



***Centaurea* Cinsine Ait Beş Türün trnT-L-F cpDNA Bölgesi Kullanılarak Filogenetik İlişkilerinin Belirlenmesi**

Ayşenur KALMER¹, Ayten DİZKIRICI TEKPINAR^{1*}

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van / TÜRKİYE

Received: 17.05.2017; Accepted: 21.11.2017

<http://dx.doi.org/10.17776/cs.j.363294>

Özet: Asteraceae familyasına ait *Centaurea* L. cinsi sistematik açıdan tartışmaları barındıran ve son yıllarda gelişen moleküler tekniklerin ışığında taksonomik problemleri aydınlatılması gereken bir cinstir. Özellikle *Centaurea depressa* türünün taksonomik konumu tartışmalı olup bazı araştırmacılar tarafından *Cyanus* cinsinde olması gerektiği iddia edilmiştir. Bu problemi açığa kavuşturmak için, cinse ait beş türün (*C. depressa*, *C. iberica*, *C. solstitialis*, *C. virgata*, *C. balsamita*) filogenetik ilişkileri kloroplast DNA'sında bulunan ve filogenetik çalışmalarda tercih edilen trnT^(UGU) - trnL^(UAA) IGS, trnL5'- trnL3' intron ve trnL^(UAA) - trnF^(GAA) IGS bölgeleri kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Cinse ait bazı türlerin DNA sekansları NCBI veri tabanından alınarak analizlere eklenmiş ve hem *C. depressa*'nın hem de çalışılan diğer dört türün cins içindeki evrimsel ilişkileri aydınlatılmaya çalışılmıştır. Maksimum Olasılık (ML) ve Maksimum Parsimoni (MP) metodlarıyla filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. trnT^(UGU) - trnL^(UAA) ve trnL5'- trnL3' intron bölgeleri için oluşturulan ağaçlarda *C. depressa* türü diğer akraba türlerden filogenetik olarak ayrılmamıştır. trnL^(UAA) - trnF^(GAA) IGS bölgesinde yeterli kalitede sekanslar elde edilemediğinden çalışmamızda bu bölge detaylandırılmamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Centaurea*, filogeni, trnT^(UGU) - trnL^(UAA), trnL5'- trnL3' intron, trnL^(UAA) - trnF^(GAA) IGS

Determination of Phylogenetic Relationships of Five Species of *Centaurea* Genus by Using trnT-L-F cpDNA Region

Abstract: The genus *Centaurea* L., belonging to Asteraceae family, contains systematic controversies and these taxonomic problems must be illuminated in the light of the molecular techniques developed in recent years. Especially, taxonomic position of *Centaurea depressa* is controversial and moving of this species to *Cyanus* genus is claimed by several researchers. To solve this problem, phylogenetic relationships of five species (*C. depressa*, *C. iberica*, *C. solstitialis*, *C. virgata*, *C. balsamita*) were tried to be determined by using the trnT^(UGU) - trnL^(UAA), trnL5'- trnL3' intron and trnL^(UAA) - trnF^(GAA) IGS regions which are found in the chloroplast DNA and are preferred for phylogenetic studies. DNA sequences of other species belonging to the genus *Centaurea* were retrieved from NCBI database and analyzed to clarify the evolutionary relationships of not only *C. depressa* but also the other four species. Phylogenetic trees were constructed by using Maximum Likelihood (ML) and Maksimum Parsimony (MP) methods. That's why, the data obtained from the trnL-trnF region will not be shared. *Centaurea depressa* is not phylogenetically separated from other related species in the trees constructed by using trnT^(UGU) - trnL^(UAA) and trnL5'- trnL3' intron regions. DNA sequences obtained from trnL^(UAA) - trnF^(GAA) IGS region are not clear so this region is not elaborated.

Keywords: *Centaurea*, phylogeny, trnT^(UGU) - trnL^(UAA) IGS, trnL5'-trnL3' intron, trnL^(UAA)-trnF^(GAA) IGS

1. GİRİŞ

Centaurea L. cinsi Asteraceae familyasında en fazla çeşitlilik gösteren cinslerden biridir [1]. Türkiye’de 178 [2] dünyada ise 400-600 arasında takson sayısı içerdiği belirtilmiştir [3,4,5]. Türler arası evrimsel ilişkilerinin belirlenmesinin zor olduğu düşünülen cinslerden biridir [6]. Son yirmi yılda *Centaurea* sistematığı özellikle moleküler tekniklerin gelişmesiyle değişmiş ve bazı problemler çözüme kavuşmuştur [7]. Garcia-Jacas ve ark. [8] yaptıkları kapsamlı çalışmada moleküler düzeyde cinsin sınırlarını belirlemeye çalışmışlar ama hala bazı problemlerin cevapsız kaldığını belirtmişlerdir.

Bitki organel genomları (kloroplast ve mitokondriyal DNA) populasyon genetiği çalışmaları ve filogenetik ilişkilerin ortaya çıkarılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [10]. Kloroplast genomunda bulunan ve kodlama yapmayan bölgeler, moleküler sistematik ve bitkilerle ilgili populasyon genetik çalışmaları için sıklıkla tercih edilirler [11]. Kodlanmayan DNA bölgeleri yüksek derecede mutasyon göstermektedir. Bu sebeple evrimsel ilişkilerin gösterilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [12]. Kloroplast DNA’sında bulunan ve kodlanmayan bölgelerden biri tRNA’dır ve evrimsel ilişkilerin belirlenmesinde kullanılmaktadır [12,13]. Bu bölgelerden sık tercih edilenler trnT^(UGU) - trnL^(UAA) IGS, trnL5’-trnL3’ intron ve trnL^(UAA) - trnF^(GAA) IGS bölgeleridir. Çalışmamızda *Centaurea* cinsine ait beş türün (*C. depressa*, *C. virgata*, *C. iberica*, *C. solstitialis* ve *C. balsamita*) filogenetik ilişkileri

bu üç bölge kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Kullanılan türlerden *Centaurea depressa* Garcia-Jacas ve ekibi tarafından [9] ITS ve matK gen bölgelerinin analizi sonucu *Cyanus* grubu içerisinde gösterilmiş, Güner ve arkadaşları tarafından da [14] *Cyanus depressus* olarak isimlendirilmiştir. Yaptığımız çalışmada amacımız bu iddiaları değerlendirmek ve cpDNA gen bölgeleri üzerinden türlerin cins içerisindeki filogenetik ilişkilerini belirlemektir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Bitki Materyalleri

Centaurea türlerine ait örnekler Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Kampüs alanından toplanarak Dr. Mesut Pınar ve Hüseyin Eroğlu tarafından morfolojik veriler kullanılarak teşhis edilmiştir. Teşhis işlemleri kapitulum özellikleri, çiçek rengi, filleri yapıları, aken ve pappus özellikleri ile yaprak ve gövde özellikleri gibi morfolojik karakterlere bakılarak yapılmıştır. Örneklerin teşhisi sırasında Türkiye Florasının 5. cildi kullanılmıştır. Tablo 1’de çalışılan *Centaurea* cinsine ait türlerin isimleri ve her bir türün trnL5’-trnL3’ intron bölgesine ait NCBI numaraları yer almaktadır. PZR çalışmaları ile hedef bölgelerin çoğaltıldığından emin olmak ve türler arası evrimsel ilişkileri en iyi şekilde yansıtabilmek için NCBI veri tabanında bulunan cinse ait diğer türler de analize dahil edilmiştir. Güvenilir sonuçlar elde etmek için çalışılan her bir tür için ikişer örnekten DNA dizileri elde edilmiştir.

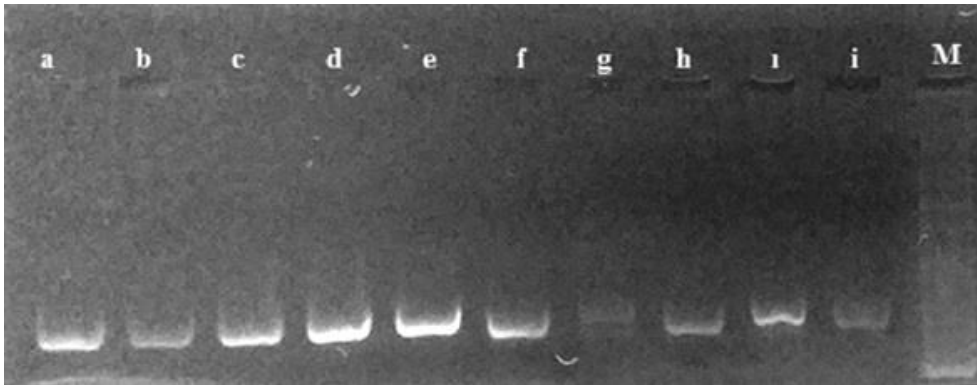
Tablo 1. Çalışmamızda kullanılan *Centaurea* türleri, yaygın isimleri, lokasyonları ve her bir türün trnL5’-trnL3’ intron bölgesine ait NCBI numaraları.

Takson isimleri	Yaygın isim	Lokalite	trnL5’-trnL3’ intron
<i>Centaurea balsamita</i> Lam.	Süslü sarıbaş	YYÜ Kampüs	MF065989
<i>Centaurea solstitialis</i> L.	Çakır diken	YYÜ Kampüs	MF065988
<i>Centaurea iberica</i> Trev. ex Sprengel	Deligözdikeni	YYÜ Kampüs	MF065987
<i>Centaurea virgata</i> Lam.	Acı süpürge	YYÜ Kampüs	MF065986
<i>Centaurea depressa</i> M.Bieb.	Gökbaş	YYÜ Kampüs	MF065985
(Sinonim: <i>Cyanus depressus</i> (M. Bieb.) Soják)			

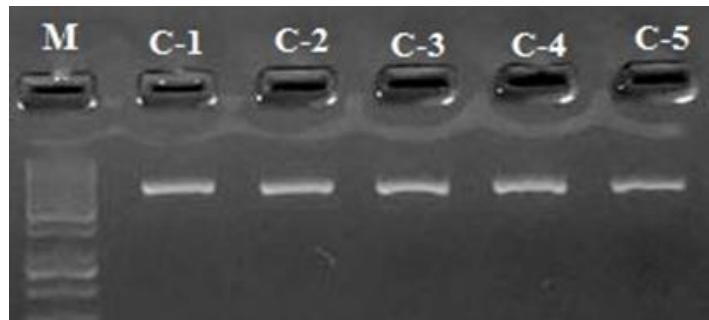
2.2. DNA İzolasyonu, PZR Amplifikasyonu ve Sekanslama

Doyle ve Doyle methodu modifiye edilerek her bir örneğin genomik DNA izolasyonu yapılmıştır [15]. DNA'nın saflığı ve miktarı NanoDrop 2000c UV-Vis Spektrofotometre kullanılarak belirlenmiş ve büyüklüğü % 0.8'lik agaroz jel kullanılarak görüntülenmiştir. Genomik DNA üzerinde hedeflenen bölgelerin çoğaltılabilmesi (amplifikasyon) için spesifik primer çiftleri kullanılmıştır; trnT^(UGU) - trnL^(UAA) bölgesi için trna (F) 5' CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT 3' , trnb (R) 5' TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC 3' , trnL5'-trnL3' intron bölgesi için trnc (F) 5' CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG 3' , trnd (R) 5' GGG GAT AGA GG ACT TGA AC 3' , trnL^(UAA) - trnF^(GAA) IGS bölgesi için ise trne (F) 5' GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC 3' , trnf (R) 5' ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG 3' primer çiftleri kullanılmıştır [12]. Bölgelerin

çoğaltılması işlemi için 25 µl'lik reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Her bir karışım için optimize edilmiş miktarlarda steril su, total DNA (10 ng/µl), 10X PZR Tampon, MgCl₂ (25 mM), dNTP (10 mM), spesifik primer çiftleri (10 µM) ve Taq polimeraz (5u/µl) enzimi kullanılmıştır. PZR uygulamasından sonra gen bölgelerinin çoğaltıldığından emin olmak için ürünler % 1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve UV cihazı altında bantlar görüntülenmiştir (Şekil 1-2). DNA dizilerinin alınması için PZR ürünleri özel bir firmaya gönderilmiştir (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Elde edilen cpDNA bölge dizileri Finch TV programı yardımıyla görünür hale getirilmiş ve her bireye ait forward ve reverse dizileri MEGA 5.0 [16] programı ile karşılaştırılarak konsensus diziler oluşturulmuştur (<http://www.geospiza.com>).



Şekil 1. *Centaurea* türlerinin PZR ürünlerine ait %1'lik jel görüntüsü (a-e; trnL5'-trnL3' intron- f-i; trnL^(UAA)- trnF^(GAA) IGS bölgesi, M; Thermo Scientific GeneRuler marker). a-e ve f-i sırasıyla *C. depressa*, *C. iberica*, *C. solstitialis*, *C. virgata*, *C. Balsamita*..



Şekil 2. *Centaurea* türlerinin PZR ürünlerine ait %1'lik jel görüntüsü (trnT^(UGU) - trnL^(UAA) IGS bölgesi, M; Thermo Scientific GeneRuler marker). C1-C5 sırasıyla *C. depressa*, *C. iberica*, *C. solstitialis*, *C. virgata*, *C. Balsamita*..

2.3. Filogenetik Analiz

Elde edilen DNA dizileri ile NCBI veri tabanından alınan *Centaurea* cinsine ait diğer türlerin DNA dizileri kombine edilerek analizleri yapılmıştır. MEGA 5.0 [16] programı kullanılarak tüm diziler ClustalW metodu ile hizalanmış ve total nükleotit uzunluğu (baz çifti, bç), indel sayısı, parsimoni informatif bölge sayısı ve nükleotid varyasyonu hesaplanmıştır (Tablo 2). trnT^(UGU) - trnL^(UAA) IGS, trnL5'-trnL3' intron bölgelerinin analizlerine devam edilmiş ve filogenetik ağaçların çizilmesi esnasında MEGA 5.0 programı ile Tamura-Nei [17] modelini kullanan Maximum Likelihood (ML) methodu ile Maksimum Parsimony (MP) kullanılmıştır. Elde edilen ağaçların güvenilirliğini artırmak için ise 1000 replikasyonlu bootstrap analizi tercih edilmiştir [18].

3. SONUÇLAR

Kloroplast DNA'sında bulunan trnT^(UGU) - trnL^(UAA) IGS, trnL5'-trnL3' intron ve trnL^(UAA) - trnF^(GAA) IGS bölgelerinden DNA dizileri elde edilmiştir. trnT^(UGU) - trnL^(UAA) bölgesinin analizi için NCBI veri tabanından 9 *Centaurea* türüne ait DNA dizisi (*C. toletana* FJ775985, *C. horrida* KF630479, *C. filiformis* KF630503, *C. montana* HM002841, *C. diffusa* AY316668, *C. maculosa* AY316670, *C. cyanus* HM002826, *C. stoebe* JN053412, *C. stoebe* JF960868) ile çalıştığımız türlerin birlikte analizi yapılmıştır. Veri tabanında çalıştığımız türlere ait sekanslar mevcut olmadığından analize eklenememiştir. trnT^(UGU) - trnL^(UAA) bölgesinin uzunluğu NCBI'dan alınan örnekler de dahil edildiğinde 511 bç olarak hesaplanmıştır. Analiz sonunda 9'u parsimoni

informatif olan 15 varyasyon saptanmıştır (Tablo 2).

trnL5'-trnL3' intron bölgesi için NCBI veri tabanından alınan 10 *Centaurea* türüne ait DNA dizisi (*C. phrygia* HM590263, *C. diffusa* AY316653, *C. iberica* KC969570, *C. solstitialis* KC969575, *C. depressa* AY772297, *C. virgata* KC969578, *C. bruguierana* AY772295, *C. pectinata* KY697477, *C. parlatoris* KC969573, *C. diluta* KC969569) ile çalışmamız sonucunda elde edilen 5 türe ait DNA dizileri beraber analiz edilmiştir. *C. balsamita* türünün trnL5'-trnL3' intron bölgesine ait DNA dizisi veri tabanında bulunmadığından analize ilave edilememiştir. trnL intron bölgesinin uzunluğu NCBI'dan alınan örnekler de dahil edildiğinde 433 bç olarak hesaplanmıştır. Tüm bireyler dahil edilerek analiz yapıldığında 2'si parsimoni informatif olan 8 varyasyon saptanmıştır (Tablo 2).

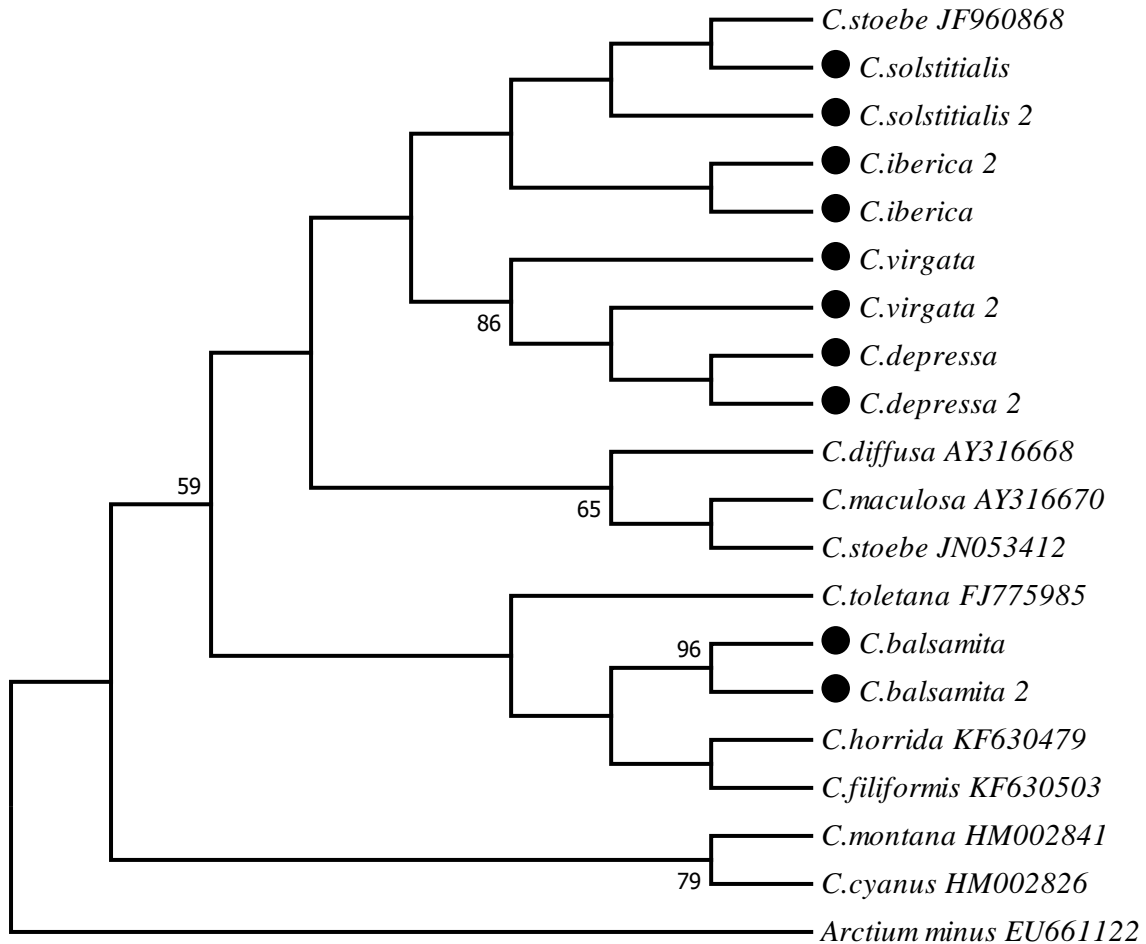
trnL^(UAA) - trnF^(GAA) IGS bölgesi için NCBI veritabanından alınan 7 *Centaurea* türüne ait kloroplast DNA dizisi (*C. depressa* AY772297, *C. diffusa* AY316653, *C. tweediei* JF775384, *C. iberica* KC969570, *C. solstitialis* KC969575, *C. virgata* KC969578, *C. bruguierana* AY772295) ile 5 türümüze ait DNA dizileri analize tabi tutulmuştur. Bu bölgenin uzunluğu NCBI'dan alınan örnekler de dahil edildiğinde elde edilen uzunluk 305 bç olarak hesaplanmıştır. Tüm bireyler dahil edilerek analiz yapıldığında 8 parsimoni informatif olan 24 varyasyon saptanmıştır (Tablo 2). Ancak bölgeden elde edilen DNA dizisinin filogenetik ağacı çizmek için yeterli güvenilirlikte olmamasından dolayı ileri analizler yapılmamıştır. Deneyler tekrarlanmış olsa da benzer sonuçlar alınmıştır.

Tablo 2. trnT^(UGU) - trnL^(UAA) IGS, trnL5'-trnL3' intron ve trnL^(UAA) - trnF^(GAA) IGS bölgeleri için hesaplanan moleküler çeşitlilik parametreleri (Bütün hesaplamalar NCBI'dan alınan DNA sekansları dahil edilerek yapılmıştır).

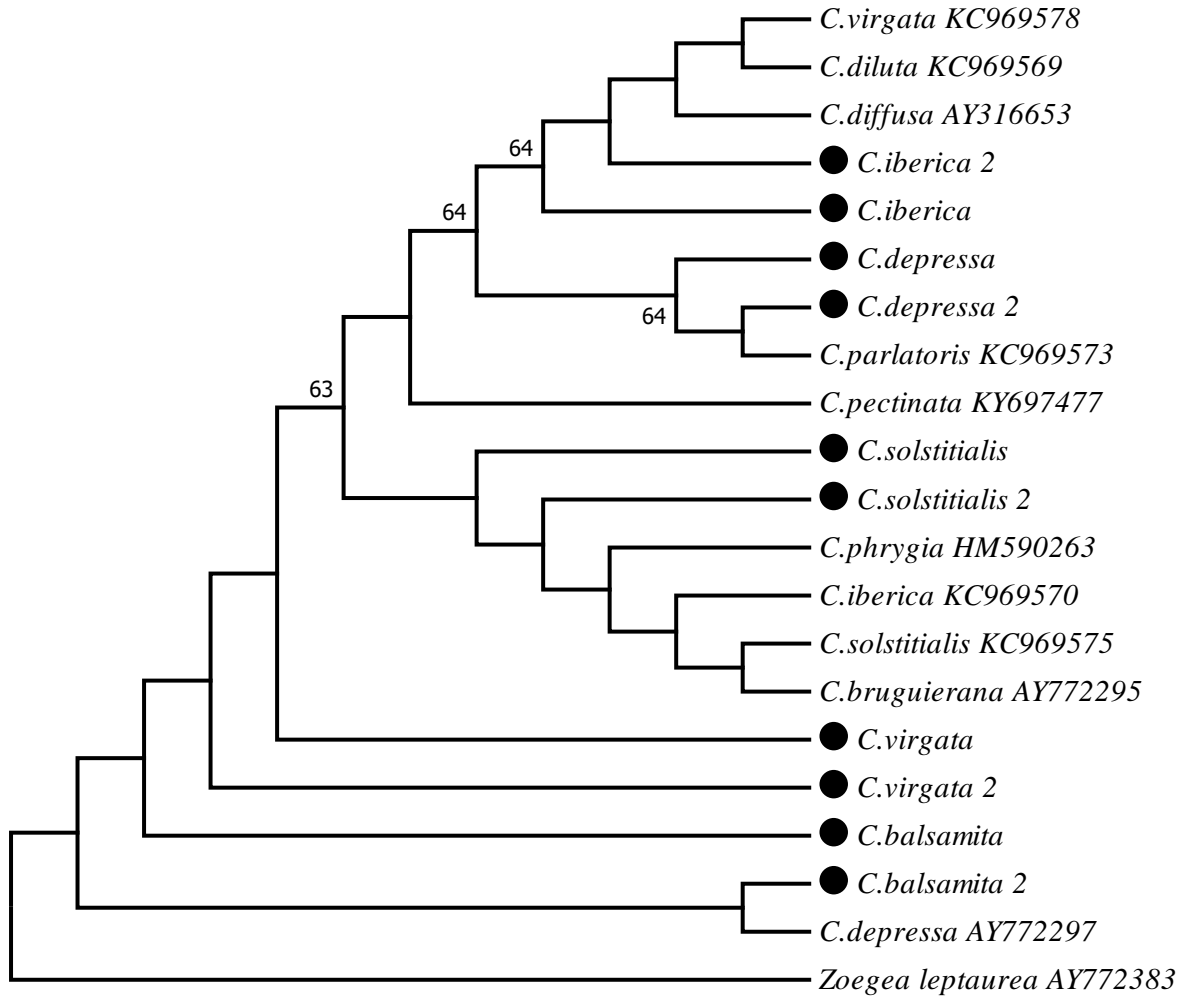
Parametreler	trnT ^(UGU) - trnL ^(UAA)	trnL intron	trnL ^(UAA) - trnF ^(GAA)
Takson sayısı	13	12	8
Sekans sayısı	19	20	12
Total uzunluk (bç)	511	433	305
Varyasyon	15	2	24
Parsimoni informatif sayısı	9	2	8
İndel sayısı (bç)	16	2	28
Ortalama uzaklık	0.008	0.002	0.032

trnT^(UGU) - trnL^(UAA) IGS için oluşturulan filogenetik ağaçta dış grup olarak NCBI veri tabanından alınan *Arctium minus* (EU661122) [9], trnL5'-trnL3' intron bölgesi için oluşturulan filogenetik ağaçta ise dış grup olarak *Zoega lepturea* (AY772383) türlerine ait diziler [9] kullanılmıştır. Çalışılan türlerden elde edilen DNA dizileri ile aynı türlerin NCBI veri tabanından alınan dizileri hizalandığında birebir aynı olmadığı ve diziler arasında bazı varyasyonların görüldüğü saptanmıştır. Her iki

bölgeden elde edilen ağaçta, taksonomik pozisyonu hakkında farklı görüşlerin olduğu *C. depressa* türünün filogenetik ilişkilerine özellikle dikkat edilmiştir. Garcia-Jacas [9] ve Güner'in [14] iddiasından farklı olarak *C. depressa* türü kloroplast DNA'sında bulunan iki farklı bölgeden elde edilen DNA dizileri dikkate alındığında *Centaurea* cinsine ait olan diğer türlerden ayrılmamıştır.



Şekil 3. trnT^(UGU) - trnL^(UAA) bölgesi kullanılarak ML metodu ile çizilen filogenetik ağaç. Uzantıların üstünde rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir. *Arctium minus* dış grup, siyah yuvarlak şekiller çalışmada kullanılan türler.



Şekil 4. trnL5'-trnL3' intron bölgesi kullanılarak ML metodu ile çizilen filogenetik ağaç. Uzantıların üstünde rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir. *Zoegia leptaura* dış grup, siyah yuvarlak şekiller çalışmada kullanılan türler.

4. TARTIŞMA

Birçok araştırmacı tarafından çalışılan *Centaurea* cinsinin taksonomik bazı problemleri çözülmüş ancak hala birtakım problemleri olduğu belirtilmiştir [7,8,19]. Bu problemlerden biri *Centaurea depressa* türünün Güner ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan morfolojik verilere dayalı çalışmalarında *Cyanus depressus* olarak *Cyanus* cinsine aktarıldığını iddia etmeleridir. Bu iddia moleküler verilerle desteklenmediği sürece bir problem teşkil etmeye devam edecektir. Kloroplast genomunda bulunan ve kodlama yapmayan bölgeler yüksek derecede mutasyon göstermektedir. Evrimsel ilişkilerin aydınlatılmasında bu bölgelerdeki mutasyonlar belirleyici olmaktadır. Çalışmamızda Güner ve

arkadaşlarının iddiasını değerlendirmek için cpDNA verilerine dayalı filogenetik analizler yapılmış ve oluşturulan filogenetik ağaçlarda bu türün cins içerisinde yer aldığı gösterilmiştir.

C. depressa türüne ait NCBI veri tabanında bulunan dizi verisi trnL5'-trnL3' intron bölgesi analizine dahil edilmiş ve her ne kadar çalışmamızda kullanılan *C. depressa* örneğinden uzak konum olsa da hala cins içerisinde yer aldığı gösterilmiştir. trnL5'-trnL3' intron ağacında *C. virgata* ve *C. balsamita* türlerinde varyasyonlar saptanmış ve diğer türlerden evrimsel seviyede ayrılmalarına neden olmuştur. trnT^(UGU) - trnL^(UAA) IGS ağacında ise çalışılan türler birbirlerine yakın konumda yer almışlar ve *C. depressa* türü cins içinde yer almıştır. Ayrıca ITS nrDNA ve matK

cpDNA bölgeleri kullanarak yapılan diğer çalışmamızda da *C. depressa* türü yine cins içerisinde yer almış ve *C. balsamita* türü en fazla varyasyon göstererek ağaca dışardan bağlanan tür olmuştur [20]. Güner ve arkadaşları tarafından *C. depressa* türünün *Cyanus depressus* ile sinonim olarak kabul edilip *Cyanus* cinsine aktarıldığı iddialarından ötürü, çalışılan türler içerisinde beklenen durum *C. depressa* türünün diğerlerinden farklılaşarak ayrı gruplanmasıydı fakat Şekil 3-4'te görüldüğü gibi çalışmamızda kullanılan *C. depressa* türü cins içerisinde konumlanmış ve diğerlerinden farklılık göstermemiştir. Özellikle trnT^(UGU) - trnL^(UAA) IGS ağacında bu durum net görülmektedir. Oluşan ağaçta iki ana klad belirlenmiş ve kladlardan birinde çalışılan türler grup oluştururken diğerinde sadece *C. cyanus* (HM002826) ve *C. montana* (HM002841) yer almıştır (Şekil 3). Burada dikkat çeken kısım *C. depressa* türünün çalışılan diğer türlerle birlikte gruplanmasıdır. Yani ağaca dışardan bağlanması beklenen *C. depressa* cins içerisinde yer almıştır. Eğer Güner ve ark. [14] ifade ettiği gibi *C. depressa* türü *Cyanus* cinsinde yer almış olsaydı diğer türlerden evrimsel olarak ayrılması ve ağaca dışardan bağlanması beklenirdi. Yapılan tüm çalışmalar dikkate alındığında çekirdek (ITS) ve kloroplast DNA'sında bulunan bölgelerin benzer sonucu vererek *C. depressa* türünün bu cins içinde kalması gerektiğini ispatlamış ve moleküler seviyede başka bir cinse aktarılmasını destekleyecek kadar varyasyon görülmemiştir. Cins içerisinde var olan bu tarz taksonomik problemleri aydınlatmak ve sinonim belirleyebilmek için hem morfolojik hem de moleküler verilerin birlikte analizinin yapılması gereklidir. Taksonomi alanında artık sadece morfolojik verilerle oluşturulan hipotezlerin geçerliliği sınırlı kalabilmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FAP-2016-5598 nolu Araştırma Potansiyelinin Geliştirilmesi Desteği kapsamında desteklenmiştir. Bitki örneklerinin teşhisinde yardımlarını esirgemeyen Dr. Mesut Pınar ve Hüseyin Eroğlu ile laboratuvar çalışmalarına katkılarından dolayı Oktay Yiğit'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1]. Susanna A., Garcia-Jacas N., Tribe Cardueae. In: Kadereit, J.W. & Jeffrey, C. (eds.) The families and genera of vascular plants 8. Springer-Verlag, Berlin 2007; 123-147.
- [2]. Davis P.H., Flora of Turkey and The East Aegean Islands Vol. 10, Edinburgh University Press, Edinburgh 1988; p. 431-463.
- [3]. Dittrich M., Cynareae systematic review. In: Heywood VH, Harborne JB, Turner BL, eds. The biology and chemistry of the Compositae London, New York, San Francisco: Academic Press 1977; 999-1015.
- [4]. Bremer K., Asteraceae. Cladistics & classification. Portland 1994; Timber Press.
- [5]. Wagenitz G, Hellwig FH., Evolution of characters and Phylogeny of the Centaureinae. In: Hind DJN, Beentje HG, eds. Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew Kew: Royal Botanic Gardens 1996; 491-510.
- [6]. Alvarado J.V., *Centaurea* L. sect. *Phrygia* Pers.: Phylogeny and Biogeography 2011; Università degli Studi di Sassari (doktora tezi), Sassari Üniversitesi, İtalya.
- [7]. Hilphold A., Vilatersana R., Susanna A., Meseguer S.A., Borsic I., Constantinidis T., Filigheddu R., Romaschenko K., Suarez-Santiago N.V., Tugay O., Uysal T., Pfeil E.B., Garcia-Jacas N. Phylogeny of the *Centaurea* group (*Centaurea*, Compositae)-geography is a better predictor than

- morphology Molecular Phylogenetics and Evolution 2014; 77: 195-215.
- [8]. Garcia-Jacas N., Uysal T., Romashchenko, K., Suarez-santiago V.N., Ertuğrul K., Susanna A. *Centaurea Revisited: A Molecular Survey of the Jacea Group*. Annals of Botany 2006; 98: 741-753.
- [9]. Garcia-Jacas N., Susanna A., Garnatje T., Vılatersana R. *Generic Delimitation and Phylogeny of the Subtribe Centaureinae (Asteraceae): A Combined Nuclear and Chloroplast DNA Analysis*. Annals of Botany 2001; 87: 503-515.
- [10]. Soltis D.E., Soltis P.S., Milligan B.G. *Intra specific chloroplast DNA variation: systematics and phylogenetic implications*. In: Soltis P.S., Soltis D.E. (eds.) *Molecular plant systematics*, Chapman and Hall, New York 1992; 117–150.
- [11]. Shaw J., Lickey E.B., Schilling E.E., Small R.L. *Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III* American J. Bot. 2006; 94:3 275-288.
- [12]. Taberlet P., Gielly L., Pantaou G., Bouvet J. *Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA* Plant Mol. Biol. 1991; 17: 1105-1109.
- [13]. Kelchner Scot A. *The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics*”, Chap. 87. Annals of the Missouri Botanical Garden 2000; 482-498.
- [14]. Güner A., Aslan S., Ekim T., Vural M., Babaç M. T. *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*”, İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. 2012.
- [15]. Doyle J.J., Doyle J.L. *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*”. Phytochemical Bulletin 1987; 19: 11-15.
- [16]. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. *MEGA 5: molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*. Molec. Biol. Evol. 2011; 28: 2731-2739.
- [17]. Tamura K., Nei M. *Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees*”. Molecular Biology and Evolution 1993; 10: 512-526.
- [18]. Felsenstein J. *Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap*”. Evolution 1985; 39: 783-791.
- [19]. Font M., Garnatje T., Garcia-Jacas N., Susanna A. *Delineation and Phylogeny of Centaurea sect. Acrocentron based on DNA sequence: a restoration of the genus Crocodylium and indirect evidence of introgression* Plant Sistematic and Evolution 2002; 234: 15-26.
- [20]. Dizkırıcı A., Köroğlu Z. *Van İlinde Bulunan Centaurea Cinsine Ait Bazı Türlerinin Filogenetik İlişkilerinin ITS ve MatK Bölgeleri Kullanılarak Belirlenmesi* 2017; DOI: 10.19113/sdufbed.39508