

***POLYGALA VULGARIS* L. (*POLYGALACEAE*)'İN
PLOİDİ DÜZEYİNİN YENİ NESİL DİZİLEME
YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ**

**AN INVESTIGATION OF PLOIDY LEVELS IN
POLYGALA VULGARIS L. (*POLYGALACEAE*) USING
NEXT GENERATION SEQUENCING**

İLAYDA GÜLMEZ

DOÇ. DR. ZÜBEYDE UĞURLU AYDIN
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.
Ocak 2025

ÖZET

***POLYGALA VULGARIS* L. (*POLYGALACEAE*)'İN PLOİDİ DÜZEYİNİN YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ**

İLAYDA GÜLMEZ

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. ZÜBEYDE UĞURLU AYDIN

Ocak 2025, 101 sayfa

Bu tez çalışmasında, kromozom sayısı $2n=4x=68$ ile tetraploid olan *Polygala vulgaris* L. türüne ait iki farklı popülasyondan toplam beş bireyin tüm genom dizilimi biyoinformatik analizlerle incelenmiştir. Çalışmada, genom boyutu tahminleme yöntemlerinden k -mer ve k -mer tabanlı olmayan programlar kullanılmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır. Ayrıca genom heterozigotluğunun tahmini, hareketli elementlerin sınıflandırılması ve bunların poliploidi ile olan ilişkileri araştırılmış ve elde edilen veriler tartışılmıştır. Bunların yanında, poliploid genom analizleri sonucunda, her bireyin evrimsel sürecinde geçirdiği poliploidi olayları ile bu olayların gerçekleşme zamanı ile tüm genom duplikasyonu haricindeki duplikasyon çeşitleri de tahmin edilmiştir.

Taksonların tüm genom dizilimleri *de novo* assembly yöntemiyle haritalanmıştır. Çalışılan beş bireyde genom boyutları, k -mer tabanlı çalışan programlardan Kmergenie ile 1300-2024 Mb arasında; GenomeScope ile 68-404 Mb olarak

hesaplanırken; *k*-mer tabanlı olmayan SGA programıyla 1224-1951 Mb arasında hesaplanmıştır. Heterozigotluk seviyeleri ise %4,8 %16, %21,68, %10 ve %4,56 olarak hesaplanmıştır. Her örneğin genomundaki hareketli element içerikleri %49,39, %45,62, %43,16, %51.01 ve %45.15 olarak bulunmuş ve genom içeriğinin neredeyse yarısının transpozonlardan oluştuğu gösterilmiştir. Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda türün ortaya çıkış zamanının yaklaşık 65 – 72 myö olduğu ve her iki populasyonun da iki adet paleo-poliploidi geçirdiği gösterilmiştir. Bunlardan birinci poliploidinin ortalama 55 milyon yıl önce, ikincisininse ortalama 34 milyon yıl önce gerçekleştiği bulunmuştur.

Çalışma sonucunda klasik yöntemlerle ve laboratuvar koşullarıyla elde edilen ploidi tespiti ve genom boyutu gibi bilgilerin biyoinformatik analizlerle de elde edilebileceği ve böylelikle laboratuvar koşullarındaki hata payının en aza indirgenip, eldeki dizi ile çok daha fazla bilgi ve analize ulaşılabileceği gösterilmiştir. Bu tez çalışmasıyla *Polygala vulgaris* bireylerine ait ilk tüm genom dizisi elde edilmiş, ploidi zamanlarının tahminlemesi yapılmış ve türün ortaya çıkış zamanı belirlenmiştir. Ayrıca, yeni nesil dizilemeyle elde edilen kısa okumaların analiz edilmesiyle bu türde ilk kez genom karakterizasyonu yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyoinformatik, Heterozigot, İleri Sekanslama Yöntemleri, *k*-mer Analizi, *Polygala vulgaris*, Paleopoliploidi

ABSTRACT

AN INVESTIGATION OF PLOIDY LEVELS IN *POLYGALA VULGARIS* L. (*POLYGALACEAE*) USING NEXT GENERATION SEQUENCING

İLAYDA GÜLMEZ

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Associate Professor Dr. ZÜBEYDE UĞURLU AYDIN

January 2025, 101 pages

In this thesis study, the whole genome sequencing of five individuals from two different populations of the tetraploid species *Polygala vulgaris* L., with a chromosome number of $2n=4x=68$, was analyzed using bioinformatics tools. Genome size estimation methods, including *k*-mer based and non-*k*-mer based programs, were utilized and their results were compared. Additionally, genome heterozygosity estimation, the classification of transposable elements, and their relationships with polyploidy were investigated, and the findings were discussed. Furthermore, through polyploid genome analyses, the polyploidy events each individual experienced during their evolutionary history, the timing of these events, and duplication types other than whole-genome duplication were also estimated.

The whole genome sequences of the taxa were mapped using the *de novo* assembly method. In the five studied individuals, genome sizes were estimated to range between 1300–2024 Mb with Kmergenie (*k*-mer based), 68–404 Mb with GenomeScope, and 1224–1951 Mb with the non-*k*-mer based SGA program. Heterozygosity levels were calculated as 4.8%, 16%, 21.68%, 10%, and 4.56%. The

transposable element contents in each genome were found to be 49.39%, 45.62%, 43.16%, 51.01%, and 45.15%, indicating that nearly half of the genome content consists of transposons. Bioinformatics analyses revealed that the emergence of the species occurred approximately 65–72 million years ago (mya) and that both populations experienced two paleo-polyploidy events. The first polyploidy event was estimated to have occurred around 55 million years ago, while the second occurred approximately 34 million years ago.

As a result of this study, it was demonstrated that information such as ploidy detection and genome size, traditionally obtained through classical methods and laboratory conditions, can also be derived through bioinformatic analyses. This minimizes the margin of error in laboratory conditions and enables access to much more information and analyses using the available sequence data. Through this thesis, the first whole-genome sequence of *Polygala vulgaris* individuals was obtained, the timing of ploidy events was estimated, and the emergence time of the species was determined. Moreover, the first genome characterization of this species was conducted by analyzing short reads obtained through next-generation sequencing.

Keywords: Bioinformatics, Heterozygosity, Next-Generation Sequencing, *k*-mer Analysis, *Polygala vulgaris*, Paleo-polyploidy

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin her aşamasında, eğitim süreçlerimin her basamağında, akademik kariyerimde yıllardır süregelen destekleriyle her konuda hep yanımda olan, danışmanım Doç. Dr. Zübeyde Uğurlu Aydın'a,

Araştırma, analiz ve arazi çalışmalarında bize her imkânı sunan, kıymetli görüşlerini ve bilgisini bizden hiçbir zaman esirgemeyen, bizi her zaman daha iyisini yapmaya motive eden sayın hocam Prof. Dr. Ali A. Dönmez'e,

Biyoinformatik analizler konusunda destekleri için çalışma arkadaşım Dr. öğrencisi Yasin Kaya'ya ve özellikle paleo-poliploidinin zaman tahminlemesi analizlerinde çok destek olan ve aynı zamanda kullanılan programın yazarı Dr. Öğrencisi Hengchi Chen'e

Her zaman bana destek olan ve beni hep motive eden hocalarım Doç. Dr. Esin Akbay Çetin ve Dr. Öğretim Üyesi Handan Sevim Akan'a

Laboratuvar işleri ve biyoinformatik analizler dahil olmak üzere bütün basamaklarda yanımda olan ve kendilerinden güç bulduğum çok kıymetli yakın arkadaşlarım ve aynı zamanda ekip arkadaşlarım, başta Gamze Kavak olmak üzere Mirac Eyüpoğlu, Buğra Kaan Çetiner ve MOBİS özel çalışma öğrencilerine,

Lisans yıllarımdan beri yanımda olan, bana her zaman her koşulda destek olan, varlığıyla bana güç veren dostum Melike Tunçer Bilir'e ve Mustafa Karaca'ya,

118Z708 no'lu projeyi maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a

Teşekkürün ve hayranlığın en büyüğünü hak eden AİLEM'e, annem, babam ve canım ikizim Lara'ya, bana lisansüstü eğitimim boyunca her anlamda destek olan Başaran ailesine ve yanımda olan herkese teşekkürü bir borç bilirim.

İlayda Gülmez

2025, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 <i>Polygalaceae</i> Familyasının Genel Özellikleri	2
1.2 <i>Polygala</i> Cinsinin Genel Özellikleri	3
1.3 <i>Polygala vulgaris</i> Türünün Genel Özellikleri ve Yayılışı	5
1.4 <i>Polygalaceae</i> Familyasında ve <i>Polygala</i> Cinsinde Sitogenetik Veriler	9
1.4.1 <i>Polygala vulgaris</i> Türünde Sitogenetik Veriler	13
1.5 Poliploidi	14
1.5.1 Bitkilerde Poliploidi	16
1.6 Poliplodinin Tespit Edilme Yöntemleri	17
1.6.1 Laboratuvar Yöntemleriyle Tespiti	17
1.6.2 Yüksek Hacimli DNA Verisi Kullanılarak Tahmin Edilmesi	19
2. MALZEMELER VE YÖNTEMLER	23
2.1 DNA İzolasyonu İçin Taze Bitki Yaprığı Eldesi	23
2.1.1 Tohum Çimlendirme Çalışmaları	23
2.2 Genomik DNA Ekstraksiyonu	25
2.3 Genomik DNA Miktar Ölçümü	26

2.4 Yüksek Hacimli DNA Verisinin Analizi	27
2.4.1 Genomik DNA Verilerinin Yeni Nesil DNA Dizileme Platformunda Dizilenmesi	29
2.4.2 Yüksek Hacimli DNA Verisinin Temizlenmesi	29
2.4.3 Genom Düzenleme (Correction)	34
2.4.4 Genom Boyutu Tahminleme	34
2.4.5 Heterozigotluk Tahmini	35
2.4.6 Genom Montajı Öncesi İşlemler	35
2.4.7 Genom Montajlama (<i>de novo</i> Assembly)	35
2.4.8 Parlatma (Polishing) Basamağı	36
2.4.9 Genom Montajı (Assembly) Sonrası Analiz İşlemleri	37
2.4.10 Hareketli Elementlerin Bulunması	37
2.4.11 Poliploidi Analizleri	38
2.4.11.1 Paleopoliploidi Zamanı Tahmini	38
2.4.11.2 Duplikasyon Çeşitlerinin Tespit Edilmesi	40
2.4.11.3 Poliploid Türün Ortaya Çıkış Zamanı	41
3. SONUÇLAR	43
3.1 Taksonların Genom Yapıları	43
3.1.1 Genom Boyutu Tahminleme ve Heterozigotluk Hesaplamaları	50
3.1.2 Genom Montajı (Assembly) Kalitesi	57
3.2 Genom Anotasyonu	59
3.2.1 Hareketli Elementler	59
3.2.2 Poliploidi Analizleri	64
3.2.2.1. Paleopolidi Zamanı Tahmini	64
3.2.2.2. Poliploid Türün Ortaya Çıkış Zamanı	69

3.2.2.3. Duplikasyon Çeşitlerinin Tespit Edilmesi	71
4. TARTIŞMA	73
4.1 <i>k</i> -mer ve <i>k</i> -mer Tabanlı Olmayan Programların Karşılaştırılması	73
4.2 Akış Sitometri Yöntemi ile Karşılaştırma	74
4.3 Poliploidi ve Transpozon İlişkisi	76
4.4 Poliploidinin Kökeni ve Gerçekleşme Zamanı	78
4.5. <i>Polygala vulgaris</i> Türünün Ortaya Çıkış Zamanı	82
4.6. <i>Polygala vulgaris</i> Türünde Tespit Edilen Duplikasyon Çeşitleri	83
5. SONUÇ	83
6. KAYNAKLAR	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Polygala tenuifolia</i> 'ya ait karşılaştırmalı gen ağacı	2
Şekil 1.2. <i>Polygala vulgaris</i> 'in Dünya'daki yayılışı	6
Şekil 1.3. <i>Polygala vulgaris</i> 'in Türkiye'deki güncel yayılışı	7
Şekil 1.4. <i>Polygala vulgaris</i> 'in genel görünüşü	8
Şekil 1.5. <i>Polygala vulgaris</i> 'in çiçek ve meyve yapısı	9
Şekil 1.6. <i>Polygala</i> taksonlarına ait temel kromozom sayısını gösteren histogram	12
Şekil 1.7. Poliploidinin türleşmeyle ilişkisini anlatan genel şema	15
Şekil 1.8. Soya fasülyesinde poliploidinin genel şeması ve avantajları	16
Şekil 2.1. <i>Polygala vulgaris</i> (A.A. Dönmez 20628) örneğine ait 3 farklı tohumun çimlenmesiyle elde edilen taze yapraklar	24
Şekil 2.2. Genomik DNA ekstraksiyonunun basamakları	25
Şekil 2.3. Biyoinformatik analizlerin genel akış şeması	28
Şekil 2.4. <i>Polygala vulgaris</i> 'e ait ham veriler	30
Şekil 2.5. Örneklerin FastQC raporları	33
Şekil 3.1. Filtreleme işlemi sonrası adaptör ve düşük okumalardan arınmış veriler	47
Şekil 3.2. <i>Polygala vulgaris</i> bireylerinin optimum <i>k</i> -mer sayıları	50
Şekil 3.3. Örneklerin SGA ile elde edilen genom boyut tahminleri	53
Şekil 3.4. Örneklerin genom heterozigotluk seviyeleri	56
Şekil 3.5. Örneklerin BUSCO sonuçlarıyla elde edilen genom montajı kaliteleri ..	58
Şekil 3.6. Beş bireye ait hareketli element içeriklerinin grafikte gösterimi	64
Şekil 3.7. AAD20628_1 numaralı bireye ait poliploidi analizleri	66

Şekil 3.8. AAD20628_8 numaralı bireye ait poliploidi analizleri	67
Şekil 3.9. AAD20628_9 numaralı bireye ait poliploidi analizleri	68
Şekil 3.10. AAD20896_1 numaralı bireye ait poliploidi analizleri	69
Şekil 3.11. AAD20896_2 numaralı bireye ait poliploidi analizleri	70
Şekil 3.12. <i>Polygala</i> ve Kapalı tohumlu taksonların ortolog genlerine dayalı soy ağacı	71
Şekil 3.13. Duplikasyon çeşitleri analizi	73
Şekil 4.1. Otopoliploidi ve allopoliploidide <i>Ks</i> grafikleri	80
Şekil 4.2. <i>Polygala vulgaris</i> bireylerinde <i>Ks</i> değerlerinin grafiği	81
Şekil 4.3. WGD temelli Yeşil Bitkiler Soy Ağacı	82
Şekil 5.1. Tez çalışmasına konu olan <i>Polygala vulgaris</i> türünün beş bireyinden elde edilen ortalama sonuçlar	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye’de yayılış gösteren <i>Polygala</i> taksonları	4
Çizelge 1.2. <i>Polygala</i> taksonlarına ait literatüre dayalı diploid ($2n$) kromozom sayıları	10
Çizelge 1.3. Kew Science Plant DNA C-values Database’ den alınan <i>Polygala</i> taksonlarına ait çekirdek DNA içeriği (2C değeri)	13
Çizelge 2.1. Tezde kullanılan bireylerin lokalite bilgileri.....	23
Çizelge 2.2. İklimlendirme kabini parametreleri.	24
Çizelge 2.3. Qubit™ 1X dsDNA HS Assay sonuçları	26
Çizelge 2.4. Yeni nesil dizileme için gönderilen örneklerin QC (kalite) raporları ...	29
Çizelge 2.5. Ortolog genlere dayalı gen ağacında kullanılan örnekler.....	42
Çizelge 3.1. Dizileme sonrası istatistikler	43
Çizelge 3.2. Filtreleme sonrası istatistikler	44
Çizelge 3.3. Beş bireyde genom boyutu tahminleme programlarının karşılaştırmalı sonuçları.....	56
Çizelge 3.4. Çalışılan örneklerin genom montajı (assembly) basamağı sonrası istatistikleri.....	58
Çizelge 3.5. Örneklerle ait hareketli element içerikleri, alt sınıfları ve yüzdeleri	61
Çizelge 3.6. Tez çalışmasında kullanılan bireylerde ve <i>P. tenuifolia</i> ’da bulunan duplikasyon çeşitleri sayıları.....	72
Çizelge 4.1. <i>Polygala vulgaris</i> ile başka örneklerin genom boyutlarının k -mer ve FCM sonuçlarının karşılaştırılması	76
Çizelge 4.2. <i>Polygala vulgaris</i> ve diğer bazı bitkilerin ploidi seviyesi ve yüzde transpozon içeriği	78

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μL Mikrolitre

Kısaltmalar

AAD Ali A. Dönmez (Bitki Örnek Kodu)

Eski Dünya Kladı EDK

FCM Akış Sitometri

Hareketli Element HE

Metre m

MYÖ Milyon Yıl Önce

rpm Dakikadaki Devir Sayısı

TE Transpoze Elementler

Yeni Dünya Kladı YDK

YHD Yüksek Hacimli DNA

YND Yeni Nesil Dizileme

1. GİRİŞ

Poliploidi, canlıya ait bir hücrenin ikiden fazla tam kromozom seti taşıma durumu olarak tanımlanmaktadır ve yeryüzündeki bitki çeşitliliğini etkileyen temel faktörlerden biridir. Dünyadaki hemen hemen tüm bitki soylarının genomlarının yapısına yansıyan, evrimlerinde birkaç poliploid olaya maruz kaldığı tahmin edilmektedir. Bitkilerde, poliploidizasyon olaylarının hem laboratuvarda akış sitometri ve klasik kromozom sayma yöntemleriyle hem de biyoinformatik analizlerle tespit edilmesi mümkündür.

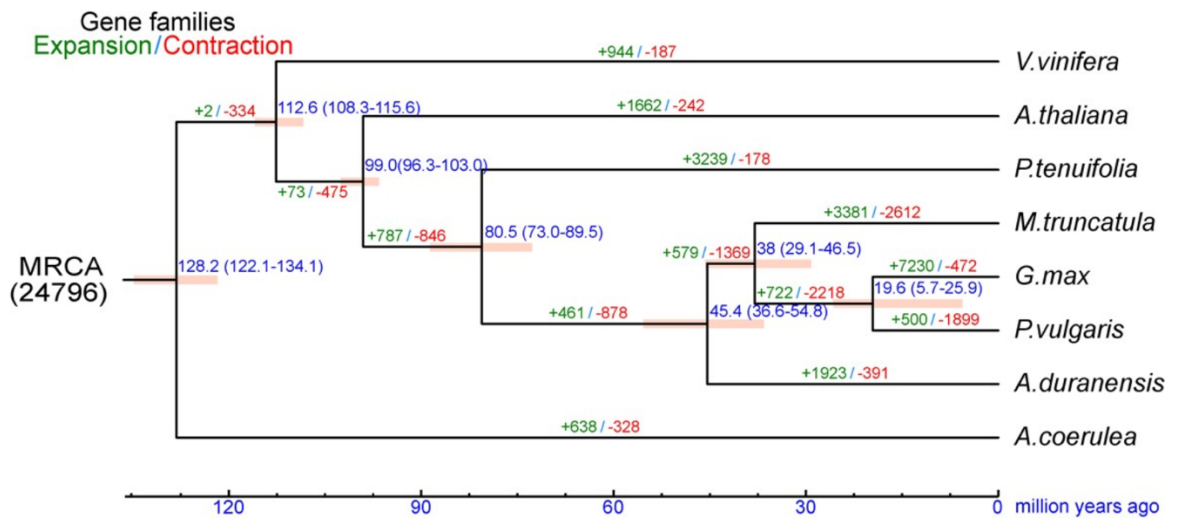
Bu tez çalışmasının amacı, kromozom sayımı ve akış sitometri yöntemleriyle tetraploid olduğu tespit edilen *Polygala vulgaris* L. türüne ait iki popülasyonun ploidi seviyesini, genom boyutunu ve poliploidizasyon olaylarını, yüksek hacimli DNA (YHD) verisiyle gerçeğe en yakın biçimde tahmin etmektir. Biyoinformatik analizlerde kullanılan YHD verisi, ileri nesil DNA dizileme yöntemiyle elde edilmiştir. Bu hedefi gerçekleştirmek amacıyla tetraploid iki popülasyona ait beş bireyin YHD verisi üzerinde k -mer temelli ve k -mer temelli olmayan analizler yapılmış ve elde edilen heterozigotluk düzeyleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca, YHD verisiyle genom boyutu tahminlemesi yapılarak akış sitometrisi ile belirlenen çekirdek DNA boyutuyla karşılaştırılmıştır. Genomda bulunan hareketli element sınıf ve yüzde içerikleri tespit edilerek genom karakterizasyonu yapılmıştır. Daha ileri analizlerle, her bireyin bugüne kadar geçirdiği poliploidi olayları, bu olayların zamanı ve tüm genom duplikasyonu haricindeki duplikasyon çeşitleri analiz edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında türün yaklaşık ortaya çıkma zamanı da hesaplanmıştır.

Tez çalışmasında uygulanan metod, elde edilen sonuçlar ve mevcut literatürle tartışma kısmına geçmeden önce türün sahip olduğu güncel taksonomi ayrıntılandırılmıştır. Bunun yanı sıra poliploidi başlığı altında cinsin ve türün sitogenetik özellikleri hakkında bilgi verilmiş ve poliplodi çalışmalarında YHD verisinin kullanımının sağlayabileceği avantajlar sırasıyla aşağıda açıklanmıştır.

1.1. *Polygalaceae* Familyasının Genel Özellikleri

Polygalaceae familyası APG sistemine göre *Fabales* takımı içerisinde yer alır, dört tribusa ayrılan bu familya, 29 cins altında ve 1200 türden oluşmaktadır [1]. Arktik zonlar, Antarktika ve Yeni Zelanda dışında kozmopolit yayılış gösteren bir familyadır. Yaklaşık 1200 tür içeren *Polygalaceae*, *Fabales* takımı içerisinde takson sayısı bakımından *Fabaceae* familyasından sonra gelmektedir [2,3].

Polygalaceae familyası moleküler çalışmaların öncesinde, zigomorfik çiçeklere sahip olmasından dolayı *Fabaceae* familyası ile benzer görülmüş ancak bu benzerlik morfolojik gözleme dayalı olarak kalmıştır. *Polygalaceae* familyası zaman içerisinde *Malpighiales* veya *Polygales* takımları altında *Krameriaceae*, *Trigoniaceae*, *Vochysiaceae*, *Tremandraceae* ve *Malpighiaceae* familyaları ile birlikte sınıflandırılmıştır. Moleküler sistematik çalışmalarının yürütülmesi ile beraber *Polygalaceae* familyasının *Fabaceae* familyası ile taksonomik olarak yakın olduğu tespit edilmiş ve *Polygalaceae* APG l'de *Fabales* takımının altına alınmıştır [4]. *Polygala* cinsi içerisinde yakın zamanda *P. tenuifolia* Willd. türünün *Fabaceae* taksonlarıyla olan ayrılma zamanları uzun okumaları genom bilgisine dayalı olarak hesaplanmıştır (Şekil 1.1) [5].



Şekil 1.1. *Polygala tenuifolia*'ya ait karşılaştırmalı gen ağacı [5].

Gen ağacındaki yeşil ve kırmızı sayılar, sırasıyla genişlemiş ve daralmış gen ailelerinin sayısını göstermektedir. Evrim düğümlerinin etrafındaki mavi sayılar ise türün (milyon yıl önce) ayrışma zamanını temsil etmektedir. Bu verilere göre *P. tenuifolia* ve *Fabaceae* familyası arasındaki zaman farkının 73-89 MYÖ olduğu tahmin edilmiştir.

1.2. *Polygala* Cinsinin Genel Özellikleri

Yaklaşık 580 tür içeren, *Polygala* L., *Polygaleae* (*Polygalaceae*, *Fabales*) tribusu içindeki en çok tür içeren cinstir [6]. İlk taksonomik sınıflandırmayı Candolle (1824), bu cinsi sekiz ayrı seksiyona ayırarak yapmıştır. İlk kapsamlı taksonomik sınıflandırma çalışması Chodat (1891) tarafından yapılmış ve seksiyonlar, alt seksiyonlar, seriler ve alt serileri içeren, o güne kadar bilinen tüm *Polygala* taksonları için cins altı bir sınıflandırma önerilmiştir. Başlangıçta, Chodat (1891) *Polygala*'yı on iki alt seksiyona ayırmış, 1893'te adlandırma çalışmalarını gerçekleştirmiştir. Daha sonra (1896) birkaç başka seri ve alt seksiyonu tanımlamış, familyayı *Polygaleae*, *Moutabeae* Chodat, *Xanthophylleae* Baill olmak üzere üç ayrı tribusa ayırmıştır [7]. Sonrasında, araştırmacılar bazı taksonomik düzenlemeler gerçekleştirmiş, Eriksen (1993) *Carpolobieae* tribusunu eklemiş böylece familyanın tribus sayısı dörde yükselmiştir [8]. Uluslararası Alg, Mantar ve Bitki Adlandırma Yasası'nda yer alan güncelleme ile *Moutabeae* tribusunun ismi *Diclidanthereae* Reveal olarak değiştirilmiştir [9].

Polygala cinsi polifiletiktir ve filogenetik analizlere dayalı olarak, Yeni Dünya Kladı (YDK), Eski Dünya Kladı (EDK) ve üçüncü olarak *Polygala* subg. *Chodatia* Paiva olarak iyi desteklenmiş üç klada bölünmüştür [6,10,11]. Ancak son zamanlarda Yeni Dünya *Polygala* taksonları yeni cins altında kabul edilmektedir [12]. Ülkemizde, yedisi Türkiye'ye endemik olmak üzere OWC'ye ait 20 *Polygala* türü bulunmaktadır [13-16].

Türkiye Florası'na göre *Polygalaceae* familyası, ülkemiz için yalnızca *Polygala* cinsi ile temsil edilmektedir. Avrupa florasında yer alan 33 farklı *Polygala* türünün yedi tanesinin Türkiye'de de yayılış gösterdiği belirtilmiştir [17]. Flora Orientalis'te *P. monspeliaca* L., *P. alpestris* Rchb., *P. comosa* Schkuhr. gibi bazı türlerin ülkemiz ve çevre coğrafi bölgelerde yayılış

gösterdiği belirtilmiştir [18]. Türkiye’de yayılış gösteren *Polygala* taksonları Çizelge 1.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Türkiye’de yayılış gösteren *Polygala* taksonları.

1- <i>Polygala myrtifolia</i> L. Sp. Pl. 703 (1753). Kültür Bitkisi
2- <i>P. supina</i> Schreb., Icon. Descr. Pl. [Schreber] 19, t. 19 (1766)
3- <i>P. stocksiana</i> Boiss., Diagn. ser. 2(1): 59 (1853).
4a- <i>P. pruinosa</i> Boiss., Diagn. ser. 1(1): 8 (1843) emend. Diagn. ser. 2(1): 58 (1853). subsp. <i>pruinosa</i>
4b- <i>P. pruinosa</i> Boiss., Diagn. ser. 1(1): 8 (1843) emend. Diagn. ser. 2(1): 58 (1853) subsp. <i>megaptera</i> Cullen in Notes R.B.G. Edinb. 25: 46 (1963). ENDEMİK
5- <i>P. venulosa</i> Sm. in Sibth. & Sm., Fl. Graec. Prodr. 2: 52 (1813).
6- <i>P. major</i> Jacq., Fl. Austr. 5: 6 (1778).
7- <i>P. anatolica</i> Boiss. & Heldr., Diagn. Pl. Orient. ser. 2, 1: 57 (1854).
8- <i>P. transcaucasica</i> Tamamschian, Feddes Rep. 39: 325 (1935-36).
9- <i>P. papilionacea</i> Boiss., Diagn. Pl. Orient. ser. 1: 8 (1843)
10- <i>P. inexpectata</i> Peşmen & Erik, Notes R.B.G. Edinb. 38:435 (1980). ENDEMİK
11- <i>P. hohenackeriana</i> Fiseh. & C.A.Mey. In Index Sem. Hort. Petrop. 4:42 (1838).
12- <i>P. comosa</i> Schkuhr, Bot. Handb. 2: 324 (1796).
13- <i>P. vulgaris</i> L, Sp. Pl. 702 (1753).
14- <i>P. alpestris</i> Reichenb., Iconogr. Bot. Pl. Crit.1: 25 (1823)
15- <i>P. peshmenii</i> Eren et al. Bot. J. Linn. Soc., 158, 82–86 (2008). ENDEMİK
16- <i>P. turcica</i> Dönmez & Uğurlu, Willdenowia 45: 430 (2015). ENDEMİK
17- <i>P. monspeliaca</i> L, Sp. Pl. 702 (1753)
18- <i>P. azizsancarii</i> Dönmez, Phytotaxa 340 (3), 255-262 (2018). ENDEMİK
19- <i>P. fadimeana</i> Dönmez & Çeçen Nordic Journal of Botany, (2023). ENDEMİK

Polygala cinsinde yaprak basit ve stipulasız, spiral dizilmiştir. Çiçek salkımı terminal veya aksiller, basit salkım şeklindedir. Kaliks-korolla düzensizdir. Sepaller 5 tane ve serbest, içte 2 tanesi geniş ve petaloid, dışta 3 tanesi küçük ve sepaloid. Petaller 3 tane, $\pm$ birleşik ve bir staminal tüple birlikte gelişmiştir. Stamenler monadelphous, 8 adettir. Anterler porlarla açılır. Kapsül 2-hücreli, basık, genellikle kanatlı. Tohumlar arillat, her bir lokülde 1'er adet, tüylü veya tüysüz olabilir [19].

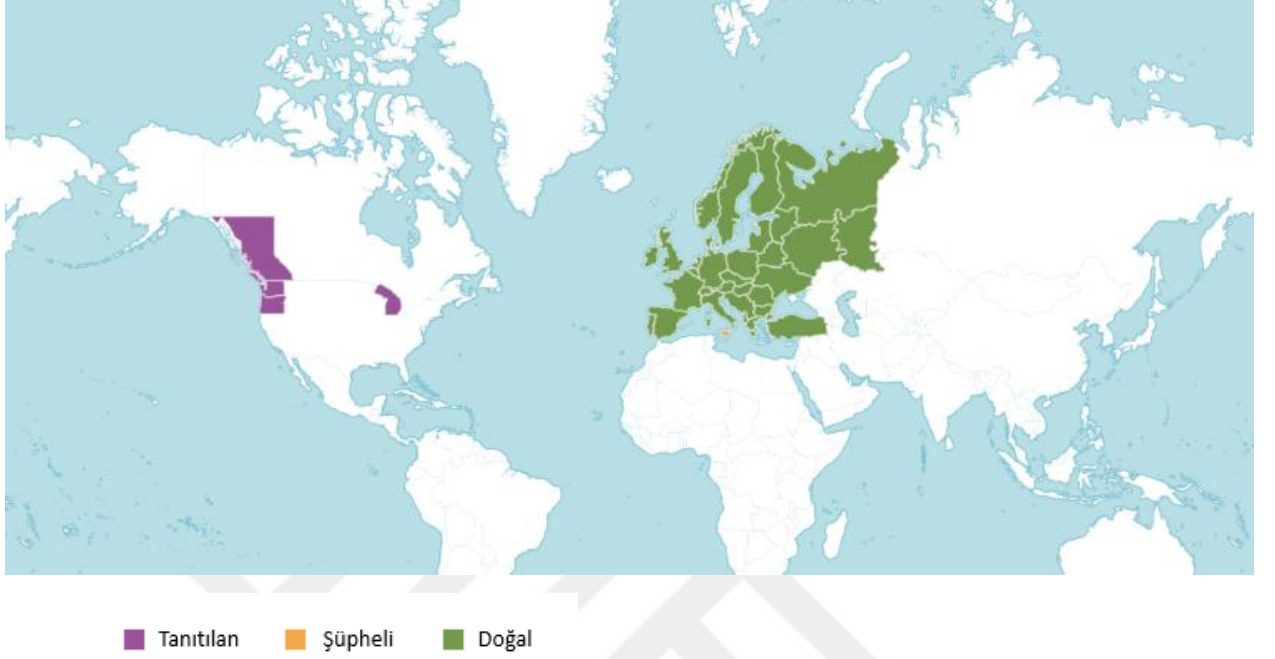
Polygala cinsinde bulunan saçak şeklindeki çiçek yapısı, tozlaşmada etkin rol oynamaktadır. Tozlaştırıcının özellikle arılar olduğu bilinmektedir ve saçak yapısının tozlaştırıcılar için nektara erişimin önemli bir etkeni olduğu düşünülmektedir [20,21].

Polygala türlerinin kökleri ve toprak üstü kısımları dünya genelinde farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Farklı lokalitelerde kullanılan türler arasında *P. tenuifolia*, *P. senega* L. ve *P. sibirica* L.'nin kökleri en popüler olanlarıdır [22]. Bu cinse ait türler nadiren yiyecek veya içecek için de kullanılmaktadır. Örneğin, *Polygala arillata* var. *revoluta* G. S. Giri'nin kökleri Nepal'de alkollü içecekleri fermente etmek için kullanılmaktadır [23]. *Polygala* cinsinde ülkemizde de *Polygala azizsancarii* Dönmez, *P. peshmenii* Eren ve *P. inexpectata* Peşmen & Erik üzerinde fitokimyasallar çalışılmış ve etkinlikleri gösterilmiştir [22,24].

1.3. *Polygala vulgaris* Türünün Genel Özellikleri ve Yayılışı

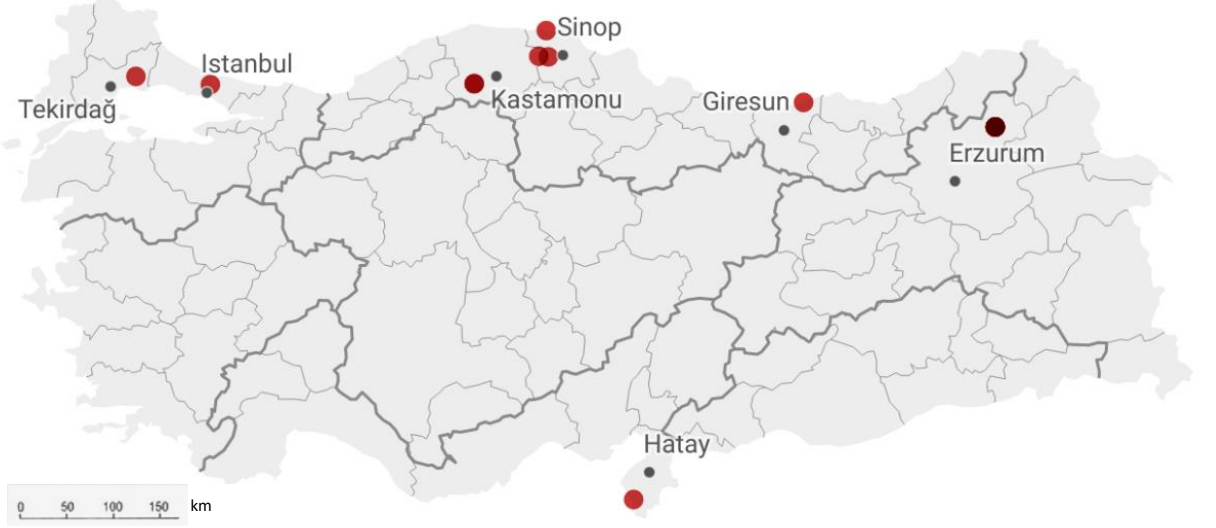
Polygala vulgaris, Avrupa Sibiryaya fitocoğrafik bölgesinde Avrupa'nın hemen her yerinde yayılış gösteren bir türdür (Şekil 1.2). Bu tür, Türkiye'de Marmara, İç Anadolu, Karadeniz ve Doğu Anadolu Bölgesi'nde yayılış göstermektedir. Türün geniş yayılış alanına istinaden herhangi yok edici bir tehdit söz konusu değildir. Ayrıca türün hayvan yemi olarak veya başka bir kullanımı da olmadığı

için bozkır açıklıklarında herhangi bir tehlikeye maruz kalmadan varlığını sürdürmektedir.



Şekil 1.2. *Polygala vulgaris* türünün Dünya'daki yayılışı (KEW, 2023).

Polygala cinsinin taksonomik revizyonuna ilişkin tamamlanan proje (TÜBİTAK-KBAG 118Z708) kapsamında ülkemizdeki tür yayılış bilgisi güncellenmiştir. Buna göre bu takson özellikle Karadeniz bölgesinde yayılış göstermektedir (ekil 1.3).



Şekil 1.3. *Polygala vulgaris* türünün Türkiye'deki güncel yayılışı. Kırmızı noktalar örneklerin toplandığı lokaliteyi, siyah noktalar şehirlerin merkezini temsil etmektedir.

Türün genel morfolojik özellikleri Şekil 1.4 A'da gösterilmiştir ve genel olarak aşağıdaki biçimde sıralanabilir:

Çok yıllık otsu bitki, 30 cm'ye kadar boylanır. Gövde dik ya da serilici, oluklu ve çizgili, tabandan çok dallanmış, genellikle ince tüylü, nadiren tüysüz. Yapraklar alternat, sapsız; gövde yaprakları 15–25 × 1–3 mm, ipliksi, şeritsi, nadiren dar eliptik, kenar düz ya da içe kıvrık, tepesi siviri ya da küt. Çiçekkurulu 5–15 cm, üstte gevşek başak halinde; tepede koma bazen görülür; çiçekler mor-mavi. Brakteler 2–2.5 × 0.3–0.6 mm, genellikle pedisellerden kısa, mızraksı, genellikle tüysüz, dökülücü; brakteoller 0.5–1 × 0.2–0.4 mm, şeritsi-mızraksı, tüysüz, dökülücü. Pediseller 1.5–2 mm, tüysüz. Çiçekler mavi, pembe veya nadiren beyaz, yatay ya da sarkık. Dış çanak yaprakların alttaki ikisi eşit 3–4 × 0.3–0.6 mm, tüysüz, bazen kenarda kirpikli; üst dış çanak yaprak kısmen dizsi, 4–5 × 0.7–1 mm, mızraksı ya da yumurtamsı, tüysüz, bazen kenarı kirpikli; iç sepaller petalsi, mavi, pembe veya nadiren beyaz; 5–9 × 3–5 mm, kapsülden uzun, eliptik, tüysüz bazen damarlarda ve kenarda kirpikli, tabandan çıkan 3 damar genellikle anastomozlu. Korolla açık ya da koyu mavi-mor; üst petaller 5–7 × 2–4 mm, eliptik; alt petal 4–5 mm, tepede ibikli. Ovaryum 2.3–3.5 × 2–3 mm. Kapsül 5–5.5 × 3.5–4 mm, sapsız veya kısa saplı, kalpsi, emarginat, damarlı, anastomozlu,

kanatlı. Tohumlar $2.5-3 \times 1-1.2$ mm, elipsoid, uzun batıcı tüylü; karunkul iki-üç loblu. Türün çiçek ve meyve görüntüsü Şekil 1.5'te verilmiştir.



Şekil 1.4. **A.** *Polygala vulgaris* türünün genel görünüşü **B.** Çiçek kurulu ve ayrıntılı çiçek görüntüsü (Fotoğraflar: Ali A. Dönmez).



Şekil 1.5. *Polygala vulgaris*'in çiçek ve meyve yapısı **A.** Türev çiçek yapısı **B.** Türev meyve yapısı (Fotoğraflar: Ali A. Dönmez).

1.4. *Polygalaceae* Familyası ve *Polygala* Cinsinde Sitogenetik Veriler

Polygalaceae karyolojik durum bakımından oldukça değişkenlik göstermektedir. Familyaya ait temel bir kromozom sayısı belirtilmemektedir [25]. *Polygala* cinsinde yer alan bazı taksonların kromozom sayıları Çizelge 1.2'de verilmiştir.

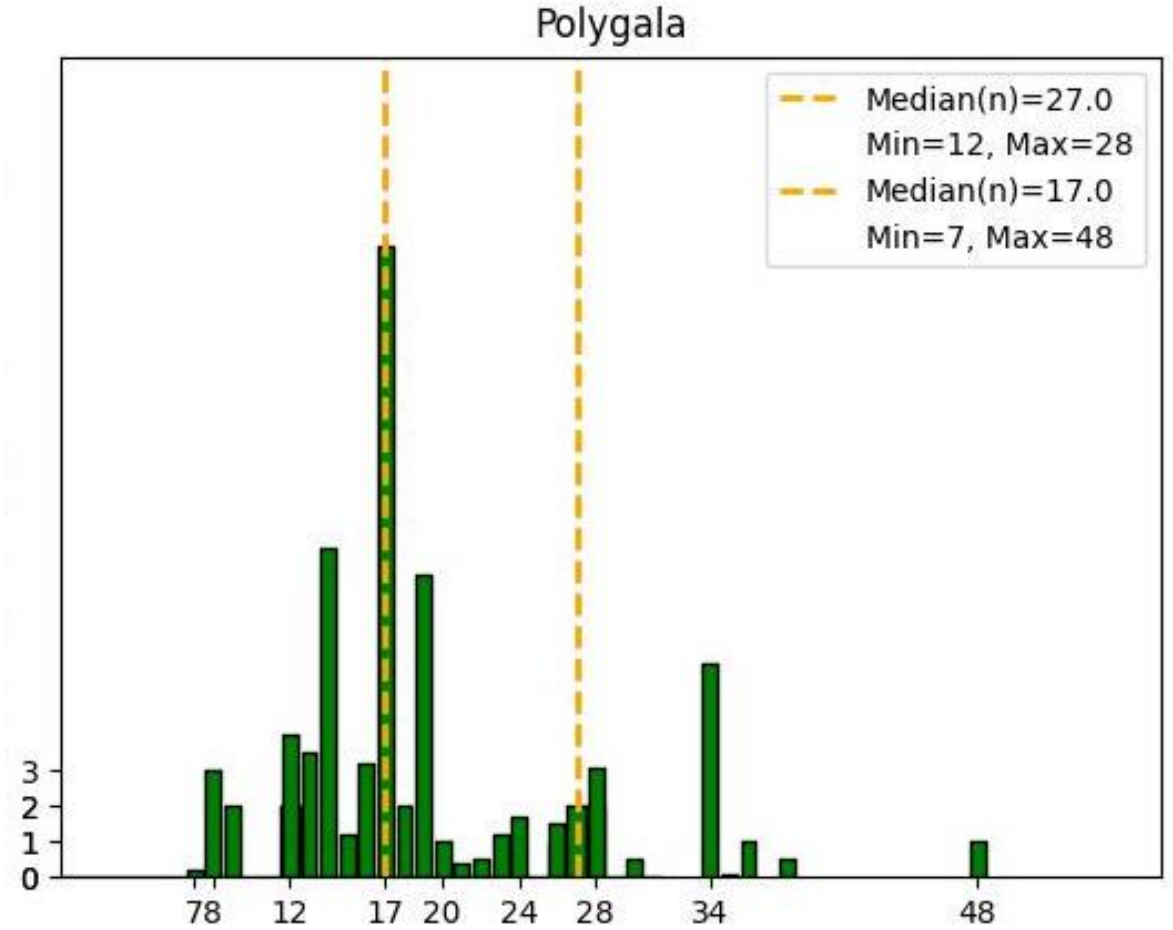
Çizelge 1.2. *Polygala* taksonlarına ait literatüre dayalı diploid ($2n$) kromozom sayıları [26].

Takson Adı	Kromozom Sayısı ($2n$)	Kaynak
<i>Polygala abyssinica</i> R. Br. Ex Fresen.	38	Sharma & Mehra, 1978
<i>P. alba</i> Nutt.	24	Löve, Á., 1983
<i>P. alpestris</i> Rchb.	34	Merxmüller & Heubl, 1983
<i>P. alpina</i> (DC.) Steud.	34	Merxmüller & Heubl, 1983
<i>P. amara</i> L.	28	Glendinning, 1960
<i>P. amara</i> subsp. <i>Brachyptera</i> Hayek	34	Merxmüller & Heubl, 1983
<i>P. amarella</i> Crantz	34	Merxmüller & Heubl, 1983
<i>P. anatolica</i> Boiss. & Heldr.	32	Löve, Á., 1988
<i>P. apiculata</i> Porta	24	Peruzzi ve ark., 2005
<i>P. boliviensis</i> A. W. Benn.	18	Marhold ve ark., 2019
<i>P. boykinii</i> Nutt.	28	Cave, M. S., 1963
<i>P. calcarea</i> F. W. Schultz	34	Glendinning, 1960
<i>P. carueliana</i> (A. W. Benn.) Caruel	16	Bechi ve ark., 1996
<i>P. chamaebuxus</i> L	44	Cave, 1959
<i>P. nuttallii</i> Torr. & A. Gray	46	Lewis & Davis, 1962
<i>P. chapmanii</i> Torr. & A. Gray	72	Cave, M. S., 1963
<i>P. chinensis</i> L.	48	Löve, Á., 1967
<i>P. comosa</i> Schkuhr	34	Merxmüller & Heubl, 1983
<i>P. crotarioides</i> B. -Ham. Ex DC.	28	Sharma & Mehra, 1978
<i>P. cruciata</i> L.	36	Lewis & Davis, 1962
<i>P. curtissii</i> A. Gray	40	Lewis & Davis, 1962
<i>P. dolichocarpa</i> S. F. Blake	16	Löve, Á., 1983
<i>P. erioptera</i> DC.	48	Khatoon, S. & S. I. Ali., 1993
	76	Sharma & Mehra, 1978
<i>P. fishiae</i> Parry	18	Ornduff, 1968
<i>P. flavescens</i>	22	Peruzzi ve ark., 2017
<i>P. grandiflora</i> Walter	28	Lewis & Davis, 1962
<i>P. longifolia</i> Poir.	38	Sharma & Mehra, 1978

<i>P. lutea</i> L.	68	Lewis & Davis, 1962
<i>P. macrostigma</i> Chodat	28	Moore, R.J., 1977
<i>P. major</i> Jacq.	34	Letz ve ark., 1999
<i>P. mariana</i> Mill.	34	Lewis & Davis, 1962
<i>P. microphylla</i> L.	32	Zapatero & Rosello, 1985
<i>P. monspeliaca</i> L.	38	Moore, R.J., 1977
<i>P. multiflora</i> Poir.	52	Federov, 1974
<i>P. myrtifolia</i> L.	38	Glendinning, 1960
<i>P. nana</i> DC.	68	Lewis & Davis, 1962
<i>P. nicaeensis</i> Risso ex W. D. J. Koch	34	Lewis & Davis, 1962
<i>P. nuttallii</i> Torr. & A. Gray	46	Lewis & Davis, 1962
<i>P. ovatifolia</i> A. Gray	56-60	Lewis & Davis, 1962
<i>P. paniculata</i> L.	52-56	Federov, 1974
<i>P. paucifolia</i> Willd.	34	Löve, Á., 1982
<i>P. polygama</i> Walter	56	Lewis & Davis, 1962
<i>P. praetervisa</i> Chodat	96	Cave, M. S., 1963
<i>P. ramosa</i> Elliott	68	Lewis & Davis, 1962
<i>P. reducta</i> S. F. Blake	30	Lewis & Davis, 1962
<i>P. rivularis</i> Gürke	24	Moore, R.J., 1977
<i>P. rugelii</i> Shuttlew. Ex A. Gray	68	Lewis & Davis, 1962
<i>P. rupestris</i> Pourr.	34	Dahlgren, 1971
<i>P. scoparia</i> Kunth	16	Lewis & Davis, 1962
<i>P. scoparioides</i> Chodat	34	Lewis & Davis, 1962
<i>P. senega</i> L.	34	Löve, Á., 1982
<i>P. serpyllifolia</i> Hosé	34	Glendinning, 1960
<i>P. sibirica</i> L.	42	Stepanov, 1992
<i>P. stenopetala</i> Klotzsch	26	Moore, R.J., 1977
<i>P. tenuifolia</i> Willd.	34	Fu ve ark., 2007
<i>P. triflora</i> L.	38	Federov, 1974
<i>P. tweedyi</i> Britton ex Wheelock	~28	Lewis & Davis, 1962
<i>P. vayredae</i> Costa	?	Lewis & Davis, 1962
<i>P. vergrandis</i> W. H. Lewis	24	Löve, Á., 1983
<i>P. verticillata</i> L.	34	Löve, Á., 1982

<i>P. vulgaris</i> L.	28, 32, ~56, 68	Lewis & Davis, 1962 Merxmüller & Heubl, 1983
-----------------------	--------------------	---

Kromozom Sayısı Veri Tabanı'ndan alınan ve *Polygala* cinsine ait kromozom sayılarının oluşturduğu histograma göre $2n=48-78$ sayıları arasında değişmekle birlikte temel kromozom sayısı $n=17$ 'dir (Şekil 1.6). Cins içerisinde en yüksek kromozom sayısı $2n=96$ ile *P. praetervisa* 'da, en düşük kromozom sayısı ise $2n=16$ ile *P. dolichocarpa* ve *P. scoparia* taksonlarında gözlemlenmiştir (Çizelge 1.2).



Şekil 1.6. *Polygala* taksonlarına ait temel kromozom sayısını gösteren histogram [26].

Polygala cinsine ait hem kromozom sayımı hem de akış sitometri analizi olan fazla sayıda çalışma yapılmadığı görülmüştür. İngiltere'de yayılış gösteren bireylerin genetik ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada (1988), *Polygala vulgaris*

türünün diploid ve tetraploid bireylerinin çevresel faktörlerden etkilenme seviyeleri morfolojik özellikleri karşılaştırılarak araştırılmış ve poliploidinin çevresel faktörlere uyum sağlamada yardımcı olduğu belirtilmiştir [27].

Cinse ait kromozom sayı tespitinin yanı sıra genom boyutunu belirlemede akış sitometri yöntemi de kullanılmıştır. Genel olarak *Polygala* cinsinde yapılan akış sitometri çalışmalarından elde edilen sonuçlar ise Çizelge 1.3'te verilmiştir [28].

Çizelge 1.3. *Polygala* taksonlarına ait çekirdek DNA içeriği (2C değeri).

Takson Adı	Kromozom Sayısı (2n)	2C Değeri (pg)	Referans
<i>Polygala amara</i> <i>ssp. brachyptera</i>	2n = 34	2C = 0.84	Temsch ve ark., 2010
<i>P. angustifolia</i>	-	2C = 0.85	Horjales ve ark., 2003
<i>P. calcarea</i> cv. Lillet	2n = 30	2C = 0.86	Hanson ver ark., 2005
<i>P. vulgaris</i>	-	2C = 0.89	Horjales ve ark., 2003
<i>P. sanguinea</i>	-	2C = 0.90	Sonnier, 2016
<i>P. microphylla</i>	-	2C = 1.05	Horjales ve ark., 2003
<i>P. major</i>	2n = 34	2C = 1.07	Pustahija ve ark., 2013
<i>P. polygama</i>	-	2C = 1.31	Bai ve ark., 2012
<i>P. supina</i>	-	2C = 1.79	Pustahija ve ark., 2013
<i>P. vayredae</i>	2n = 28	2C = 2.71	Castro ve ark., 2007
<i>P. paucifolia</i>	-	2C = 3.10	Bai ve ark., 2012

Polygala cinsinde 2C değerleri ve kromozom sayıları literatürde bu cinsin hala çok çalışılmadığını göstermektedir. Cins içerisindeki 11 adet türün Genomik DNA içeriği hesaplanmıştır. Bu hesaplama göre 2C değeri 0.84 - 3.10 pg arasında değişmektedir. Buna göre cinsin genom boyutu ortalama 1.367 Mb bulunmuştur. Cins içerisinde kromozom sayısındaki değişkenlik, 2C değerindeki değişkenlikle paralel olarak gözlenmiştir.

1.4.1. *Polygala vulgaris* Türünde Sitogenetik Veriler

Hem literatür taramasında hem de yapılan M. K. Şenova tez çalışmasında [25] *P. vulgaris* türünün farklı sitotiplerinin olduğu bilinmektedir. Bu tez çalışmasında incelenen iki popülasyonun da $2n=68$ kromozom sayısı ile tetraploid olduğu kromozom sayımı ve akış sitometri sonuçlarıyla gözlemlenmiştir.

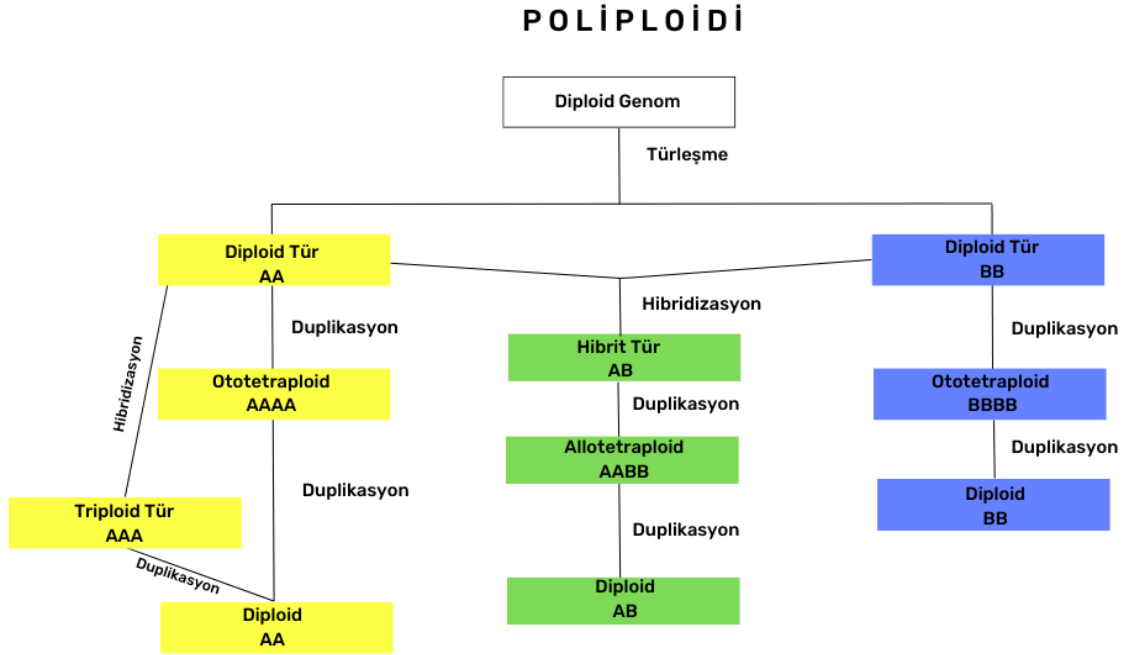
Bu türün akış sitometri verilerinde ploid seviyesinin farklılığından kaynaklı değişkenlikler bulunduğu düşünülmektedir. Kew Science verilerine göre *Polygala vulgaris*'in kromozom sayısı belirtilmese de $2C$ değerinin 0.89 pg olduğu hesaplanmıştır (Çizelge 1.2). Ancak, M. K. Şenova'nın Türkiye'deki Bazı *Polygala* L. (*Polygalaceae*) Taksonlarının Kromozom Sayımı ve Akış Sitometri (Fcm) Teknikleri ile Sitotaksonomisi (2021) tez çalışmasının verilerine göre, AAD20628 numaralı örneğin 3 bireyin kromozom sayısı $2n=68$ ve ortalama $2C$ değeri 1,86 pg ve AAD20896 numaralı 2 bireyin kromozom sayısı $2n=68$ ve ortalama $2C$ değeri 2.05 pg olarak belirtilmiştir [25].

1.5. Poliploidi

Poliploidi (tüm genom duplikasyonu), dünya üzerindeki bitki çeşitliliğini etkileyen ve şekillendiren temel faktörlerden biridir [29]. Dünyadaki hemen hemen tüm bitki soylarının genomlarının yapısına yansıyan, evrimlerinde birkaç poliploid olaya maruz kaldığı tahmin edilmektedir [30,31]. Halihazırda paleo-poliploidizasyonun kalıntılarını taşıyan bitkilerin önemli bir kısmı, geçirilen son poliploidizasyonun etkilerini yaşamaktadır [32].

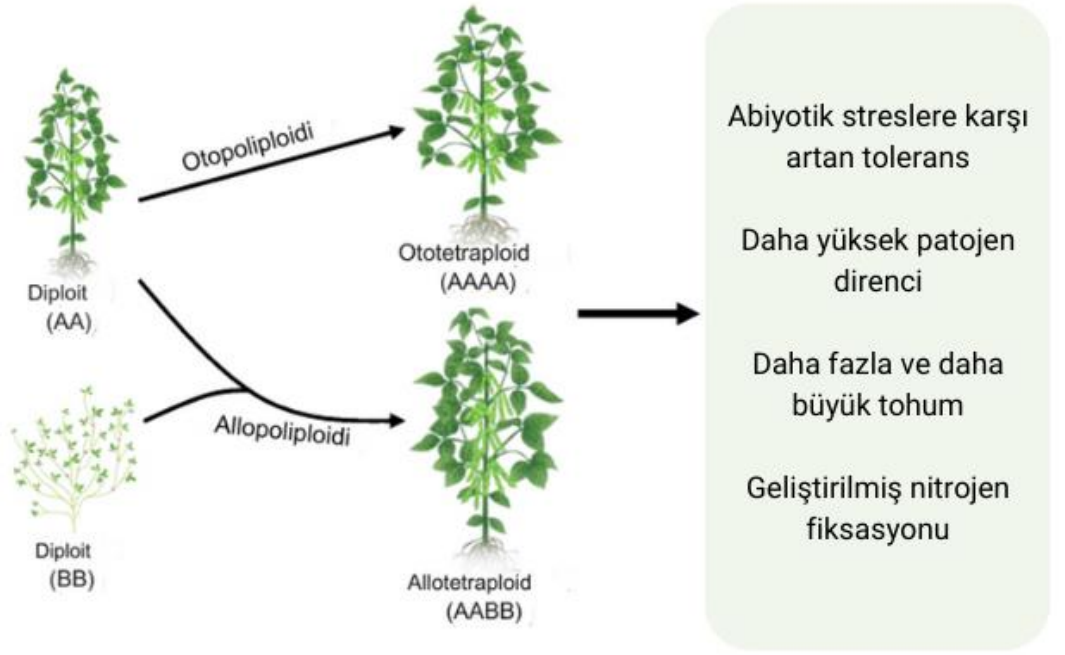
Poliploid oluşumunun ana yolları gametik indirgememe ve somatik ikiye katlamadır [33,34,35]. Gametik indirgenmeme durumunda, en az biri indirgenmemiş, tam somatik kromozom tamamlayıcısı içeren iki gamet, poliploidiye yol açabilir. Zigotik, embriyonik veya sporofitik dokuda somatik ikiye katlanma meydana gelebilir. Bu dokularda rastgele genom çoğalmasından dolayı kopyalanan bölgelerde gamet oluşumu yoluyla, canlı poliploid yavrular da üretilebilmektedir [34].

Poliploidi temel olarak ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan birincisine otopoliploidi, ikincisine ise allopoliploidi denmektedir. Allopoliploidler genellikle otopoliploidlerden daha çeşitli gamet üretmesiyle ayırt edilebilmektedir [36] (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Poliploidinin türleşmeyle ilişkisini anlatan genel şema. (McGregor C., Polyploidy and Its Implications in Plant Breeding, 2012, kitabından uyarlanmıştır.)

Poliploidinin genel avantajları olarak, iki diploid türden oluşan poliploid yavrunun ebeveyn türlerden daha güçlü ve büyük olması, korunan gen bölgeleri sayesinde genom heterozigotluğunu da koruyabilmesi ve bu sayede negatif mutasyonlardan korunabilmesi, stres faktörlerine karşı daha dirençli olabilmesi sayılabilmektedir [36]. Bu örneklerle benzer şekilde soya fasülyesinde yapılan bir çalışmada da abiyotik streslere karşı tolerans artışı, patojenlere karşı daha yüksek direnç gösterme, daha fazla ve daha büyük tohumla sahip olma, geliştirilmiş nitrojen fiksasyonu gibi avantajlar gösterilmiştir [37] (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Soya fasülyesinde poliploidinin genel şeması ve avantajları.

Poliploidinin oluşmasındaki faktörlerden biri olan hibridizasyon, hibrit tür üretmek için genetik olarak farklı ebeveynler arasında melezleme işleminin söz konusu olmasıdır ve genellikle poliploid yavrular oluşmasıyla sonuçlanmaktadır [38].

1.5.1 Bitkilerde Poliploidi

Bitki çeşitliliği ve ilişkileri aydınlatmak amacıyla DNA dizilerinden elde edilen kanıtlar sayesinde devam eden araştırmalar, tüm bitkileri birkaç monofiletik gruba yerleştirerek sağlam bir soy oluşturmuştur [39]. Poliploidi, filogenetik analizlerde özellikle genom duplikasyonunun kökenlerinde türler arası hibridizasyondan dolayı kafa karıştırıcı bir faktör olarak tanımlanmaktadır. Ortaya çıkan gen kopyaları uyumsuzluğa yol açabilmektedir. Mutasyon, rekombinasyon ve genomun yeniden düzenlemeleri, genetik ve üreme izolasyonuna yol açma potansiyeline sahip önemli evrimsel olaylardır. Poliploidi bitkilerde, özellikle Kapalı tohumlularda uzun süredir önemli bir türleşme mekanizması olarak kabul edilmektedir. Ayrıca adaptasyon ve türleşmenin ana mekanizmasını temsil etmekle beraber, genom evriminde önemli bir rol oynamaktadır [40,41].

Tüm çiçekli bitkilerin yaklaşık yarısının, iki veya daha fazla atadan gelen kromozom setlerine sahip yeni poliploidler olduğu ve diploid ataların genellikle aynı veya yakın cins içinde olduğu düşünülmektedir [42]. Bununla birlikte genellikle poliploid bitkilerde gözlenen rekombinasyon, gen mutasyonu, transpozon aktivitesi ve kromozomal yeniden düzenleme olaylarının yanı sıra, aynı şekilde poliploidi veya tam genom çoğalmasının da bitki davranışı ve gen fonksiyonunda evrim ve farklılaşmanın itici güçleri olarak çeşitlenmeyi, türleşmeyi ve dolayısıyla bitki evrimini mümkün kıldığı düşünülmektedir [43].

Poliploid bitkilerin aynı populasyonlarında birden fazla ploid seviyeleriyle karma-ploid durumları da gözlenebilmektedir ve en az iki sitotip bulunduran taksonlara karma-ploid denmektedir [44]. Kolar ve ark. (2017) karma-ploid populasyonunun, türler ve çevre etkileşimini incelemek için ideal bir populasyon olduğunu düşünülmektedir [44]. Bu bağlamda *Polygala vulgaris*'in kromozom sayımı sonuçlarına göre [25]; AAD20628 numaralı örneklerin $2n=4x=68$, AAD20896 numaralı örneklerin $2n=4x=68$ ve AAD20743 numaralı örneklerin $2n=28+2B$ kromozom sayısına sahip olduğu ölçülmüş ve karma-ploid olma özelliği TÜBİTAK-KBAG 118Z7 no'lu 08 proje çalışmasıyla tespit edilmiştir.

Polygala cinsi dışında başka taksonomik basamaklardan bitkilerde de karma-ploid populasyonlar çalışılmıştır. Bunlara örnek olarak ploid seviyesi $3x$, $4x$, $6x$, $7x$, $8x$, $10x$, $11x$ ve $12x$ olarak ölçülen *Phragmites australis* Trin [45]; $2x$, $4x$, $6x$ ploid seviyeleri ile *Actinidia chinensis* Planch [46]; $2x$, $3x$, $4x$ ve $5x$ ploid seviyeleri ile *Pilosella alpicola* F.W.Schultz & Sch.Bip. [47] verilebilir. *Phragmites australis* çalışmasında Çin'deki örneğin iki soyu ve bu soylarda karma-ploid gözlemlendiği ve potansiyel melezleşmeyle beraber bu iki soy arasındaki genetik farklılıklar belirtilmiştir. *Actinidia chinensis* çalışmasında ise genomik çeşitliliğin kaynağının poliploidi ve hibridizasyon olduğu vurgulanmıştır. Son olarak, *Pilosella alpicola* çalışmasında poliploidi çeşidinin belirli taksonlarda gözlemlenen genetik çeşitlilik üzerinde önemli etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.

1.6. Poliplodinin Tespit Edilme Yöntemleri

1.6.1. Laboratuvar Yöntemleriyle Tespiti

Ploidinin tespiti için iki klasik yöntem bulunmaktadır. Bunlardan biri klasik kromozom sayma yöntemidir [48]. Kromozomlar, canlıların genetik yapısını barındırması sebebiyle önemli materyaller olarak değerlendirilmişlerdir. Kromozom sayımı çalışmaları, canlıların ploid seviyesini belirlemek için tercih edilen bir yöntemdir. Ancak kromozom sayımı çalışmalarının yapılabilmesi için olgun ve sonrasında çimlenmiş bir kök ucuna ya da polen hücresine ihtiyaç duyulmaktadır. Tohumun kök ucu vermediği durumlarda kromozom sayımı gerçekleştirilememektedir. Ayrıca bu yöntem tecrübe gerektiren ve toksik kimyasalların kullanıldığı bir süreçtir [49]. Bu da herbaryum materyalleri, birey sayısı az olan örnekler ile ve çimlenme engeli olan bitkiler açısından bir dezavantaj yaratmaktadır. Ayrıca klasik kromozom sayımı çalışmaları ezme-yayma preparasyon gibi zaman alıcı süreçlere sahiptir [25], [50].

Bir diğer yöntem ise akış sitometri (FCM)'dir. Temel anlamda hücrenin fiziksel ve kimyasal özelliklerini tespit etmek için kullanılan bir tekniktir. DNA içeriği, ploid tespiti, polisomati analizi gibi oldukça farklı çalışma yöntemlerinde de kullanılmaktadır. Bitkilerde akış sitometrinin en yaygın olarak kullanıldığı alan çekirdek DNA analizidir. Çekirdek DNA içeriği genom büyüklüğü bilinen standart bitki ile örneğin floresan yoğunluğunun kıyaslanmasıyla belirlenmektedir. Analiz öncesi standart materyal seçimi oldukça önemlidir. Bu standart, çekirdek DNA içeriği bilinen herhangi bir bitki olabilmektedir. Çekirdek DNA içeriğinin belirlenmesiyle bitkinin ploid durumuyla ilgili yorum ve tahmin yapılabilmektedir. Literatür karşılaştırmasıyla, elde edilen 2C çekirdek DNA içeriğinin pg cinsindeki değeri bitkinin ploid seviyesi hakkında tahminler üretilmesini sağlamaktadır. Ancak klasik kromozom sayımı çalışmalarında olduğu gibi, akış sitometri çalışmalarında da bazı dezavantajlı durumlar mevcuttur. Akış sitometri yöntemi kullanılacak olan örneğin genellikle canlı yaprağı bulunmalıdır ve bu durum yine herbaryum örnekleri ve çimlenmesi zor olan örnekler için büyük bir sıkıntı yaratmaktadır. Deneysel ekipman iyi hazırlanmadığında ise her iki yöntemle de ploid seviyesini tahmin etmek oldukça zordur [51,52].

1.6.2. Yüksek Hacimli DNA Verisi Kullanılarak Tahmin Edilmesi

DNA yapısının ilk keşfedildiği 1953 yılından itibaren genom dizilemelerini incelemek amacıyla çok sayıda teknoloji geliştirilmiştir. Bu teknolojiler sırayla,

Sanger (Birinci nesil), NGS (Yeni nesil, ikinci nesil), Üçüncü Nesil ve Dördüncü Nesil Dizileme Teknolojileri olarak sayılabilir [53,54].

Sanger (birinci nesil dizileme), genellikle 500-1000 baz çifti uzunluğunda okuma yapan bir dizileme yöntemidir. Bu dizileme için bir PCR amplifikasyonu veya klonlama gerekmektedir. İnsan Genom Projesi, Sanger yöntemiyle tamamlanmıştır. Sanger dizileme yönteminin dezavantajı; zaman alıcı, düşük verim ve yüksek maliyetli olması ve daha fazla emek gerektirmesidir [55].

İleri Nesil Dizileme (NGS), Sanger'den sonra bilim dünyasına sunulan teknolojik araçlarla daha çok veri elde etme imkânı veren bir dizileme yöntemidir. İkinci nesil dizileyiciler, *in vivo* klonlama ihtiyacını ortadan kaldırmıştır ve DNA, adaptör ile *in vitro* uygun boyutlarda dizileme kitaplıkları üretmek için doğrudan parçalanabilir hale gelmiştir.

İkinci nesil dizileme teknolojileri, kullandıkları reaksiyon kimyası temelinde iki kategoriye ayrılır: (a) Illumina, Roche/454 ve Ion Torrent tarafından kullanılan sentez yoluyla dizileme (b) ABI'nin SOLiD dizileyicileri tarafından kullanılan ligasyon yoluyla dizileme [56].

Üçüncü Nesil Dizileme yöntemlerinin en önemli avantajı uzun baz çiftlerini hızlı bir şekilde okuyabilmeleridir. Amplifikasyon adımı gerektirmediği için, kütüphane hazırlama sırasında polimerazın neden olduğu hataların ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır. Üçüncü nesil sekanslayıcı tarafından üretilen daha uzun okumalar, *de novo* genom sekanslama ve birleştirmeye de imkân sunmaktadır. Ayrıca, genom içindeki yapısal varyasyonun daha doğru analizine ve ikinci nesil sekanslayıcılarda sınırlı olan genomların daha bitişik yeniden yapılandırılmasına da hizmet etmektedir [57].

Dördüncü nesil dizileme yöntemi ya da yerinde sıralama yöntemi, sabit hücre ve dokulardaki nükleik asit bileşimini doğrudan okumak için ikinci nesil NGS kimyasından yararlanır. Yerinde sıralama, önceki dizileme nesillerinden iki açıdan farklılık gösterir. İlk olarak, numune üzerinde okunan sıralamanın mekansal dağılımı görülebilir, bu da önemli düzeyde bilgi sağlar. İkinci bir fark, aynı anda analiz edilmesi mümkün olan hücre sayısı açısından verimdir. Tek hücreli RNA dizileme yöntemleri, yalnızca birkaç

pikogram başlangıç materyali ile sağlam olacak şekilde geliştirilmiştir ve hücre dizileme oranında bir artışın yanı sıra maliyette de bir azalma olmuştur [58].

Yayınlanan ilk poliploid bitki genomu, 2010'da Sanger teknolojisi ile soya fasülyesine (*Glycine max* (L.) Merr.) aittir [59]. Bu çalışmayı tetraploid olan *Arabidopsis lyrata* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz izlemektedir [60]. Illumina teknolojisi kullanılarak dizilenen poliploid bitki genomlarının örnekleri ise hekzaploid *Triticum aestivum* L. (buğday) ve *Gossypium hirsutum* L. (pamuk) genomudur [61,62]. 454 ve Illumina teknolojilerinin bir kombinasyonu olarak, *Brassica oleracea* L. (lahana) ve *B. napus* L. (kolza tohumu) genomları sekanslanmıştır [63]. Zaman geçtikçe ve teknolojilere ulaşım kolaylaştıkça, bu çalışmaların sayıları hızla artmıştır.

Uzun okumaların bitki genomlarında sağladığı en önemli avantajlardan biri de hareketli elementleri (Transpozonlar) genomda saptayabilmektir. Tüm genom dizilenmesi, gen tahminlemesi, transpozonların saptanabilmesi ve evrimsel karşılaştırmalar yapılabilmesi, genel olarak bir genom karakterizasyonun içeriğini oluşturmaktadır [64].

Transpozonlar, genomda hareket edebilen DNA dizileri olarak bilinmektedir ve mobil elementler olarak da adlandırılmaktadır. İlk defa 1948 yılında Barbara McClintock tarafından mısır bitkisinde (*Zea mays* L.) keşfedilmiştir [65], [66]. Hareketli elementler, bitki genomlarının yaklaşık %80 kadarını, mantar genomlarının %3 ile 20'sini ve metazo genomlarının %3 ile 52'sini temsil etmektedir [67,68,69]. Transpozonlar, genellikle iki sınıfa ayrılmaktadır: Birinci sınıfta bulunan Retrotranspozonlar, genom içerisine girebilmek ve kendisini çoğaltabilmek için RNA'ya ihtiyaç duyan elementlerdir. Bu elementler, RNA polimeraz II (RNA Pol II) tarafından kopyalanan mRNA'nın ters transkripsiyonu ile cDNA'ya dönüştürülerek çekirdek içine girerler. Genom içinde yeni bir konum belirlerler ve kopyala-yapıştır mekanizmasıyla transpoze olurlar [70]. Bu mekanizma esnasında bazı farklılıklar gösterdikleri için Uzun Terminal Tekrarları (Long-Terminal Repeats; LTR'ler), Uzun Serpiştirilmiş Ögeler (Long Interspersed Nucleotide Elements; LINE'ler) ve Kısa Serpiştirilmiş Ögeler (Short Interspersed Nucleotide Elements; SINE'ler) şeklinde üç gruba ayrılmaktadır [71]. İkinci sınıfta bulunan DNA Transpozon elementleri ise kendilerini Retrotranspozonlar gibi kopyalamazlar, hareketli elementler tarafından kodlanan transpozaz enzimi

aracılığıyla bağlandıkları DNA'dan kes-yapıştır mekanizmasıyla farklı bir konuma hareket edebilmektedirler. Bitkilerde en çok bulunan hareketli element Retrotranspozon sınıfının üyesi Uzun Terminal Tekrarları (Long-Terminal Repeats; LTR'ler)'dir [72].

Genom yapısını aydınlatma çalışmalarının yanı sıra, bitkilerde yüksek hacimli DNA verisiyle heterozigotluk yüzdesi elde edilerek poliploidi seviyesi tahminlenebilmektedir. Bu analizleri yapabilmek ve heterozigotluk yüzdesini elde etmek için ve ayrıca ham kısa okuma sıralama verilerinden genel genom özelliklerini (toplam ve haploid genom uzunluğu, tekrarlanan içeriğin yüzdesi ve heterozigotluk oranı) ve genel okuma özelliklerini (okuma kapsamı, okuma çoğaltma ve hata oranı) tahmin etmek için sıklıkla kullanılan biyoinformatik araçlar geliştirilmiştir [73]. Heterozigotluk yüzdesi triploid veriler için %24,0'e kadarı allotetraploid veriler için %18,0'a kadar, ototetraploid veriler için %23,5'e kadar, pentaploid veriler için %24,0'e kadar ve hekzaploid veriler için %24,0'a kadar kabul edilmektedir [74].

Son yıllarda, *k*-mer tabanlı analiz ve karşılaştırma yöntemleri, kromozomlar, tüm genomlar ve hatta metagenomlar gibi büyük DNA dizilerinin analizi ve heterozigotluk tahmini için standart araçlar haline gelmiştir [75]. *K*-mer, dizi birleştirmesinde kullanılmakta olup, DNA dizilemesinden elde edilen dizide yer alan *k* uzunluğundaki bütün muhtemel alt dizileri ifade etmektedir. *k* değerinden kaç tane *k*-mer elde edileceği *n* değeri ile ifade edilmektedir ve *n*, (Genom Uzunluğu – *k* değeri) + 1 olarak hesaplanır. Örneğin ATCG dizisinde genom uzunluğu 4 olduğundan ve *k*=2 olacak şekilde (4-2) +1 =3 tane olası *k*-mer hesaplanır. Bunlar sırayla, AT TC CG bazlarıdır. *k* =3 seçilecek olursa, *n* değeri (4-3)+1 = 2 olacaktır ve bunlar sırayla ATC TCG dizisidir.

K-mer yöntemleri kullanılarak metagenomik, genom montajı, varyant saptama gibi konular da çalışılmaktadır [76,77,78,79]. Optimum *k* sayısını bulabilmek için SGA [80] ve Kmergenie [81] gibi programlar kullanılmaktadır. Her iki program da Python temeli olup, bu tez çalışması kapsamında SGA genom boyutu tahminlemede, Kmergenie ise öncelikli olarak optimum *k* sayısını bulmada kullanılmıştır.

K-mer analizi ile poliploidi seviyesinin belirlenmesi yeni nesil DNA dizileme teknolojisi (NGS) ile gerçekleştirilir [82]. Bir örneğin hem *k*-mer analizi ile genom boyutunun tahminlendiği hem de akış sitometri yöntemiyle elde edilen veriyle karşılaştırıldığı az sayıda çalışma mevcuttur. Bitkiler söz konusu olduğunda çalışma sayısı iyice azalmaktadır. *K*-mer analiziyle ve akış sitometri yöntemiyle yapılan genom boyutu karşılaştırmalarına bazı örnek çalışmalar şöyledir: *Dioscorea rotundata* Poir için genom boyutu tahminlemesi *k*-mer analiziyle 579 Mb, FCM ile 570 Mb [83]; *Ilex chinensis* Sims için *k*-mer ile 618 Mb, FCM ile 660 ± 10 Mb [84]; *Lepeophtheirus salmonis* Krøyer için *k*-mer analiziyle 976 Mb, FCM ile 1017 Mb [85]; *Gracilariopsis lemaneiformis* Bory için *k*-mer ile 97.02 Mb, FCM ile 160 Mb [86]; *Garcinia mangostana* L. için *k*-mer ile 5.92 Gbp FCM 5,87 Gbp [87]; *Psammochloa villosa* Bor için *k*-mer ile 1563.54 Mb, FCM ile 1580.10 ± 5.02 Mb [88]; *Gryllotalpa orientalis* Burmeister için *k*-mer ile 3.17-3.77 Gb, FCM ile 3.14 Gb hesaplanmıştır [89]. Bu verilere göre *k*-mer analiziyle yapılan genom boyutu tahminleme çalışmaları, akış sitometri ile elde edilen genom boyutu tahminine büyük ölçüde yaklaşmıştır.

Polygala vulgaris içinse henüz böyle bir çalışma yayınlanmamıştır. Bu tez çalışmasının amacı, ploidi seviyesinin tahminlenmesinde kullanılan klasik laboratuvar yöntemlerinin haricinde biyoinformatik analizler kullanılarak, klasik yöntemin tohum çimlenmesi, taze yaprak kullanma zorunluluğu, herbaryum materyallerinde çalışılamaması gibi dezavantajlarını en az seviyeye indirmeye çalışmak ve aynı zamanda *P. vulgaris* türüne ait beş bireyin genom karakterizasyonunu ve poliploidizasyon olaylarını ortaya çıkarmaktır.

Bu tez çalışmasına konu olan *Polygala vulgaris* türüne ait bireyler, M. K. Şenova'nın Türkiye'deki Bazı *Polygala* L. (*Polygalaceae*) Taksonlarının Kromozom Sayımı ve Akış Sitometri (Fcm) Teknikleri ile Sitotaksonomisi (2021) adlı tez çalışmasında kromozom sayımı yapılmış ve akış sitometri sonuçları elde edilmiş örneklerdir [25].

Buna göre, kromozom sayısı $2n = 4x = 68$, genom boyutu 1822 Mb ve 2004 Mb olarak hesaplanan *P. vulgaris* popülasyonlarına ait bireyler; SGA, Kmergenie, ve GenomeScope programlarında analiz edilmiş ve karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca genomik DNA'nın biyoinformatik analizleri ve elde

edilen optimum *k*-mer sayıları ile genom montajlama, genom boyutu tahminleme, poliploid kökeni anlamaya yardımcı olması açısından hareketli elementler, poliploidinin gerçekleşme zamanı ve diğer duplikasyon çeşitleri de incelenmiştir.

2. MALZEMELER VE YÖNTEMLER

2.1. DNA İzolasyonu İçin Taze Bitki Yaprığı Eldesi

2.1.1. Tohum Çimlendirme Çalışmaları

Tez çalışmasında kullanılan AAD20628 ve AAD20896 numaralı bireylere ait -40 °C'de bekletilen tohumlarının yüzey sterilizasyonu sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisi ile yapılmıştır. Ardından steril petri kaplarında kurutma kâğıdı üzerinde çimlendirilmiştir. Petri kapları düzenli olarak dH₂O ile nemlendirilmiştir. 2 hafta karanlıkta ve 4 °C sıcaklıkta bekleyen örnekler Çizelge 2.2'de bulunan koşullarda iklimlendirme kabinine alınmıştır. Çimlendirme kabininde kotiledonların oluşumundan sonra bitkilere ait genç yapraklar gelişmiş ve Şekil 2.1'deki gibi toplanan yapraklar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 2.1. Tezde kullanılan bireylerin lokalite bilgileri.

Tezde Kullanım Numarası	Takson Adı	Lokalite
AAD20628_1	<i>Polygala vulgaris</i>	Erzurum, Oltu, Narman yolu, <i>Juniperus</i> açıklığı, 40°28'241"K, 41°54'29.2"D, 1765m, 5 Ağustos 2019, Ali A. Dönmez 20628
AAD20628_8	<i>Polygala vulgaris</i>	Erzurum, Oltu, Narman yolu, <i>Juniperus</i> açıklığı, 40°28'24.1"K, 41°54'29.2"D, 1765m, 5 Ağustos 2019, Ali A. Dönmez 20628

AAD20628_9	<i>Polygala vulgaris</i>	Erzurum, Oltu, Narman yolu, <i>Juniperus</i> açıklığı, 40°28'24.1"K, 41°54'29.2"D, 1765 m, 5 Ağustos 2019, A. A. Dönmez 20628
AAD20896_1	<i>Polygala vulgaris</i>	Erzurum, Oltu, Duralar Köyü, <i>Juniperus</i> açıklığı, 40°29'29.9"K, 41°56'20.9"D, 1421 m, 4 Temmuz 2021 A. A. Dönmez 20896
AAD20896_2	<i>Polygala vulgaris</i>	Erzurum, Oltu, Duralar Köyü, <i>Juniperus</i> açıklığı, 40°29'29.9"K, 41°56'20.9"D, 1421 m, 4 Temmuz 2021 A. A. Dönmez 20896

Çizelge 2.2. İklimlendirme kabini parametreleri.

Parametre	Aydınlık Dönem	Karanlık Dönem
Sıcaklık (°C)	25	6
Nem (%)	90	20
Zaman (Saat)	18	6
Işık Şiddeti (LUX)	8000	-

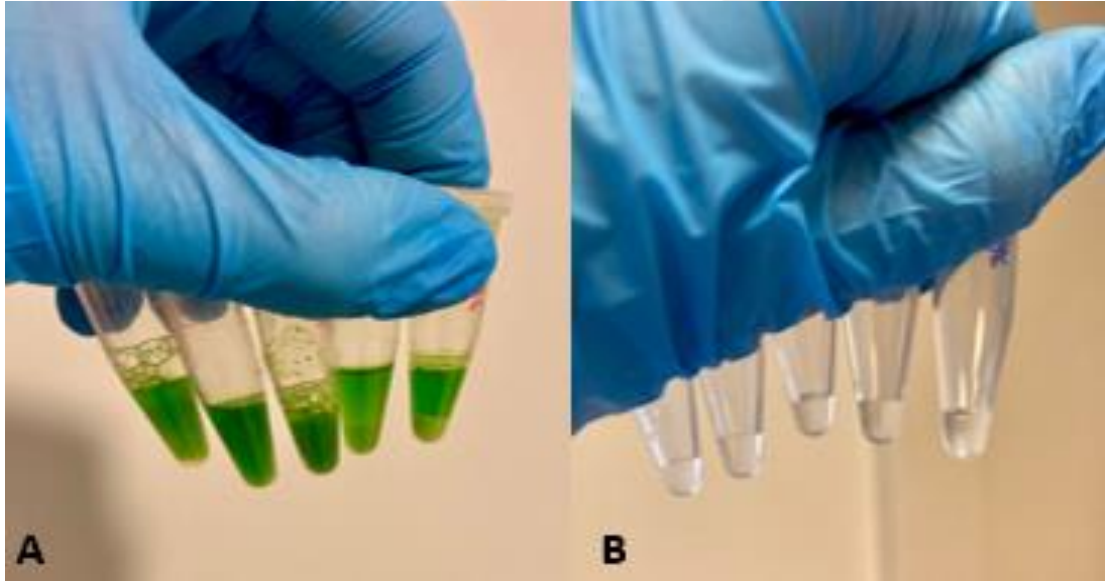


Şekil 2.1. *Polygala vulgaris* (A.A. Dönmez 20628) örneğine ait 3 farklı tohumun çimlenmesiyle elde edilen taze yapraklar.

-80'den alınan yapraklar örnek numarasına göre ardışık olarak adlandırılmıştır ve AAD20628_1 ile başlayan örnek seti AAD20628_9'a kadar devam etmiştir. Her örneğin genomik DNA ekstraksiyonu sonrası ölçülen miktarlarına göre AAD20628_1, AAD20628_8 ve AAD20628_9, AAD20896_1 ve AAD20896_2 numaralı örnekler ileri nesil sekanslama için gönderilmiştir. Tez kapsamında çalışılan örneklerin bilgileri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

2.2. Genomik DNA Ekstraksiyonu

İleri sekanslama analizleri için elde edilen canlı yapraklardan genomik DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu işlem için aşağıda verilen protokole uygun olarak GeneAll® Exgene™ Plant SV mini 100 kiti kullanılmıştır. Şekil 2.2.1'de Genomik DNA ekstraksiyonun ilk ve son basamakları sırayla verilmiştir.



Şekil 2.2. Genomik DNA ekstraksiyonunun basamakları. **A.** Genomik DNA ekstraksiyonunun ilk basamağında havanda ezilen yaprak dokusu. **B** Genomik DNA ekstraksiyonunun son basamağında elde edilen ve dizilemeye gönderilen Genomik DNA.

- a. -80 °C'de bulunan yapraklar havanda ezilmiş, içerisine 400 µl Buffer PL ve 4 µl RNase A (100 mg/ml) eklenerek 90 dakika 65°C'de inkübe edilmiştir.

- b. İnkübasyon sonrasında vortex yapılan örnekler 140 µl Buffer PD eklenmiş, vortex'lenmiş ve 5 dakika 15.000 rpm'de santrifüje alınmışlardır.
- c. Tüpteki lizat kısım EzSep™ Filter (mavi) tüplere aktarılarak 2 dakika 15.000 rpm'de santrifüje edilmiştir.
- d. Elde edilen lizat yeni 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- e. Tüpteki miktarın 1,5 katı kadar Buffer BD pipetting yapılarak eklenmiştir.
- f. Tüpteki 700 µl karışım, EzSep™ Filter (yeşil) tüplere aktarılarak 30 saniye 15.000 rpm'de santrifüje edilmiş ve filtreden süzülen sıvı dökülerek tekrar aynı tüple işleme devam edilmiştir.
- g. 700 µl'den daha fazla olan örnekler için bu basamak tekrarlanmıştır.
- h. Yeşil filtreye 700 µl Buffer CW eklenmiş, 30 saniye 15.000 rpm'de santrifüje edilmiş ve filtreden süzülen sıvı dökülerek tekrar aynı tüple işleme devam edilmiştir.
- i. Yeşil filtreye 300 µl Buffer CW eklenmiş, 2 dakika 15.000 rpm'de santrifüje edilmiş ve filtre, 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne takılmıştır.
- j. Filtrenin membranının merkezine 50 µl Buffer AE eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında beklenip, 1 dakika 15.000 rpm'de santrifüje edilmiştir.
- k. Filtreden, 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne süzülen genomik DNA, miktar tayini ölçümünde kullanılmış ve sonrasında -20 C'de muhafaza edilmiştir.

2.3. Genomik DNA Miktar Ölçümü

Elde edilen genomik DNA'nın miktar tayini Qubit™ 1X dsDNA HS Assay kiti kullanılarak, aşağıdaki protokol takip edilerek yapılmıştır ve elde edilen sonuç Çizelge 2.3'te verilmiştir.

- a. Standart 1 ve Standart 2 eklenerek, örnek sayısından 2 adet fazla tüp hazırlanmış ve n+2 hesaplaması referans alınmıştır.
- b. n+2 x 1 µl Qubit™ reagent ve n+2 x 199 µl Qubit™ 1X dsDNA HS buffer eklenerek karışım oluşturulmuştur.

- c. Oluşturulan karışım, ölçümü yapılacak genomik DNA tüplerine 199 µl, Standart 1 ve Standart 2 tüplerine 190 µl paylaştırılmıştır.
- d. Standart 1 ve Standart 2 tüplerinden, sırayla 10 µl, hazırlanan karışım eklemiş tüplere alınmıştır. Bu tüpler vortex'lenerek cihazda okutulmuştur.
- e. 199 µl karışım içeren genomik DNA ölçümü yapılacak olan tüplere, uygun sırayla, 1 µl genomik DNA eklenmiştir. Tüpler vortex'lenerek cihazda okutulmuştur.

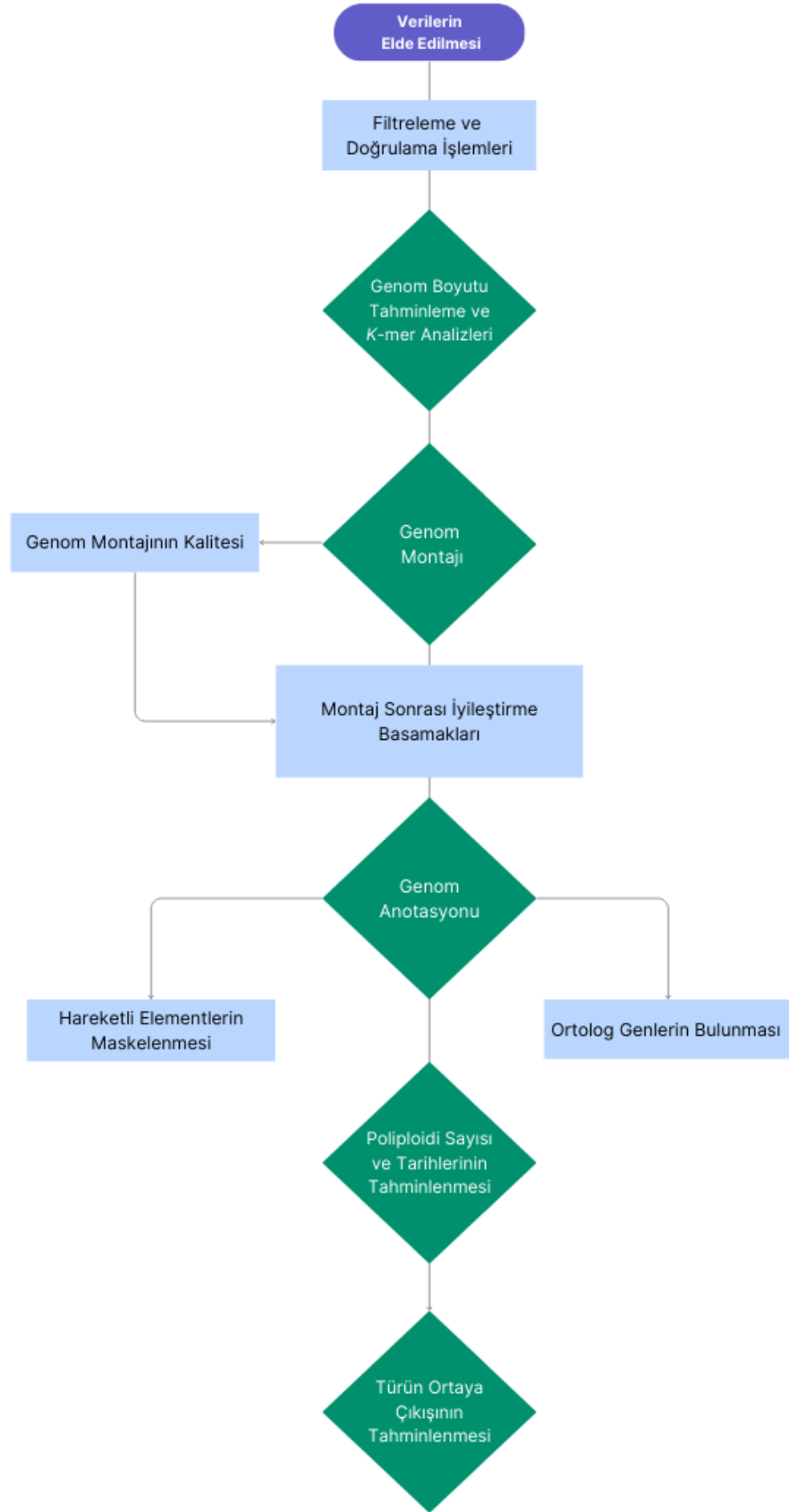
Çizelge 2.3. Qubit™ 1X dsDNA HS Assay sonuçları.

Örnek Numarası	Genomik DNA Miktarı (ng/ µl)
AAD20628 – 1. Birey	35.6
AAD20628 – 2. Birey	4.6
AAD20628 – 3. Birey	10.2
AAD20628 – 4. Birey	3.5
AAD20628 – 5. Birey	16.5
AAD20628 – 6. Birey	11.7
AAD20628 – 7. Birey	29.6
AAD20628 – 8. Birey	102
AAD20628 – 9. Birey	44
AAD20896 – 1. Birey	35.6
AAD20896 – 2. Birey	15.6

Not: Koyu renkle işaretlenmiş örnekler tez çalışmasına dahil edilmiş örneklerdir.

2.4. Yüksek Hacimli DNA Verisinin Analizi

Yüksek hacimli DNA verisinin analizi, Şekil 2.6'da verilen biyoinformatik iş akışını takiben gerçekleştirilmiştir. Biyoinformatik analizlerle hedeflenen ve sonuçlandırılan iş akışının genel basamakları aşağıda verilmiştir.



Şekil 2.3 Biyoinformatik analizlerin genel akış şeması.

2.4.1. Genomik DNA Verilerinin Yeni Nesil DNA Dizileme Platformunda Dizilenmesi

Örneklere ait genomik DNA'lar, Yeni Nesil Dizileme teknolojisi kullanılmak üzere Macrogen Europe BV'e gönderilmiştir. Örnekler 150 x 2 bp kısa okuma şeklinde tüm genom verisi olarak dizilenmiştir. Elde edilen QC (Kalite kontrol) raporları Şekil 2.3'te verilmiştir.

AAD20628_1, AAD20628_9, AAD20896_1 ve AAD20896_2 numaralı örnekler TruSeq Nano DNA Kit, AAD20628_8 numaralı örnek TruSeq DNA PCR-Free Kit kütüphaneleri kullanılarak Illumina platformunda dizilenmiştir.

2.4.2 Yüksek Hacimli DNA Verisinin Temizlenmesi

Elde edilen tüm veriler TÜBİTAK ULAKBİM Yüksek Başarımlı ve Grid Hesaplama Merkezi'nin alt yapısı olan TRUBA'da (Türk Ulusal Bilim e-Altyapısı) depolanmıştır ve analizleri burada gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.4. Yeni nesil dizileme için gönderilen örneklerin QC (kalite) raporları.

Örnek	Konsantrasyon (ng/μl)	Son Hacim(μl)	Toplam Miktar (μg)	DIN Değeri
AAD20628_1	43.42	35	1.516	6
AAD20628_8	79.895	20	1.598	5.7
AAD20628_9	50.15	11	0.552	5.1
AAD20896_1	68.508	38	2.603	5.9
AAD20896_2	18.268	38	0.694	6.3

Raw Data Statistics

- The total number of bases, reads, GC (%), Q20 (%), and Q30 (%) are calculated for the 2 samples.
For example, in AAD20628_1 sample, 139,424,364 reads are produced, and total read bases are 21.1 Gbp.
The GC content (%) is 39.1% and Q30 is 86.5%.

* Raw Data

Sample ID	Total bases(bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
AAD20628_1	21,053,078,964	139,424,364	39.1	60.9	93.4	86.5
AAD20896_2	21,255,970,114	140,768,014	39.1	60.9	94.1	87.6

Raw Data Statistics

- The total number of bases, reads, GC (%), Q20 (%), and Q30 (%) are calculated for the 2 samples.
For example, in 20628_8 sample, 168,171,938 reads are produced, and total read bases are 25.4 Gbp.
The GC content (%) is 38.8% and Q30 is 86.0%.

* Raw Data

Sample ID	Total bases(bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
20628_8	25,393,962,638	168,171,938	38.8	61.2	93.5	86.0
20628_9	21,528,606,956	142,573,556	38.9	61.1	93.1	85.5

Raw Data Statistics

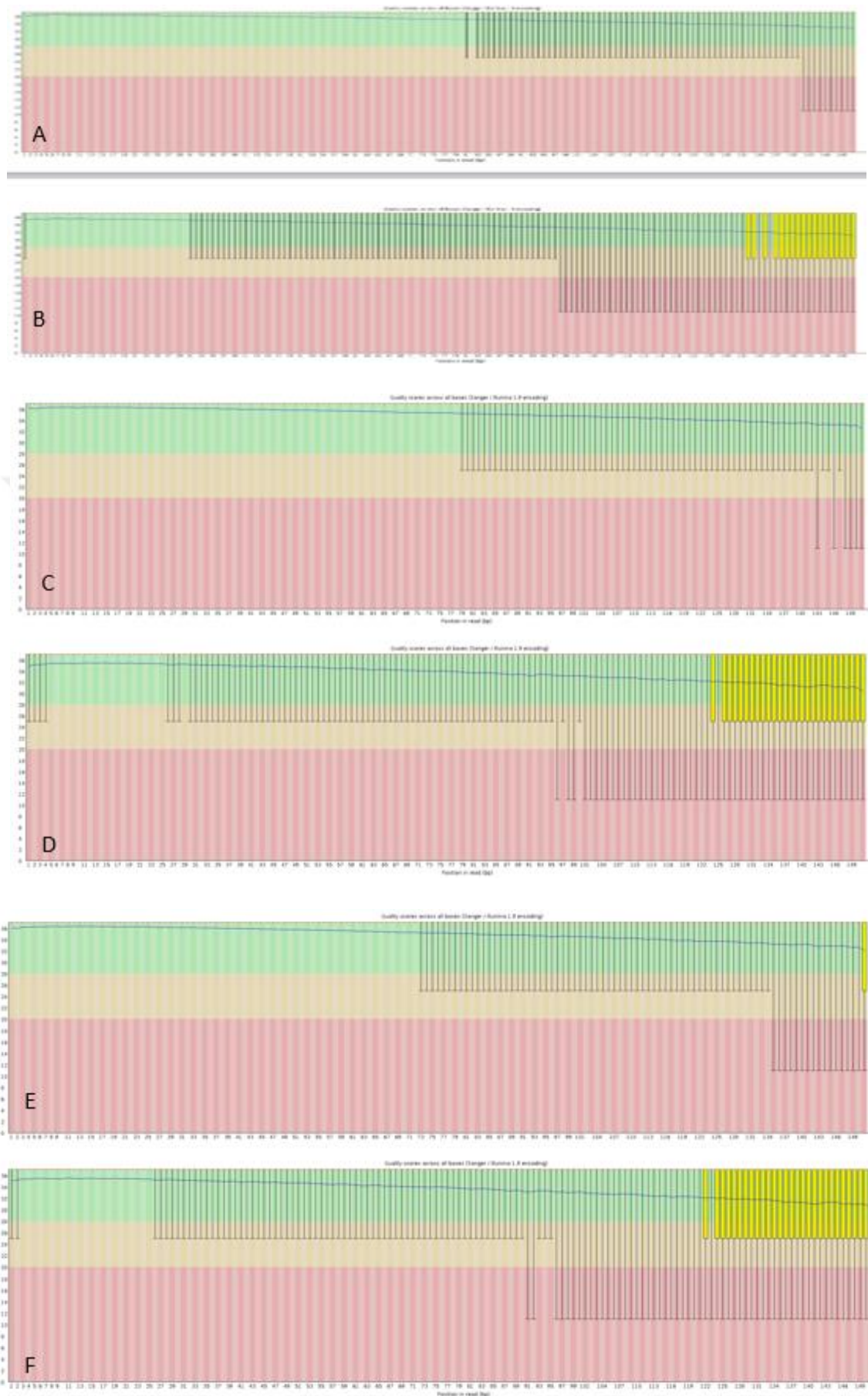
- The total number of bases, reads, GC (%), Q20 (%), and Q30 (%) are calculated for the 1 samples.
For example, in AAD20896_1 sample, 171,527,020 reads are produced, and total read bases are 25.9 Gbp.
The GC content (%) is 39.0% and Q30 is 90.3%.

* Raw Data

Sample ID	Total bases(bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
AAD20896_1	25,900,580,020	171,527,020	39.0	61.0	96.2	90.3

Şekil 2.4. *Polygala vulgaris*'e ait ham veriler.

Dizileme sonucunda elde edilen ham veriler adaptör ve düşük okumalı dizilimlerden arındırılmamış şekilde tarafımıza ulaşmıştır (Şekil 2.5). Yeşil boyalı alanda bulunan kutu şekilleri bazların yüksek kalitede olduğunu göstermektedir. Bu şekillerin sarı ve kırmızı alana doğru aşağıya uzanmış halde bulunması, adaptörlerin kaynaklı kirlilik bulunduğunu ve genom verileri üzerinde ilave filtreleme işlemine ihtiyaç duyulduğu anlamına gelmektedir.





Şekil 2.5. Örneklerin FastQC raporları. **A.** AAD20628_1 numaralı örneğin birinci okumasının (AAD20628_1_1) ilk FastQC raporu. **B.** AAD20628_1 numaralı örneğin ikinci okumasının (AAD20628_1_2) ilk FastQC raporu. **C.** AAD20628_8 numaralı örneğin birinci okumasının (AAD20628_8_1) ilk FastQC raporu. **D.** AAD20628_8 numaralı örneğin ikinci okumasının (AAD20628_8_2) ilk FastQC raporu. **E.** AAD20628_9 numaralı örneğin birinci okumasının (AAD20628_9_1) ilk FastQC raporu. **F.** AAD20628_9 numaralı örneğin ikinci okumasının

(AAD20628_9_2) ilk FastQC raporu **G.** AAD20896_1 numaralı örneğin birinci okumasının (AAD20896_1_1) ilk FastQC raporu **H.** AAD20896_1 numaralı örneğin ikinci okumasının (AAD20896_1_2) ilk FastQC raporu. **I.** AAD20896_2 numaralı örneğin birinci okumasının (AAD20896_2_1) ilk FastQC raporu. **İ.** AAD20896_2 numaralı örneğin ikinci okumasının (AAD20896_2_2) ilk FastQC raporu.

Filtreleme işlemi SOAPnuke [90] algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SOAPnuke hem ham verilerin hem de önceden işlenmiş verilerin istatistiklerini özetlemek için geliştirilen bir programdır. Filtreleme adımı, istenmeyen terminal parçaları kesilir, standart altı okumalar filtrelenebilir ve belirli dönüştürme işlemleri uygulanır. Okumaların her iki ucunda da daha düşük kaliteli bazlar kesilebilir. Adaptörlü okumalarda, kısa uzunlukta, çok fazla belirsiz bazda, düşük ortalama kalitede veya çok fazla düşük kaliteli bazda filtreleme yapılabilir. Bu bağlamda AAD20628_1 numaralı örnek için parametre şöyledir:

```
SOAPnuke filter -n 0.01 -l 35 -q 0.1 -1 AAD20628_1_1.fastq.gz -C  
clean_AAD20628_1_1.fastq.gz -2 AAD20628_1_2.fastq.gz -D  
clean_AAD20628_1_2.fastq.gz --polyX 65 --minReadLen 65
```

AAD20628_8 ve_9 numaralı örnekler için ise parametreler şöyledir:

```
SOAPnuke filter -n 0.01 -l 30 -q 0.1 -1 20628_8_1.fastq.gz -C  
clean_20628_8_1.fastq.gz -2 20628_8_2.fastq.gz -D clean_20628_8_2.fastq.gz  
--polyX 60 --minReadLen 65.
```

2.4.3. Genom Düzenleme (Correction)

İki yönlü okumalarda çakışan bölgede herhangi bir uyumsuzluk bulunursa fastp programı bunları “correction” işlemi ile düzeltmektedir [91]. Örneklere ait genomik verilerinin bu yanlış baz eşleşmeleri, montajlama işlemi öncesinde çıkarılmıştır. Kullanılan parametreler ise şöyledir:

```
fastp --in1 *fasta --out1 *fasta --in2 *fasta --out2 *fasta --correction
```

2.4.4. Genom Boyutu Tahminleme

Genom boyutu tahminlemede SGA [80], GenomeScope 2.0 [74] ve Kmergenie [81] programları kullanılmıştır. SGA, dizi grafikleri konseptine dayanan bir genom birleştiricidir. SGA programının ana hedefi, DNA dizisi okumalarının sıkıştırılmış bir temsili kullanılarak elde edilen, hafıza açısından oldukça verimli olmaktır. GenomeScope, *k*-mer sayım dağılımını kullanarak genom özelliklerini açıklayan bir rapor ve çeşitli bilgilendirici grafikler üretir. Bu raporda genomun heterozigotluk yüzdesi de hesaplanmaktadır. Kmergenie programı ise *k*'nin varsayılan değeri için bolluk histogramlarını oluşturur ve daha sonra histogramdaki kaç farklı *k-mer*'in genomik olduğunu tahmin etmek için her histograma üretken bir model yerleştirir. Son olarak genomik *k*-mer sayısını maksimuma çıkaran *k* değerini seçilir. GenomeScope internet sitesi üzerinden yürütülürken, Kmergenie için bir parametre kullanılmamıştır. SGA için kullanılan parametreler sırasıyla şöyledir:

- a) sga preprocess --pe-mode / (paired-end)
- b) sga index -a ropebwt -t 8 --no-reverse /
- c) sga preqc -t > *P.vulgaris.preqc

2.4.5. Heterozigotluk Tahmini

Heterozigotluk yüzdesi GenomeScope 2.0 [74] kullanılarak hesaplanmıştır. Kullanılan parametreler ise şöyledir:

- a) jellyfish count <(zcat *fastq.gz) <(zcat *fastq.gz) -C -m optimum *k* değeri -s 100M -t 10 -o reads.jf
- b) jellyfish histo -t 10 reads.jf > pur.histo

2.4.6. Genom Montajı Öncesi İşlemler

Genom montajı öncesi, dizileme hatalarının temizlenmesi adına KARECT [92] programı aşağıda verilen komutlar ile kullanılmıştır:

```
karect -correct -threads=16 -matchtype=hamming -celltype=diploid -  
inputfile=*1.fastq -inputfile=*2.fastq
```

Elde edilen son dosyalar ile genom montajı işlemine geçilmiştir.

2.4.7. Genom Montajlama (*de novo* Assembly)

Genom montajının amacı, birçok kısa sıralama okumasından tam bir genomu yeniden oluşturmaktır.

Genom montajı (assembly) çalışması için tüm genomu tarayacak optimum *k*-mer sayısını belirlemek için Kmergenie yazılımı kullanılmıştır. *K*-mer uzunluğunun düşük sayıda olması yanlış baz eşleşmelerinin ihtimalini artırabilmektedir. Bu yüzden *k*-mer sayısı seçilirken genomu en iyi kapsayan ve yeterli uzunlukta bir değer olmasına önem verilmelidir. Kmergenie programını çalıştırmak için, veriyi fasta formatında direkt olarak komuta vermek yeterlidir. Sonuçlar ise pdf dosyası şeklinde elde edilmektedir.

Optimum *k*-mer sayısı belirlendikten sonra filtreden geçirilen genom verileri MEGAHIT [93] programı kullanılarak *de novo* assembly işlemine tabii tutulmuştur. MEGAHIT, büyük ve karmaşık metagenomik verileri zaman açısından verimli bir şekilde bir araya getiren bir NGS *de novo* derleyicisidir. Bu program verileri bir bütün olarak bir araya getirir, yani bölümlene gibi ön işlemlere gerek kalmadan çalışır. Elde edilen contig'lere SOAPdenovo2 [93] programı kullanılarak scaffolding işlemi uygulanmıştır. Parametreler sırasıyla şöyledir:

```
megahit --no-mercy -1 *fastq.gz -2 *fastq.gz
```

```
SOAPdenovo-fusion -D -s config.txt -p 64 -K optimum -g * -c  
megahit_out/final.contigs.fa
```

```
SOAPdenovo-127mer map -s config.txt -p 64 -g *
```

```
SOAPdenovo-127mer scaff -p 64 -g * -F
```

2.4.8. Parlatma (Polishing) Basamağı

Elde edilen diziler Racon [94] programı ile 3 kez parlatma (polishing) işlemine tabii tutulmuştur. Bu işlemler için öncelikle, doğrulama (correction) basamağı tamamlanan iki farklı okuma aşağıdaki komutla birleştirilmiştir:

```
1) cat 1.fasta 2.fasta > 1.2.fasta
```

Her iki okuma tek dosyada birleştirildiği için aşağıdaki komutla bir ön işlem gerçekleştirilmiştir:

2) python racon_preprocess.py 1.2.fasta > final.1.2.fasta

Genom montajı verisi, Minimap2 [95] kullanılarak üst basamakta elde edilen fasta dosyasına aşağıdaki komutla hizalanmıştır ve sam dosyası elde edilmiştir:

3) minimap2 -ax sr scaffolds.fasta final.1.2.fasta > aln.sam

Racon ile son basamak olan parlatma işlemi yapılmıştır:

4) racon -m 8 -x -6 -g -8 -w 500 -t 64 final.1.2.fasta aln.sam scaffolds.fasta > polished1.fasta

Son basamakta elde edilen polished1.fasta dosyası, 3. basamaktaki scaffolds.fasta dosyası yerine konularak basamaklar tekrar edilmiş, polished2.fasta dosyası elde edilmiştir. Yine aynı şekilde, polished2.fasta dosyası da 3. basamaktaki scaffolds.fasta dosyası yerine konarak tekrar edilmiş ve son olarak polished3.fasta dosyası ile 3 tekrarlı parlatma işlemi tamamlanmıştır.

Parlatma basamağının hemen ardına RagTag [96] programı ile, *Polygala tenuifolia* genomu referans alınarak genom montajı verisi düzeltilmiştir. Kullanılan komut ise şöyledir:

ragtag.py scaffold reference.fasta polished3.fasta

2.4.9. Genom Montajı (Assembly) Sonrası Analiz İşlemleri

Assembly sonrası ortaya çıkan konsensus dizilimler BUSCO [97] yazılımıyla incelenmiştir. Analizin temel amacı genom montajının kalitesinin yüzdelik olarak hesaplanması ve montajdaki eksik kısımların bulunmasıdır. Genomun bütünlüğünü ve hizalama başarısını değerlendirmek amacıyla Minimap2 [95] programı kullanılarak ham halde bulunan tüm genom dizilimleri ve assembly sonrası ortaya çıkan fasta uzantılı dosya birbirlerine hizalanmıştır.

Anotasyon basamağında AUGUSTUS [98] programı “strand=both” parametresi kullanılarak protein dizileri ve kodlama yapan nükleotid dizileri elde edilmiştir ve elde edilen dosyalar sonraki basamaklarda girdi dosyası olarak kullanılmıştır.

Elde edilen protein dizilerini kullanarak, Ensembl Plant (<https://plants.ensembl.org/>) kütüphanesinden alınan örneklerin protein dizileriyle

(Çizelge 2.5) OrthoFinder [99] programı ile ortolog genler ve bu genlere dayalı tür ağacı çıkartılmıştır. Bu analiz için kullanılan komut şöyledir:

```
orthofinder.py -M msa
```

MSA (Multiple Sequence Alignment) seçeneği ile MAFFT [100] programı tercih edilerek, ortolog genlerden oluşan tüm diziler birbiriyle hizalanmıştır.

2.4.10. Hareketli Elementlerin Bulunması

Hareketli elementlerin tayini için öncelikli olarak RepeatModeler [101] programı ve aşağıdaki komutlar kullanılarak, örneklerle uygun bir cins kütüphanesi oluşturulmuştur:

```
BuildDatabase -name x assembly.fasta
```

```
RepeatModeler -database x -threads 36 -LTRStruct > out.log
```

Elde edilen kütüphane, RepeatMasker [102] programında kullanılmış ve hareketli elementlerin içeriği elde edilmiştir. Kullanılan komut ise şöyledir:

```
RepeatMasker -e rmbast -x -pa 36 -gff -lib consensi.fa.classified assembly.fasta
```

Hareketli elementlerin daha detaylı sınıflandırılması için RepeatExplorer2 [103] web sitesi kullanılmıştır. Ortaya çıkan sınıf ve alt sınıflar bulunma yüzdeleriyle birlikte Çizelge 3.5 ve Şekil 3.6'da verilmiştir.

2.4.11. Ploidi Analizleri

Anotasyon basamağında elde edilen dosyalar kullanılarak poliploidinin kökenin aydınlatılması için Python temelli olan wgd v2 [104] aracı kullanılmıştır. Bu aracın iş akışı, birbirini takip eden altı basamaktan oluşmaktadır. Basamaklar sırasıyla şu şekilde çalıştırılmıştır:

- wgd dmd *.polished3.fasta o wgd_dmd
- wgd ksd wgd_dmd/*. polished3.fasta.tsv *.polished3.fasta -o wgd_ksd
- wgd syn -f mRNA -a Name wgd_dmd/*.polished3.fasta.tsv *.polished3.fasta.gff3 -ks wgd_ksd/*.polished3.fasta.tsv.ks.tsv -o wgd_syn

- wgd peak --heuristic wgd_ksd/*.polished3.fasta.tsv.ks.tsv -ap wgd_syn/iadhore-out/anchorpoints.txt -sm wgd_syn/iadhore-out/segments.txt -le wgd_syn/iadhore-out/list_elements.txt -mp wgd_syn/iadhore-out/multiplicon_pairs.txt -n 1 4 -kc 3 -o wgd_peak
- wgd dmd -f P.vulgaris -ap wgd_peak/AnchorKs_FindPeak/*.polished3.fasta.tsv.ks.tsv_95%CI_AP_for_dating_weighted_format.tsv -o wgd_dmd_ortho *eklenen dış gruplar* *.polished3.fasta

2.4.11.1. Paleopolipolidi Zamanı Tahmini

Yukarıda verilen basamakların devamında wgd v2 programında “focus” komutu ile paleopoliplodinin gerçekleştiği zaman tahminlemesi yapılmıştır. Bu analiz basamağı her örnek için iki kez gerçekleştirilmiştir ve böylece iki olayın da zamanı hesaplanabilmiştir:

- wgd focus --protocoding --aamodel lg wgd_dmd_ortho/merge_focus_ap.tsv -sp dating_tree.nw -o wgd_dating -d mcmctree -ds 'burnin = 2000' -ds 'sampfreq = 1000' -ds 'nsample = 20000' *eklenen dış gruplar* *.polished3.fasta

mcmctree [105] programı için kullanılan parametre dosyasının içeriği (mcmctree.ctrl) aşağıda verildiği gibi düzenlenip çalıştırılmıştır:

seqfile = Concatenated.paln.paml

treefile = dating_tree.nw

outfile = mcmctree.out

ndata = 1

seqtype = 2

usedata = 2 * 0: no data; 1:seq; 2:approximation; 3:out.BV (in.BV)

clock = 2

RootAge = <5.00

model = 1

alpha = 0.5

ncatG = 5

cleandata = 0

BDparas = 1 1 0.1

kappa_gamma = 6 2

alpha_gamma = 1 1

rgene_gamma = 2 20 1

sigma2_gamma = 1 10 1

finetune = 1: .1 .1 .1 .1 .1 .1

print = 1

burnin = 2000

sampfreq = 1000

nsample = 20000

Son iki basamakta eklenen ve poliploidinin gerçekleştiği zamanların tahminlemesi analizinde karşılaştırılan dış gruplar ise şöyledir: *Punica granatum* L., *Syzygium aromaticum* L., *Eucalyptus grandis* W. Hill, *Tripterygium wilfordii* Hook.f., *Populus trichocarpa* Torr., *Manihot esculenta* Crantz, *Vernicia fordii* (Hemsl.) Airy Shaw, *Artocarpus nanchuanensis* S.S. Chang, *Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl, *Prunus persica* (L.) Batsch, *Begonia fuchsioides* Hook, *Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn, *Cucurbita argyrosperma* C. Huber, *Quercus rubra* L., *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch, *Juglans regia* L., *Polygala tenuifolia* Willd.

2.4.11.2. Duplikasyon Çeşitlerinin Tespit Edilmesi

Tüm genom duplikasyonu (poliploidi) haricinde genomdaki diğer duplikasyon çeşitlerinin analizinde R programlama dilinde yazılan doubletrouble [106] programı kullanılmıştır. Bu analiz kapsamında temel olarak segmental duplikasyonlar (SD), küçük ölçekli duplikasyonlar (small-scale duplications, SSD), tandem duplikasyonlar (TD), proksimal duplikasyonlar (PD) ve dağınık duplikasyonlar (DD) ele alınmıştır. Programın temel olarak kullandığı iki dosya anotasyon basamağında elde edilen *.gff ve aminoasit dizilimlerinin olduğu dosyalardır. Bu verilerin tanıtılmasından sonra paralog gen çiftlerini tanımlamak için DIAMOND [107] programı kullanılmaktadır. DIAMOND, R programı haricinde bilgisayara terminal üzerinden kurulup, yolu verilerek çalıştırılmıştır:

```
seq <- list(Biostrings::readAAStringSet("~/aa.pep"))

annot <- list(rtracklayer::import("~/gff"))

pdata <- process_input(seq, annot)

diamond_path <- "/opt/homebrew/bin"

Sys.setenv(PATH = paste(diamond_path, Sys.getenv("PATH"), sep = ":"))

diamond_intra <- run_diamond( seq = pdata$seq, compare = "intraspecies", ...
= "--sensitive" ))

cpairs <- classify_gene_pairs(annotation = pdata$annotation, blast_list =
diamond_intra, scheme = "standard" )

c_binary <- classify_gene_pairs(annotation = pdata$annotation, blast_list =
diamond_intra, scheme = "binary")

c_standard <- classify_gene_pairs( annotation = pdata$annotation, blast_list =
diamond_intra, scheme = "standard")
```

Beş bireyden oluşan analizler tamamlandığında karşılaştırma ve yorum yapabilmek adına *Polygala tenuifolia*'nın yayınlanmış gff ve peptid dosyaları kullanılarak, analize dahil edilmiştir
(<https://cbcb.cdutcm.edu.cn/TCMPG/resource/genomes/details/?id=TCMPG201>)

96). Böylelikle beş adet tetraploid birey, aynı cinsten bir diploid birey ile karşılaştırılmıştır.

2.4.11.3. Poliploid Türün Ortaya Çıkış Zamanı

Poliploidinin gerçekleşme zamanı bulunduğundan sonra, ortologlara dayalı gen ağacı ve ortolog genlerin hizalanmış dosyası kullanılarak *Polygala vulgaris*'in ortaya çıkış zamanı tahmin edilmiştir. Yine bu analize Çizelge 2.5'te verilen türler dahil edilmiş olup, seçilen türler için ortaya çıkış zamanları kalibrasyona eklenmek üzere TimeTree [108] kütüphanesinden erişilmiştir. OrthoFinder analizinden elde edilen gen ağacının üzerine kalibrasyon zamanları eklenerek analize verilecek olan son ağaç dosyası elde edilmiştir ve bu son ağaç dosyası ile hizalanmış sekans dosyası kullanılarak MCMCtree programı yürütülmüştür. Görselleme için MCMCtreeR programı aşağıdaki parametrelerle kullanılmıştır [109].

```
mcmc_data <- read.table("~/Desktop/mcmc.txt", header = TRUE, sep = "")
mcmc_phy <- readLines("~/Desktop/figtree.tre")
phy <- readMCMCtree(mcmc_phy, from.file = FALSE)

MCMC.tree.plot(phy, cex.tips = 0.4, time.correction = 100, scale.res = c("Eon",
                                                                    "Period", "Epoch", "Age"),
plot.type = "phylogram", cex.age = 0.4,
cex.labels = 0.5, relative.height = 0.08, col.tree = "grey40",
label.offset = 4, node.method = "none", no.margin = TRUE)
```

Bütün programlar ve komutlar işlem sırasına göre <https://github.com/ilayda gulmez/Pipeline-of-Genome-Characterization> adresinde paylaşılmıştır.

Çizelge 2.5. Ortolog genlere dayalı gen ağacında kullanılan örnekler.

Tür	Familiya	Referans
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Brassicaceae</i>	https://ftp.ebi.ac.uk/ensemblgenomes/pub/release-60/plants/fasta/arabidopsis_thaliana/pep/
<i>Glycine max</i>	<i>Fabaceae</i>	https://ftp.ebi.ac.uk/ensemblgenomes/pub/release-60/plants/fasta/glycine_max/pep/
<i>Malus domestica</i>	<i>Rosaceae</i>	https://ftp.ebi.ac.uk/ensemblgenomes/pub/release-60/plants/fasta/malus_domestica_golden/pep/
<i>Musa acuminata</i>	<i>Musaceae</i>	https://ftp.ebi.ac.uk/ensemblgenomes/pub/release-60/plants/fasta/musa_acuminata/pep/
<i>Nicotiana attenuata</i>	<i>Solanaceae</i>	https://ftp.ebi.ac.uk/ensemblgenomes/pub/release60/plants/fasta/nicotiana_attenuata/pep/
<i>Oryza sativa</i>	<i>Poaceae</i>	https://ftp.ebi.ac.uk/ensemblgenomes/pub/release-60/plants/fasta/oryza_sativa/pep/
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Fabaceae</i>	https://ftp.ebi.ac.uk/ensemblgenomes/pub/release-60/plants/fasta/phaseolus_vulgaris/pep/
<i>Polygala tenuifolia</i>	<i>Polygalaceae</i>	https://cbcb.cdutcm.edu.cn/TCMPG/resource/genomes/details/?id=TCMPG20196
<i>Polygala vulgaris</i>	<i>Polygalaceae</i>	Tez çalışması
<i>Trifolium pratense</i>	<i>Fabaceae</i>	https://ftp.ebi.ac.uk/ensemblgenomes/pub/release-60/plants/fasta/trifolium_pratense/pep/

<i>Triticum aestivum</i>	<i>Poaceae</i>	https://ftp.ebi.ac.uk/ensemblgenomes/pub/release-60/plants/fasta/triticum_aestivum/pep/
<i>Vicia faba</i>	<i>Fabaceae</i>	https://ftp.ebi.ac.uk/ensemblgenomes/pub/release-60/plants/fasta/vicia_faba/pep/
<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitaceae</i>	https://ftp.ebi.ac.uk/ensemblgenomes/pub/release-60/plants/fasta/vitis_vinifera/pep/
<i>Zea mays</i>	<i>Poaceae</i>	https://ftp.ebi.ac.uk/ensemblgenomes/pub/release-60/plants/fasta/zea_mays/pep/

3. SONUÇLAR

3.1. Taksonların Genom Yapıları

Polygala vulgaris örneklerinin genetik yapıları Yeni Nesil Dizileme yöntemi kullanılarak elde edilen YHD verisi üzerinden incelenmiş ve beş bireyin DNA dizilimi kalite skorlarını içeren istatistikler Çizelge 3.1’de verilmiştir. Bu verilere göre örneklerin toplam okuma sayısı 139,424,364- 171,527,020; toplam baz sayısı 21,053,078,964- 25,900,580,020; Q20 kalite skoru %93,1 – 96,2 ve GC oranı %38,8 – 39,1 arasında elde edilmiştir. Ham verilerin işlenmeye başlanmasıyla, filtreleme işlemi sonrası adaptör ve düşük okumalardan arınmış veriler Şekil 3.1’de ve istatistikleri Çizelge 3.2’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre toplam okuma sayısı 55.894082 - 132.681986 ; toplam baz sayısı 8.121853 - 19.693153; Q20 kalite skoru %96,1 – 98,9 ; GC oranı %37,81 – 38,9 arasında değişmektedir.

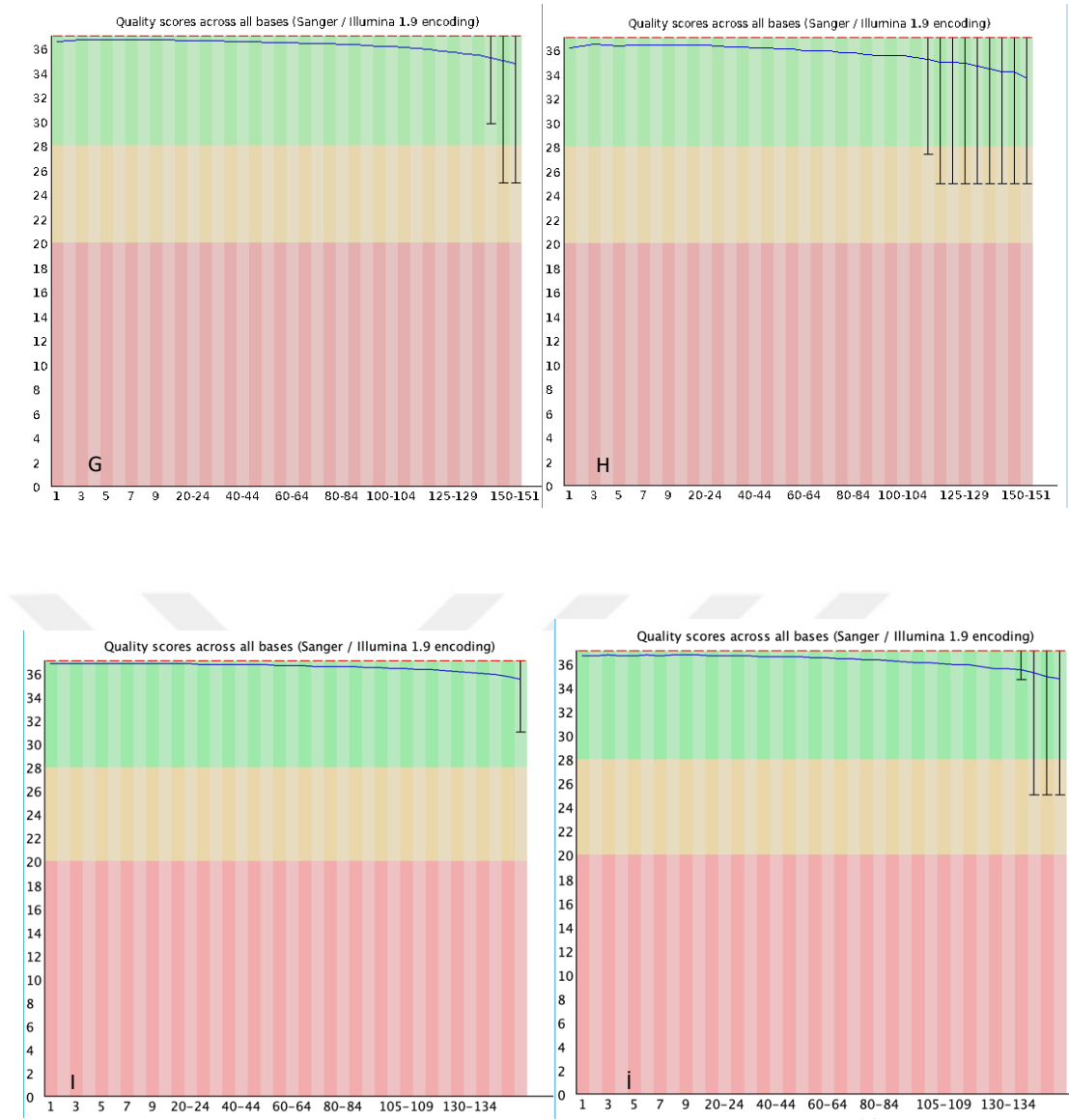
Çizelge 3.1. Dizileme sonrası istatistikler.

Toplayıcı Numarası	Illumina Platform	Toplam Okuma Sayısı	Toplam Baz Sayısı (bp)	Q20 Kalite Skoru (%)	GC Oranı (%)
AAD20628_1	TruSeq Nano DNA Kit	139,424,364	21,053,078,964	93.4	39,1
AAD20628_8	TruSeq PCR-Free Kit	168,171,938	25,393,962,638	93,5	38,8
AAD20628_9	TruSeq Nano DNA Kit	142,573,556	21,528,606,956	93,1	38,9
AAD20896_1	TruSeq Nano DNA Kit	171,527,020	25,900,580,020	96.2	39
AAD20896_2	TruSeq Nano DNA Kit	140,768,014	21,255,970,114	94,1	39,1

Çizelge 3.2. Verilerin filtreleme ve doğrulama işlemleri sonrası istatistikleri.

Toplayıcı Numarası	Toplam Okuma Sayısı	Toplam Baz Sayısı	Q20 Kalite Skoru (%)	GC Oranı (%)
AAD20628_1	55.894082 M	8.391216 G	98.9	37.81
AAD20628_8	54.043442 M	8.121853 G	98.8	37.87
AAD20628_9	43.777862 M	6.580952 G	98.7	37.87
AAD20896_1	132.681986 M	19.693153 G	96.1	38.4
AAD20896_2	73.341194 M	10.986657 G	98.9	38.9



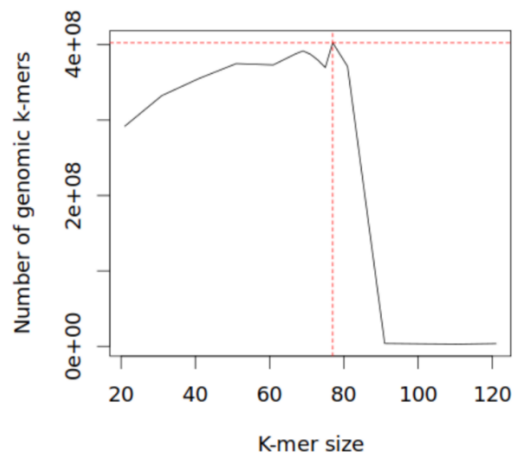


Şekil 3.1. Filtreleme işlemi sonrası adaptör ve düşük okumalardan arınmış veriler. **A.** AAD20628_1 birinci okuma. **B.** AAD20628_1 ikinci okuma. **C.** AAD20628_8 birinci okuma. **D.** AAD20628_8 ikinci okuma. **E.** AAD20628_9 birinci okuma. **F.** AAD20628_9 ikinci okuma. **G.** AAD20896_1 birinci okuma. **H.** AAD20896_1 ikinci okuma. **I.** AAD20896_2 birinci okuma. **İ.** AAD20896_2 ikinci okuma.

Filtreleme işlemi sonrası, örneklerin optimum k -mer'leri analiz edilmiştir ve sonuçlar Şekil 3.2'de verilmiştir.

Predicted best k: 77

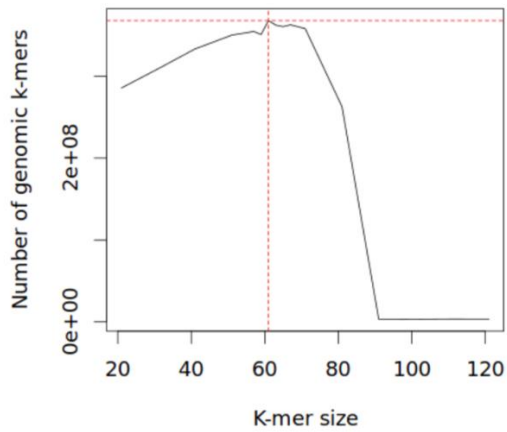
Predicted assembly size: 402593111 bp



A

Predicted best k: 61

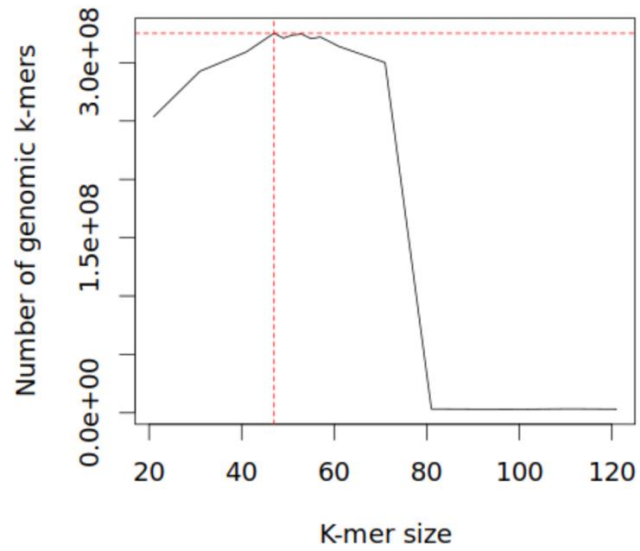
Predicted assembly size: 367781733 bp



B

Predicted best k: 47

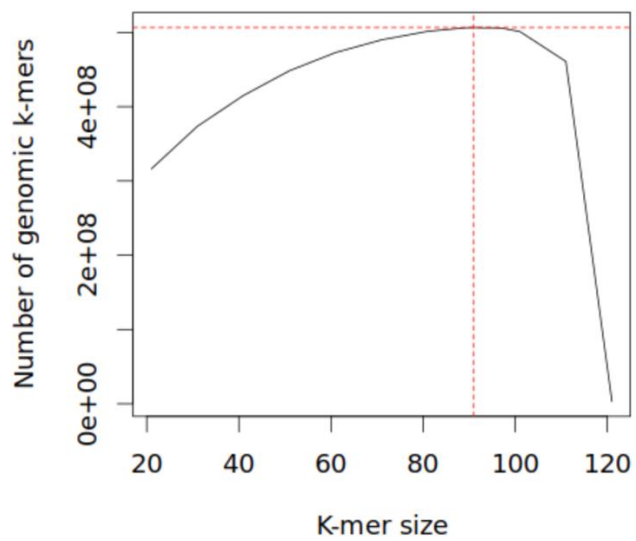
Predicted assembly size: 325252679 bp



C

Predicted best k: 91

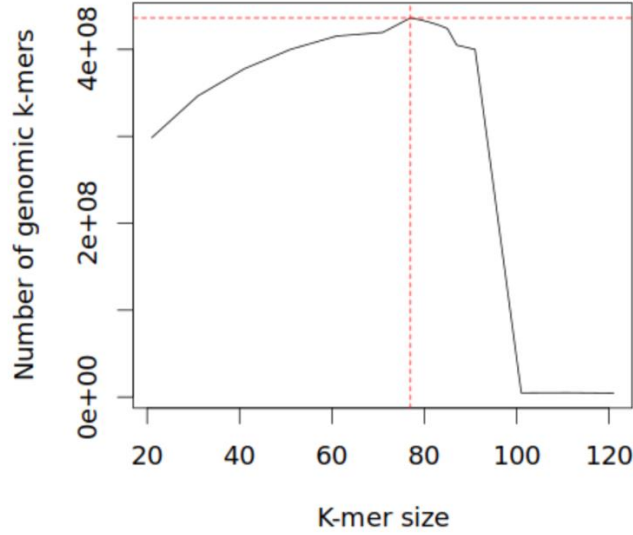
Predicted assembly size: 506578395 bp



D

Predicted best k: 77

Predicted assembly size: 436158775 bp



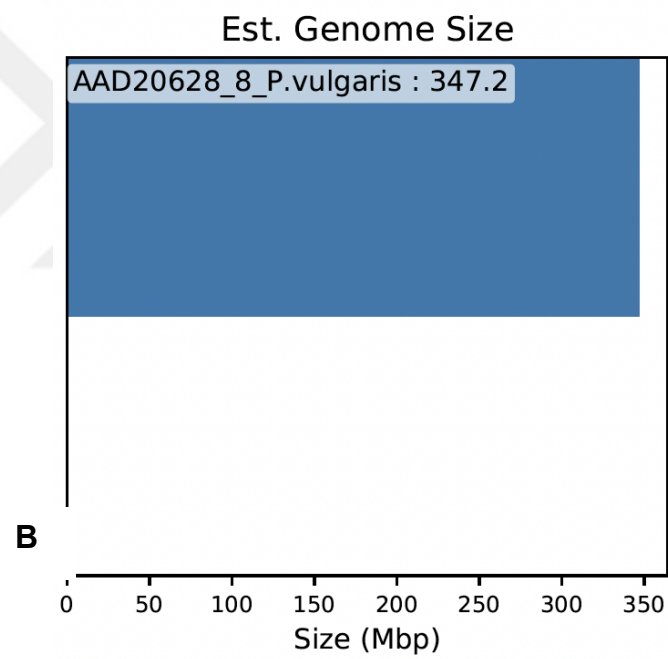
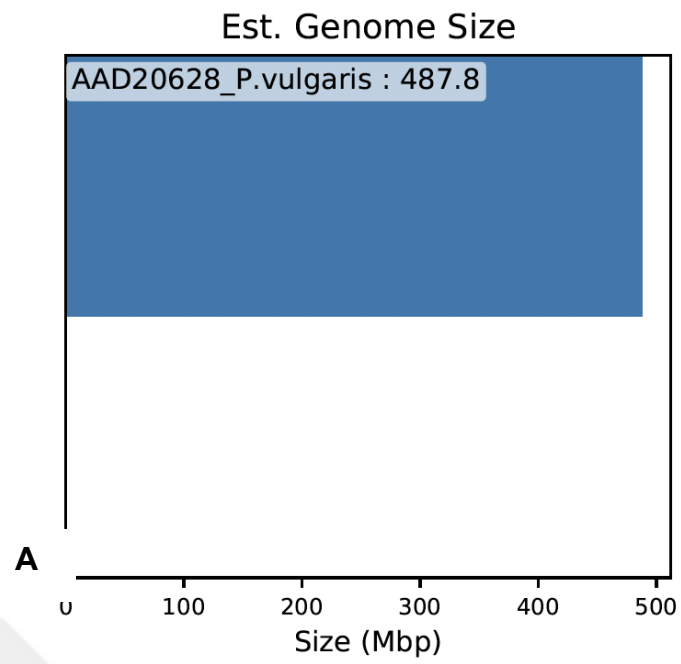
E

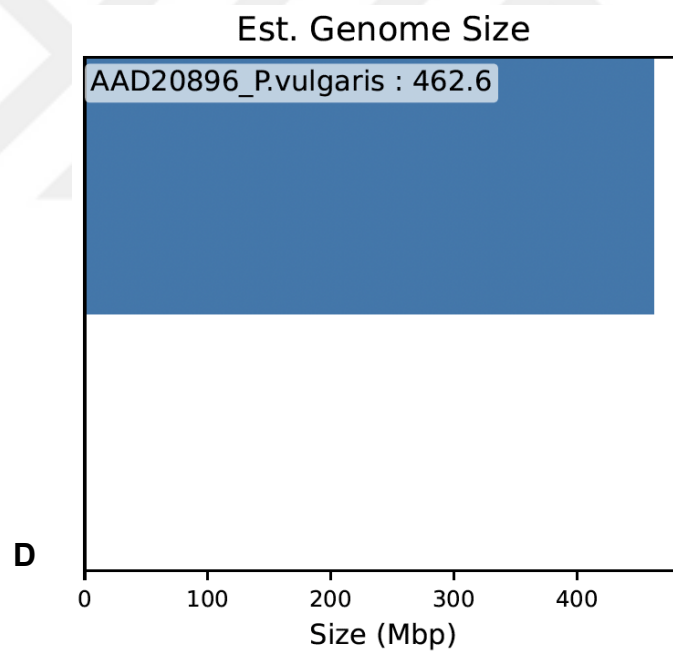
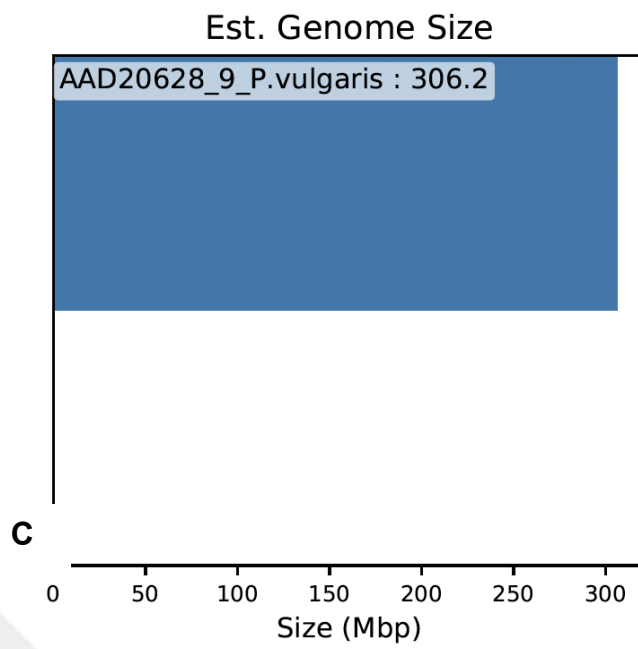
Şekil 3.2. *Polygala vulgaris* bireylerinin optimum *k*-mer sayıları. **A.** AAD20628_1 **B.** AAD20628_8 **C.** AAD20628_9 **D.** AAD20896_1 **E.** AAD20896_2

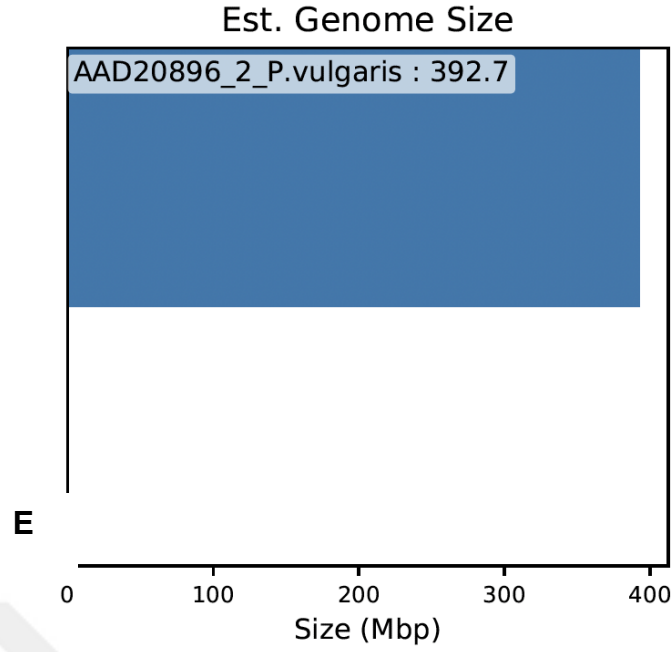
AAD20628_1 için 77 *k*-mer uzunluğu, AAD20628_8 için 61, AAD20628_9 için 47, AAD20896_1 için 91 ve AAD20896_2 için ise 77 olarak hesaplanmış, sonrasındaki işlemlerde bu değerler kullanılarak analizler yapılmıştır.

3.1.1. Genom Boyutu ve Heterozigotluk Hesaplamaları

Genom boyutu tahminlemede kullanılan programlar akış sitometri sonuçlarıyla kıyaslandığında, en yüksek başarıyı SGA programı elde etmiştir. Örneklerin SGA programı tarafından hesaplanan genom boyutu tahminleri Şekil 3.3'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre örneklerin genom boyutu tahminleri 1224 – 1951 Mb aralığında değişmektedir.



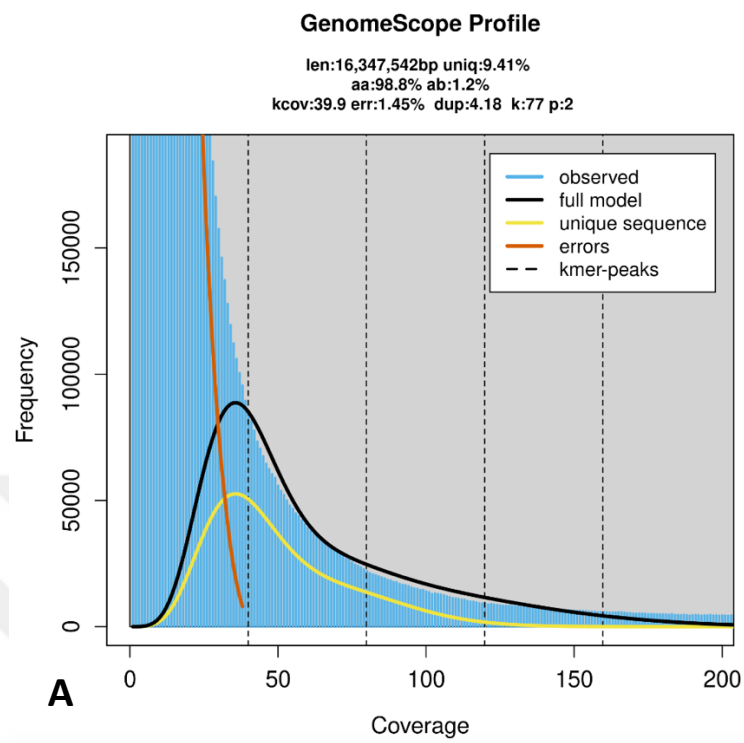




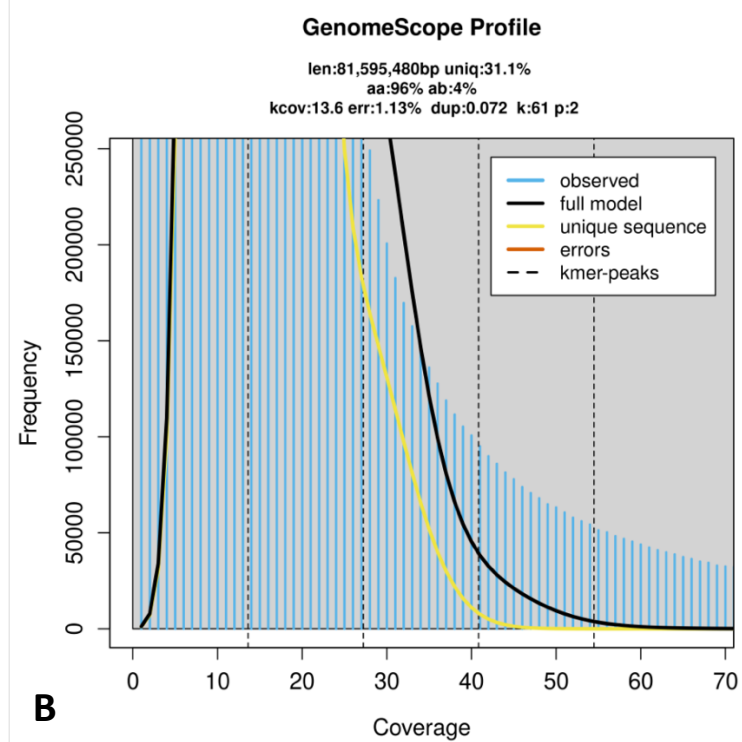
Şekil 3.3. Örneklerin SGA ile elde edilen genom boyut tahminleri. **A.** AAD20628_1. **B.** AAD20628_8. **C.** AAD20628_9. **D.** AAD20896_1. **E.** AAD20896_2.

Kmergenie ve GenomeScope programlarıyla elde edilen genom boyutu tahminleri, heterozigotluk yüzdeleri (Şekil 3.4) ve her üç programın akış sitometri sonuçlarıyla karşılaştırılmalı sonuçları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

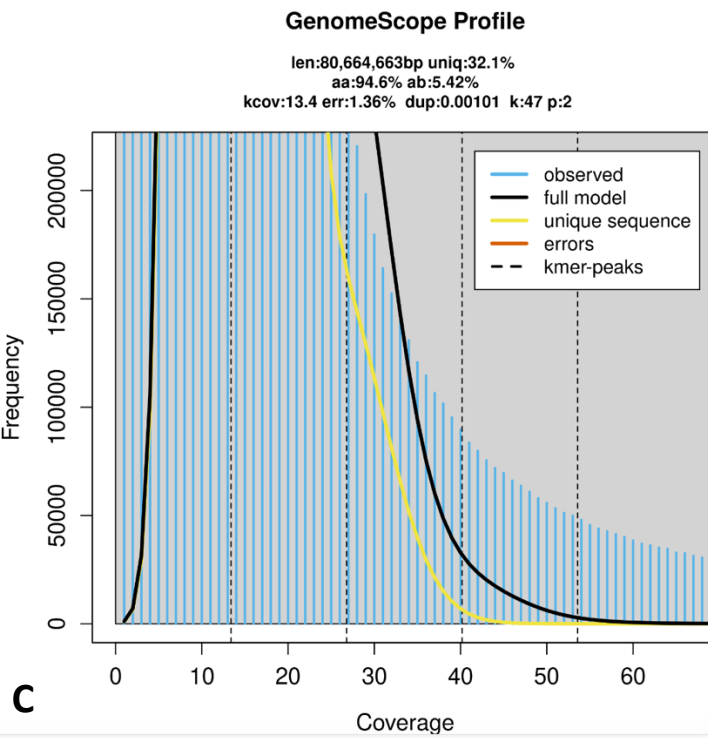
20628_1



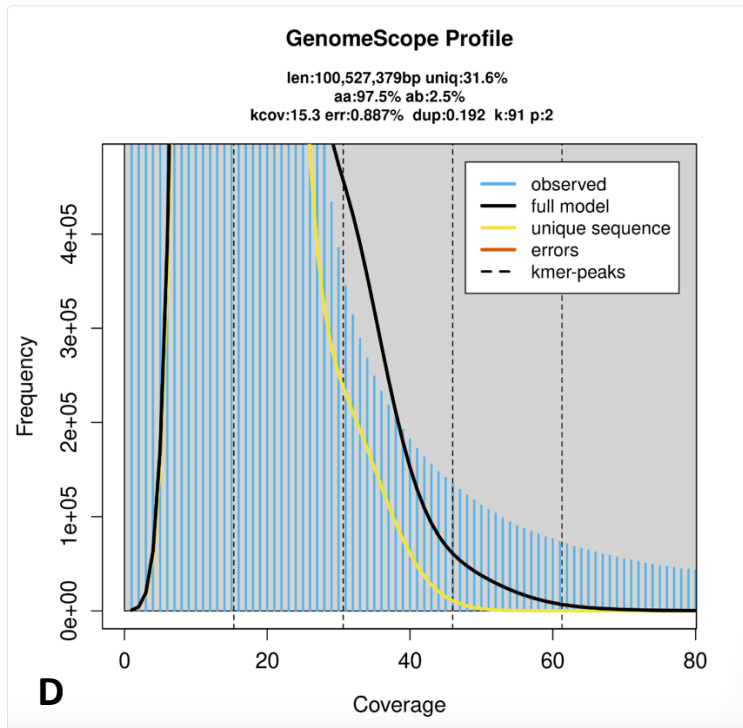
20628_8



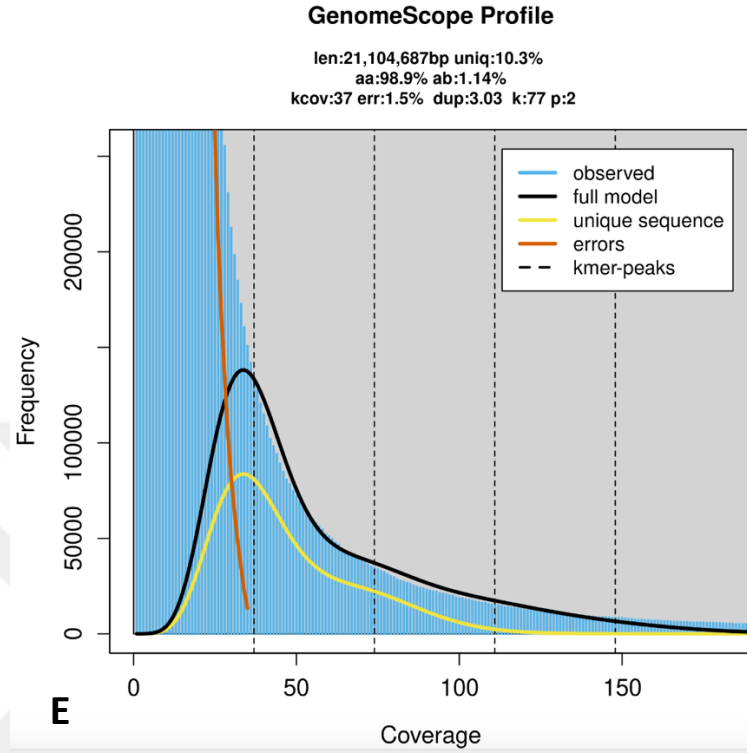
20628_9



20896_1



20896_2



Şekil 3.4. Örneklerin genom heterozigotluk seviyeleri. **A.** AAD20628_1 **B.** AAD20628_8 **C.** AAD20628_9. **D.** AAD20896_1 **E.** AAD20896_2. **len:** Toplam genom uzunluğu. **unig:** Genomdaki benzersiz kısımlar. **aa:** Homozigotluk. **ab:** Heterozigotluk. **kcov:** K-mer kapsama oranı **err:** Okuma hatası oranı. **dup:** Okuma kopyası oranı.

Çizelge 3.3. Beş bireyde genom boyutu tahminleme programlarının karşılaştırmalı sonuçları.

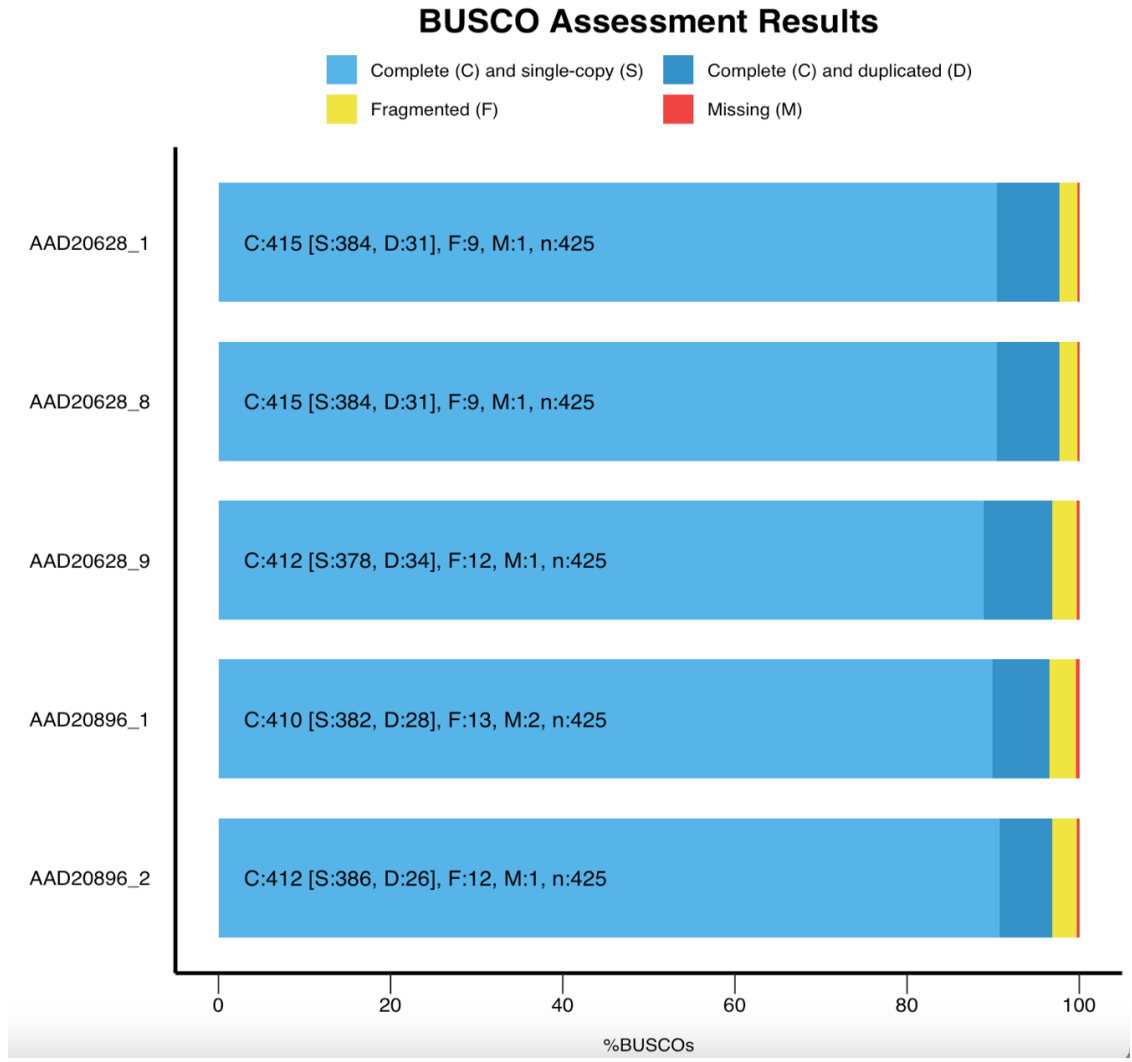
K-mer Tabanlı Olmayanlar			K-mer Tabanlı Programlar			
Örnekler	*FCM Ortalaması (Mb)	SGA (Mb)	Kmergenie (Mb)	GenomeScope (Mb)	Heterozigotluk (%)	Optimum k-mer

AAD20628_1	1.819	487.8x4= 1951,2	403x4= 1612	17x4= 68	1.2x4= 4.8	77
AAD20628_8	1.819	347.2x4= 1388,8	367x4= 1468	82x4= 328	4x4= 16	61
AAD20628_9	1.819	306.2x4= 1224,8	325x4= 1300	81x4= 324	5.42x4= 21.68	47
AAD20896_1	2.004	462.6x4= 1850,4	506x4= 2024	101x4= 404	2.5x4= 10	91
AAD20896_2	2.004	392.7x4= 1570,8	436x4= 1744	22x4= 88	1.14x4= 4.56	77

*Akış sitometri sonucundan Mb cinsinde genom boyutunu bulmak için 0.978 ile çarpılmıştır.

3.1.2. Genom Montajı (Assembly) Kalitesi

De novo genom montajı işlemi sonrası örneklerin BUSCO sonuçları Şekil 3.4'te, özet istatiki bulgular ise Çizelge 3.4'te verilmiştir. Bu verilere göre örneklerin genom montajı basamağı ortalama %97 başarı ile hesaplanmıştır. Aynı zamanda D ile temsil edilen genomdaki çoğaltılmış bölgeler, poliploidiye ilişkin bulgu olarak yorumlanmıştır. Örneklerde contig ve scaffold sayılarının yüksek çıkması, poliploid genomlardaki karmaşıklığa ve *de novo* yöntemiyle ilişkili olduğu düşünülmüştür.



Şekil 3.5. Örneklerin BUSCO sonuçlarıyla elde edilen genom montajı kaliteleri.
(C: Tamamlanmış, D: Çoğaltılmış, F: Parçalanmış, M: Eksik)

Çizelge 3.4. Çalışılan örneklerin genom montajı (assembly) basamağı sonrası istatistikleri.

Örnek	BUSCO (%)	*N50 (Mb)	Assembly Boyutu (bp)	Contig Sayısı	İskele (Scaffold) Sayısı
AAD20628_1	97.7	5	33400204 2	143211	69661

AAD20628_8	97.7	5	32428301 4	154967	77919
AAD20628_9	96.9	5	31064348 6	148711	78586
AAD20896_1	96.5	7	38439979 7	138915	64549
AAD20896_2	96.9	2,4	37281192 2	179128	95518

***N50 değeri** özellikle genom birleştirme işleminde contig uzunluklarını refere etmekte ve birleştirme işleminin kalitesini tanımlamaktadır.

3.2. Genom Anotasyonu

Tez çalışması kapsamında yer alan beş adet tetraploid bireyin genetik yapılarının içeriği hakkında detaylı bilgiye sahip olmak ve karşılaştırma yapabilmek ve genetik yapıları hakkında fikir sahibi olmak amacıyla anotasyon çalışmaları yürütülmüştür ve bu bağlamda her bireyin hareketli elementleri tespit edilmiştir.

3.2.1. Hareketli Elementler

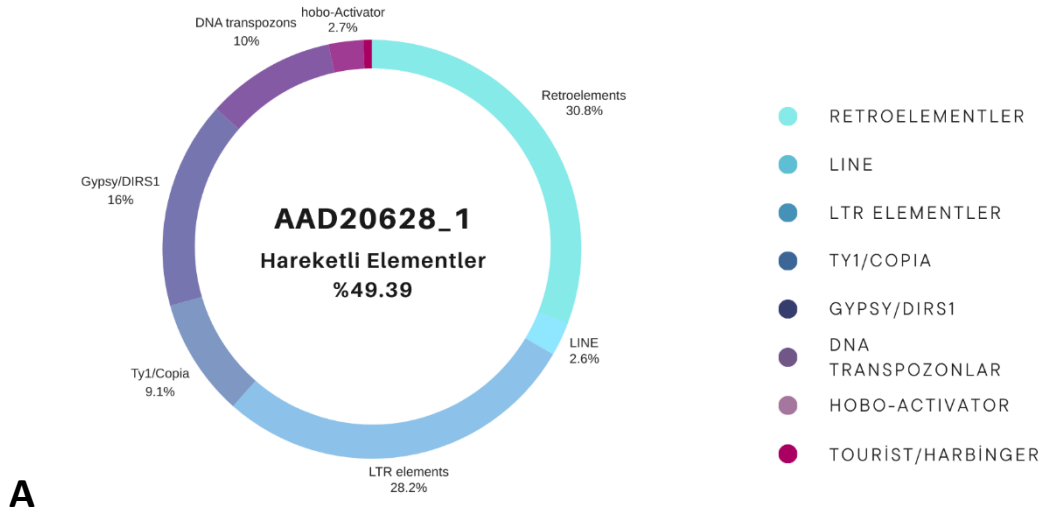
Poliploidinin kökenini anlamada en önemli parametrelerden biri olan hareketli elementler, her örnek için ortaya çıkarılmış ve sonuçları verilmiştir (Şekil 3.5). Çizelge 3.5'te ise hareketli elementler ve bu elementlere ait alt sınıfların bulunma yüzdeleri verilmiştir. Buna göre her bireyin hareketli element içerikleri sırasıyla %49,39, %45,62, %43,16, %51.01 ve %45.15 olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.5. Örneklerle ait hareketli element içerikleri, alt sınıfları ve yüzdeleri.

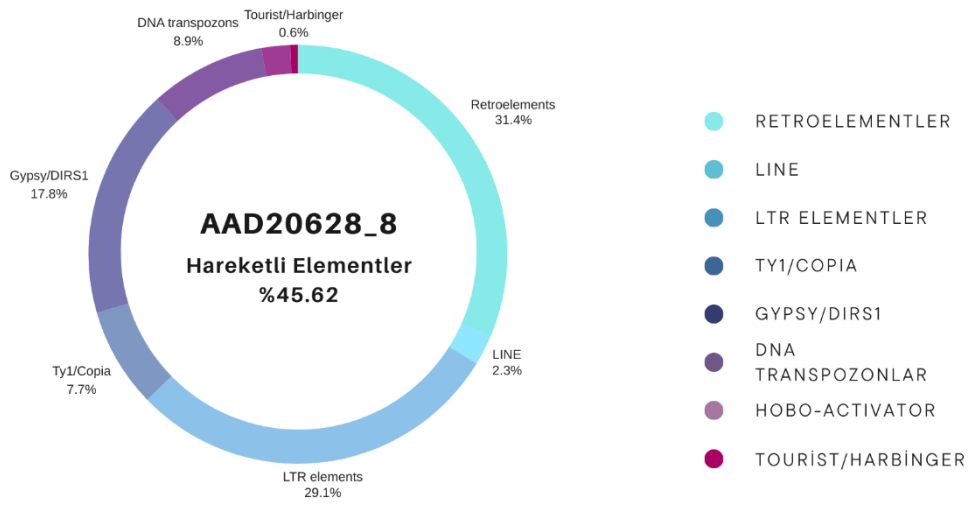
	Tekrarlı (Repeat) Grubu	AAD20628_1	AAD20628_8	AAD20628_9	AAD20896_1	AAD20896_2
Retroelementler (%)		13,33	17,97	15,94	19,41	16,24
	LTR	12,21	16,63	14,55	18,00	14,93
	Ty3/gypsy	6,95	10,18	8,95	12,16	9,50
	CRM	2,48	1,76	2,2	2,21	3,78
	Tekay	4,22	3,61	4,78	3,5	6,77
	Athila	0,69	0,17	0,98	0,08	0,28
	Ogre	0,78	0,6	1,42	0,54	2,65
	Retand	0,67	0,43	0,5	0,25	0,66
	Ty1/Copia	3,95	4,41	3,86	4,18	3,83
	Ikeros	0,45	0,32	0,43	0,25	0,56
	Ivana	0,41	0,35	0,4	0,3	0,48
	Tork	1,15	0,83	1,28	0,74	1,62
	LINE	1,13	1,34	1,4	1,41	1,30
DNA Transpozon (%)		4,33	5,11	5,14	5,44	5,24
	EnSpm_CACTA	2,27	2	2,24	2,15	2,79
	hAT	0,3	0,02	0,14	0,02	0
	hobo-Activator	1,16	1,27	1,26	1,28	1,31
	Tourist/Harbinger	0,3	0,49	0,36	0,32	0,33
Sınıflandırılmayan (%)		30,06	21,21	20,62	25,35	28,46
Toplam TE İçeriği (%)		49,39	45,62	43,16	51,01	45,15

Maskelenen dizilimlere bakıldığında, AAD20628_1 numaralı örnekte tüm genomun %49.39'u, AAD20628_8 numaralı örnekte %45.62'si, AAD20628_9 numaralı örnekte %43.16'sı, AAD20896_1 numaralı örnekte %51.01'i, ve son olarak AAD20896_2 numaralı örnekte ise %45.15'i hareketli elementlerle temsil edilmektedir. Her beş bireyde de en çok Retrotranspozonlar bulunmaktadır. Bu sınıfa ait olan LTR'ler yine her beş bireyde de en fazla miktarda bulunan alt sınıf elementler olarak görülmektedir. Genomdaki % hareketli element içeriklerinin birbirine çok yakın ve yüksek çıkması ise, otopoliploidinin bir göstergesi olarak yorumlanmıştır.

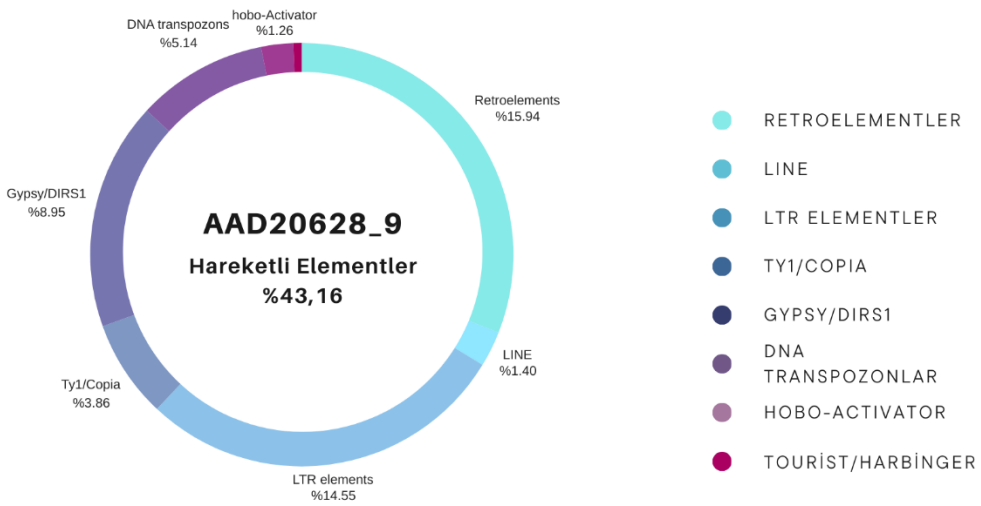
Hareketli elementlerin alt sınıfları RepeatExplorer2 kullanılarak bulunmuştur ve detaylı sınıflandırılmasıyla birlikte örneklerde bulunma yüzdeleri Çizelge 3.5'te verilmiştir.

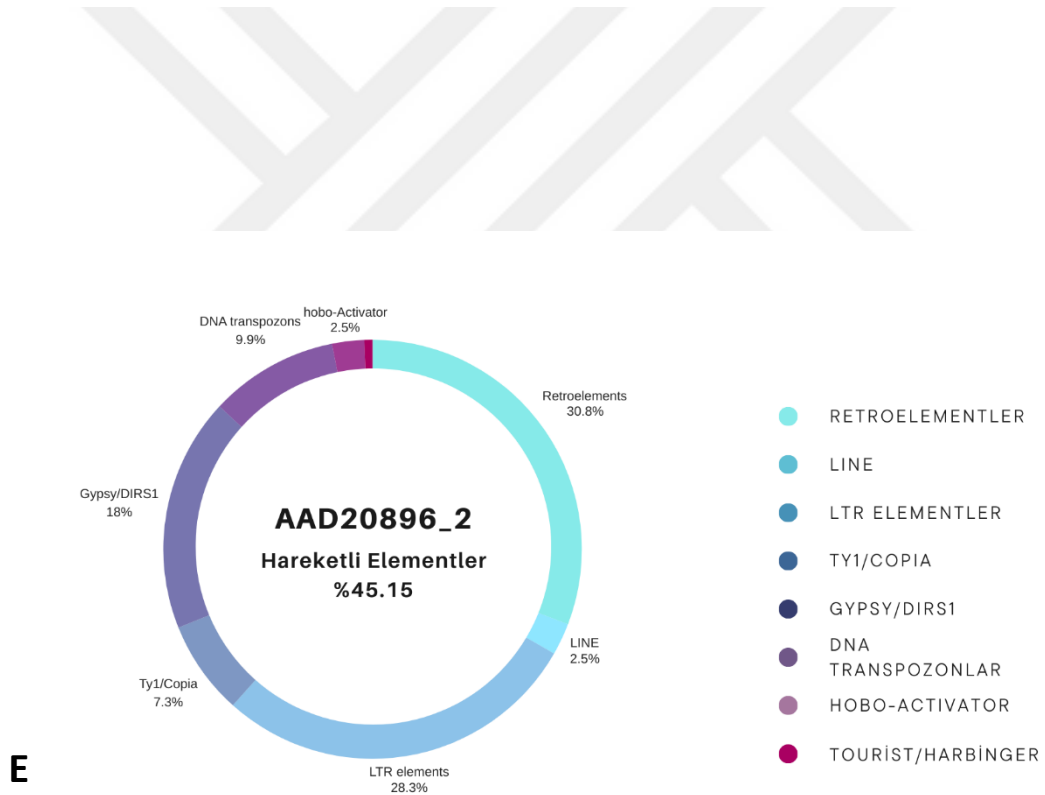
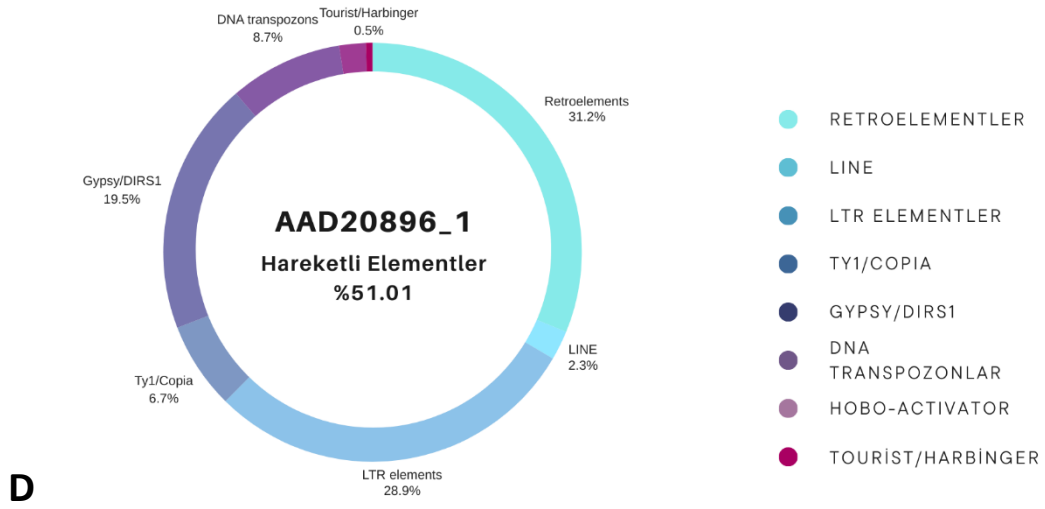


B



C





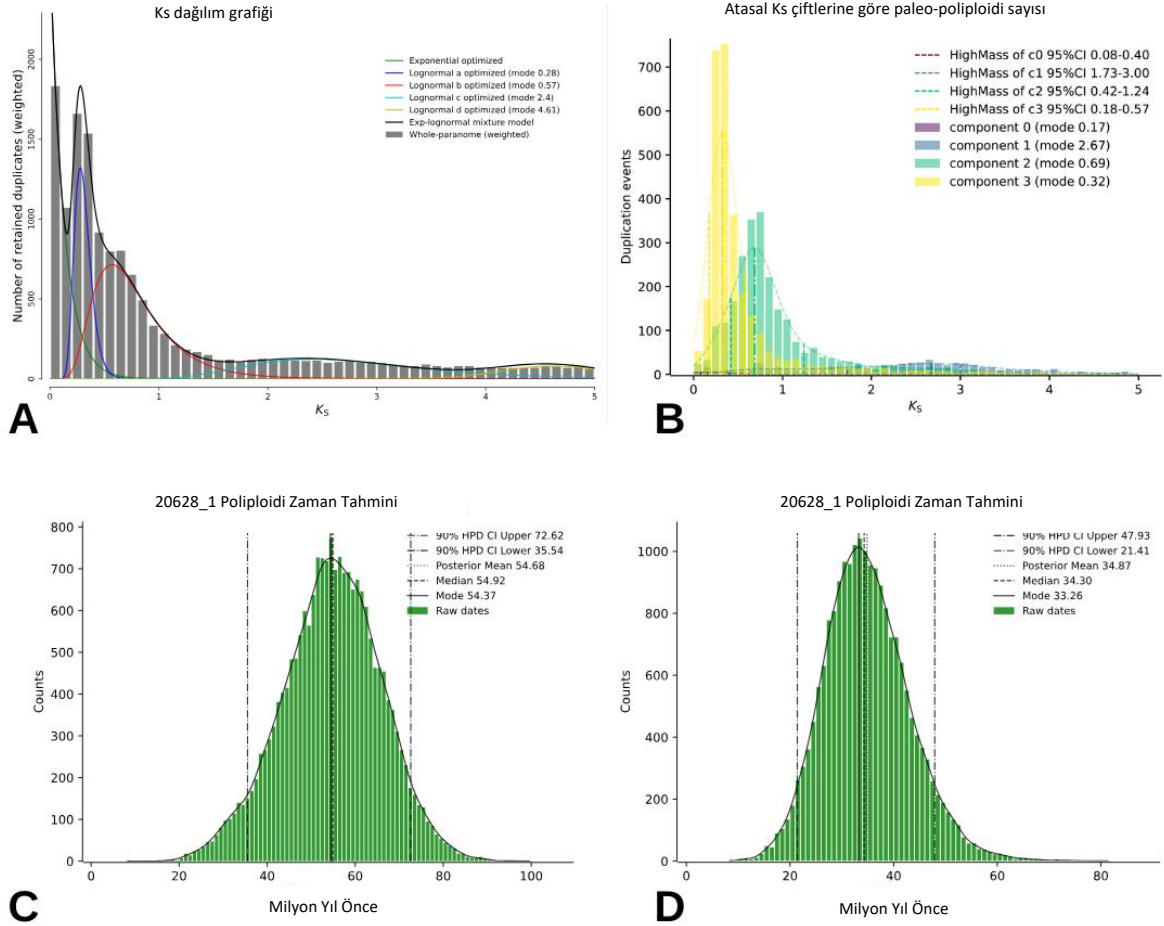
Şekil 3.6. Beş bireye ait hareketli element içeriklerinin grafikte gösterimi. **A.** AAD20628_1 **B.** AAD20628_8 **C.** AAD20628_9. **D.** AAD20896_1. **E.** AAD20896_2.

3.2.2. Ploidi Analizleri

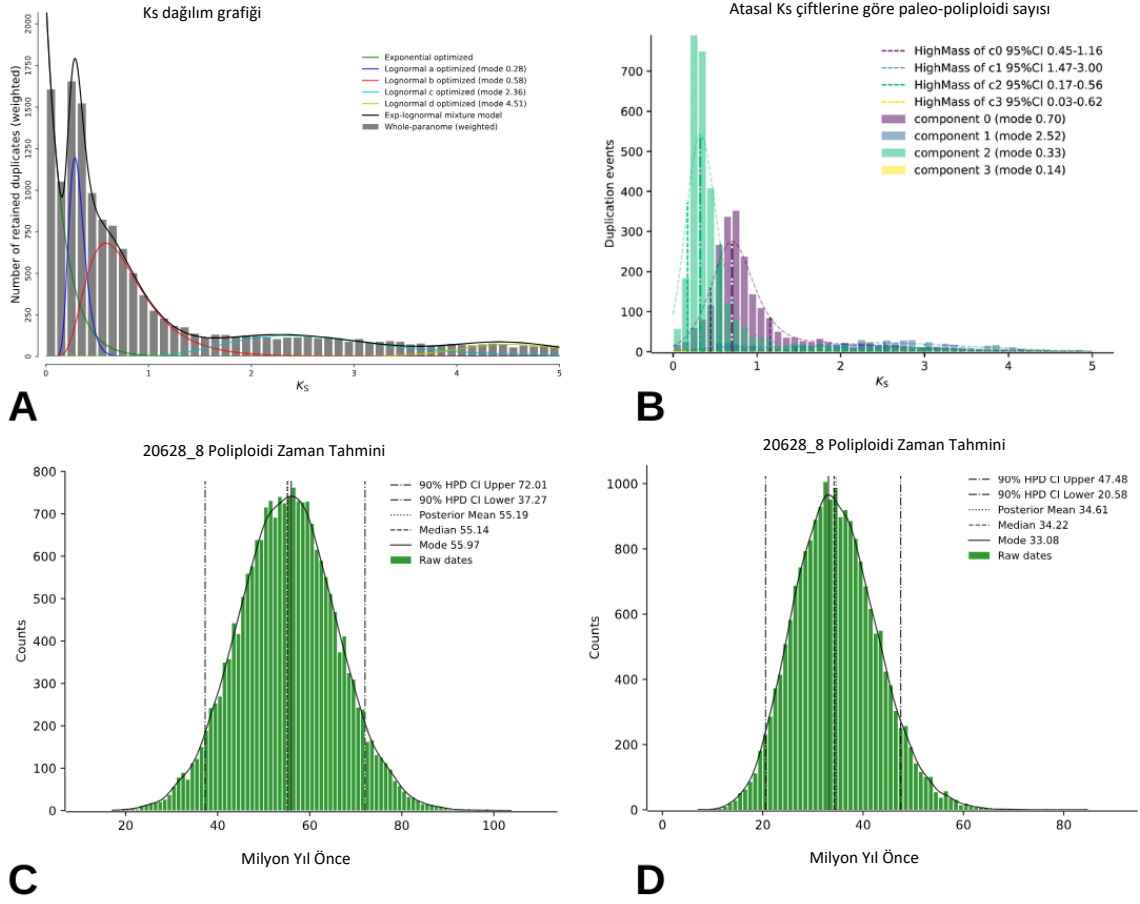
Her beş örneğin *Ks* değerleri wgd v2 aracı kullanılarak elde edilmiştir. Buna göre sonuçlar birbirine yakın ve uyumlu çıkmıştır. (Şekil 3.7-3.11A). Sonuçlara göre *AAD20628_1* için *Ks* değerleri 0.57, *AAD20628_8* için 0.58, *AAD20628_9* için 0.54, *AAD20896_1* için 0.31 ve *AAD20896_2* içinse 0.29 olarak bulunmuştur.

3.2.2.1. Paleopolidi Zamanı Tahmini

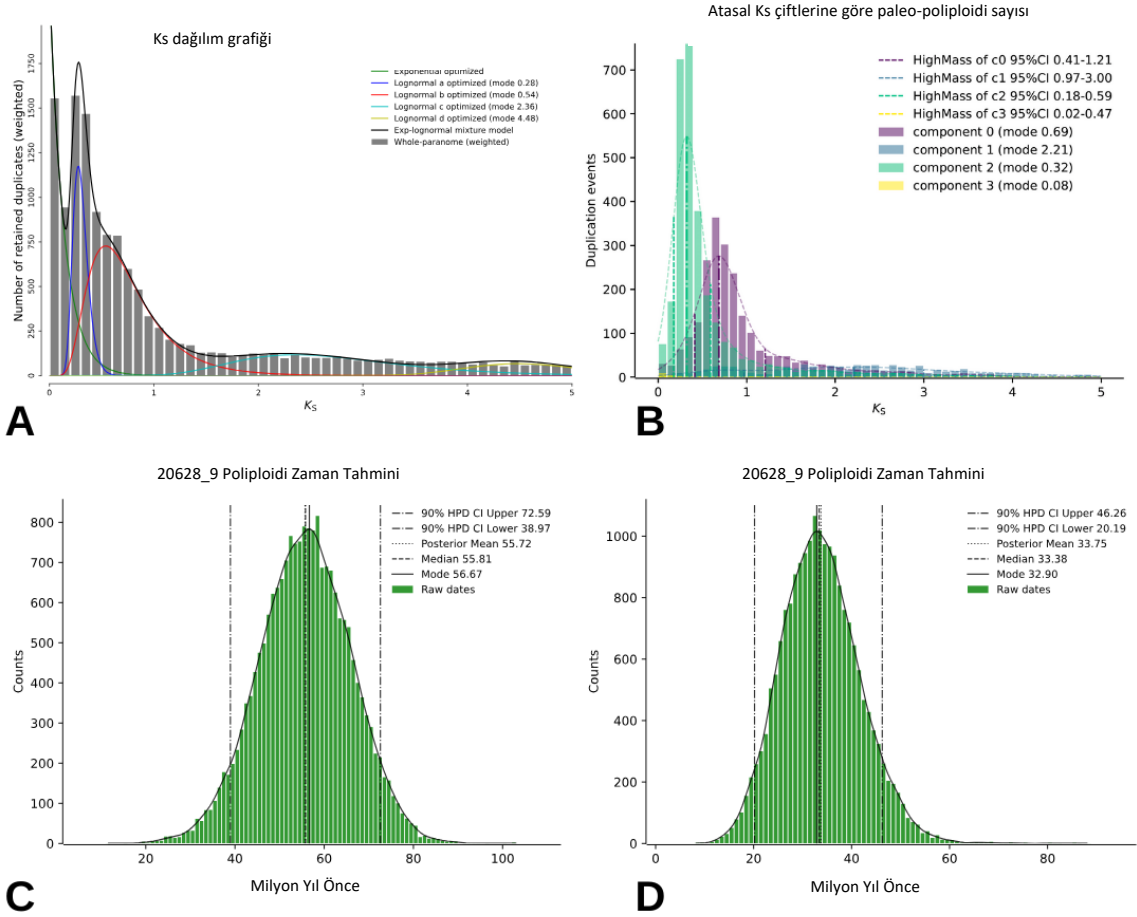
Her beş örnekte de iki adet paleo-poliploidi olayının gerçekleştiği saptanmış ve bu iki olayın yaklaşık zamanları hesaplanmıştır. Tüm bu analizler sonucunda *AAD20628_1* numaralı örneğin ilk poliploidi olayını 54.68 myö ve sonuncusunun ise 34.87 myö gerçekleştirdiği, *AAD20628_8* numaralı örneğin 55.19 myö ve 34.61 myö, *AAD20628_9* numaralı örneğin 55.72 myö ve 33.75 myö, *AAD20896_1* numaralı örneğin 55.19 myö ve 36.27 myö, *AAD20896_2* numaralı örneğin ise 54.98 myö ve 34.78 myö önce gerçekleştiği bulunmuştur (Şekil 3.7- 3.11).



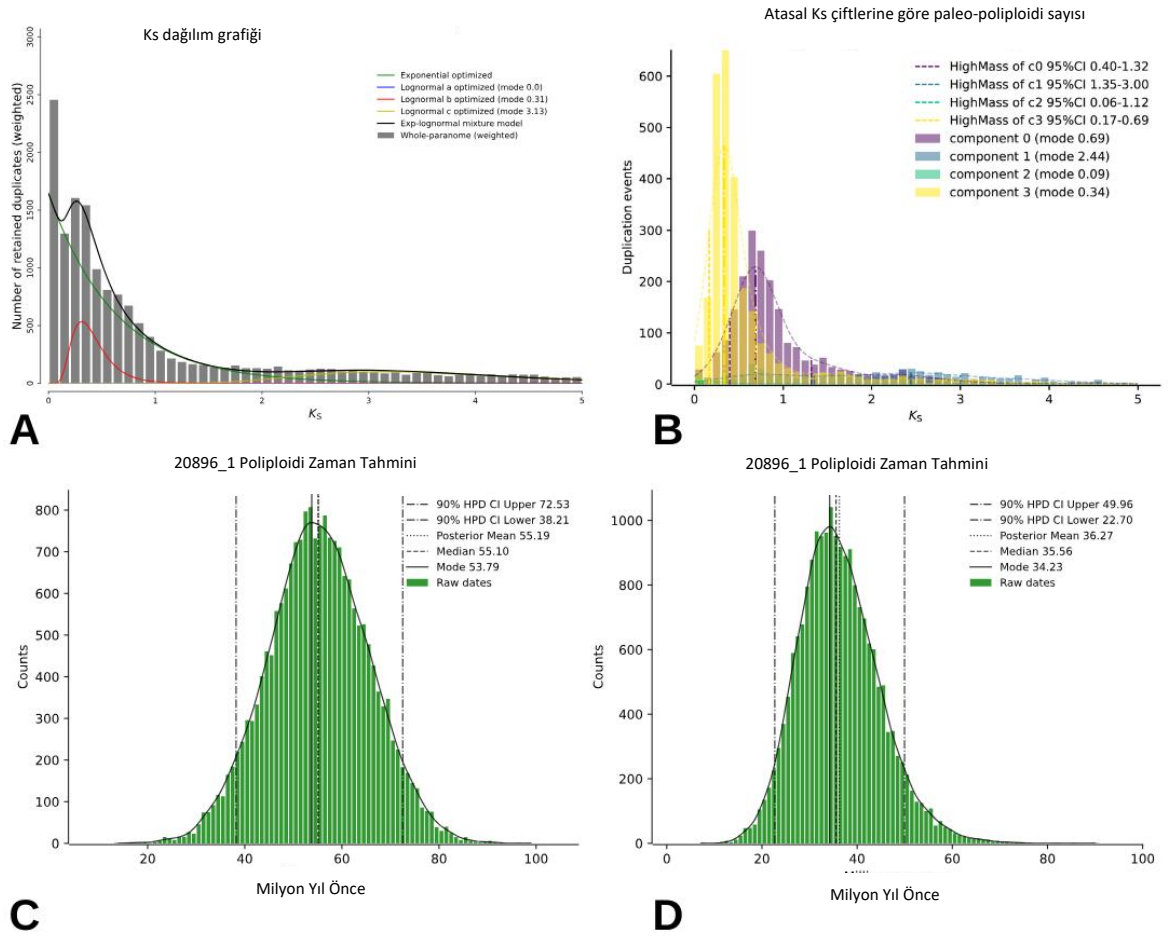
Şekil 3.7. AAD20628_1 numaralı bireye ait poliploidi analizleri. **A.** Ks değerini gösteren grafik. **B.** İki adet paleo-poliploidinin gerçekleştiğini gösteren grafik. **C.** İlk paleo-poliploidinin gerçekleşme zamanı. **D.** Son poliploidinin gerçekleşme zamanı.



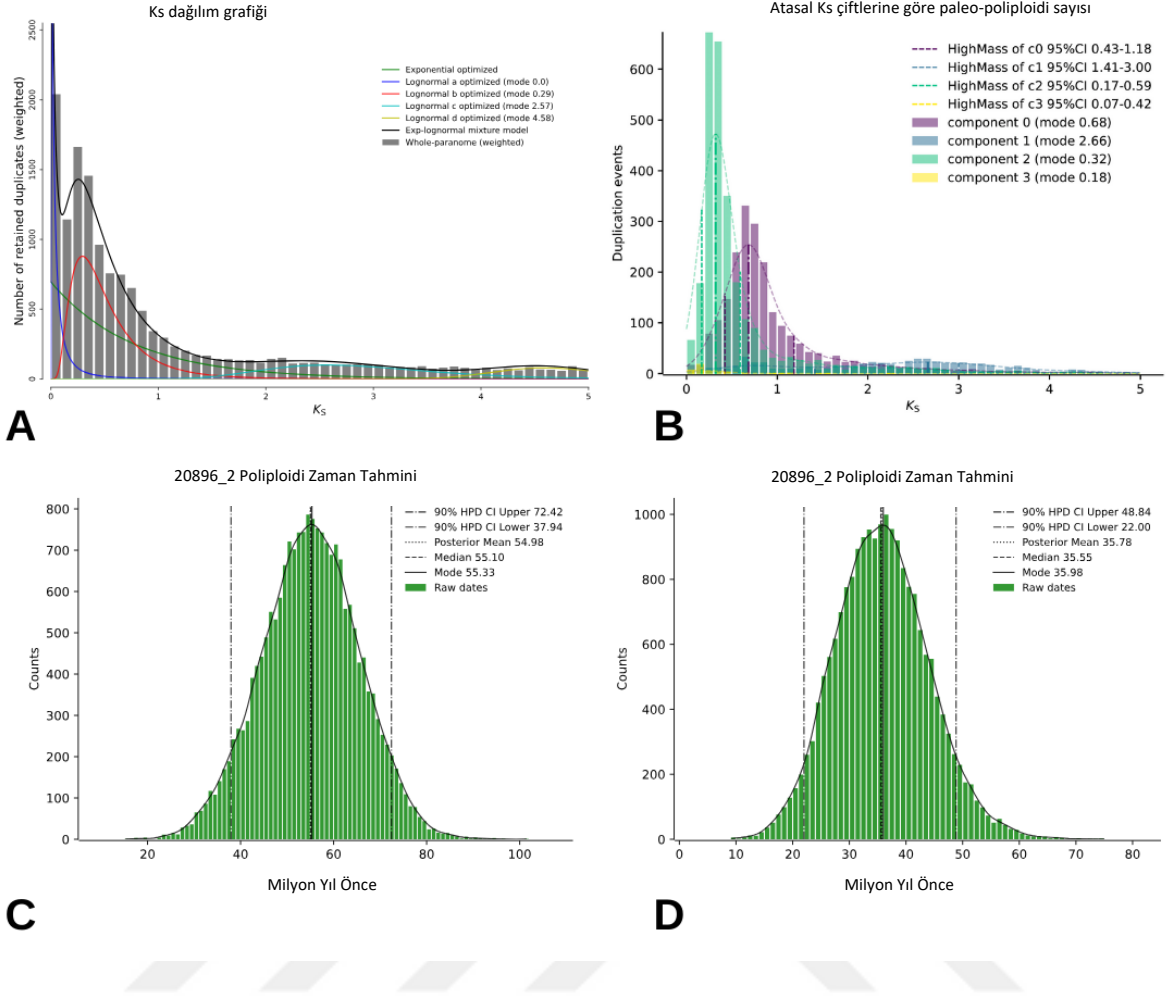
Şekil 3.8. AAD20628_8 numaralı bireye ait poliploidi analizleri. **A.** Ks değerini gösteren grafik. **B.** İki adet paleo-poliploidinin gerçekleştiğini gösteren grafik. **C.** İlk paleo-poliploidinin gerçekleşme zamanı. **D.** Son poliploidinin gerçekleşme zamanı.



Şekil 3.9. AAD20628_9 numaralı bireye ait poliploidi analizleri. **A.** Ks değerini gösteren grafik. **B.** İki adet paleo-poliploidinin gerçekleştiğini gösteren grafik. **C.** İlk paleo-poliploidinin gerçekleşme zamanı. **D.** Son poliploidinin gerçekleşme zamanı.



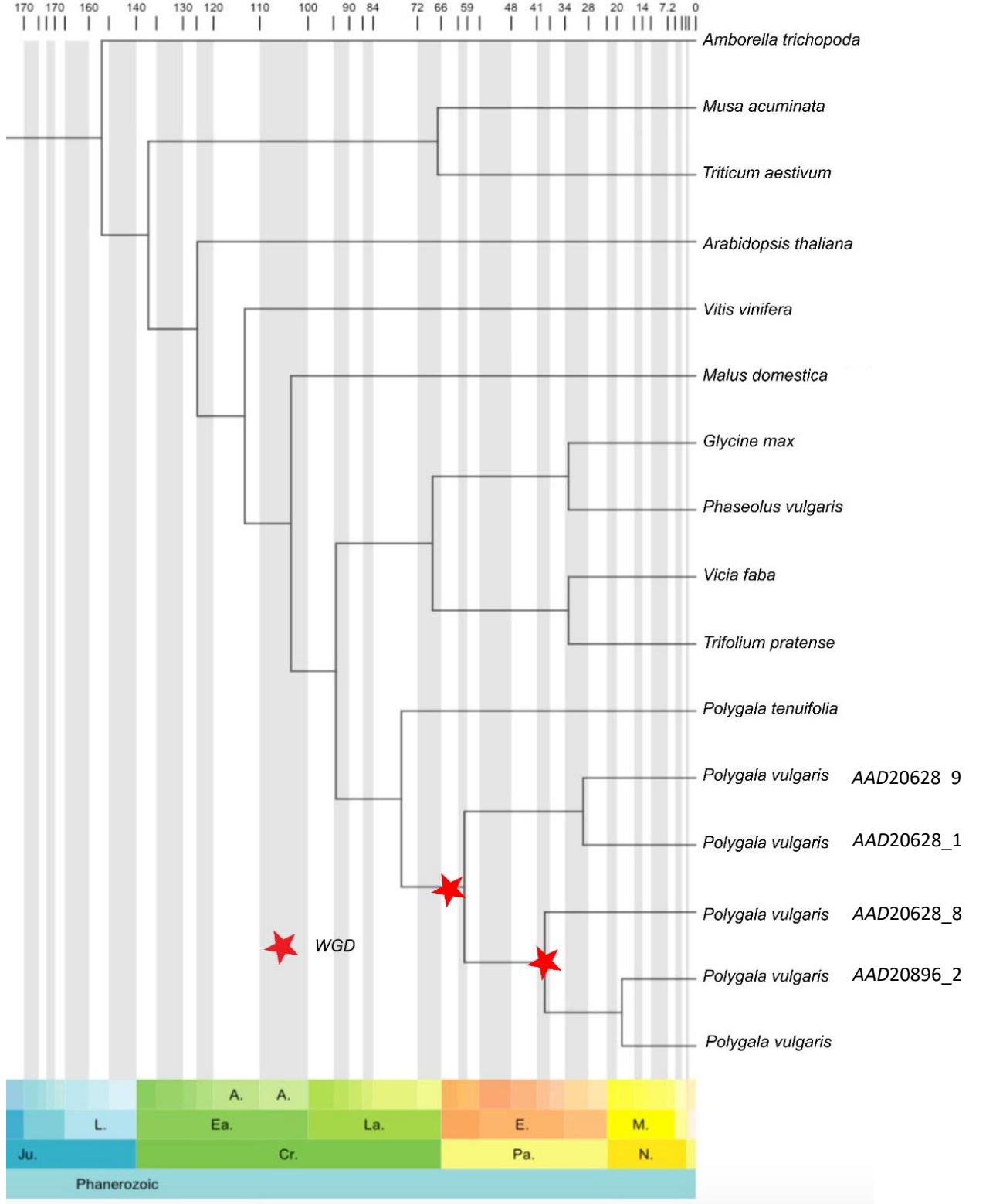
Şekil 3.10. AAD20896_1 numaralı bireye ait poliploidi analizleri. **A.** K_s değerini gösteren grafik. **B.** İki adet paleo-poliploidinin gerçekleştiğini gösteren grafik. **C.** İlk paleo-poliploidinin gerçekleşme zamanı. **D.** Son poliploidinin gerçekleşme zamanı



Şekil 3.11. AAD20896_2 numaralı bireye ait poliploidi analizleri. **A.** Ks değerini gösteren grafik. **B.** İki adet paleo-poliploidinin gerçekleştiğini gösteren grafik. **C.** İlk paleo-poliploidinin gerçekleşme zamanı. **D.** Son poliploidinin gerçekleşme zamanı.

3.2.2.2. Poliploid Türün Ortaya Çıkış Zamanı

Poliploidizasyonun gerçekleşme zamanlarının bulunmasının ardından, türün ve temsilci örneklerinin poliploidi öykülerini filogenetik bağlamda göstrebilmek amacıyla ortolog genlere dayalı soy ağacı çizilmiştir. Bu sayede paleopoliploid zaman tahminlerinin yanı sıra türün ortaya çıkış zamanı da tahminlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tez çalışması kapsamında incelenen *Polygala vulgaris* bireylerinin yaklaşık 65-72 milyon yıl önce farklılaştığı düşünülmektedir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. *Polygala* ve bazı Kapalı tohumlu taksonların ortolog genlerine dayalı soy ağacı. WGD: Tüm Genom Duplikasyonu (Poliploidi). Cr.: Kretase, Ju.: Jura, Pa.: Paleosen, N.: Neosen

Ortolog genlere dayalı soy ağacının oluşturulmasına, OrthoFinder programında kullanılan örnekler dahil edilmiştir ve böylelikle *Polygala vulgaris* türünün yanı sıra, yakın zamanda uzun okuma verisi yayınlanmış olan *P. tenuifolia*, *Fabaceae* familyasından *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba*, *Trifolium pratense* ile *Arabidopsis thaliana*, *Malus domestica*, *Musa acuminata*, *Nicotiana attenuata*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Vitis vinifera* ve *Zea mays* eklenmiştir.

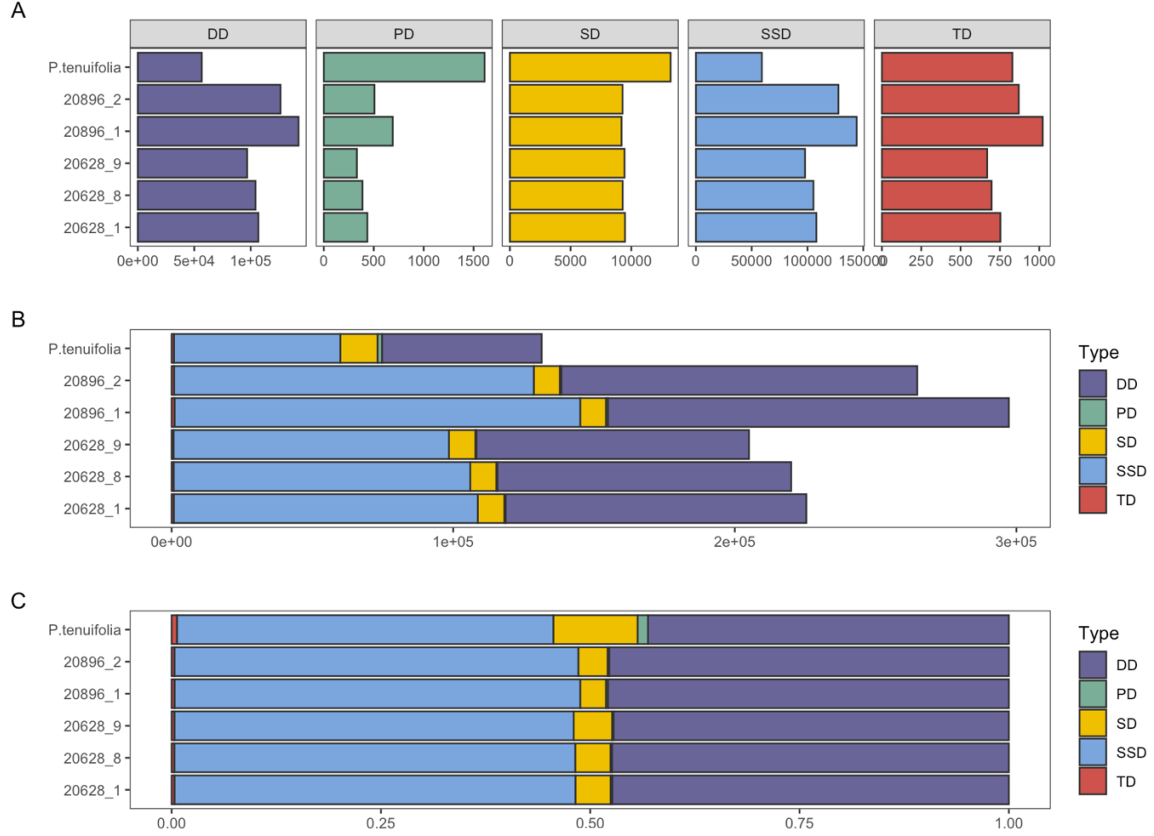
3.2.2.3. Duplikasyon Çeşitlerinin Tespit Edilmesi

Atasal duplikasyon olayları ve mevcut gen duplikasyonlarının yüksek oranda korunması, bitki genomlarında bol miktarda gen duplikasyonu bulunmasına katkıda bulunmaktadır [110]. Bu sebeple tüm genom duplikasyonu haricinde genomdaki diğer duplikasyon çeşitleri ve sayıları da elde edilmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Tez çalışmasında kullanılan bireyler ile *P. tenuifolia*'da bulunan duplikasyon çeşitleri sayıları.

Örnekler	SD	SSD	TD	PD	DD
AAD20628_1	9482	107960	753	436	106771
AAD20628_8	9290	105365	697	387	104281
AAD20628_9	9441	97803	669	331	96803
AAD20896_1	9194	144070	1022	690	142358
AAD20896_2	9280	127760	870	507	126383
<i>P. tenuifolia</i>	13237	59094	829	1610	56655

SD: Segmental Duplikasyonlar, SSD: Küçük Ölçekli Duplikasyonlar (small-scale duplications), TD: Tandem Duplikasyonlar, PD: Proksimal Duplikasyonlar, DD: Dağınık Duplikasyonlar.



Şekil 3.13. Duplikasyon çeşitleri analizi. **A.** Herbir duplikasyon çeşidinin bireylerde bulunma sayıları. **B.** Duplikasyon çeşitlerinin yaygınlık kıyaslaması. **C.** Duplikasyon çeşitlerinin yüzdesel dağılımı.

Elde edilen sonuçlara göre, beş bireyin de duplikasyon sayıları birbirine yakın çıkmıştır. SD'ler bireylerde sırasıyla 9482, 9290, 9441, 9104 ve 9290 adet; SSD'ler 107960, 105365, 97803, 144070 ve 127760 adet; TD'ler 753, 697, 669, 1022 ve 870 adet, PD'ler 436, 387, 331, 690 ve 507 adet ve son olarak DD'ler 106771, 104281, 96803, 142358 ve 126383 adet bulunmuştur. Aynı duplikasyon çeşitleri sırasıyla *P. tenuifolia* örneğinde ise 13237, 59094, 829, 1610, 56655 adet bulunmuştur. Bu durumda elde edilen sonuçlar diploid olan *P. tenuifolia* ile kıyaslandığında poliploid olan *P. vulgaris* bireylerinde duplikasyon çeşitlerinin çok daha yaygın bulunduğu açıkça görülmektedir (Şekil 3.13 B).

4. TARTIŞMA

4.1. *k*-mer ve *k*-mer Tabanlı Olmayan Programların Karşılaştırılması

Tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda genom boyutu tahminleri *k*-mer tabanlı ve *k*-mer tabanlı olmayan programlarda analiz edilmiştir. Buna göre *k*-mer tabanlı programlardan Kmergenie AAD20628_1, AAD20628_8, AAD20628_9, AAD20896_1 ve AAD20896_2 numaralı örneklerde sırasıyla 1612, 1468, 1300, 2024 ve 1744 Mb; GenomeScope programıyla sırasıyla 68, 328, 324, 404 ve 88 Mb olarak hesaplanırken; *k*-mer tabanlı olmayan program SGA ile sırasıyla 1951,2, 1388,4, 1224,8, 1850,4 ve 1570,8 Mb hesaplanmıştır. Heterozigotluk seviyeleri yine sırayla %4,8 %16, %21,68, %10 ve %4,56 olarak hesaplanmıştır. Her örneğin sırayla, genomdaki hareketli element içerikleri sırayla %49,39, %45,62, %43,16, %51,01 ve %45,15 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar cins içerisinde long read (uzun okuma) sekansı yapılan tek örnek olan *Polygala tenuifolia* ile karşılaştırıldığında, *P. tenuifolia* örneğinin genom boyutu 798.58 Mb olarak hesaplanırken, heterozigotluk seviyesi %0,96, hareketli element içeriği %61,62 olarak bulunmuştur [5]. *P. tenuifolia* örneğinin uzun okuma verisiyle transpozon analizinden elde edilen sonuçlar, bu tez çalışmasındaki kısa okuma verileriyle karşılaştırıldığında daha yüksek çıkmıştır ve beklenen bir sonuç olarak kabul edilmektedir. Ayrıca heterozigotluk yüzdelerindeki farklılıklar, bireylerin poliploidi seviyelerindeki farklılıklarla örtüşmektedir. *P. tenuifolia* $2n = 2x = 38$ kromozom sayısı ile diploid bir genoma sahipken, AAD20628 ve AAD20896 numaralı bireylerin $2n = 4x = 68$ kromozom sayısı ile tetraploid genoma sahip oldukları karşılaştırıldığında, genomun heterozigotluk yüzdelerinin tetraploid bireylerde daha yüksek çıkması yine beklenen ve heterozigotluk ile poliploidi seviyesi arasındaki korelasyonu destekleyen sonuçlardır.

K-mer tabanlı ve *k*-mer tabanlı olmayan programların sonuçlarının karşılaştırması Çizelge 3.3'te verilmiştir. Sonuçlara göre, akış sitometri ile tayin edilen genom boyutuna en yakın sonucu *k*-mer tabanlı olmayan SGA programı tahminlemiştir. *K*-mer tabanlı programlarda ise Kmergenie programı, GenomeScope programına kıyasla gerçeğe çok daha yakın ve tutarlı sonuçlar sunmuştur. Buna göre en iyi sonucu veren SGA programının poliploid genom boyutu tahminlemesi yapmada kullanılabilecek ilk tercih olması düşünülmektedir.

4.2. Akış Sitometri Yöntemi ile Karşılaştırma

Yüksek hacimli DNA verilerinin analizleri ile elde edilen *k*-mer yaklaşımlı ve *k*-mer yaklaşımından bağımsız programlar ile yapılan genom boyutu tahminlemeleri akış sitometri yöntemi ile edile edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, biyoinformatik temelli sonuçların akış sitomeri sonuçlarına oldukça yakın çıktığı görülmüştür (Çizelge 3.3).

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar mevcut literatürdeki bazı çalışmalarla kıyaslandığında genom boyutu tahminlemesinde literatüre paralel sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Çizelge 4.1'de yer alan örnekler ele alındığında biyoinformatik analizlerle (*k*-mer sütunu) tahminlenen genom boyutu FCM ile elde edilen genom boyutuna çoğunlukla ulaşmayı başarmıştır.

Viruel ve ark., (2019) herbaryum örneklerinin ploidi seviyesinin tahminlemesini akış sitometri ve biyoinformatik yaklaşımlarıyla incelemiş ve kıyaslamıştır. Biyoinformatik veriyi Illumina kütüphanesinden elde eden araştırmacılar, 236 yıl öncesinin örneklerinin dahi biyoinformatik araçlarla analiz edilebileceğini göstermiştir [111]. Bu sonuçla birlikte akış sitometrisi veya kromozom sayımının mümkün olmadığı, iki yüzyıl kadar eski olan herbaryum örneklerinden bile bir türün ploidi durumuna ilişkin verimli bir şekilde bilgi edinmenin mümkün olduğunu gösterilmiştir ve bu da biyoinformatik analizleri, ploidi çalışmalarında daha cazip hale getirmiştir.

Mohammedin ve ark., *Aethionema arabicum* L. türünün cins ve familya düzeyinde evrimsel yoruma dayalı karşılaştırmasını yapmak üzere Illumina TruSeq-RNA kütüphanesini kullanmış ve diploid-tetraploid türlerde heterozigotluk seviyelerini %0,83-2,76 değerleri arasında hesaplamıştır [112]. Yine genomun heterozigotluk yüzdelerinin tetraploid bireylerde daha yüksek çıkması beklenen poliploidi seviyesi arasındaki korelasyonu destekleyen sonuçlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca bu çalışmada diploid ve tetraploid bireylerin farklı yerlerde bulunup bulunmadığı, introgresyon veya allopoliploidi geçmişinin olup olmadığı ve tetraploidlerin belirli ekolojik faktörlere adapte olup olmadığı gibi soruların daha fazla populasyon örneğiyle çözülebilecek sorunlar olduğu vurgulanmıştır. Bu bağlamda bu tez çalışması kapsamında çalışılan bireyler aynı yerden toplanmış olduğu için, karma-poliploidinin farklı yerlere bağlı olmaksızın da gerçekleştirilebileceğini göstermektedir.

Mgwayu ve ark., *Aspalathus linearis* Burm. türünün genom boyutu tahminlemede FCM ve Illumina MiSeq ve HiSeq dizileriyle biyoinformatik yaklaşımlarını kıyaslamışlardır. Elde ettikleri sonuca göre *k*-mer tabanlı biyoinformatik araçların parametreleriyle, ayarlarına bağlı tahminler yapılabildiğini ve dizilenen verinin kalitesinin önemini vurgulamıştır [113]. Dizilenen verinin kalitesi, uzun veya kısa okuma türüne bağlı olarak da sonuçları etkilemektedir.

Reseda pentagyna Abdallah & A.G.Mill. ve *R. lutea* L. ile yapılan bir başka çalışmada heterozigotluk yüzdeleri sırayla %1,37 ve %1,04 hesaplanmıştır [82]. Akış sitometri bulgularını doğrulamak için *k*-mer analizi yapıldığını vurgulayan araştırmacılar, yine, *k*-mer analizine dayalı programların tahminleme başarısının parametre seçimlerine bağlı olarak değişebildiğini ve dizilemenin kalitesinin önemli bir rol oynadığını vurgulamıştır. En güvenilir programları CovEST-repeat, Kmergenie, GenomeScope ve FindGSE olarak sıralamışlardır. Bu bağlamda tez çalışmasında kullanılan Kmergenie ve GenomeScope programlarının literatürle paralel olarak, tahminlemede başarılı olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.1. *Polygala vulgaris* ile başka örneklerin genom boyutlarının *k*-mer ve FCM sonuçlarının karşılaştırılması.

Örnek	K-MER (MB)	FCM	Referans
<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i> Bory	97.02	160 Mb	Qingwei ve ark., 2016
<i>Dioscorea rotundata</i> Poir	579	570 Mb	Tamiru ve ark., 2017
<i>Ilex chinensis</i> Sims	618	660 ± 10 Mb	Zhou ve ark., 2022
<i>Psammochloa villosa</i> Bor	1563.54	1580.10±5.02	Liu ve ark., 2022
<i>Gryllotalpa orientalis</i> Burmeister	3.17-3.77 Gb	3.14 Gb	Sun ve ark., 2023

<i>Polygala vulgaris</i>	~ 1 Gb	~ 1.900 Gb	Bu tez çalışması
--------------------------	--------	------------	------------------

4.3. Poliploidi ve Transpozon İlişkisi

Transpozonların, gen ifadesini düzenlemelerine ve yeni düzenlemeler oluşturmalarına imkân sağlayan mekanizmaları vardır. Genomun yeniden yapılandırılmasında, gen kaybında ve çoğaltma olaylarından sonra genomik dengenin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Allopoliploidizasyon, TE transkripsiyonuna yol açabileceği gibi diploid türlerde TE kopya sayısının artmasına yol açabilmektedir. Poliploidizasyon her zaman TE kopya sayısının artmasıyla sonuçlanmayabilir ve farklı bir düzenleme mekanizmasıyla karşılaşılabilir, ayrıca TE sınıfları genomlar arasında farklılık gösterebilmektedir. Buna rağmen, özellikle LTR'lerin poliploidizasyonda bitki genomunun genişlemesine ve evrimine katkıda bulunduğu bilinmektedir [114], [115].

Poliploidizasyonla birlikte transpozon amplifikasyonu, bitki genomunun boyutunu arttırmaya ve evrimine yönelik ana mekanizma olarak kabul edilir [116]. Genom boyutundaki artış bu iki ana mekanizmada paralel görünse de bazı durumlarda birbirinden bağımsız da gerçekleşebilmektedir ve poliploidizasyon ile genom büyüklüğü arasında bir ilişkinin olmadığını da düşündürmektedir [117], [118]. Poliploidizasyonun ardından TE'lerdeki ani artış, birkaç paleo-poliploid bitki türünde veya yeni poliploidlerde gösterilebilmektedir [119]. Ancak bu genellemelerin aksine poliploid türlerde her zaman bir TE artışı yaşanmadığı da görülmüştür. Örneğin, *Capsella bursa-pastoris* L. ebeveyn türlerinde TE'lerin genom çapında büyük bir çoğalma yaşadığına dair bir kanıt bulunmamıştır [120].

Transpozonların alt sınıflarında yapılan araştırmalara göre, tetraploid olan *Orobanch* türlerinde toplam TE içeriği %68.68 hesaplanırken, bunun %30'unun *Gypsy* elementleri olduğu bulunmuştur [121]. Hekzaploid olan *Chenopodium formosanum* Koidz. örneğinde de toplam %67.8 tekrarlı element bulunurken, en bol bulunan element %22.28 ile *Gypsy* olmuştur [122]. Bu örnekler poliploid türlerde özellikle *Gypsy* elementlerinin daha bol bulunduğuna dair bir yorum yapılmasına yol açabilmektedir (Çizelge 4.2). Bu tez çalışması kapsamında edilen sonuçlarla,

literatürdeki çalışmalar karşılaştırdığında (Çizelge 3.5), alt sınıflardan en çok rastlanan element *Gypsy*'ler olduğu açıkça görülmektedir.

Çizelge 4.2. *Polygala vulgaris* ve diğer bazı bitkilerin ploidi seviyesi ve yüzde transpozon içeriği.

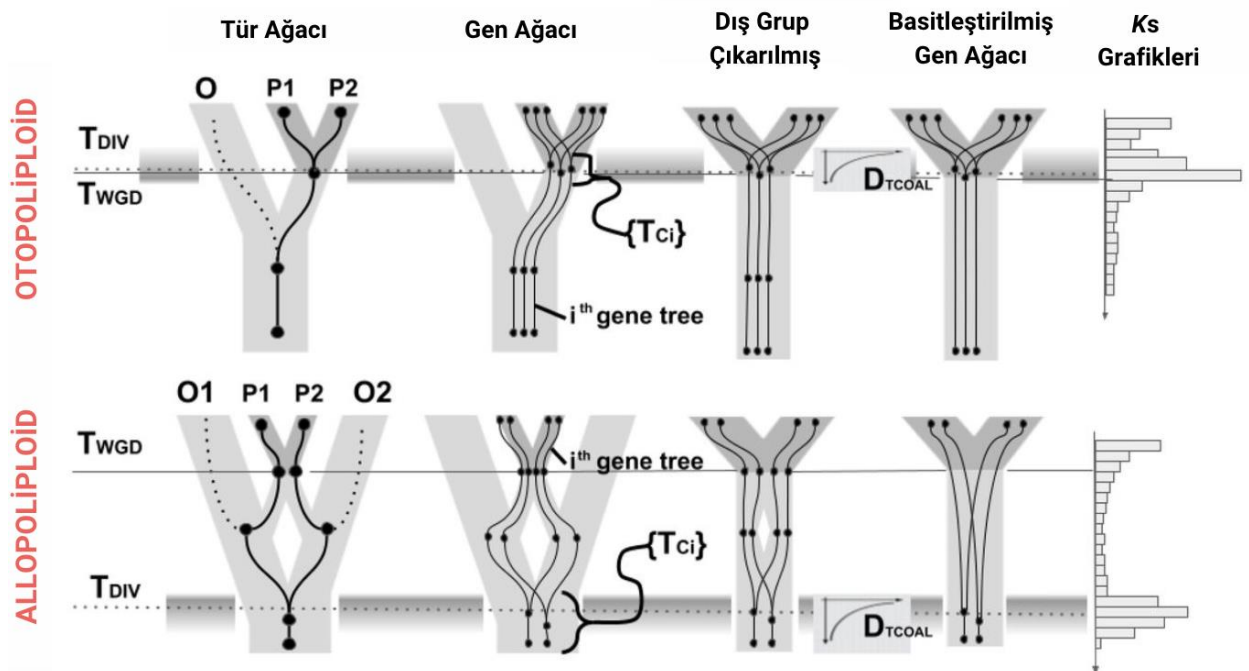
Örnek	Ploidi Seviyesi	TE İçeriği (%)	Referans
<i>Solanum</i> spp.	Karışık poliploid	~ 60	Kyriakidou ve ark., 2020
<i>Raphnobrassica</i>	Allopoliploid	56.01	Zhang ve ark., 2022
<i>Arachis</i> türleri	Diploid	~ 68	Samoluk ve ark., 2022
<i>Boechera</i> türleri	Karışık poliploid	~ 22	Masarova, 2022
<i>Gossypium hirsutum</i>	Allopoliploid	~ 60	Paterson ve ark., 2012
<i>Orobancha</i> türleri	Tetraploid	~ 68	Piednoel ve ark., 2015
<i>Cynodon dactylon</i>	Tetraploid	37.91	Zhang ve ark., 2022
<i>Pleurozium schreberi</i>	Karışık poliploid	28.34	Pederson ve ark., 2019
<i>Oryza</i> türleri	Karışık poliploid	~ 53	Shenton ve ark., 2020
<i>Polygala vulgaris</i>	Karışık poliploid	~ 47	Bu tez çalışması

4.4. Poliploidinin Kökeni ve Gerçekleşme Zamanı

Karasal bitkilerde tüm genom duplikasyonu evrimleşme ve çeşitlenme için ana itici güç olarak tanınmıştır [123]. Bu bağlamda tez çalışmasındaki beş birey haricinde *Polygala tenuifolia* örneği de bu analize dahil edilerek cinsin poliploid kökeni hakkında karşılaştırmalı analizler yapılmıştır.

Genel olarak bitkilerde türleşmenin allopoliploidiye mi yoksa otopoliploidiye göre mi gerçekleştiği çok tartışılmıştır ve son araştırmalar, dizilenen bitki genomlarının allopoliploididen türleşmesinin daha yaygın olduğunu göstermiştir [124],[125],[126]. Wang ve ark., (2023) tanımlamasına göre; poliploid organizmalar, ya tam genom çoğaltma (WGD) olaylarından (otopoliploidi) ya da kromozom çiftlemesinin (allopoliploidi) takip ettiği türler arası hibridizasyondan kaynaklanan ikiden fazla homolog kromozom setinden oluşmaktadır [127]. Analizler sonucu elde edilen tekrarlayan elementlerin içeriğinin yüksek olması, büyük genom boyutu ve yüksek heterozigotluk seviyesi yine örneklerin otopoliploid olduğuna işaret etmektedir [128], [129].

Otopoliploidi ve allopoliploidinin tayin edilmesine yönelik parametrelerden biri de örneklerin göstermiş olduğu K_s değeri dağılım grafiği olarak kabul edilmektedir [126, 130].

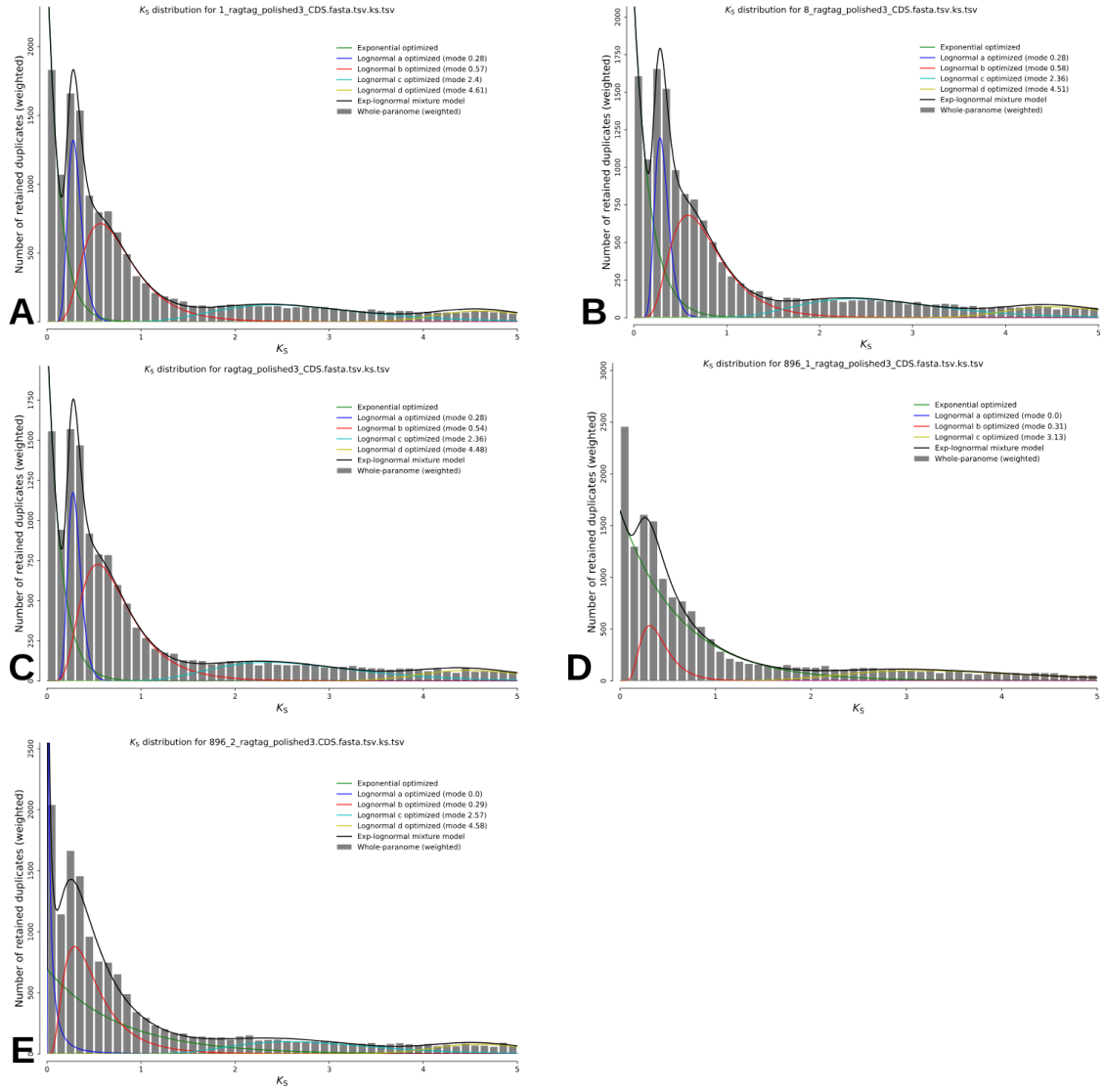


Şekil 4.1. Otopoliploidi ve allopoliploidide *Ks* grafikleri. T. Dunn ve A. Sethuraman (2024)'dan değiştirilerek alınmıştır. O: Dış grup, P1 ve P2: Poliploid türler.

Poliploid türlerin farklılaşma gösterdikten sonra tüm genom duplikasyonuna maruz kaldığı düşünülmektedir ve buna bağlı olarak *Ks* değerlerinin farklı histogramlar ortaya çıkardığı bilinmektedir (Şekil 4.1). Allopoliploid ve otopoliploid bireylerin *Ks* grafikleri arasındaki bariz farklılık, bu iki çeşidin tespiti için kullanılabilecek bir parametre olarak görülmektedir.

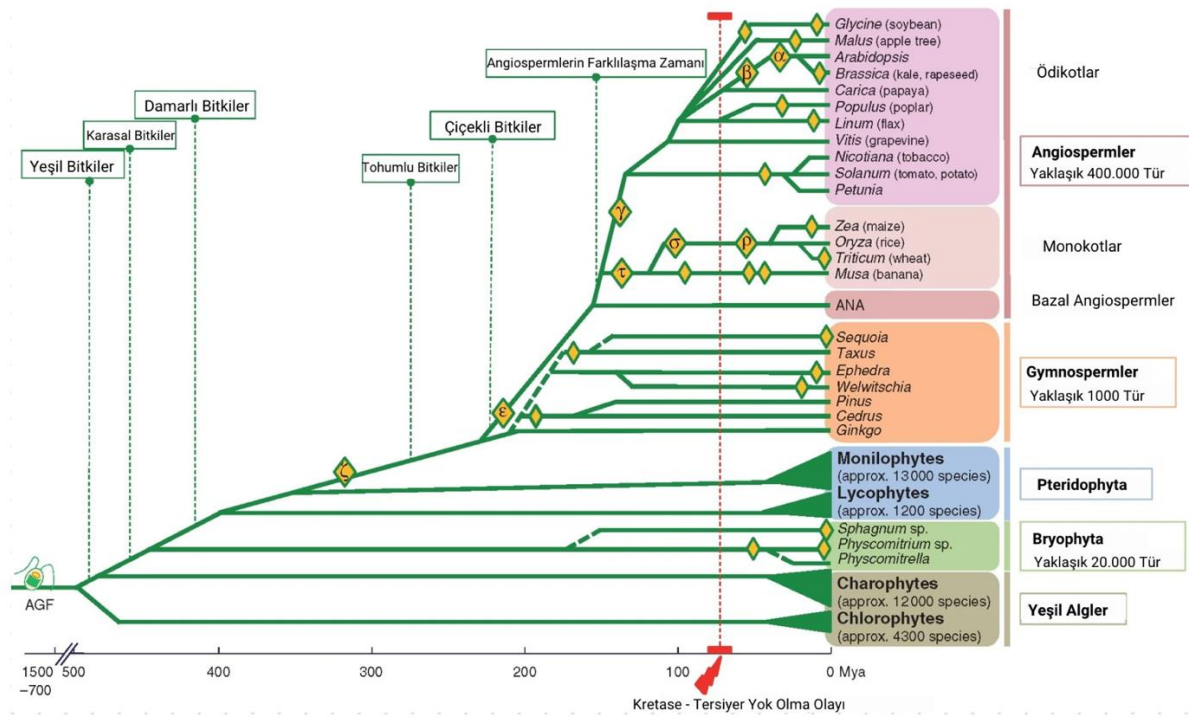
Bu tez çalışması kapsamında çalışılan bireylerin *Ks* değerlerinin grafiği (Şekil 4.2), otopoliploid türler için oluşturulan grafiklere uyumlu bulunmuştur (Şekil 4.1). Grafiklerin karşılaştırılmasından elde edilen sonuçta *Polygala vulgaris* bireylerinin otopoliploid olduğuna *Ks* grafikleri parametresiyle de çıkarım sağlanmaktadır.





Şekil 4.2. *Polygala vulgaris* bireylerinde K_s değerlerinin grafiği. **A.** AAD20628_1 **B.** AAD20628_8 **C.** AAD20628_9. **D.** AAD20896_1. **E.** AAD20896_2.

Yeşil Bitkiler Soy Ağacının WGD temeliyle oluşturulmuş filogenisi incelendiğinde (Şekil 4.3), dizilenen çoğu türde birden fazla poliploidi olayları gözlenmiştir. Tez çalışmasında tespit edilen iki adet poliploidi olayı bu sonucu destekler niteliktedir.



Şekil 4.3. WGD temelli Yeşil Bitkiler Soy Ağacı. Alix ve ark. (2017)'dan değiştirilmiştir. Sarı renkli dörtgenler poliploidi olaylarını temsil etmektedir.

Kapalı tohumlu bitkilerde gerçekleşen poliploidi (ya da tüm genom duplikasyonu) olayının tesadüfen rastgele dönemlerde gerçekleşmediği, genellikle birçok bitkide Kretase – Palosen (K-Pg) (145 – 66 myö), Kretase – Tersiyer (145 – 56 myö) gibi jeolojik dönemlerinin geçiş civarlarında, yok oluş olayından kurtulmak ve adapte olmak adına bu mekanizmayı geliştirdiği düşünülmektedir [131], [132]. Büyük çevresel değişimlerin bitkilerin adaptif evrimiyle ilişkisini kurmak için daha fazla genom yapısını incelemeye ihtiyaç vardır. Ancak bu hipotezi araştırmak için 41 adet bitki genomuyla yapılan çalışmada, son ~100 milyon yıl içinde gerçekleştirmiş olan bitki paleo-poliploidizasyonlarının, zaman içinde rastgele dağılmadığı ve aksine bu olayların birçoğunun K–Pg yok oluş sınırlarına yakın ve ilişkili olduğu bulunmuş, bu bağlamda özellikle yok oluş ve stresin poliploidiyi teşvik eden en güçlü faktörler olduğu düşünülmüştür [133]. Ayrıca Kapalı tohumlu bitkilerde gerçekleşen bu paleo-poliploidizasyon olaylarının geçmişteki çevresel değişikliklerle eşzamanlı veya yakın zamanda olarak gerçekleşmiş olmasının, poliploidlerin oluşumunda önemli rol oynadığı da düşünülmektedir [134]. Yapılan önemli çalışmalar ve bu tez çalışması bu görüşü destekler niteliktedir.

Polygala vulgaris bireylerinin geçirdiği iki adet paleo-poliploidinin zamanlarına bakılacak olursa, birinci olayın ~55 myö gerçekleşmesi jeolojik zamanlardan Paleosen döneminden Eosen'e geçiş dönemine, ikinci olayın ~35 myö gerçekleşmesi ise Eosen'den Oligosen'e geçiş dönemine denk gelmektedir. Bu dönemlerde Türkiye'nin iklimsel verilerine göre, Eosen döneminde tropikal iklim koşullarının hâkim olduğu, Oligosen döneminde ise soğumanın gerçekleştiği bilinmektedir [135], [136].

Elde edilen sonuçlara göre, jeolojik dönemlerin geçiş süreçlerinde *Polygala vulgaris*'in, değişen sıcaklık koşullarına ve çevreye adaptasyonunda geçirmiş olduğu poliploidinin etkin olduğu düşünülmektedir. Literatürde kapalı tohumlu bitkiler için önerilen sonuca paralel olarak, bu tez çalışması kapsamında incelenen *Polygala vulgaris* türü için de paleo-poliploidinin, türün evrimine ve adaptasyonuna katkısının birçok türle karşılaştırmalı olarak çalışılabileceği ve geniş bir veri seti oluşturulabileceği önerilmektedir [131].

4.5. *Polygala vulgaris* Türünün Ortaya Çıkış Zamanı

Tez çalışmasındaki bütün bireylerde ve referans alınan *Polygala tenuifolia*'da iki adet paleo-poliploidi olayının gerçekleştiği ve bu iki olayın tarihlerinin türlerin farklılaşma tarihleriyle uyumlu olduğu görülmüştür. Diploid örnek olan *P. tenuifolia*, ortologlara dayalı gen ağacı sonuçlarına göre yaklaşık 75-80 milyon yıl önce farklılaşmış ve paleo-poliploidi olaylarını ~59 ve ~33 milyon yıl önce geçirmiştir. Benzer şekilde, tez çalışması kapsamında çalışılan poliploid *P. vulgaris* ise yaklaşık 65-72 milyon yıl önce farklılaşmış ve iki adet paleo-poliploidiyi sırayla ~55 ve ~35 milyon yıl önce geçirmiştir. Ayrıca, *P. tenuifolia* çalışmasında görüldüğü üzere bu örnek, kromozomal yeniden düzenleme ve azalma yaşamış, bu tüm genom duplikasyonu sonucunda disomik kalıtıma geri dönmüştür. Ancak aynı durum tezde çalışılan *P. vulgaris*'e ait beş birey için geçerli olmamıştır. Eldeki bireyler tüm genom duplikasyonu sonucunda kromozom düzenlenmesinde azalma yerine sayısını katlamış ve tetraploid bireyler oluşturmuştur. Ancak familya ve cins içerisinde yapılmış başka bir biyoinformatik çalışma bulunmaması, bu yorumları kısıtlamaktadır. *Polygalaceae* türlerinin ve yakından ilişkili türlerin genomlarının daha fazla çalışılmasıyla, daha doğru bir evrim senaryosu, kapsamlı bir şekilde incelenebilecektir.

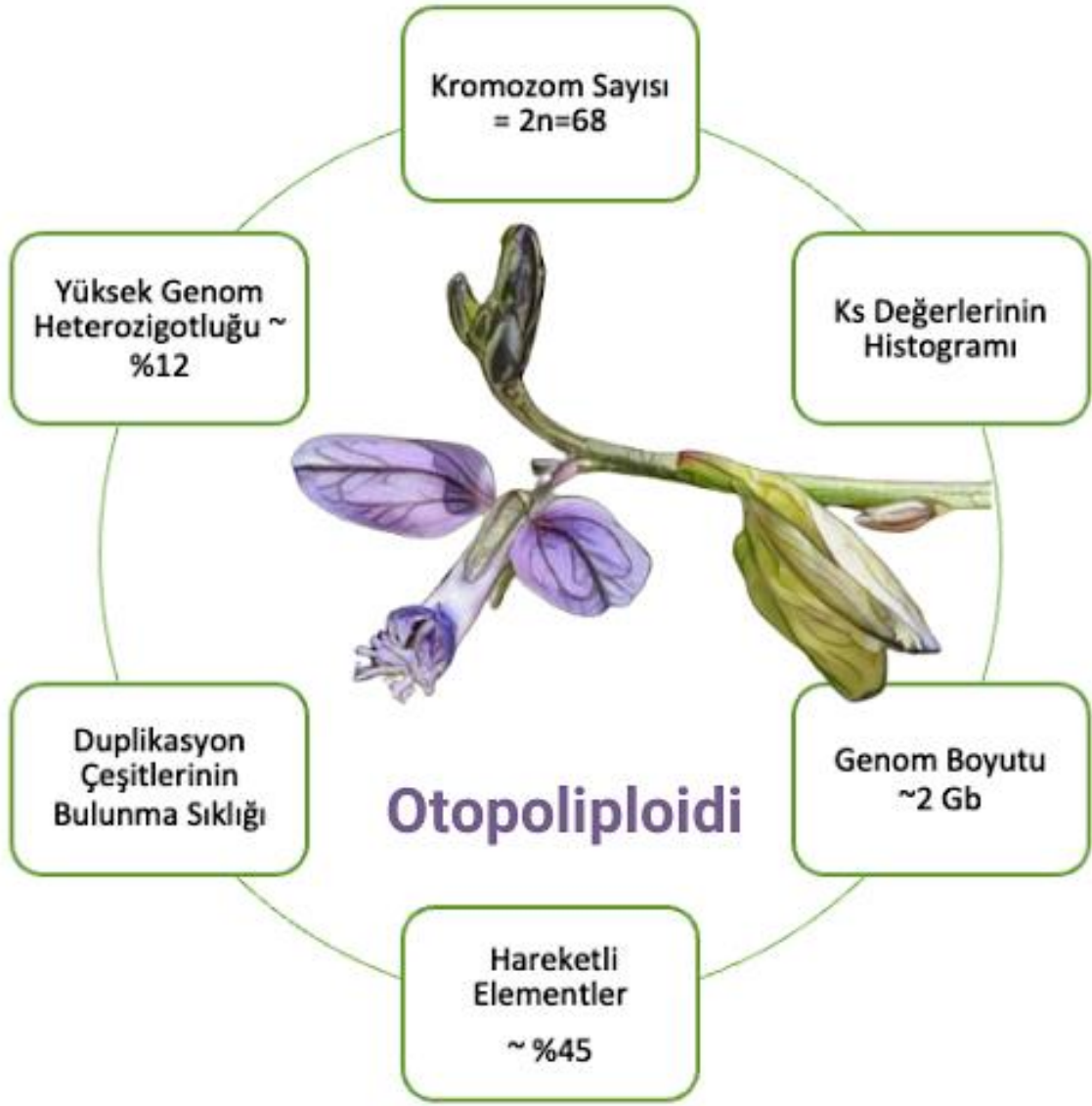
4.6. *Polygala vulgaris* Türünde Tespit edilen Duplikasyon Çeşitleri

Duplikasyon çeşitlerinden özellikle Tandem Duplikasyonların (TD) genom boyutunu artırmada rol aldığı bilinmektedir [137]. Elde edilen sonuçlar da bu gerçekliği desteklemektedir. TD, 1022 adet ile en fazla AAD20896_1 numaralı örnekte bulunmaktadır ve bu örnek yine *K*-mer tabanlı programlarda genom boyutu en fazla çıkan örnek olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.3). Segmental Duplikasyonlar (SD) her örnekte TD'lere kıyasla yaklaşık 12 kat daha fazla gözlenmiştir. Bu da SD'lerin, poliploidide ana itici güç olduğunu düşündürmektedir. Küçük Ölçekli Duplikasyonların (SSD), evrimleşme sırasında genetik olarak yenilenmeye önemli ölçüde katkıda bulunabileceği düşünülmektedir [138]. Bu bilgiyle paralel olarak *P. vulgaris* bireylerinde SSD'lerin, *P. tenuifolia* sonucunda göre çok daha yüksek çıkması, yine bu bireylerin geçirdiği poliploidiye işaret etmektedir. Dağınık Duplikasyonların (DD) örneklerde çok miktarda çıkması, çok az bilgiye sahip olduğunu işaret etmekle birlikte, Proksimal Duplikasyonlar (PD) içinse lokal transpozon ilişkisinin araştırılması önerilmektedir.

5. SONUÇ

Tez çalışması sonucunda elde edilen sonuçlar ana başlıklar halinde şu şekilde sıralanabilir:

- 1- Bu tez çalışması ile *Polygala vulgaris* türünün ilk kez tüm genom verisi elde edilmiş ve biyoinformatik analizlerle yorumlanmıştır.
- 2- Bu tez çalışması ile ilk kez *Polygala* cinsine ait poliploid bir tür, YHD verisi ile analiz edilerek poliploidizasyona ilişkin ayrıntılı sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Tez çalışmasına konu olan *Polygala vulgaris* türünün beş bireyinden elde edilen ortalama sonuçlar.

3- *Polygala vulgaris*'e ait genom boyutu tahminleri, *k*-mer analizleri, genomundaki hareketli elementler, paleo-poliploidi geçirilen zaman tahminleri ve türün ortaya çıkışına dair ortolog genlere dayalı zaman tahminleme çalışmaları ilk kez yapılmıştır.

4- Bu tez çalışması sayesinde genom boyutu tahminleme, genom montajı ve poliploidi analizleri için birçok biyoinformatik araç denenmiş ve veri setine en uygun araçlar kullanılmıştır.

5- Türün ilk kez iki adet poliploidi geçirildiği tespit edilmiştir ve poliploidizasyon tarihlerine göre büyük çevresel değişikliklerle yakından ve sıkı ilişkili olduğu görülmüştür. Bu tez çalışmasına göre, *P. vulgaris* türü poliploidizasyonun bitki yaşamını devam ettirmeye olan katkısına yeni bir örnek oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, yapılan analizler sonucunda, örneklerin genom boyutlarının FCM ile ortalama ~1925 Mb, biyoinformatik araçlarla ortalama ~1160 Mb bulunmuştur. Bu sonucun diploid yakın tür *P. tenuifolia* genomundan (~800 Mb) yaklaşık iki katı kadar büyük olması, genomların heterogizotluk oranının ortalama ~%12 bulunması, hareketli element içeriklerinin ortalama %47 bulunması, iki adet paleo-poliploidi tespit edilmesi ve *Ks* değerlerinin grafiği de göz önüne alınarak *Polygala vulgaris* türüne ait beş bireyin otopoliploid olarak değerlendirebileceği (Şekil 5.1), daha kapsamlı analizler için uzun okuma dizisi kullanılabileceği önerilmektedir.

Ayrıca değişen ve gelişen dizileme teknolojileri ve biyoinformatik programlarla daha derin analizler yapılabilmesi ve bu bağlamda *Polygala vulgaris* türünün kazandığı ve kaybettiği genler ortaya çıkarılarak bunların büyük çevresel değişikliklerle ilişkisini daha iyi aydınlatabilmek mümkündür. İlave olarak, otopoliploidiye ilişkin fazla sayıda veri elde edilmesine rağmen *P. vulgaris* türünün en yakın olduğu diploid bir taksonla karşılaştırmalı genomik analizlerinin yapılması önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

[1] T. A. P. Group, M. W. Chase, M. J. M. Christenhusz, M. F. Fay, J. W. Byng, W. S. Judd, D. E. Soltis, D. J. Mabberley, A.N. Sennikov, P. S. Soltis, ve P. F. Stevens, An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV, *Bot.J.Linn. Soc.*, c. 181, sayı 1, ss. 1–20, **2016**, doi:10.1111/boj.12385.

[2] J. F. B. Pastore, J. R. Abbott, K. M. Neubig, C. Van Den Berg, M. C. D. A. Mota, A. Cabral, W. M. Whitten, Phylogeny and biogeography of *Polygala* (Polygalaceae), *Taxon*, c 68, sayı 4, ss 673-691, 2019, doi: 10.1002/tax.12119.

[3] *Fabaceae* Lindl. | Plants of theWorldOnline| Kew Science.<http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30000147-2> (Erişim tarihi: **10 Ekim 2023**).

[4] C. Persson, Phylogenetic relationships in Polygalaceae based on plastid DNA sequences from the trnL-F region, *Taxon*, c 50, sayı 3, ss 763-779, **2001**, doi: 10.2307/1223706.

[5] F. Meng, T. Chu, P. Feng, N. Li, C. Song, C. Li, L. Leng, X. Song, W. Chen, Genome assembly of *Polygala tenuifolia* provides insights into its karyotype evolution and triterpenoid saponin biosynthesis, *Horticulture Research*, c 10, sayı 9, **2023**, doi: 10.1093/hr/uhad139.

[6] A. Martinez, J. M. Acosta, M. A. Ferrero, F. B. Pastore, L. Aagesen, Evolutionary patterns within the New World Clade *Polygala* sections *Clinclinia* and *Monninopsis* (Polygalaceae), *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **2022**, doi: 10.1016/j.ppees.2022.125673.

[7] R. Chodat, *Polygalaceae novae vel parum cognitae*. éditeur non identifié, **1896**.

[8] B. Eriksen, Phylogeny of the Polygalaceae and its taxonomic implications, *Plant Syst. Evol.*, c. 186, sayı 1–2, ss. 33–55, **1993**, doi: 10.1007/BF00937712.

[9] J. L. Reveal, Newly required infrafamilial names mandated by changes in the code of nomenclature for algae, fungi, and plants, *Phytoneuron*, c. 33, ss. 1–32, **2012**.

[10] J. R. Abbott, Phylogeny of the Polygalaceae and a revision of, **2009**.

[11] J. F. B. Pastore, J. R. Abbott, K. M. Neubig, C. Van Den Berg, M. C. D. A. Mota, A. Cabral, W. M. Whitten, Phylogeny and biogeography of *Polygala* (Polygalaceae), *Taxon*, c. 68, sayı 4, ss. 673–691, **2019**, doi: 10.1002/tax.12119.

- [12] J. F. B. Pastore, A. Martinez, J. R. Abbott, K. Neubig, Toward New Generic Delimitations in Polygalaceae II: Senega, Annals of the Missouri Botanical Garden, c 108, **2023**, doi: 10.3417/2023754.
- [13] A. A. Dönmez, Z. U. Aydın, S. Işık, *Polygala turcica* (Polygalaceae), a new species from E Turkey, and a new identification key to Turkish *Polygala*, Willdenowia, c 45, sayı 3, ss 429-434, **2015**, doi: 10.3372/wi.45.45309.
- [14] A. A. Dönmez, Z. U. Aydın, *Polygala azizsancarii* (Polygalaceae), a new species from Mardin Province, SE Turkey, Phytotaxa, c 340, sayı 3, ss 255-262, **2018**, doi: 10.11646/PHYTOTAXA.340.3.5.
- [15] Ö. Çeçen, Z. U. Aydın, A. A. Dönmez, Morphological and molecular data on a new species of *Polygala* (Polygalaceae) from Turkey, Nordic Journal of Botany, c 6, **2023**, doi: doi.org/10.1111/njb.03951.
- [16] A. A. Dönmez, Z. U. Aydın, S. Yüzbaşıoğlu, On the border of extinction and speciation, *Polygala seyfegoluensis* (Polygalaceae), a new species from marshy habitat, Central Türkiye: Under the threat of climate change, water retreat, and subsequent degradation, Turkish Journal of Botany, c 48, **2024**, doi: 10.55730/1300-008X.2793.
- [17] T. G. Tutin, V. G. Heywood, N. A. Burges, D. M. Moore, D. A. Valentine, S. M. Walters, ve D. A. Webb, Flora Europaea: Volume 2 Rosaceae to Umbelliferae, c. 2, **1968**, ss. 231–236.
- [18] (E. Boissier ve R. (Robert) Buser, Flora Orientalis : sive, Enumeratio plantarum in Oriente a Graecia et Aegypto ad Indiae fines hucusque observatarum. Basileae : H. Georg, **1867**.
- [19] P. Davis, Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Volume 1. Edinburgh University Press, ss. 533–539, **1965**.

- [20] C. De Kock, C. Minnaar, K. Lunau, P. Wester, C. Verhoeven, M. J. Schulze, M. R. Randle, C. Robson, R. H. Bolus, B. Anderson, The functional role of the keel crest in *Polygala myrtifolia* (Polygalaceae) and its effects on pollinator visitation success, South African Journal of Botany, c 118, ss 105-111, **2018**, doi: 10.1016/j.sajb.2018.06.011
- [21] S. Castro, P. Silveira, L. Navarro, Floral traits variation, legitimate pollination, and nectar robbing in *Polygala vayredae* (Polygalaceae), Ecological Research, c 24, sayı 1, ss. 47-55, **2008**, doi: 10.1007/s11284-008-0481-5
- [22] İ. Çalış, E. Becer, A. Ünlü, Z. U. Aydın, A. Hanoğlu, H. S. Vatansever, A. A. Dönmez, Comparative phytochemical studies on the roots of *Polygala azizsancarii* and *P. peshmenii* and neuroprotective activities of the two xanthones, Phytochemistry, **2023**, doi: 10.1016/j.phytochem.2023.113650.
- [23] A. Chevalier, Une plante vivrière peu connue : le *Polygala butyracea* Heckel. [Histoire, dispersion et affinités.], Rev. Bot. appliquée d'agriculture Colon., c. 4, sayı 35, ss. 446–451, **1924**, doi: 10.3406/jatba.1924.4198.
- [24] A. Ünlü, K. Teralı, Z. U. Aydın, A. A. Dönmez, H. S. Yusufoglu, İ. Çalış, Isolation, Characterization and In Silico Studies of Secondary Metabolites from the Whole Plant of *Polygala inexpectata* Peşmen & Erik, Molecules, c 27, sayı 3, **2022**, doi: 10.3390/molecules27030684.
- [25] M. K. Şenova, Türkiye'deki Bazı *Polygala* L. (Polygalaceae) Taksonlarının Kromozom Sayımı ve Akış Sitometri (Fcm) Teknikleri ile Sitotaksonomisi, **2021**.
- [26] A. Rice, L. Glick, S. Abadi, M. Einhorn, N. M. Kopelman, A. Salman-Minkov, J. Mayzel, O. Chay, I. Mayrose, The Chromosome Counts Database (CCDB) – a community resource of plant chromosome numbers, New Phytologist, c 206 sayı 1, ss. 19-26, **2014**, doi: 10.1111/nph.13191.
- [27] A. Lack, Q. Kay, Allele frequencies, genetic relationships and heterozygosity in *Polygala vulgaris* populations from contrasting habitats in southern Britain, Biological Journal of the Linnean Society, **1988**, doi: 10.1111/J.1095-8312.1988.TB01953.X.

- [28] <https://cvalues.science.kew.org/search/angiosperm>, **2023**.
- [29] D. C. Tank, J. M. Eastman, M. W. Pennell, P. S. Soltis, D. E. Soltis, C. E. Hinchliff, J. W. Brown, E. B. Sessa, L. J. Harmon, Nested radiations and the pulse of angiosperm diversification: increased diversification rates often follow whole genome duplications, *New Phytol*, sayı 207, ss 454-467, **2015**, doi: 0.1111/nph.13491.
- [30] P. S. Soltis, D. B. Marchant, Y. Van de Peer, D. E. Soltis, Polyploidy and genome evolution in plants, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2015**, doi: 10.1016/j.gde.2015.11.003.
- [31] R. Ren, H. Wang, C. Guo, N. Zhang, L. Zeng, Y. Chen, H. Ma, J. Qi, Widespread Whole Genome Duplications Contribute to Genome Complexity and Species Diversity in Angiosperms, *Molecular Plant*, c 11, sayı 3, ss 414-428, **2018**, doi: 10.1016/j.molp.2018.01.002
- [32] Z. Chumová, Z. Monier, K. Šemberová, E. Havlíčková, D. E. Brown, A. M. Muasya, N. G. Bergh, P. Trávníček, Diploid and tetraploid cytotypes of the flagship Cape species *Dicerothamnus rhinocerotis* (*Asteraceae*): variation in distribution, ecological niche, morphology and genetics, *Ann. Bot.*, **2023**, doi: 10.1093/aob/mcad084.
- [33] Lewis W, Polyploidy in species populations. In: Lewis W (ed.). *Polyploidy: Biological Relevance*. Plenum: New York. ss 103–144, **1980**.
- [34] Ramsey J, Schemske DW., Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu Rev Ecol Syst* 29, ss 467–501, **1998**.
- [35] Levin D., *The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution*. Oxford University Press: New York, **2002**.
- [36] Woodhouse, M., Burkart-Waco, D. Comai, L. Polyploidy, *Nature Education* 2(1):1, **2009**.

[37] J. Yuan, Q. Song, Polyploidy and Diploidization in Soybean, *Mol. Breed*, **2023**, doi: 10.1007/s11032-023-01396-y.

[38] P. Carnicero, J. Kröll, P. Schönswetter, Homoploid hybrids are common but evolutionary dead ends, whereas polyploidy is not linked to hybridization in a group of Pyrenean saxifrages, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, c 180, **2023**, doi: 10.1016/j.ympev.2023.107703.

[39] <https://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>, 2016. Erişim tarihi: **2023**.

[40] Y. Van de Peer, E. Mizrachi, K. Marchal, The evolutionary significance of polyploidy, *Nature Reviews Genetics*, c 18, ss 411-424, **2017**.

[41] S. P. Gordon, B. Contreras-Moreira, J. J. Levy, A. Djamei, A. Czedik-Eysenberg, V. S. Tartaglio, A. Session, J. Martin, A. Cartwright, A. Katz, V. R. Singan, Eugene Goltsman, K. Barry, V. H. Dinh-Thi, B. Chalhoub, A. Diaz-Perez, R. Sancho, J. Lusinska, E. Wolny, C. Nibau, J. H. Doonan, L. A. Mur, C. Plott, J. Jenkins, S. P. Hazen, S. J. Lee, S. Shu, D. Goodstein, D. Rokhsar, J. Schmutz, R. Hasterok, P. Catalan, J. P. Vogel, Gradual polyploid genome evolution revealed by pan-genomic analysis of *Brachypodium hybridum* and its diploid progenitors, *Nature Comm.*, c 11, **2020**.

[42] K. Alix, P. R. Gerard, T. Schwarzacher, J.S. Heslop-Harrison, Polyploidy and interspecific hybridization: partners for adaptation, speciation and evolution in plants, *Annals of Botany*, c 120, sayı 2, ss 183-194, **2017**, doi: 10.1093/aob/mcx079.

[43] J. S. H. Harrison, T. Schwarzacher, Q. Liu, Polyploidy: its consequences and enabling role in plant diversification and evolution, *Ann. Bot.*, c 131, sayı 1, ss 1-10, **2023**, doi: 10.1093/aob/mcac132.

[44] F. Kolář, M. Čertner, J. Suda, P. Schönswetter, B. C. Husband, Mixed-Ploidy Species: Progress and Opportunities in Polyploid Research, *Trends Plant Sci.*, c 12, ss 1041-1055, **2017**, doi: 10.1016/j.tplants.2017.09.011.

- [45] L. Liu, M. Yin, X. Guo, J. Wang, Y. Cai, C. Wang, X. Yu, N. Du, H. Brix, F. Eller, C. Lambertini, W. Guo, Cryptic lineages and potential introgression in a mixed-ploidy species (*Phragmites australis*) across temperate China, *Journal of Systematic and Evolution*, **2020**, doi: 10.1111/jse.12672.
- [46] Y. Liu, D. Li, L. Yang, H. Huang, The Microgeographical Patterns of Morphological and Molecular Variation of a Mixed Ploidy Population in the Species Complex *Actinidia chinensis*, *Plos One*, **2015**, doi: 10.1371/journal.pone.0117596.
- [47] B. Singliarova, J. Chrtek, I. Plackova, P. Mraz, Allozyme Variation in Diploid, Polyploid and Mixed-Ploidy Populations of *Pilosella alpicola* Group (*Asteraceae*): Relation to Morphology, Origin of Polyploids and Breeding System, *Folia Geobotanica*, c 46, ss 387-410, **2011**.
- [48] J. Viruel, M. Conejero, O. Hidalgo, L. Pokorny, R. F. Powell, F. Forest, M. B. Kantar, M. S. Gomez, S. W. Graham, B. Gravendeel, P. Wilkin, I. J. Leitch, A Target Capture-Based Method to Estimate Ploidy From Herbarium Specimens, *Front Plant Sci*, c 10, **2019**, doi: 10.3389/fpls.2019.00937.
- [49] L. J. Kramer, J. Bamberg, Comparing Methods of Ploidy Estimation in Potato (*Solanum*) Species, *American Journal of Potato Research*, ss 419-426, **2019**, doi: 10.1007/s12230-019-09729-4.
- [50] M. D. Windham, K. M. Pryer, D. B. Poindexter, F. Li, C. J. Rothfels, J. B. Beck, A step-by-step protocol for meiotic chromosome counts in flowering plants: A powerful and economical technique revisited, *App. Plant Sci.*, c 8, **2020**, doi: 10.1002/aps3.11342.
- [51] J. Doležal, J. Greilhuber, J. Suda, Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry, *Nature Protocols*, c 2, ss 2233-2244, **2007**.
- [52] M. Sun, E. Pang, W. N. Bai, D. Y. Zhang, K. Lin, ploidyfrost: Reference-free estimation of ploidy level from whole genome sequencing data based on de Bruijn graphs, *Molecular Ecology Resources*, c 23, sayı 2, ss 499-510, **2022**, doi: 10.1111/1755-0998.13720.

[53] J. D. Watson and F. H. C. Crick, A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid, *Nature*, c 171, sayı 1, ss 737–738, **1953**.

[54] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174), c 74, sayı 12, ss 5463–5467, **1977**.

[55] U. K. Nurjanovich, R. O. H. Qizi, S. S. Abdurashidovna, Analysis Of The Evolution Of Technologies For Determining The Nucleotide Sequence Of A Dna Molecule, *International Scientific Journal*, c 5, sayı 2, **2023**, doi: 5281/zenodo.7934854v.

[56] J. Shendure and H. Ji, Next-generation DNA sequencing, *Nat. Biotechnol.*, c 26, sayı 10, ss 1135–1145, **2008**.

[57] E. E. Schadt, S. Turner, A. Kasarskis, A window into third-generation sequencing, *Human Molecular Genetics*, sayı 19, ss 227-240, **2010**, doi: 10.1093/hmg/ddq416.

[58] M. Mignardi, M. Nilsson, Fourth-generation sequencing in the cell and the clinic, *Genome Medicine*, **2014**.

[59] J. Schmutz, S. B. Cannon, J. Schlueter, J. Ma, T. Mitros, W. Nelson, D. L. Hyten, Q. Song, J. J. Thelen, J. Cheng, D. Xu, U. Hellsten, G. D. May, Y. Yu, T. Sakurai, T. Umezawa, M. K. Bhattacharyya, D. Sandhu, B. Valliyodan, E. Lindquist, M. Peto, D. Grant, S. Shu, D. Goodstein, S. A. Jackson, Genome sequence of the palaeopolyploid soybean, *Nature*, sayı 463, ss 178-183, **2010**.

[60] T. Hu, P. Pattyn, E. G. Bakker, J. Cao, J. Cheng, R. M. Clark, N. Fahlgren, J. A. Fawcett, H. Grimwood, H. Gundlach, G. Haberer, J. D. Hollister, S. Ossowski, R. P. Otillar, A. A. Salamov, K. Schneeberger, M. Spannagl, X. Wang, L. Yang, M. E. Nasrallah, J. Bergelson, J. C. Carrington, B. S. Gaut, J. Schmutz, K. F. X. Mayer, Y. Van de Peer, I. V. Grigoriev, M. Nordborg, D. Weihel, Y. Guo, The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change, *Nat. Genet.*, sayı 43, ss 476-481, **2011**, doi: 10.1038/ng.807.

- [61] Bento, M., Gustafson, J. P., Viegas, W., and Silva, M. Size matters in triticeae polyploids: larger genomes have higher remodeling. *Genome* 54, ss 175–183, **2011**, doi: 10.1139/G10-107
- [62] Li, F., Fan, G., Wang, K., Sun, F., Yuan, Y., Song, G., Genome sequence of the cultivated cotton *Gossypium arboreum*. *Nat. Genet.* 46, ss 567–572. 2011, doi: 10.1038/ng.2987.
- [63] Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., Parkin, I. A., Tang, H., Wang, X., Plant genetics. Early allopolyploid evolution in the post-neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* 345, ss 950–953, **2014**, doi: 10.1126/science.1253435.
- [64] Y. Kaya, Z. U. Aydın, X. Cai, X. Wang, A. A. Dönmez, Genome-wide characterization of two *Aubrieta* taxa: *Aubrieta canescens* subsp. *canescens* and *Au. macrostyla* (Brassicaceae), *AoB Plants*, c 14, sayı 5, **2022**, doi: doi.org/10.1093/aobpla/plac035.
- [65] B. McClintock, The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea mays*., *Genetics*, c 26, sayı 2, ss 234–82, **1941**.
- [66] B. McClintock, The origin and behavior of mutable loci in maize., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, c 36, sayı 6, ss 344–355, **1950**.
- [67] V. Pereira, Insertion bias and purifying selection of retrotransposons in the *Arabidopsis thaliana* genome., *Genome Biol.*, c 5, sayı 10, 2004.
- [68] T. Wicker, F. Sabot, A. Hua-Van, J. L. Bennetzen, P. Capy, B. Chalhoub, A. Flavell, P. Leroy, M. Morgante, O. Panaud, E. Paux, P. SanMiguel, and A. H. Schulman, Reply: A unified classification system for eukaryotic transposable elements should reflect their phylogeny, *Nat. Rev. Genet.*, c 10, sayı 4, **2009**.
- [69] T. R. Gregory, J. A. Nicol, H. Tamm, B. Kullman, K. Kullman, I. J. Leitch, B. G. Murray, D. F. Kapraun, J. Greilhuber, and M. D. Bennett, Eukaryotic genome size databases, *Nucleic Acids Res.*, c 35, ss 332– 338, **2007**.

- [70] C. Biémont, A brief history of the status of transposable elements: From junk DNA to major players in evolution, *Genetics*, c 186, sayı 4, ss 1085–1093, **2010**.
- [71] A. Serrato-Capuchina and D. Matute, The Role of Transposable Elements in Speciation, *Genes (Basel)*., c 9, sayı 5, **2018**.
- [72] Pray, L., Transposons: The jumping genes. *Nature Education* 1(1):204, **2008**.
- [73] G. W. Vurture, F. J. Sedlazeck, M. Nattestad, C. J. Underwood, H. Fang, J. Gurtowski, M. C. Schatz, GenomeScope: fast reference-free genome profiling from short reads, *Bioinformatics*, c 15, sayı 33, ss 2202-2204, **2017**, doi: 10.1093/bioinformatics/btx153.
- [74] T. R. Ranallo-Benavidez, K. S. Jaron, M. C. Schatz, GenomeScope 2.0 and Smudgeplot for reference-free profiling of polyploid genomes, *Nature Communications*, sayı 11, **2020**.
- [75] A. Sievers, K. Bosiek, M. Bisch, C. Dreessen, J. Riedel, P. Froß, M. Hausmann, G. Hildenbrand, *K-mer* Content, Correlation, and Position Analysis of Genome DNA Sequences for the Identification of Function and Evolutionary Features, *Genes*, c 8, **2017**, doi: 10.3390/genes8040122.
- [76] D. E. Wood, S. L. Salzberg, Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments, *Genome Biology*, sayı 15, **2014**.
- [77] N. Nagarajan, M. Pop, Sequence assembly demystified, *Nat. Rev. Genet.*, c 14, sayı 3, ss 157-167, **2013**, doi: 10.1038/nrg3367.
- [78] G. Benoit, P. Peterlongo, M. Mariadassou, E. Drezen, S. Schbath, D. Lavenier, C. Lemaitre, Multiple comparative metagenomics using multiset k-mer counting, *PeerJ Comp. Sci.*, **2016**, doi: 10.7717/peerj-cs.94.
- [79] A. Shajii, D. Yorukoglu, Y. W. Yu, B. Berger, Fast genotyping of known SNPs through approximate k-mer matching, *Bioinformatics*, c 32, ss 538-544, **2016**, doi: 10.1093/bioinformatics/btw460.

- [80] Jared T. Simpson and Richard Durbin, Efficient de novo assembly of large genomes using compressed data structures, *Genome Res.*, ss 549-556, **2012**, doi: 10.1101/gr.126953.111.
- [81] R. Chikhi and P. Medvedev, Informed and automated k-mer size selection for genome assembly, *Bioinformatics*, c 30, sayı 1, ss 31–37, **2014**.
- [82] F. Al-Qurainy, A. Z. Gaafar, S. Khan, M. Nadeem, A. M. Alshameri, M. Tarroum, S. Alansi, N. B. Almarri, N. S. Alfarrarj, Estimation of Genome Size in the Endemic Species *Reseda pentagyna* and the Locally Rare Species *Reseda lutea* Using comparative Analyses of Flow Cytometry and K-mer Approaches, *Plants*, sayı 10, **2021**, doi: 10.3390/plants10071362.
- [83] M. Tamiru, S. Natsume, H. Takagi, B. White, H. Yaegashi, M. Shimizu, K. Yoshida, A. Uemura, K. Oikawa, A. Abe, N. Urasaki, H. Matsumura, P. Babil, S. Yamanaka, R. Matsumoto, S. Muranaka, G. Girma, A. Lopez-Montes, M. Gedil, R. Bhattacharjee, M. Abberton, P. L. Kumar, I. Rabbi, M. Tsujimura, R. Terauchi, Genome sequencing of the staple food crop white Guinea yam enables the development of a molecular marker for sex determination, *BMC*, c 15, **2017**.
- [84] P. Zhou, J. Li, J. Huang, F. Li, Q. Zhang, M. Zhang, Genome Survey Sequencing and Genetic Background Characterization of *Ilex chinensis* Sims (Aquifoliaceae) Based on Next-Generation Sequencing, *Plants*, c 11, **2022**, doi: 10.3390/plants11233322.
- [85] G. A. Wyngaard, R. Skern-Mauritzen, K. Malde, R. Prendergast, S. Peruzzi, The salmon louse genome may be much larger than sequencing suggests, *Nature Scientific Reports*, c 12, **2022**.
- [86] Q. Du, Z. Sui, L. Chang, H. Wei, Y. Liu, P. Mi, E. Shang, N. Zeeshan, Z. Que, Genome size of *Alexandrium catenella* and *Gracilariopsis lemaneiformis* estimated by flow cytometry, *Journal of Ocean University of China*, sayı 15, sss 704-710, **2016**.
- [87] M. R. Midin, M. S. Nordin, M. Madon, M. N. Saleh, H. Goh, N. M. Noor, Determination of the chromosome number and genome size of *Garcinia mangostana* L. via cytogenetics, flow cytometry and k-mer analyses, *International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, sayı 71, **2018**, doi: 10.1080/00087114.2017.1403762.

- [88] T. Liu, Y. Liu, G. Fu, T. LV, F. Liu, Y. Zhang, D. Su, Y. Wang, C. Zheng, X. Su, Estimation of genome size for *Psammochloa villosa* by flow cytometry and K-mer analysis, *Acta Prataculturae Sinica*, c 31, sayı 12, ss 133-145, **2022** doi: 10.11686/cyxb2021491.
- [89] K. Sun, D. Guan, H. Huang, S. Xu, Genome Survey Sequencing of the Mole Cricket *Gryllotalpa orientalis*, *Genes*, c 14, **2023**, doi: 10.3390/genes14020255.
- [90] Y. Chen, Y. Chen, C. Shi, Z. Huang, Y. Zhang, S. Li, Y. Li, J. Yu, Z. Li, Z. Zhang, J. Wang, H. Yang, L. Fang, Q. Chen, SOAPnuke: a MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data, *GigaScience*, c 7, sayı 1, **2017**, doi: 10.1093/gigascience/gix120.
- [91] S. Chen, Y. Zhou, Y. Chen, J. Gu, fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, *Bioinformatics*, c 34, sayı 17, ss 884-890, **2018**, doi: 10.1093/bioinformatics/bty560.
- [92] A. Allam, P. Kalnis, V. Solovyev, Karect: accurate correction of substitution, insertion and deletion errors for next-generation sequencing data, *Bioinformatics*, c 31, sayı 21, ss. 3421–3428, **2015**, doi: 10.1093/bioinformatics/btv415.
- [93] D. Li, C. Liu, R. Luo, K. Sadakane, T. Lam, MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct *de Bruijn* graph, *Bioinformatics*, c 31, sayı 10, ss 1674-1676, **2015**, doi: 10.1093/bioinformatics/btv033.
- [94] R. Vaser, I. Sovic, N. Nagarajan, M. Sikic, Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads, *Genome Research*, c 33, sayı 12, **2017**, doi: 10.1101/gr.214270.116.
- [95] H. Li, Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences, *Bioinformatics*, c 34, sayı 18, ss 3094–3100, **2018**.

- [96] M. Alonge, L. Lebeigle, M. Kirsche, K. Jenike, S. Ou, S. Aganezov, X.Wang, Z. B. Lippman, M. C. Schatz, S. Soyk, Automated assembly scaffolding using RagTag elevates a new tomato system for high-throughput genome editing, *Genome Biology*, c 23, s 258, **2022**, doi: 10.1186/s13059-022-02823-7
- [97] F. A. Simao, R. M. Waterhouse, P. Ioannidis, E. V. Kriventseva, E. M. Zdobnov, BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs, *Bioinformatics*, c 31, sayı 19, ss 3210-3212, **2015**, doi: 10.1093/bioinformatics/btv351.
- [98] M. Stanke, R. Steinkamp, S. Waack, B. Morgenstern, AUGUSTUS: A web server for gene finding in eukaryotes, *Nucleic Acids Res.* c. 32, **2004**, doi: 10.1093/nar/gkh379.
- [99] D. M. Emms, S. Kelly, OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics, *Genome Biology*, c 20, sayı 238, **2019**, doi: 10.1186/s13059-019-1832-y.
- [100] K. Katoh, D. M. Standley, MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version:7 Improvements in Performance and Usability, *Mol. Biol. And Evo.* c 30, sayı 4, **2013**, doi: 10.1093/molbev/mst010.
- [101] <https://www.repeatmasker.org/RepeatModeler/> Erişim tarihi: Haziran **2023**.
- [102] <https://www.repeatmasker.org/> Erişim tarihi: Haziran **2023**.
- [103] <https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/galaxy/> Erişim tarihi Ekim **2023**.
- [104] H. Chen, A. Zwaenepoel, Y. Van de Peer, wgd v2: a suite of tools to uncover and date ancient polyploidy and whole-genome duplication, *Bioinformatics*, c. 40, s. 5, **2024**, doi: 10.1093/bioinformatics/btae272.
- [105] Z. Yang, A. Notes, PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood, *Molecular Biology and Evolution*, c 24, sayı 7, ss. 1586-1591, **2007**, doi: 10.1093/molbev/msm088.

- [106] F. Almeida-Silva, Y. Van de Peer, doubletrouble: an R/Bioconductor package for the identification, classification, and analysis of gene and genome duplications, **2024**, doi: 10.1101/2024.02.27.582236.
- [107] B. Buchfink, K. Reuter, H. Drost, Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND, *Nature Methods*, c 18, ss. 366-368, **2021**, doi: 10.1038/s41592-021-01101-x.
- [108] <https://timetree.org/> Erişim tarihi Ekim **2024**.
- [109] M. N. Puttick, MCMCtreeR: functions to prepare MCMCtree analyses and visualize posterior ages on trees, *Bioinformatics*, c 35, sayı 24, ss 5321-5322, **2019**, doi: 10.1093/bioinformatics/btz554.
- [110] N. Panchy, M. Lehti-Shiu, S. Shiu, Evolution of Gene Duplication in Plants, *Plant Physiology*, c 171, sayı 4, ss 2294-2316, **2016**, doi: 10.1104/pp.16.00523.
- [111] J. Viruel, M. Conejero, O. Hidalgo, L. Pokorny, R. F. Powell, F. Forest, M. B. Kantar, M. S. Gomez, S. W. Graham, B. Gravendeel, P. Wilkin, I. J. Leitch, A Target Capture-Based Method to Estimate Ploidy From Herbarium Specimens, *Front. Plant Sci.* **2019**, doi: 10.3389/fpls.2019.00937.
- [112] S. Mohammadin, W. Wang, T. Liu, H. Moazzeni, K. Ertuğrul, T. Uygsal, C. S. Christodoulou, P. P. Edger, J. C. Pires, S. I. Wright, M. E. Schranz, Genome-wide nucleotide diversity and associations with geography, ploidy level and glucosinolate profiles in *Aethionema arabicum* (*Brassicaceae*), *Plant Systematics and Evolution*, c 304, sayı 5, ss 619-620, **2018**.
- [113] Y. Mgwaty, A. A. Stander, S. Ferreira, W. Williams, U. Hesse, Rooibos (*Aspalathus linearis*) Genome Size Estimation Using Flow Cytometry and K-mer Analyses, *Plants*, **2020**, doi: 10.3390/plants9020270.
- [114] T. E. Wood, N. Takebayashi, M. S. Barker, I. Mayrose, P. B. Greenspoon, L. H. Rieseberg, The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. C* 106, ss, 13875–13879, **2009**, doi: 10.1073/pnas.0811575106.

- [115] C. Parisod, N. Senerchia, Responses of transposable elements to polyploidy. *Topics Curr. Genet.* c. 24, **2012**, doi: 10.1007/978-3-642-31842-99.
- [116] C. M. Vicient, J. M. Casacuberta, Impact of transposable elements on polyploid plant genomes, *Ann. Bot.* c. 120, ss 195-207, **2017**, doi: 10.1093/aob/mcx078.
- [117] J. Blommaert, S. Riss, B. Hecox-Lea, D. B. M. Welch, C. P. Stelzer, Small, but surprisingly repetitive genomes: transposon expansion and not polyploidy has driven a doubling in genome size in a metazoan species complex, *BMC Genomics*, c 20, **2019**, doi: 10.1186/s12864-019-5859-y.
- [118] X. Wang, J. A. Morton, J. Pellicer, I. J. Leitch, A. R. Leitch, Genome downsizing after polyploidy: mechanisms, rates and selection pressures, *The Plant Journal*, c 107, sayı 4, ss 1003-1015, **2021**, doi: doi.org/10.1111/tpj.15363.
- [119] R. A. Gill, F. Scossa, G. J. King, A. A. Golicz, C. Tong, R. J. Snowdon, A. R. Fernie, S. Liu, On the Role of Transposable Elements in the Regulation of Gene Expression and Subgenomic Interactions in Crop Genomes, *Critical Reviews in Plant Sciences* , c 40, sayı 2, **2021**, doi: 10.1080/07352689.2021.1920731.
- [120] J. A. Agren, H. Huang, S. I. Wright, Transposable element evolution in the allotetraploid *Capsella bursa-pastoris*, *Am. J. Bot.*, c 103, sayı 7, **2016**, doi: 10.3732/ajb.1600103.
- [121] M. Piednoel, A. Sousa, S. S. Renner, Transposable elements in a clade of three tetraploids and a diploid relative, focusing on Gypsy amplification, *Mobile DNA*, c 12, **2015**.
- [122] D. E. Jarvis, J. S. Sproul, B. Navarro-Dominguez, K. Krak, K. Jaggi, Y. Huang, T. Huang, T. C. Lin, E. N. Jellen, P. J. Maughan, Chromosome-Scale Genome Assembly of the Hexaploid Taiwanese Goosefoot “Djulius” (*Chenopodium formosanum*), *Genome Biol. Evol.*, c 14, **2022**, doi: 10.1093/gbe/evac120.
- [123] M. S. Bisht, M. Singh, A. Chakraborty, V. K. Sharma, Genome of the most noxious weed water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) provides insights into plant invasiveness and its translational potential, *iScience*, c 27, sayı 9, **2024**, doi: 10.1016/j.isci.2024.110698.

- [124] M. S. Barker, N. Arrigo, A. E. Baniaga, Z. Li, D. A. Levin, On the relative abundance of autopolyploids and allopolyploids, *New Phytologist*, c 210, sayı 2, ss. 391-398, **2016**, doi: 10.1111/nph.13698.
- [125] A. E. Baniaga, H. E. Marx, N. Arrigo, M. S. Barker, Polyploid plants have faster rates of multivariate niche differentiation than their diploid relatives, *Ecology Letters*, c 23, sayı 1, ss. 68-78, **2020**, doi: 10.1111/ele.13402.
- [126] T. Dunn, A. Sethuraman, Accurate Inference of the Polyploid Continuum using Forward-time Simulations, *Molecular Biology and Evolution*, **2024**, doi: 10.1093/molbev/msae241.
- [127] Y. Wang, J. Yu, M. Jiang, W. Xi, X. Zhang, H. Tang, Sequencing and Assembly of Polyploid Genomes, *Methods in Molecular Biology*, **2023**, doi: 10.1007/978-1-0716-2561-3_23.
- [128] S. Wang, A. Wang, R. Chen, D. Xu, H. Wang, F. Jiang, H. Liu, W. Qian, W. Fan, Haplotype-resolved chromosome-level genome of hexaploid Jerusalem artichoke provides insights into its origin, evolution, and inulin metabolism, *Plant Communications*, c 5, sayı 3, **2024**, doi: 10.1016/j.xplc.2023.100767.
- [129] F. Zhang, Y. Wang, Y. Lin, H. Wang, Y. Wu, W. Ren, L. Wang, Y. Yang, P. Zheng, S. Wang, J. Yue, Y. Liu, Haplotype-resolved genome assembly provides insights into evolutionary history of the *Actinidia arguta* tetraploid, *Molecular Horticulture*, **2024**, doi: 10.1186/s43897-024-00083-6.
- [130] H. Chen, A. Zwaenepoel, Inference of Ancient Polyploidy from Genomic Data, In: Van de Peer, Polyploidy. *Methods in Molecular Biology*, c 2545, **2023**, doi: 10.1007/978-1-0716-2561-3_1.
- [131] S. Wu, B. Han, Y. Jiao, Genetic Contribution of Paleopolyploidy to Adaptive Evolution in Angiosperms, *Molecular Plant*, c 13, sayı 1, ss 59-71, **2020**, doi: 10.1016/j.molp.2019.10.012.

[132] J. A. Fawcett, S. Maere, Y. Van de Peer, Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous–Tertiary extinction event, PNAS, c 106, sayı 14, **2009**, doi: 10.1073/pnas.0900906106.

[133] K. Vanneste, G. Baele, S. Maere, Y. Van de Peer, Analysis of 41 plant genomes supports a wave of successful genome duplications in association with the Cretaceous–Paleogene boundary, Genome Research, **2014**, doi: 10.1101/gr.168997.113.

[134] Y. Van de Peer, S. Maere, A. Meyer, The evolutionary significance of ancient genome duplications, Nature Reviews Genetics, sayı 10, **2009**, doi: 10.1038/nrg2600.

[135] F. Akgün, M. S. Kayseri Özer, Türkiye Paleovejetasyonunun Jeolojik Zaman İçerisindeki Değişimi ve Biyoçeşitlilik, Türkiye Bilimler Akademisi, doi: 10.53478/TUBA.978-625-8352-58-0.ch15.

[136] Ü. Akkemik, H. Çelik, Türkiye’de tespit edilen fosil gymnosperm ağaçlarının mekânsal ve zamansal dağılımı, Turkish Journal of Biodiversity, c 5, sayı 1, ss 57-66, **2022**, doi: 10.38059/biodiversity.1094302.

[137] X. Wang, J. A. Morton, J. Pellicer, I. J. Leitch, A. R. Leitch, Genome downsizing after polyploidy: mechanisms, rates and selection pressures, The Plant Journal, c 107, sayı 4, **2021**, doi: 10.1111/tpj.15363.

[138] Y. Wang, H. Tang, X. Wang, Y. Sun, P. V. Joseph, A. H. Paterson, Detection of colinear blocks and synteny and evolutionary analyses based on utilization of MCScanX, Nature Protocols, c 19, ss. 2206-2229, **2024**, doi: 10.1038/s41596-024-00968-2.