Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi
Cilt **, Sayı *, **-**, 20**

Süleyman Demirel University
Journal of Natural and Applied Sciences
Volume **, Issue *, **-**, 20**

DOI: 10.19113/sdufbed.39508

Van İlinde Bulunan *Centaurea* Cinsine Ait Beş Türün Moleküler Analizi ve *Centaurea depressa*' nın Taksonomik Pozisyonunun Belirlenmesi

Ayten DIZKIRICI*[1], Zeynep KOROGLU[1]

[1]Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 65080, Van

(Alınış / Received: 17.03.2017, Kabul / Accepted: 25.05.2017, Online Yayınlanma / Published Online: 10.06.2017)

Anahtar Kelimeler
Centaurea,
ITS,
matK,
Filogeni

Özet: Bu çalışmada, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi kampüsünde doğal olarak yetişen *Centaurea* cinsine ait beş farklı türün (*C. depressa, C. virgata, C. iberica, C. solstitialis ve C. balsamita*) filogenetik ilişkileri çalışılarak taksonomik açıdan akrabalık dereceleri belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca, bazı araştırmacılar tarafından *C. depressa* türünün *Cyanus* cinsi içerisine aktarılmasının moleküler seviyede desteklenip desteklenmediği de tartışılmıştır. Moleküler belirteç olarak, evrimsel çalışmalarda en fazla tercih edilen ve nüklear DNA'da bulunan ITS ve kloroplast DNA'da bulunan matK bölgeleri kullanılmıştır. Çalışılan türlerin teşhisinden emin olmak ve daha önceki çalışılan türlerle olan ilişkilerini de göstermek için NCBI veritabanından ilave sekanslar alınmıştır. ITS bölgesi ITS1, 5.8S ve ITS2 alt bölgelerini kapsamakta olup yaklaşık 630 baz çifti, matK bölgesi ise tamamen ekson bölgesinden oluşan yaklaşık 1200 baz çifti uzunluğundadır. ITS bölgesinde 100'den fazla, matK bölgesinde ise 24 nükleotit varyasyonu görülmüştür. ITS ve matK bölgeleri dizileri birleştirilerek yapılandırılan UPGMA ağacında, *Cyanus* cinsine transfer edilen *C. depressa* değil, *C. balsamita* türü evrimsel olarak uzak konumlanmıştır. Bu sonuçlar dikkate alındığında *C. depressa* türünün *Centaurea* cinsten çıkarılarak *Cyanus* cinsine aktarılması moleküler seviyede desteklenememiştir.

Molecular Analysis of Five *Centaurea* Species Found in Van Province and Determination of Taxonomic Position of *Centaurea depressa*

Keywords
Centaurea,
ITS,
matK,
Phylogeny

Abstract: In this study, the phylogenetic relationships of five different *Centaurea* species (*C. depressa, C. virgata, C. iberica, C. solstitialis and C. balsamita*) that naturally occur in the campus of Van Yüzüncü Yıl University were studied to understand their relationship at taxonomic levels. The transfer of *C. depressa* species into the genus *Cyanus* was tested by molecular data and discussed. As molecular markers, ITS region of nuclear DNA and matK region of chloroplast DNA, the frequently preferred regions for evolutionary studies were used. Additional sequences were taken from the NCBI database to confirm the diagnosis of studied species and to show relationships between them. The ITS region including ITS1, 5.8S and ITS2 subregions was about 630 base pair, matK region that is entirely composed from exon was about 1200 base pair. More than 100 variation sites in ITS and 24 variations in matK were observed. *C. balsamita*, not the species transferred into the *Cyanus* genus (*C. depressa)*, was located evolutionarily distant in the constructed tree based on ITS and matK DNA sequences together. When these results are taken into consideration, removing of *C. depressa* species from *Centaurea* and transferring into *Cyanus* genus were not supported with the molecular data.

1. Giriş

Centaurea L. (Asteraceae) Türkiye florasında % 61.6'sı endemik olmak üzere 168 tür ve 203 taksonla temsil edilen bir cinstir [1]. Çok sayıda *Centaurea* türünün geleneksel halk tıbbında farklı amaçlar için kullanım bulduğu kayıtlıdır [2, 3]. Yapılan araştırmalarla *Centaurea* türlerinin farklı kısımlarının antimikrobiyal [4], sitotoksik [5] ve antienflamatuvar [6] aktivitelere sahip olduğu saptanmıştır. Modern taksonomi kullanılarak akrabalık derecelerinin belirlenmesi ve aralarında endemik tür varsa tanımlanması gibi çalışmalar da son yıllarda oldukça dikkat çekmiştir [7, 8]. Bu çalışmalardan en dikkat çekeni, Garcia-Jacas vd. [9] yapmış olduğu

*İlgili yazar: aytendizkirici@gmail.com

ülkemizden birkaç örneğin de bulunduğu moleküler taksonomi çalışmasıdır.

Yaptığımız çalışmada *Centaurea* cinsine ait beş ayrı türün (*C. depressa, C. virgata, C. iberica, C. solstitialis* ve *C. balsamita*) filogenetik ilişkileri ve akrabalık dereceleri moleküler seviyede belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışılan türlere ait örnekler Yüzüncü Yıl Üniversitesi Kampüs yerleşkesinin farklı alanlarından toplanmış ve Türkiye Florası kullanılarak teşhis edilmiştir [10, 11, 12]. *Centaurea depressa*, Güner vd. [12], yılında *Cyanus depressus* (*M.Bieb*.) Soják türü ile sinonim olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızın amacı moleküler teknikler kullanılarak beş *Centaurea* türünün akrabalık ilişkilerini saptamak ve sinonim kabul edilen iki türün taksonomik açıdan konumlarını belirlemektir.

Bitki filogenetik çalışmalarında en çok tercih edilen bölgelerden bir tanesi nüklear DNA'da bulunan ITS1, 5.8S ve ITS2 alt bölgelerinde oluşan ITS (Internal Transcribed Spacer; İnternal Ara Bölgeler) bölgesidir. Bu bölge yüksek genetik varyasyon göstermesinden dolayı moleküler taksonomistler tarafından tercih edilmektedir [13, 14, 15], ITS1 ve 2 intron bölgeleri, 18S, 5.8S ve 26S ribosomal RNA üretilmesinden sorumlu olan genlerin arasında yer almaktadır. İkinci bölge olarak kloroplast DNA'sında bulunan ve ITS bölgesinden farklı olarak tamamen ekson olan matK (maturase K) bölgesi seçilmiştir. matK geni kloroplast DNA'sında bulunan grup II intronların uzaklaştırılmasında görev almaktadır. Bu bölge eksonik olmasına rağmen fazla varyasyon gösterme eğiliminde olduğundan tercih edilmiştir [16, 17, 18].

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki örnekleri

Centaurea türlerine ait örnekler YYÜ kampüsünde toplanarak Dr. Mesut Pınar ve Hüseyin Eroğlu'nun yardımıyla morfolojik veriler kullanılarak teşhis edilmiştir. Örneklerin teşhisi esnasında Türkiye Florasının 5. cildi kullanılmış ve kapitulum özellikleri, fillari yapıları, çiçek rengi, aken ve pappus özellikleri ile yaprak ve gövde özelliklerinden gibi morfolojik karakterlere bakılarak isimlendirilmiştir. Tablo 1'de toplanan örnekler ve herbir çalışılan bölge için alınan NCBI numaraları yer almaktadır. Sinonim kabul edilen türlerden *Cyanus depressus*'a ait ITS ve matK DNA sekansları NCBI veritabanın taranmış fakat bu isim adı altında bulunamamıştır. Arama kelimesi olarak sisteme *Cyanus depressus* yazıldığında çıkan DNA dizileri *Centaurea depressa* türüne aittir. Bu sonuç iki türün sinonim olarak kabul edilmesinden kaynaklanabilir. Veritabanında *C. depressa* türünün her iki bölgesi içinde sadece birer sekans bulunabilmiş ve bunlar analize ilave edilerek çalışmamızda kullanılan *C. depressa* ile olan akrabalık ilişkisine bakılmıştır.

2.2. DNA izolasyonu, PCR, sekanslama ve filogenetik analiz

Doyle ve Doyle metodu modifiye edilerek kullanılmış ve herbir örnekten DNA saf olarak izole edilmiştir [19]. DNA temizliği ve miktarı NanoDrop 2000c UV–Vis Spektrofotometre kullanılarak saptanmaya çalışılmış ve RNA/protein kontaminasyonu en az olan örnekler PCR çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. İzole edilen stok DNA'lar kontamine olmamaları ve uzun süre saklanabilmeleri için derindondurucuda muhafaza edilmiştir. PCR ile bölgelerin amplifiye edilmesi için ITSL (F) 5' TCG TAA CAA GGT TTC CGT AGG TG 3' / ITS4 (R) 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' (reverse) [20], matK bölgesi için F1 5' ACT GTA TCG CAC TAT GTA TCA 3' / R3 5' GAT CCG CTG TGA TAA TGA GA 3' primerleri kullanılmıştır [21].

Bölgeler 50 µl'lik karışımlarda çoğaltılmış ve her iki bölge için en iyi PCR bandını almak için optimizasyon çalışmaları yapılarak optimum karışım ve sıcaklık koşulları saptanmıştır. Her iki bölge için hazırlanan PCR karışımına Taq polimeraz (5u/µl) enzimi, dNTP miks (10 mM), $MgCl_2$ (25 mM), 10X PCR Tampon, seçilen primer çiftleri (10 µM), total DNA (10 ng/µl) ve steril H_20 optimize edilmiş miktarlarda ilave edilmiştir. ITS bölgesinden amplikonların elde edilmesi için PCR karışımları ilk olarak 95°C'de 4 dakika (94°C'de 2') bekletilmiş ve daha sonra herbir döngü için 95°C'de 1 dakika (94°C'de 1'), 55°C'de 1 dakika (48°C'de 1') ve 72°C'de 1.5 dakika (72°C'de 1.5') olacak şekilde programlama yapılmış, döngü 29 defa tekrarlanmış ve son olarak 72°C'de 10 dakika bekletilmiştir (Parantez içindeki değerler matK bölgesi için geçerlidir).

Hedef bölgelerin uygun uzunlukta ve temizlikte amplifiye olduğunu ispatlamak için % 1-1.5 agaroz jelde yürütülmüş ve bantlar görüntüleme cihazında gözlenmiştir. Temiz olan amplikonlar DNA dizilerinin alınması için Amsterdam'da bulunan Macrogen adlı özel bir firmaya gönderilmiştir. Dizileme Sanger metodu, ABI 3730XL automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) cihazı ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kiti (Applied Biosystems) kullanılarak yapılmıştır. Bir birey için alınan iki dizi (Forward ve Reverse) Finch TV programı ile açılmış ve GeneBee web sitesindeki Alibee Multiple Alignment 3.0 software programıyla güvenilirliği en yüksek olan dizilere karar verilmiştir.

MEGA 5.0 programı kullanılarak tüm diziler ClustalW metodu ile hizalanmış ve sonrasında bölgelerin uzunluğu (baz çifti, bç), insersiyon ve delesyon miktarı (indel) GC miktarı (%), varyasyon ve parsimoni informatif bölge sayısı hesaplanmıştır [22]. Analiz esnasında türler arası varyasyon miktarını artırmak ve elde ettiğimizi sekanslardan emin olmak için NCBI veritabanından alınan sekanslarla beraber analiz yapılmıştır. UPGMA metodu kullanılarak evrimsel ilişkileri gösteren ağaç oluşturulmuştur.

Bireyler arası uzaklıklar p-distance (uzaklık) yöntemi ile hesaplanmıştır [23]. Ağaçların güvenilirlikleri 500 replikasyonlu bootstrap analizi ile test edilmiştir [24]. Analize indeller dahil edilmemiştir; bir veya birkaç baz uzunluğunda olan bu bölgeler ITS bölgesinin ITS1 ve 2 alt bölgelerinde görülmüş, matK bölgesinde ise saptanmamıştır. Dış grup olarak *Arctium* cinsine ait türlerin DNA dizileri kullanılmış ve bu diziler de NCBI veritabanından alınmıştır (ITS; FJ449889, matK: JN894039). *Arctium* cinsinin bulunduğu alttakım Carduinae ile *Centaurea*'nın bulunduğu Centaureinae alttakımı kardeş takson olduğundan *Arctium* türleri dışgrup olarak seçilmiştir.

3. Bulgular

PCR tamamlandıktan sonra hedef bölgenin amplifikasyonundan emin olmak için PCR karışımları uygun yoğunluktaki agaroz jellerde yürütülmüştür. Elde edilen DNA dizilerinin doğruluğundan emin olmak için herbir türe ait en az iki örnek kullanılmış ve bunların kendi içinde varyasyon gösterip göstermediğine de bakılmıştır. Tekrar dizileri arasında farklılık olmadığı için filogenetik analizlerde her tür için bir dizi kullanılmıştır. ITS bölgesi verisi çalışılan ve NCBI veritabanından alınan dizilerden oluşmuştur [*C. solstitialis* (KU295763, DQ319163), *C. depressa* (AY826255), *C. virgata* (DQ319174), *C. iberica* (DQ319120)]. Bölgenin sınırlarının belirlenmesinde NCBI veritabanından alınan örnekler kullanılmıştır. Sadece çalışılan örnekler hizalandığında bölgenin uzunluğu 628 bç (*C. solstitialis*) ile 633 bç (*C. depressa, C. balsamita*) arasındadır. Veritabanından ilave edilen sekanslarla hizalama yapıldığında bölge 636 bç uzunluğunda olup NCBI'dan alınan bireyler dikkate alındığında 11 tane indel ve 104 polimorfik bölge (73 tanesi parsimoni informatif) saptanmıştır. GC miktarı %56.1 gibi yüksek bir değer bulunmuştur.

Kloroplast DNA'sında çalışılan bölge olan matK totalde 1500 bç'dir ve genelde iki ayrı primer çifti (F1,R3 ve F5,R1; [21]) ile çoğaltılır. İlk primer çifti 1200 bç olan ilk alanı amplifiye ederken, diğer primer çifti geriye kalan 300 bç olan alanı çoğaltmaktadır. Çalışmamızda 1200 bç olan kısım çalışılmış ve son 300 bç olan kısım kullanılmamıştır. matK bölgesi için NCBI veritabanından dört örnek alınmış [*C. depressa* (AY013499), *C. solstitialis* (KC969491), *C. virgata* (KC969494), *C. iberica* (KC969485)] ve bölge uzunluğu 1208 bç olarak saptanmıştır. Beklenildiği gibi bu bölgede indel saptanmamış olup 24 (18 tanesi parsimoni informatif) polimorfik bölge görülmüştür. GC miktarı ITS bölgesinden hesaplanan değere göre daha düşük bir değer (%33.5) bulunmuştur.

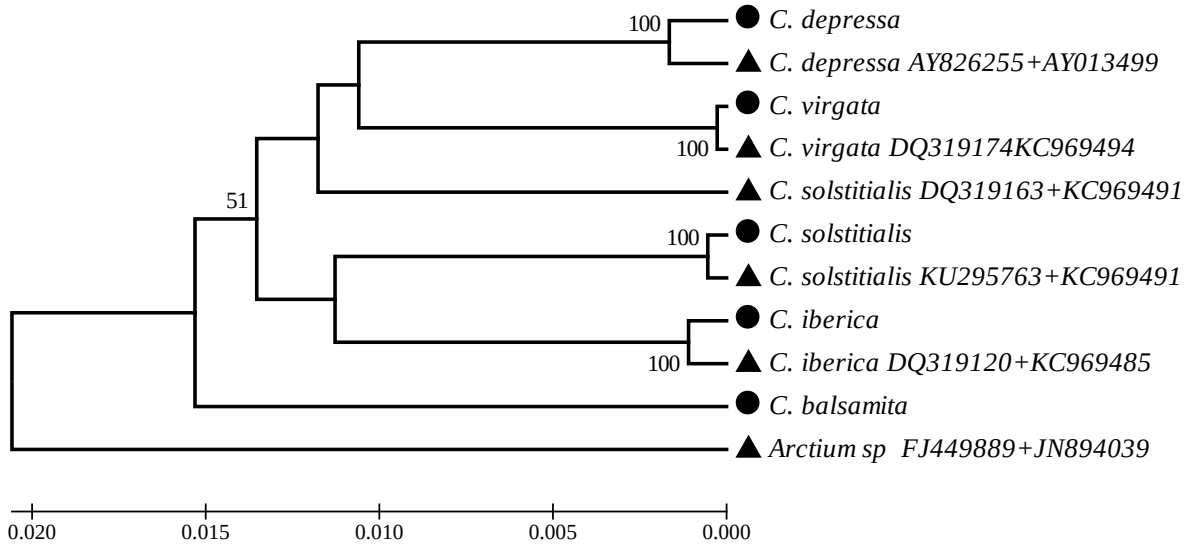
Moleküler çeşitlilik parametreleri hesaplandıktan sonra, iki bölgeye ait DNA dizileri birleştirilerek türler arası p-uzaklık değerleri hesaplanmış (Tablo 2) ve bu değerler dikkate alınarak türler arası evrimsel ilişkileri gösteren ağaç yapılandırılmıştır (Şekil 1). Ağaçta projede kullandığımız *Centaurea* türüne ait örnekle, NCBI'dan alınan aynı türe ait örneğin beraber gruplandığı görülmüştür. Bu durum yapılan işlemlerin doğruluğunun da ispatı olarak düşünülebilir. Sadece NCBI veritabanından alınan *C. solstitialis* türüne ait iki örnekten bir tanesi çalışılan *C. solstitialis* örneğiyle gruplanırken, diğeri uzak konumlanmıştır. Bu bireyin uzak konumlanma nedeni diğer çalışmada yapılan hatalı tür teşhisi kaynaklı olabilir. Beklendiği gibi diğer tüm türlerin monofilileri desteklenmiştir (Şekil 1).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *Centaurea* türleri ve kullanılan bölgelere ait NCBI numaraları

Takson isim	Lokalite	NCBI ITS	NCBI matK
Centaurea balsamita Lam.	YYÜ Kampüs	KY676858	KY676853
Centaurea solstitialis L.	YYÜ Kampüs	KY676854	KY676849
Centaurea iberica Trev. ex Sprengel	YYÜ Kampüs	KY676857	KY676852
Centaurea virgata Lam.	YYÜ Kampüs	KY676856	KY676851
Centaurea depressa M.Bieb. (Syn:*Cyanus depressus* (M. Bieb.) Soják)	YYÜ Kampüs	KY676855	KY676850

Tablo 2. ITS + matK bölgeleri kullanılarak hesaplanan p-distance değerleri. NCBI veritabanından alınan DNA dizileri (dış grup hariç) analize dahil edilerek hesaplamalar yapılmıştır.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C. solstitialis										
C. depressa	0.029									
C. virgata	0.021	0.021								
C. iberica	0.023	0.033	0.025							
C. balsamita	0.034	0.028	0.026	0.035						
*C. solstitialis*KU295763+KC969491	0.001	0.029	0.021	0.024	0.034					
*C. solstitialis*DQ319163+KC969491	0.025	0.025	0.021	0.030	0.032	0.024				
C. depressa AY826255+AY013499	0.030	0.003	0.022	0.034	0.029	0.030	0.027			
C. virgata DQ319174+KC969494	0.021	0.020	0.001	0.026	0.025	0.021	0.021	0.021		
C. iberica DQ319120+KC969485	0.021	0.032	0.024	0.002	0.034	0.023	0.029	0.033	0.025	



Şekil 1. ITS ve matK bölge DNA dizileri kullanılarak UPGMA metodu altında türler arası ilişkiyi gösteren ağaç. (Dallar üzerindeki rakamlar: bootstrap değeri, Daire: projede kullanılan *Centaurea* türleri, Üçgen: NCBI veritabanından alınan örnekler)

Güner vd. [12] tarafından *Centaurea depressa* türü *Cyanus depressus* ile sinonim olarak kabul edilip *Cyanus* cinsine aktarıldığından, çalışılan türler içerisinde beklenen durum, yapılandırılan ağaçta *C. depressa* türünün diğerlerinde farklılaşarak ayrı gruplanmasıydı. Fakat Şekil 1'de görüldüğü gibi moleküler seviyede en fazla farklılık gösteren tür *C. balsamita* olmuştur. C*entaurea depressa* türü ise *Centaurea* cinsi içinde konumlanmıştır. Bu türün *Cyanus* cinsine aktarılması moleküler bulgular ışığında desteklenmemiştir.

4. Tartışma ve Sonuç

ITS bölgesinde 5.8S rRNA yapımından sorumlu olan ve orta kısmında bulunan ekson bölgesinde nükleotit varyasyonuna rastlanmamıştır. *Centaurea* cinsi içerinde yapılacak olan filogenetik çalışmalarda sadece bu alt bölgenin kullanılmasının, türler arası evrimsel ilişkileri anlamak için yeterli olmayacağı düşünülmektedir. NCBI veritabanından alınan DNA dizileri analize ilave edilidiğinde dahi bu bölgede varyasyon görülmemiştir. Bu durum beklenen bir durumdur; tek bir bazdaki değişim dahi tüm protein veya RNA yapısını değiştirebildiğinden evrimsel süreç boyunca ekson bölgeleri koruma altındadır. ITS bölgesinden kaynaklanan varyasyonlar ITS1 ve ITS2 alt bölgelerinden kaynaklanmaktadır. Her iki bölgede yaklaşık sayıda varyasyon saptanmıştır. Alt bölgeler tek tek kullanılarak yapılan filogenetik analizlerde türler arası evrimsel ilişkiler benzer çıkmıştır (karışıklığa sebeb olmamak için ağaçlar verilmemiştir).

ITS bölgesi ile karşılaştırıldığında matK bölgesinde varyasyonun oldukça az olduğu ifade edilebilir. Bu sonuç beklenmektedir; matK bölgesi tıpkı ITS bölgesinin 5.8S alt bölgesi gibi eksondur ve protein kodlamaktadır. P-uzaklık verilerine dayanarak UPGMA metodu ile yapılandırılan ağaç (Şekil 1) dikkate alındığında en fazla varyasyon *C. balsamita* türünde görülmüştür. *C. balsamita* türüne ait DNA dizileri NCBI veri tabanında mevcut değildir. *C. balsamita* türüne ait ITS ve MatK DNA dizileri ilk defa NCBI veri tabanına bu çalışma ile kazandırılmış olacaktır. Uysal vd. [25], 47 *Centaurea* türünü kullanarak SDS-PAGE yöntemi ile türlerin protein profillerini incelenmiş ve dendogramda *C. balsamita* türünün diğer türlerden bariz şekilde ayrıldığını göstermişlerdir. Bu durumda hem protein hemde DNA seviyesinde yapılan çalışmalarla elde edilen sonuçlar gözönüne alındığında, *C. balsamita* türünün morfolojik karakterler ve diğer yöntemler kullanarak incelenmesi ve taksonomik pozisyonunun yeniden gözden geçirilmesi uygun olabilir.

Güner vd. [12], morfolojik karakterler kullanarak ifade ettiği *C. depressa* türünün bu cinsten çıkarılarak *Cyanus depressus* olarak isimlendirilmesi ve *Cyanus* cinsine aktarılması görüşü moleküler verilerle yapılan çalışmamızla desteklenememiştir. ITS ve matK bölgelerinden elde edilen ve toplamda yaklaşık 1800 baz çifti uzunluğunda olan DNA dizilerinde varyasyonların dikkate değer kısmı *C. depressa'*dan değil *C. balsamita* türünden kaynaklanmıştır. Elde edilen sonuçtan emin olmak için *Centaurea depressa* (*Cynus depressus*) örneği NCBI veritabanından da alınarak analize ilave edilmiştir. Elde edilen ağaçlarda Van'dan toplanan ve çalışmamızda kullanılan *C. depressa* ile NCBI veri tabanından alınan *C. depressa* örnekleri birlikte bir klad oluşturmuştur. Yapılandırılan ağaçta çalışmamızın asıl amacını oluşturan *C. depressa* türünün NCBI'dan alınan aynı türe ait örnekle beraber terminal bir dal oluşturması ve ele alınan cinsin diğer türler ile bir ortak ata ilişkisi göstermesi, *C. depressa* türünün *Centaurea*

cinsi içinde yeralması gerektiğini ve *Cyanus* cinsine transferinin uygun olmadığını göstermektedir.

Teşekkür

Yapılmış olan çalışma 2209-Üniversite Öğrencileri Yurt İçi/Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı kapsamında desteklenmiştir. Örneklerin teşhisinde çalışmamıza desteklerini esirgemeyen Dr. Mesut Pınar, Hüseyin Eroğlu ve veri analizi çalışmalarına katkılarından dolayı Oktay Yiğit'e teşekkür ederiz.

Kaynakça

[1] Pınar, M.S., 2016. Centaurea sintenisiana Gand. - A New Record for the Family Asteraceae (Compositae) from Turkey. Journal of The Institute of Natural & Applied Sciences, 21 (2), 75-82.

[2] Arif, R., Küpeli, E., Ergun, F. 2004. The biological activity of Centaurea L. species. G. U. J. Science, 17, 149-164.

[3] Baytop, T. 1999. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi (Geçmişte ve Bugün), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2.baskı, 316s.

[4] Karamenderes, C., Khan, S., Tekwani, B.L., Jacob, M.R., Khan, I.A. 2006. Antiprotozoal and antimicrobial activities of *Centaurea* species growing in Turkey. Pharm. Biol, 44, 534-539.

[5] Koukoulitsa, E., Skaltsa, H., Karioti, A., Demetzos, C., Dimas, K. 2002. Bioactive sequiterpene lactones from Centaurea species and their cytotoxic/cytostatic activity against human cell lines in vitro. Planta Med, 68, 649-652.

[6] Kim, S.H., Shin, K.J., Kim, D., Kim, Y.H., Han, M.S., Lee, T.G., Kim, E., Ryu, S.H., Suh, P.G. 2003. Luteolin inhibits the nuclear factor-κB transcriptional activity in Rat-1 fibroblasts, Biochem. Pharm, 66, 955-963.

[7] Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Mozaffarian, V., Ilarslan, R. 2000. The natural delimitation of *Centaurea* (Asteraceae: Cardueae): ITS sequence analysis of the *Centaurea jacea* group. Plant Syst Evol, 223, 185- 199.

[8] Greuter, W. 2003. The Euro+Med treatment of Cardueae (Compositae)-generic concepts and required new names. Willdenowia, 33, 49-61.

[9] Garcia-Jacas, N., Uysal, T., Romaschenko, K., Suarez-Santiago, VN., Ertugrul, K., Susanna, A. 2006. *Centaurea* Revisited. A molecular survey of the *Jacea* group. Annals ofBotany, 98, 741-753.

[10] Wagenitz, G. 1975. Centaurea L. In: Davis PH, editor. Flora of Turkey and the East Aegean Islands Vol. 5, Edinburgh University Press, Edinburgh, p. 465–585.

[11] Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K. 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 10, Edinburgh University Press, Edinburgh.

[12] Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M. T. 2012. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.

[13] Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S., & Donoghue, M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann. Miss. Bot.l Gard, 82, 247–277.

[14] Wojciechowski, M.F. 2005. Astragalus (Fabaceae): A molecular phylogenetic perspective. Brittonia, 57, 382–396.

[15] Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., Pang, X., Xu, H., Zhu, Y., Xiao, P., & Chen, S. 2010. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. PLOS ONE, 5, e13102.

[16] Young, N.D., & de Pamphilis, C.W. 2000. Purifying selection detected in the plastid gene matK and flanking ribozyme regions within a Group II intron of nonphotosynthetic plants. Mol. Biol. Evol, 17, 1933–1941.

[17] Yang, D.Y., Fushimi, H., Cai, S.Q., & Komatsu, K. 2004. Molecular analysis of Rheum species used as rhei rhizoma based on the chloroplast matK gene sequence and its application for identification. Biol. Pharmac. Bull, 27, 375–383

[18] Selvaraj, D., Sarma, R.K., & Sathishkumar, R. 2008. Phylogenetic analysis of chloroplast matK gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. Bioinformation, 3, 24–27.

[19] Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull, 19, 11-15.

[20] Hsiao, C., Chatterton, N.J., Asay, K.H., and Jensen, K.B. 1995. Phylogenetic relationships of the monogenomic species of the wheat tribe, Triticeae(Poaceae), inferred from nuclear rDNA (internal transcribed spacer) sequences, Genome, 38, 221-223.

[21] Li, J.H., Bogle, A.L., and Klein, A.S. 1997. Interspecific relationships and genetic

divergence of the disjunct genus *Liquidambar* (Hamamelidaceae), Rhodora, 99, 229-241.

[22] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA 5: molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, Molec Biol Evol, 28, 2731-2739.

[23] Nei, M. & Kumar, S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

[24] Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, Evolution, 39, 783-791.

[25] Uysal, T., Arslan, E., Tugay, O., Ertuğrul, K. 2010. Determination of the relationship between some *Centaurea* species based on SDS-PAGE. Turk J Biol, 34, 125-131.