

Article Arrival Date

19.02.2021

Article Type

Research Article

Article Published Date

20.03.2022

Doi Number: <http://dx.doi.org/10.38063/ejons.625>**BAZI *ASYNEUMA* GRİSEB. & SCHENK (CAMPANULACEAE) TÜRLERİNİN ITS2 (INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 2) BÖLGESİNİN YAPISAL KAREKTERİZASYONU VE TAKSONOMİK AÇIDAN ÖNEMİ****CHARACTERIZATION OF ITS2 SECONDARY STRUCTURE IN SOME *ASYNEUMA* GRİSEB. & SCHENK (CAMPANULACEAE) SPECIES AND ITS TAXONOMICAL UTILITY****Kurtuluş ÖZGİŞİ**

Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Science and Letters, Department of Biology, TR-26040
Eskisehir, Türkiye. ORCHID ID: 0000-0002-7344-6666

Özet

Organizmalar arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için ribozomal RNA dizilerinin dahili kopyalanmış aralayıcıları (ITS)'nin faydası kanıtlanmıştır. ITS1 ve ITS2, dizi olarak oldukça değişken olmasına rağmen, rRNA gen transkriptlerinin işlenmesinde anahtar bir işlevi olan korunmuş yapılara sahiptirler. Böyle korunmuş bir motifin belirlenmesi, organizmalar arasındaki ilişkilerin tanımlanmasına yardımcı olabilmektedir. ITS2 korunmuş bir ikincil yapıya sahip olduğundan bu yapıları araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada, *Asyneuma* cinsine ait yedi farklı taksonun ITS2 ikincil yapıları belirlenmiştir. ITS2'de Telafi Edici Baz Değişiklikleri (Compensatory Base Changes, CBC's) olarak adlandırılan eşleşmiş baz çiftlerinin her iki tarafındaki nükleotid değişiklikleri türler arasındaki ilişkileri tespit etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada ITS2 ikincil yapısının sahip olduğu Telafi Edici Baz Değişiklikleri ve bunların taksonomik açıdan kullanılabilirliği de test edilmiştir. Analizler, ikincil yapıların bazı taksonlar da korunmuş; bazı taksonlarda ise yapısal olarak farklı olduğunu göstermektedir. Ayrıca taksonlar arasında tespit edilen Telafi Edici Baz Değişiklikleri (CBC)'nin taksonları birbirinden ayırmada taksonomik olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Öte yandan, her dizi, kara bitkileri arasında yaygın olan korunmuş bir bölgeye sahiptir. *Asyneuma* cinsi üyelerinde ITS2 ikincil yapısındaki farklılıkların taksonomik olarak kullanılabilirliği gerçekleştirilen bu çalışma ile gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Asyneuma*, Campanulaceae, ITS2, ikincil yapı.

Abstract

Internally transcribed spacers (ITS) of ribosomal RNA sequences have proven useful for determining phylogenetic relationships among organisms. Although ITS1 and ITS2 are highly variable in sequence, they have conserved structures that have a key function in processing rRNA gene transcripts. Identifying such a conserved motif can help define relationships between organisms. Since ITS2 has a conserved secondary structure, these structures are frequently used by researchers. In this study, ITS2 secondary structures of seven different taxa belonging to the genus *Asyneuma* were determined. In ITS2, nucleotide changes on both sides of paired base pairs, called Compensatory Base Changes (CBC's), are widely used to detect relationships between species. In this study, the Compensatory Base Changes of the ITS2 secondary structure and their taxonomic usability were also tested. Analyzes showed that some taxa of secondary structures were also preserved; whereas some taxa are structurally different. In addition, it shows that the CBC detected between taxa can be used taxonomically. On the other hand, each taxa has a protected zone that is common among land plants. The taxonomic usability of differences in ITS2 secondary structure in members of the genus *Asyneuma* has been demonstrated by this study.

Keywords: *Asyneuma*, Campanulaceae, ITS2, secondary structure.

1. GİRİŞ

Campanulaceae (Çançığigiller) familyası kapalı tohumlu bitkiler (Angiosperm) içerisinde sınıflandırılması en karmaşık olan familyalardan birisidir (Cosner vd., 1994; Gustafsson ve Bremer, 1995). Familya kategorisindeki birçok düzenleme (De Candolle, 1830; Boissier, 1875; Fedorov, 1957 vb.) sistematik anlamda farklı görüşlerin ortaya çıkmasına neden olmakla birlikte, grup üyelerinin morfolojilerinde; ekolojilerinde; üreme sistemi ve kromozom sayılarındaki varyasyon, farklı araştırmacılar tarafından cins ve tür seviyelerinde de farklı taksonomik yaklaşımların benimsenmesine neden olmaktadır (Haberle vd., 2009).

Campanulaceae cinslerinden bir tanesi olan *Asyneuma* Griseb. & Schenk cinsi sınıflandırılmasında farklı yaklaşımlar benimsenmesi nedeniyle yakın cinsler arasında taksomomik birçok kombinasyon ve statü değişikliği yapılmış bir cinstir (De Candolle, 1830; Boissier, 1875; Grisebach ve Schenk, 1852; Damboldt, 1968 vb.).

Günümüzde *Asyneuma* cinsi içerisinde değerlendirilen birçok tür De Candolle (1830) tarafından *Phyteuma* L. cinsi içerisinde değerlendirirken; Don (1834) *Phyteuma* cinsi içerisinde yeni bir seksiyon, sect. *Podanthum* Don, tanımlayarak bu türlerin bu seksiyon içerisinde sınıflandırılması gerektiğini belirtmiştir. Boissier (1849), Don (1834)'un cinsin sınıflandırmasında benimsediği bu yaklaşımı başlangıçta kabul etmiş ve bu seksiyona ait birçok yeni *Phyteuma* türünü tanımlamıştır. Yeni tür tanımlamanın yanı sıra Boissier (1849) *Phyteuma* cinsi içerisinde değerlendirilen; ancak problemlili bazı türleri *Campanula* cinsine aktarmıştır.

İlerleyen yıllarda Boissier (1875), *Podanthum* seksiyonu içerisinde yer alan bitki türlerinin farklı bir cins altında değerlendirilmesi gerektiğini belirterek *Podanthum* Boiss. cinsini tanımlamış ve ilgili türleri bu cins içerisinde *Clinocarpium* Boiss. ve *Eupodanthum* Boiss seksiyonları altında değerlendirmiştir. Ancak *Podanthum*'un ayrı bir cins olarak değerlendirilmesi Boissier (1875)'den önce Ruprecht (1867) tarafından gerçekleştirilmesine rağmen bazı yazarlar cins yazarı olarak Boissier'i benimsemişlerdir. Boissier'i cins yazarı olarak kabul eden bu yazarlardan birisi olan Schulz (1904), *Phyteuma* cinsinin monografında Boissier'in sınıflandırma sistemini benimseyerek *Podanthum* cinsini *Phyteuma*'dan bağımsız bir cins olarak değerlendirmiştir. Ancak gerçekleştirdiği çalışmada Janchen (1906), Grisebach and Schenk (1852)'in *Podanthum* seksiyonu üyelerini Boissier (1875)'den daha önce farklı bir cins olarak tanımladıkları *Asyneuma* cinsi içerisinde değerlendirdiklerini belirtmiştir. Ancak cins üyeleri belirli bir dönem *Podanthum* veya *Phyteuma* (bazı durumlarda her iki cins altında) cinsleri altında değerlendirilmeye devam edilmiş ve bu durum cins sistematğinde karmaşaya neden olmuştur. Bornmüeller (1921) bu cinsler altında değerlendirilen bütün türlerin *Asyneuma* cinsine aktarımını gerçekleştirerek sistematik anlamdaki bu karmaşaya bir anlamda son vermiştir.

Bahsi geçen çalışmalardan görüleceği üzere cins sınırları halen netlik kazanamamış ve bu durum toplam takson sayısında da tutarsızlıklara neden olmuştur. Boissier (1875)'e göre *Asyneuma* cinsi (*Podanthum* cinsi olarak değerlendirmiştir) 26 tür ile temsil edilirken Bornmüller (1921)'e göre *Asyneuma* cinsi 40 türle temsil edilmektedir. Ancak Dambolt gerçekleştirdiği çalışmada (1970) morfolojik varyasyonları da dikkate alarak *Asyneuma* cinsinin 22 tür; 11 alttür ve bir varyete ile temsil edildiğini belirtmiştir. Diğer taraftan World Checklist of Selected Plant Families (WCSP, <http://wcsp.science.kew.org/qsearch.do;jsessionid=C18C1270B3EE8C4211BFE5FB521B3852.kppapp06-wcsp>, son erişim:20/01/2022) ve Plants of The World Online (POWO, http://www.plantsoftheworldonline.org/?f=%2Caccepted_names&page.size=120&q=asyneuma, son erişim:20/01/2022) göre *Asyneuma* cinsine ait 59 taksonun ismi kabul edilirken; The Plant List (<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Asyneuma>, son erişim:20/01/2022) ve World Flora Online (WFO; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000003508#children>, son erişim: 24/03/2021)'a göre 41 taksonun ismi kabul edilmektedir.

Teknolojik gelişmeler, özellikle moleküler biyoloji alanında, sistematik çalışmalara yeni bakış açıları sağlamaktadır. Organizmaların filogenetik ilişkilerini anlamak için sınırlı sayıda ortolog gen bölgesi canlılar arsındaki filogenetik ilişkiyi belirlemek adına yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu

moleküler belirteçlerden bir tanesi olan çekirdek DNA'sının (nrDNA) ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi birçok organizmada bulunması; yeterli sinapomorfik karakter barındırması ve düşük maliyetlerle tespit edilebilmesi gibi nedenlerden ötürü filogenetik çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir moleküler belirteçtir (Hillis vd., 1991; Warwick vd., 2010).

Ribozomal RNA gen kümesi yedi farklı bileşenden oluşmaktadır. Bunlardan üçü (18S, 5.8S ve 26S), RNA'ları üretmek için işlenen rRNA gen bölgeleridir. Bu yüksek oranda korunmuş rDNA ekzonlarından önce bir harici kopyalanmış aralayıcı gelir ve her bir gen sırasıyla iki dâhili kopyalanmış aralayıcı (ITS1 ve ITS2) ile birbirinden ayrılmaktadır (Baldwin vd., 1995).

Sitoplazma içerisindeki ribozomlar her ne kadar ITS bölgelerini içermese de, ITS bölgeleri rRNA'nın oluşturulmasında önemli rol almaktadır. Örneğin, 40S alt birimlerinin oluşumunun engellenmesi, ITS1'in merkezi kısmının delesyonlarına bağlıdır. Ayrıca ITS2'nin 5'-terminal bölgesindeki delesyonlar, 26S rRNA'nın oluşmasını bloke eder. Bu süreçler, ITS1 ve ITS2 bölgelerinin özel olarak ikincil katlanmaları ile yüksek oranda ilişkilidir ve ribozomal alt birimlerin oluşması için ITS bölgelerinin korunmuş bir ikincil yapısı gereklidir. ITS bölgeleri, nokta mutasyonları ve indeller nedeniyle yüksek bir mutasyon oranına sahip olsa da, bu ikincil yapının korunması rRNA'nın oluşması için kritik öneme sahiptir (Musters vd., 1990; Mai ve Coleman, 1997; Saha vd., 2017; Karpenko vd., 2018).

ITS bölgelerinin korunan ikincil yapıları ve bu yapıların sahip olduğu özellikler, türlerin sınırlarını anlamak için de kullanılmaktadır. ITS2'de Telafi Edici Baz Değişiklikleri (Compensatory Base Changes, CBC's) olarak adlandırılan eşleşmiş baz çiftlerinin her iki tarafındaki nükleotid değişiklikleri türler arasındaki ilişkileri tespit etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Mullineux ve Hausner, 2009).

Coleman ve Vacquier (2002)'in gerçekleştirdiği çalışmaya göre ITS2 ikincil yapısının korunan pozisyonlarındaki telafi edici bazlarda meydana gelen bir baz değişikliği bile taksonlar arasında melezleme/çaprazlamayı bloke etmektedir. Coleman ve Vacquier (2002)'in tespit ettiği bu bulgu biyolojik tür kavramı ile uyumlu olduğu için ITS2 ikincil yapısındaki baz değişimleri (CBC'ler) birçok araştırmacı tarafından tür sınırlama aracı olarak kullanılmaktadır (Musters vd., 1990; Mai ve Coleman, 1997; Saha vd., 2017; Karpenko vd., 2018).

Bu çalışmada sistematik anlamda tür sınırları netleştirilememiş bazı *Asyneuma* (Campanulaceae) türlerinin ITS2 ikincil yapısı karakterize edilerek bu yapının tür sınırlamadaki etkinliğinin test edilmesi amaçlanmaktadır.

2. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada kapsamında *Asyneuma* cinse ait farklı taksonların ITS bölgesine ait sekans dizileri NCBI Gen Bankasından (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) alınmıştır (Çizelge 1).

Çalışılan taksonlara ait ITS sekansları öncelikle ITS2 Veritabanı V (ITS2 database V; Ankenbrand vd., 2015)'de bulunan Hidden Markov Model (HMM) tabanlı lokus belirleme aracı kullanılarak analizlere tabi tutulmuş ve her taksonun ITS2 sekans dizileri tespit edilmiştir.

ITS2 sekans dizilerinin sınırlarını belirlemek için Ankenbrand vd. (2015)'nin önerdiği şekilde ITS2 Veritabanı V Lokus Belirleme Aracı'nda E-value<0.01; Organizma: Viridiplantae ve Minimum ITS2 uzunluğu >150 nt. opsiyonları kullanılmıştır.

ITS bölgesinin 5.8S ve 28S arasında konumlanan ITS2 dizilerinin konum belirleme işlemi sonrası her taksona ait ITS2 ikincil yapıları RNA Katlanması Tahmin Aracı olan Mfold (Zuker, 2003)'da 2.3 Enerji Kuralı ve 37 °C katlanma sıcaklığı opsiyonları kullanılarak tespit edilmiştir.

Mfold (Zuker, 2003) programının yanı sıra ITS2 sekanslarına ait ikincil yapıları tespit etmek için ITS2 Veri Bankası (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/> son erişim: 18/02/2022; Koetschan vd., 2012)'da kullanılmıştır. Elde edilen ITS2 ikincil yapıları sekans bilgileri ile birlikte 12 × 12 puanlama matrisi kullanan 4SALE programı ile eşzamanlı olarak hizalanmıştır. Her taksona ait ITS2 ikincil yapısı VARNA 3.9 (Darty vd., 2009) yazılımı kullanılarak görselleştirilmiştir.

Çizelge 1. Çalışma kapsamında kullanılan *Asyneuma* taksonları ve NCBI erişim numaraları.

Takson	NCBI Erişim Numarası
<i>Asyneuma campanuloides</i> (M.Bieb.) Bornm.	DQ304586
<i>Asyneuma canescens</i> Griseb. & Schenk	KC455546
<i>Asyneuma comosiforme</i> Hayek & Janch.	FJ426592
<i>Asyneuma limoniifolium</i> subsp. <i>limoniifolium</i> (L.) Janch.	DQ304587
<i>Asyneuma lobelioides</i> Hand.-Mazz.	KC455541
<i>Asyneuma pichleri</i> subsp. <i>pichleri</i> (Vis.) D.Lakušić & F.Conti	KC455542
<i>Asyneuma trichocalycinum</i> (Ten.) K.Malý	KC455544

Taksonlara ait ITS2 sekonder yapısındaki sinapomorfik değişimleri ve Telafi Edici Baz Değişiklikleri (Compensatory Base Changes, CBC's)'ni tespit etmek için PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) programı kullanılmıştır. Sinapomorfik değişiklikleri PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) programında tespit edebilmek için öncelikle taksonların dâhil olduğu Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood) filogenetik ağacı R (R core team, 2014) istatistik programında phangorn (Schliep, 2011) yazılımı kullanılarak ITS2 veri seti için oluşturulmuştur.

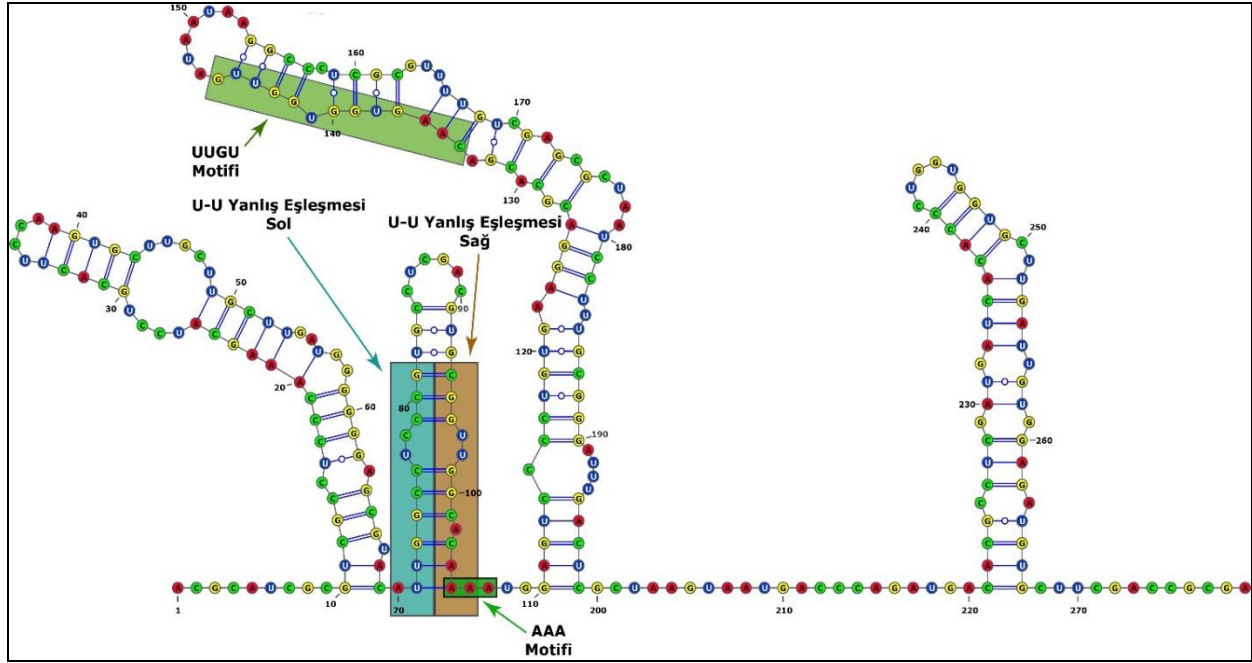
Oluşturulan filogenetik ağaç ve ITS2 sekansları PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) programında karakter durumu optimizasyonu DELTRAN seçeneği altında analiz edilmiş ve taksonlara ait tüm apomorfik ve sinapomorfik karakterler tespit edilmiştir. Tespit edilen Telafi Edici Baz Değişiklikleri (Compensatory Base Changes, CBC's) ilgili taksona ait ITS2 ikincil yapı üzerinde gösterilmiştir.

305

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında incelenen *Asyneuma* taksonlarının ITS2 bölgesinin 279 bp uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir. Taksonlara ait ortalama ITS2 ikincil yapı sayısı ortalama 4.5 olup ITS2 sekanslarının ortalama GC içeriği %55.91'dir.

İncelenen bütün *Asyneuma* taksonları 4-Parmaklı ITS2 ikincil yapısına sahip olmakla birlikte bütün ITS2 ikincil yapıların ikinci heliksinde tüm bitkilerde korunmuş olan U-U Yanlış Eşleşme Bölgesi (5'-AACUGGUCUCCCGUG, sol; 5'-CGCGGUUGGCCAAAA, sağ) bulunmaktadır. Ayrıca tüm taksonların ITS2 ikincil yapılarının üçüncü heliksinde yine tüm bitkilerde korunmuş olan UGGU (5'-GACAUGCGGUGUGA) motifi; ikinci ve üçüncü heliksler arasında da korunmuş AAA motifi bulunmaktadır (Şekil 1).

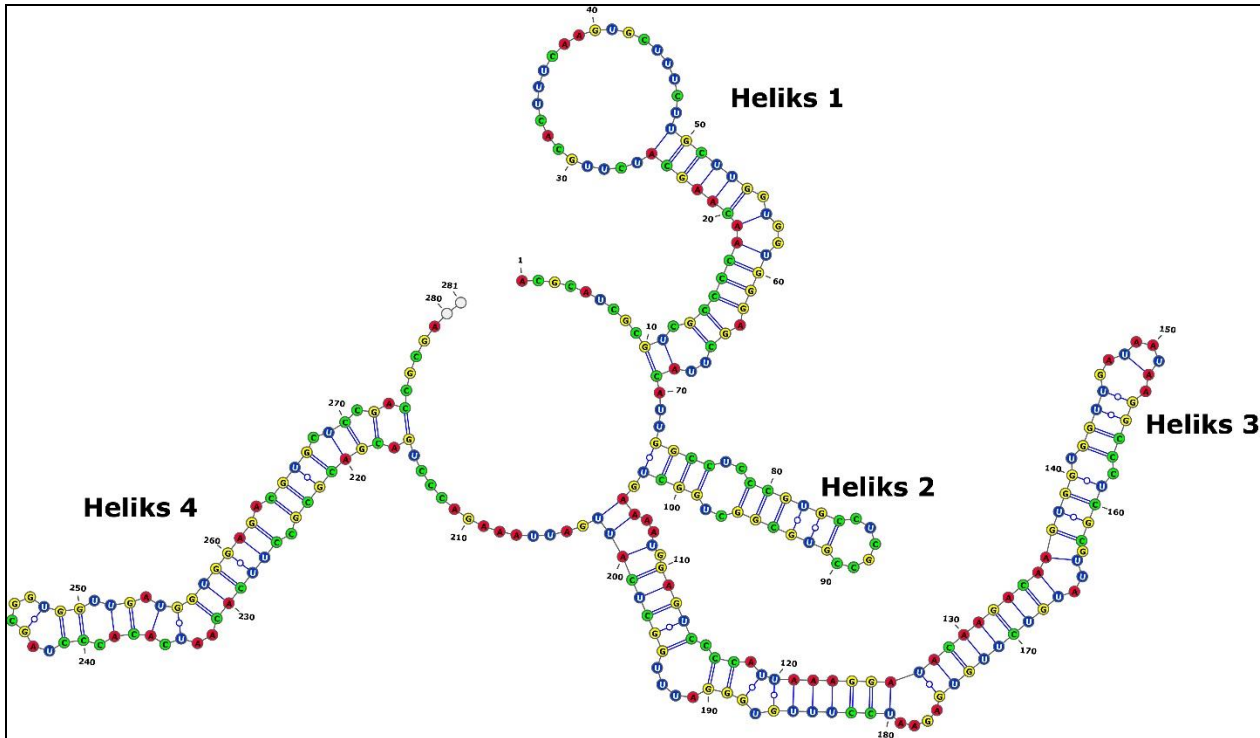


Şekil 1. *Asyneuma* taksonlarında korunmuş U-U Yanlış Eşleşme Bölgesi (Heliks II, sol; Heliks II, sağ), AAA motifi (Heliks 2 ve 3 arası) ve UGGU motifi (Heliks III).

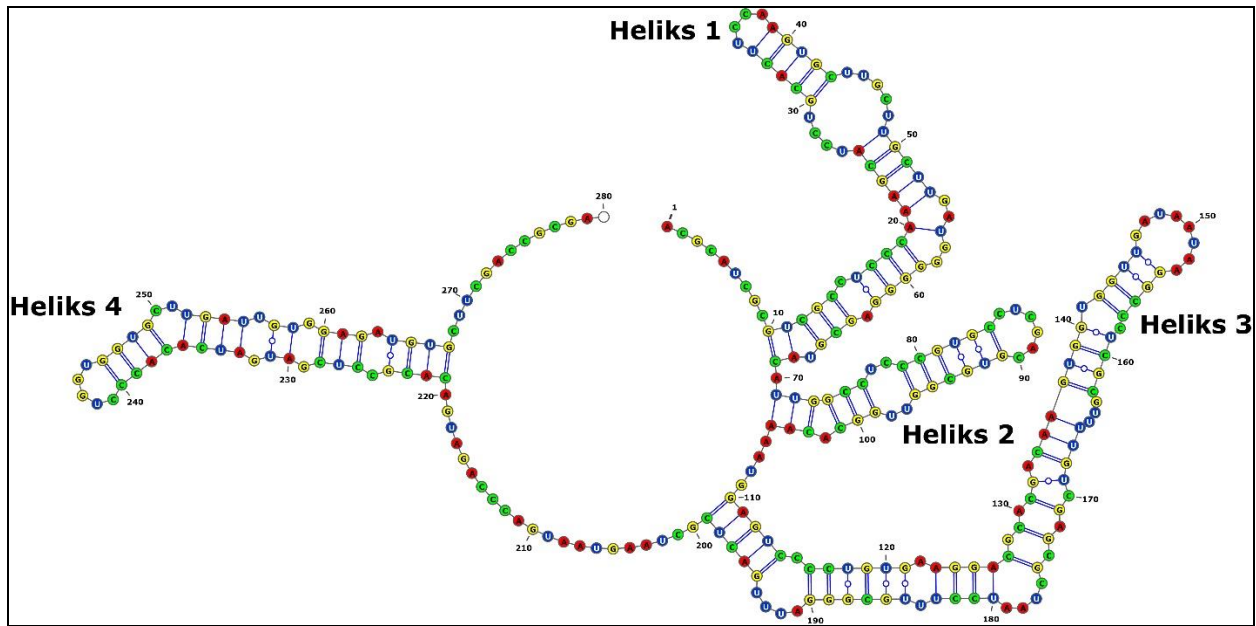
Asyneuma taksonlarının ITS2 ikincil yapıları incelendiğinde Heliks 2; Heliks 3 ve Heliks 4'ün bütün taksonlarda korunmuş olduğu görülmektedir. Ancak Heliks 1'in *A. comosiforme* ve *A. limoniifolium* subsp. *limoniifolium* taksonlarında yapısal olarak farklı olduğu görülmektedir.

A. comosiforme taksonunda Heliks 1'in uç kısmında (25-49. bazlar arasında) halkasal (loop) bir yapı bulunurken; Heliks 1'in halkasal yapısı (loop) *A. limoniifolium* subsp. *limoniifolium* taksonunda uç kısma yakın bir yerde bulunmaktadır (Şekil 2 ve Şekil 3). Diğer taksonların birinci helksinin uç kısmına yakın kısımlarında da halkasal yapı bulunmakla birlikte *A. limoniifolium* subsp. *limoniifolium* taksonundaki halkasal yapıdan (14 baz uzunluğunda) daha kısadır (9 baz uzunluğunda).

306



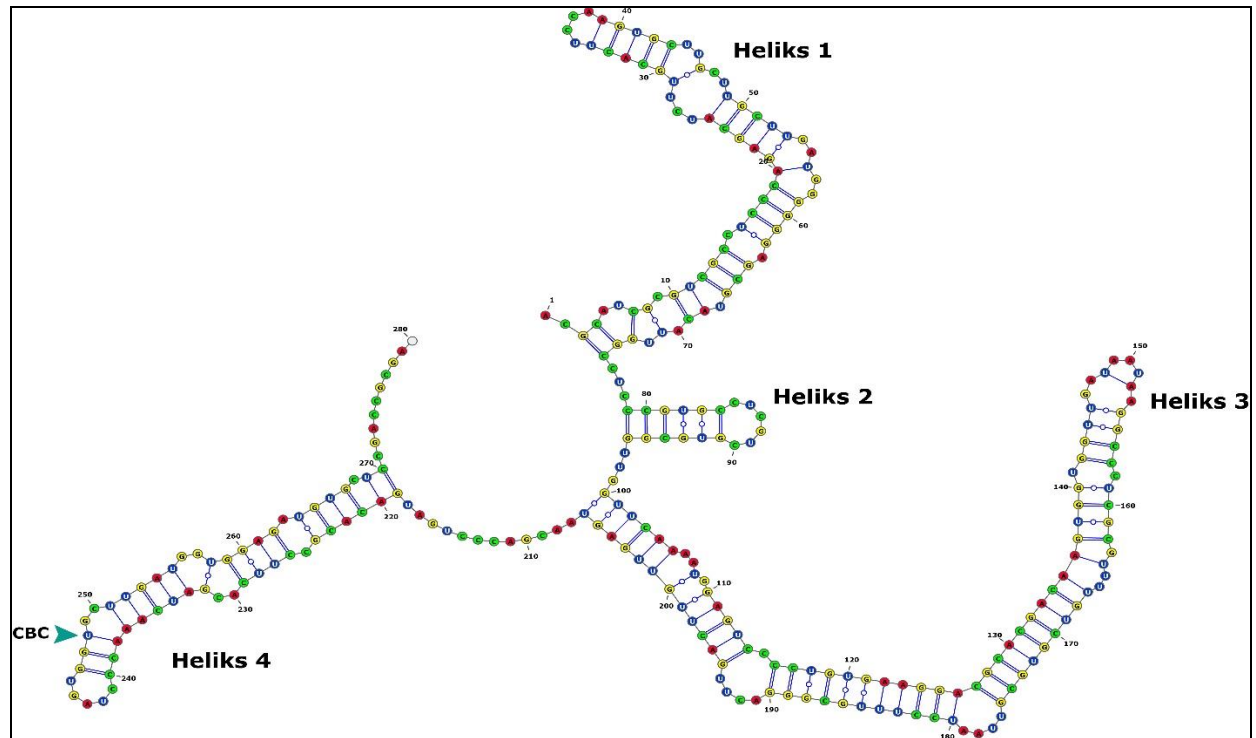
Şekil 2. *A. comosiforme* türünün ITS2 ikincil yapısı ve Heliks 1'in uç kısmındaki halkasal yapı.



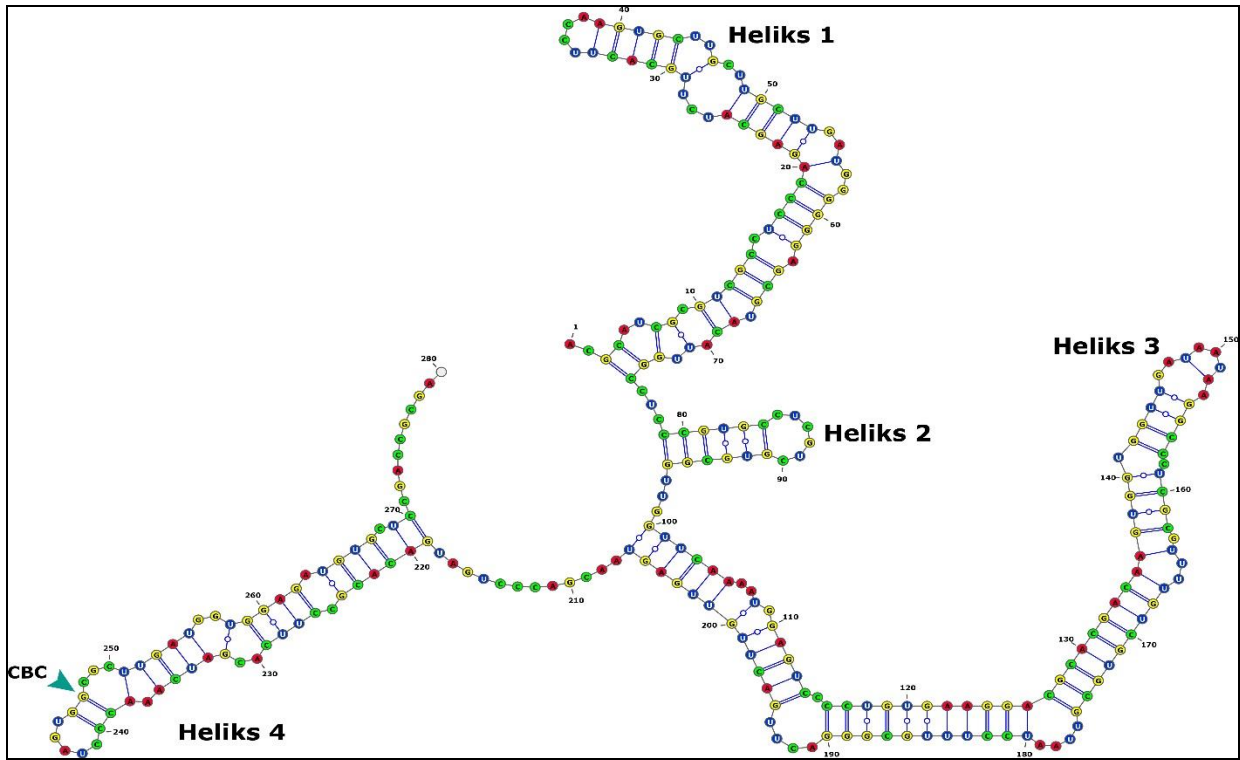
Şekil 3. *A. limoniifolium* subsp. *limoniifolium* taksonunun ITS2 ikincil yapısı ve Heliks 1'in 25-49. bazlar arasındaki halkasal yapı.

Asyneuma campanuloides; *A. canescens*; *A. lobelioides*; *A. pichleri* subsp. *pichleri* ve *A. trichocalycinum* taksonlarının ITS2 ikincil yapıları yapısal olarak birbirine benzemekle birlikte *A. pichleri* subsp. *pichleri* taksonunda ITS2 sekansının 248. baz pozisyonunda Telafi Edici Baz Değişikliği (Compensatory Base Change, CBC) bulunmaktadır (Şekil 4). *A. trichocalycinum* türünde ise Telafi Edici Baz Değişikliği ITS2 sekansının 247. pozisyonunda bulunmaktadır (Şekil 5).

307



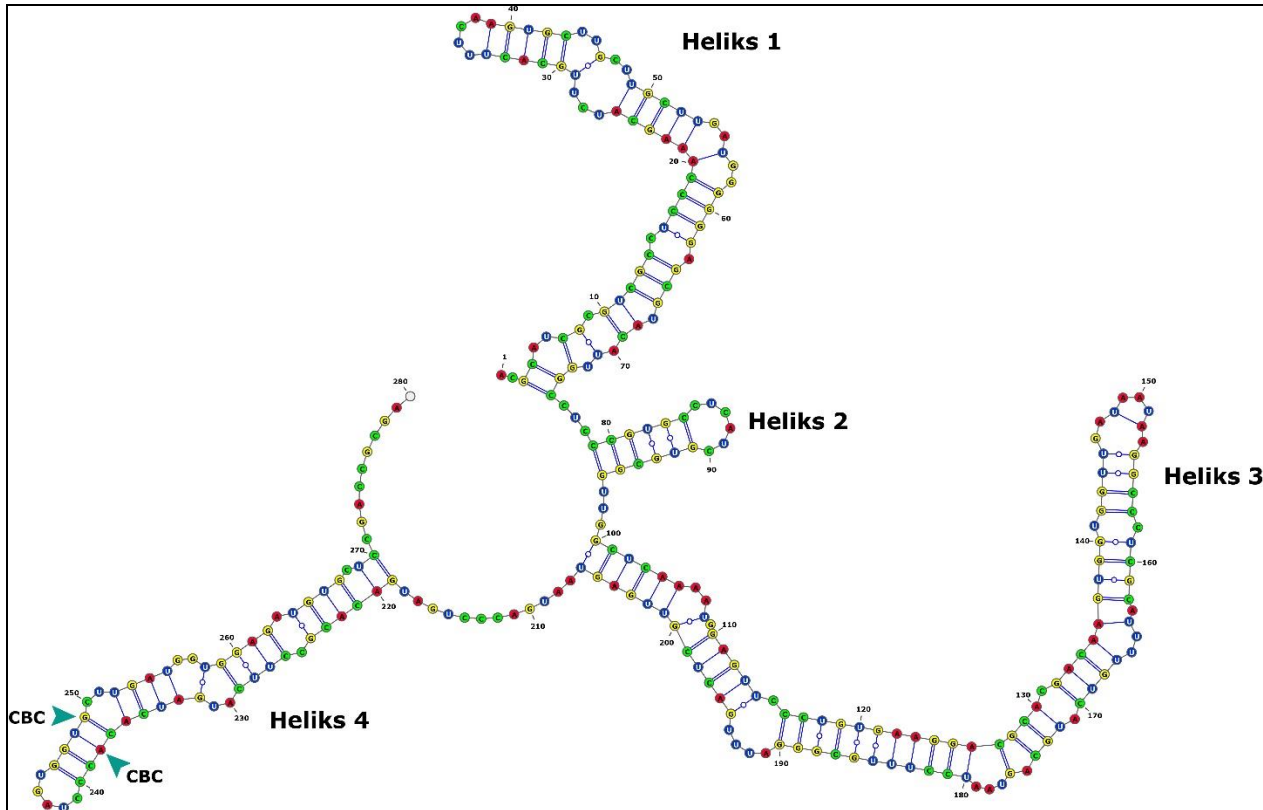
Şekil 4. *A. pichleri* subsp. *pichleri* taksonunun ITS2 ikincil yapısı ve Heliks 4'te 248. baz pozisyonunda bulunan CBC.



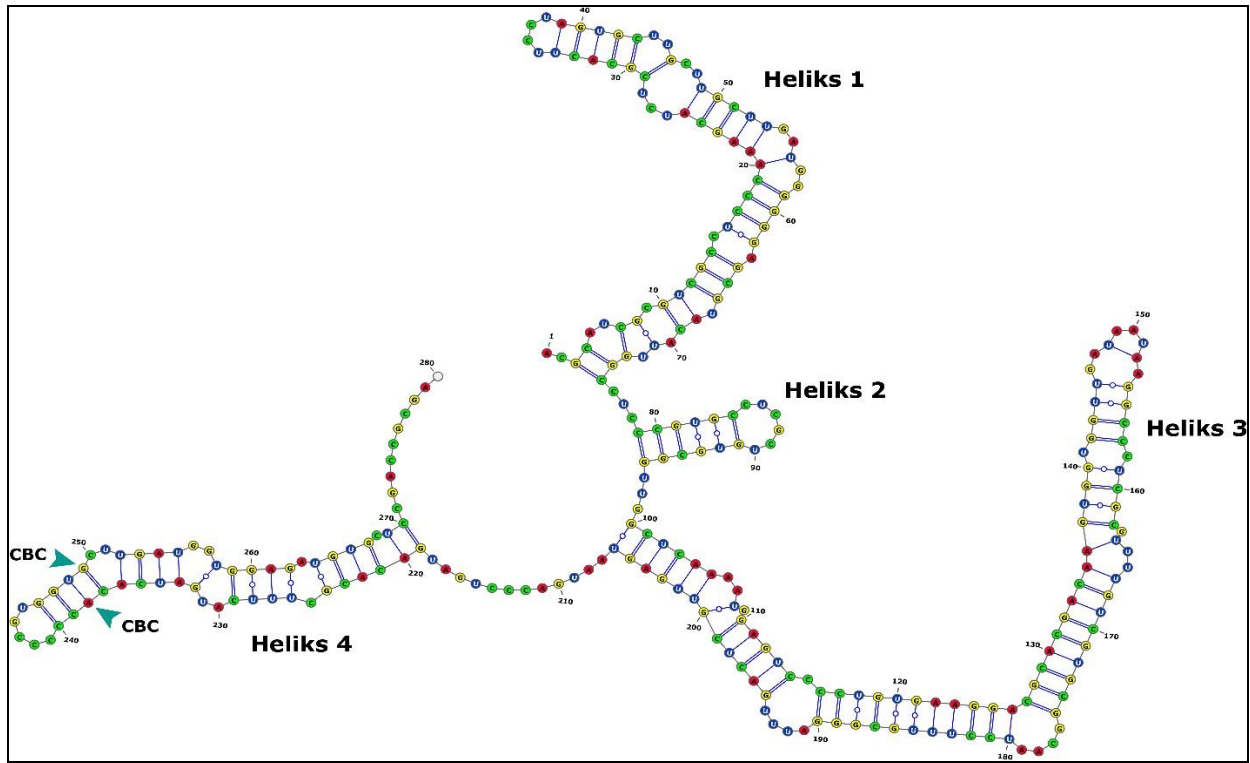
Şekil 5. *A. trichocalycinum* türünün ITS2 ikincil yapısı ve Heliks 4'te 247. baz pozisyonunda bulunan CBC.

Asyneuma campanuloides ve *A. canescens* türlerinin ITS2 ikincil yapısı birbirlerinin aynı olup ilgili türler diğer taksonlardan ITS2 sekanslarının 238. ve 249. baz pozisyonlarındaki Telafi Edici Baz Değişiklikleri ile ayrılmaktadır (Şekil 6; Şekil 7).

308

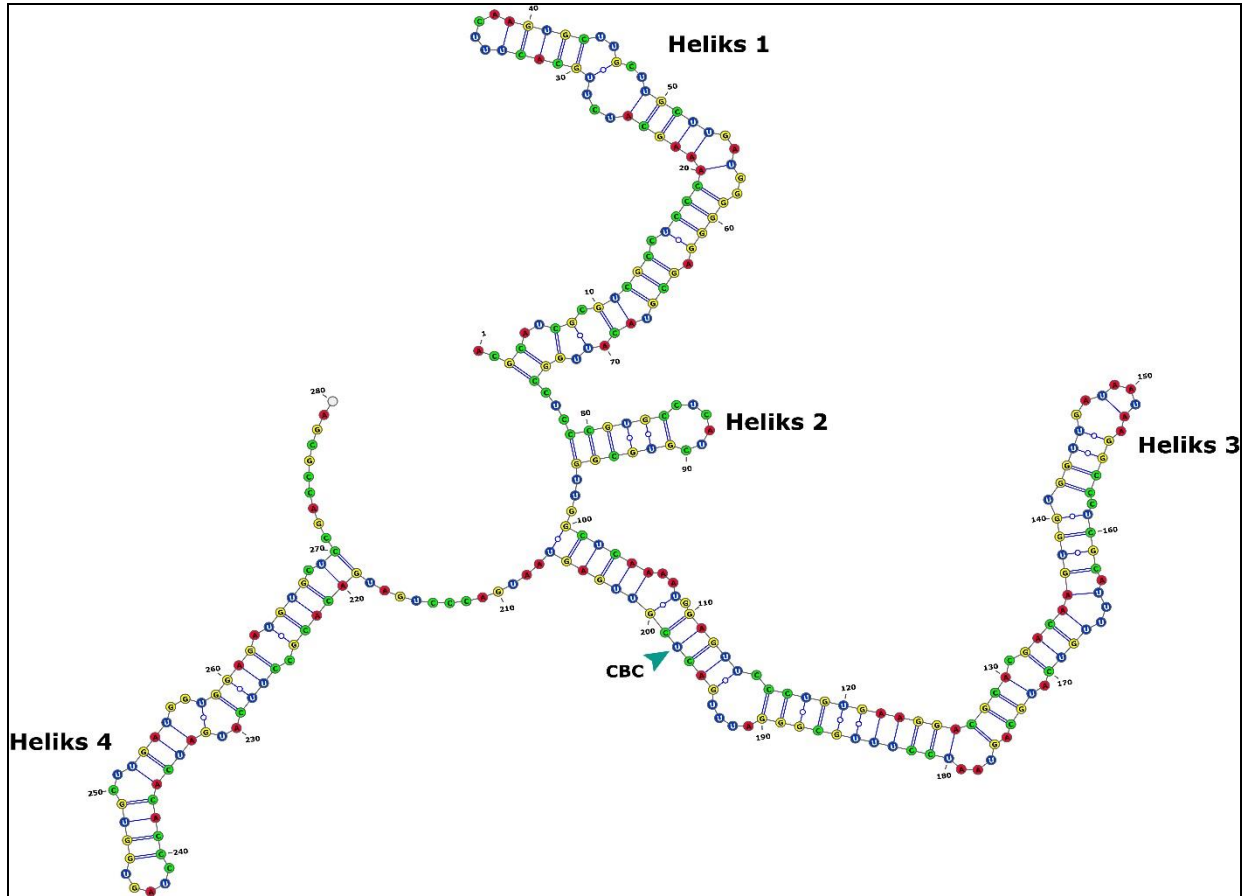


Şekil 6. *A. campanuloides* türünün ITS2 ikincil yapısı ve Heliks 4'te 238. Ve 249. baz pozisyonlarındaki CBCs.



Şekil 7. *A. canescens* türünün ITS2 ikincil yapısı ve Heliks 4'te 238. Ve 249. baz pozisyonlarındaki CBCs.

A. lobelioides türü ise ITS2 sekansının 198. baz pozisyonundaki Telafi Edici Baz Değişikliği (Compensatory Base Change, CBC) ile diğer taksonlardan ayrılmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. *A. lobelioides* türünün ITS2 ikincil yapısı ve Heliks 3'te 198. baz pozisyonundaki CBC.

Bu çalışma ile incelenen *Asyneuma* taksonlarının birçoğunun hem ITS2 ikincil yapısı hem de Telafi Edici Baz Değişiklikleri açısından birbirlerinden farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Coleman ve Vacquier [8]'in çalışmalarında belirttiği taksonlar arasında tespit edilen bir adet telafi baz değişikliğinin (CBC) taksonları ayırmada önemli bir kriter kabul edilmesi, çalışma kapsamında en az birer adet CBC içeren *A. campanuloides*; *A. canescens*; *A. lobelioides*; *A. pichleri* subsp. *pichleri* ve *A. trichocalycinum* taksonlarının birbirlerinden farklı birer takson olduğunu göstermektedir.

Diğer taraftan ITS2 bölgesinin rRNA'nın oluşturulmasında önemli rol oynadığı ve birbirine çok yakın gruplarda korunmuş bir yapıya sahip olduğu bilinmektedir. Çalışma kapsamında incelenen taksonlardan *A. comosiforme* ve *A. limoniifolium* subsp. *limoniifolium* taksonlarının ITS2 ikincil yapısının Heliks 1 bölgesindeki yapısal farklılık bu taksonların diğer taksonlardan oldukça farklı olduğunu göstermektedir. Ancak bu iki takson arasında herhangi bir telafi edici baz değişikliği bulunmasa da bu iki taksonun da Heliks 1 bölgesindeki yapının birbirlerinden farklı olduğu görülmektedir (Şekil 2; Şekil 3). Bu durumda bu iki takson da birbirlerinden farklı taksonlar olarak değerlendirilmektedir.

Bu çalışma ile Coleman ve Vacquier (2002)'in belirttiği taksonlar arasındaki telafi edici baz değişikliğinin ayırım karakteri olarak kullanılmasının yanı sıra ITS2'nin yapısal formunun da *Asyneuma* taksonları için ayırt edici bir karakter olduğu gösterilmiştir. İncelenen taksonlar dışında aynı cinse ait daha fazla taksonun da benzer çalışmalara dahil edilerek incelenmesi; grubun ITS2 ikincil yapısının karakterize edilmesi ve gruplar arası telafi edici baz değişikliklerinin (CBCs) tespiti ile grubun akrabalık ilişkileri ve taksonların tür sınırları daha net bir şekilde tespit edilecektir.

4. KAYNAKÇA

- Ankenbrand, M. J., Keller, A., Wolf, M., Schultz, J., & Förster, F. (2015). ITS2 database V: Twice as much. *Molecular Biology and Evolution*, 32(11), 3030-3032.
- 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*, 247-277.
- Boissier, E. (1849). *Diagnoses plantarum orientaliarum novarum*. ser. 1, 12. Paris: M. Ducloux et cons.
- Boissier, E. (1875). *Campanulaceae*. *Flora orientalis*, 3, 884-962.
- Bornmüller, J. F. N. (1921). Ein Beitrag zur Kenntnis der Gattung *Asyneuma* Griseb.
- Coleman, A. W., & Vacquier, V. D. (2002). Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: a test case for abalone (*Haliotis*). *Journal of molecular evolution*, 54(2), 246-257.
- Cosner, M. E., Jansen, R. K., & Lammers, T. G. (1994). Phylogenetic relationships in the Campanulales based on rbcL sequences. *Plant systematics and evolution*, 190(1), 79-95.
- Damboldt, J. (1968). Vorarbeiten zu einer revision der gattung *Asyneuma* (Campanulaceae). I. *Willdenowia*, 35-54.
- Damboldt, J. (1970). Revision der Gattung *Asyneuma*. *Boissiera*.
- Darty, K., Denise, A., & Ponty, Y. (2009). VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics*, 25(15), 1974.
- De Candolle, A. (1830). *Monographie des campanulées*. Veuve Desray.
- Don, G. (1834). A general history of the dichlamydeous plants (Vol. 3). JG and F. Rivington.
- Fedorov, A.A. (1957). *Campanulaceae* Juss. in: Shishkin, B.K. & Bobrov, E.G. eds.), *Flora of the U.S.S.R.*, English ed. 1972, vol. 24. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 92–343.

- Grisebach, A. H. R., & Schenk, A. (1852). *Iter hungaricum a. 1852 susceptum: Beiträge zur Systematik der ungarischen Flora*. Akad. Verlag-Ges.
- Gustafsson, M. H., & Bremer, K. (1995). Morphology and phylogenetic interrelationships of the Asteraceae, Calyceraceae, Campanulaceae, Goodeniaceae, and related families (Asterales). *American Journal of Botany*, 82(2), 250-265.
- Haberle, R. C., Dang, A., Lee, T., Peñaflor, C., Cortes-Burns, H., Oestreich, A., ... & Jansen, R. K. (2009). Taxonomic and biogeographic implications of a phylogenetic analysis of the Campanulaceae based on three chloroplast genes. *Taxon*, 58(3), 715-734.
- Hillis, D. M., & Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly review of biology*, 66(4), 411-453.
- Janichen, E. (1906). *Ein Beitrag zur Kenntnis der Flora der Herzegowina*. Verlag des Naturwissenschaftlichen Vereines.
- Karpenko, N., Martyniuk, V., Tyshchenko, O., Tarieiev, A., TEKPINAR, A., Didenko, V., & Kostikov, I. (2018). Resolving the position of *Astragalus borysthenticus* Klokov within the *Astragalus* L. species. *Turkish Journal of Botany*, 42(5), 623-635.
- Koetschan, C., Hackl, T., Müller, T., Wolf, M., Förster, F., & Schultz, J. (2012). ITS2 database IV: interactive taxon sampling for internal transcribed spacer 2 based phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63(3), 585-588.
- Mai, J. C., & Coleman, A. W. (1997). The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. *Journal of Molecular Evolution*, 44(3), 258-271.
- Musters, W., Boon, K., Van der Sande, C. A., van Heerikhuizen, H., & Planta, R. J. (1990). Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. *The EMBO journal*, 9(12), 3989-3996.
- R Core Team (2014). *R: A language and environment for statistical computing*.
- Ruprecht, F.J. (1867). *Revisio Campanularum Caucasi*. Bull. Acad. Imp. Sci. Saint-Pétersbourg, 9, 203-222.
- Saha, P. S., Sengupta, M., & Jha, S. (2017). Ribosomal DNA ITS1, 5.8 S and ITS2 secondary structure, nuclear DNA content and phytochemical analyses reveal distinctive characteristics of four subclades of *Protasparagus*. *Journal of Systematics and Evolution*, 55(1), 54-70.
- Schliep, K. P. (2011). phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27(4), 592-593.
- Schulz, R. (1904). *Monographie der Gattung Phyteuma*. J. Schmeck, Geisenheim.
- Swofford, D. L. (2002). PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods)*. Version 4., (Sinauer Associates Inc.: Sunderland, MA, USA.).
- Valiante, V., Jain, R., Heinekamp, T., & Brakhage, A. A. (2009). The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 46(12), 909-918.
- Warwick, S. I., Mummenhoff, K., Sauder, C. A., Koch, M. A., & Al-Shehbaz, I. A. (2010). Closing the gaps: phylogenetic relationships in the Brassicaceae based on DNA sequence data of nuclear ribosomal ITS region. *Plant Systematics and Evolution*, 285(3), 209-232.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*, 31(13), 3406-3415.