür düzeyinde taksonomik durumu tartışılmıştır. Buna göre:

1. Cins düzeyinde; *Achillea maritima* türünün tekrar *Otanthus* cinsi altında *O. maritimus* (L.) Hoffmanns. & Link şeklinde yer alması gerektiği,

2. Seksiyon düzeyinde; *Achillea* türlerinin Ehrendorfer ve Guo (2006) tarafından verilen *A. sect. Otanthus* dışındaki 4 seksiyon (*A. sect. Babounya*, *A. sect. Ptarmica*, *A. sect. Anthemoideae* ve *A. sect. Achillea*) altında yer alması gerektiği (Tablo 6.1),

3. Tür düzeyinde ise; *Achillea sivasica*’nın, *A. gypsicola* subsp. *svasica* (Çelik & Akpulat) Arabacı & G.Uzay comb. et stat. nova olarak *A. gypsicola* türünün bir alt türü olması gerektiği tarafımızdan önerilmektedir.

Bu çalışma *Achillea* cinsine ait taksonların nrDNA’sının ITS bölgeleri filogenetik analizini içermektedir. Bu gen bölgesi bazı taksonları ayırmada yeterli olmayabilir. Bu nedenle farklı gen bölgeleri ile yapılacak olan çalışmalar ile bu durum çözülebilir.

Buna göre ülkemizde yayılış gösteren *Achillea* taksonları 4 seksiyona ait 5’i tipik, 9’u tipik olmayan 48 tür olarak Tablo 6.1’de verilmiştir.

Tablo 6.1. Türkiye’de yayılış gösteren *Achillea* seksiyonları ve içerdikleri türler.

| Seksiyonlar (Ehrendorfer & Guo 2006 ve bu çalışma sonucunda) | Seksiyonlar (Huber-Morath 1975) | Türler (Bu çalışmadan önce) | Türler (Bu çalışma sonucunda) |
|--|----------------------------------|---|--|
| <i>A. sect. Otanthus</i> | <i>Otanthus</i> cinsi altında | 1. <i>Achillea maritima</i> subsp. <i>maritima</i> | <i>Otanthus maritimus</i> |
| <i>A. sect. Babounya</i> | <i>Leucocyclus</i> cinsi altında | 1. <i>A. formosa</i> subsp. <i>formosa</i> <i>A. formosa</i> subsp. <i>amanica</i> | 1. <i>A. formosa</i> subsp. <i>formosa</i> <i>A. formosa</i> subsp. <i>amanica</i> |
| | <i>A. sect. Babounya</i> | 1. <i>A. sieheana</i> | 2. <i>A. sieheana</i> |
| | <i>A. sect. Arthrolepis</i> | 1. <i>A. membranacea</i> 2. <i>A. brachyphylla</i> 3. <i>A. oligocephala</i> 4. <i>A. sipikorensis</i> | 3. <i>A. membranacea</i> 4. <i>A. brachyphylla</i> 5. <i>A. oligocephala</i> 6. <i>A. sipikorensis</i> |
| | <i>A. sect. Santolinoidea</i> | 1. <i>A. santolinoides</i> subsp. <i>wilhelmsii</i> 2. <i>A. falcata</i> 3. <i>A. cucullata</i> 4. <i>A. vermicularis</i> 5. <i>A. monocephala</i> 6. <i>A. schischkinii</i> 7. <i>A. lycanica</i> 8. <i>A. magnifica</i> 9. <i>A. sivasica</i> | 7. <i>A. santolinoides</i> subsp. <i>wilhelmsii</i> 8. <i>A. falcata</i> 9. <i>A. cucullata</i> 10. <i>A. vermicularis</i> 11. <i>A. monocephala</i> 12. <i>A. schischkinii</i> 13. <i>A. lycanica</i> |

| | | | |
|------------------------------|--------------------------------|--|--|
| | | 10. <i>A. tenuifolia</i> 11. <i>A. phrygia</i> 12. <i>A. gypsicola</i> 13. <i>A. boissieri</i> 14. <i>A. aleppica</i> subsp. <i>aleppica</i> <i>A. aleppica</i> subsp. <i>zederbaueri</i> 15. <i>A. pseudoaleppica</i> 16. <i>A. teretifolia</i> 17. <i>A. cretica</i> 18. <i>A. armenorum</i> 19. <i>A. baltai</i> 20. <i>A. sintenisii</i> 21. <i>A. adenii</i> 22. <i>A. milliana</i> 23. <i>A. ketenoglui</i> 24. <i>A. hamzaoglui</i> 25. <i>A. goniocephala</i> 26. <i>A. spinulifolia</i> | 14. <i>A. magnifica</i> 15. <i>A. tenuifolia</i> 16. <i>A. phrygia</i> 17. <i>A. gypsicola</i> subsp. <i>gypsicola</i> <i>A. gypsicola</i> subsp. <i>sivasica</i> 18. <i>A. boissieri</i> 19. <i>A. aleppica</i> subsp. <i>aleppica</i> <i>A. aleppica</i> subsp. <i>zederbaueri</i> 20. <i>A. pseudoaleppica</i> 21. <i>A. teretifolia</i> 22. <i>A. cretica</i> 23. <i>A. armenorum</i> 24. <i>A. baltai</i> 25. <i>A. sintenisii</i> 26. <i>A. adenii</i> 27. <i>A. milliana</i> 28. <i>A. ketenoglui</i> 29. <i>A. hamzaoglui</i> 30. <i>A. goniocephala</i> 31. <i>A. spinulifolia</i> |
| <i>A. sect. Ptarmica</i> | <i>A. sect. Ptarmica</i> | 1. <i>A. biserrata</i> 2. <i>A. salicifolia</i> subsp. <i>salicifolia</i> | 1. <i>A. biserrata</i> 2. <i>A. salicifolia</i> subsp. <i>salicifolia</i> |
| <i>A. sect. Anthemoideae</i> | | 1. <i>A. fraasii</i> 2. <i>A. multifida</i> | 1. <i>A. fraasii</i> 2. <i>A. multifida</i> |
| <i>A. sect. Achillea</i> | <i>A. sect. Millefolium</i> | 1. <i>A. latiloba</i> 2. <i>A. grandifolia</i> 3. <i>A. millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> 4. <i>A. pannonica</i> 5. <i>A. setacea</i> 6. <i>A. crithmifolia</i> 7. <i>A. kotschyi</i> subsp. <i>kotschyi</i> <i>A. kotschyi</i> subsp. <i>canescens</i> 8. <i>A. nobilis</i> subsp. <i>neilreichii</i> <i>A. nobilis</i> subsp. <i>densissima</i> <i>A. nobilis</i> subsp. <i>sipylea</i> <i>A. nobilis</i> subsp. <i>kurdica</i> | 1. <i>A. latiloba</i> 2. <i>A. grandifolia</i> 3. <i>A. millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i> 4. <i>A. pannonica</i> 5. <i>A. setacea</i> 6. <i>A. crithmifolia</i> 7. <i>A. kotschyi</i> subsp. <i>kotschyi</i> <i>A. kotschyi</i> subsp. <i>canescens</i> 8. <i>A. nobilis</i> subsp. <i>neilreichii</i> <i>A. nobilis</i> subsp. <i>densissima</i> <i>A. nobilis</i> subsp. <i>sipylea</i> <i>A. nobilis</i> subsp. <i>kurdica</i> 9. <i>A. filipendulina</i> 10. <i>A. clypeolata</i> 11. <i>A. coarctata</i> 12. <i>A. arabica</i> 13. <i>A. cappadocica</i> |
| | <i>A. sect. Filipendulinae</i> | 1. <i>A. filipendulina</i> 2. <i>A. clypeolata</i> 3. <i>A. coarctata</i> 4. <i>A. arabica</i> 5. <i>A. cappadocica</i> | |
| Toplam | | 50 tür | 48 tür |

KAYNAKLAR

1. Güner A, Ekim T. (eds). *Resimli Türkiye Florası*, cilt 1. İstanbul, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları2014.
2. Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT. (eds). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. İstanbul, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını2012.
3. Davis PH. *Flora of Turkey and East Aegean Islands* (vol. 1-9). Edinburgh, Edinburgh University Press1965-1985.
4. Davis PH, Mill RR, Tan K. *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, (vol. 10). Edinburgh, Edinburgh University Press 1988: 213-4.
5. Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC. *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, vol. 11. Edinburgh, Edinburgh University Press 2000: 213-4.
6. Baytop T. *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*. Nobel Tıp Kitabevleri 1999: 520.
7. Brunke EJ, Hammerschmidt FJ, Aboutabl EA. *Progress in Essential Oil Research*. Berlin, New York, Walter de Gruyterand Co. 1986: 85.
8. Arabacı T. *Türkiye’de Yetişen Achillea L. (Asteraceae) Cinsinin Revizyonu*. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji anabilim Dalı. Doktora tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi,2006.
9. Arabacı T. *Achillea L.* In: Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT (eds). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. İstanbul, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını2012:108-112.
10. Bremer K. *Asteraceae: Cladistics & Classification*. Timber Press, Oregon 1994.
11. Kadereit JW, Jeffrey C (eds). *Flowering Plants. Eudicots: Asterales*. In: Kubitzki K (ed). *The Families and Genera of Vascular Plants*, Vol. 8. Berlin, Springer 2007.
12. Ehrendorfer F, Guo YP. *Multidisciplinary studies on Achillea sensu lato (Compositae-Anthemideae): new data on systematics and phylogeography*. *Willdenowia* 2006, 36: 1–19.
13. Huber-Morath A. *Achillea L.* In: Davis PH. (ed). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 5. Edinburgh, Edinburgh University Press1975: 224-52.
14. Duman H. *Achillea L.* In : Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC. (eds). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, (supplement)vol. 11. Edinburgh, Edinburgh University Press2000: 158-9.
15. Danihelka J. *Achillea pannonica* in the Czech Republic, with taxonomic remarks. *Preslia*2001, 73: 213-44.

16. Ehrendorfer F, Guo YP. Changes in the circumscription of the genus *Achillea* (Compositae-Anthemideae) and its subdivision. *Willdenowia* 2005, 35: 1-6.
17. Arabacı T, Yıldız B. *Achillea salicifolia* Besser subsp. *salicifolia* (Asteraceae) in Turkey, with Taxonomic Remarks. *Tr J Bot* 2006, 30: 171-4.
18. Çelik N, Akpulat HA. *Achillea sivasica* (Asteraceae: sect. Babounya (DC.) O. Hoffm.), a new species from Inner Anatolia, Turkey. *Kew Bulletin* 2008, 63: 485-9.
19. Arabacı T, Budak Ü. *Achillea hamzaoglui* (Asteraceae), a new species from Turkey. *Ann Bot Fenn* 2009, 46: 459-463.
20. Aytaç Z, Duman H, Ekici M. Two new *Achillea* L. (Asteraceae) species from Turkey. *Turk J Bot* 2016, 40: 373-9.
21. Akyalçın H, Arabacı T, Yıldız B. Türkiye’de Yetişen *Achillea* L. (Asteraceae) Taksonlarının Polen Morfolojisi, TÜBİTAK Projesi (Proje No: TBAG-104T291), 2009.
22. Akyalçın H, Arabacı T, Yıldız B.. Pollen morphology of some *Achillea* L. sect. *Babounya* (DC.) O. Hoffm. (Asteraceae) species from Turkey. *Acta Botanica Gallica* 2014, 161: 129-49.
23. Akyalçın H, Arabacı T, Yıldız B. Pollen morphology of six *Achillea* L. sect. *Achillea* (Asteraceae) species in Turkey. *Tr J Bot* 2011, 35: 183-201.
24. Şahin A, Kıran Y, Arabacı T, Turkoğlu I. Karyological Notes on Eight Species of *Achillea* L. (Asteraceae, Santolinoideae) from Turkey. *Bot J Linn Soc* 2006, 151: 573-80.
25. Aksu N, Inceer H, Hayırhoğlu-Ayaz S. Karyotype analysis of six *Achillea* L. (Asteraceae, Anthemideae) taxa from Turkey. *Caryologia* 2013, 66: 103-8.
26. Kıran Y, Arabacı T, Şahin A, Turkoğlu I. Karyological Notes on Another Eight Species of *Achillea* (Asteraceae) from Turkey. *Biologia* 2008, 63: 343-8.
27. Kıran Y, Turkoğlu I, Kirilmaz F, Arabacı T, Şahin A, Bağcı E. Karyological investigation of six *Achillea* L. (Asteraceae) species growing in Turkey. *Caryologia* 2012, 65: 101-5.
28. Turkoğlu S, Akpulat HA. Chromosome numbers, karyotypes and 4C DNA contents of *Achillea sipikorensis* Hausskn. and Bornm. and *Achillea sintenisii* Hub.-Mor. (Asteraceae). *Caryologia* 2004, 57: 244-9.
29. İşcan G, Kırımer N, Kürkçüoğlu M, Arabacı T, Küpeli E, Başer KHC. Biological Activity and Composition of the Essential Oils of *Achillea schischkinii* Sosn. and *Achillea aleppica* DC. subsp. *aleppica*. *J Agric Food Chem* 2006, 54: 170-3.

30. Azaz AD, Arabacı T, Sangun MK, Yıldız B. Composition and the in vitro Antimicrobial Activities of the Essential Oils of *Achillea wilhelmsii* C.Koch. and *Achillea lycaonica* Boiss. & Heldr. *Asian J Chem* 2008, 20: 1238-44.
31. Azaz AD, Arabacı T, Sangun MK. Essential Oil Composition and Antimicrobial Activities of *Achillea biserrata* M. Bieb. and *Achillea salicifolia* Besser subsp. *salicifolia* Collected in Turkey. *Asian J Chem* 2009, 21: 3193-8.
32. Kucukbay FZ, Kuyumcu E, Gunal S, Arabacı T. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea formosa* subsp. *amanica*. *Chem Nat Compd* 2011, 47: 300-2.
33. Kucukbay FZ, Kuyumcu E, Arabacı T. The essential oil of *Achillea boissieri*. *Chem Nat Compd* 2010, 46: 824-5.
34. Guo YP, Ehrendorfer F, Samuel R. Phylogeny and systematics of Achille (Asteraceae-Anthemideae) inferred from nrITS and plastid trnL-F DNA sequences. *Taxon* 2004, 53:(3) 657-72.
35. Saukel J, Anchev M, Guo Y-P, Vitkova A, Nedelcheva A, Goranova V, Konakchiev A, Lambrou M, Nejati S, Rauchensteiner F, Ehrendorfer F. Comments on the biosystematics of *Achillea* (Asteraceae-Anthemideae) in Bulgaria. *Phytologia Balcanica* 2004, 9: 361-400.
36. Baltaş H, Bağda E. Türkiye’de Yayılış Gösteren Bazı *Achillea* L. (Anthemideae, Asteraceae) Taksonlarının Moleküler Karakterizasyonu. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2014.
37. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A Plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1983, 1/4: 19.
38. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (eds). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. New York, Academic Press, 1990: 315-22.
39. Sambrook J, Russell DW. *Agarose Gel Electrophoresis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2006.
40. Hall T (2004). BioEdit. Carlsbad, CA, USA: Ibis Biosciences. Web adresi <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. (Erişim tarihi 1 September 2015).
41. Swofford DL. *PAUP 4.0b10: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)*, Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, 2002.
42. Campbell NA, Reece JB. *Biyoloji*. Ankara, Palme Yayıncılık, 2008.

43. Simpson MG. Plant Systematics. Ankara, Nobel Akademik Yayıncılık eğitim Danışmanlık Tic. Ltd. Şti. 2012.
44. Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 5. Edinburgh, Edinburgh University Press 1975: 253.

EKLER

EK.1. ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Gizem UZAY

Doğum Yeri ve Tarihi: Malatya, 1992

Adres : İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Botanik
Abd., MALATYA

E-Posta : guzay44@gmail.com

Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2014.

Eserler Listesi:

Yayınlar:

1. Arabacı T., Uzay G., Kelestemur U., Karaaslan MG., Balcıoğlu S., Ateş B. Cytotoxicity, Radical Scavenging, Antioxidant Properties and Chemical Composition of the Essential Oil of *Satureja cilicica* P.H. Davis from Turkey. Marmara Pharmaceutical Journal 21/3: (Baskıda), 2017.

Kongre Bildirileri:

1. Arabacı T., Uzay G., Kelestemur U., Karaaslan MG., Balcıoğlu S., Ateş B. Cytotoxicity, Antioxidant and Chemical Composition of the Essential Oil of *Satureja cilicica* P.H. Davis from Turkey. International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara University, Faculty of Pharmacy, 09-12 June 2015, Ankara-TURKEY.

EK.2. ITS nrDNA Dizisinin Veri Matrisi

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|--------------------------------|--------------|------------|-----------|---------------|---------|---------------|
| A. falcata 2558 | GAACCC | TGCAAAGCAG | AACGACCCG | TGAACATGTAAAA | CAACCG | AGCGTCGGGTGGA |
| A. spinulifolia 2189 | | | | | | |
| A. fraasii 2525 | | | | A..... | T..... | A..... |
| A. phrygia 2962 | | | C..... | | A..... | |
| A. nobilis subsp. sipylea | | | C..... | A..... | T..... | |
| A. vermicularis 2559 | | | C..... | | | |
| A. sipikorensis 2206 | ..C..WG..... | | C..... | | SW..... | |
| A. kotschyi subsp. canescens 2 | | R..... | C..... | | T..... | |
| A. salicifolia subsp. salicifo | | | C..... | A..... | T..... | A..... |
| A. monocephala 1584 | | | C..... | | | |
| A. crithmifolia 1552 | | | C..... | A..... | | T.....A..... |
| A. arabica 1440 | | | C..... | | | |
| A. pannonica 2131 | | | Y..... | | Y..... | |
| A. magnifica 2958 | | | C..... | A..... | T..... | A..... |
| A. clypeolata 1546 | | | C..... | | |G |
| A. tenuifolia 1427 | | | C..... | | | |
| A. ketenoglui 2219 | | | Y..... | | Y..... |K..... |
| A. milliana 1600 | | | C..... | | | |
| A. pseudoaleppica 2244 | | | C..... | | | |
| A. armenorum 1968 | | | C..... | | T..... | A.....AT..... |
| A. lycaonica 1377a | | | C..... | A..... | T..... | AA..... |
| A. membranacea 1385 | | | C..... | | | AT..... |
| A. boissieri 2594 | | | C..... | | | |
| A. culcullata 2083 | | | C..... | | | |
| A. nobilis subsp. neilreichii | | | C..... | | TA..... | |
| A. nobilis subsp. densissima 2 | | | C..... | | T..... |G..... |
| A. gypsicola 1560 | | | C..... | A..... | | A..... |
| A. gypsicola 2221 | | | C..... | | | A..... |
| A. sivasica 2964 | | | C..... | A..... | | |
| A. filipendulina 1625 | | | C..... | M..... | | A..... |
| A. formosa subsp. formosa 2991 | | | C..... | | | A..... |
| A. hamzaoglui 2954 | | | C..... | | | |
| A. cappadocica 1567 | | | C..... | | T..... | A..... |
| A. setacea 2133 | | | C..... | A..... | T..... | A..... |
| A. goniocephala 2957 | | | C..... | | T..... | |
| A. latiloba 1614 | | | C..... | A..... | T..... | A..... |
| A. sieheana 1527 | | | C..... | | | |
| A. santolinoides subsp. wilhel | | | C..... | A..... | | T.....A..... |
| A. oligocephala 1635 | | | C..... | | | AT..... |
| A. schischkinii 2959a | | | C..... | | |K..... |
| A. nobilis subsp. kurdica 1409 | | | C..... | A..... | T..... | |
| A. maritima subsp. maritima 19 | | | | | T..... | |
| A. grandifolia 2254 | | | C..... | A..... | | A.....AT..... |
| A. millefolium 1429 | | | C..... | A..... | T..... | A..... |
| A. aleppica subsp. aleppica 13 | | | C..... | | |G |
| A. coarctata 2671 | | | C..... | A..... | T..... | AW..... |
| A. teretifolia 8035 | | | C..... | A..... | | A..... |
| A. brachyphylla 15136 | | | | | T..... |T..... |
| A. sintensisii 2080 | | | C..... | | | |
| A. biserrata 16676 | | | C..... | A..... | | |
| A. aleppica subsp. zederbaueri | | | C..... | | T..... | A..... |
| A. formosa subsp. amanica 2253 | | | C..... | | | T..... |
| A. cretica 15634 | | | A..... | C..... | | |

| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
|--------------------------------|--------------|---------|-----------|-------------|-------------|-----------|
| A. falcata 2558 | TTAAGCACTTGT | TTTGATC | CTCTTGATG | CTTTGTCGATG | TGCATTTACTT | GTGTCCTTT |
| A. spinulifolia 2189 | | | | Y | | |
| A. fraasii 2525 | T | M | C | | C | T |
| A. phrygia 2962 | G | | C | | | |
| A. nobilis subsp. sipylea | T | | C | | | T |
| A. vermicularis 2559 | | | T | S | | |
| A. sipikorensis 2206 | | A | S | S | S | Y |
| A. kotschyi subsp. canescens 2 | | | C | | | |
| A. salicifolia subsp. salicifo | TC | | C | | C | T |
| A. monocephala 1584 | | | C | | | M |
| A. crithmifolia 1552 | TTWW | | C | | C | T |
| A. arabica 1440 | | | C | | | |
| A. pannonica 2131 | T | | Y | | | T |
| A. magnifica 2958 | T | | C | | | T |
| A. clypeolata 1546 | | | CK | | | |
| A. tenuifolia 1427 | | | C | | | T |
| A. ketenoglui 2219 | | | C | | | T |
| A. milliana 1600 | | | C | | | |
| A. pseudoaleppica 2244 | | | C | | | T |
| A. armenorum 1968 | | | C | | | Y |
| A. lycaonica 1377a | TT | W | C | | | T |
| A. membranacea 1385 | | | C | | | T |
| A. boissieri 2594 | | | C | | | |
| A. culcullata 2083 | | | C | | | |
| A. nobilis subsp. neilreichii | TY | | C | | | T |
| A. nobilis subsp. densissima 2 | TT | | C | R | | Y |
| A. gypsicola 1560 | G | | C | | | |
| A. gypsicola 2221 | G | | C | | | |
| A. sivasica 2964 | G | | C | | | T |
| A. filipendulina 1625 | TA | | C | | | T |
| A. formosa subsp. formosa 2991 | | | C | | | C |
| A. hamzaoglui 2954 | | | C | | | |
| A. cappadocica 1567 | C | TC | C | | | T |
| A. setacea 2133 | T | | C | | | T |
| A. goniocephala 2957 | | | C | | | |
| A. latiloba 1614 | TC | | C | | C | T |
| A. sieheana 1527 | | | C | | | A |
| A. santolinoides subsp. wilhel | TT | | C | | C | T |
| A. oligocephala 1635 | | | C | | | T |
| A. schischkinii 2959a | | | C | | G | Y |
| A. nobilis subsp. kurdica 1409 | T | | C | | | T |
| A. maritima subsp. maritima 19 | C | | | | G | W |
| A. grandifolia 2254 | | | C | | | T |
| A. millefolium 1429 | T | | C | | | T |
| A. aleppica subsp. aleppica 13 | | C | CT | C | | |
| A. coarctata 2671 | | | C | W | | T |
| A. teretifolia 8035 | G | | C | | G | T |
| A. brachyphylla 15136 | | | | | G | T |
| A. sintensisii 2080 | | | C | | | |
| A. biserrata 16676 | | | C | | C | T |
| A. aleppica subsp. zederbaueri | | | C | | | |
| A. formosa subsp. amanica 2253 | | | C | | | |
| A. cretica 15634 | | | C | | | |

| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
|--------------------------------|--|-----|-----|-----|--------|--------|
| A. falcata 2558 | TATGGACCTCGTGAATGTGTGCATTGACGCAATAACAACCCCGGCACAATGTGTGCCAAG | | | | | |
| A. spinulifolia 2189 | .T.....G..... | | | | | S..... |
| A. fraasii 2525 | .M.....T.....G.Y..... | | | | | S..... |
| A. phrygia 2962 | .T.....G.....T..... | | | | | |
| A. nobilis subsp. sipylea | .T.....G.....T..... | | | | | |
| A. vermicularis 2559 |A.Y.....A..... | | | | | |
| A. sipikorensis 2206 | | | | | | |
| A. kotschyi subsp. canescens 2 | | | | | | |
| A. salicifolia subsp. salicifo | .T.....G..... | | | | | |
| A. monocephala 1584 |Y..... | | | | | |
| A. crithmifolia 1552 | .T.....AG..... | | | | | |
| A. arabica 1440 |G..... | | | | | |
| A. pannonica 2131 |S..... | | | | | |
| A. magnifica 2958 | .T.....G..... | | | | | |
| A. clypeolata 1546 |G..... | | | | | |
| A. tenuifolia 1427 | .T.....G..... | | | | | |
| A. ketenoglui 2219 | | | | | | |
| A. milliana 1600 | | | | | | |
| A. pseudoaleppica 2244 | R.....T..... | | | | | |
| A. armenorum 1968 |K.....AC..... | | | | A..... | |
| A. lycaonica 1377a | .T.C...AG..... | | | | | |
| A. membranacea 1385 | .T.....A..... | | | | | C..... |
| A. boissieri 2594 |T..... | | | | | |
| A. culcullata 2083 | | | | | | M..... |
| A. nobilis subsp. neilreichii | .T.....G..... | | | | | |
| A. nobilis subsp. densissima 2 | .T.....G.G.....W.....Y..... | | | | | |
| A. gypsicola 1560 | .C.....G.....g..... | | | | | |
| A. gypsicola 2221 | .C.....C.....G..... | | | | | |
| A. sivasica 2964 | .c.....cT.....g..... | | | | | |
| A. filipendulina 1625 | .T.....AG.....A..... | | | | | |
| A. formosa subsp. formosa 2991 |T..... | | | | | Y..... |
| A. hamzaoglui 2954 | | | | | | A..... |
| A. cappadocica 1567 | .T.....G..... | | | | | |
| A. setacea 2133 | .T.....G.....A..... | | | | | |
| A. goniocephala 2957 | | | | | | |
| A. latiloba 1614 | .T.....G..... | | | | | |
| A. sieheana 1527 | A.....C..... | | | | | |
| A. santolinoides subsp. wilhel | .T.....AG..... | | | | | |
| A. oligocephala 1635 | .TC.....A..... | | | | | |
| A. schischkinii 2959a | | | | | | |
| A. nobilis subsp. kurdica 1409 | .T.....G..... | | | | | S..... |
| A. maritima subsp. maritima 19 |T..... | | | | | |
| A. grandifolia 2254 | .TC...A.G.....G..... | | | | | |
| A. millefolium 1429 | .T.....G.....A..... | | | | | |
| A. aleppica subsp. aleppica 13 |CT..... | | | | | |
| A. coarctata 2671 | .T.....G.Y.....M.R.....A..... | | | | | |
| A. teretifolia 8035 |T.....C.....A..... | | | | | |
| A. brachyphylla 15136 |A..... | | | | | |
| A. sintensisii 2080 | | | | | | |
| A. biserrata 16676 | G.....T..... | | | | | |
| A. aleppica subsp. zederbaueri |R..... | | | | | |
| A. formosa subsp. amanica 2253 |T..... | | | | | |
| A. cretica 15634 |T.....C..... | | | | | |

| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
|--------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| A. falcata 2558 | GAAAAC TAAACT T GAGAAGGCTTGTTCATGTTTCCCC -GTTCCGGTGTGCTCATGGAA | | | | | |
| A. spinulifolia 2189 |S.....Y..... | | | | | |
| A. fraasii 2525 |G.....C..... | | | | | |
| A. phrygia 2962 | .G.....G..... | | | | | |
| A. nobilis subsp. sipylea |G.....C..... | | | | | |
| A. vermicularis 2559 |G..... | | | | | |
| A. sipikorensis 2206 |G.....S..... | | | | | |
| A. kotschyi subsp. canescens 2 |G..... | | | | | |
| A. salicifolia subsp. salicifo |G.....C..... | | | | | |
| A. monocephala 1584 |G..... | | | | | |
| A. crithmifolia 1552 |G..... | | | | | |
| A. arabica 1440 |G..... | | | | | |
| A. pannonica 2131 |G..... | | | | | |
| A. magnifica 2958 |G..... | | | | | |
| A. clypeolata 1546 |G..... | | | | | |
| A. tenuifolia 1427 |G..... | | | | | |
| A. ketenoglui 2219 |G..... | | | | | |
| A. milliana 1600 |G..... | | | | | |
| A. pseudoaleppica 2244 |G..... | | | | | |
| A. armenorum 1968 |G..... | | | | | |
| A. lycaonica 1377a |G..... | | | | | |
| A. membranacea 1385 |G..... | | | | | |
| A. boissieri 2594 |A.G..... | | | | | |
| A. culcullata 2083 |G..... | | | | | |
| A. nobilis subsp. neilreichii |G.....C..... | | | | | |
| A. nobilis subsp. densissima 2 |G.....C..... | | | | | |
| A. gypsicola 1560 |G..... | | | | | |
| A. gypsicola 2221 |G..... | | | | | |
| A. sivasica 2964 |G..... | | | | | |
| A. filipendulina 1625 |G.....C..... | | | | | |
| A. formosa subsp. formosa 2991 |G..... | | | | | |
| A. hamzaoglui 2954 |G.....C..... | | | | | |
| A. cappadocica 1567 |AG.....C..... | | | | | |
| A. setacea 2133 |G.....C..... | | | | | |
| A. gonioccephala 2957 |G..... | | | | | |
| A. latiloba 1614 |G.....C..... | | | | | |
| A. sieheana 1527 |G..... | | | | | |
| A. santolinoides subsp. wilhel |G..... | | | | | |
| A. oligocephala 1635 |G..... | | | | | |
| A. schischkinii 2959a |G..... | | | | | |
| A. nobilis subsp. kurdica 1409 | .G.....C..... | | | | | |
| A. maritima subsp. maritima 19 |W.....T..... | | | | | |
| A. grandifolia 2254 | A.....G.....G..... | | | | | |
| A. millefolium 1429 |G.....C..... | | | | | |
| A. aleppica subsp. aleppica 13 |G..... | | | | | |
| A. coarctata 2671 | .R.....R.....Y..... | | | | | |
| A. teretifolia 8035 |G..... | | | | | |
| A. brachyphylla 15136 |G..... | | | | | |
| A. sintensisii 2080 |G..... | | | | | |
| A. biserrata 16676 |G.....C..... | | | | | |
| A. aleppica subsp. zederbaueri |G..... | | | | | |
| A. formosa subsp. amanica 2253 |G..... | | | | | |
| A. cretica 15634 |G..... | | | | | |

| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
|--------------------------------|------------|-----------|------------|-------------|------------|--------------|
| A. falcata 2558 | ATGAARAAMG | TAGCAAAAT | GSGATACTT | TGGTGKGAATT | GCAGAATCCC | GGGAACCATCGA |
| A. spinulifolia 2189 | | | | | T..... | ...S. |
| A. fraasii 2525 | | | | | T..... | |
| A. phrygia 2962 | | | | | T..... | |
| A. nobilis subsp. sipylea | | | | | T..... | |
| A. vermicularis 2559 | | | | | T..... | |
| A. sipikorensis 2206 | | | | | T..... | |
| A. kotschyi subsp. canescens 2 | | | | | T..... | |
| A. salicifolia subsp. salicifo | | | | | T..... | |
| A. monocephala 1584 | | | | | T..... | ...K. |
| A. crithmifolia 1552 | | | | | T..... | |
| A. arabica 1440 | | | | | T..... | |
| A. pannonica 2131 | | | | | T..... | |
| A. magnifica 2958 | | | | | W..... | |
| A. clypeolata 1546 | | | | | T..... | |
| A. tenuifolia 1427 | | | | | T..... | |
| A. ketenoglui 2219 | | | | | T..... | |
| A. milliana 1600 | | | | | T..... | |
| A. pseudoaleppica 2244 | | | | | T..... | |
| A. armenorum 1968 | | | | | T..... | |
| A. lycaonica 1377a | | | | | T..... | |
| A. membranacea 1385 | | | | | T..... | |
| A. boissieri 2594 | | | | | T..... | |
| A. culcullata 2083 | | | | | T..... | |
| A. nobilis subsp. neilreichii | | | | | T..... | |
| A. nobilis subsp. densissima 2 | | | | | T..... | |
| A. gypsicola 1560 | | | | | T..... | |
| A. gypsicola 2221 | | | | | T..... | |
| A. sivasica 2964 | | | | | T..... | |
| A. filipendulina 1625 | | | | | T..... | |
| A. formosa subsp. formosa 2991 | | | | | T..... | |
| A. hamzaoglui 2954 | | | | | T..... | |
| A. cappadocica 1567 | | | | | T..... | |
| A. setacea 2133 | | | | | T..... | |
| A. goniocephala 2957 | | | | | T..... | |
| A. latiloba 1614 | | | | | T..... | |
| A. sieheana 1527 | | T..... | | | T..... | |
| A. santolinoides subsp. wilhel | | | | | T..... | |
| A. oligocephala 1635 | | | | | T..... | |
| A. schischkinii 2959a | | | | | T..... | |
| A. nobilis subsp. kurdica 1409 | | | Y..... | | T..... | |
| A. maritima subsp. maritima 19 | | | | Y..... | T..... | |
| A. grandifolia 2254 | | | | | T..... | |
| A. millefolium 1429 | | | T..... | | W..... | |
| A. aleppica subsp. aleppica 13 | | | | | T..... | |
| A. coarctata 2671 | | ...K..... | ...KY..... | | W..... | |
| A. teretifolia 8035 | | | | | T..... | |
| A. brachyphylla 15136 | | | | | T..... | |
| A. sintenisii 2080 | | | | | T..... | |
| A. biserrata 16676 | | | | | T..... | |
| A. aleppica subsp. zederbaueri | | | | | T..... | |
| A. formosa subsp. amanica 2253 | | | | | T..... | |
| A. cretica 15634 | | | | | T..... | |

| | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
|--------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| A. falcata 2558 | GTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAACCTTTTGGCCMAGGGCMCGTCYGCCTGGGCGTC | | | | | |
| A. spinulifolia 2189 |K..K..... | | | | | |
| A. fraasii 2525 |G.....G..... | | | | | |
| A. phrygia 2962 |G.....G..... | | | | | |
| A. nobilis subsp. sipylea |G.....G..... | | | | | |
| A. vermicularis 2559 |G.....G.....C..... | | | | | |
| A. sipikorensis 2206 |G.....G..... | | | | | |
| A. kotschyi subsp. canescens 2 |G.....G..... | | | | | |
| A. salicifolia subsp. salicifo |G.....G..... | | | | | |
| A. monocephala 1584 |G.....G..... | | | | | |
| A. crithmifolia 1552 |G.....TG..... | | | | | |
| A. arabica 1440 |G.....G..... | | | | | |
| A. pannonica 2131 |G.....G..... | | | | | |
| A. magnifica 2958 |G.....G..... | | | | | |
| A. clypeolata 1546 |G.....G..... | | | | | |
| A. tenuifolia 1427 |G.....G..... | | | | | |
| A. ketenoglui 2219 |G.....G..... | | | | | |
| A. milliana 1600 |G.....G..... | | | | | |
| A. pseudoaleppica 2244 |G.....G..... | | | | | |
| A. armenorum 1968 |G.....G..... | | | | | |
| A. lycaonica 1377a |G.....TG..... | | | | | |
| A. membranacea 1385 |G.....G..... | | | | | |
| A. boissieri 2594 |G.....G..... | | | | | |
| A. culcullata 2083 |G.....G..... | | | | | |
| A. nobilis subsp. neilreichii |G.....G..... | | | | | |
| A. nobilis subsp. densissima 2 |G.....G..... | | | | | |
| A. gypsicola 1560 |G.....G..... | | | | | |
| A. gypsicola 2221 |G.....G..... | | | | | |
| A. sivasica 2964 |G.....G..... | | | | | |
| A. filipendulina 1625 |G.....G..... | | | | | |
| A. formosa subsp. formosa 2991 |G.....TG..... | | | | | |
| A. hamzaoglui 2954 |G.....G..... | | | | | |
| A. cappadocica 1567 |G.....G..... | | | | | |
| A. setacea 2133 |G.....G..... | | | | | |
| A. goniocephala 2957 |G.....G..... | | | | | |
| A. latiloba 1614 |G.....G..... | | | | | |
| A. sieheana 1527 |G.....G..... | | | | | |
| A. santolinoides subsp. wilhel |G.....TG..... | | | | | |
| A. oligocephala 1635 |G.....G..... | | | | | |
| A. schischkinii 2959a |G.....G..... | | | | | |
| A. nobilis subsp. kurdica 1409 |S.....G..... | | | | | |
| A. maritima subsp. maritima 19 |R.....G..... | | | | | |
| A. grandifolia 2254 |G.....G..... | | | | | |
| A. millefolium 1429 |T.....G..... | | | | | |
| A. aleppica subsp. aleppica 13 |R.....G.....TG.R..... | | | | | |
| A. coarctata 2671 |G.....G.....G..... | | | | | |
| A. teretifolia 8035 |G.....G..... | | | | | |
| A. brachyphylla 15136 |G.....TG..... | | | | | |
| A. sintenisii 2080 |G.....G..... | | | | | |
| A. biserrata 16676 |G.....G..... | | | | | |
| A. aleppica subsp. zederbaueri |G.....G..... | | | | | |
| A. formosa subsp. amanica 2253 |G.....TG..... | | | | | |
| A. cretica 15634 |G.....TG..... | | | | | |

| | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
|--------------------------------|-------------|----------------|---------|--------|-------|---------------|
| A. falcata 2558 | AMGCATCGCGT | CGCCCCCAACAAAT | TYTCTGT | | | T-GGGGGCGGATA |
| A. spinulifolia 2189 | | | | | | |
| A. fraasii 2525 | | | A..... | | | |
| A. phrygia 2962 | | | | | | |
| A. nobilis subsp. sipylea | | | A..... | | | |
| A. vermicularis 2559 | | M..... | | | | |
| A. sipikorensis 2206 | | | | | | |
| A. kotschyi subsp. canescens 2 | | | | | | |
| A. salicifolia subsp. salicifo | | | A..... | | | |
| A. monocephala 1584 | | | | | | |
| A. crithmifolia 1552 | | | G..T.. | | | |
| A. arabica 1440 | | | | | | |
| A. pannonica 2131 | | | | | | |
| A. magnifica 2958 | | | M..... | | | |
| A. clypeolata 1546 | | | | | | |
| A. tenuifolia 1427 | | | | | | |
| A. ketenoglui 2219 | | | | | | |
| A. milliana 1600 | | | | | | |
| A. pseudoaleppica 2244 | | | | | | |
| A. armenorum 1968 | | | | | | |
| A. lycaonica 1377a | | | | | | |
| A. membranacea 1385 | | | | T..... | | |
| A. boissieri 2594 | | | | | | |
| A. culcullata 2083 | | | | | | |
| A. nobilis subsp. neilreichii | | | A.A... | | | |
| A. nobilis subsp. densissima 2 | | | A..... | | | |
| A. gypsicola 1560 | | | | T..... | | |
| A. gypsicola 2221 | | | | | | |
| A. sivasica 2964 | | | | | | |
| A. filipendulina 1625 | | | A..... | | | |
| A. formosa subsp. formosa 2991 | | T..... | | A..... | | |
| A. hamzaoglui 2954 | | | | | | |
| A. cappadocica 1567 | | | | | | |
| A. setacea 2133 | | | | A.T... | | |
| A. goniocephala 2957 | | | | | | |
| A. latiloba 1614 | | | | A..... | | |
| A. sieheana 1527 | | T..... | | | | |
| A. santolinoides subsp. wilhel | | | G..T.. | | | |
| A. oligocephala 1635 | | | | T..... | | |
| A. schischkinii 2959a | | | | | | |
| A. nobilis subsp. kurdica 1409 | | | | A.T... | | |
| A. maritima subsp. maritima 19 | | K..... | T..... | CA... | | |
| A. grandifolia 2254 | | | | T..... | | |
| A. millefolium 1429 | | | | A.T... | | |
| A. aleppica subsp. aleppica 13 | | | | | | |
| A. coarctata 2671 | | | | A.Y... | | |
| A. teretifolia 8035 | | | | | | |
| A. brachyphylla 15136 | | | | T..... | | |
| A. sintensis 2080 | | | | | | |
| A. biserrata 16676 | | | | | | |
| A. aleppica subsp. zederbaueri | | | | | | |
| A. formosa subsp. amanica 2253 | | | | A..... | | |
| A. cretica 15634 | | | | | | |

| | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 |
|--------------------------------|----------------|-------------|---------------|----------------|-----|
| A. falcata 2558 | TTGGTCTCCCGKGC | TGATGGTGKGG | TTGGCCAAAATAG | AAGTCCCTTCGAW | |
| A. spinulifolia 2189 | | | | ..RG.....S.. | |
| A. fraasii 2525 | | | | ..AG..... | |
| A. phrygia 2962 | | | | ..G..... | |
| A. nobilis subsp. sipylea | | | | ..AG..... | |
| A. vermicularis 2559 | | | | ..G...T..Y.T.. | |
| A. sipikorensis 2206 | | | | ..G..... | |
| A. kotschyi subsp. canescens 2 | | | | ..G..... | |
| A. salicifolia subsp. salicifo | | | | ..G..... | |
| A. monocephala 1584 | | | | ..G.....R.. | |
| A. crithmifolia 1552 | | | | ..G.....C | |
| A. arabica 1440 | | | | ..G..... | |
| A. pannonica 2131 | | | | ..G..... | |
| A. magnifica 2958 | | | | ..G..... | |
| A. clypeolata 1546 | | | | ..G..... | |
| A. tenuifolia 1427 | | | | ..G..... | |
| A. ketenoglui 2219 | | | | ..G..... | |
| A. milliana 1600 | | | | ..G..... | |
| A. pseudoaleppica 2244 | | | | ..G..... | |
| A. armenorum 1968 | | | | ..G..... | |
| A. lycaonica 1377a | | | | ..G..... | |
| A. membranacea 1385 | | ..C..... | | ..TG..... | |
| A. boissieri 2594 | | | | ..G..... | |
| A. culcullata 2083 | | | | ..G..... | |
| A. nobilis subsp. neilreichii | | | | ..G..... | |
| A. nobilis subsp. densissima 2 | | | | ..AG.....G | |
| A. gypsicola 1560 | | | | ..G..... | |
| A. gypsicola 2221 | | | | ..G..... | |
| A. sivasica 2964 | | | | ..G..... | |
| A. filipendulina 1625 | | | | ..G..... | |
| A. formosa subsp. formosa 2991 | | | | ..G.....AG. | |
| A. hamzaoglui 2954 | | | | ..G.A..... | |
| A. cappadocica 1567 | | | | ..G..... | |
| A. setacea 2133 | | | | ..AG..... | |
| A. goniocephala 2957 | | | | ..G..... | |
| A. latiloba 1614 | | | | ..G..... | |
| A. sieheana 1527 | | | | ..G.....A.. | |
| A. santolinoides subsp. wilhel | | | | ..G.....C | |
| A. oligocephala 1635 | | ..K..... | | ..TG.A..... | |
| A. schischkinii 2959a | | | | ..G.A..... | |
| A. nobilis subsp. kurdica 1409 | | ..Y..... | ..M..... | ..RGT..... | |
| A. maritima subsp. maritima 19 | | ..T..... | ..C.T..... | ..G..... | |
| A. grandifolia 2254 | | ..C..... | | ..G..... | |
| A. millefolium 1429 | | | | ..AR..... | |
| A. aleppica subsp. aleppica 13 | | | | ..TG..... | |
| A. coarctata 2671 | | ..T..Y..... | ..MC..TA.. | | |
| A. teretifolia 8035 | | | | ..G..... | |
| A. brachyphylla 15136 | | ..C..... | | ..G..... | |
| A. sintenisii 2080 | | | | ..G..... | |
| A. biserrata 16676 | | | | ..G..... | |
| A. aleppica subsp. zederbaueri | | | | | |
| A. formosa subsp. amanica 2253 | | | | ..AG.C..... | |
| A. cretica 15634 | | | | ..G..... | |

EK.3.Etik Kurul Onayı Gerekmediğine Dair Yazı

Çalışma konusunu Bitki Materyali oluşturduğundan dolayı Resmi Gazetenin 13 Nisan 2013 tarih ve 28617 sayılı “Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelikte” belirtilen Etik Kurul Onay Belgesine gerek bulunmamaktadır.