

Araştırma Makalesi / Research Article

Siirt İlinin Farklı Bölgelerinde Yayılış Gösteren *Crocus biflorus* Mill. subsp. *pseudonubigena* B.Mathew Türüne Ait Örnekler Arasındaki Akrabalık İlişkisinin Moleküler Düzeyde Belirlenmesi
Behcet İNAL^{1*}, Mehmet FİDAN²

¹ Siirt Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü 56100 Siirt

² Siirt Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 56100 Siirt

* Sorumlu Yazar; behcetinal@siirt.edu.tr

Geliş tarihi / Received: 02/05/2021

Kabul tarihi / Accepted: 10/06/2021

ÖZET

Crocus biflorus Mill. subsp. *pseudonubigena* B. Mathew (Siirt Çiğdemi) İran-Turan elementi olup ismini Siirt ilinden almış endemik bir taksondur. Yayılış coğrafyasına bakıldığında Yukarı Fırat Bölümü, Adana Bölümü, Dicle Bölümü gibi üç değişik alanda yayılış bulunmaktadır. İlk olarak 1982 yılında Mathew tarafından bilim dünyasına kazandırılmıştır. Bu çalışmada *Crocus biflorus* subsp. *pseudonubigena* taksonunun Siirt il sınırları içerisinde üç farklı (Tillo, Şirvan ve Veysel Karani) popülasyondan toplanan örneklerinin ITS gen bölgesi kullanarak akrabalık ilişkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda Tillo, Şirvan ve Veysel Karani bölgelerinden toplanan örneklerin morfolojik olarak küçük farklarının olduğu ancak moleküler düzeyde yakın akraba oldukları ve bu morfolojik farklılıklarının varyasyon olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu genotiplerin en fazla *Crocus biflorus* ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Crocus biflorus* subsp. *pseudonubigena*; Moleküler, ITS; Sistemantik.

Determination of Molecular Kinship Relations Between The samples of *Crocus biflorus* Mill. subsp. *pseudonubigena* B.Mathew Species Collected from Different Regions of Siirt Province

ABSTRACT

Crocus biflorus Mill. subsp. *pseudonubigena* B. Mathew (Siirt Çiğdemi) is an Iran-Turan element and is an endemic taxon named after the province of Siirt. Considering its distribution geography, it has spread in three different areas such as Upper Euphrates Section, Adana Section and Tigris Section. It was first introduced to the world of science in 1982 by Mathew. In this study, *Crocus biflorus* subsp. The kinship relations of the

pseudonubigena taxon collected from three different populations (Tillo, Şirvan and Veysel Karani) within the provincial borders of Siirt were investigated by using the ITS gene region. As a result of the study, it was determined that the samples collected from Tillo, Şirvan and Veysel Karani regions have minor morphological differences, but they were found to be close relatives at the molecular level and these morphological differences showed some variations. In addition, these genotypes were found to be most similar with *Crocus biflorus*.

Keywords: *Crocus biflorus* subsp. *pseudonubigena*; molecular, ITS; Systematic

1. GİRİŞ

Türkiye Florası (Baser, 2002) yayınlandıktan sonra birçok alanda yapılan floristik araştırmalarda birçok cins ve seksiyonda tür ve tür altı taksonların teşhisindeki taksonomik sorunlar daha net olarak anlaşılmaya başlanmıştır. Yeni bulgular türlerin deskripsiyonlarında, tanımlamalarında ve lokalite bilgilerinde eksiklikler olduğunu ortaya çıkarmış ve bu nedenle daha ayrıntılı araştırmaların yapılmasını zorunlu hale getirmiştir (Fidan and Özgökçe, 2016). *Crocus* L. cinsi Iridaceae (Süsengiller) familyasından bir cins olup yaklaşık 90 türü bulunmaktadır (Mathew, 1982; Davis, 1970; Petersen ve ark., 2008; Erol ve ark., 2015). Ancak, cinsin son revizyonundan bu yana (Mathew, 1982), 50'den fazla yeni tür tanımlanmıştır (Erol ve ark., 2015; Erol ve ark., 2012; Peruzzi ve Carta, 2011; Harpke ve ark., 2014; Harpke ve ark., 2015; Kerndorff ve ark., 2013a; Kerndorff ve ark., 2013b). Türkiye'de 55 taksonu endemik olmak üzere toplam 99 tür (156 takson) doğal yayılış göstermektedir

Yapılan filogenetik analizler, *C. biflorus* Miller ve 23 alt türü (Mathew, 1982) örneğinde olduğu gibi, özel olmayan düzeyde bile *Crocus* cinsi içinde birkaç ünitenin para- veya polifiletik olduğu kanıtlanmıştır (Mathew, 1982; Erol ve ark., 2015). Bazı türlerin filogenetik pozisyonunu açıklığa kavuşturmak için nükleer ribozomal DNA'nın (rDNA) ITS: ITS1 + 5.8S rDNA + ITS2 ve 5' harici kopyalanmış, ara parçası (ETS) sıralanmış ve yeni bir *Crocus* türünün evrimi tanımlanmıştır (Erol ve ark., 2015). Yapılan çalışmalar *Crocus* cinsinin taksonomik olarak kompleks olduğunu göstermektedir. Öyle ki; yeni açıklanan taksonların birçoğu hiçbir seriye atanmamıştır (Erol ve ark., 2015). Bütün bu durumlar göz önünde bulundurulduğunda, *Crocus* cinsinin tüm örneklerinin doğal popülasyonlarından toplanarak baştan betimlemelerinin yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

DNA dizileme çalışmaları taksonların filogenetik durumlarını ve taksonomik ilişkilerini açığa çıkarmada son yıllarda sıklıkla kullanılan önemli bir yaklaşımdır. Genomik DNA dizi verilerinden ITS (İçsel Kopyalama Bölgesi) bitki sistematğinde en çok kullanılan

bölgelerindedir. ITS bölgesinin canlılar arasındaki temel akrabalık ilişkilerinin moleküler ortaya çıkarılmasında yaygın olarak kullanılmasının çok önemli nedenleri vardır. Bunalar: değişik taksonomik gruplarda çalışılabilen birkaç çeşit PZR primer setinin olması ve bu bölgenin büyüklüğünün 700 baz çiftinin altında olması nedeniyle çoğaltma ve sekanslamada kolaylık sağlamasıdır (Gernandt ve ark., 2001). Bu bölge tür ve tür altı seviyelerdeki taksonlar arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde faydalı ve kullanılabilir bilgiler sunmaktadır (Baldwin ve Markos, 1998). Nüklear genler ile birlikte kloroplast DNA dizileri de bitkiler arasındaki akrabalık ilişkilerinin ortaya çıkarılmasında en çok kullanılan bölgelerdendir. Kodlanan bölge olması ve baz değişimi içermesinden ötürü matK ve benzer genler; tür altı takson seviyesinden familya seviyesine kadar taksonomik kategorilerde filogenetik ilişkilerin kurulmasında kullanılmaktadır (Müller ve ark., 2006). matK geni; bitkilerde yaygın olarak bulunan kloroplast genomunda yer alması, moleküler çalışmalarda makul bir büyüklüğe sahip olması, transisyon/transversiyon oranının düşük olması, yüksek baz değiştirme oranına sahip olması ve çoğaltılmasının kolay olması nedeniyle bitki sistematğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, çekirdek DNA üzerinde bulunan ITS nükleotit dizileri kullanılarak Siirt ilinin farklı bölgelerinde toplanan *Crocus biflorus* subsp. *pseudonubigena*'nın moleküler düzeydeki akrabalık ilişkileri ortaya konulmuştur.

2. MATERYALLER VE METOD

2.1. Materyal

Çalışma materyalini oluşturan *Crocus biflorus* subsp. *pseudonubigena* örnekleri Siirt iline ait Şirvan, Veysel Karani ve Tillo bölgelerinden toplanmıştır. Teşhis edilen örneklerden bir tanesi Siirt Üniversitesi Flora ve Fauna Merkezi'nde (SUFAF) muhafaza altına alınmıştır.

2.2. Moleküler Çalışmalar

2.2.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, CTAB (cetyl tri methy lammonium bromide) metodu uyarlanarak yapılmıştır. Buna göre;

Her bir bitki örneğinden, yaklaşık olarak 0.5 g yaprak örneği sıvı azot kullanılarak porselen havanlarda ezildikten sonra örnekler 2 ml'lik eppendorf tüplere konularak 700 µl CTAB tampon çözeltisi (100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, %2 CTAB, pH 8.0) eklenmiştir. Tampon çözeltisi eklendikten sonra tüplerin ağzı kapatılarak örnekler 65 0C sıcaklığa sahip su banyosu içerisinde 1 saat bırakılacak ve bu süre içerisinde birkaç kez hafifçe

kariştirilmiştir. Su banyosundan çıkarılan örnekler biraz soğduktan sonra tampon ozelti ile eşit hacimde 24:1 hacimli kloroform: izoamil alkol konularak 13500 rpm’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra ayırım oluşan ayırım tabakasının üstünde kalan sıvı yeni 2 ml’lik eppendorf tüplere aktarılıp üzerine soğuk isopropanoldan 400 l eklenip bir gün süreyle -20 0C’de bırakılmıştır. Yaklaşık 24 saat sonra örnekler 13500 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip DNA dibe oktrlerek geri kalan sıvı tüplerden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra tüplere %75 etanol/10 mM amonyum asetat içeren ozeltiden 200 l eklenerek 10000 rpm’de 5 dakika santrifüj yapılarak yıkanma sağlanmış, bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Yıkama tamamlandıktan sonra kurutma işlemi yapılarak 100 l TE solüsyonu (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA) eklenerek DNA yoğunluğu ve sağlığı (A 260/280) (şimşek ve ark., 2008) Nanodrop ile belirlenmiştir. DNA miktarı belirlendikten sonra 120 ng/l olacak şekilde seyreltme yapılmıştır.

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) alışmaları

İzole edilmiş genomik DNA’ların ITS (genomik) bölgelerinin oğaltılmasında ITS4, ITS5A primerleri kullanılmıştır (F: 5’-TGTGAATTGCARRATYCMG-3’ ve R 5’-CCCGHYTGAYYTGRGGTCDC-3’). Bu primerler yardımıyla, ilgili bölgeler PCR yoluyla çoğaltılmıştır. DNA üzerinden bu bölgelerin çoğaltılması 200 L’lik tüplerde; 10X’lik reaksiyon tamponundan 2.5 L, 25 mM MgCl₂’den 2.5 L, 10 mM dNTP’den 0.4 L, 50 pmol/L’lik primerlerden 2.5 L, Taq DNA Polimeraz’dan 0.3 L, DMSO’dan 2.5 L, kalıp DNA’dan 2 L, dH₂O’dan 10.8 L alınarak toplam hacim 25 L olarak ayarlanmıştır. PCR uygulamalarında olası bir kontaminasyonun olup olmadığını anlayabilmek amacıyla her uygulamada, genomik DNA içermeyen negatif kontroller kullanılmıştır.

2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonucunda oluşan bantları gözlemlemek ve genomik DNA izolasyonu sonuçlarına bakmak amacıyla %0,8’lik agaroz jel elektroforezi yapılacak. İşlem için ilk olarak 0,8 gr agaroz tartılıp ve 100 ml 0,5 X TBE tamponu içinde, mikrodalga fırında kaynatılarak ozlmştir. Karışım 50°C’ye soğutulurak içerisine 1L Etidyum Bromür boyası ilave edilmiştir. Tampon, tarakları önceden yerleştirilmiş jel kasetine dökülmüş ve polimerleşmesi için 15 dk bekletilerek jelin donması sağlanmıştır. Jel polimerleştikten sonra kasetten taraklar çekilerek çıkartılmıştır. Hazırlanan jel, elektroforez tankına yerleştirilip üzerine jelin üzerini örtecek kadar 0.5 X TBE tamponu ilave edilmiştir. 2 L PCR ürünü, 2 L yükleme boyası ve 2 L dH₂O kariştırılarak (6X DNA loading dye) kuyucuklara pipet yardımıyla yüklenmiştir. PCR ürününün büyüklüğünü belirleyebilmek amacıyla 5 L DNA büyüklük belirleyici (1kb DNA ladder) boş

bir kuyucuğa yüklenmiştir. Örnekler 100 voltta 40 dk yürütülüp, daha sonra jel, jel görüntüleme cihazına alınmıştır. UV ışığı altında bantlar gözlemlenecek ve bilgisayar programı yardımıyla fotoğrafları çekilip, veriler kaydedilmiştir. Genomik DNA izolasyonu sonuçlarına bakmak için 2 µL PCR ürünü, 2 µL yükleme boyası ve 2 µL dH₂O karıştırılarak kuyucuklara yüklenip aynı işlemler sırası ile tekrar edilmiştir.

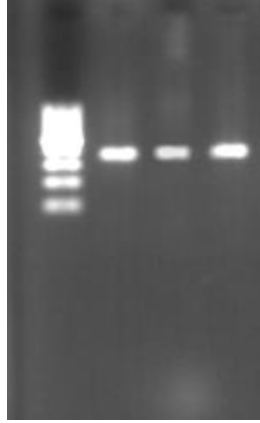
2.2.4. Dizileme ve Filogenetik Analiz

Hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Ardından Dizileri hizalanmış olan türlerin akrabalık derecelerini öğrenebilmek için yaygın olarak kullanılan PAUP filogenetik analiz programı tercih edilmiştir. Nexus formatındaki verilerin “execute” komutu ile analizine başlanacak ve daha sonra açılan pencerede “help” komutu ile seçilecek ağaç kriterlerinin olduğu pencere açılmış ve açılan pencerede oluşturulmak istenilen ağaç kriterleri seçilerek filogenetik ağaçlar elde edilmiştir. Filogenetik ağaç oluşturmada karakter temelli yöntemlerden Maksimum Parsimony Metodu kullanılarak, bootstrap ve branch and bound analizleri yapılmıştır. Bu analizlerin yanı sıra UPGMA ve NJ metotlarıyla filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

3. SONUÇ VE TARTIŞMA

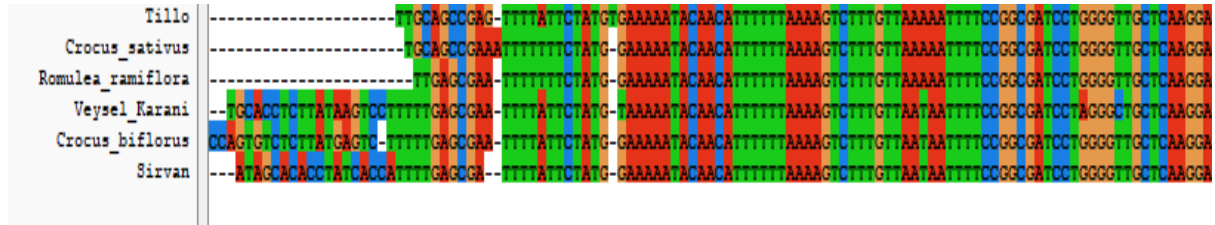
3.1 Şekiller, Şemalar ve Tablolar

Crocus cinsi çok karmaşıktır ve taksonomik-filogenetik olarak anlaşılması zordur. Özellikle yakın akraba türlerde iç içe geçme ve geri çaprazlamadan kaynaklanan ara veya değişken karakterin görülmesi durumu daha da zorlaştırmaktadır (Harrison ve Larson, 2014; Kerndorff ve ark., 2016). Bu çalışma bağlamında yapılan analizler sonucunda, Siirt bölgesine ait üç farklı lokasyondan (Şirvan, Veysel Karani, Tillo) toplanan *Crocus biflorus* subsp. *pseudonubigena* taksonlarının moleküler düzeyde nasıl bir akrabalık ilişkisi olduğu ortaya konulmuştur. Moleküler akrabalık için bitkiler alemi ve nadirde olsa hayvanlar alemi içinde kullanılan nükleer gen bölgesi olan ITS kullanılmıştır. Öncelikle genotiplere ait DNA izolasyonu yapılmış ve DNA'nın kalite düzeyindeki kalitesi agaroz jel ile tespit edilmiştir. Ayrıca izole edilen DNA kantitatif özelliği ise, Nanodrop (Thermo) ile ölçülmüştür. Ölçüm sonuçlarının 260/280 dalga boyu oranının 1.6 ile 1.9 arası değiştiği görülmüş olup PCR çalışması için uygun kalitede oldukları sonucuna varılmıştır. Kalliteli DNA örnekleri PCR reaksiyonu için normalize edildikten sonra, ITS primerleri kullanılarak ilgili gen bölgesi çoğaltılmıştır. Şekil 1'de de görüldüğü üzere PCR ürün boyu beklenildiği gibi 650-700 bp civarı olduğu görülmüştür.



Şekil 1. Üç farklı bölgeden toplanan taksonlara ait ITS gen bölgesine ait PCR görüntüsü

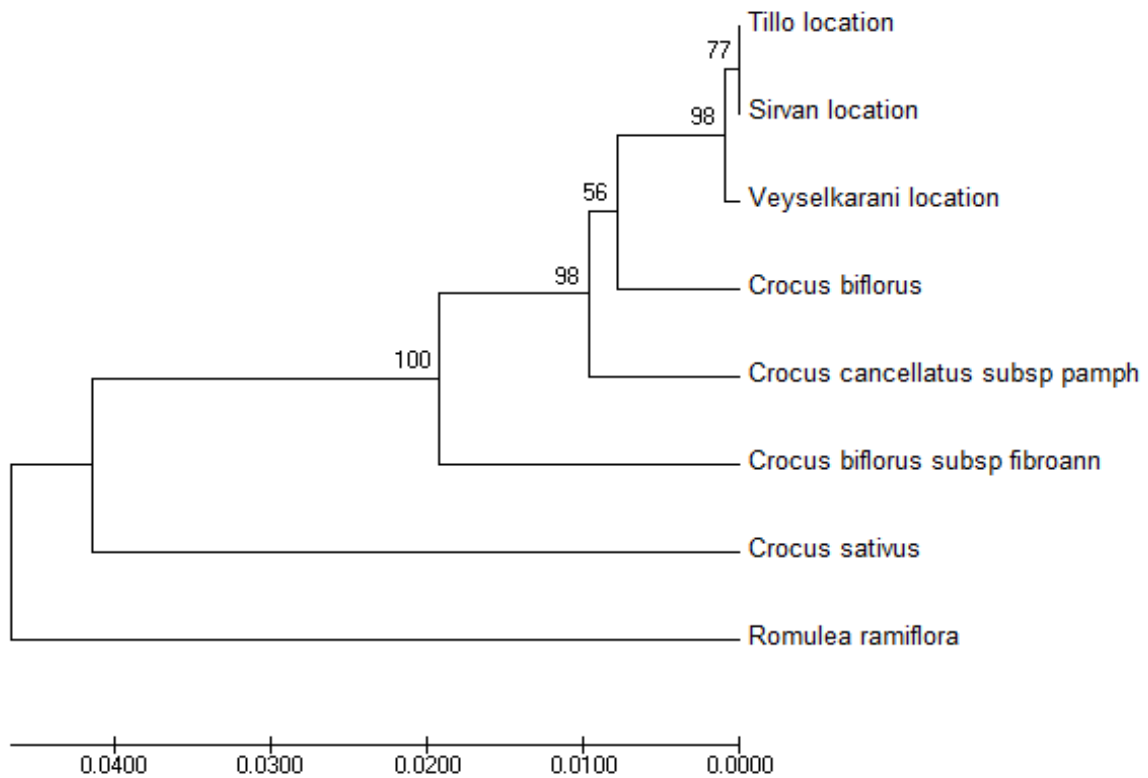
PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürün, dizileme amacı ile hizmet alımı yapılmıştır. Hizmet alımı ile PCR ürün yıkama ve dizileme işlemi dahil edilmiştir. Dizileme sonucu elde edilen sekanslar NCBI veri tabanı kullanılarak BLAST yapılmıştır. BLAST sonucunda ilgili dizilerin *Crocus* cinsine ait oldukları belirlenmiştir. BLAST işleminden sonra taksonlara ait dizinin hizalanması için NCBI da bulunan *C. biflorus*, *C. sativa* ve dış grup olarak kullanılan *Romulea ramiflora* ya ait diziler de indirilmiştir. Ardından filogenetik ağaç için hizalama işlemi Clustal W ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 2). ITS verilerine göre, çalışma kapsamında incelenen tüm taksonlara ait hizalanmış verilerden ikili dizin mesafesi analizi yoluyla taksonlar arası “Benzemezlik Matrisi” oluşturulmuştur.



Şekil 2. Taksonlara ait ITS gen dizisinin hizalanmasından bir kesit

ITS bölgesi, en yaygın kullanılan nükleer DNA dizilerinden biridir ve genellikle filogeniyi yeniden yapılandırmak ve yakından ilişkili türleri ve cinsiyetleri tanımlamak için daha düşük taksonomik seviyelerde uygundur (Yousefzadeh ve ark., 2019; Kress ve ark., 2005). Çalışmada hizalama işleminden sonra PAUP filogenetik analiz programı kullanılarak türler arasındaki akrabalık ilişkisini gösteren ağaç çizilmiştir (Şekil 3). Çalışmada gerçekleştirilen Neighbor Joining (NJ) filogenetik metoduna göre elde edilen filogenetik ağaçlar ve nodlarında yer alan bootstrap değerleri Şekil 3’te gösterilmiştir. Filogenetik ağaç incelendiğinde, dış gruptaki taksonun (*Romulea ramiflora*) diğer tüm taksoblardan ayrı bir yerde çıkarak yapılan analizin bir açıdan doğruluğunu doğrulamıştır. Tillo, Şirvan ve Veysel Karani’den toplanan

Crocus Sp. biflorus subsp. *pseudonubigena* taksonları aynı kümede toplanmış ve en fazla *C. biflorus* ile benzerlik göstermişlerdir. Dolayısı 3 farklı lokustan toplanan taksonların birbirinden farklı olmadığı aksine benzer oldukları bu çalışmada tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan *C. sativus* ise diğer kullanılan *Crocus* türlerinden oldukça bağımsız bir yerde kümeleme oluşturmuş ve diğer türlere göre en çok benzemezlik durumu göstermiştir. Bu çalışmada da kullanılan PCR tabanlı gibi moleküler çalışmalar ve özellikle son yıllarda DNA sekans bilgileri üzerinde yapılan çalışmalar, cins taksonomisinin anlaşılmasını hızlandırmıştır. Daha önce yapılmış bir çok moleküler çalışmalar sonucunda *Crocus* cinsin taksonomik durumu değiştiği (Petersen ve ark., 2008; Harpke ve ark., 2014; Harpke ve ark., 2013) ve cinse ait birçok taksonomik sınıflandırma, yanlış filogenetik ilişkiler nedeniyle tekrar revize edildiği bilinmektedir. Bu çalışmada da Siirt iline bağlı farklı bölgelerden toplanan *Crocus Sp. biflorus* subsp. *pseudonubigena* PCR tabanlı markırlar uygulanarak bu taksonların çok benzer oldukları ortaya konuşmuştur. ITS gen bölgeleri, yapılan literatür çalışmalarında *Crocus* sp. ve alt türlerinin taksonomisini anlamak ve hala var olan taksonomik sorunları çözmek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Yılmaz, 2021).



Şekil 3. ITS gen bölgesi DNA dizi analizi sonuçlarına ve Neighbor Joining Filogenetik metoduna göre elde edilmiş filogenetik ağaç

KAYNAKLAR

- Baldwin, B.G. & Markos, S. (1998). Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S–26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10: 449-463.
- Baser, K.H.C., (2002). Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure and Applied Chemistry*, 74: 527-545.
- Davis, P.H., (1970). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 3. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 3*.
- Erol, O., Can, L., Şık, L. (2012). *Crocus demirizianus* sp. nov. from northwestern Turkey. *Nordic Journal of Botany*, 30: 665-667.
- Erol, O., Harpke, D., Yıldırım, H., (2015). A new *Crocus* L.(Iridaceae) species from SE Turkey, based on morphological and molecular data. *Phytotaxa*, 239: 223-232.
- Fidan, M., F. Özgökçe, (2016). Türkiye *Gypsophila* L.(Caryophyllaceae) cinsine ait Hagenia A. Braun. seksiyonunun revizyonu.
- Gernandt, D.S., Liston, A., Piñero, D. (2001). Variation in the nrDNA ITS of *Pinus* subsection *Cembroides*: implications for molecular systematic studies of pine species complexes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21: 449-467.
- Harpke, D., Meng, S., Rutten, T., Kerndorff, H., Blattner, F.R. (2013). Phylogeny of *Crocus* (Iridaceae) based on one chloroplast and two nuclear loci: ancient hybridization and chromosome number evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66: 617-627.
- Harpke, D., Peruzzi, L., Kerndorff, H., Karamplianis, T., Constantinidis, T., Randelovic, V., Randelovic, N., Juskovic, M., Pasche, E., Blattner, F.R., (2014). Phylogeny, geographic distribution, and new taxonomic circumscription of the *Crocus reticulatus* species group (Iridaceae). *Turkish Journal of Botany*, 38: 1182-1198.
- Harpke, D., Carta, A., Tomović, G., Randelović, V., Randelović, N., Blattner, F.R., Peruzzi, L. (2015). Phylogeny, karyotype evolution and taxonomy of *Crocus* series Verni (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 301: 309-325.
- Harrison, R.G. & Larson, E.L. (2014). Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *Journal of Heredity*, 105: 795-809.
- Kerndorff, H., E. Pasche, F. Blattner, D. Harpke, (2013a). Fourteen new species of *Crocus* (Liliiflorae, Iridaceae) from west, south-west and south-central Turkey. *Stapfia*, 99: 145-158.
- Kerndorff, H., Pasche, E., Blattner, F., Harpke, D. (2013b). A new species of *Crocus* (Liliiflorae, Iridaceae) from Turkey. *Stapfia*, 99: 141-144.
- Kerndorff, H., Pasche, E., Harpke, D. (2016). The Genus *Crocus* (Liliiflorae, Iridaceae): Taxonomical Problems and How to Determine a Species Nowadays, *Stapfia*: 42.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A, Janzen, D.H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 8369-8374.
- Mathew, B., (1982). The *Crocus*, A Revision of The Genus *Crocus* (Iridaceae), BT Batsford Ltd. London, UK.
- Müller, K.F., Borsch, T., Hilu, K.W. (2006). Phylogenetic utility of rapidly evolving DNA at high taxonomical levels: contrasting matK, trnT-F, and rbcL in basal angiosperms. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41: 99-117.
- Peruzzi, L. & Carta, A. (2011). *Crocus ilvensis* sp. nov.(sect. *Crocus*, Iridaceae), endemic to Elba Island (Tuscan archipelago, Italy). *Nordic Journal of Botany*, 29: 6-13.
- Petersen, G., Seberg, O., Thorsøe, S., Jørgensen, T., Mathew, B. (2008). A phylogeny of the genus *Crocus* (Iridaceae) based on sequence data from five plastid regions. *Taxon*, 57: 487-499.

- Yılmaz, A., (2021). The Importance in Phylogenetic Relationships of The Regions Belonging to Nuclear and Plastid DNA among *Crocus biflorus* subspecies. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25: 61-70.
- Yousefzadeh, H., Colagar, A.H., Yousefi, E., Badbar, M., Kozłowski, G. (2019). Phylogenetic relationship and genetic differentiation of *Populus caspica* and *Populus alba* using cpDNA and ITS noncoding sequences. *Journal of Forestry Research*, 30: 451-461.

- İnal, B. & Fidan, M. (2021). Siirt İlinin Farklı Bölgelerinde Yayılış Gösteren *Crocus biflorus* Mill. subsp. *pseudonubigena* B.Mathew Türüne Ait Örnekler Arasındaki Akrabalık İlişkisinin Moleküler Düzeyde Belirlenmesi. *Şirnak Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(1): 14-22.
- İnal, B. & Fidan, M. (2021). Determination of Molecular Kinship Relations Between The samples of *Crocus biflorus* Mill. subsp. *pseudonubigena* B.Mathew Species Collected from Different Regions of Siirt Province. *Sirnak University Journal of Sciences*, 2(1): 14-22.