

Tıbbi ve Aromatik Bitki Olarak Kullanılan *Tanacetum* sp. (Pire otu) Türlerinin Genetik Benzerliğinin Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi

Nalan YILDIRIM DOĞAN¹, Mustafa KORKMAZ¹, Hüseyin BULUT^{2*}

¹Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Erzincan, Türkiye

²Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Eczane Hizmetleri Bölümü, Erzincan, Türkiye

*e-mail: huseyinbulut@erzincan.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan on beş *Tanacetum* türünün genetik benzerliklerinin tespiti için RAPD ve ISSR markerleri kullanıldı. RAPD analizinde türler arasında ortalama % 88.8 polimorfizm tespit edilmiştir. Benzerlik matrisi en düşük genetik benzerliğin *T. vulgare* ve *T. Heteroatom* (0.198) arasında, en yüksek genetik benzerliğin ise *T. nitens* ve *T. heteroatom* (0.938) arasında olduğunu ortaya koymuştur.

ISSR primerlerinden elde edilen polimorfik bant yüzdesi % 76.9 ile % 100 arasındadır. Türler arasındaki benzerlik matrisi en düşük genetik benzerliğin *T. nitens* ve *T. angyrophyllum* arasında (0.238), en yüksek genetik benzerliğin ise *T. argenteum* ve *T. nitens* (0,891) arasında olduğunu ortaya koymuştur.

RAPD ve ISSR analizlerinin veri kombinasyonu, türlerin iki ana gruba ayrıldığı ana bileşenlerin analizine tabi tutulmuştur. Grup 1' de 13 tür, grup 2'de 2 tür yer aldı. Benzerlik matris değerleri 0.186 ile 0.813 arasındadır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar ISSR ve RAPD tekniklerinin, Asteraceae familyasındaki genetik çeşitlilik ve benzerlik gibi türlerin genetik ilişkilerinin çözümünde güçlü bir araç olduğunu göstermiştir.

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş: 18.05.2019

Kabul:27.09.2019

Anahtar kelimeler:

Genetik Benzerlik, ISSR, RAPD, *Tanacetum*, Tıbbi ve Aromatik Bitki.

Determination of Genetic Similarity of *Tanacetum*(sp.) Species Used as Medicinal and Aromatic Plants by Molecular Methods

ABSTRACT

In this study, RAPD and ISSR markers for the detection of genetic similarity of fifteen *Tanacetum* species collected from different regions of Turkey were used. In the RAPD analysis, an average of 88.8% polymorphism was detected among the species. The similarity matrix revealed that the lowest genetic similarity was between *T. vulgare* and *T. Heteroatom* (0.198) and the highest genetic similarity was between *T. nitens* and *T. heteroatom* (0.938).

The percentage of polymorphic band obtained from ISSR primers is between 76.9% and 100%. The similarity matrix between species revealed that the lowest genetic similarity was between *T. nitens* and *T. angyrophyllum* (0.238), while the highest genetic similarity was between *T. argenteum* and *T. nitens* (0.891).

The data combination of RAPD and ISSR analyzes was subjected to the analysis of the major components in which the species were divided into two main groups. There were 13 species in group 1 and 2 species in group 2. Similarity matrix values are between 0.186 and 0.813. The results of the study showed that ISSR and RAPD techniques are a powerful tool for solving genetic relationships of species such as genetic diversity and similarity in Asteraceae family.

ARTICLE INFO

Research article

Received: 18.05.2019

Accepted: 27.09.2019

Keywords:

Genetic Diversity, ISSR, Medicinal and Aromatic Plant, RAPD, *Tanacetum*

GİRİŞ

Bitkiler geleneksel tıbbın temelini oluşturmaktadır (Boroushaki vd., 2010). Günümüzde ilaçların yan etkileri ve metabolizma üzerindeki kimyasal içeriklerinden dolayı bitkisel kökenli ilaçlara dünya genelinde bir eğilim vardır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarına göre, son yirmi yılda kullanılan ilaçların %25'i doğrudan bitkilerden elde edilmekte olup, Belçika (%31),

Avustralya (%48), Fransa (%49), Kanada (%70) ve Almanya (%77) gibi birçok gelişmiş ülke geleneksel bitkisel tedavi yöntemlerini günümüz sağlık sistemlerine uyarlamışlardır (WHO, 2016).

Tıbbi ve aromatik bitkiler sınıfındaki Asteraceae familyası bitkilerinden elde edilen ekstraktlar üzerinde yapılan çalışmalar farklı biyolojik aktiviteleri doğrulamaktadır. Asteraceae familyası bitkilerinin antifungal, antihipertansif, diüretik ve antelmintik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Chiasson vd., 2001, Lahlou vd., 2007, Lahlou vd., 2008, Hassanpouraghdam vd., 2009, Erecevit vd., 2011, Kumar ve Tyagi, 2013, Baranauskiene vd., 2014, Stojković vd., 2014, Godinho vd., 2014). Ayrıca son zamanlardaki çalışmalarda *Tanacetum balsamita* L. ve *Tanacetum vulgare* L.'nin antibakteriyel ve antioksidan aktivitesi (Baczeq vd.,2017), *T. Parthenium* ekstraktının Herpes simpleks tip 1 (HSV-1) virüs enfeksiyonuna karşı inhibe edici olduğu ve terapötik etki gösterdiği (Erica vd., 2019), *Tanacetum macrophyllum*'un esansiyel yağının tümör hücrelerine karşı sitotoksik olduğu ve antioksidan özelliği gösterdiği tespit edilmiştir (Venditti vd., 2018).

Dünyada yaklaşık 23.000 türün bulunduğu Asteraceae, Türkiye'nin en büyük bitki ailesinden biridir (Aytaç ve Duman, 2013; Öztürk ve Çetin, 2013; Yıldız vd., 2013; Korkmaz vd., 2015). *Tanacetum* L., Asteraceae familyasının en büyük üçüncü cinsidir (Sonboli vd., 2012). Cins, dünya çapında yaklaşık yüz altmış tür tarafından temsil edilmektedir. *Tanacetum* cinsine ait bitkiler, kuzey yarımkürenin ılıman bölgesi boyunca Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika'da yaygın olarak dağılmıştır (Heywood, 1976). Çoğunlukla çok yıllık, nadiren yıllık türlerdir (Oberprieler v., 2007).

Bazı cins türleri yaygın olarak yetiştirilmektedir. Türkiye'de kırk altı tür vardır (Güner, 2012). Endemik tür sayısı 26, endemizm oranı %57'dir (Sonboli vd., 2012; Aytaç ve Duman, 2013; Korkmaz vd., 2015, Selvi ve Korkmaz, 2016).

Bu çalışmada, tıbbi ve aromatik bitki sınıfında yer alan şifalı bitki olarak halk arasında geleneksel yöntemlerle kullanılan *Tanacetum* türlerinin genetik benzerliğinin tespiti amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Taksonomik çalışmalar

Bu çalışmanın materyalini, Türkiye'deki farklı bölgelerden toplanan on beş *Tanacetum* türü oluşturmaktadır. Bitki örneklerinin bilimsel isimleri Grierson (1975) ve Güner (2012) yardımıyla belirlenmiştir. Ayrıca, fitocoğrafik bölgeler ve çalışılan taksonların endemizmi belirlenmiştir. Dokuz takson Irano-Turanian, bir tanesi Avrupa-Sibirya unsurlarıydı. Diğerlerinin fitocoğrafik bölgeleri bilinmiyordu. Endemik takson sayısı yedi (%47) idi (Çizelge 1). Taksonomik çalışmalardan sonra Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda her taksonun herbaryum örneği korunmuştur.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan *Tanacetum* türlerine ait detaylar.

Takson adı	Kayıt numarası	Fitocoğrafik bölge	Endemizm
<i>T. abrotanifolium</i>	Kandemir 6545	Irano-Turanian	-
<i>T. argenteum</i>	Kandemir 6202	Irano-Turanian	Endemik
<i>T. argyrophyllum</i> subsp. <i>argyrophyllum</i>	Kandemir 4047	Irano-Turanian	Endemik
<i>T. armenum</i>	Korkmaz 2344	-	-
<i>T. aucherianum</i>	Kandemir 6366	Irano-Turanian	-
<i>T. balsamitoides</i>	Korkmaz 2727	-	-
<i>T. eginense</i>	Kandemir 10178	Irano-Turanian	Endemik
<i>T. heterotomum</i>	Kandemir 6063	Irano-Turanian	Endemik
<i>T. kotschy</i>	Korkmaz 2709	Irano-Turanian	-
<i>T. mucroniferum</i>	Kandemir 5573	Irano-Turanian	Endemik
<i>T. nitens</i>	Kandemir 5475	-	Endemik
<i>T. parthenium</i>	Kandemir 5512	-	-
<i>T. punctatum</i>	Kandemir 5887	Auro.-Siberian.	-
<i>T. vulgare</i>	Kandemir 10059	-	-
<i>T. zahlbruckneri</i>	Kandemir 4253	Irano-Turanian	Endemik

Genomik DNA ekstraksiyonu

Bitki numunelerinin RAPD ve ISSR metotları analizi için DNA örnekleri izole edilmiştir. DNA izolasyonu, Shagai-Marooof ve arkadaşlarının protokolünde küçük değişikliklerle yapılarak gerçekleştirilmiştir (1984). Toplam DNA konsantrasyonlarını belirlemek için izole edilen DNA'lar ACTGene Spektrofotometre (ACTGene UVIS-99, NJ, ABD), ile A260 / 280 O.D'de ölçülmüş ve tüm örneklerin DNA'sı 0,5 µg'ye ayarlanmıştır.

RAPD analizi

RAPD analizinde kullanılan primerler ve sekans bilgileri Çizelge 2'de verilmiştir. RAPD PCR bileşenleri ve miktarları ise Çizelge 3'te verilmiştir. Thermalcycler (Eppendorf Com.), Çizelge 4'te verilen değerlerde programlanmıştır. PCR sonunda elde edilen ürünler +4 °C'de stoklanmıştır.

Çizelge 2. RAPD ve ISSR' da kullanılan primerler ve sekans bilgileri

Marker	Primer	Sekans (5'-3')	Marker	Primer	Sekans (5'-3')
	OPW 6	5'-AGGCCCGATG-3'		UBC810	(GA)8T
	OPB 10	5'-CTGCTGGGAC- 3'		UBC842	(GA)8YG
	OPK 19	5'- CACAGGCGGA- 3'		UBC868	(GAA)
RAPD	OPH 16	5'-TCTCAGCTGG - 3'	ISSR	SBS812	(AC)8G
	OPY 1	5'- GTGGCATCTC- 3'		SBS826	(GA)8T
	OPY 15	5'-AGTCGCCCTT - 3'		UBC818	(CA)8G
	OPH 10	5'-CCTACGTCAG - 3'		UBC808	(AG)8C
				UBC829	(TG)8 C

Çizelge 3. RAPD analizi için PCR bileşenleri ve değerleri

Bileşen	Miktar (µl)
10 x Buffer	2
Taq DNA Polimeraz (5 birim)	1
dNTP (10 mM)	0.5
RAPD primer (5µM)	1
Ultra saf su	13.25
Genomik DNA	1 (50ng)
MgCl ₂	1.25

Çizelge 4. RAPD PCR döngüsü sayıları ve süreleri

Döngü adı	Süre	Sıcaklık	Döngü sayısı
Başlangıç	2 dk.	95°C	1
Denatürasyon	30 sn.	95°C	2
Primer bağlanma	1 dk.	37°C	1
Uzama	2 sn.	72°C	2
Denatürasyon	30 sn.	95°C	41
Primer bağlanma	1 dk.	35°C	1
Uzama	2 dk.	72°C	1
Son uzama	5 dk.	72°C	1
Bekleme	∞	4°C	1

ISSR analizi

ISSR analizinde kullanılan primerler ve sekans bilgilerine ait detaylar Çizelge 2'de gösterilmiştir. Çizelge 5'te ise ISSR reaksiyon bileşenleri ve bunların miktarları verilmiştir.

Çizelge 5. ISSR analizi için PCR bileşenleri ve değerleri

Bileşen	Miktar (µl)
Genomik DNA	40 ng
Reaksiyon buffer	2 U
dNTPs	200nM
Taq DNA polimeraz	1U
1.5 mM MgCl ₂	1.25
0.5 Primer mM	1 U

Thermalcycler (Eppendorf Com.), Çizelge 6'da verilen değerlerde programlanmıştır.

Çizelge 6. ISSR-PCR döngüsü sayıları ve süreleri

Döngü adı	Süre	Sıcaklık	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	5 dk.	94°C	1
Bağlanma	45 sn.	94°C	35
Sonlanma	1 dk.	72°C	1
Son uzatma	7 dk.	72°C	1

Elektroforez

Elde edilen PCR ürünleri agaroz jeli üzerinde çalıştırıldı. Bunun için 0.7 g Agaroz 10 ml TBE (Tris / Borat / EDTA) pH 8 eklenmiş ve damıtılmış su ile 100 ml'ye saflaştırılmış ve bir mikrodalga fırında ısıtılmış ve 2 ul Ethidium Bromide eklenmiştir. Örnekler, 100 dakika boyunca 90 voltta elektroforezde yürütüldü ve bir UV kamera ile görüntüledi.

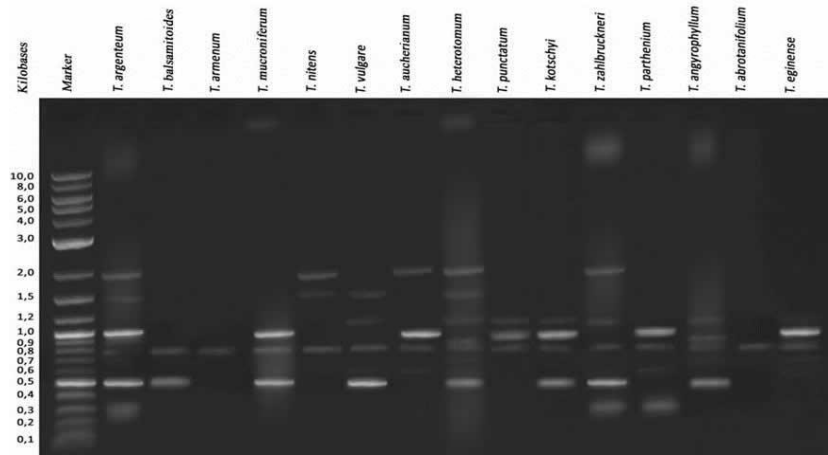
Data analizi

Elde edilen RAPD ve ISSR PCR ürünleri, her genotip için ve 1 bant kaybı için analiz edildi. Bu veriler ve Jaccard (1908) benzerlik endeksi hesaplanmış ve UPGMA dendrogramı elde edilmiştir. Bu çalışmada tüm deneyler üç kez tekrar edildi.

BULGULAR

RAPD analizi

Toplam on beş tür *Tanacetum*, RAPD primerleri ile PCR yapıldı ve elde edilen bantlar görüntüledi (Şekil 1).



Şekil 1. *Tanacetum* türlerinin RAPD analizinde kullanılan OPW-6 primerinden elde edilen amplifikasyon sonuçları.

RAPD analizimizin sonuçları, Tablo 7'de özetlenmiştir. Seçilen 7 RAPD primerlerinden 15 *Tanacetum* türü (Tablo 7) içinde 63 bant elde edilmiştir (bunlardan 56 tanesi polimorfiktir). Çalışılan türler arasında ortalama polimorfizm % 88.8'dir. Bant sayısı 7 (OPB 10, OPK 19, OPY 1) ile 15 (OPH 16) arasında değişmekte olup, büyüklükleri ise 300 ile 2000 bp arasındadır.

Benzerlik matrisi en düşük genetik benzerliğin (0.198) *T. vulgare* ve *T. heteroatom* arasında olduğunu gösterdi. Özellikle, *T. nitens* ve *T. heteroatom* en yüksek genetik benzerliği ortaya koymuştur (0.938).

ISSR analizi

Bu çalışmada, toplam 34 primerin taranmasıyla berrak ve tekrarlanabilir bantlar gösteren 8 primer elde edildi. Bu sekiz primer daha sonra onbeş *Tanacetum* türünün genetik çeşitliliğini analiz etmek için kullanıldı. ISSR analizinin sonuçları, Çizelge 7'de verilmiştir. 200 ila 2300 bp arasında değişen toplam 94 fragman, primer başına ortalama 11,75 bant elde edilmiştir. Her primer 9-15 bant üretmiştir. Ayrıca her primer tarafından üretilen polimorfik bant yüzdesi % 76.9 ile % 100 arasındadır.

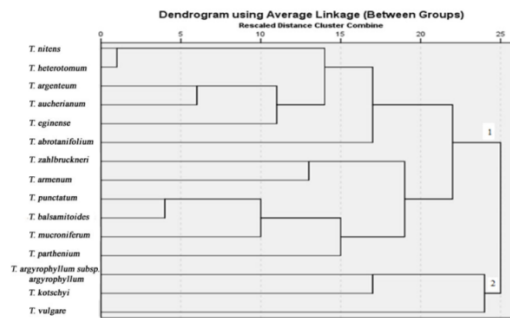
Benzerlik matrisi indeksi en düşük genetik benzerliğin (0.238) *T. nitens* ve *T. angrophyllum* arasında olduğunu göstermiştir. *T. argenteum* ve *T. nitens* en yüksek genetik benzerliği ortaya koymuştur (0,891).

Çizelge 7. RAPD ve ISSR analizlerinden elde edilen veriler

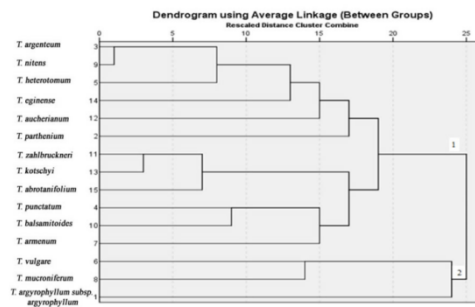
Marker	Primer	Amp. bant uzunluğu	Bant sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm Oranı (%)
RAPD	OPW 6	300-2000	10	9	90
	OPB 10	800-975	7	6	85.7
	OPK 19	700-1500	7	6	85.7
	OPH 16	300-2000	15	14	93.3
	OPY 1	750-2000	7	6	85.7
	OPY 15	700-1500	9	8	88.8
	OPH 10	600-2000	8	7	87.5
	Toplam	300- 2000	63	56	88.8
ISSR	UBC810	350-1200	14	11	78.6
	UBC842	300-2000	9	9	100
	UBC868	200-1800	13	12	92.3
	SBS812	300-3000	10	9	90
	SBS826	500-2800	13	10	76.9
	UBC818	300- 1700	9	7	77.7
	UBC808	400- 1500	11	9	81.8
	UBC829	500- 2300	15	13	86.6
	Toplam	200- 2300	94	80	85.1

RAPD ve ISSR analizlerinin kombinasyonu

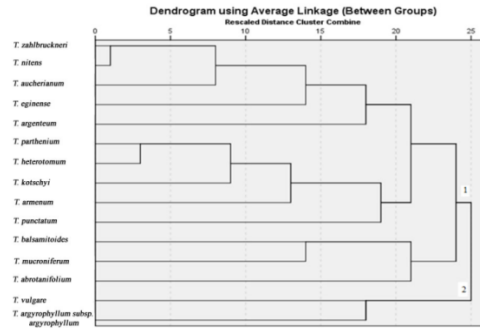
UPGMA kümesi, RAPD ve ISSR belirteçlerinden bir veri kombinasyonu kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 4). 15 *Tanacetum* türü iki ana gruba ayrıldı (1 ve 2). Küme 1, 2 alt gruba bölünmüştür: İlk alt kümeyi *T. zahlbruckneri*, *T. nitens*, *T. aucheranum*, *T. eginense*, *T. argenteum*, *T. parthenium*, *T. heteroatom*, *T. kotschyi*, *T. armenum*, *T. Punctatum* oluştururken, *T. balsamita*, *T. mucroniferum*, *T. abrotanifolium* diğer alt kümeyi oluşturmuştur. Küme 2, *T. vulgare*, *T. angyrophyllum*'dan oluşmaktadır (Şekil 4). Benzerlik matris değerleri 0.186 ile 0.813 arasındadır.



Şekil 2. RAPD belirteçleri tarafından ortaya konan 15 *Tanacetum* türü örneği arasındaki kümelendirme modelini gösteren dendrogram.



Şekil 3. ISSR markerleri tarafından ortaya konan 15 *Tanacetum* türü örneği arasındaki kümelendirme modelini gösteren dendrogram.



Şekil 4. RAPD ve ISSR markörleri tarafından ortaya konan 15 *Tanacetum* türü örneği arasındaki kümelenme modelini gösteren dendrogram.

TARTIŞMA

Bazı *Tanacetum* türleri önemli şifalı bitkilerdendir ve Avrupa İlaç kataloğunda migrenin profilaksisi için bitkisel ilaçlardan birisi olarak listelenmiştir (Wichtl, 2004; European Pharmacopoeia 8th, 2008). *Tanacetum* cinsinin bitkileri, anti-enflamatuar ve anterinik de dahil olmak üzere birçok tıbbi amaçla, yıllardır geleneksel tıp uygulamalarında kullanılmaktadır (Onozato vd., 2009; Rosselli vd., 2012).

Bu çalışmada, ülkemizde yetişen *Tanacetum* türlerinin dünya genelinde tıbbi ve aromatik bitkilere yönelim nedeniyle RAPD ve ISSR tekniklerini kullanılarak genetik benzerlikleri araştırılmıştır. Akrabalık derecesinin tespitinde moleküler yöntemlerden faydalanılmıştır. Modern teknolojiye gelişmelerle birlikte akrabalık derecesinin tespitinde morfolojik incelemelerin yerini moleküler teknikler almıştır. Moleküler ve biyokimyasal belirteçler, türler arası ve türler arası genetik benzerliğin belirlenmesinde önemli araçlardır (Chahal, 2002; Mort, 2003; Bacchetta vd., 2013; Mukherjee vd., 2013; Doğan vd., 2015; Ercisli vd., 2015).

Daha önceki çalışmalarda da akrabalık derecesinin tespitinde RAPD analizlerinden yararlanılmıştır. Örneğin Asteraceae familyasından *Carthamus tinctorius* L. türlerinin genetiği RAPD tekniği ile değerlendirilmiş ve %88.7 polimorfizm tespit edilmiştir (Rehman vd., 2015). Yine, *Eclipta alba*'nın Asteraceae familyasından genetik benzerliği RAPD belirteçleri ile değerlendirilmiş ve %91.38 polimorfizm tespit edilmiştir (Pendkar vd., 2015). Bu çalışmada da, *Tanacetum* türleri arasında RAPD analizi sonuçları % 88.8 polimorfizm değerini vermiştir. Bacchetta vd., (2013) *Lamyropsis microcephala* (Asteraceae) türlerindeki genetik çeşitliliği ISSR tekniği ile araştırmışlar ve %64.4 polimorfizm tespit etmişlerdir. Shafie vd., (2011) çalışmalarında, ISSR ile *Artemisia capillaris* genetik çeşitlilik analizi yapmışlar ve %66.67 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. *Tanacetum* türlerinin genetik çeşitliliğini belirlemek için kullandığımız ISSR analizinden %85.1 polimorfizm elde edilmiştir.

RAPD analizleri ile elde edilen dendrogram sonuçlarına göre, *T. argenteum*, *T. eginense*, *T. heterotomum*, *T. mucroniferum*, *T. nitens* ve *T. zahlbruckneri* endemikleri aynı kümede bulunurken, ISSR dendrogram sonuçlarına göre *T. argenteum*, *T. eginense*, *T. heterotomum*, *T. nitens* ve *T. zahlbruckneri* aynı endemik kümesindedirler. Ek olarak RAPD ve ISSR dendrogram sonuçlarında, *T. argenteum*, *T. zahlbruckneri*, *T. mucroniferum*, *T. nitens*, *T. eginense* ve *T. heterotomum* endemikleri aynı kümede oldukları belirlenmiştir. RAPD dendrogram sonuçlarına göre *T. abrotanifolium*, *T. argenteum*, *T. Aucherianum*, *T. Eginense*, *T. heterotomum*, *T. mucroniferum* ve *T. zahlbruckneri tanacetum* türleri ve ISSR dendrogram sonuçlarına göre ise *T. abrotanifolium*, *T. argenteum*, *T. Aucherianum*, *T. Tinense*, *T. Heterotomum*, *T. kotschy* ve *T. zahlbruckneri tanacetum* türleri Fitocoğrafik bölge değerlendirmesi kapsamında İran-Turan bölgesindeki aynı kümede oldukları belirlenmiştir.

Dünya genelinde geleneksel tıp uygulamalarına ve kimyasal içerikli ilaçlar yerine tıbbi ve aromatik bitkilere yönelim kullanılan bitkilerin akrabalıklarını önemli hale getirmiştir. Bu çalışmada da farklı tıbbi etkileri olan şifalı bitkilerden kabul edilen *Tanacetum* türlerinin akrabalığı RAPD ve ISSR moleküler yöntemleri ile başarılı bir şekilde tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Awang D, Dawson B, Kindact D, Crompton C, Heptinstall S, 1991. Parthenolide Content of Feverfew (*Tanacetum parthenium*) Assessed by HPLC and HNM Spectroscopy. Journal of Natural Products, 346, 1516-1521.
- Aytaç Z, Duman H, 2013. A new species and 2 new records from Turkey. Turk Journal Botany, 37, 1055-1060.
- Bacchetta G, Fenu G, Gentili R, Mattana E, Sgorbati S, 2012. Preliminary assessment of the genetic diversity in *Lamyropsis microcephala* (Asteraceae). Plant Biosystems, 147, 500-507.

- Bączek K B, Olga Kosakowska , Jarosław L. Przybył, Ewelina Pióro-Jabrucka, Rosaria Costa, Luigi Mondello, Małgorzata Gniewosz, Alicja Synowiec, Zenon Węglarz, 2017. Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.), *Industrial Crops and Products*, 102, 154-163.
- Baranauskienė R, Kazernavičiūtė R, Pukalskienė M, Mažžierienė R, Venskutonis PR, 2014. Agrorefinery of *Tanacetum vulgare* L. into valuable products and evaluation of their antioxidant properties and phytochemical composition, *Ind. Crops Prod.*, 60, 113-122.
- Baytop T, 1999. Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Borouhaki MT, Sadeghnia HR, Banihashem M, Yavari S, 2010. Protective effect of pomegranate seed oil on hexachlorobutadien-induced nephrotoxicity in rats, *Journal of Renal Failure*, 32, 612–617.
- Casida J, 1980. *Pyrethrum* Flowers and Pyrethroid Insecticide *Environ. Health Perspect*, 34, 189-202.
- Chahal GS, Gosal SS, 2002. Principles and Procedures of Plant Breeding. Biotechnological and Conventional Approaches. 1th ed. Alpha science international ltd, New York.
- Chiasson H, Bélanger A, Bostanian N, Vincent Ch, Poliquin A, 2001. Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction, *J. Econ. Entomol.*, 94:941, 167-171.
- Doğan B, Duran A, Şeker M, Çetin Ö, Martin E, 2015. Study of phylogenetic relationship of Turkish species of Klasea (Asteraceae) based on ISSR amplification. *PhytoKeys*, 56, 29–40.
- Ercisli S, Yanar M, Sengül M, Yildiz H, Topdas E, Taskin T, Zengin Y, Yilmaz K, 2015. Physico-chemical and biological activity of hawthorn (*Crataegus spp.* L.) fruits in Turkey. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum*, 14, 83-93.
- Ereçevit P, Onganer AN, Kursat M, Kirbağ S, 2011. In vitro evaluation of antimicrobial activities of some plant, *Turk. J. Tech.*, 6:2, 81-86.
- Érica Benassi-Zanqueta, Caroline Fernandes Marques, Larissa Machado Valone, Bruna Luíza Pellegrini, Anelize Bauermeister, Izabel Cristina Piloto Ferreira, Norberto Peoporine Lopes, Celso Vataru Nakamura, Benedito Prado Dias Filho, Maria Raquel Marçal Natali, Tânia Ueda-Nakamura, 2019. Evaluation of anti-HSV-1 activity and toxicity of hydroethanolic extract of *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip. (Asteraceae), *Phytomedicine*, 55, 249-254.
- European Pharmacopoeia 8th ed., 2008. *Tanacetum parthenium* herba 01/2008:1516. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM), Council of Europe Strasbourg.
- Grđiša M, Liber Z, Radosavljević I, Carović-Stanko K, Kolak I, Satovic Z, 2014. Genetic Diversity and Structure of Dalmatian *Pyrethrum* (*Tanacetum cinerariifolium* Trevir. /Sch./ Bip., Asteraceae) within the Balkan Refugium. *Plos Journal*, 10, 52-65.
- Grierson A, 1975. *Tanacetum* L. In: Davis PH, editor. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh University, Edinburgh, UK 5, 256–292.
- Güner A, 2012 Türkiye Bitkileri Listesi, 1 th ed. Ali Nihat Gökyiğit Vakfı Yayınları, İstanbul.
- Hassanpouraghdam MB, Tabatabaie SJ, Nazemiyeh H, Vojodi L, Aazami MA, 2009. Volatile oil constituents of alecost (*Tanacetum balsamita* L. ssp. *balsamitoides* (Schultz-Bip.)) growing wild in North West of Iran *Herba Pol.*, 55:1, 53-59.
- Heywood VH, 1976. L. T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.M. Moore, D.H. Valentine, S.M. Walters, D.A. Webb (Eds.), *Tanacetum* Flora Europaea, Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae), vol. 4, Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain, 169-171
- Korkmaz M, Kandemir A, İlhan V, Yıldırım Doğan N, 2015. *Tanacetum erzincanense* (Asteraceae), a new species from Erzincan, Turkey. *Turk Journal Botany*, 39, 96-104.
- Kumar V, Tyagi D, 2013. Chemical composition and biological activities of essential oils of genus *Tanacetum* –a review, *J. Pharm. Phytochem.*, 2:3, 159-163.
- Kumari N, Thakur S, 2014. Randomly amplified polymorphic dna-a brief review. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 9, 6-13.
- Lahlou S, Tahraoui A, Israili Z, Lyoussi B, 2007. Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats, *J. Ethnopharmacol.*, 110:3, 458-463.
- Levi A, Thomas E, Simmons A, Thies J, 2005. Analysis based on RAPD and ISSR markers reveals closer similarities among *Citrullus* and *Cucumis* species than with *Praecitrullus fistulosus* (Stocks) Pangalo. *Genetic Resource Crop Evol*, 52, 465–472.
- Mokhtari N, Rahimmalek M, Talebi M, Khorrami M, 2013. Assessment of genetic diversity among and within *Carthamus species* using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. *Plant Syst Evol*, 299, 1285–1294.
- Mort M, Crawford D, Santos-Guerra A, Francisco-Ortega D, Javier H, Esselman M, Elizabeth J, Wolfe A, 2003. Relationships among the Macaronesian members of *Tolpis* (Asteraceae: Lactuceae) based upon analyses of inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Taxon*, 52, 511–518.
- Mukherjee A, Dey A, Acharya L, Palai S, Panda P, 2013. Studies on genetic diversity in elite varieties of *Chrysanthemum* using RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Biotechnology*, 12, 161-169.

- Oberprieler C, Vogt R, Watson L, 2007. Tribe *Anthemideae* Cass. In: Kadereit JW, Jeffrey C, editors. The Families and Genera of Vascular Plants, Vol. 8: Flowering Plants, Eudicots, Asterales. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Onozato T, Nakamura CV, Garcia Cortez DA, Dias Filho BP and Ueda-Nakamura T, 2009. *Tanacetum vulgare*: antiherpes virus activity of crude extract and the purified compound parthenolide, *Phytotherapy Research*, 23: 6, 791–796.
- Öztürk M, Çetin Ö, 2013. *Inula tuzgoluensis* (Asteraceae), a new species from Central Anatolia, Turkey. *Turk Journal Botany*, 37, 825–835.
- Öztürk M, Özçelik H, 1991. Useful Plants of East Anatolia, 65-72 Ankara: SİSKAV.
- Panahi, B. and Neghab, M.G. (2013). Genetic characterization of Iranian safflower (*Carthamus tinctorius*) using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *Physiol Mol Biol Plants*, 19, 239–243.
- Pelizzaro-Rocha KJ, Tiunan TS, Izumi E, Ueda-Nakamura T, Filho BPD and Nakamura CV, 2010. Synergistic effects of parthenolide and benzimidazole on *Trypanosoma cruzi*, *Phytomedicine*, 18: 1, 36–39.
- Pendkar S, Hegde S, Nayak S, Hegde H, Kholkute S, Roy S, 2016. Detection of Adulteration by *Wedelia calendulacea* in *Eclipta alba* through ISSR and RAPD Markers. *Planta Medicine International*, 3, 43-46.
- Prevost A, Wilkinson M, 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato accessions. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 107–112.
- Rehman H, Rabbani M, Shinwari Z, Akbar F, 2015. Rapd Markers Based Genetic Diversity Of Safflower (*Carthamus Tinctorius* L.) Germplasm. *Pakistan Journal of Botany*, 47, 199-204.
- Rosselli S, Bruno M, Raimondo FM et al., 2012. Cytotoxic effect of eudesmanolides isolated from flowers of *Tanacetum vulgare* ssp. *Siculum*, *Molecules*, 17, 8186–8195.
- Saghai-Maroofof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW, 1984. Ribosomal DNasepacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci.*, 81:8014–8019.
- Selvi S, Korkmaz M, 2016. Micromorphological and Anatomical Investigations on Local Endemic *Tanacetum erzincanense* Species Distributed in Erzincan. *Internatinal Erzincan Symposium*, Erzincan, Turkey, September 28 - October 1, 323-328
- Shafie M, Zain Hasan S, Zain A, Shah R, 2011. RAPD and ISSR markers for comparative analysis of genetic diversity in wormwood capillary (*Artemisia capillaris*) from Negeri Sembilan. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 4426-4437.
- Sonboli A, Stroka K, Osaloo S, Oberprieler C, 2012. Molecular phylogeny and taxonomy of *Tanacetum* L. (Compositae, Anthemideae) inferred from nrDNA ITS and cpDNA trnH-psbA sequence variation. *Plant Syst Evolution*, 298, 431–444.
- Stojković MB, Mitic SS, Jovana LJ, Pavlović JL, Stojanovic BT, Paunović DD, 2014. Antioxidant potential of *Tanacetum vulgare* L. extracts, *Biol. Nyssana*, 5:1, 47-51.
- Tiunan TS, Ueda-Nakamura T, Garcia Cortez DA, et al., 2005. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 1, 176–182.
- Venditti A, Claudio Frezza; Fabio Sciubba; Mauro Serafini; Armandodoriano Bianco; Kevin Cianfaglione; Giulio Lupidi; Luana Quassinti; Massimo Bramucci; Filippo Maggi, 2018. Volatile components, polar constituents and biological activity of tansy daisy (*Tanacetum macrophyllum* (Waldst. et Kit.) Schultz Bip.), *Industrial Crops & Products*, 225-235.
- Verma V, Behera T, Munshi A, Parida S, Mohapatra T, 2007. Genetic diversity of ash gourd [*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.] inbred lines based on RAPD and ISSR markers and their hybrid performance. *Scientia Horticulturae*, 113, 231–237.
- Welsh J, McClelland M, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids Research*, 18, 7213-7218.
- WHO World Health Organization. 2016. Traditional Medical Strategy, <http://www.who.int/en/>
- Wichtl M, 2004. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals a Handbook of Practice on a Scientific Basis*, (third ed.), CRC Press, Stuttgart.
- Williams J, Kubelik G, Livak A, Rafalski K, Tingey J, 1990. DNA Polimorphism Amplified By Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*. 18, 6531-6535.
- Yıldız B, Arabacı T, Dirmenci T, 2013. Two new species of *Cirsium* (Asteraceae) and notes on allies from Turkey. *Turk Journal Botany*, 37, 1045–1054.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176–183.