



Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/yyufbed>



Araştırma Makalesi

Kars ili Endemik ve Nadir Bitki Türlerinin Tanımlanmasında ITS1 ve ITS2 Gen Bölgelerinin Etkinliği

 Funda ÖZDEMİR DEĞİRMENCİ^{*1},  Asiye ULUĞ²,
 Gül Esma AKDOĞAN KARADAĞ³,  Fevzi ÖZGÖKÇE⁴

¹ Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 40100, Kırşehir, Türkiye

² Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 36000, Kars, Türkiye

³ Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 36000, Kars, Türkiye

⁴ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 65080, Van, Türkiye

*Sorumlu yazar e-posta: funda07@gmail.com

Öz: DNA barkodlama, bitki türlerinin genetik düzeyde doğru ve güvenilir şekilde tanımlanmasını sağlayan etkili bir yöntemdir. Bu çalışmada, Kars iline özgü endemik bitki türlerinin moleküler karakterizasyonu ve filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla ITS1 ve ITS2 barkod gen bölgeleri kullanılmıştır. Elde edilen DNA dizileri, her iki bölgenin de moleküler tanımlama için yüksek çözünürlük sunduğunu, ancak ITS2 bölgesinin tür düzeyinde daha fazla bilgi içeriği ve yüksek nükleotit çeşitliliği sağladığını göstermektedir. Genetik çeşitlilik analizleri sonucunda bazı türlerde yüksek nükleotit çeşitliliği ve özgün mutasyonlara rastlanırken, bazı türlerde ise oldukça korunmuş dizilere ve sınırlı düzeyde genetik farklılıklara rastlanmıştır. ITS1 ve ITS2 bölgelerinin birlikte kullanımı, taksonomik sınıflandırmanın daha güvenilir ve kapsamlı bir şekilde gerçekleştirilmesine olanak tanımaktadır. Bu çalışmada, iki gen bölgesi için elde edilen ve veri tabanına yüklenen genetik barkodlar, Türkiye'nin, özellikle Kars ilinin biyolojik çeşitliliğinin ulusal ve uluslararası düzeyde belgelenmesine ve korunmasına önemli bir katkı sunacaktır. Ayrıca, çalışma sonuçları bölgenin biyocoğrafyası ve ekolojik süreçlerine ilişkin yeni araştırmalara bilimsel bir temel sağlayarak, biyolojik çeşitliliğin korunması ve taksonomik doğrulama çalışmalarına değerli bir kaynak oluşturma potansiyeline sahiptir.

Anahtar Kelimeler: DNA barkodlama, Endemik, Filogenetik, ITS1, ITS2

The Effectiveness of ITS1 and ITS2 Gene Regions in the Identification of Endemic and Rare Plant Species in Kars Province

Abstract: DNA barcoding is an effective method for accurate and reliable plant species identification at the genetic level. In this study, the ITS1 and ITS2 barcode gene regions were used to characterise the molecular diversity and determine the phylogenetic relationships of endemic plant species from Kars Province. The DNA sequences obtained indicate that both regions provide high resolution for molecular identification; however, the ITS2 region provides greater nucleotide diversity and higher information content at the species level. Genetic diversity analyses revealed high nucleotide variation and the presence of singleton mutations in some species, while others exhibited highly conserved sequences with limited genetic divergence. The combined use of ITS1 and ITS2 regions allows a more reliable and comprehensive taxonomic classification. In this study, the genetic barcodes obtained for the two gene regions have been uploaded to the database, thus contributing significantly to the documentation and conservation of the biodiversity of Türkiye, in particular Kars province, both nationally and internationally. In addition, the results of this study provide a scientific basis for new research on the biogeography and ecological processes of the region, providing a valuable resource for biodiversity conservation and taxonomic validation studies.

Keywords: DNA barcoding, Endemic, ITS1, ITS2, Phylogenetics

Gönderilme Tarihi: 05.04.2025

Kabul Tarihi: 02.07.2025

Nasıl atıf yapılır: Özdemir Değirmenci, F., Uluğ, A., Akdoğan Karadağ, G. E., & Özgökçe, F. (2025). Kars ili endemik ve nadir bitki türlerinin tanımlanmasında ITS1 ve ITS2 gen bölgelerinin etkinliği. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 30(2), 485-498. <https://doi.org/10.53433/yyufbed.1670379>

1. Giriş

Türkiye, Akdeniz, İran-Turan ve Avrupa-Sibirya gibi üç büyük floristik bölgenin kesişim noktasında yer alması nedeniyle, dünya genelinde bitki çeşitliliği açısından en zengin ülkeler arasında kabul edilmektedir (Davis, 1988). Ülkenin yedi coğrafi bölgesinde görülen farklı iklim koşulları, topoğrafik çeşitlilik, jeolojik ve jeomorfolojik yapıların zenginliği ile deniz, göl ve akarsu gibi çeşitli su ekosistemlerinin varlığı, Türkiye florasının zenginliğini destekleyen başlıca çevresel faktörlerdir (Güneş & Özba, 2014). Yaklaşık 10.000'den fazla bitki türünü barındıran Türkiye, bu türlerden 3.035'inin endemik olması nedeniyle önemli bir bitki biyoçeşitliliği merkezidir (Güneş & Özba, 2014; POWO, 2025). Türkiye'nin floristik zenginliğine önemli ölçüde katkı sunan bölgelerden biri olan Doğu Anadolu'da yer alan Kars ili, uluslararası ölçütlere göre belirlenen ve doğa koruma açısından öncelikli alanlar arasında kabul edilen "Önemli Bitki Alanları (ÖBA)" kapsamında değerlendirilen 144 bölgeden üçünü Çıldır Gölü, Allahuekber Dağları ve Sarıkamış Ormanları sınırları içerisinde barındırmaktadır (Özhatay ve ark., 2005). Ağırlıklı olarak İran-Turan floristik bölgesinin özelliklerini taşıyan Kars, kuzey kesimlerinde Avrupa-Sibirya, güneyde ise Iğdır çevresinde Akdeniz flora bölgesinin etkisini göstermektedir. Bu üç büyük flora bölgesinin geçiş kuşağında yer alması ve Kafkasya'ya komşu konumu, ilin bitki örtüsünü ekolojik ve floristik açıdan daha da çeşitlendirmektedir. Bugüne dek Kars ilinde saptanan 1.615 bitki türü, Türkiye florasının yaklaşık %16'sını oluşturmaktadır. Bu türlerden 71'i endemiktir ve bunların 12'si yalnızca Kars'a özgü lokal endemik türlerdir (Güneş & Özba, 2014).

Bölgenin sahip olduğu bu değerli bitki çeşitliliği çeşitli doğal ve antropojenik tehditler nedeniyle baskı altındadır. Özellikle küresel iklim değişikliğine bağlı olarak artan sıcaklıklar ve değişen yağış rejimleri, yüksek rakımlı alanlarda yaşayan hassas türlerin yaşam alanlarını daraltmakta, alt kuşaklardan gelen türlerle artan rekabet baskısı altında bırakmaktadır (Demir ve ark., 2009). Aşırı ve düzensiz otlatma faaliyetleri, özellikle step ve subalpin kuşaklarda habitat bütünlüğünü bozarak endemik ve nadir türlerin yayılış alanlarında ciddi ekolojik tahribatlara yol açmaktadır (Erken ve ark., 2022). Endemik ve nadir bitki türleri, sınırlı yayılış alanları ve düşük ekolojik toleransları nedeniyle biyolojik çeşitliliğin korunmasında özel önem taşımaktadır. Habitat kaybı, iklimsel değişkenlikler ve insan faaliyetlerinden kaynaklanan tehditler karşısında yüksek duyarlılık gösteren bu türlerin genetik çeşitliliklerinin belirlenmesi ve doğru taksonomik teşhislerinin yapılması, hem koruma biyolojisi hem de sistematik botanik açısından kritik öneme sahiptir (Myers ve ark., 2000; Mace ve ark., 2008; Nohutçu ve ark., 2019). Ancak geleneksel morfolojik tanımlama yöntemleri, fenotipik plastisite, mevsimsel varyasyonlar ve ekolojik koşullardaki farklılıklar nedeniyle çoğu zaman yetersiz kalabilmektedir (CBOL Plant Working Group, 2009). Bu nedenle, DNA barkodlama yöntemleri; tür düzeyinde kesin teşhis imkânı sunan, türler arası genetik farklılıkların ortaya konulmasına olanak tanıyan ve filogenetik ilişkilerin çözülmesinde etkili olan modern moleküler yaklaşımlar arasında öne çıkmaktadır (Hebert ve ark., 2003).

DNA barkodlama yöntemlerinde yaygın olarak kullanılan genetik belirteçlerden biri olan internal transcribed spacer (ITS) bölgesi, özellikle ITS1 ve ITS2 dizileri, bitkilerin moleküler düzeyde tanımlanması ve filogenetik ilişkilerinin ortaya konulmasında önemli bir araç olarak öne çıkmaktadır (Baldwin ve ark., 1995; Coleman, 2003; Chen ve ark., 2010). ITS bölgeleri, nükleer ribozomal DNA (nrDNA) üzerinde yer alan ve transkripsiyona uğrayan aralıkları temsil eder; ITS1 bölgesi 18S ve 5.8S rRNA genleri arasında, ITS2 ise 5.8S ve 28S rRNA genleri arasında konumlanmaktadır (White ve ark., 1990). Bu diziler, yüksek oranda korunmuş rRNA genleri ile çevrelendikleri için evrensel primerler aracılığıyla kolaylıkla amplifiye edilebilmekte ve geniş bir bitki taksonomik yelpazesinde tür düzeyinde ayırt edici özellikler sunmaktadır (Chase ve ark., 2005; Chen ve ark., 2010; Mishra ve ark., 2016; Bhat ve ark., 2024). Yüksek kopya sayısına sahip bu iki gen bölgesi karasal bitki türlerini cins düzeyinde ayırma gücüne sahiptir (Chase ve ark., 2007; Kang ve ark., 2017). ITS gen bölgesi farklı bitki gruplarının sistematik çalışmalarında en çok kullanılan DNA barkod bölgesi olmasının yanı sıra plastid DNA barkod bölgelerine göre türler arası ayırım yapma gücü daha fazladır (Letsiou ve ark., 2024).

ITS1 ve ITS2 dizileri, endemik ve nadir bitki türlerinin moleküler teşhisinde önemli avantajlar sağlamaktadır. Türler arası yüksek seviyede nükleotid varyasyonu göstermeleri, özellikle filogenetik olarak yakın akraba türlerin ayırt edilmesinde bu bölgeleri oldukça etkili hale getirmektedir (Kress ve ark., 2005; Sokolowska ve ark., 2022; Letsiou ve ark., 2024). Ayrıca bu diziler, yalnızca bitkiler değil; mantarlar, algler ve likenler gibi çok çeşitli organizma gruplarında yaygın şekilde kullanılmakta olup, onları evrensel nitelikte bir barkod bölgesi haline getirmiştir (Schoch ve ark., 2012; Banchi ve ark., 2018). Çin florasında gerçekleştirilen kapsamlı bir çalışmada, ITS barkod bölgesinin bitkilerin yaklaşık

%92'sini doğru bir şekilde teşhis edebildiği rapor edilmiştir (China Plant BOL Group, 2011). Ayrıca farklı bitki aileleri ile yapılan tanımlama çalışmalarında ITS gen bölgesinin etkinliği gösterilmiştir (Michel et al., 2016; Won & Renner, 2005). Bu durum, özellikle endemik ve dar yayılışlı türlerin tanımlanması açısından ITS bölgelerinin taksonomik doğruluk ve koruma biyolojisine katkı potansiyelini ortaya koymaktadır. Moleküler düzeyde gerçekleştirilen bu teşhisler, yalnızca türlerin sistematik konumunu netleştirmekle kalmayıp, aynı zamanda populasyon düzeyinde genetik çeşitliliğin değerlendirilmesine ve türlerin korunmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesine de temel oluşturmaktadır.

Filogenetik analizlerde ITS1 ve ITS2 bölgelerinin kullanımı, endemik türlerin evrimsel ilişkilerinin çözülmesini sağlarken, morfolojik olarak benzer fakat genetik olarak farklılaşmış türlerin ayrımında da yüksek çözünürlük sunmaktadır. Bununla birlikte, bazı bitki gruplarında ITS bölgelerinin çoklu kopyalar hâlinde bulunması (örneğin paraloglar ya da psödogenler), aynı birey içerisinde dizisel heterojenliklere neden olabilmekte ve bu durum filogenetik analizlerin yorumlanmasında dikkat gerektirmektedir (Alvarez & Wendel, 2003). Ayrıca, bazı türlerde ITS bölgelerinin amplifikasyonunda veya sekans analizinde teknik zorluklarla karşılaşılabilenekte olup, bu gibi durumlarda tamamlayıcı genetik belirteçlerin kullanımı gerekebilmektedir (Hollingsworth ve ark., 2011).

Ulug ve ark. (2025), Kars ilinden örnekledikleri ve bu çalışmadaki 11 türle ortak olan toplam 14 endemik bitki türü üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, trnH-psbA, maturase K (matK), ve ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcL) kloroplast gen bölgelerini çoğaltarak bu türlerin moleküler düzeyde tanımlanmasına katkı sağlamışlardır. Bu çalışmanın temel amacı ise, Kars iline özgü endemik ve nadir bitki türlerinin tanımlanmasında, söz konusu kloroplast gen bölgelerine ek olarak ITS1 ve ITS2 barkod bölgelerinin etkinliğini karşılaştırmalı olarak değerlendirmektir. Bu kapsamda, ITS1 ve ITS2 dizileri kullanılarak hedef türler arasında genetik çeşitlilik analizi gerçekleştirilmiş; filogenetik ilişkiler ortaya konmuş ve her iki barkod bölgesinin türler arasındaki ayrımı sağlama kapasitesi analiz edilmiştir. Elde edilen moleküler veriler, Kars ilinin floristik zenginliğini bilimsel olarak belgelemenin yanı sıra, bölgedeki endemik ve nadir bitki türlerinin korunmasına ve sürdürülebilir yönetimine yönelik uygulamalara bilgi temeli sunmayı amaçlamaktadır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Bitki örnekleri ve DNA izolasyonu

Üçü lokal endemik olmak üzere toplam 12 endemik bitki türü, Kars ilinde Önemli Bitki Alanları (ÖBA) olarak tanımlanan ekolojik bölgelerden toplanmıştır (Özhatay ve ark., 2005). Özellikle Çıldır Gölü, Allahuekber Dağları, Kağızman ve Sarıkamış Ormanları çevresinden araştırma materyali için belli aralıklarla araziye çıkılarak bitki materyali temin edilmiştir. Bitki numunelerin teşhisinde Türkiye Florası (Davis ve ark., 1970; Davis ve ark., 1988; Güner ve ark., 2000)'ndan faydalanılmıştır. Araştırmanın yapılabilmesi için her bir popülasyondan yeterli miktarda toplanan bitki örnekleri, numaralandırıldıktan sonra herbaryum tekniklerine uygun olarak kurutulmuş ve kütük numarası verilmiştir. Bu herbaryum materyalleri şu anda Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Herbaryumu (VANF)'nda saklanmaktadır. Örnekleme sürecinde her türün yayılış gösterdiği farklı habitatlardan üçer birey örneklenmiştir (Çizelge 1). Bitkisel materyal olarak her bir endemik türe ait yaprak örnekleri toplanmış ve hücresel bütünlüğün korunmasını sağlamak amacıyla DNA izolasyon sürecine kadar nem alıcı özellikteki silika jel içeren steril plastik torbalarda muhafaza edilmiştir. DNA izolasyonu, yaprak dokularından nükleer DNA'nın saflaştırılması amacıyla Kistler (2012) tarafından geliştirilen modifiye CTAB protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA ekstraktlarının kalite ve saflık değerlendirmesi, 230 nm, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbans ölçümleri yapılarak belirlenmiştir. Ölçümler, Biodrop Lite 7141 V.1.0.4 spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 1. Kars ilinden örneklenen endemik ve nadir bitkilere ait bilgiler (* Lokal endemik bitkiler)

Endemik bitki türleri	Habitat	Familya
* <i>Onosma nigricaulis</i> Riedl	Kars	Boraginaceae
<i>Onosma isaurica</i> Boiss. & Heldr.	Sarıkamış	Boraginaceae
<i>Tragopogon aureus</i> Boiss.	Kars	Asteraceae
<i>Papaver triniifolium</i> Boiss.	Çıldır	Papaveraceae
<i>Rosa pisiformis</i> (Christ) Sosn.	Kars	Rosaceae
* <i>Lathyrus karsianus</i> P.H. Davis	Sarıkamış	Fabaceae
<i>Astragalus globosus</i> Vahl	Kısır Dağı	Fabaceae
<i>Salvia rosifolia</i> Sm.	Kağızman	Lamiaceae
<i>Pastinaca armena</i> Fisch. & C.A.Mey.	Arpaçay	Apiaceae
subsp. <i>dentata</i> (Frey et Sint.) Chamberlain		
* <i>Vincetoxicum coskuncebianus</i> Makbul & Güven	Çıldır, Taşbaşı Köyü	Apocynaceae
<i>Fritillaria michailovskyi</i> Fomin	Sarıkamış	Liliaceae
<i>Draba bruniifolia</i> Steven subsp. <i>armeniaca</i> Coode & Cullen	Kars	Brassicaceae

2.2. ITS1 ve ITS2 gen bölgelerinin PCR amplifikasyonu

ITS1 ve ITS2 için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) amplifikasyonu, toplam 20 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyon karışımı; 4 µl HOT FIREPol Blend Master Mix (Solis BioDyne, Tartu, Estonya), her bir primer çifti için 0.5 µl ileri ve geri primer (ITS1F: GCATCGATGAAGAACGCAGC, ITS1R: TCCTCCGCTTATTGATATGC; ITS2F: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG, ITS2R: GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (White vd., 1990), 5 µl 10 ng seyreltilmiş DNA ve 10 µl deiyonize su içerecek şekilde hazırlanmıştır.

PZR amplifikasyonu, başlangıçta 94 °C'de 4 dakika süresince gerçekleştirilen denatürasyon adımı ile başlatılmıştır. Bunu takiben, her biri 94 °C'de 1 dakika süreyle denatürasyon, 50 saniye boyunca uygun bağlanma sıcaklığında (ITS1 için 59 °C, ITS2 için 60 °C) bağlanma ve 72 °C'de 1 dakika süresince uzatma aşamalarını içeren 35 döngü lük bir amplifikasyon protokolü uygulanmıştır. Son olarak, 72 °C'de 10 dakika süreyle gerçekleştirilen son uzatma adımı ile reaksiyon tamamlanmıştır. Amplifikasyonun başarıyla gerçekleştiğini doğrulamak amacıyla, elde edilen PZR ürünleri %3 agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. Elektroforez işlemi, 90 V gerilim altında 30 dakika süreyle yürütülmüş ve amplifikasyon ürünlerinin varlığı, jelde uygun büyüklükteki bantların gözlemlenmesi ile doğrulanmıştır. DNA fragmentlerinin büyüklük tahminleri için düşük aralıklı DNA merdiveni (BIO BASIC, GM303) kullanılmıştır.

2.3. Genetik analizler

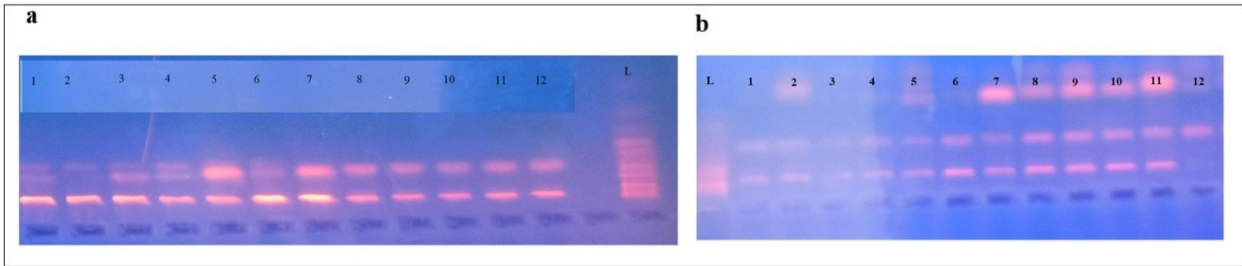
Başarılı bir şekilde amplifiye edilen PZR ürünleri, dizileme öncesinde saflaştırma işlemine tabi tutulmuş ve ardından BM Labosis (Çankaya, Ankara) tarafından Sanger dizileme analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ham dizileme verileri, kromatogram bazında görselleştirme ve değerlendirme amacıyla MEGA11 yazılımı (Tamura ve ark., 2021) kullanılarak incelenmiştir. Dizi hizalama işlemi, çoklu dizi karşılaştırmalarında yaygın olarak kullanılan CLUSTAL yazılımı (Thompson ve ark., 1994) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte, hizalanan dizilerin bütünlüğü ve doğruluğu dikkatle kontrol edilerek analizlere uygun hale getirilmiştir. Tür düzeyinde tanımlamayı doğrulamak amacıyla, hizalanan diziler GenBank veri tabanında bulunan referans dizilerle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma işlemi, National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2024) veri tabanı tarafından sağlanan BLASTn algoritması (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) (Altschul ve ark., 1990) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sırasında, sorgu kapsamı (query coverage) ve dizi

kimliği (sequence identity) gibi temel parametreler dikkate alınarak, çalışmada elde edilen dizilerin tür düzeyindeki kimlikleri ile en yakın akraba türlerle olan benzerlikleri değerlendirilmiştir. Her bir barkod için ayrı ayrı filogenetik analizler MEGA11 yazılımı (Tamura ve ark., 2021) ile gerçekleştirilmiştir. Her tür için ayrı olarak gerçekleştirilen filogenetik analizler ilgili türün ITS1 ve ITS2 barkod gen bölgesi için elde edilen sekansı ve bu sekansın NCBI veri tabanında en yüksek eşleşme ve benzerlik gösterdiği aynı cinse ait akraba türlerin sekansları kullanılarak yapılmıştır.

3. Bulgular

3.1. ITS1 ve ITS2 gen bölgesi ile tür tanımlaması

ITS1 ve ITS2 gen bölgeleri endemik ve nadir bitkiler için başarılı bir şekilde amplifiye edilmiştir (Şekil 1). Her bitki türü adına bir örneğin DNA dizisi elde edilmiştir. 12 endemik bitki taksonunun ITS1 ve ITS2 gen bölgesi dizilimi analiz edilerek, elde edilen dizilerin GenBank veri tabanındaki referans dizilerle karşılaştırılması yapılmıştır (Çizelge 2 ve Çizelge 3). BLAST analizleri, incelenen tüm türlerin ITS1 ve ITS2 gen bölgesi dizilerinin en yakın akraba türlerle yüksek oranda benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Kars ilinde yayılış gösteren 12 endemik bitkiye ait genetik çeşitlilik, dağılım ve ekolojik özellikler hakkında önemli bilgiler sağlayan 24 yeni genetik barkod üretilmiştir. Bu genetik barkodlar için alınan aksesyon kodları NCBI, GenBank veri tabanına yüklenmiştir (Çizelge 2 ve Çizelge 3).



Şekil 1. (a) ITS1 gen bölgesine ait jel elektroforez görüntüsü, (b) ITS2 gen bölgesine ait jel elektroforez görüntüsü 1: *L. karsianus*, 2: *A. globosus*, 3: *S. rosifolia*, 4: *L. galactophyllum*, 5: *O. isaurica*, 6: *O. nigricaulis*, 7: *P. armena* subsp. *dentata*, 8: *R. pisiformis*, 9: *P. triniifolium*, 10: *T. aureus*, 11: *V. coskuncelebianus* 12: *D. bruniifolia* subsp. *armeniaca*, L:Düşük aralıklı (50-500 bp) DNA merdiveni.

Çalışılan endemik bitki türlerinin ITS1 gen bölgesi için eşleşme sonuçları ve alınan aksesyon kodları Çizelge 2’de verilmiştir. ITS1 gen bölgesi için *Pastinaca armena* subsp. *dentata*, *Pastinaca armena* örneği ile eşleşme göstermiştir (MT254215.1). *Fritillaria michailovskyi*’ de aynı türle (HE656030.1) %100 benzerlik oranı ile eşleşme göstermiştir. Her ne kadar *Onosma isaurica*, *Onosma nigricaulis* ve *Tragopogon aureus* türleri için NCBI veri tabanında yayınlanmış ITS1 ve ITS2 gen dizileri mevcut olsa da (*O. isaurica*, *O. nigricaulis* ve *T. aureus* türleri için sırasıyla aksesyon kodları: MK321815.1, MK321815.1, KF050364.1) bu türler aynı türlerle eşleşme göstermemiştir. Bunun yerine aynı cinsteki diğer yakın türlerle eşleşme göstermiştir. Çalışılan diğer endemik türler, NCBI GenBank veri tabanında bu türler için daha önce yayınlanmış ITS1 dizisinin bulunmaması nedeniyle aynı türle hizalanma göstermemiştir (NCBI, 2024). Bu endemik bitkiler için elde edilen diziler, aynı cinslere ait akrabalarıyla eşleşme göstermiştir. *Onosma isaurica*, *Onosma visianii* (JX267844.1) ile % 97.42 özdeşlikle en düşük eşleşmeyi gösterirken *Vincetoxicum coskuncelebianus*, *Vincetoxicum hiriundinaria* (OP756339.1) ile %99.47 benzerlikle en yüksek eşleşmeyi göstermiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Çalışılan 12 endemik bitki türü için ITS1 gen bölgesinin GenBank hizalama sonuçları

Endemik türler	Ürün uzunluğu (bp)	Eşleşen türler	GenBank Aksesyon numarası	Eşleşme yüzdesi	e değeri	Benzerlik yüzdesi
ITS1						
<i>Onosma nigricaulis</i>	378	<i>Onosma tenuiflora</i> (FR718864.1)	PQ278968	100	0	98.94
<i>Onosma isaurica</i>	310	<i>Onosma visianii</i> (JX267844.1)	PQ278969	100	1e-151	97.42
<i>Tragopogon aureus</i>	364	<i>Tragopogon ruber</i> (MT922842.1)	PQ278970	100	0	98.63
<i>Rosa pisiformis</i>	328	<i>Rosa laxa</i> (PP906913.1)	PQ278967	100	2e-160	98.78
<i>Lathyrus karsianus</i>	308	<i>Lathyrus bauhunii</i> (AM401032.1)	PQ278964	100	8e-156	98.35
<i>Astragalus globosus</i>	344	<i>Astragalus latifolius</i> (KX954972.1)	PQ278973	100	2e-175	98.84
<i>Salvia rosifolia</i>	303	<i>Salvia aucheri</i> var. <i>canescens</i> (DQ667286.1)	PQ278965	100	4e-147	97.70
<i>Papaver triniifolium</i>	303	<i>Papaver armena</i> (DQ250302.1)	PQ278966	100	0	98.75
<i>Pastinaca armena</i> subsp. <i>dentata</i>	387	<i>Pastinaca armena</i> (MT254215.1)	PQ278974	100	0	99.45
<i>Vincetoxicum coskuncebianus</i>	378	<i>Vincetoxicum hiriundinaria</i> (OP756339.1)	PQ278972	100	0	99.47
<i>Fritillaria michailovskyi</i>	324	<i>Fritillaria michailovskyi</i> (HE656030.1)	PQ859600	100	2e-17	100
<i>Draba brunifolia</i> subsp. <i>armeniaca</i>	302	<i>Draba brunifolia</i> (DQ467252.1)	PQ859601.1	100	0	100

Çizelge 3. Çalışılan 12 endemik bitki taksonu için ITS2 gen bölgesinin GenBank hizalama sonuçları

Endemik türler	Ürün uzunluğu (bp)	Eşleşen türler	GenBank Aksesyon numarası	Eşleşme yüzdesi	e değeri	Benzerlik yüzdesi
ITS2						
<i>Onosma nigricaulis</i>	377	<i>Onosma erecta</i> (FR718846.1)	PQ278980	100	0	98.03
<i>Onosma isaurica</i>	407	<i>Onosma tenuiflora</i> (FR718864.1)	PQ278981	100	0	99.73
<i>Tragopogon aureus</i>	400	<i>Tragopogon pratensis</i> (MT922836.1)	PQ278982	100	0	99
<i>Rosa pisiformis</i>	341	<i>Rosa phoenicia</i> (AB043829.1)	PQ278979	100	2e-179	99.41
<i>Lathyrus karsianus</i>	379	<i>Lathyrus boissieri</i> (AM401146.1)	PQ278976	100	0	98.94
<i>Astragalus globosus</i>	400	<i>Astragalus latifolius</i> (KX954972.1)	PQ278984	100	0	99.50
<i>Salvia rosifolia</i>	282	<i>Salvia huberi</i> (KU563800.1)	PQ278977	100	4e-143	99.29
<i>Papaver triniifolium</i>	396	<i>Papaver persicum</i> (PP232209.1)	PQ278978	100	0	98.99
<i>Pastinaca armena</i> subsp. <i>dentata</i>	364	<i>Pastinaca armena</i> (MT254215.1)	PQ278984	100	0	99.45
<i>Vincetoxicum coskuncebianus</i>	378	<i>Vincetoxicum mongolicum</i> (MH712653.1)	PQ278983	100	0	98.68
<i>Fritillaria michailovskyi</i>	362	<i>Fritillaria michailovskyi</i> (HE656030.1)	PQ859605	100	0	100
<i>Draba brunifolia</i> subsp. <i>armeniaca</i>	320	<i>Draba oligosperma</i> (NC_049629.1)	PQ859616.1	100	0	99.83

ITS2 gen bölgesine yönelik gerçekleştirilen BLAST analizleri, çalışılan tüm endemik bitki türlerinin ITS2 dizilerinin en yakın akraba türlerle yüksek düzeyde benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Elde edilen eşleşme oranları %98.03 ile %100 arasında değişmekte olup, tüm türlerde anlamlı düzeyde genetik uyum saptanmıştır (Çizelge 3). ITS1 gen bölgesi ile karşılaştırıldığında, ITS2 dizilerinin benzer şekilde yüksek ayırt ediciliğe sahip olduğu gözlemlenmiştir. *Fritillaria michailovskyi*, ITS1 bölgesinde olduğu gibi ITS2 bölgesinde de aynı türle (HE656030.1) %100 benzerlik oranı ile eşleşmiştir. *Onosma isaurica* (*Onosma tenuiflora*: %99.73), *Astragalus globosus* (*Astragalus latifolius*: %99.50) ve *Pastinaca armena subsp. dentata* (*Pastinaca armena*: %99.45) türleri ise oldukça yüksek düzeyde sekans benzerliği göstermiştir. Bu bulgular, ITS2 bölgesinin söz konusu türler için moleküler tanımlamada güvenilir bir belirteç olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, *Onosma nigricaulis* (*Onosma erecta*: %98.03) ve *Papaver triniifolium* (*Papaver persicum*: %98.99) türlerinde gözlemlenen görece düşük benzerlik oranları, bu türlerde ITS2 dizilerinde daha yüksek düzeyde varyasyon olabileceğine ya da mevcut veri tabanlarındaki dizilerin bu türleri tam olarak temsil edemeyebileceğine işaret etmektedir.

3.2. ITS1 ve ITS2 gen bölgelerinin filogenetik analizi

ITS1 gen bölgesi için analiz edilen türlerin eşleşen sekans uzunlukları 281 bp (*S. rosifolia*) ile 387 bp (*P. armena subsp. dentata*) arasında değişmektedir. Korunan bölge uzunlukları ise 281 bp ile 365 bp arasında olup, bu durum ITS1 gen bölgesinin farklı türler arasında değişen düzeyde korunmuş olduğunu göstermektedir. Farklılık gösteren en fazla filogenetik farklılaşmaya yol açan bölgeler açısından, en fazla varyasyonun *Pastinaca* (34 bölge), *Onosma* (27 bölge) ve *Papaver* (27 bölge) türlerinde gözlemlendiği tespit edilmiştir. Bu türlerde yüksek düzeyde tekil (singleton) bölge ve parsimonik (filogenetik açıdan bilgilendirici) bölge sayıları da dikkate alındığında, özellikle *Onosma* türlerinin genetik olarak diğer türlerden daha farklı bir konumda olduğu anlaşılmaktadır (Çizelge 4). İndel (insersiyon/delesyon) analizi, ITS1 gen bölgesinde nispeten düşük sayıda indel içeren türlerin baskın olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, *Onosma* türlerinde görülen 10 delesyon bu türlerin filogenetik olarak daha uzak akrabalıkları olabileceğini düşündürmektedir. Nükleotit çeşitliliği en yüksek *Onosma* ve *Papaver* ($\pi = 0.03$) türlerinde gözlemlenmiş olup, bu değerler bu türlerin türler arası genetik çeşitliliğinin diğerlerine kıyasla daha yüksek olabileceğini ortaya koymaktadır. Buna karşılık, *Tragopogon*, *Astragalus* ve *Pastinaca* türlerinde çeşitliliğin son derece düşük ($\pi \leq 0.01$) olduğu belirlenmiştir, bu da bu türlerde ITS1 gen bölgesinin oldukça korunmuş olduğunu göstermektedir. ITS1 gen bölgesinin GC içeriği %50.3 (*Lathyrus*) ile %64.3 (*Fritillaria*) arasında değişmekte olup, bu oranlar bitki ITS dizileri için beklenen aralıklara uygundur. GC içeriği filogenetik olarak bilgi sağlayan bir özellik olup, yüksek GC oranları genellikle daha korunmuş bölgelerle ilişkilendirilmektedir. *Fritillaria* türlerinin %64.3 ile en yüksek GC içeriğine sahip olması, bu türün diğerlerine kıyasla daha korunmuş bir ITS1 bölgesine sahip olduğunu düşündürmektedir.

Çizelge 4. ITS1 barkod gen bölgesi için filogenetik analiz sonuçları

Tür/Filogenetik parametreler	<i>Salvia</i>	<i>Lathyrus</i>	<i>Papaver</i>	<i>Rosa</i>	<i>Onosma</i>	<i>Vincetoxicum</i>	<i>Tragopogon</i>	<i>Pastinaca</i>	<i>Astragalus</i>	<i>Fritillaria</i>	<i>Draba</i>
Eşleşen tür sayısı	11	7	10	10	11	11	10	10	10	10	10
Eşleşen sekans uzunluğu	303	308	303	328	378	381	344	387	344	324	302
Korunan bölge	281	294	276	313	351	365	341	352	339	302	288
Farklılık gösteren bölge	22	14	27	13	27	13	3	34	4	22	9
Singleton bölge	13	9	18	10	9	6	1	25	2	9	4
Parsimoni bölge	9	5	9	3	18	7	2	8	2	13	5
Indel	-	-	-	3	10	-	1	1	1	-	-
Nükleotit çeşitliliği	0.02	0.02	0.03	0.01	0.03	0.01	0.00	0.01	0.00	0.02	0.01
GC içeriği %	62.6	50.3	55.9	58	55.6	62.4	52.7	55.1	52.6	64.3	51.1

Çizelge 5. ITS2 barkod gen bölgesi için filogenetik analiz sonuçları

Tür/Filogenetik parametreler	<i>Salvia</i>	<i>Lathyrus</i>	<i>Papaver</i>	<i>Rosa</i>	<i>Onosma</i>	<i>Vincetoxicum</i>	<i>Tragopogon</i>	<i>Pastinaca</i>	<i>Astragalus</i>	<i>Fritillaria</i>	<i>Draba</i>
Eşleşen tür sayısı	12	8	11	12	13	12	13	12	13	13	10
Eşleşen sekans uzunluğu	282	379	396	340	377	378	400	364	400	362	320
Korunan bölge	268	370	355	335	289	363	385	305	380	343	314
Farklılık gösteren bölge	13	9	40	5	88	14	15	59	20	19	6
Singleton bölge	4	1	24	2	65	7	7	48	12	10	3
Parsimoni bölge	9	8	16	3	23	7	8	11	8	9	3
Indel	-	-	1	-	11	-	-	-	2	-	-
Nükleotit çeşitliliği	0.02	0.00	0.03	0.00	0.04	0.01	0.01	0.03	0.03	0.02	0.01
GC içeriği %	63.3	49.0	58.1	58.4	55.7	64.2	55.0	56	51.3	65.8	54.8

ITS2 gen bölgesi için eşleşen sekans uzunlukları 282 bp (*S. rosifolia*) ile 400 bp (*Tragopogon, Astragalus*) arasında değişmektedir. Korunan bölge uzunlukları 268 bp ile 385 bp arasında olup, türler arasındaki değişkenlik ITS2'nin taksonomik ayırım yapabilme gücünü desteklemektedir (Çizelge 5). ITS1 gen bölgesine benzer olarak farklılık gösteren bölge sayısı açısından, en yüksek varyasyon *Onosma* (88 bölge), *Pastinaca* (59 bölge) ve *Papaver* (40 bölge) türlerinde gözlemlenmiştir. Bu yüksek değişkenlik, bu türlerin ITS2 gen bölgesinde nispeten hızlı bir değişim/varyasyon geçirdiğini göstermektedir. Buna karşılık, *Rosa* (5 bölge) ve *Lathyrus* (9 bölge) türlerinde düşük değişkenlik gözlenmiştir, bu da bu türlerde ITS2'nin daha korunmuş olduğunu ortaya koymaktadır. Singleton bölge açısından *Onosma* (65 bölge) ve *Pastinaca* (48 bölge) türlerinde yüksek değerler bulunmuştur. Tekil mutasyonlar içeren bu bölgelerin fazla olması, bu türlerin filogenetik açıdan farklılaşmış olabileceğine işaret etmektedir. Parsimoni bilgilendirici bölgeler açısından *Onosma* (23 bölge) ve *Papaver* (16 bölge) türlerinde nispeten yüksek sayıda filogenetik açıdan ayırt edici bölge gözlemlenmiştir. Bu durum, bu türlerin filogenetik analizlerde daha belirgin ayrımlarla gruplandığını desteklemektedir. Indel analizi, ITS2 bölgesinde nispeten düşük sayıda insersiyon/delesyon olayının gerçekleştiğini göstermektedir. Ancak, *Onosma* (11 indel) ve *A. globosus* (2 indel) gibi türlerde indel varlığı, bu bölgelerin farklılaşmış olduğuna işaret etmektedir. Nükleotit çeşitliliği (π) açısından en yüksek değerler ITS1 gen bölgesinde olduğu gibi *Onosma* ($\pi = 0.04$) ve *Papaver* ($\pi = 0.03$) türlerinde gözlemlenmiştir. Buna karşılık, *Lathyrus* ve *Rosa* türlerinde bu değer $\pi = 0.00$ olarak hesaplanmış olup, bu durum bu türlerin ITS2 bölgesinde genetik olarak oldukça korunmuş dizilere sahip olduğunu göstermektedir. ITS2 gen bölgesinin GC içeriği %49.0 (*Lathyrus*) ile %65.8 (*Fritillaria*) arasında değişmektedir. ITS dizilerinde GC oranı genellikle sekans stabilitesi ve varyasyon hızı ile ilişkilendirilir. Yüksek GC oranına sahip türler, daha korunmuş gen bölgelerine sahip olmakta ve bu türler arasında daha yakın filogenetik ilişkiler bulunmaktadır. Özellikle *Fritillaria* ve *Vincetoxicum* türlerinin yüksek GC içeriğine sahip olması, bu türlerin ITS2 dizilerinin diğer türlere kıyasla daha az değişkenlik gösterdiğini düşündürmektedir. Buna karşılık, *Lathyrus* türlerinde düşük GC içeriği gözlemlenmiş olup, bu durum bu türlerin ITS2 bölgesinin zaman içinde mutasyon süreçlerinde daha fazla değişikliğe uğramış olabileceğini göstermektedir (Çizelge 5).

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, ITS1 ve ITS2 gen bölgeleri kullanılarak incelenen endemik ve nadir bitki türlerinin genetik kimlikleri başarıyla doğrulanmış, türlerin referans dizilerle olan ilişkileri ortaya konmuştur. Her iki gen bölgesi de yüksek benzerlik oranları sunarak moleküler düzeyde tanımlamada etkinliklerini göstermiştir.

ITS1 gen bölgesi analizleri, bazı türlerin (örneğin *Fritillaria michailovskyi* ve *Pastinaca armena subsp. dentata*) kendi türlerine ait referans dizilerle yüksek düzeyde (%100 ve %99.45) eşleştiğini ortaya koymuş, bu da ITS1 dizisinin bu türler için yeterli taksonomik çözünürlük sunduğunu göstermiştir. Ancak *Onosma isaurica*, *Onosma nigricaulis* ve *Tragopogon aureus* gibi bazı türlerde, veri tabanında kendi türlerine ait diziler bulunmasına rağmen, eşleşmelerin aynı cins içerisindeki filogenetik olarak yakın türlerle gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu durum, söz konusu türlerde ITS1 bölgesine ait sekanslarda intra-tür varyasyonların bulunması, sekans kalitesine bağlı teknik faktörler ya da veri tabanındaki referans dizilerin taksonomik doğruluğundaki eksikliklerle ilişkili olabilir (Hollingsworth ve ark., 2011). Özellikle *Onosma isaurica*'nın *Onosma visianii* ile %97.42 benzerlik göstermesi, ITS1 bölgesinin bu türde tür düzeyinde ayırt edici gücünün sınırlı olabileceğine işaret etmektedir. Öte yandan, *Vincetoxicum coskuncelebianus*'un aynı cinse ait bir türle %99.47 oranında benzerlik göstermesi, türler arası taksonomik yakınlıkla birlikte muhtemel genetik muhafazayı yansıtmaktadır.

ITS2 gen bölgesine ait BLAST analizleri ise, tüm örneklerde yüksek düzeyde genetik benzerlik göstermiştir. Elde edilen eşleşme oranları %98.03 ile %100 arasında değişmekte olup, ITS2 bölgesinin tür düzeyinde tanımlamada güçlü ve güvenilir bir barkod olduğunu desteklemektedir (Chen ve ark., 2010; Yao ve ark., 2010). Özellikle *Fritillaria michailovskyi* türünde, ITS1 analizindeki %100'lük eşleşme ITS2 bölgesinde de teyit edilmiş ve barkod bölgesinin tanısal gücünü pekiştirmiştir. *Onosma isaurica* (*Onosma tenuiflora* ile %99.73), *Astragalus globosus* (*Astragalus latifolius* ile %99.50) ve *Pastinaca armena subsp. dentata* (*Pastinaca armena* ile %99.45) türlerinde yüksek düzeyde benzerlik oranları gözlenmiş ve bu sonuçlar, taksonomik yakınlığı desteklemiştir. Ayrıca bu bulgular, ITS2 bölgesinin yalnızca tanılama değil, aynı zamanda filogenetik yakınlıkların belirlenmesinde de

kullanılabilirliğini göstermektedir (Kress ve ark., 2005). Bununla birlikte, *Onosma nigricaulis* (*Onosma erecta* ile %98.03) ve *Papaver triniifolium* (*Papaver persicum* ile %98.99) gibi türlerde gözlenen nispeten daha düşük benzerlik oranları, ITS2 bölgesinde belirli türler için daha yüksek düzeyde genetik varyasyon olabileceğini göstermektedir. Bu durum, ya bu türler arasında daha belirgin moleküler ayrımların bulunduğu ya da bireysel/genomik düzeyde farklılıkların sekans verilerine yansıdığına işaret etmektedir (Schultz & Wolf, 2009).

Genel olarak, ITS1 ve ITS2 dizilerinden elde edilen yüksek benzerlik oranları, bu gen bölgelerinin endemik bitki türlerinin moleküler düzeyde tanımlanmasında güvenilir ve türler arası ayırt edici güce sahip barkod belirteçler olduğunu göstermektedir. ITS1 ile karşılaştırıldığında, ITS2 barkod bölgesi benzer düzeyde teşhis doğruluğu sunmakta ve bazı türlerde daha homojen bir varyasyon profili sergilemektedir. Bununla birlikte, çalışılan türlerin çoğunda referans veri eksikliği ya da sınırlı taksonomik temsil nedeniyle aynı türle doğrudan eşleşme sağlanamamış; bunun yerine filogenetik olarak yakın türlerle hizalanmalar gerçekleşmiştir. Bu durum, daha önce Ulug ve ark. (2025) tarafından gerçekleştirilen ve bu çalışmada yer alan 11 endemik türü de içeren çalışmayla paralellik göstermektedir. Söz konusu çalışmada, matK, rbcL ve trnH-psbA gibi kloroplast gen bölgeleri amplifiye edilmiş ve analiz edilen endemik türlerin büyük bir kısmı, bu çalışmada olduğu gibi, NCBI veri tabanında aynı türle değil, aynı cins içindeki yakın akraba türlerle eşleşme göstermiştir. Dolayısıyla her iki çalışmanın bulguları birlikte değerlendirildiğinde, hem nükleer ribozomal ITS bölgelerinin hem de kloroplast gen bölgelerinin, özellikle yeterince temsil edilmeyen endemik taksonlar için sınırlı referans veri nedeniyle bazen aynı türle eşleşme sağlamada yetersiz kalabileceği, ancak buna rağmen taksonomik yakınlıkları ortaya koymada ve moleküler tanımlama süreçlerinde önemli bilgiler sunduğu görülmektedir. Bu durum, özellikle endemik ve az çalışılmış taksonlar için DNA barkod veri tabanlarının zenginleştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır (CBOL Plant Working Group, 2009).

Filogenetik analizler, ITS1 ve ITS2 bölgelerinin türler arasında farklı varyasyon oranlara sahip olduğunu ortaya koymuştur. ITS1 bölgesi, *Onosma*, *Papaver* ve *Pastinaca* türlerinde yüksek varyasyon seviyeleri ve daha fazla parsimonik bilgilendirici bölge içermektedir. Bununla birlikte, *Tragopogon*, *Astragalus* ve *Pastinaca* türlerinde ITS1'in daha korunmuş olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, ITS2 bölgesi, özellikle *Onosma* ve *Pastinaca* türlerinde yüksek değişkenlik gösterirken, *Rosa* ve *Lathyrus* türlerinde daha korunmuş bir yapı sergilemektedir. İndel analizi sonuçları, her iki bölgedeki yapısal değişikliklerin düşük düzeyde olduğunu gösterse de, özellikle *Onosma* türlerinde tespit edilen delesyonlar, bu türlerin filogenetik olarak daha uzak akrabalıklara sahip olabileceğini düşündürmektedir. ITS bölgelerindeki GC içeriği, dizilerin korunmuşluğu ile ilişkilidir (Müller ve ark., 2015). Yüksek GC içeriği genellikle daha korunmuş bölgelerle ilişkilendirilirken, düşük GC içeriği daha hızlı varyasyon bölgeleri işaret etmektedir (Liu ve ark., 2023). Bu çalışmada, ITS2 bölgesinin GC içeriği *Lathyrus* türlerinde %49.0, *Fritillaria* türlerinde ise %65.8 arasında değişirken, ITS1 bölgesindeki GC içeriği %50.3 ile %62.6 arasında daha dar bir aralıkta kalmıştır. Bu durum, ITS2'nin türler arasındaki farklılıkları belirlemede daha fazla bilgi sağlayabileceğini göstermektedir.

ITS1 ve ITS2'nin varyasyon dinamikleri incelendiğinde, ITS2'nin genellikle daha fazla değişken bölge içerdiği ve daha yüksek nükleotit çeşitliliğine sahip olduğu görülmüştür. ITS2 bölgesi, tür ve aile bazında gerçekleştirilen filogenetik çalışmalarda yüksek oranda ayırım yapma gücüne sahiptir (Alvarez & Wendel, 2003; Bhat ve ark., 2024). ITS2'deki daha fazla değişken bölge, bu bölgenin taksonomik ayırım gücünün daha yüksek olabileceğini göstermektedir. Özellikle, ITS2 bölgesinde *Onosma* türlerinde 65, *Pastinaca* türlerinde ise 48 singleton bölge belirlenirken, ITS1'de bu türlerde daha düşük sayılarda singleton bölge tespit edilmiştir. Bu durum, ITS2'nin türlere özgü genetik işaretleri taşıyan daha fazla ve daha belirgin bir çeşitliliğe sahip olduğunu göstermektedir (Chen ve ark. 2010; Nasrollahi ve ark., 2019). Ayrıca, ITS2'de *Onosma* (23 bölge) ve *Papaver* (16 bölge) türlerinde daha fazla parsimonik bilgilendirici bölge belirlenmiştir. Bu da ITS2'nin çeşitlilik ilişkilerinin belirlenmesinde daha güvenilir ve daha fazla bilgi taşıyan bölgeler sunduğunu göstermektedir (Yao ve ark., 2010; Nasrollahi ve ark., 2019). Nükleotit çeşitliliği açısından, ITS2 bölgesi için *Onosma* türlerinde $\pi = 0.04$, *Papaver* türlerinde ise $\pi = 0.03$ olarak hesaplanırken, ITS1 için bu değerler 0.03'ü geçmemektedir. Daha yüksek nükleotit çeşitliliği, ITS2'nin türler arasındaki genetik farklılaşmayı daha iyi yansıtmaya potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Liu ve ark., 2023). Bu çalışmada, literatürdeki çalışmaların sonuçlarına benzer olarak, ITS2'nin daha fazla değişken bölge içermesi, yüksek nükleotit çeşitliliği ve filogenetik açıdan daha fazla bilgilendirici bölge içermesi nedeniyle, tür düzeyindeki ayrımları belirlemede daha yüksek çözünürlük sunduğu belirlenmiştir. Farklı bitki

türlerinin tanımlanmasında her iki bölgenin birlikte kullanımı, taksonomik ayrımın daha güvenilir ve kapsamlı şekilde yapılmasını sağlayacaktır. ITS1 ve ITS2 bölgelerinin birlikte analizi, filogenetik ilişkilerin daha güçlü şekilde aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır. Dolayısıyla, filogenetik analizlerde yalnızca tek bir bölgeye dayalı sonuçlar yerine, her iki bölgenin ve ek genetik belirteçlerin bir arada değerlendirilmesi önerilmektedir. Ayrıca bitkilerde DNA barkodlamanın tamamlayıcısı olarak bir türün genotiplerinin tanımlamak için üretilen DNA parmak izi çıkarılması, germplazm koruması ve kontrolünün sağlanmasına katkı sağlayacaktır (Nabhan ve ark., 2023).

Bu çalışma, ITS1 ve ITS2 gen bölgelerinin endemik ve nadir bitki türlerinin moleküler düzeyde tanımlanmasında güvenilir ve etkili belirteçler olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle yüksek genetik benzerlik gösteren türler arasında bu iki gen bölgesinin taksonomik doğrulama ve filogenetik analizlerde başarıyla kullanılabilmesi, dolayısıyla biyoçeşitliliğin korunmasına önemli katkılar sağlayabileceği belirlenmiştir. ITS1 bölgesi, bazı türler için yüksek düzeyde korunmuş yapısıyla güvenilir bir moleküler barkod sunarken; ITS2 bölgesi ise daha fazla değişkenlik ve nükleotit çeşitliliği içerdiğinden, tür düzeyindeki ayrımlarda daha fazla ayırt edici bilgi sağlamaktadır. Bu bulgular, her iki bölgenin birlikte kullanılmasıyla endemik ve nadir bitkilerin genetik çeşitliliğinin daha doğru biçimde belirlenebileceğini ve taksonomik analizlerin daha güvenilir sonuçlar vereceğini göstermektedir. ITS1 ve ITS2 gen bölgelerine ait toplam 24 genetik barkodun NCBI veri tabanına yüklenmesi, Türkiye'nin, özellikle de Kars ilinin biyolojik çeşitliliğinin ulusal ve uluslararası düzeyde belgelenmesine katkı sunmakta; gelecekte yürütülecek biyoçeşitlilik ve ekolojik süreç odaklı çalışmalara sağlam bir veri kaynağı oluşturmaktadır. Ayrıca, elde edilen dizilerin çoğunun veri tabanlarında daha önce yer almayan türlere ait olması, bu türlerin genetik açıdan ilk kez kayda geçirilmesi bakımından da önemli bir katkı sağlamaktadır. Bu çalışma, biyolojik çeşitliliğin belgelenmesi, taksonomik doğrulamanın gerçekleştirilmesi ve ekolojik süreçlerin daha derinlemesine anlaşılması açısından güçlü bir temel sunmaktadır. Elde edilen veriler, endemik ve nadir bitki türlerinin korunmasına yönelik daha etkili stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunacak ve biyolojik çeşitliliğin sürdürülebilir şekilde yönetilmesi için değerli bir kaynak oluşturacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2023-FM-35 numarası ile GÜDÜMLÜ Araştırma projesi olarak desteklenmiştir. Bu çalışmanın deney aşamalarının bir kısmı Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümünde, Prof. Dr. Zeki KAYA'nın yöneticiliğindeki Bitki Genetiği ve Doku Kültürü laboratuvarında yapılmıştır. Desteklerinden ötürü Prof. Dr. Zeki KAYA'YA teşekkür ederiz.

Yazar katkısı

Bu çalışmada, arazi çalışmaları Asiye ULUĞ ve Gül Esma AKDOĞAN KARADAĞ tarafından, bitki örnekleme ise yalnızca Gül Esma AKDOĞAN KARADAĞ tarafından yapılmıştır. Bitkilerin teşhisi ve herbaryum materyali haline getirilip Herbaryuma kayıt edilmesi Fevzi ÖZGÖKÇE tarafından yapılmıştır. Deneyisel çalışmalar, genetik analizler ve makale yazımı ise Asiye ULUĞ ve Funda ÖZDEMİR DEĞİRMENCİ tarafından gerçekleştirilmiştir.

Etik beyanı

Bu makalenin yazarları, bu çalışmada kullanılan materyal ve yöntemlerin etik kurul izni ve / veya yasal-özel izin gerektirmediğini beyan etmektedir.

Çıkar çatışması beyanı

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Kaynakça

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alvarez, I., & Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 417-434. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00208-2)
- 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. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82(2), 247-277. <https://doi.org/10.2307/2399880>
- Bhat, A., Hegde, S., Kammar, S., Mudgal, G., & Mohan, T. (2024). *Identification and validation of ITS2-specific universal primers for DNA barcoding in plants*. Research Square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4190589/v1>
- Banchi, E., Stankovic, D., Fernández-Mendoza, F., Gionechetti, F., Pallavicini, A., & Muggia, L. (2018). ITS2 metabarcoding analysis complements lichen mycobiome diversity data. *Mycological Progress*, 17(9), 1049-1066. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1415-4>
- CBOL Plant Working Group, Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., Van Der Bank, M., Chase, M. W., Cowan, R. S., Erickson, D. L., Fazekas, A. J., Graham, S. W., James, K. E., Kim, K., Kress, W. J., Schneider, H., Van AlphenStahl, J., Barrett, S. C., Van Den Berg, C., Bogarin, D., . . . Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794–12797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>
- Chase, M. W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J. M., Kesanakurthi, R. P., Haider, N., & Savolainen, V. (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 360(1462), 1889-1895. <http://doi.org/10.1098/rstb.2005.1720>
- Chase, M. W., Cowan, R. S., Hollingsworth, P. M., Van Den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Seberg, O., Jørgensen, T., Cameron, K. M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T. A., Conrad, F., Salazar, G. A., Richardson, J. E., Hollingsworth, M. L., Barraclough, T. G., Kelly, L., & Wilkinson, M. (2007). A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*, 56(2), 295-299. <https://doi.org/10.1002/tax.562004>
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y., & Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, 5(1), e8613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>
- China Plant BOL Group, Li, D., Gao, L., Li, H., Wang, H., Ge, X., Liu, J., Chen, Z., Zhou, S., Chen, S., Yang, J., Fu, C., Zeng, C., Yan, H., Zhu, Y., Sun, Y., Chen, S., Zhao, L., Wang, K., Yang, T., & Duan, G. (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19641-19646. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104551108>
- Coleman, A. W. (2003). ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*, 19(7), 370-375. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(03\)00118-5](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(03)00118-5)
- Davis, P. H. (1970). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Volume 3*. Edinburgh University Press. <http://www.jstor.org/stable/10.3366/j.ctvxrc93>
- Davis, P. H., Mill, R. R., & Tan, K. (eds.) (1988). *Flora of Turkey and the East Aegean islands, Volume 10*, (supplement 1) Edinburgh University Press.
- Demir, A. (2009). Küresel iklim değişikliğinin biyolojik çeşitlilik ve ekosistem kaynakları üzerine etkisi. *Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi*, 1(2), 37-54. https://doi.org/10.1501/Csaum_0000000013
- Erken, K., Parlak, S., & Yılmaz, M. (2022). Endemik taksonların korunması ve tür koruma eylem planları. *Ağaç ve Orman*, 3(1), 33-46.

- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., & Başer, K. H. C. (eds.) (2000). *Flora of Turkey and the East Aegean islands, Volume 11*, (supplement 2). Edinburgh University Press.
- Güneş, F., & Özba, B. (2014). *Kars çiçekleri* (1. Baskı), Kafkas Üniversitesi Yayınları.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE*, 6(5), e19254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019254>
- Kang, Y., Deng, Z., Zang, R., & Long, W. (2017). DNA barcoding analysis and phylogenetic relationships of tree species in tropical cloud forests. *Scientific Reports*, 7, 12564, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13057-0>
- Kistler, L. (2012). Ancient DNA extraction from plants. In: Shapiro, B., Hofreiter, M. (eds) *Ancient DNA. Methods in Molecular Biology*, vol 840. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-516-9_10
- 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(23), 8369-8374. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503123102>
- Letsiou, S., Madesis, P., Vasdekis, E., Montemurro, C., Grigoriou, M. E., Skavdis, G., Moussis, V., Koutelidakis, A. E., & Tzakos, A. G. (2024). DNA barcoding as a plant identification method. *Applied Sciences*, 14(4), 1415. <https://doi.org/10.3390/app14041415>
- Liu, Y., Liang, N., Xian, Q., & Zhang, W. (2023). GC heterogeneity reveals sequence-structures evolution of angiosperm. *BMC Plant Biology*, 23, 608. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04634-9>
- Mace, G. M., Norris, K., & Fitter, A. H. (2008). Biodiversity and ecosystem services: A multi-layered relationship. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(1), 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.08.006>
- Michel, C. I., Meyer, R., Taveras, Y., & Molina, J. (2016). The nuclear internal transcribed spacer (ITS2) as a practical plant DNA barcode for herbal medicines. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(3), 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.02.002>
- Mishra, P., Kumar, A., Rodrigues, V., Shukla, A. K., & Sundaresan, V. (2016). Feasibility of nuclear ribosomal region ITS1 over ITS2 in barcoding taxonomically challenging genera of subtribe Cassiinae (Fabaceae). *Peer Journal*, 4, e2638. <https://doi.org/10.7717/peerj.2638>
- Müller, K. F., Borsch, T., Legendre, L., Porembski, S., Theisen, I., & Barthlott, W. (2015). Evolution of carnivory in *Lentibulariaceae* and the *Lamiales*. *Plant Biology*, 6(4), 477-490. <https://doi.org/10.1055/s-2004-817909>
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Nabhan, A., Arvas, Ö., & Furan, M. A. (2023). The applicability of wheat SSR markers to analyzing the molecular diversity and distribution of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) genotypes from eastern anatolian habitats. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 28(2), 732-744. <https://doi.org/10.53433/yyufbed.1260839>
- Nasrollahi, F., Kazempour-Osaloo, S., Saadati, N., Mozaffarian, V., & Zare Maivan, H. (2019). Molecular phylogeny and divergence times of *Onosma* (Boraginaceae s.s.) based on nrDNA ITS and plastid rpl32-trnL(UAG) and trnH-psbA sequences. *Nordic Journal of Botany*, 37, e02060. <https://doi.org/10.1111/njb.02060>
- Nohutçu, L., Tunçtürk, M., & Tunçtürk, R. (2019). Yabancı bitkiler ve sürdürülebilirlik. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24(2), 142-151.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2024, 20 Aralık). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Özhatay, N., Byfield, A., & Atay, S. (2005). *Türkiye'nin 122 önemli bitki alanı*. WWF Türkiye (Doğal Hayatı Koruma Vakfı), İstanbul. 4765.
- POWO. (2025). *Plants of the world online*. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Erişim tarihi: 25. 02.2025. <https://powo.science.kew.org/>

- Schultz, J., Wolf, M. (2009). ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics: A how-to manual for molecular systematics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(2), 520-523. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.01.008>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K., Bai, F., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M., Blackwell, M., . . . Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Sokołowska, J., Fuchs, H., & Celiński, K. (2022). Assessment of ITS2 region relevance for taxa discrimination and phylogenetic inference among pinaceae. *Plants*, 11(8), 1078. <https://doi.org/10.3390/plants11081078>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Uluğ, A., Özdemir Değirmenci, F., & Akdoğan, G. E. (2025). Molecular identification of endemic plant species in Kars province based on universal barcode gene regions. *Plant Gene*, 42, 100514. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2025.100514>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315-322). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Won, H., & Renner, S. S. (2005). The internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA in the gymnosperm Gnetum. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36(3), 581-597. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.03.011>
- 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(10), e13102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013102>