

**ALPİNİK *PHYLLOLEPIDUM CYCLOCARPUM* (BOISS.) L.
CECCHI SUBSP. *CYCLOCARPUM*'UN (BRASSICACEAE)
BİYOCOĞRAFYASI, POPÜLASYON GENOMİĞİ VE
NUMERİK TAKSONOMİSİ**

**BIOGEOGRAPHY, POPULATION GENOMICS AND
NUMERICAL TAXONOMY OF ALPINE *PHYLLOLEPIDUM
CYCLOCARPUM* (BOISS.) L. CECCHI SUBSP.
*CYCLOCARPUM***

EMRULLAH YILMAZ

DOÇ. DR. BARIŞ ÖZÜDOĞRU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

Yüksek Lisans TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Canım Aileme...

ÖZET

Alpinik *Phyllolepidum cyclocarpum* (Boiss.) L. Cecchi subsp. *cyclocarpum*'un (Brassicaceae) Biyocoğrafyası, Popülasyon Genomiği ve Numerik Taksonomisi

Emrullah YILMAZ

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Barış ÖZÜDOĞRU

Haziran 2024, xii+76 sayfa

Bu çalışmada, Toros ve Anadolu Diyagonalı Dağları'nın (Toros Yolu) alpinik kayalıklarında yaşayan ve Türkiye'ye endemik olan *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* (Kayaincisi) taksonunun popülasyon dinamiklerinin genom düzeyinde örnekleme yöntemini kullanan RADSeq verileri yardımıyla doğu ile batı popülasyon grupları arasındaki ilişkileri belirleyip türün demografik yapısını ortaya çıkarmak amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, ilgili bitkinin literatürde taranan lokalite bilgileri ve bulunabileceği habitatlar dikkate alınarak, Toros Yolu üzerindeki dağlık bölgelerde arazi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Morfolojik analizler için, toprak üstü özelliklerden sadece sayısal ölçülebilecek karakterler dikkate alınmış ve elde edilen veri seti Temel Bileşenler Analizi (TBA-PCA) ile değerlendirilmiştir. Bunun yanında, RADSeq dizileme yöntemi kullanılarak 15 popülasyona ait 140 birey dizilenmiştir. Genomik veri hem Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) hem de snakeRAD kullanılarak elde edilen lokuslarla değerlendirilmiştir. Lokus tabanlı filogenetik analizler için hem parsimoni bilgi verici 50 lokus hem de rasgele örneklenmiş 3 tane 50 lokusluk veri seti kullanılmıştır. Hem lokus verisi ile gerçekleştirilen koalesent tabanlı ve zamanla kalibre

edilmiş filogenomik analizler, hem de SNP verisi ile gerçekleştirilen PCA ve karışım analizleri doğu ve batı popülasyon grupları arasında belirgin bir farklılaşmayı ortaya koymuştur. Genomik veriden elde edilen bulgular morfolojik verilerle de desteklenmiştir. Ayrıca, popülasyonlar arası ve içi farklılaşma sonuçları da doğu popülasyonları içerisinde genetik farklılaşmanın yüksek, batı popülasyonları içerisinde ise genetik çeşitliliğin oldukça düşük olduğunu göstermiştir. Her iki popülasyon grubu arasında ise oldukça yüksek bir genetik farklılaşma tespit edilmiştir. Son olarak, doğu, batı ve tüm popülasyonlar için gerçekleştirilen demografik analizlerde doğu ve batı popülasyonlarında sırasıyla Son Buzul Maksimumu ve erken Dryas Dönemi buzullaşmalarından sonra belirgin bir şekilde popülasyon daralması tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anadolu Diyagonali, Alpinik Flora, Filogenomik, NGS, RADSeq

ABSTRACT

Biogeography, Population Genetics and Numerical Taxonomy of Alpine *Phyllolepidum cyclocarpum* (Boiss.) L. Cecchi subsp. *cyclocarpum*

Emrullah YILMAZ

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Barış ÖZÜDOĞRU

June, 2024, xii+76 pages

This study aimed to determine the relationships between the eastern and western population groups of *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*, a taxon endemic to Turkey found in the alpine rocks of the Taurus and Anatolian Diagonal mountains (Taurus Way). Using RADSeq data and genome-level sampling, the study sought to uncover the species' demographic structure. Field studies were conducted in the Taurus Way mountains, targeting localities and potential habitats identified through literature review. For morphological analysis, only quantitatively measurable characters were considered, and the data set was evaluated via Principal Component Analysis. Additionally, 140 individuals from 15 populations were sequenced using the RADSeq method. Genomic data analysis utilized both Single Nucleotide Polymorphism (SNP) and loci obtained using snakeRAD. Phylogenetic analyses employed both parsimony-informative 50 loci and three randomly sampled 50 loci datasets. Coalescent-based and time-calibrated phylogenomic analyses with locus data, along with PCA and admixture analyses with SNP data, demonstrated clear differentiation between eastern and western population groups. Genomic findings were supported by

morphological data. The study also revealed high genetic differentiation within eastern populations and low genetic diversity within western populations, with significant differentiation between the two groups. Demographic analyses indicated a significant population construction in both eastern and western populations following the Last Glacial Maximum and early Dryas Period glaciations, respectively.

Keywords: Anatolian Diagonal, Alpine Flora, Phylogenomics, NGS, RADSeq

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitimim süresince ve bu çalışmanın her aşamasında bana rehberlik eden, değerli bilgi ve tavsiyeleriyle hayatıma yön veren kıymetli hocam Doç. Dr. Barış ÖZÜDOĞRU'ya,

Tezin birçok aşamasında fikirlerinden faydalandığımız Doç. Dr. İsmail Kudret SAĞLAM'a ve Işın ALTINKAYA'ya,

Hacettepe Üniversitesi Biyocoğrafya Araştırma Laboratuvarı'nı kullanımımıza açan sayın Prof. Dr. Utku PERKTAŞ'a,

Tezime yapmış oldukları tüm katkılar ve arkadaşlıkları için Ilgın Deniz CAN, Kaan SOYUER, İlayda DUMLUPINAR ve Elif ÇELTİK'e,

Ayrıca, lisans hayatım boyunca bana destek olan Prof. Dr. Güler EKMEKÇİ, Doç. Dr. Çiğdem Özenirler'e ve Doç. Dr. Burcu Tarıkahya HACIOĞLU'na,

Bu çalışmada yer alan kısmi numerik hesaplamaların gerçekleştirilmesine olanak sağlayan TÜBİTAK ULAKBİM, Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi (TRUBA kaynakları)'ne,

Bu tezin tamamlanmasında 120Z561 numaralı proje ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a, Canım aileme; bugünlere gelmemde sağladıkları katkılar için sonsuz teşekkürler...

Emrullah YILMAZ

Haziran, 2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Anadolu'nun Zengin Biyoçeşitliliği ve Nedenleri.....	3
2.2. Anadolu Diyagonali ve Toros Yolu.....	4
2.3. Brassicaceae Familyası.....	6
2.4. <i>Phyllolepidum</i> Trinajstić.....	7
2.5. Yeni Nesil Dizileme: RAD-Seq	8
2.6. Çalışmanın Amacı ve Hipotez	9
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	10
3.1. Örnekleme ve Arazi Çalışmaları	10
3.2. Morfolojik Çalışmalar	10
3.3. Moleküler Çalışmalar	12
3.3.1. DNA İzolasyonu ve DNA Çoğaltma	12
3.3.2. Filogenetik Çalışmalar için Veri Hazırlama	13
3.3.2.1. Barkod Ayırma	13
3.3.2.2. Kalite Kontrolü	16
3.3.2.3. Ham Verinin BAM Dosyalarına Dönüştürülüp Hizalanması.....	17

3.3.3. Filogenetik Analizler için Lokus Belirleme	18
3.3.4. Filogenetik Analizler ve Ayrılma Zamanı Hesaplamaları	19
3.4. Popülasyon Genetiği Çalışmaları.....	20
3.4.1. Polimorfik Bölge Belirleme	20
3.4.2. Popülasyon Genetik Yapısı.....	21
3.4.2.1. Temel Bileşenler Analizi (TBA - PCA).....	21
3.4.2.2. Karışım Analizi (Admixture)	23
3.4.2.3. Popülasyon İçi ve Popülasyonlar Arası Genetik Çeşitlilik	26
3.5. Demografik Analizler	29
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	32
4.1. Arazi Çalışmaları.....	32
4.2. Morfolojik Çalışmalar	36
4.3. Moleküler Çalışmalar	45
4.3.1. Filogenetik çalışmalar için Veri Hazırlığı	45
4.3.2. Kalite Kontrolü.....	47
4.3.3. Filogenetik Analizler, Ayrılma Zamanı Hesaplamaları ve Biyocoğrafik Analizler.....	48
4.4. Popülasyon Genetiği Çalışmaları.....	53
4.4.2. Temel Bileşenler Analizi (TBA - PCA).....	53
4.4.1. Karışım Analizi (Admixture).....	54
4.4.3. Popülasyon İçi ve Popülasyonlar Arası Genetik Çeşitlilik.....	56
4.5. Demografik Analizler	60
5. YORUM.....	67
6. KAYNAKLAR.....	69
EK 1 - Tezden Türetilmiş Yayınlar.....	77
Tez Orijinallik Raporu	78
ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Türkiye'nin fitocoğrafik bölgeleri ve Anadolu Diyagonali	5
Şekil 2.2. Bir Dispersal Koridoru olarak Toros Yolu.....	6
Şekil 4.1. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> 'un güncellenmiş yayılışı.	32
Şekil 4.2. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> 'un Doğu Toroslar'a ait popülasyonları	33
Şekil 4.3. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> 'un Batı Toroslar'a ait popülasyonları.....	34
Şekil 4.4. Çalışılan <i>P. cyclocarpum</i> popülasyonlarında ölçülmüş morfolojik varyasyonun Temel Bileşenler Analizi.....	37
Şekil 4.5. Temel bileşenlerin toplam varyasyonun yüzde cinsinden ne kadarını açıkladığını gösteren varyasyon grafiği (Scree Plot).....	38
Şekil 4.6. Değişkenlerin TB1 bileşenine sağladıkları katkı düzeyleri (%).	39
Şekil 4.7. Değişkenlerin TB2 bileşenine sağladıkları katkı düzeyleri (%).	40
Şekil 4.8. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> popülasyonlarında yaprak varyasyonu.....	42
Şekil 4.9. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> popülasyonlarında meyve varyasyonu	43
Şekil 4.10. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> popülasyonlarında tohum varyasyonu	44
Şekil 4.11. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> 'a ait bireylerin FastQC kullanılarak yapılan kalite kontrolü	47
Şekil 4.12. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> popülasyonları ve parsimoni bilgi verici 50 lokus kullanılarak *Beast analizi sonucu elde edilmiş ve zamanla kalibre edilmiş popülasyon ağacı.....	48
Şekil 4.13. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> popülasyonları ve parsimoni bilgi verici 50 lokus kullanılarak Beast analizi sonucu elde edilmiş popülasyon ağacı.....	49
Şekil 4.14. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> popülasyonları ve rastgele seçilmiş 50 lokus kullanılarak *Beast analizi sonucu elde edilmiş popülasyon ağacı	50
Şekil 4.15. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> popülasyonları ve rastgele seçilmiş 50 lokus kullanılarak *Beast analizi sonucu elde edilmiş popülasyon ağacı.....	51
Şekil 4.16. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> popülasyonları ve rastgele seçilmiş 50 lokus kullanılarak *Beast analizi sonucu elde edilmiş popülasyon ağacı	52
Şekil 4.17. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> 'un 15 farklı popülasyonu için SNP verisi (GL) kullanılarak elde edilen Temel Bileşenler Analizi (TBA).....	53
Şekil 4.18. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> bireyelerine ait Karışım Analizi.....	54
Şekil 4.19. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> 'a ait ve atasal popülasyon, K 2 olarak hesaplanan karışım analizi sonucu.....	55
Şekil 4.20. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> popülasyonları için ağırlıksız Fst analiz sonuçları	57

Şekil 4.21. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> popülasyonları için ağırlıklı Fst analiz sonuçları	58
Şekil 4.22. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cylocarpum</i> 'un batı popülasyonlarına ait etkin popülasyon büyüklüğünün (Ne) zamana bağlı değişimi	60
Şekil 4.23. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cylocarpum</i> 'un batı popülasyonlarına ait Minör Alel Frekans Spektrumu (folded SFS).....	61
Şekil 4.24. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cylocarpum</i> 'un doğu popülasyonlarına ait etkin popülasyon büyüklüğünün (Ne) zamana bağlı değişimi	62
Şekil 4.25. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cylocarpum</i> 'un doğu popülasyonlarına ait Minör Alel Frekans Spektrumu (folded SFS).....	63
Şekil 4.26. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cylocarpum</i> 'un tüm popülasyonlarına ait etkin popülasyon büyüklüğünün (Ne) zamana bağlı değişimi	64
Şekil 4.27. <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cylocarpum</i> 'un doğu popülasyonlarına ait Minör Alel Frekans Spektrumu (folded SFS).....	66

ÇİZELGELER DİZİ

Çizelge 3.1. Morfolojik çalışmalarda kullanılan karakterler	11
Çizelge 3.2. DNeasy Plant Mini Kit ile uygulanan protokol basamakları.....	12
Çizelge 4.1. Arazi çalışmalarında örneklenen <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> popülasyonları.....	35
Çizelge 4.2. TB1 bileşenine en çok katkı sağlayan değişkenler ve ortalamaları.	40
Çizelge 4.3. TB2 bileşenine en çok katkı sağlayan değişkenler ve ortalamaları.	41
Çizelge 4.4. Toplanan <i>Phyllolepidum cyclocarpum</i> subsp. <i>cyclocarpum</i> 'a ait verilen kodlar, popülasyon bilgileri ve DNA miktarları (Qubit).	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

km ²	kilometrekare
$\theta\pi$	Theta Pi
θ_s	Theta S

Kısaltmalar

AEF	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbariumu
ANK	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbariumu
B	Berlin Herbariumu
BAM	Binary Alignment Map
E	Ege Üniversitesi Herbariumu
EGE	Ege Üniversitesi Herbariumu
GAZI	Gazi Üniversitesi Herbariumu
GL	Genotype Likelihood
HKY	Hasegawa Kishino Yano
HUB	Hacettepe Üniversitesi Herbariumu
ISTE	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbariumu
K	Kew Herbariumu
KONF	Selçuk Üniversitesi Herbariumu
MAF	Minor Allele Frequency
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
ng/ μ L	Nano Gram / Mikro Litre
NGS	Next-Generation Sequencing

RADSeq	Restriction Site Associated DNA Sequencing
SAM	Sequence Alignment Map
SFS	Site Frequency Spectrum
TB / PC	Temel Bileşenler / Principal Components
TBA / PCA	Temel Bileşenler Analizi / Principal Component Analysis
TNP / SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi / Single Nucleotide Polymorphism

1. GİRİŞ

Türlerin azalması ya da yok olması, biyoçeşitlilik kavramı farkındalık kazandığından beri ele alınan önemli bir konu olmuştur. Bu bağlamda, biyoçeşitliliğin negatif yönde değişmesinde; genel olarak çevresel değişiklikler, iklimsel değişiklikler, insan etkisi, buzul devirlerin başlaması gibi doğal dönemler veya istilacı türlerin artması gibi birçok etkenin rol oynadığı bilinmektedir (Wilson, 1992; Malav, Kumar ve Malav, 2020). Özellikle, büyük iklimsel veya çevresel değişim dönemlerinde türlerin yok olmaması için korunabileceği bölgelere göç ederek yaşamaya devam edebileceği bölgeler olan sığınaklar bu anlamda iyi iş görmektedir. Sığınaklar, türlerin hayatta kalmalarını ve genetik çeşitliliklerini korumalarını sağlar. Güncel çalışmalar, sığınaklardaki biyoçeşitliliğin yeterince korunmadığını ve bu zenginliğin tehlike altında olduğuna dair sonuçlar vermektedir (Habel ve ark., 2011; Noroozi ve ark., 2018).

Dünyada 36 biyoçeşitlilik sıcak noktası tanımlanmış olup Kafkasya, Akdeniz Havzası ve İran-Anadolu bölgesi olmak üzere 3 sıcak nokta Anadolu üzerinde bulunmaktadır. Bu durum, Anadolu'nun zengin biyoçeşitliliğe ve endemizme sahip olduğunu göstermektedir. Örneğin, Anadolu'da bulunan bitki türlerinin coğrafi olarak Avrupa'ya yakın bir konumda olup, yüzölçümü olarak daha küçük olmasına rağmen yaklaşık %34'ü endemiktir (Conservation International, 2024). Bu çeşitliliğin sebepleri:

- İran-Turan, Akdeniz ve Avrupa-Sibirya fitocoğrafik bölgelerinin kesişim noktasında bulunması,
- Deniz seviyesinden yaklaşık 5200 m'ye kadar değişen yükselti farkı,
- Kısa mesafelerde bile değişen makro ve mikro iklimler,
- Buzul ve buzullar arası dönemlerde yaşanan değişimler gibi sebepler sayılabilmektedir (Şekercioğlu ve ark., 2011; Avise, 2000; Hewitt, 2004).

Kuvaterner dönemde, özellikle Avrupa'nın 52 derecelik kuzey enlemlerine kadar ulaşan buzullaşmalar, bitkileri önemli derecede etkilemiştir. Dolayısıyla, son buzul maksimumu sırasında ılıman kuşak türlerin yayılış alanlarının küçülmesini takiben etkin popülasyon büyüklükleri de azalmıştır (Schönswetter ve ark., 2005). İber Yarımadası, İtalya ve Balkanlar gibi buzul sığınaklarına sığınan türler Avrupa'daki buzullaşma sona erdiğinde

tekrar aynı bölgeye yayılmıştır (Hewitt, 2004). Anadolu’da ise bu durum biraz daha farklıdır. Bu dönemde Anadolu’da oluşan buzullaşmalar sadece yüksek dağ zirvelerinde meydana gelmiş olup bitkiler için; düşük rakımlarda yaşayanların enlemsel hareket yapmalarına, yüksek rakımdakilerin ise aşağı yukarı hareketler yapmalarına sebep olmuştur (Tzedakis, Emerson ve Hewitt, 2013; Comes ve Kadereit, 1998, 2003; Gür, 2017). Bu süreç, daralma-genişleme modeli ile açıklanabilmektedir. Türlerin, yayılış alanları daralma dönemlerinde küçüldüğü için etkin popülasyon büyüklükleri de azalmıştır. Ancak, buzul dönemi sona erdiğinde türler, sığınaklardan geldikleri yere doğru yayılış alanlarını genişleterek etkin popülasyon büyüklüklerini tekrar artırmışlardır (Avisé, 2000; Hewitt, 2004).

P.H. Davis’in asistanı Cullen tarafından “Flora of Turkey and the East Eagean Islands” adlı eserin 1965 yılında yayınlanan birinci cildindeki türlerin yayılışları analiz edilirken, İç Anadolu ile Doğu Anadolu arasında floral bir kesintinin olduğu fark edilmiştir. Daha sonra Davis (1971), Doğu Karadeniz Dağları’nın yağmur gölgesinden başlayıp güneybatıda orta Toroslar’a kadar uzanıp İç Anadolu ile Doğu Anadolu arasında kesintiye sebep olan bu bariyeri Anadolu Diyagonali olarak tanımlamıştır. Yakın bir zaman önce ise Anadolu Diyagonali’nin Toros Dağları ve Ege’nin dağlık alanları ile Kafkasya ve Balkan biyotaları arasında köprü rolü oynayan bir dispersal koridoru, “Toros Yolu” nu oluşturduğu ortaya konulmuştur (Çıplak, 2008; Kaya ve Çıplak, 2017).

Bu çalışmada bilinen yayılışı Toros Yolu ile sınırlı, alpinik zonun kayalık alanlarında yetişen *Phyllolepidum cyclocarpum* (Boiss.) L. Cecchi subsp. *cyclocarpum* (Kayaincisi, Brassicaceae) model organizma olarak kullanılıp Toros Yolu dispersal koridoru biyocoğrafik olarak ele alınmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Anadolu'nun Zengin Biyoçeşitliliği ve Nedenleri

Anadolu, geniş coğrafi yapısı, farklı topoğrafik özellikleri ve iklim çeşitliliği ile dikkat çeken bir coğrafyadır. Bu çeşitlilik, farklı bölgelerdeki topoğrafik özelliklerin çeşitlenmesine olanak sağlayarak kısa mesafelerde farklı yaşam alanlarının oluşmasına imkan sağlar. Ancak, bu biyoçeşitlilik sadece coğrafi ve iklimsel faktörlerle sınırlı değildir; aynı zamanda tarihi ve jeolojik geçmişin bir sonucudur. Milyonlarca yıl boyunca jeolojik süreçlerle şekillenen Anadolu, çeşitli ekosistemlerin oluşumuna katkıda bulunmuştur. Bu ekosistemler özellikle, biyolojik çeşitliliğin en zengin olduğu ve endemizmin yüksek olduğu yerler olarak tanımlanan sıcak noktaların oluşmasını sağlamıştır (Atalay ve Efe, 2015; Atalay, 1996; Gürkan ve ark., 2016).

Sıcak noktalar, dünya yüzeyinin sadece %2,4'ünü kapsamalarına rağmen, endemizm açısından oldukça zengin bölgelerdir. Bu alanlar, özellikle bitki ve hayvan türlerinin benzersiz ve sadece belirli bir bölgede bulunmasıyla önem kazanır. Çoğu sıcak nokta, yüksek endemizm seviyeleri nedeniyle devletler ve kuruluşlar tarafından korunması gereken alanlar listesine alınmıştır. Anadolu, dünyada tanımlanmış 36 sıcak noktadan 3'ünü (Akdeniz Havzası, Kafkasya ve İran-Anadolu) barındırması nedeniyle biyolojik çeşitlilik açısından oldukça önemli bir konumda bulunmaktadır. Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan fitocoğrafik bölgelerinin de Anadolu'daki varlığı, Anadolu'nun biyoçeşitlilik açısından zenginliğini göstermekte olup bu bölgelerdeki ekosistemlerin korunması, genel biyoçeşitliliğin sürdürülebilirliği açısından kritik öneme sahiptir (Conservation, 2024; Myers ve ark., 2000).

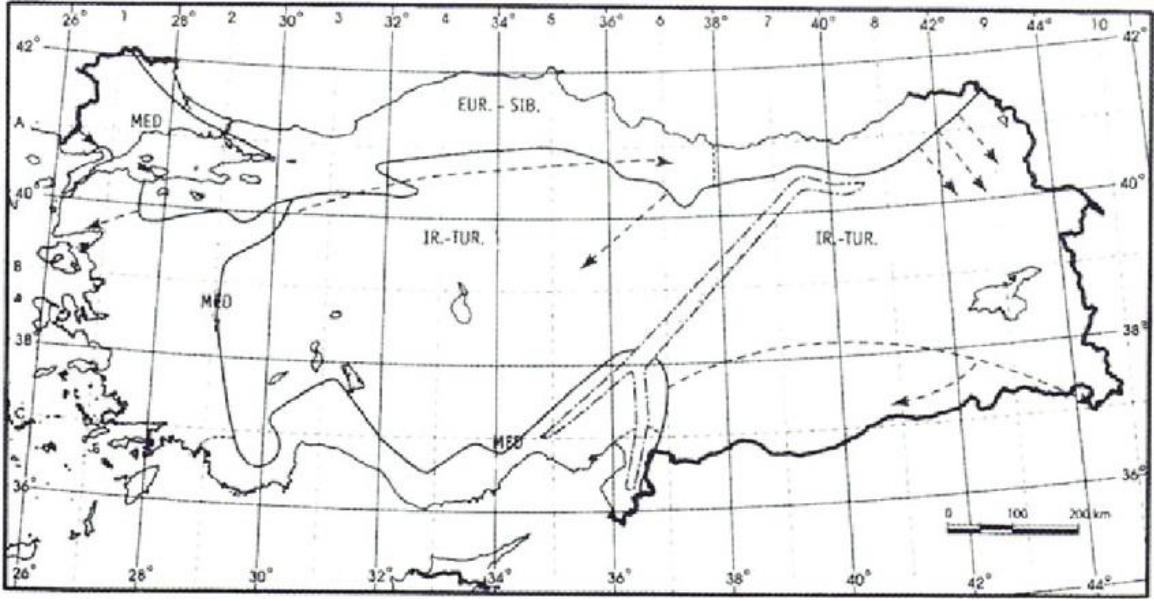
Anadolu, birçok parametre açısından diğer coğrafyalarla karşılaştırılabilir, ancak benzerlik bakımından Avrupa ile karşılaştırıldığında daha doğru sonuçlar elde edilebilir. Anadolu'nun yüzölçümü yaklaşık 800.000 km² iken, Avrupa'nın yüzölçümü 10 milyon km² olarak kaydedilmiştir. Bununla birlikte, tür çeşitliliği açısından Anadolu 9.222 türe (12.006 takson) ev sahipliği yaparken, Avrupa'da bu sayı 11.500 tür ile sınırlıdır. Endemik türler açısından da Anadolu'nun zenginliği dikkat çekicidir ve 2.891 endemik tür (3.778 takson)

barındırırken, Avrupa'da bu sayı 3.500 olarak görülmektedir (Erik ve Hacıoğlu, 2004; Barthlott ve ark., 2005). Bu veriler, Anadolu'nun coğrafi olarak daha küçük olmasına rağmen, biyolojik çeşitlilik açısından Avrupa ile karşılaştırılabilir seviyede zenginliğe sahip olduğunu göstermektedir (Erik ve Hacıoğlu, 2004; Güner ve ark., 2012).

Anadolu'nun coğrafi yapısı, kısa mesafelerde bile değişen makro ve mikro iklimlerin oluşmasına olanak tanır ki bu durum da bitki çeşitliliğinin artmasına katkı sağlar. Özellikle, Kuvaterner döneminde yaşanan iklim değişiklikleri de Anadolu'nun flora zenginliğini etkilemiştir. Bu dönemde, Avrupa'yı büyük ölçüde kaplayan buzullar Anadolu'da sadece yüksek dağ zirveleriyle sınırlı kalmışlardır. Bu faktörlerin bir araya gelmesi ise Anadolu'nun eşsiz ve zengin bitki örtüsünün oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Şekercioğlu ve ark., 2011; Atalay, 1996; Şenkul ve Doğan, 2013; Gür, 2017).

2.2. Anadolu Diyagonali ve Toros Yolu

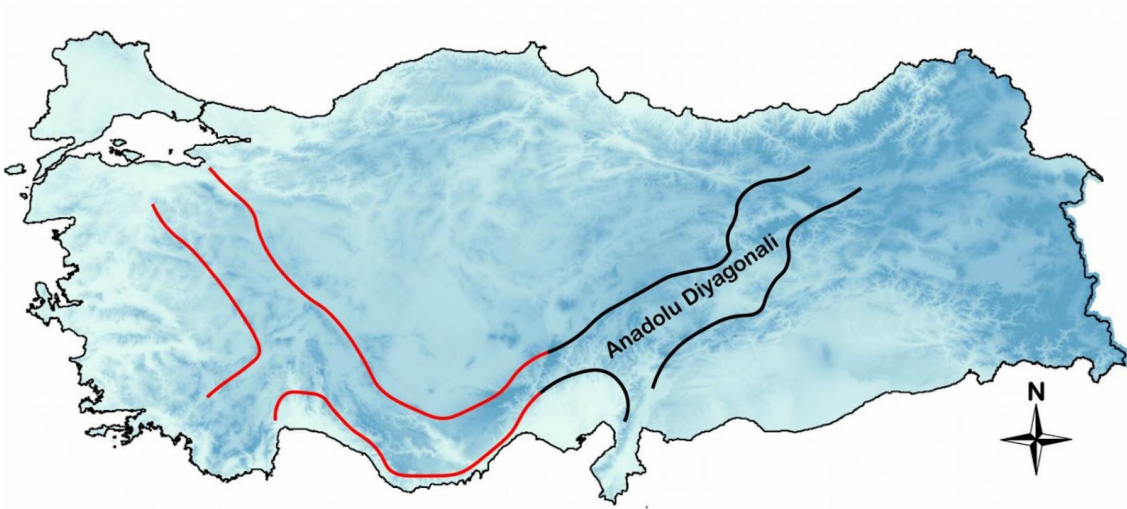
Anadolu'nun zengin biyolojik çeşitliliğinin sebeplerinden biri de Anadolu'yu kuzeydoğu/güneybatı yönünde kesen bir bariyerin varlığıdır. İç Anadolu ile Doğu Anadolu bölgeleri arasında floral bir kesikliğin varlığı ilk defa P.H. Davis'in asistanı Cullen tarafından Türkiye Florası'nın birinci cildine (Davis, 1965) ait istatistikler çıkarılırken fark edilmiş ve türlerin yayılışında kesintiye neden olan bu hat daha sonra Davis tarafından Anadolu Diyagonali olarak tanımlamıştır (Davis, 1971). Türkiye'nin kuzeydoğusundan güneybatısına uzanan İç Anadolu ve Doğu Anadolu arasında bir sınır olan Anadolu Diyagonali, Gümüşhane-Bayburt civarlarından başlayıp güneybatıda orta Toroslara kadar uzanarak Tahtalı ve Binboğa Dağları'nın güneyinde çatallanıp, bir kolu Amanoslar (Nur)'da diğer kolu ise Aladağlar ve Bolkar Dağları'nda biter (Şekil 2.1) (Gür, 2017).



Şekil 2.1. Türkiye'nin fitocoğrafik bölgeleri ve Anadolu Diyagonali (Davis, 1971'e göre).

Davis, İç Anadolu ile Doğu Anadolu arasında böylesine büyük bir floral kesintiyi açıklamak için bu iki bölge arasındaki yükseklik ve sıcaklık farkının yeterli olamayacağı ve bu durumun ancak Anadolu'nun paleocoğrafik geçmişiyle açıklanabileceğini iddia etmiştir (Davis, 1971). Bir biyocoğrafik olgu olarak Anadolu Diyagonali'nin bariyer rolü uzun zamandır tartışılmakta ve bazı araştırmacılar için bariyer etkisinin çevresel değişkenlerle açıklanabileceği iddia edilmektedir (Ekim ve Güner, 1986; Gür, 2017). Ancak bariyer rolünün yanında Anadolu Diyagonali'nin kuzeydoğu/güneybatı yönünde bir koridor rolü de söz konusu olup özellikle Pleistosen iklimsel dalgalanmaları esnasında bitkilerin Anadolu Diyagonali'ni bir koridor olarak kullandıkları düşünülmektedir. Özellikle Diyagonal'in güney ucu olan Amanos Dağları'nda *Taxus baccata* L., *Fagus orientalis* Lipsky, *Buxus sempervirens* L., *Ilex aquifolium* L., *Staphylea pinnata* L. gibi çok sayıda Avrupa-Sibirya türünün bulunması ya da *Acantholimon ulicinum* (Willd ex Schutt.) Boiss, *Allium tchihatschewii* Boiss., *Hesperis cappadocica* E.Fourn. gibi yayılışı sadece Diyagonalini oluşturan dağlarla sınırlı türlerin varlığı Anadolu Diyagonali'nin bu rolünü ortaya koymaktadır. Fakat gerçekleştirilen çalışmalarda Anadolu Diyagonali'nin bu özelliği vurgulanmış olmasına rağmen, görece yakın bir zamana kadar Anadolu Diyagonali ve Toros Dağları bağlantısı göz ardı edilmiştir (Ekim ve Güner, 1986; Atalay ve Efe, 2015).

Anadolu üzerinde bir dispersal koridoru olarak Toros Yolu terimi ilk olarak çıplak (2008) tarafından kullanılmıştır. Kaya ve çıplak (2017) ise, Kafkas ve Balkan biyotaları arasında Anadolu Diyagonali, Güney Anadolu Dağları ve Ege'nin dağlık alanları vasıtasıyla kurulan bağlantı için bir dispersal koridoru olarak Toros Yolu'nun detaylarını vermişlerdir (Şekil 2.2). Özellikle Balkanlar ve Kafkaslar arasındaki kesintili yayılışı açıklamak için kullanılan bu dağılım koridoru *Psorodonatus caucasicus* tür kompleksini oluşturan çekirge türlerinde test edilmiş ve çalışılan taksonlar açısından Anadolu içerisinde böyle bir koridorun varlığı gösterilmiştir (Kaya ve ıplak, 2017) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Bir Dispersal Koridoru olarak Toros Yolu. Siyah çizgiler arasında kalan alan Anadolu Diyagonali'ni, siyah + kırmızı çizgilerin arasında kalan alanın tamamı ise "Toros Yolu" nu göstermektedir.

2.3. Brassicaceae Familyası

Brassicaceae (Lahanagiller) ailesi Dünya genelinde 58 oymak altına yerleştirilmiş 349 cins ve yaklaşık 4140 türle temsil edilir (German ve ark., 2023; Hendriks ve ark., 2023). Brassicaceae familyasına özgü olan morfolojik özellikler temel olarak ha şeklinde karşılıklı dizilmiş dört ta (petal) yaprak ve dört çanak (sepal) yapraktır. Bu karakteristik iek yapısı, iki dairede dizilmiş altı stameni kapsar; bunlardan ikisi kısa, dördü ise uzun olup, bu yapı tetradinam olarak isimlendirilir. Pistil, genelde üst durumlu bir ovaryuma sahiptir ve iki karpel ve yalancı bir bölme ile ayrılan iki lokulustan oluşur. Meyve yapısı genellikle silikua veya silikula şeklinde olup, nadiren de olsa lomentum veya nuks şeklinde olabilmektedir (Al-Shehbaz, 2012; BrassiBase, 2024).

Brassicaceae familyası Antarktika kıtası dışında diğer tüm kıtalara dağılmıştır, bu da familya üyelerinin coğrafi dağılım açısından geniş bir yayılım gösterdiğini, çeşitli iklim ve habitatlara adaptasyonunun kolay olduğunu ve ekolojik esnekliğini kanıtlamaktadır. Aynı zamanda bu geniş coğrafi dağılım türler arasında genetik çeşitliliğin zenginliğine de işaretir. Bu familyanın taksonları, ılıman kuşaklara doğru yayılmış olup Akdeniz, güneybatı ve Orta Asya bölgelerinde en yoğun çeşitliliği sunmaktadır (Bailey ve ark., 2006).

Brassicaceae için yapılan son filogenetik çalışmalar, bu familyanın Aethionemoideae ve Brassicoideae olmak üzere iki alt aile altında sınıflandırılmasına dayanan yeni bir sistem önermiştir. Bu alt aileler, toplamda 58 oymaktan oluşmakta olup Aethionemoideae dışında geri kalan 57 oymak Brassicoideae içerisine yerleştirilmiştir. Taksonomik olarak en karmaşık cinsleri içeren ve çalışmanın konusunu oluşturan *Phyllolepidum*'un da dahil olduğu Alysseae oymağı, 282 türle temsil edilmekte olup bu türler genel olarak Avrasya'da dağılmıştır (Hendriks ve ark., 2023; German ve ark., 2023).

2.4. *Phyllolepidum* Trinajstić

Tez konusunu oluşturan *Phyllolepidum cyclocarpum* (Boiss.) L. Cecchi subsp. *cyclocarpum* (Kayaincisi) tarihsel olarak Aucher tarafından Munzur Dağları'ndan toplanmış örneklerle dayanarak *Ptilotrichum cyclocarpum* Boiss. ismi ile yayınlanmıştır. Ancak bu tür Türkiye Florası'na *Aurinia* cinsi altında *Aurinia rupestris*'in bir alt türü olarak *A. rupestris* subsp. *cyclocarpa* (Boiss.) Cullen & T.R.Dudley şeklinde yazılmıştır. Zaman içerisinde gerçekleştirilen moleküler filogenetik çalışmalar ise *A. rupestris* subsp. *rupestris* ile *A. rupestris* subsp. *cyclocarpa*'nın farklı türler olduklarını ve ikisinin de *Aurinia* ve Asya yayılışlı *Ptilotrichium* cinsine dahil olmamaları gerektiğini ortaya koymuştur. Dolayısıyla bu tür 1990 yılında Trinajstić tarafından tanımlanan *Phyllolepidum* cinsi altında değerlendirilmeye başlanmıştır (Cecchi, 2011). Cinsin iki türünden *P. rupestris*'in yayılışı güney Avrupa iken *P. cyclocarpum* Türkiye ve Yunanistan'da bulunmaktadır. Yunanistan'da bulunan popülasyon yeni bir alt tür olarak değerlendirilip *P. cyclocarpum* (Boiss.) Cecchi subsp. *pindicum* (Hartvig) Cecchi olarak yayınlandıktan sonra ise Anadolu'da kalan *P. cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* popülasyonları endemik statüsü kazanmıştır (Cecchi, 2011). Bitkinin yayılışı Türkiye Florası kayıtlarına göre Anadolu Diyagonalı ile sınırlı iken,

sonradan yapılan arazi çalışmalarıyla Torosların batı uçlarında; yani Antalya, Burdur ve Muğla'da da yayılış gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat mevcut durumda da türün Batı Toroslar popülasyonları ile Doğu Toroslar/Anadolu Diyagonalı popülasyonları arasında önemli sayılabilecek derecede yayılış boşluğu bulunmaktadır. Yüksek dağların subalpin ve alpin bölgelerinde sabit veya hareketli kalker kayalıklarda yetişen bu çok yıllık türün sahip olduğu kanatlı tohum yapısı dispersali kolaylaştırmakta olup bu durum uzun mesafe dispersal yeteneğinin önemli bir göstergesidir. Ancak Batı Toroslarda yetişen popülasyonlara ait herbaryum örneklerinde gerçekleştirilen morfolojik gözlemler bu popülasyonların doğdakilerden farklı olarak çok sık, kompakt ve kısa boylu öbekler oluşturduğunu göstermiştir. Dolayısıyla doğu ve batı popülasyonları arasında gerçekleştirilecek detaylı morfolojik ve moleküler analizler sonucunda batıdaki popülasyonların farklı bir takson olup olmadıkları da anlaşılabilir.

2.5. Yeni Nesil Dizileme: RAD-Seq

Restriksiyon Bölgesi İlişkili DNA dizilimi (Restriction Site Associated DNA Sequencing ya da RAD-Seq), yüksek yoğunlukta genomik veri elde etmek için kullanılan ve genetik çeşitliliği inceleyen oldukça güçlü bir sekanslama yöntemidir. RAD-Seq, tüm genomu pahalı maliyetlerle dizilenmesi yerine önceden belirlenmiş restriksiyon enzimlerini kullanarak kesilmiş bölgelerin dizilenmesiyle çalışmaktadır (Davey, 2010).

RAD-Seq, tüm genomun dizilenmesine kıyasla ekolojik ve evrimsel çalışmalarda bazı avantajlar sunmaktadır. Tüm genom dizilenmesi daha fazla genomik bilgi sağlasa da birçok ekolojik ve evrimsel soru bu tür bir artıştan faydalanmaz. Belirli bir sistemde daha kapsamlı veya esnek araştırma sağlamak için transkriptom dizilimi, hedefli yakalama veya model olmayan türler için de-novo referans genomları gibi diğer genomik yaklaşımlarla tamamlanabilecek bir tekniktir. Bu nedenle, araştırma sorusu ve ihtiyaç duyulan genomik bilgi düzeyine bağlı olarak RADSeq dizileme yöntemi seçilmektedir (Andrews ve ark., 2016).

Popülasyon genetiği, herhangi bir türün, genetik varyasyonunu, geçmişte geçirdikleri evrimsel süreçleri ve gelecek hakkında tahminleri anlamak için kullanılmakta olan bir

araçtır. RADSeq gibi tüm genomu değil de temsil edilen genlere dayalı yöntemler, popülasyon düzeyinde genetik çeşitliliği hızlı ve ekonomik bir şekilde değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlar, genomun belirli bölgelerini seçici olarak hedef alarak, büyük örnekleme boyutlarıyla bile genetik bilgiyi geniş kapsamlı bir şekilde elde etmeyi mümkün kılar (Andrews ve ark., 2016; Baird ve ark., 2008).

RADSeq, çoklu genetik belirteçler sayesinde hem hibrit bireyleri tanımlama hem de seçilime yanıt veren genomdaki lokusları tespit etmeye yarar. Bu da kriptik türleşme olaylarının çözümünde, özellikle morfolojik olarak birbirlerine ne kadar benzeseler de genetik olarak farklılaşmış, coğrafi olarak ayrılmış türlerin tespit edilmesinde yüksek çözünürlükte genetik veriler sağlayarak önemli bir rol oynar (Pante ve ark., 2015; Emerson ve ark., 2010; Davey ve ark., 2011).

2.6. Çalışmanın Amacı ve Hipotez

Bu tezin temel amacı Toros Dağları ve Anadolu Diyagonalı'nın alpinik kayalık komünitelerinin tipik bitkilerinden birisi ve Türkiye endemiği olan *Phyllolepidum cyclocarpum* (Boiss.) L. Cecchi subsp. *cylocarpum*'un (Kayaincisi) popülasyon dinamiklerini genom düzeyi örnekleme yöntemine dayanan RADSeq verileriyle ortaya çıkarmak ve popülasyonları arasındaki ilişkileri belirleyerek türün tarihsel biyocoğrafik hikayesini ortaya koymaktır. Bu amacı gerçekleştirebilmek için ulaşılmaması gereken hedefler aşağıda listelenmiştir.

- *P. cyclocarpum* popülasyonlarının genomik yapısını ortaya koymak,
- Tür içerisinde monofiletik soyların var olup olmadığını test etmek,
- Eğer monofiletik soylar varsa bu soylar arasında ve içinde genetik çeşitlilik ve farklılaşmayı hesaplamak,
- SNP'leri (Tekli Nükleotid Polimorfizmi) bir veri seti olarak ayarlayarak popülasyon düzeyinde hesaplamalar yapmak,
- Demografik analizlerle türün geçmişinde iklim değişikliğine bağlı popülasyon genişlemesi ya da daralması yaşayıp yaşamadığını test etmek.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Örneklem ve Arazi Çalışmaları

Phyllolepidum cyclocarpum'a ait yayılış bilgileri öncelikli olarak Türkiye Florası (Dudley, 1965) olmak üzere lokal floristik çalışmalar ve yurt içi/yurt dışı herbaryumlardan (HUB, GAZI, ANK, EGE, B, K, E, ISTE, KONF) elde edilmiştir. Yayılış bilgileri doğrultusunda 2021-2023 yıllarında türün yayılış gösterdiği Anadolu Diyagonalı ve Toros Yolu Dağları'nda hem türün bilinen lokasyonlarına hem de bulunmasının olası olduğu alpinik kalker kayalık alanlarda arazi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen arazi çalışmalarında her lokasyon birer popülasyon olarak ele alınmış ve genomik çalışmalarda kullanılmak üzere 10 farklı bireyden silikajel içerisine yaprak örnekleri alınmıştır. Morfolojik çalışmalar için ise 3-6 birey herbaryum materyali haline getirilerek kurutulmuştur. Ayrıca her popülasyona ait yükseklik, koordinat, habitat vs. gibi bilgiler kaydedilmiştir. Hazırlanan herbaryum örnekleri Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda (HUB) saklanmaktadır.

3.2. Morfolojik Çalışmalar

Yapılan arazi çalışmaları sonucunda toplanan bitki örnekleri Türkiye Florası kullanılarak teşhis edilmiştir. Bu örnekler ve lokasyon bilgileri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Toplanan tüm örnekler gelişim dönemleri (çiçekli /meyveli/geç dönem meyveli) göz önüne alınarak mümkün olduğunca numerik taksonomik çalışmalara dahil edilmeye çalışılmıştır. Çizelge 3.1'de verilen *P. cyclocarpum*'a ait bireyler için gerçekleştirilen morfolojik ölçümler listelenmiştir. Çalışma kapsamında, her popülasyonu temsil etmeye yetecek sayıda (3-6 birey) birey seçilmiş ve ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler genel olarak toprak üstü özellikleri içermekte olup standart cetvel ile yapılmıştır. Ölçüm yapılan popülasyonlara ait bireyler, genomik veri ile uyumlu bir şekilde morfolojik açıdan da değerlendirilmiş ve her popülasyondan örneklenecek bireyler bitkinin boyu, gövdedeki ilk yaprak ile taban yaprağı arası mesafe, gövde yaprağı, pedisel meyve bilgileri (boy, en, sayı) vb. karakterleri detaylı bir şekilde ölçülüp skorlandıktan sonra Temel Bileşenler Analizi ile çalışılan karakter açısından varyasyonu en iyi açıklayan karakterler R programı kullanılarak TB eksenlerinin

eigen değer analizi ile ortaya konmuştur. Ölçümler yapılırken, rozet yaprak boyu, meyve eni ve meyve boyu üç farklı ölçümün ortalaması olarak alınmuştır. Skorlanan karakterler Çizelge 3.1’de listelenmiştir.

Çizelge 3.1. Morfolojik çalışmalarda kullanılan karakterler

A. Bitkinin boyu (BY)
B. Rozet Yaprak Boyu (RYB)
C. Rozet Yaprak Eni (RYE)
D. İlk Yapı ile Taban Arasındaki Mesafe (İYTAM)
E. Aynı kökten çıkan gövde sayısı (AKCGS)
F. Gövde Yaprak Sayısı (GYS)
G. Gövde Yaprak Boyu (GYB)
H. Gövde Yaprak Eni (GYE)
İ. Pedisel Sayısı (PS)
J. Pedisel Boyu (PB)
K. Meyve Sayısı (MS)
L. Alt Meyve Boyu (AMB)
M. Alt Meyve Eni (AME)

P. cyclocarpum'a ait morfolojik ölçümleri tamamlanan 82 birey ve TBA analizinde kullanılan 22 popülasyondan oluşan veri seti, Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Bu yöntem, morfolojik özelliklerin varyasyonunu çoklu verinin karmaşasını indirgeyerek daha az sayıda temel bileşenle açıklamak için kullanılmıştır (Pearson, 1901; Jolliffe, 2002).

Temel Bileşenler Analizi, *P. cyclocarpum* popülasyonları arasındaki sistematik problemlerin çözülebilmesi için çizelgedeki tüm örnekler açısından değerlendirilmiştir. Oluşturulan veri seti R 4.3.0 kapsamında RStudio 2023-04-21 ucrt (RStudio Team, 2023) programında ggplot2 paket programı kullanılarak morfometrik TBA yapılarak değerlendirilmiştir (Wickham ve ark., 2024).

3.3. Moleküler Çalışmalar

3.3.1. DNA İzolasyonu ve DNA Çoğaltma

Yapılan arazi çalışmalarında silikajel içerisinde toplanan *P. cyclocarpum* bireylerine ait yaprak örnekleri tamamen kuruduktan sonra deniz kumu yardımıyla ezilip, standart DNA izolasyon kitleri kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. DNeasy Plant Mini Kit ile uygulanan protokol basamakları

-
1. Yaprak doku örnekleri deniz kumu yardımıyla homojenize edilir.
 2. Örneğin bulunduğu tüpe 500 AP1 Buffer ve 4 µL RNAaz eklenir.
 3. Tüp, vorteks cihazı ile karıştırıldıktan sonra ısıtıcı blokta, 750 RPM ve 65C'de 30 dakika bekletilir.
 4. 130 µL P3 Buffer eklenir, örnekler vorteks cihazı ile karıştırıldıktan sonra en az 30 dakika buzdolabında bekletilir.
 5. Lizat (Hücre içeriği) 5 dakika boyunca 14.000 RPM'de santrifüj edilir.
 6. Lizat, farklı tüplere alınarak 2 dakika boyunca 14.000 RPM'de santrifüj edilir.
 7. Akıp giden kısım pelet ile temas ettirilmeden ependorflara aktarılır. Bu kısmın

- 1.5 katı kadar AW1 Buffer eklenir ve pipet ile karıştırılır.
8. Oluşan karışımdan 650 µL alınıp farklı renkte tüplere konur, 9.000 RPM'de 1.30 dakika santrifüj edilir.
9. Altta kalan sıvı kısım atıldıktan sonra kalan örnek tekrar 9.000 RPM'de 1.30 dakika santrifüj edilir.
10. Altta kalan sıvı atıldıktan sonra üst kısımda kalan kolon, yeni bir 2 mL'lik koleksiyon tüplerine yerleştirilir.
11. 400 µL AW2 Buffer konduktan sonra 1.30 dakika boyunca 9.000 RPM'de santrifüj edilir. Akıp giden alttaki kısım atılır.
12. 450 µL AW2 Buffer konur, 14.000 RPM'de 2 dakika boyunca santrifüj edilir.
13. Alt kısım atılıp üstte kalan kısım ependorflara konur.
14. Elüsyon aşaması için 30 µL AE Buffer konur, 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekledikten sonra 8.000 RPM'de 1 dakika boyunca santrifüj edilir.
15. 14. adım tekrarlanır.
16. Üst kısım atıldıktan sonra ependorflar kapatılıp -20 C'de depolanır.

DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA miktarları örnekler dizilemeye gönderilmeden önce Qubit cihazı kullanılarak ng/µl cinsinden ölçülmüştür. Qubit analizleri sonunda elde edilen ölçüm sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir. Elde edilen DNA'lar RAD kütüphaneleri oluşturulmak ve dizilenmek üzere Floragenex, Oregon (ABD) firmasına gönderilmiştir. Brassicaceae familyası ile ilgili proje ekibinin önceki çalışmalarında, standart kit protokollerinden farklı olarak inkübasyon süresinin 30 dakika ve izolasyon sonu hacminin 60 µl olduğu durumda, ideal miktarda DNA elde edildiği (5 ng/µl'nin üzerinde) belirlenmiştir.

3.3.2. Filogenetik Çalışmalar için Veri Hazırlama

3.3.2.1. Barkod Ayırma

Floragenex firması tarafından Fastq formatında karmaşık bir şekilde gönderilen ham veriler TÜBİTAK ULAKBİM, Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi'ndeki (TRUBA

Kaynakları) Levrek1 kümesinde bulunan hesap kullanılıp öncelikli olarak bireylere ayrılmıştır. Bu işlem için aşağıda verilen Perl ve Bash betikleri, indeks dosyasında bulunan birey kısaltmaları ve 6 bazlık kesim noktalarını kullanılmış ve her bir bireye ait dosyalar yine Fastq formatında ayrılmıştır. Elde edilen her bireye ait sekanslar ham RAD kütüphane verisinden 6 baz çiftlik barkodlar yoluyla çıkarılarak bireylere özgü fastq dosyaları oluşturulmuştur. Aşağıdaki Perl betiği, ham RAD sekans dosyasını ileri (R1) ve geri (R2) yönlü işleyerek bireylerin ayırt edilmesi için kullanılmıştır.

```
#!/usr/bin/perl

$R1file = $ARGV[0];
$R2file = $ARGV[1];
$barcode = $ARGV[2];

@commas = split(/\./, $barcode);
$barcode_length = length($commas[0]);

$x=0;
while ($x <= $#commas) {
    $hash{$commas[$x]} = $commas[$x] . "_R1.fastq";
    $filename = $hash{$commas[$x]};
    $OUT1 = $commas[$x] . "1";
    open($OUT1, ">$filename") or die;
    $x++;
}

$x=0;
while ($x <= $#commas) {
    $hash{$commas[$x]} = $commas[$x] . "_R2.fastq";
    $filename = $hash{$commas[$x]};
    $OUT2 = $commas[$x] . "2";
    open($OUT2, ">$filename") or die;
    $x++;
}

open(FILE1, "<$R1file")
    or die;
open(FILE2, "<$R2file")
    or die;

while (<FILE1>) {
```

```

$ID_line_1 = $_;
$seq_line = <FILE1>;
$ID_line_2 = <FILE1>;
$Quality_line = <FILE1>;

    $ID_line_12 = <FILE2>;
    $seq_line2 = <FILE2>;
    $ID_line_22 = <FILE2>;
    $Quality_line2 = <FILE2>;

chop $seq_line;
$bc = substr($seq_line,0,$barcode_length);

if ($hash{$bc} ne "") {

    $read_length = length($seq_line) - ($barcode_length);
    $read = substr($seq_line,($barcode_length),$read_length);

    $Quality_line_trimmed = substr($Quality_line,($barcode_length),$read_length);

    $OUT1 = $bc . "1";
    $OUT2 = $bc . "2";

    print $OUT1 $ID_line_1;
    print $OUT1 "$read\n";
    print $OUT1 $ID_line_2;
    print $OUT1 "$Quality_line_trimmed\n";

    print $OUT2 $ID_line_12;
        print $OUT2 $seq_line2;
        print $OUT2 $ID_line_22;
        print $OUT2 $Quality_line2;

    }

}
close FILE;

$x=0;
while ($x <= $#commas) {
    $OUT1 = $commas[$x] . "1";
    $OUT2 = $commas[$x] . "2";
    close($OUT1); close($OUT2);
    $x++;
}

```

Yüksek işlemci ve kaynak gereksinimlerine sahip bu işlem, TRUBA kümesinde çalıştırılmak üzere aşağıdaki Bash betiğiyle gerçekleştirilmiştir.

```
#!/bin/bash -l

#SBATCH -A emyilmaz
#SBATCH --time=02-00:00:00
#SBATCH -N 2
#SBATCH --ntasks-per-node=28
#SBATCH --partition=long
#SBATCH --job-name=job1
#SBATCH --output=output.sh.%j.out
#SBATCH --error=slurm-%j.err

read1=$1
read2=$2
index=$3
barcodes=$(cut -f1 $index | sed 1d | tr '\n' ',' | awk '{print $1}')
n=$(wc -l $index | awk '{print $1}')

./BarcodeSplit5_PE.pl $read1 $read2 $barcodes
x=2
while [ $x -le $n ]
do
    string="sed -n ${x}p $index"
    str=$(($string))
    var=$(echo $str | awk -F"\t" '{print $1, $2}')
    set -- $var
    c1=$1   ### Barcode ###
    c2=$2   ### Labels ###
    mv ${c1}_R1.fastq ${c2}_R1.fastq
    mv ${c1}_R2.fastq ${c2}_R2.fastq
    x=$(( $x + 1 ))
done
```

3.3.2.2. Kalite Kontrolü

Bireylere ait ham Fastq dosyalarının oluşturulmasının ardından, verinin kalite kontrolü için FastQC (Ewels ve ark., 2016) aracı kullanılmıştır. FastQC, birey Fastq dosyalarının

kalitesini istatistiksel olarak ölçmekte ve olası problemleri tespit ederek raporlamaktadır.

Raporlarda;

- toplam sekans, filtrelenen sekanslar, sekans uzunluğu gibi öncül basit istatistikler,
- her pozisyon için bazların kalite değerleri,
- yanlış veya eksik okumalar,
- bazların genomdaki yüzdellik değerleri,
- GC oranı ve olası kontaminasyon analizi,
- okunamayan bazlar (N değeri ile temsil edilir.),
- Yinelenen veya aşırı temsil edilen diziler gibi istatistikler sunulmaktadır.

Sonuçlara göre, herhangi bireyde ilgili parametrelerde kalite problemi yaşanırsa ya veri setinden çıkarılmalıdır ya da uygun farklı önlemler alınıp sürece devam edilmelidir.

3.3.2.3. Ham Verinin BAM Dosyalarına Dönüştürülüp Hizalanması

Ham veriler, kapladığı alan ve karmaşası dolayısıyla biyoinformatik analizlere uygun bir yapıda değildir. Bu sebeple, SAM/BAM (Sequence Alignment Map / Binary Alignment Map) uzantılı dosyalar hem daha az yer kaplamaları hem de kalite kontrol, referans tür gibi bilgileri içermeleri sebebiyle tercih edilmektedir. Aşağıdaki kod, her bireye ait fastq dosyalarını bam dosyalarına çevirmektedir.

```
#!/bin/bash
#SBATCH -A emyilmaz
#SBATCH --time=02-00:00:00
#SBATCH -N 2
#SBATCH --ntasks-per-node=28
#SBATCH --partition=long
#SBATCH --job-name=convbam
#SBATCH --output=output.sh%j.out
#SBATCH --error=slurm-%j.err
```

```

ref="GCF_000001735.4_TAIR10.1_genomic.fna"
data=$(ls | grep "_R1.fastq" | cut -f 1 -d "_") # Pc75,Pc63
bwa index -a bwtsv $ref
str1="_R1.fastq" #forward Pc75
str2="_R2.fastq" #reverse Pc75
for i in $data;do
bwa mem -M -t 4 $ref $i$str1 $gez$str2 > $gez".sam"
samtools view -bS $i".sam" | samtools sort - > $i"_sorted.bam"

java -jar /truba/home/bozudogru/SHARED/PROGRAMS/picard/build/libs/picard.jar
MarkDuplicates INPUT=$i"_sorted.bam" OUTPUT=$i"_sorted_mdup.bam"
METRICS_FILE=$i"_metrics.txt" VALIDATION_STRINGENCY=LENIENT
REMOVE_DUPLICATES=False
samtools index $i"_sorted_mdup.bam"
done

```

Ham veriden ayrılan birey fastq dosyaları National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) adlı veri bankasında bulunan TAIR10.1 (GCF_000001735.4) kodlu 2018 yılında oluşturulmuş *Arabidopsis thaliana* referans genomu kullanılarak hizalanmıştır. BWA (Li, 2013) ve Samtools (Li ve ark., 2009), hizalama işlemini betiğin içinde gerçekleştirmektedir. Dolayısıyla, elde edilen bam uzantılı dosyalar biyoinformatik analizlere hazır hale gelmiştir. Hizalama sonrasında elde edilen bireylere ait bam formatındaki dosyalar ANGSD: Analysis of Next Generation Sequencing Data ile snakeRAD (Altinkaya ve ark., hazırlık aşamasında) programları lokus belirleme işleminde kullanılmıştır (Korneliussen, Albrechtsen ve Nielsen, 2014).

3.3.3. Filogenetik Analizler için Lokus Belirleme

Farklı *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* bireyelerine ait DNA dizilerinden snakeRAD programı kullanılarak genom boyunca hem parsimoni bilgi verici hem de bu seçenek kullanılmadan elde edilmiş rastgele lokuslardan oluşan 4 tane 50 lokusluk veri seti oluşturulmuştur. snakeRAD programı için çalışma prensipleri aşağıda özetlenmiştir.

snakeRAD; Python tabanlı, tekrarlanabilen, çok sayıda büyük işleri küçük parçalara bölen ve temel olarak bam uzantılı sekans verilerinin amaca yönelik işlenmesi için birçok biyoinformatik aracının kullanıldığı akış diyagramı üreten Snakemake iş akışı programıdır. Bu iş akışında, DNA sekansı elde edilmiş popülasyonları / türleri temsil edecek şekilde paylaşılan RAD lokusların elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, kısaca aşağıdaki adımlar otomatize edilerek uygulanmıştır:

- ‘.bam’ uzantılı örneklerin samtools aracı ile sekanslama kalitesine göre filtrelenmesi ve bu örneklerin indekslenmesi,
- Belirtilen örneklerden ANGSD aracı ile her örnek için fasta dosyası oluşturulması,
- Belirtilen örneklerin her birinde, mosdepth aracı ile genomdaki her nükleotid pozisyonunun veya lokusların derinliğinin ölçülmesi, çoğunluk için aynı lokuslara denk gelen lokus isimlerinin yazdırılması,
- Lokus aralıklarının belirlenmesi ve bu boşluklara göre birleştirilmesi,
- Popülasyon ya da türlerin aynı lokuslara göre gruplanması ve birleştirilmesi,
- Her örnek için oluşturulan lokus listelerine göre lokus fasta dosyası oluşturulması,
- Her örnek için her lokusta nükleotid kompozisyonunun özetlenmesi ve kullanıcının belirleyeceği filtre parametreleri ile yeni bir lokus fasta dosyası oluşturulması,
- Kullanıcının belirleyeceği sayıda lokus fasta dosya kopyasının rastgele oluşturulması, ilaveten ve tercihe bağlı olarak parsimoni bilgilendirici nükleotid pozisyonlarının oranının en yüksek olduğu lokus fasta dosyalarının belirtilen sayıda seçilmesi

işlemleri otomatik olarak verilen örnek listesi için uygulanmaktadır.

3.3.4. Filogenetik Analizler ve Ayrılma Zamanı Hesaplamaları

Çalışılan bütün *P. cyclocarpum* popülasyonlarına ait hem en parsimonik 50 lokus hem de rastgele seçilmiş 50 lokusluk üç ayrı veri seti, toplamda dört farklı veri seti kullanılarak filogenetik analizler zamanla kalibre edilip Beast v2.7.6 (Bouckaert, 2019) programında gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde temel olarak popülasyon grupları arasındaki ilişki test

edileceği için bireyleri birer popülasyona atayıp nihai olarak koalesent (birleşme) tabanlı popülasyon ağaçları çizilmesine olanak veren StarBeast3 şablonu Beauti programında kullanılmıştır. Kullanılan lokuslar açısından bağlantısallık olduğuna dair önsel hiçbir bilginiz olmadığından , her lokus için ikame modeli ve saat parametreleri bağımsız olarak ele alınmış ve lokuslar birbirine bağlanmamıştır. Tüm analizlerde ikame modeli olarak transisyon/transversiyon geçişine izin veren HKY modeli (Hasegawa, Kishino ve Yano, 1985) kullanılmış, bu model Gamma ve Proportion Invariant parametreleri girilmeksizin, “empirical” seçeneği altında “Substitution rate” ve “kappa” parametreleri varsayılan değerleri olan 1 ve 2 bırakılıp, her iki parametre için de “estimate” seçeneği işaretlenmiştir. Çalışılan takson için doğrudan bir fosil kaydı ya da dolaylı olarak kullanılacak bir kalibrasyon noktası bulunmadığı için model organizma *Arabidopsis thaliana* genomu için hesaplanmış olan mutasyon hızı $7.1 \times 10^{-9} \mp 0.7 \times 10^{-9}$ “clock rate” olarak “clock model” panelinde “Species Tree Relaxed Clock” modeli altında girilmiştir (Ossowski ve ark., 2010). Her bir veri seti için Markov Chain Monte Carlo (MCMC) analizi, 10 milyon zincir uzunluğunda gerçekleştirilmiş ve her 1000 jenerasyonda bir örneklem yapılarak toplamda 10000 ağaç elde edilmiştir. Analizde kullanılan parametrelere ait Effective Sample Size (ESS) değerlerinin değerlendirilmesi ve tür ağacının elde edilmesi için de yine yukarıdaki örneklem stratejisi kullanılmıştır. Tüm analizlerden elde edilen log dosyaları Tracer version 1.7.1. (Rambaut ve ark., 2018) programı kullanılarak kontrol edilip Treeannotator (Drummond ve Rambaut, 2007) programı ile %10 burn-in değeri kullanılarak konsensüs ağaçlar oluşturulmuştur. Oluşturulan nihai ağaçlar Figtree v.1.4.4 (Rambaut, 2018) programı kullanılarak görselleştirilmiştir. En parsimonik 50 lokusla gerçekleştirilen analiz sonuçları ise ayrıca elde edilen 10.000 ağacı toplu olarak gösterip bu şekilde dallar arasındaki geçişliliğin görülmesine olanak veren Densitree (Bouckaert, 2010) programı ile görselleştirilmiştir.

3.4. Popülasyon Genetiği Çalışmaları

3.4.1. Polimorfik Bölge Belirleme

Tezde, hizalanmış olan dizilerden polimorfik bölgeler ANGSD programı kullanılarak keşfedilmiştir. ANGSD, tekli nükleotid polimorfizmleri (TNP-SNP) aramak ve popülasyon genetik analizleri için gerekli veri setlerini oluşturmak için kullanılmış olup hizalanan diziler

içinde bu program ile polimorfik bölgeler belirlenmiş ve her bölgenin ender alel sıklıkları (Minor Allele Frequency=MAF) ve genotip olasılıkları (genotype likelihood=GL) hesaplanmıştır. Böylece *P. cyclocarpum* popülasyonlarının evrimsel geçmişi ve genetik çeşitliliği hakkında bilgi edinmek amacıyla gerekli veri seti düzenlenmiştir.

Program çalıştırılırken kullanılan parametreler şu şekildedir: SNP, MAF ve GL verisi alabilmek için, bam dosyalarının bir listesi oluşturulup ‘bam’ parametresine atanır. ‘GL’ parametresi 2 değeriyle genotip tahminleme yapılır. Genotip tahminleme algoritması GATK (The Genome Analysis Toolkit) programı ile aynıdır. Genomdaki ekleme veya silme hatalarını düzeltir, bazların kalite puanlarını yeniden düzenler ve daha sonra genotip tahminleme yapar (McKenna ve ark., 2010). Popülasyonda bulunan en nadir alelin frekansını ifade eden MAF (Minör Alel Frekansı), ‘doMaf’ parametresi ile hesaplanır. ‘SNP_pval’ parametresi 1e-6 değeri ile bu değerden büyük değere sahip olan lokus verilerini listeden çıkarır.

3.4.2. Popülasyon Genetik Yapısı

3.4.2.1. Temel Bileşenler Analizi (TBA - PCA)

Popülasyonlar arası genetik yapının ölçülebilmesi ve görüntülenebilmesi için TBA yapılmıştır. Bu analiz, SNP’leri kullanarak karmaşık popülasyonlarda, özellikle düşük derinliğe sahip olan yeni nesil sekans verileri (NGS) için kovaryans matrisini ve bireysel alel frekanslarını tahmin edebilmek için geliştirilmiş olan PCAngsd yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Program çıktılarının görselleştirilmesi ve değerlendirilmesi R 4.3.0 (R Core Team, 2022) kapsamında RStudio “2023-04-21 ucrt” programında ve ggplot2 (Wickham, 2016) paket programı kullanılarak yapılmış olup bu şekilde tüm popülasyonlar için elde edilen genetik veri özetlenmiştir. TBA ile ilgili detaylar aşağıda verilmiştir;

Genotip tahminleme dosyası olan ‘beagle’ dosyasını oluşturmak için ‘-GL’ parametresine 2 değeri atanmıştır. ‘-doGlf’ parametresi 2 değeriyle beagle dosyası oluşturabilmek için gerekli olup ayrıca ‘-doMajorMinor’ parametresinin girilmesini gerektirir. ‘SNP_pval’ ve ‘doMaf’ değerleri bu adımda, Polimorfik Bölge Belirleme (2.4.1.) bölümünde olduğu gibi

yine girilmiştir. ANGSD ile çalıştırılan bu adımdan sonra '*.beagle.gz' dosyası elde edilmektedir.

Bir önceki adımda çıktı olarak alınan ".beagle.gz" dosyası, PCAngsd (Meisner, 2018) programında girdi olarak kullanılmıştır. PCAngsd ise bu dosyayı kovaryans matrisi olarak kullanarak veri setinde var olan değişkenler arasındaki ilişkileri analiz edip boyut indirgemeyi sağlar. Böylece '.cov' dosyası, PCAngsd programının Beagle dosyasından SNP'leri kullanarak kovaryans matrisini hesaplama sonuçlarını verir. Dosya, bireyler arasındaki genetik kovaryansı temsil eden simetrik bir matristir. Bu verinin yanında ilgili bireylerin anlaşılabilmesi için SNP verisi alınırken kullanılan veri seti kısaltılarak kullanılıp 'pop.info' olarak kaydedilir.

Aşağıda yazılan betik ilgili TBA'yı görselleştirmek için kullanılmıştır.

```
pop<-read.table("pop.info") # popülasyon bilgisi
C <- as.matrix(read.table("pcyc.cov")) # Kovaryans matrisi
e <- eigen(C)
rownames(e$vector) <- pop[,2]
pca.data <- data.frame(Sample = rownames(e$vector),
                      X = e$vector[,1],
                      Y = e$vector[,2])
library(ggplot2)
pop<-pop[,1]
p <- ggplot(data = pca.data, aes(x = X, y = Y, label = Sample, color = pop, group = pop))
p + scale_x_reverse() +
  geom_point(size = 3) + # Nokta boyutunu artırma
  theme_minimal() + # Temayı değiştirme
  labs(title = "Phyllolepidum cyclocarpum PCA w Molecular Data",
       x = "TB1",
       y = "TB2")
ggsave("./pcyc_pca.svg")
```

3.4.2.2. Karışım Analizi (Admixture)

Popülasyonlar arası genetik yapının ölçülebilmesi için diğer bir yaklaşım ise karışım analizi (Admixture) yapmaktır. Böylece, popülasyonlar arasında paylaşılan genotip oranı izlenerek popülasyonlar arasındaki genetik yakınlık değerlendirilir. Karışım analizi, NGSadmixon (Skotte, Korneliussen ve Albrechtsen, 2013) ile göç ve karışım açısından değerlendirilmiş olup düşük kapsamlı yeni nesil veriler ile çalışır. Program, bu düşük kapsamı dikkate alarak çıkarılamamış genotiplerden kaynaklanan belirsizlikleri de hesaba katar. Aşağıda yazılan kod ile karışım analizine ait girdi hazırlanır:

- `./angsd -GL 1 -out admix_out -doGlf 2 -doMajorMinor 1 -SNP_pval 1e-6 -doMaf 1 -bam bam.filelist`

Parametreler şu şekilde açıklanabilir: ‘-GL’ parametresi 1 değerini kullanarak, genotip olasılıklarını hesaplamak için bir model kullanır. ‘-doGlf’ parametresi 2 değerini kullanarak, genotip olasılıklarını çıktı şeklinde almayı sağlar. ‘-doMajorMinor’ parametresi 1 değerini kullanarak, majör ve minör alelleri maksimum olabilirlik yöntemiyle seçer. ‘-SNP_pval’ parametresi 1e-6 değeri ile, SNP çağırma için p-değer eşiğini 1e-6 olarak ayarlar. ‘-doMaf’ 1 parametresi, minör alel frekansını (MAF) hesaplar. ‘-bam’ bam.filelist parametresi, analizde kullanılacak birey BAM dosyalarının listesini belirtir. Bu komut, verilen BAM dosyalarından genotip olasılıklarını ve minör alel frekanslarını doğru bir şekilde hesaplayarak genetik varyasyon analizini yapmayı sağlar.

TBA analizinde olduğu gibi ‘beagle.gz’ dosyası elde edildiğinde bu dosya NGSadmixon ile ‘-likes’ parametresine değer olarak girilir. ‘-K’ parametresi, popülasyon yapısının kaç farklı atasal popülasyona ayrılacağını tanımlar. 2’den başlayarak 8’e kadar döngü ile doğru atasal veri hesaplanır. Bu adımda aşağıdaki kısa R betik kullanılarak, 2-8 arası K değerleri için 10’ar çıktı oluşturulmuştur.

```
for (j in 1:10) {  
  for (i in 2:8) {  
    system(paste("/truba/home/emyilmaz/programs/ngsadmixon/NGSadmixon -likes  
/truba/home/emyilmaz/data/pcyc/admixture/pcyc.beagle.gz -minMaf 0.05 -K ",
```

```
    i, " -o ", "K", i, "run", j, " -minInd 21",  
    sep = ""))  
  }  
}
```

Elde edilen ‘.qopt’ verileri, oluşturulan popülasyon verisi ile beraber aşağıda yazılmış R betiği yardımıyla K parametresi 2 ile 8 arasında değişen grafikler çıktı olarak alınmıştır.

```
library(tidyverse)  
  
file_paths <- c("K2run4.qopt",  
               "K3run4.qopt",  
               "K4run9.qopt",  
               "K5run4.qopt",  
               "K6run3.qopt",  
               "K7run4.qopt",  
               "K8run5.qopt")  
  
plot_admixture <- function(file_path) {  
  tbl <- read.table(file_path)  
  species <- read.table("population.info")  
  
  plot_data <- tbl %>%  
    mutate(id = row.names(species)) %>%  
    gather(key = "Sample", value = "Probability", V1:length(tbl)) %>%  
    group_by(id) %>%
```

```

mutate(
  likely_assignment = Sample[which.max(Probability)],
  assignment_prob = max(Probability)
) %>%
arrange(likely_assignment, desc(assignment_prob)) %>%
ungroup() %>%
mutate(id = forcats::fct_inorder(factor(id)))
p <- ggplot(plot_data, aes(x = id, y = Probability, fill = Sample, group = Sample)) +
  geom_bar(stat = "identity", position = "stack", width = 0.7, color = "white", size = 0.5) +
  facet_wrap(~ likely_assignment, ncol = 4, scales = 'free', labeller = labeller(Sample =
"Populasyon")) +
  theme_minimal() +
  theme(
    axis.text.x = element_text(angle = 90, hjust = 1, vjust = 0.5, size = 8, color = "black"),
    panel.grid.major.x = element_blank(),
    panel.grid.minor.x = element_blank(),
    legend.position = "none",
    plot.title = element_text(size = 18, face = "bold", hjust = 0.5),
    axis.title = element_text(size = 14, face = "bold"),
    strip.text = element_text(size = 12, face = "bold")
  ) +
  labs(
    title = paste("Admixture Analizi Sonuclari"),
    x = "Bireyler",
    y = "Olasilik"
  ) +

```

```
theme(  
  plot.margin = margin(1, 1, 1, 1, "cm")  
)  
return(p)  
}  
plots <- lapply(file_paths, plot_admixture)  
pdf("admixture_grafikleri.pdf", width = 15, height = 10)  
invisible(lapply(plots, print))  
dev.off()
```

3.4.2.3. Popülasyon İçi ve Popülasyonlar Arası Genetik Çeşitlilik

Genetik çeşitlilik hem popülasyonlar arasında hem de popülasyon içi genetik yapılarını anlamak için önemli bir istatistiksel ölçüttür. Bu çalışmada, bu amaçlara uygun iki farklı theta indeksi kullanılmıştır.

Theta Pi ($\theta\pi$): Nükleotid farklılıklarının ortalamasını ifade etmekte olup örneklenen bireyler arasındaki genetik farklılıkların ortalaması da olarak anlaşılabilir. Genetik sürüklenme ve doğal seçilim gibi evrimsel süreçlerin etkilerinin anlaşılabilmesi için kullanılmaktadır. Büyük $\theta\pi$ değerleri, yüksek genetik çeşitliliği ve düşük genetik bağlantıyı gösterebilir, bu da popülasyonun eski veya büyük olduğunu veya sık sık genetik çeşitliliğe maruz kaldığını gösterebilir.

Theta S (θ_s): Farklılaşmış nükleotid bölgelerinin sayısını ölçmektedir. Örneklenen bireyler arasında farklılık gösteren lokusların sayısını hesaplamaktadır. Daha yüksek θ_s değerleri, daha fazla farklılaşmış bölge olduğunu ve popülasyonun geçmişte çeşitli evrimsel baskılara veya karışımlara maruz kaldığını gösterebilir.

Popülasyonların genetik farklılıkları ve evrimsel tarihleri çeşitli yöntemlerle analiz edilebilmektedir. Popülasyonların nötraliteden yani rastgelelikten uzaklaşma oranları

Tajima'nın D'si kullanılarak değerlendirilir ve alel sıklık dağılımı (ASD, Allele Frequencies Distribution) analizlerinde bir ölçüt olarak kullanılmaktadır. Tajima'nın D testinin amacı, rastgele ("nötr olarak") gelişen bir DNA dizisi ile yönlü seçim veya dengeleme seçimi, demografik genişleme veya daralma, genetik sürüklenme dahil olmak üzere rastgele olmayan bir süreç altında gelişen bir DNA dizisi arasında ayırım yapmaktır.

Popülasyonların genetik çeşitliliğini değerlendirmek için her bir popülasyona ait ASD'ler ANGSD ile hesaplanıp bu ASD'lerden ise $\theta\pi$ ve θ_s gibi genetik çeşitlilik ölçütleri hesaplanmaktadır; özellikle, RAD lokusundaki toplam bölge sayısına bölünerek bölge başına düşen $\theta\pi$ ve θ_s ve Tajima D değerleri, popülasyonların genetik yapısını anlamak için önemli bir araç olarak kullanılmaktadır.

Bu değerleri saptayabilmek için öncelikle tüm popülasyonlar için ayrı ayrı listeler oluşturulmuştur. Birey listesi kullanılarak sadece popülasyonlara özel SFS değeri hesaplanmıştır. Ardından, demografik analizlerde kullanılan ANGSD parametrelerinden 'doSaf', 'ref' ve 'anc' kullanılarak '.saf.gz', '.saf.idx' ve '.saf.pos.gz' dosyaları çıktı olarak alınmıştır.

- .saf.gz dosyası: Her pozisyondaki alel frekanslarını saklar.
- .saf.idx dosyası: .saf.gz dosyasına erişmek için kullanılan indeks dosyasıdır ve büyük veri setlerinde pozisyonlara hızlı erişim sağlar. SAF dosyalarını kullanmak için bu indeks dosyası, ilgili parametrelere değer olarak kullanılır.
- .saf.pos.gz dosyası: Her lokusta hesaplanan SAF değerlerini içerir.

realSFS tüm popülasyonlar için ikişer popülasyon (2D-ASD) arasındaki genetik farklılaşmayı çözebilmekte olup bunları '.sfs' dosyasına yazdırır. Bu sayede, popülasyonlar arasındaki alel frekansı farklılıkları değerlendirilir ve Fiksasyon İndeksi (Fst) gibi çeşitli istatistikler oluşturulur (Nielsen ve ark., 2012).

```
realSFS unlupi.saf.idx subasi.saf.idx > unlupi.subasi.sfs
```

Yazılan kod ile ‘.sfs’ çıktısı alınır. Bu çıktı genetik farklılıkları hesaplamış olup bir sonraki adımda Fst hesaplamaları için gerekli olan popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın lokus bazında ayrıntılı olarak incelenmesini sağlar. Yüksek Fst değerleri, bu bölgelerin doğal seçim veya diğer evrimsel kuvvetler tarafından etkilenmiş olabileceğini gösterebilmektedir. Fst değerleri, ayrıca popülasyon yapısını, göç oranlarını ve özellikle popülasyonlar arasındaki gen akışını anlamaya yardımcı olmaktadır. Bu adımda, ‘fold’ parametresi için 1 değeri, daha önceki adımlarda olduğu gibi kullanılmıştır.

- realSFS fst index unlupi.saf.idx subasi.saf.idx -fold 1 -sfs unlupi.subasi.sfs -fstout unlupi.subasi.persite

Bu adımda ‘fst.idx’ dosyaları elde edilir. Bu indekslenmiş çıktı, ikili popülasyon analizlerinde Fst hesaplamalarının sonuçlarını içerir. Bu dosyalar, Fst istatistiklerini ve her bir pozisyon için hesaplanan Fst değerlerini içermektedir.

- realSFS fst stats unlupi.subasi.fst.idx

Elde edilen Fst.Unweight ve Fst.Weight değerleri Fst sonuçları olarak yorumlanabilmektedir. Bu iki değerden her iki Fst.Weight ve Fst.UnWeight değeri kullanılmıştır. Fst.Weight değerleri, her lokusun genetik çeşitliliğe katkısının farklı olduğu ağırlık hesaplamasını kapsamaktadır. Ağırlıklı Fst değerleri minimal olmayan veri setlerinde daha doğru çalışmaktadır. Bunun yanında ağırlıksız Fst değerleri de kullanılarak genomda etkisi daha büyük olan lokusların bu değere etkileri de alınabilmektedir. İlgili veri seti, aşağıda yazılan betik ile ısı haritasında (heat map) gösterilmek üzere kullanılmıştır.

```
#libraries
```

```
library(corrplot)
```

```
library(ggplot2)
```

```
#data
```

```

data <- read.table("fst_values")

#graphic

plot <- ggplot(data, aes(x = V2, y = V1, fill = V3)) +

  geom_tile() +

  scale_fill_gradient(low = "lightblue", high = "#8B4513", name = "Fst") +

  theme_minimal() +

  labs(title = "Fst for P_cyc", x = "", y = "") +

  geom_text(aes(label = sprintf("%.2f", V3), group = interaction(V1, V2)),

            vjust = 0.5, hjust = 0.5, color = "black") +

  theme(axis.text.x = element_text(size = 10, face = "bold", angle = 90, vjust = 0.5), # x
ekseni etiketleri

        axis.text.y = element_text(size = 10, face = "bold"))

print(plot)

ggsave("./sfsanalysis.svg")

```

3.5. Demografik Analizler

Phyllolepidum cyclocarpum subsp. *cyclocarpum*'a ait çalışılan popülasyonların zamana bağlı etkin popülasyon büyüklüklerindeki değişiklikler Stairway Plot 2 v2.1.2 programı ile değerlendirilmiştir. Stairway Plot 2, popülasyonların zamana bağlı boyutlarındaki değişimleri, dar boğazları ve genişlemeleri inceleyerek çevresel değişikliklere ve evrimsel süreçlere nasıl tepki verdikleri hakkında fikir verip, bu sayede özellikle endemik veya nesli tükenmekte olan türlerin korunması amacıyla demografik çıkarımlar yapılmasına olanak sağlar (Liu ve Fu, 2020).

Stairway Plot 2, Site Frequency Spectrum (SFS) verilerini girdi olarak kullanmaktadır. SFS verilerini elde edebilmek için önce ANGSD programı yardımıyla *P. cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* bireylerinin ".bam" listesi hazırlanmıştır. Referans ve atasal parametreler ('-anc', '-ref') için ise dış grup olmadığı ve atasal organizma bilinmediği için model organizma

olan *Arabidopsis thaliana* kullanılmıştır. Bu yöntemde, atasal aleller bilinmediği ve dış grup kullanılmadığı için 'Folded SFS' yöntemi tercih edilmiştir.

Bu yöntem yanlışlığı azaltarak genel alel frekansını doğru bir şekilde yansıtmaktadır. Bu parametreler dışında; '-doCounts' parametresi 1 değeri ile her lokusta oluşan alellerin frekansını, 'GL' parametresi 1 değeri ile genotip tahminlerini, 'doMajorMinor' ve 'doMaf' parametresi 1 değeri ile genotip olasılık veya ham verilerden majör ve minör alelleri maksimum olabilirlik (maximum likelihood) yöntemiyle seçmektedir (Skotte, 2013). 'doSaf' parametresi 1 değeri ile ANGSD her bölge için alel frekansının olasılığını hesaplayıp ve çıktı dosyalarına aktarmaktadır. Aynı şekilde, 'uniqueOnly' parametresi 1 değeri ile birden fazla olan okumaları kaldırır, 'remove_bads' parametresi 1 değeri ile 'samtools flag -x' gibi çalışmakta olup hatalı veya yinelenen okumaları kaldırmaktadır. 'only_proper_pairs' parametresi 1 değeri ile eşleşen tüm doğru okuma çiftlerini çıktı olarak almayı sağlar. 'baq' parametresi 2 değeri ile genişletilmiş BAQ (Base Alignment Quality) analizi yaparak bölgelerin doğru hizalanıp hizalanmadığının ihtimalini ölçer (Heng Li, 2011). 'nInd' parametresi analiz edilen birey sayısını, 'minInd' parametresi bulunan bölgenin en az kaç bireyde olması gerektiğini gösterir ve sadece bu ve bunun üstündeki değerleri çıktı olarak alır. Bu değer, toplam bireyin yarısı olacak şekilde hesaplanmıştır. 'minMapQ' parametresinin 10 değeri eşleme kalitesinin en az 10 olması gerektiğini, 'minQ' parametresinin 20 değeri ise düşük kalitede (<20) okunan bazların çıkarılmasını sağlar.

ANGSD ile kullanılan parametreler aracılığıyla oluşan çıktılarından biri olan saf.idx ekli dosyanın, realSFS programında kullanılmasıyla sfs ekli dosya oluşturulmuştur. Bu dosya oluşturulurken 'fold' parametresi 1 değeri ile kullanılarak folded SFS yöntemi tercih edilmiştir. Alel frekansı grafiği çıktısını alabilmek için sfs dosyası ile ham birey verisini içeren liste girdi olarak kullanılıp 'folded' seçeneği 1 olarak alınmıştır. Grafik, plotSFS.R isimli betik kullanılarak oluşturulmuştur (Fumagalli, 2017).

Bu adımlardan sonra sfs ekli dosya ve türetilmiş alel frekansı (Derived Allele Frequency) elde edilmektedir. Stairway Plot 2 programı, aşağıda açıklanan parametreleri blueprint ekli dosyaya ekleyerek çalıştırılmıştır.

‘blueprint’ dosyasında kullanılan parametrelerden; ‘L’ parametresi, SFS grafiğindeki türetilmiş alel frekansının 2 katını, ‘whether_folded’ parametresi SFS yönteminin folded yöntemi ile kullanılıp kullanılmadığını, ‘n_rand’ parametresi ise 4 değerden oluşmakta olup L parametresinden 2 çıkarılıp sırasıyla 4, 3, 2 ve 1’e bölünmesiyle elde edilmektedir. ‘pct_training’ parametresi, temel grafik modelini eğitmek için kullanılan verilerin yüzdesini ifade etmektedir. Bu değer varsayılan değer olan 0.67 olarak bırakılmıştır. ‘mu’ parametresine değer olarak *A. thaliana* genomu için hesaplanmış olan jenerasyon başına yıllık mutasyon hızı olan $7.1 \times 10^{-9} \mp 0.7 \times 10^{-9}$ girilmiştir. ‘year_per_generation’ bir nesil başına düşen yıl sayısını belirtmektedir. *P. cyclocarpum* için tahmin edilen değer 10 olarak girilmiştir (Rota ve ark., 2023).

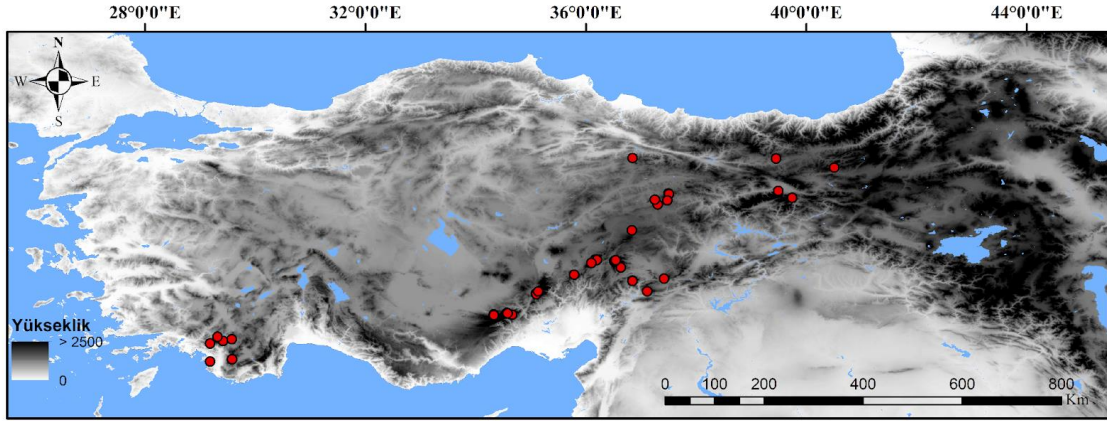
Bu veriler dışında kalan tüm parametreler varsayılan olarak bırakılmış olup Java openjdk versiyon “19.0.2” ile çalıştırılmıştır. Analiz sonucu, *P. cyclocarpum* popülasyonlarında günümüze kadar üremiş olan bireylerinin yani etkin popülasyon büyüklüğünün zaman içindeki değişimleri görselleştirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması beş temel başlıkta özetlemiş, bu kapsamda i) arazi çalışmaları ii) morfolojik çalışmalar iii) moleküler çalışmalar iv) popülasyon genetiği çalışmaları ve v) demografik çalışmalarına ait sonuçlar değerlendirilmiştir.

4.1. Arazi Çalışmaları

Gerçekleştirilen literatür taramaları, herbaryum ve arazi çalışmaları ile, *P. cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'un Anadolu'daki mevcut yayılış alanı tespit edilmiştir. Toros Yolu üzerinde, bitkinin hem bilinen hem de potansiyel olarak bulunabileceği lokalitelerde gerçekleştirilen arazi çalışmaları ile Türkiye Florası'nda sınırlı sayıda kayıttan bilinen bu taksona ait yayılış alanı, çok sayıda yeni kayıtla birlikte güncellenmiştir (Şekil 4.1). Elde edilen bulgular bitkinin yaşam alanının genellikle, 1500-2800 metre yüksekliklerde kalker ana kayanın hâkim olduğu alanlarda hareketli ya da sabit kayalıkları içerdiğini göstermektedir.



Şekil 4.1. *Phyllolepidium cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'un güncellenmiş yayılış alanı.

Toplanan örnekler, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu (HUB)'na saklanmak üzere teslim edilmiştir. Toplanan bireylere ait popülasyonların tür, lokalite, habitat vb. bilgileri Çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.2. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'un Doğu Toroslar'a ait popülasyonları. a) Niğde, Aladağlar, b) Kayseri, Binboğa Dağı, c) Kayseri, Arslantaş Yaylası, d) Karaman, Aydos Dağı.



Şekil 4.3. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'un Batı Toroslar'a ait popülasyonları. a) Burdur, Boncuk Dağı, b) Burdur, Eldirek Dağı, c) Muğla, Babadağ, d) Muğla, Tuzlabeli Geçidi

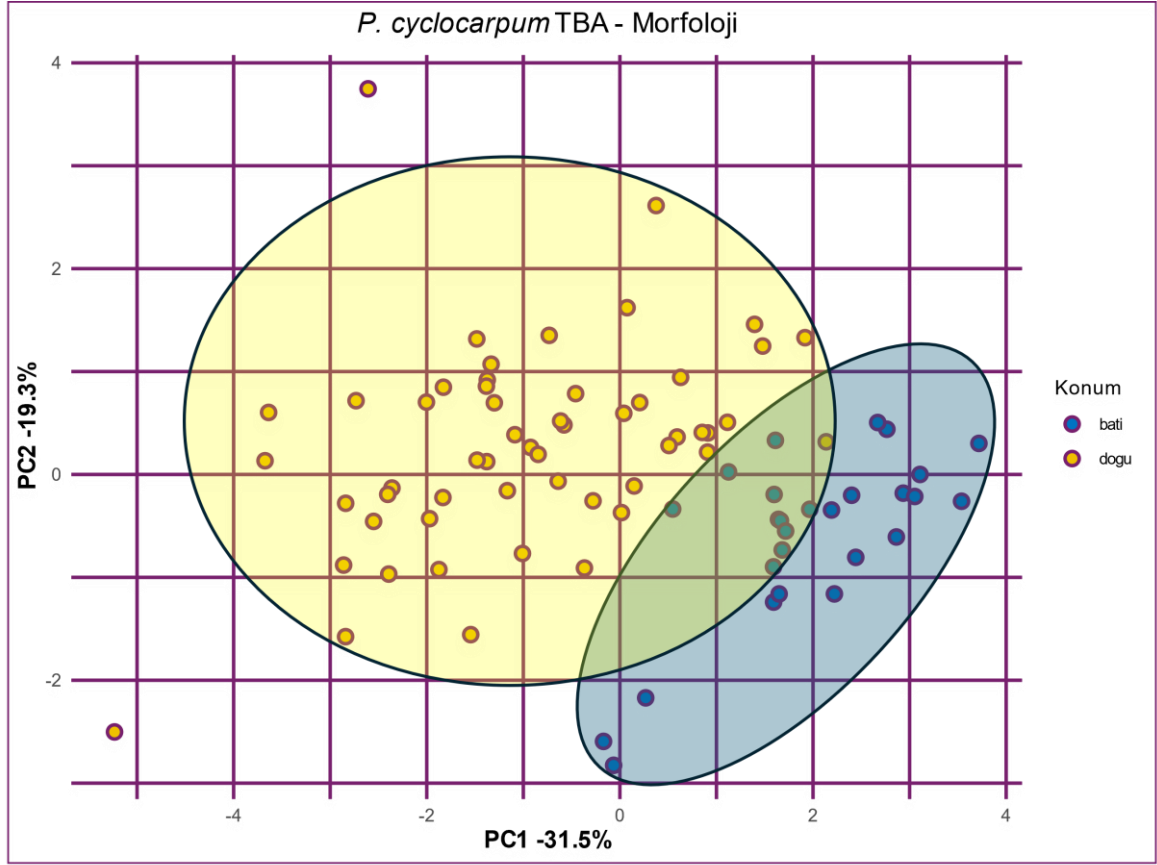
Çizelge 4.1. Arazi çalışmalarında örneklenen *Phyllolepidium cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* popülasyonları.

Toplayıcı No.	Popülasyon	Birey Sayısı	Grup
BÖ5565	Binboğa Dağı / Kahramanmaraş	2	Doğu
BÖ5641	Subaşı Yaylası / Antalya	4	Batı
BÖ5699	Bolkar Dağları, Karagöl / Niğde	5	Doğu
BÖ5705	Bolkar Dağları, Çiniligöl / Niğde	1	Doğu
BÖ5637	Fethiye, Tuzlabeli / Muğla	4	Batı
BÖ5880	Bolkar Dağları, Karagöl Doğusu / Niğde	3	Doğu
BÖ5628	Eldirek Dağı / Burdur	6	Batı
BÖ5725	Aladağlar, Karayalak Vadisi / Niğde	3	Doğu
BÖ5759	Berit Dağı / Kahramanmaraş	5	Doğu
BÖ5629	Fethiye, Babadağ / Muğla	4	Batı
BÖ5610	Boncuk Dağı / Muğla	6	Batı
BÖ5577	Bakırdağı / Kayseri	4	Doğu
BÖ5581	Pınarbaşı, Oyukalan Köyü / Kayseri	3	Doğu
BÖ5706	Aladağlar, Küçük Mangırcı Dağı / Niğde	4	Doğu
BÖ5738	Binboğa Dağları, Tavla Köyü / Kayseri	4	Doğu
BÖ5773	Engizek Dağı / Kahramanmaraş	4	Doğu

BÖ5789	Yıldız Dağları, Demirözü Köyü / 6 Sivas		Doğu
BÖ5799	Zara, Gürlevik Dağı / Sivas	3	Doğu
BÖ5817	Ergan Dağı / Erzincan	1	Doğu
BÖ5832	Bahtlı Dağı / Bayburt	4	Doğu
BÖ5853	Kelkit, Ünlüpınar Köyü / 3 Gümüşhane		Doğu
BÖ5954	Çameli, Yaylacık Dağı / Denizli	3	Batı

4.2. Morfolojik Çalışmalar

Çizelge 4.1’de popülasyon bilgileri verilen *P. cyclocarpum*’a ait bireyler, Çizelge 3.1’de yer alan karakterler bakımından ölçülmüş olup, sadece sayısal veriler üzerinden TBA yapılmıştır.



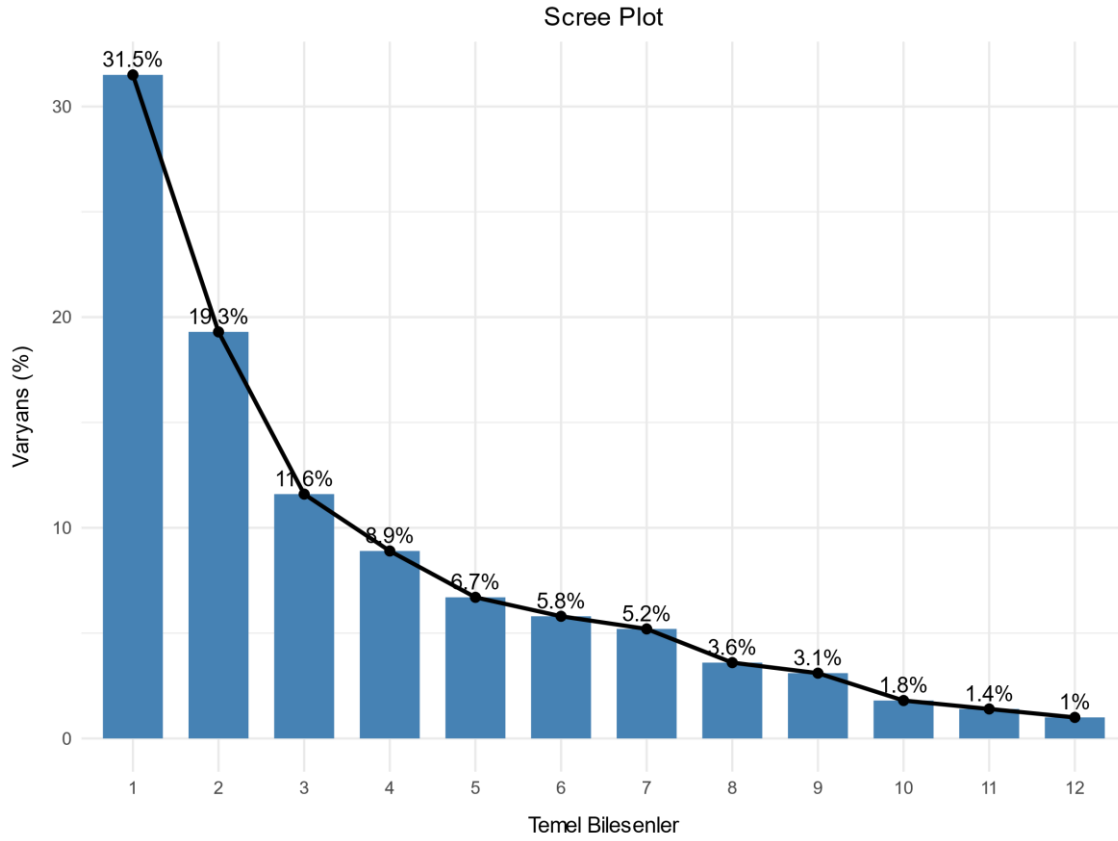
Şekil 4.4. Çalışılan *P. cyclocarpum* popülasyonlarında ölçülmüş morfolojik varyasyonun Temel Bileşenler Analizi.

Analiz sonucunda, TBA'ya dahil edilen doğu (Binboğa Dağı (Kahramanmaraş), Bolkar Dağları-Karagöl (Niğde), Bolkar Dağları-Çiniligöl (Niğde), Bolkar Dağları (Niğde), Aladağlar (Niğde), Berit Dağı (Kahramanmaraş), Bakırdağı (Kayseri), Oyukalan Köyü (Kayseri), Küçük Mangırcı Dağı (Niğde), Binboğa Dağları (Kayseri), Engizek Dağı (Kahramanmaraş), Yıldız Dağları (Sivas), Gürlevik Dağı (Sivas), Ergan Dağı (Erzincan), Bahtlı Dağı (Bayburt), Ünlüpınar Köyü (Gümüşhane)) ve batı (Subaşı Yaylası (Antalya), Tuzlabeli (Muğla), Eldirek Dağı (Burdur), Babadağ (Muğla), Boncuk Dağı (Muğla), Yaylacık Dağı (Denizli)) popülasyon gruplarına ait bireyler büyük ölçüde ayrıştığı görülmektedir.

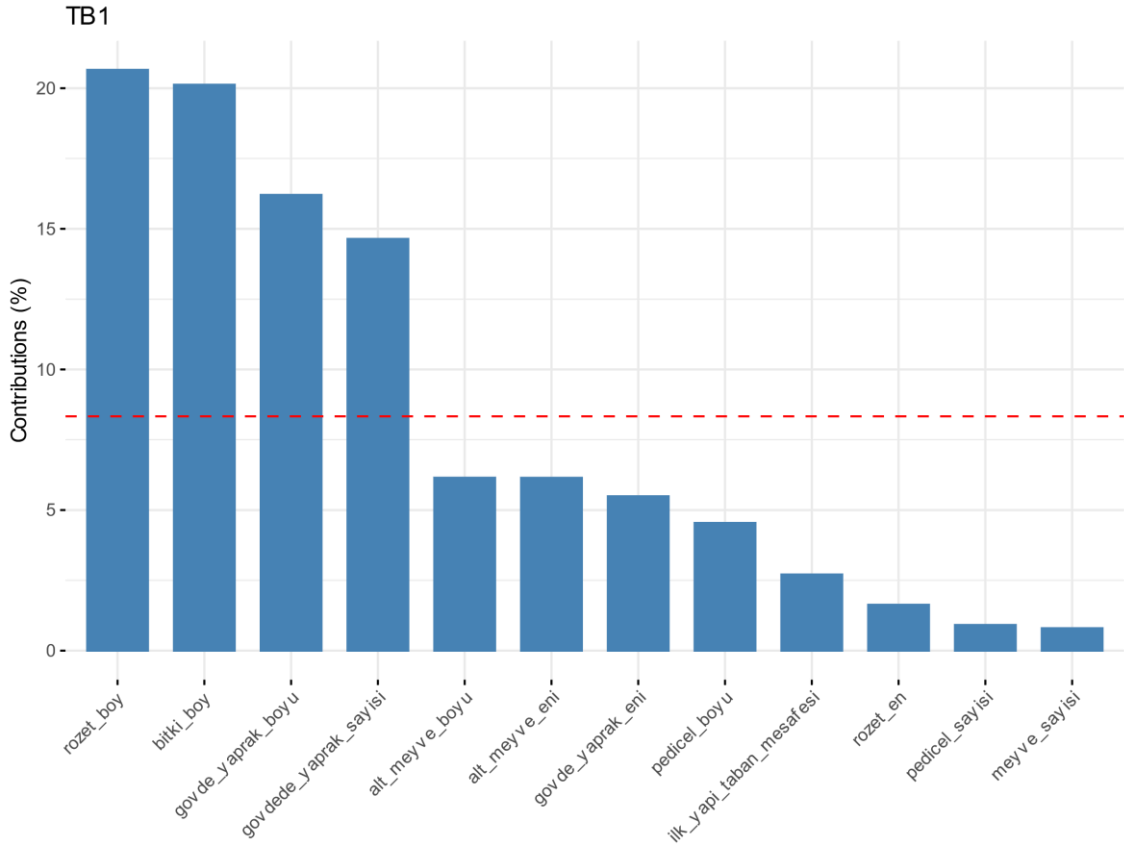
Şekil 4.4'te yer alan grafik üzerindeki; yatay eksenini temsil eden TB1 (ya da PC1) toplam varyansın %31,5'ini açıklamaktadır. Dikey eksenini temsil eden TB2 (ya da PC2) toplam

varyansın %19,3'ünü açıklamakta olup bu iki bileşen, ilgili morfoloji verilerinin genel varyasyonunun %50,8'ini açıklamaktadır.

Grafikte, çoğunluğu sarı elipste görünen doğu grubu popülasyonlarına ait bireyler geniş bir alana yayılmış olup çeşitlilik göstermektedir. Mavi elipste bulunan batı grubu popülasyonlarına ait bireyler dar bir alanda olup morfolojik çeşitliliği kısıtlıdır. Kesişimde bulunan ara bireyler, popülasyonlar arasında doğal olarak ortak morfolojik özelliklerin bulunduğunu gösterir. Bu ara bireyler, iki popülasyon arasında gen akışı veya melezleşme olabileceğini düşündürebilir. Ancak genel olarak popülasyonlar birbirlerinden anlamlı bir şekilde morfolojik olarak ayrılmıştır.



Şekil 4.5. Temel bileşenlerin toplam varyasyonun yüzde cinsinden ne kadarını açıkladığını gösteren varyasyon grafiği (Scree Plot). En soldan sağa TB1-TB12 olup sıralı olarak dizilmiştir.



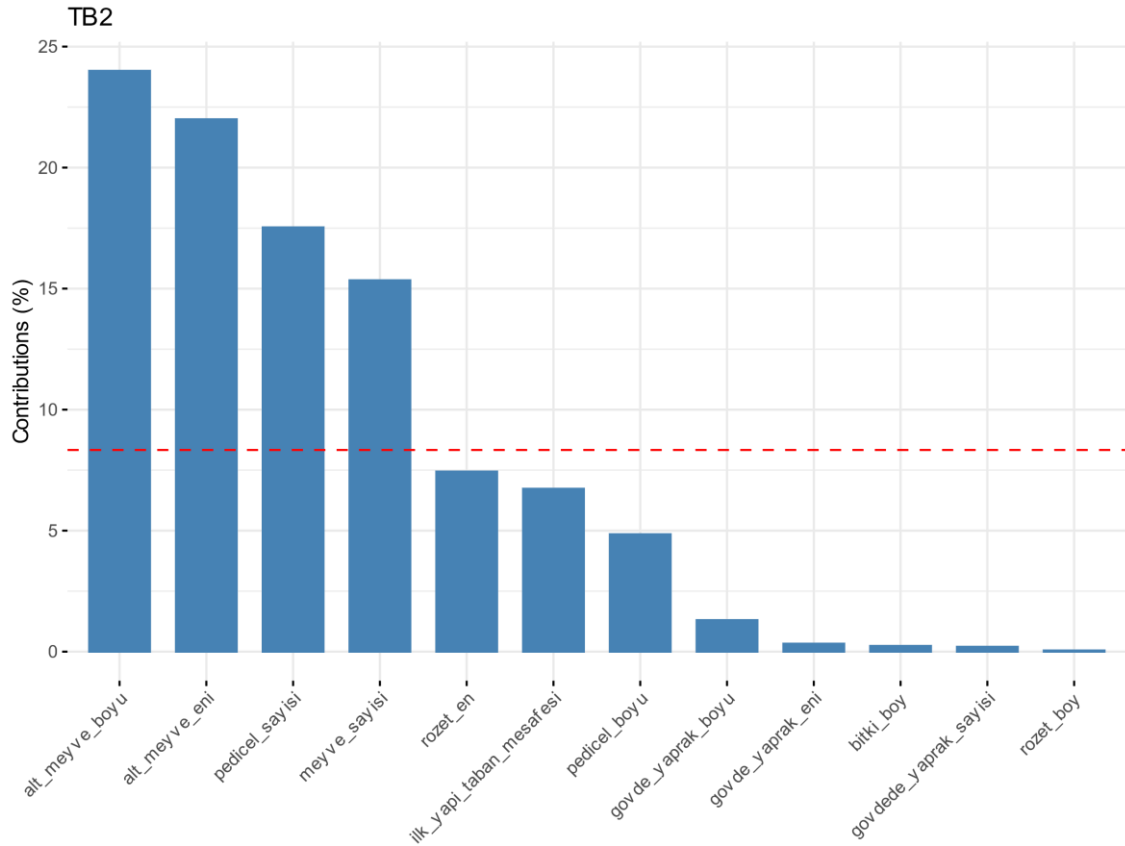
Şekil 4.6. Değişkenlerin TB1 bileşenine sağladıkları katkı düzeyleri (%).

TB1, verideki varyansın %31,5'ini açıklamaktadır. Bu durum, TB1'e en çok katkı sağlayan değişkenlerin verideki genel varyasyonu bir ölçüde temsil ettiğini göstermektedir. Şekil 4.6'da görüldüğü üzere TB1'e en çok katkı sağlayan veriler rozet yaprak boyu, bitki boyu, gövde yaprak boyu ve gövdedeki yaprak sayısından oluşmaktadır. TB1'e, alt meyve boyu, alt meyve eni, gövde yaprak eni gibi diğer veriler her ne kadar katkı sağlasalar da asıl değer oluşma sürecinde en fazla katkı sağlayan değişkenler Çizelge 4.2'de ortalaması verilenlerdir.

Çizelge 4.2. TB1 bileşenine en çok katkı sağlayan değişkenler ve ortalamaları.

Rozet Yaprak Boyu (cm)	3,05
Bitki Boyu (cm)	12,3
Gövde Yaprak Boyu (cm)	0,77
Gövdedeki Yaprak Sayısı	~4 (3,7)

Elde edilen değerler, *P. cyclocarpum* popülasyonları arasındaki varyasyonun genel olarak yaprak karakterleriyle açıklanmakta olup toplam varyasyona en fazla katkı sağlayan değişkenin rozet yaprak boyu olduğunu göstermektedir. Şekil 4.8 incelendiğinde ise doğu popülasyonlarının taban yapraklarının belirgin bir şekilde batı popülasyonlarından uzun olduğu görülmektedir.



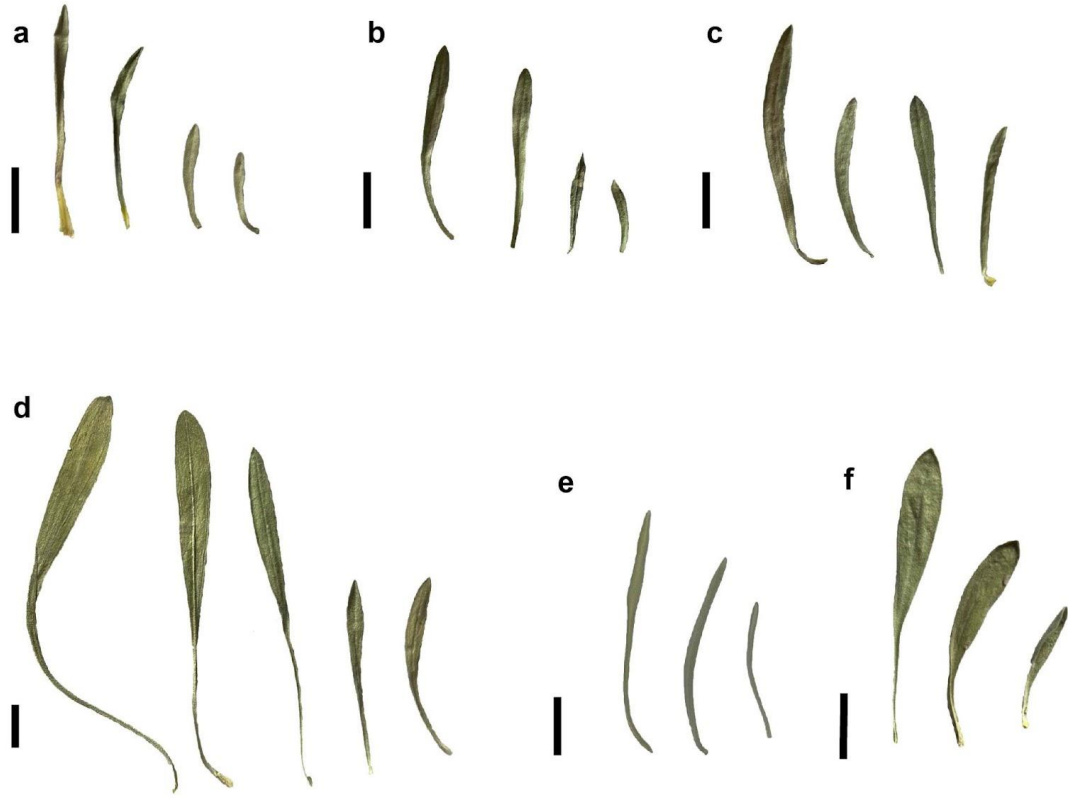
Şekil 4.7. Değişkenlerin TB2 bileşenine sağladıkları katkı düzeyleri (%).

TB2, varyansın %19,3'ünü açıklamaktadır. TB2'nin toplam varyansı açıklama yüzdesi, TB1'e göre düşük olmasına rağmen yine de bilgi vericidir. TB2 bileşenine en çok katkı sağlayan veriler; salkımın en altındaki meyvenin boyu (alt meyve boyu olarak kodlanmıştır), alt meyve eni, pedisel sayısı ve meyve sayısından oluşmaktadır.

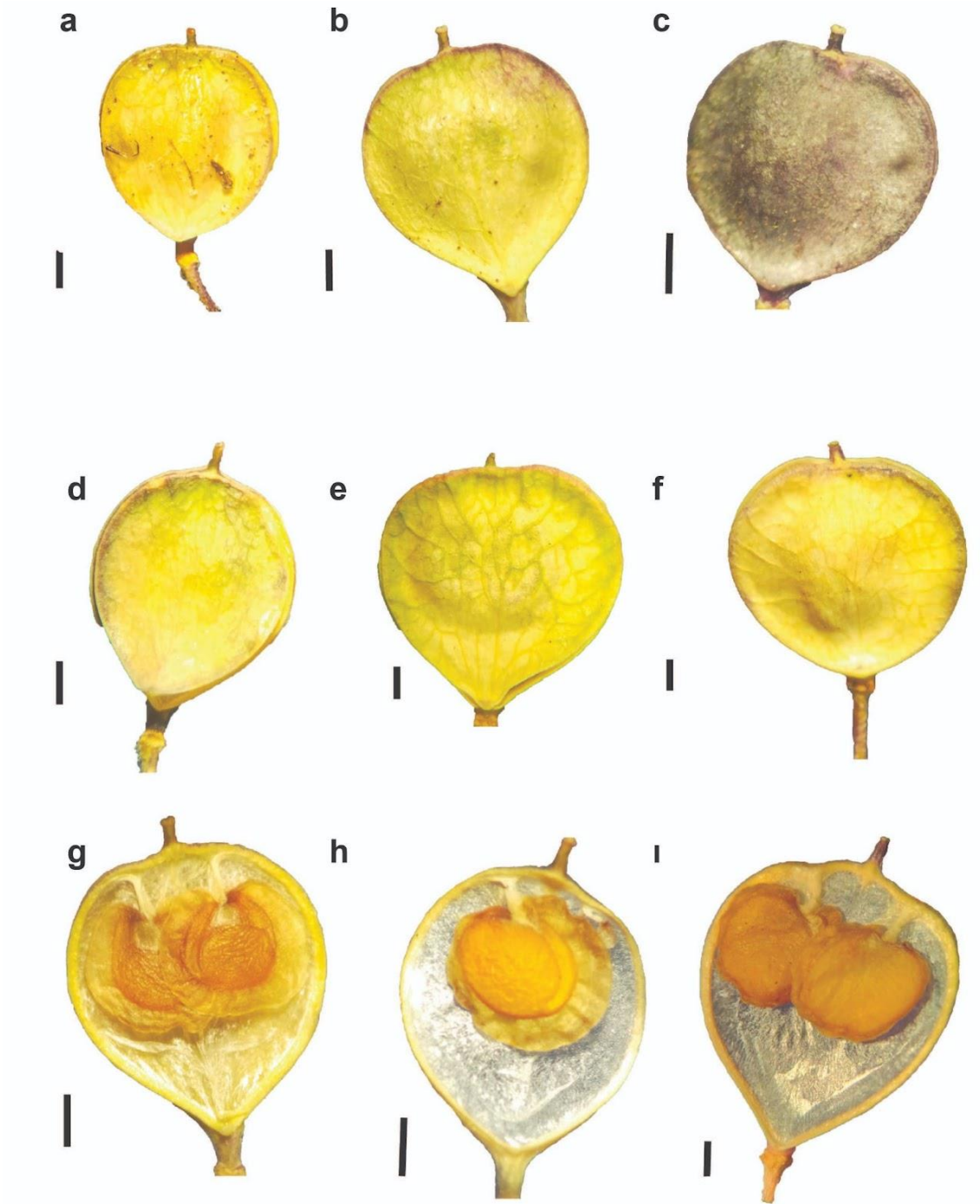
Çizelge 4.3. TB2 bileşenine en çok katkı sağlayan değişkenler ve ortalamaları.

Alt Meyve Boyu (mm)	6
Alt Meyve Eni (mm)	4,7
Pedisel Sayısı	15
Meyve Sayısı	~9 (8,8)

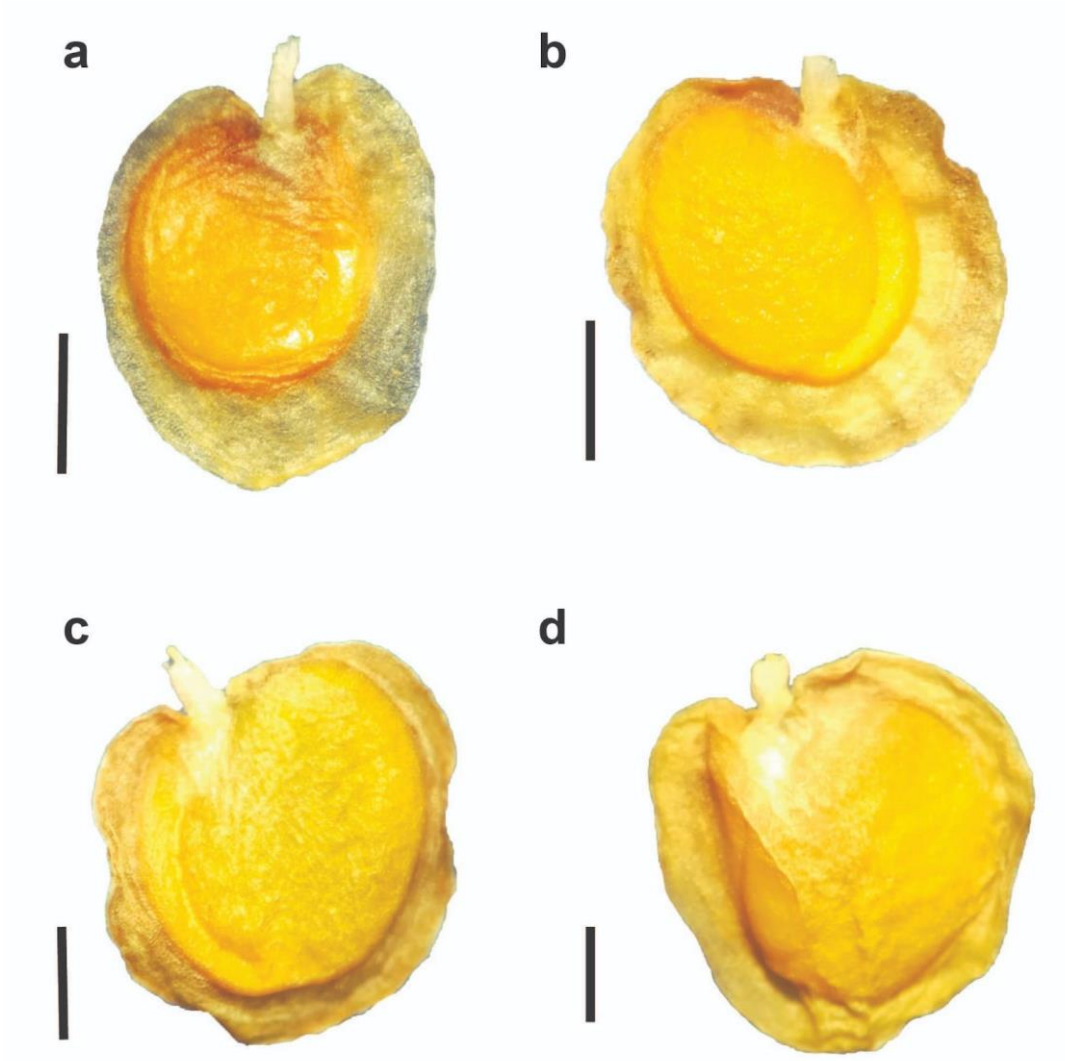
Elde edilen değerler, *P. cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* popülasyonları arasındaki varyasyonun TB2'ye göre genel olarak meyve karakterleriyle açıklanmakta olup, toplam varyasyonun ise büyük ölçüde rozet yaprak boyu ile açıklandığını göstermektedir.



Şekil 4.8. *Phyllolepidum cyclocarpum* popülasyonlarında yaprak varyasyonu. a-c batı popülasyonları, d-f doğu popülasyonları; a) Burdur, Eldirek Dağı, b) Muğla, Babadağ, c) Denizli, Yaylacık Dağı, d) Kayseri, Arslantaş Yaylası, e) Erzurum, Bahtlı Dağı, f) Karaman, Aydos Dağı. Barlar=1 cm.



Şekil 4.9. *Phyllolepidum cyclocarpum* popülasyonlarında meyve varyasyonu. a) Muğla, Tuzlabeli, b) Burdur, Eldirek Dağı, c) Muğla, Babadağ, d) Denizli, Yaylacık Dağı, e) Kayseri, Binboğa Dağları, f) Kayseri, Dedeveli Geçidi, g) Burdur, Eldirek Dağı, h) Denizli, Çameli, i) Karaman, Aydos Dağı. Barlar=1 mm.



Şekil 4.10. *Phyllolepidum cyclocarpum* popülasyonlarında tohum varyasyonu. a) Muğla, Tuzlabeli Geçidi, b) Denizli, Çameli, c) Kayseri, Binboğa Dağları, d) Kayseri, Dedebeği Geçidi. Barlar=1 mm.

Örneklenen popülasyonlar meyve ve tohum morfolojisi açısından detaylı olarak incelenmiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). *P. cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'a ait batı ve doğu popülasyonları arasında meyve morfolojisi açısından belirgin bir fark tespit edilmemekle birlikte, tohumlarının kanat genişliği arasında batı popülasyonlarında daha geniş olacak şekilde bir fark gözlenmiştir. Genel olarak *Alysseae* tribusu sistematüğinde yaygın bir şekilde kullanılan tüy morfolojisi açısından ise doğu ve batı popülasyonları arasında bir fark bulunmamaktadır.

4.3. Moleküler Çalışmalar

4.3.1. Filogenetik çalışmalar için Veri Hazırlığı

Çizelge 4.4'te Qubit ile ölçülen DNA miktarları, PcX (*Phyllolepidium cyclocarpum* X. birey), popülasyon ve toplanan birey, başarıyla tamamlanan birey sayısı ve analizlerde kullanılmış olan popülasyon kısaltmaları verilmiştir.

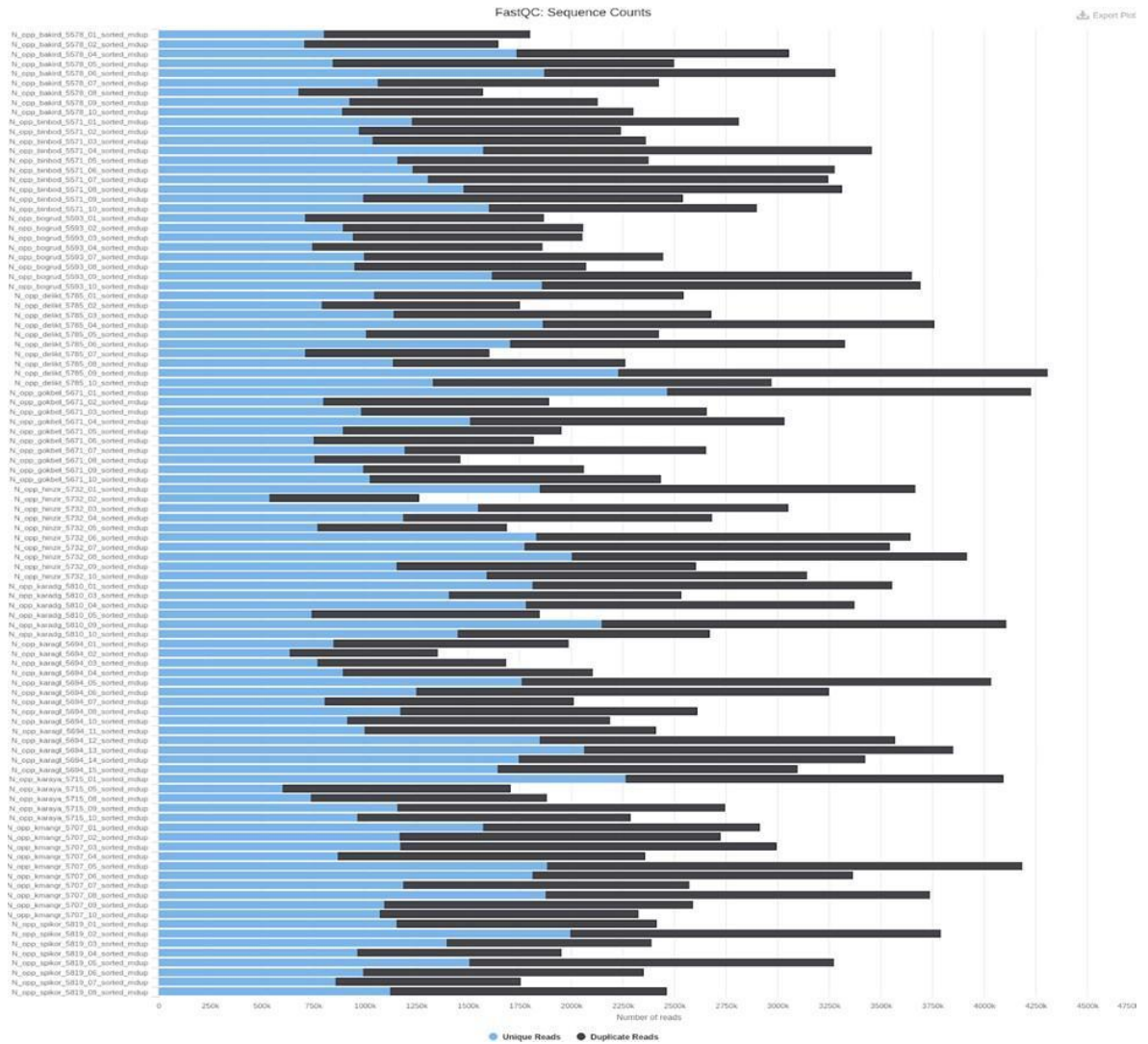
Çizelge 4.4. Toplanan *Phyllolepidium cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'a ait verilen kodlar, popülasyon bilgileri ve DNA miktarları (Qubit).

Kod	Popülasyon (Toplanan Birey)	Tamamlanan Birey Sayısı	Popülasyon Kısaltması	DNA Miktarları Ortalaması (ng/ μ L)
(Pc1 - Pc12)	Küçük Mangırcı Vadisi / Niğde (11)	9	kmangr	17,1
(Pc21 - Pc30)	Subaşı Yaylası / Antalya (10)	10	subasi	16
(Pc31 - Pc40)	Tuzlabeli / Muğla (10)	10	tzlabe	18,4
(Pc41 - Pc50)	Boncuk Dağı / Burdur (10)	10	boncuk	16,2
(Pc51 - Pc59)	Babadağ / Muğla (9)	9	babadg	18,6

(Pc81 - Pc94)	Bakırlı Dağ / Kayseri (11)	12	bakırl	12,5
(Pc95 - Pc104)	Bahtlı Dağı / Erzurum (10)	10	bahtli	17,7
(Pc105 - Pc114)	Gürlevik Dağı / Sivas (10)	10	gurlev	17
(Pc115 - Pc124)	Demirözü Köyü / Sivas (10)	10	demiro	14,9
(Pc125 - Pc135)	Eldirek Dağı / Burdur (11)	11	eldire	13,7
(Pc136 - Pc145)	Ünlüpınar Köyü / Gümüşhane (10)	10	unlupi	16,8
(Pc146 - Pc157)	Berit Dağı, Morun Yatağı / Kahramanmaraş (4)	4	moruny	16,5
(Pc158 - Pc167)	Engizek Dağı / Kahramanmaraş(4)	4	engizk	17,8
(Pc168 - Pc179)	Binboğa Dağları / Kayseri(12)	11	binboa	18,7
(Pc195 - Pc208)	Bolkar Dağları, Karagöl / Niğde (9)	9	karagl	17,2

4.3.2. Kalite Kontrolü

Filogenetik analizlerde kullanılan lokuslara ait FastQC sonuçları aşağıda özetlenmiştir.



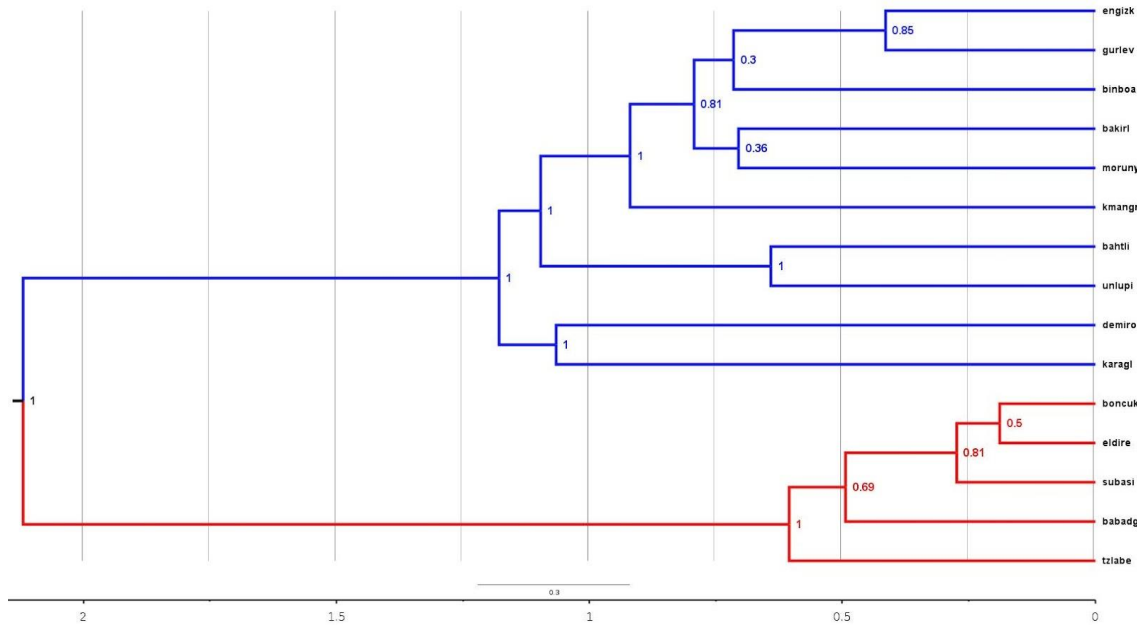
Şekil 4.11. *Phyllolepidium cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'a ait bireylerin FastQC kullanılarak yapılan kalite kontrolü. Tekli okumalar mavi olarak; ikili okumalar siyah olarak gösterilmektedir. Her bar bir bireyi göstermektedir.

Çalışmada kullanılan DNA dizilerine ait veri setinde doğu ve batı olmak üzere 15 ayrı popülasyon ve 140 birey bulunmaktadır. Bu popülasyonlar içerisindeki örnekler için toplam okuma sayısı FastQC analizi sonucunda 0,12 milyon ile 7.18 milyon okuma arasında değişmektedir. Grafikte, dağılım neredeyse homojen olup 2,5 milyon (± 0.2 milyon) okuma civarında küçük bir yığılma olmuştur. Bu da çoğu birey için elde edilen değerlerin bu bölümde yoğunlaştığını göstermektedir.

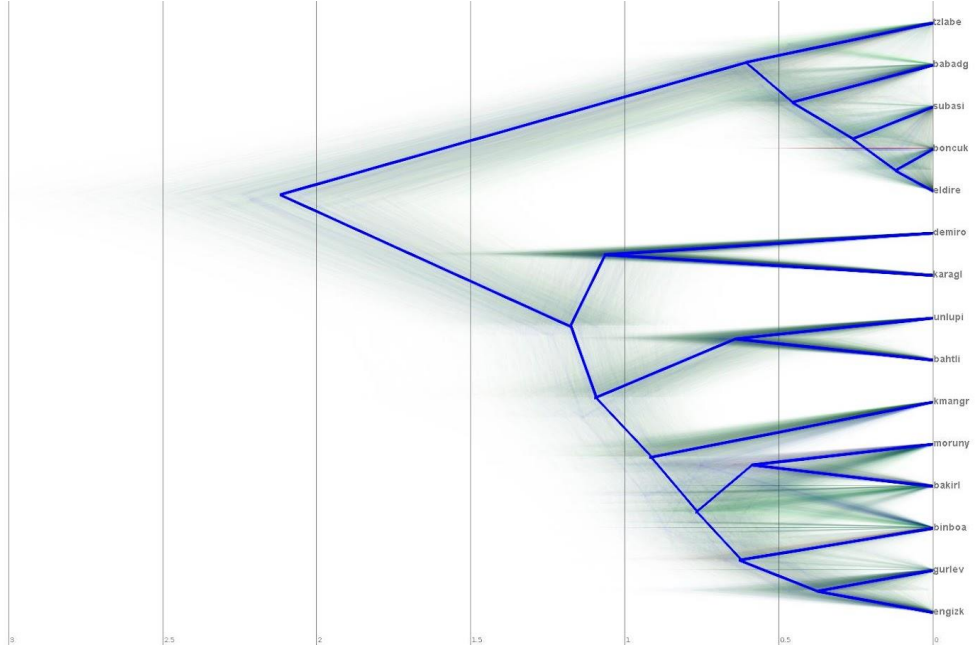
Sonuç olarak, MultiQC analizi, veri setindeki okuma sayılarının genel olarak dengeli ve uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca, tekli ve ikili okuma kombinasyonu bu veri için dengeli olup, genetik analizlerde daha doğru sonuçlar elde etmeyi sağlar.

4.3.3. Filogenetik Analizler, Ayrılma Zamanı Hesaplamaları ve Biyocoğrafik Analizler

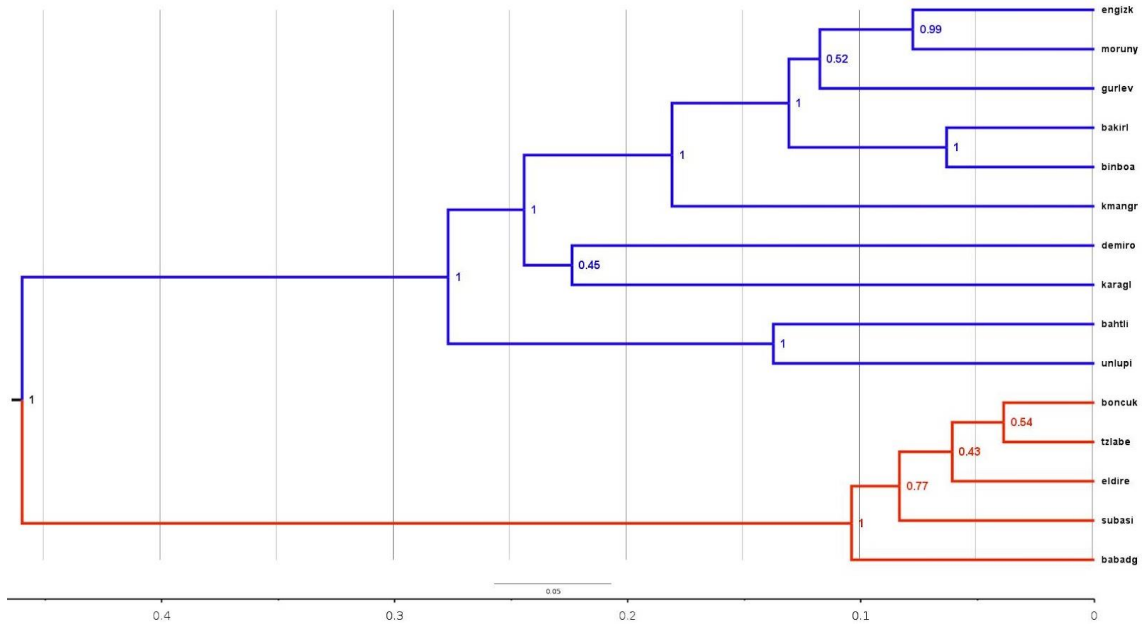
Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16’da ise *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* popülasyonlarıyla gerçekleştirilen 50’şer lokustan oluşan ve üçü rastgele biri parsimoni bilgilendirici lokus verileri ile yapılan filogenetik analizler verilmiştir. Gerçekleştirilen tüm analizlerde doğu ve batı popülasyonları ayrışması belirgin bir şekilde (pp=1) desteklenmiştir. Ayrılma zamanı hesaplamaları açısından ise rastgele lokuslarla yapılan analizlerin parsimoni bilgi verici lokuslarla yapılan analizlere göre daha yakın tarihleri hesaplama eğiliminde olduğu görülmektedir.



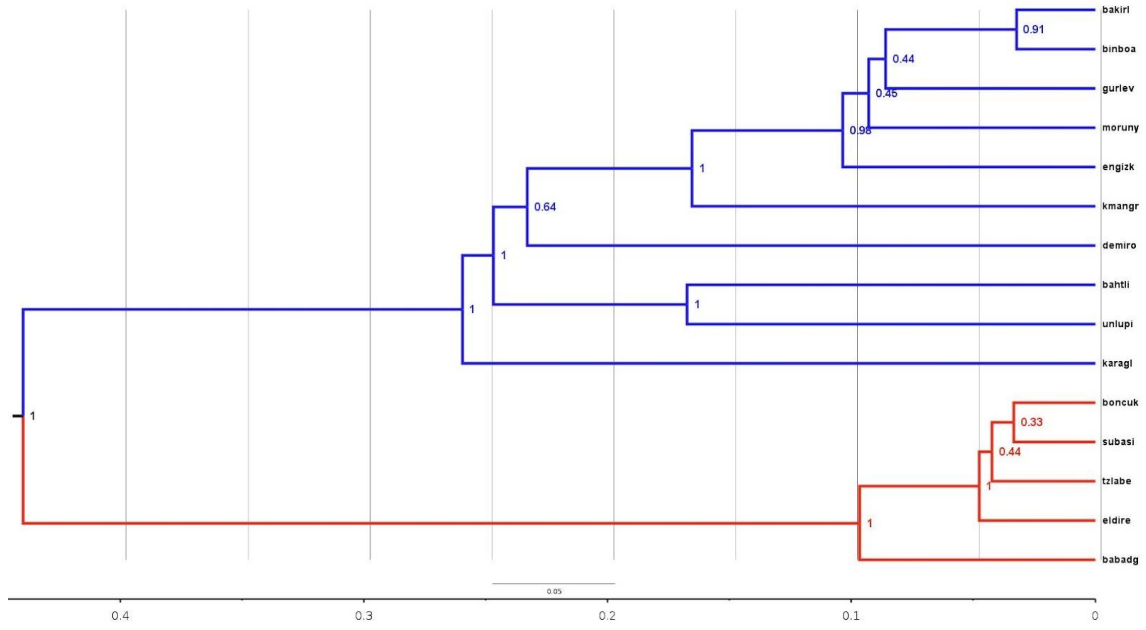
Şekil 4.12. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* popülasyonları ve parsimoni bilgi verici 50 lokus kullanılarak *Beast analizi sonucu elde edilmiş ve zamanla kalibre edilmiş popülasyon ağacı. Ardıl olasılık değerleri (pp) nodlarda gösterilmiştir. Mavi dallar “doğu”, kırmızı dallar “batı” popülasyonlarını göstermektedir. Ağacın altındaki zaman ölçeği milyon yıl olarak verilmiştir.



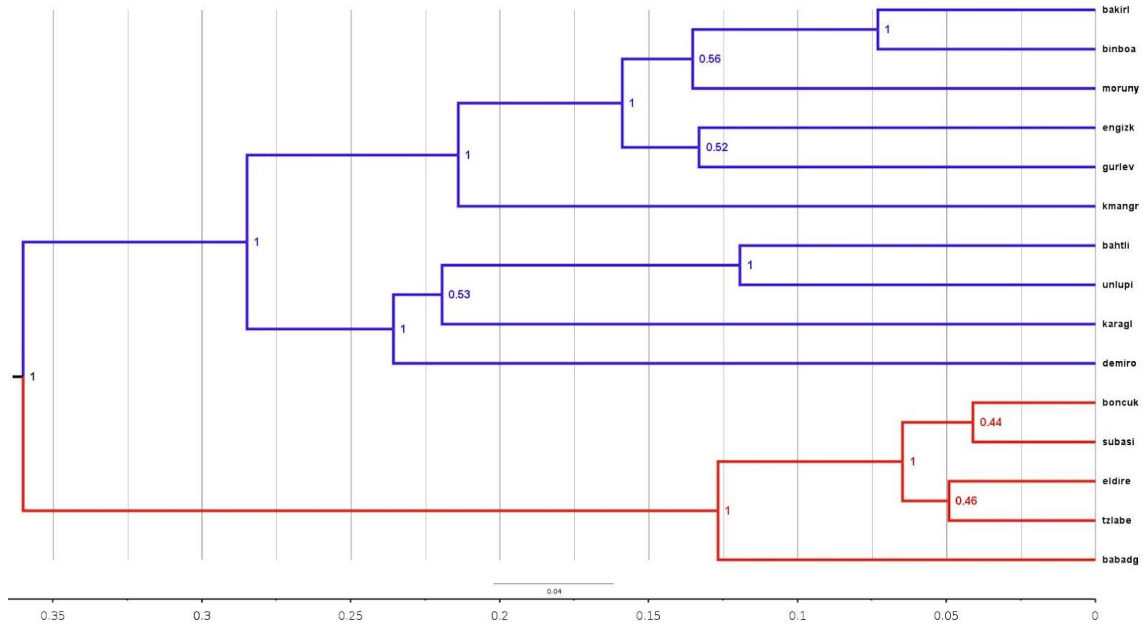
Şekil 4.13. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* popülasyonları ve parsimoni bilgi verici 50 lokus kullanılarak Beast analizi sonucu elde edilmiş popülasyon ağacı. Tüm soy ağacı seti (ince çizgiler) ve konsensüs ağaç (kalın mavi çizgiler) DensiTree programıyla görselleştirilmiştir.



Şekil 4.14. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* popülasyonları ve rastgele seçilmiş 50 lokus (veri seti bir) kullanılarak *Beast analizi sonucu elde edilmiş popülasyon ağacı. Ardıl olasılık değerleri (pp) nodlarda gösterilmiştir. Mavi dallar “doğu”, kırmızı dallar “batı” popülasyonlarını göstermektedir. Ağacın altındaki zaman ölçeği milyon yıl olarak verilmiştir.



Şekil 4.15. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* popülasyonları ve rastgele seçilmiş 50 lokus (veri seti iki) kullanılarak *Beast analizi sonucu elde edilmiş popülasyon ağacı. Ardıl olasılık değerleri (pp) nodlarda gösterilmiştir. Mavi dallar “doğu”, kırmızı dallar “batı” popülasyonlarını göstermektedir. Ağacın altındaki zaman ölçeği milyon yıl olarak verilmiştir.



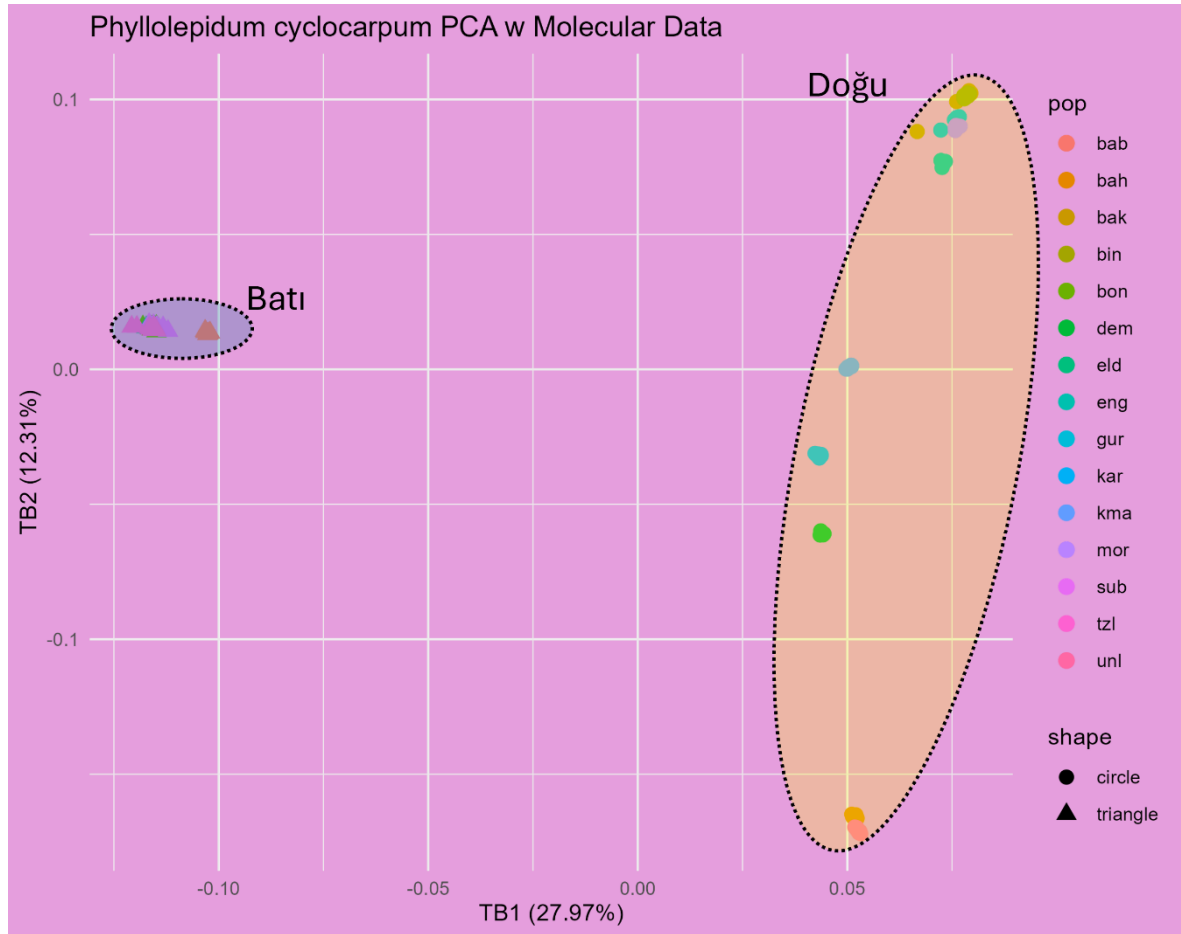
Şekil 4.16. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* popülasyonları ve rastgele seçilmiş 50 lokus (veri seti üç) kullanılarak *Beast analizi sonucu elde edilmiş popülasyon ağacı. Ardıl olasılık değerleri (pp) nodlarda gösterilmiştir. Mavi dallar “doğu”, kırmızı dallar “batı” popülasyonlarını göstermektedir. Ağacın altındaki zaman ölçeği milyon yıl olarak verilmiştir.

P. cyclocarpum'a ait moleküler veriler ile gerçekleştirilen filogenetik analizler incelendiğinde parsimoni bilgi verici lokuslar ve rastgele seçilen lokuslardan oluşan üç veri setine dayalı gerçekleştirilen analizlerde doğu ve batı farklılaşmasını ortaya koyan ağaç topolojilerinin tutarlı olduğu görülmektedir (Şekil 4.12-4.16). Filogenetik ağaçların internal nodları açısından da özellikle doğu kladında Sivas Gürlevik Dağı (gurlevik), Kayseri Bakırlı (bakirl) ve Binboğa Dağları (binboa), Kahramanmaraş Berit (moruny) ve Engizek Dağları'ndaki (engizek) popülasyonlar tüm analizlerde monofiletik bir subklad (alt klad) oluşturmuştur. Benzer bir şekilde taksonun en kuzey iki yayılış alanını temsil eden Gümüşhane, Kelkit, Ünlüpınar Köyü ile, Erzurum Bahtlı Dağı'ndaki popülasyonlar da tüm analizlerde monofiletik bir subklad oluşturmuşlardır. Bu durum, doğu popülasyonlarında belirgin bir coğrafi yapılanma olduğunu göstermektedir. Doğu popülasyonları arasında sadece Niğde Bolkar Dağları (karagl), Küçük Mangırcı Dağı (kmangr) ile Sivas Demirözü Köyü (demiro) popülasyonlarının yeri, farklı veri setleriyle gerçekleştirilen analizlerde değişmektedir.

4.4. Popülasyon Genetiği Çalışmaları

4.4.2. Temel Bileşenler Analizi (TBA - PCA)

Phyllolepidum cyclocarpum subsp. *cyclocarpum* popülasyonları için SNP verisi kullanılarak gerçekleştirilen TBA analizinin sonuçları Şekil 4.17’de verilmiştir.

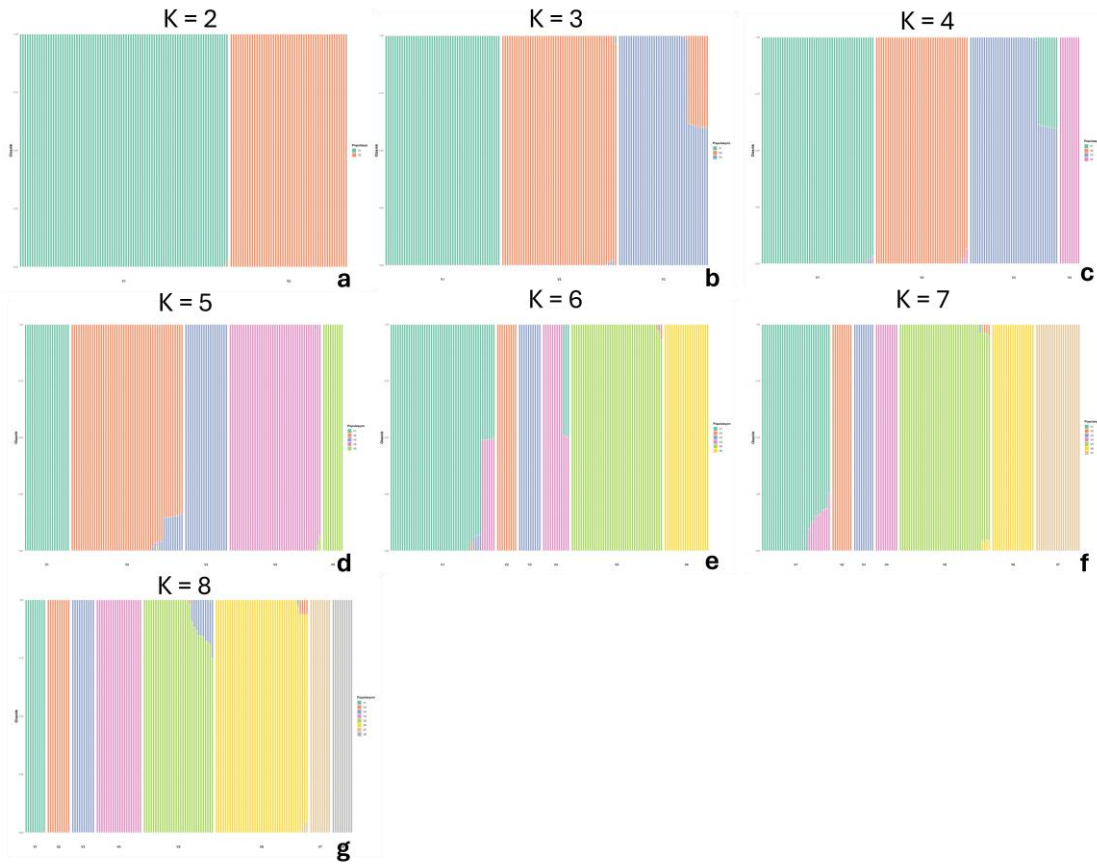


Şekil 4.17. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'un 15 farklı popülasyonu için SNP verisi (GL) kullanılarak elde edilen Temel Bileşenler Analizi (TBA). bab Babadağ, bah Bahtlı Dağı, bak Bakırlı Dağ, bin Binboğa Dağları, bon Boncuk Dağı, dem Demirözü Köyü, eld Eldirek Dağı, eng Engizek Köyü, gur Gürlevik Dağı, kar Karadağ, kma Küçük Mangırcı Vadisi, mor Berit Dağı Morun Yatağı, sub Subaşı Yaylası, tzl Tuzlabeli, unl Ünlüpınar Köyü popülasyonlarını temsil etmektedir.

Phyllolepidum cyclocarpum subsp. *cyclocarpum*'a ait 15 farklı popülasyon için SNP verisinden elde edilen Temel Bileşenler Analizi beklenildiği üzere doğu ve batı popülasyon gruplarını birbirinden belirgin bir şekilde ayırmıştır. TB1, %27'lik oranla genetik Batı popülasyon grubu ile ilgili bu durumu destekleyecek morfolojik çalışmalar Şekil 4.4'te yer almakta olup, bu popülasyon grubunun yeni bir taksona karşılık gelme ihtimali söz konusudur.

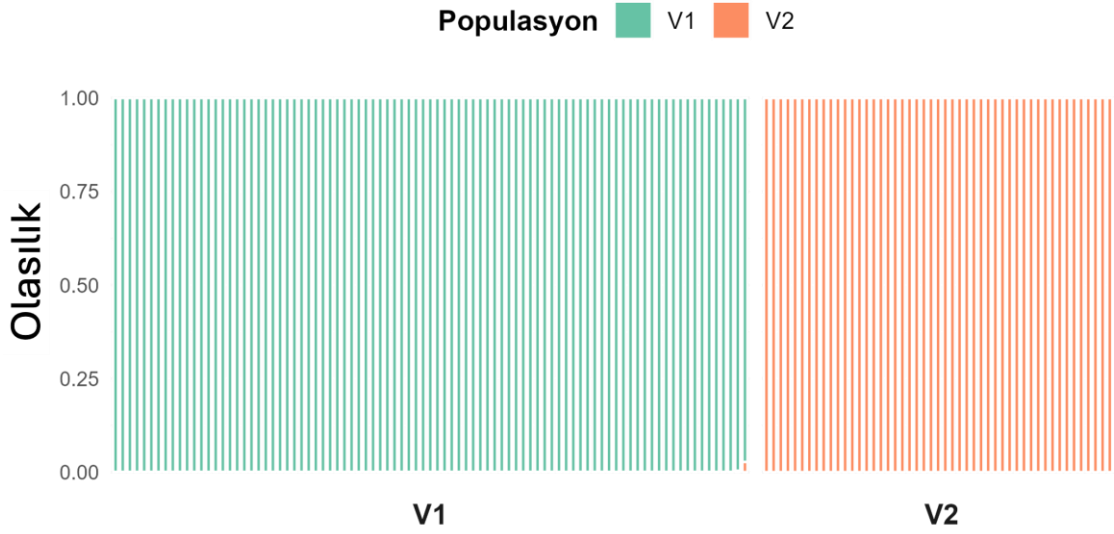
4.4.1. Karışım Analizi (Admixture)

Karışım analizlerinde çalışılan tür için atasal popülasyonların sayıları 2-8 arasında test edilmiştir.



Şekil 4.18. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* bireylerine ait Karışım Analizi. Atasal popülasyonlar; a, b, c, d, e, f, g grafikleri için sırasıyla K 2'den 8'e kadar hesaplanıp 7 grafik oluşturulmuştur. Tüm grafiklerdeki her bar bir bireyi, her renk bir popülasyonu temsil etmektedir.

Admixture Analizi (K=2)



Şekil 4.19. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'a ait ve atasal popülasyon, K 2 olarak hesaplanan karışım analizi sonucu. Her bir bar bir bireyi, her renk bir popülasyonu temsil etmektedir.

Phyllolepidum cyclocarpum subsp. *cyclocarpum* için NGSAdmix programı atasal popülasyon olarak K 2 önermiştir. Analiz sonucu Şekil 4.19'da görülmekte olup şekilde yeşil renk doğu, turuncu renk ise batı popülasyonlarını temsil etmektedir. Kayseri, Bakırlı Dağı'ndaki istisnai bir birey dışında iki popülasyon grubu arasında herhangi bir karışım görülmektedir. Bu durum da her iki popülasyon grubu arasında uzun süredir herhangi bir gen akışı olmadığı ve popülasyonların birbirlerinden ciddi ölçüde farklılaştığı şeklinde yorumlanabilir.

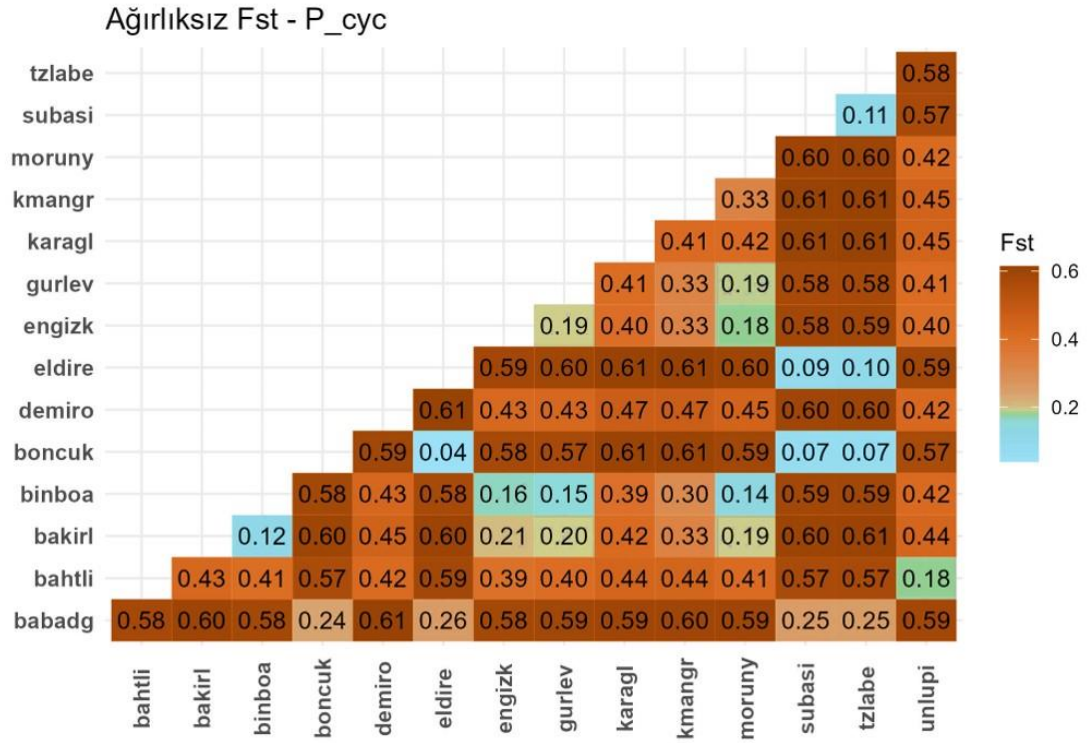
Evanno ve arkadaşları (2005), ΔK değerinin veri setindeki genetik kümeleşmenin (K) en ideal sayısını belirlemek için kullanıldığını açıklamıştır. K değeri, Şekil 4.18'de verilen 2 ile 8 arasındaki her bir K değerinin logaritmik olasılığındaki değişim oranından (ΔK) türetilmiştir. Analizde, ΔK , önerilen yöntemeye dayalı olarak bir veri setinde genetik kümelerin (K) en olası sayısını belirlemek için kullanılan bir istatistiktir. Daha yüksek ΔK değerleri, genetik verilerin kümeleşme yapısının daha belirgin olduğunu gösterir. Bu da ideal kümeleşmenin belirli bir K değeri etrafında olduğunu ve bu değer optimal veya optimale yakın olduğunu gösterir.

Alexander ve arkadaşları (2009) karışım analizi yaparken temel bileşenler analizi ile birlikte sağlama yapılmasını önermiştir. Karışım analizi, verilerdeki atasal popülasyonun kümelenmesine odaklanırken, temel bileşenler analizi, popülasyonlar arasındaki varyasyonu (SNP ya da genotip olasılıkları) açıklar.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen karışım analizi atasal popülasyonu K 2 olarak tespit etmiştir ve iki popülasyon grubu neredeyse ayrılmıştır (Şekil 4.19). Aynı şekilde SNP verilerini kullanan TBA da doğu ile batı arasındaki belirgin bir ayrım yakalamıştır (Şekil 4.17).

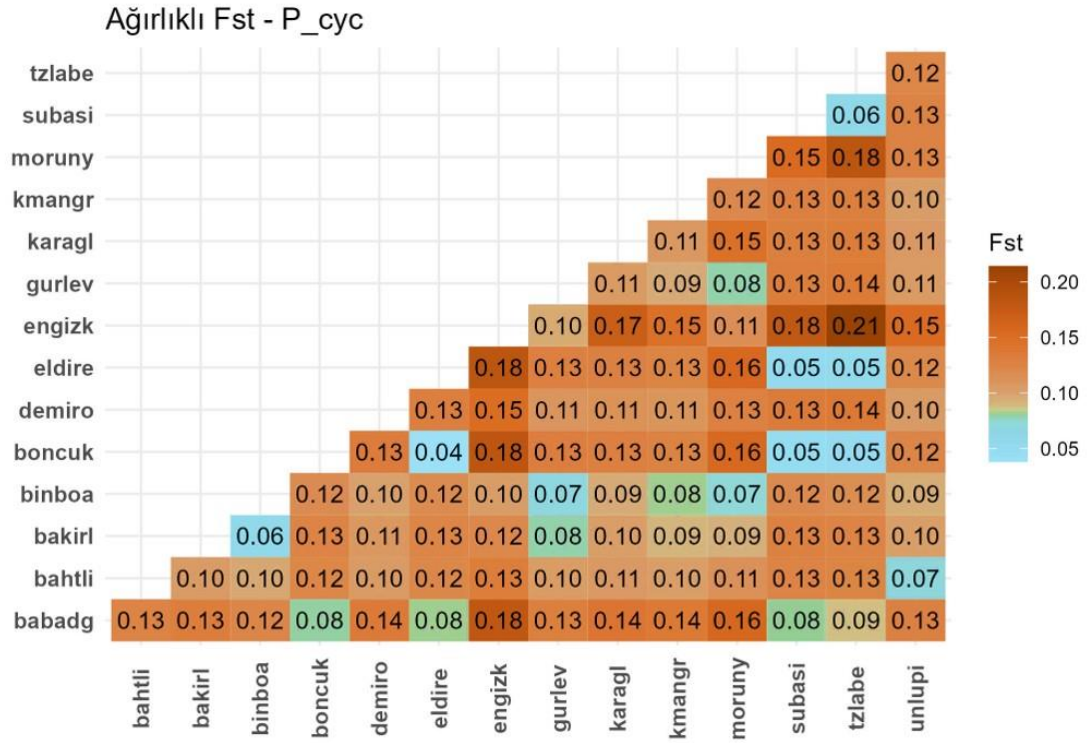
4.4.3. Popülasyon İçi ve Popülasyonlar Arası Genetik Çeşitlilik

Çalışılan takson için popülasyon içi ve arası genetik çeşitlilikler ayrı ayrı hesaplanmıştır. Popülasyonlar arası ve içi genetik çeşitliliğin bir ifadesi olan F_{st} değerleri ısı haritası (heatmap) grafiği ile Şekil 4.20 ve 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.20. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* popülasyonları için ağırlıksız Fst analiz sonuçları. 0-1 arasında değişen değerlerden; 0: genetik benzerliğin yüksek olduğunu, 1: herhangi bir genetik benzerlik olmadığını bildirmektedir.

Grafikte ağırlıksız Fst değerleri maviden kahverengiye geçildikçe genetik farklılığın arttığını göstermektedir. Doğu ile batı popülasyonları arasında ağırlıksız Fst değeri 0,57 ile 0,61 arasında değişmektedir. Doğu popülasyonları kendi aralarında 0,12 ile 0,45 arasında oldukça yüksek bir aralıkta değişkenlik göstermektedir. Batı popülasyonları kendi içinde 0,04 ile 0,26 arasında değişmekle beraber Babadağ popülasyonu 0,24 ile 0,26 arasında değişen popülasyon içi en farklılaşmış olan popülasyondur. Ancak geriye kalan Subaşı, Tuzlabeli, Eldirek, Boncuk popülasyonları kendi içlerinde 0,04 ile 0,11 değerleri arasında değişen değerlere sahip olup genetik benzerliğin oldukça yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 4.21. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* popülasyonları için ağırlıklı Fst analiz sonuçları. 0-1 arasında değişen değerlerden; 0: genetik benzerliğin yüksek olduğunu, 1: herhangi bir genetik benzerlik olmadığını bildirmektedir.

Grafikte ağırlıklı Fst değerleri maviden kahverengiye geçildikçe genetik farklılığın arttığını göstermektedir. Doğu ile batı popülasyonları arasında ağırlıklı Fst değeri 0,12 ile 0,21 arasında değişmektedir. Batı popülasyonları kendi içinde 0,04 ile 0,09 arasında değişmektedir. Doğu popülasyonları kendi içlerinde değerlendirildiğinde, 0,06 ile 0,17 arasında değişkenlik göstermektedir. Ağırlıksız Fst değerlerinde popülasyon içinde genetik farklılığı diğerlerine göre yüksek çıkan Babadağ popülasyonu, diğer batı popülasyonları 0,04 ile 0,06 arasında değişirken 0,08 ile 0,09 değerleri arasında değişkenlik göstermektedir.

Pluess ve Stöcklin (2004)'in yaptığı çalışmada, 2000-3000 metreler arasında yaşayan alpin bitkilerin genetik çeşitliliğinin alçak irtifa bitkilerine göre daha az olduğu belirtilmiştir. İkili popülasyon Fst değerleri arasında (0,02 ila 0,45 arasında değişen) önemli farklılıklar gözlemlenmemiş olması, bu bitkilerde rastgele genetik sürüklenmenin etkili olduğunu göstermektedir. Çalışmada ayrıca, *Geum reptans* türünün tohumlarının uzun mesafelere dağıldığı, dolayısıyla yüksek dispersal kapasitesine sahip olduğu vurgulanmıştır. Bu

bulgular, alpin bitkilerin geniş dispersal kapasitesine rağmen genetik çeşitliliğinin düşük olduğunu ve genetik sürüklenmenin bu bitkilerde belirleyici bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

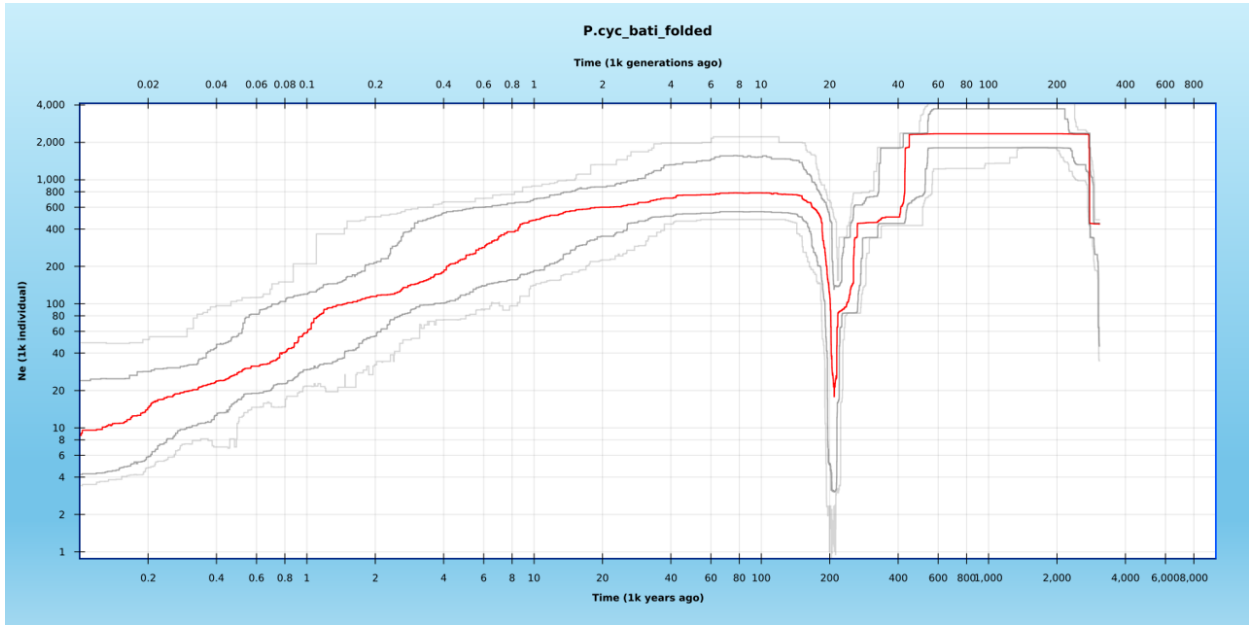
Buna karşılık olarak, *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* üzerinde yapılan çalışmalar, bu alpinik bitkinin kanatlı tohum yapısı sayesinde yüksek dispersal kapasitesine sahip olduğunu, Anadolu diyagonali gibi bir coğrafi izolasyon üzerinde yetişmesi ve bu nedenle genetik çeşitliliğinin yüksek olabileceğini düşündürmektedir. Pluess ve Stöcklin'in bulguları, alpin bitkilerin genetik çeşitliliğinin genellikle düşük olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, *P. cyclocarpum*'un genetik çeşitliliği, Pluess ve Stöcklin'in genetik sürüklenme ve düşük çeşitlilik bulgularına kıyasla farklılık göstermektedir.

Wright (1978)'a göre F_{st} değerleri üzerinden genetik farklılaşma seviyeleri çok yüksek ($>0,25$), yüksek (0,15-0,25), orta (0,05-0,15) ve farklılaşma yok denecek kadar az (0,00-0,05) olmak üzere dörde ayrılmıştır (Wu ve ark., 2023). Bu tezde sonucu alınan ağırlıksız F_{st} değerleri doğu ve batı popülasyonları arasında çok yüksek (0.57-0.61) olarak yorumlanırken, Doğu popülasyonları kendi içinde orta, yüksek ve çok yüksek genetik farklılaşma (0.12-0.45), Batı popülasyonları ise, diğer batı popülasyonlarıyla düşük ve orta, yüksek ve çok yüksek genetik farklılaşmaya sahiptir (0.04-0.26). Ancak Babadağ popülasyonu dışında oldukça düşük ve orta genetik farklılaşma seviyelerine sahiptir (0.04-0.11). Ağırlıklı F_{st} değerleri incelendiğinde ise, popülasyonlar arası orta ve yüksek genetik çeşitlilik içerirken, Doğu popülasyonu içinde, orta ve yüksek genetik çeşitlilik, Batı popülasyonları ise, orta seviyede genetik çeşitlilik içerdiği söylenebilir.

SNP verileri ile gerçekleştirilen analizler için genel bir değerlendirme yaptığımızda TBA ve karışım analizleri ile belirgin bir şekilde iki gruba ayrılan doğu ve batı popülasyonları arasında hesaplanan oldukça yüksek F_{st} değerleri bu popülasyon grupları arasında belirgin bir genetik farklılaşma olduğunu işaret etmektedir.

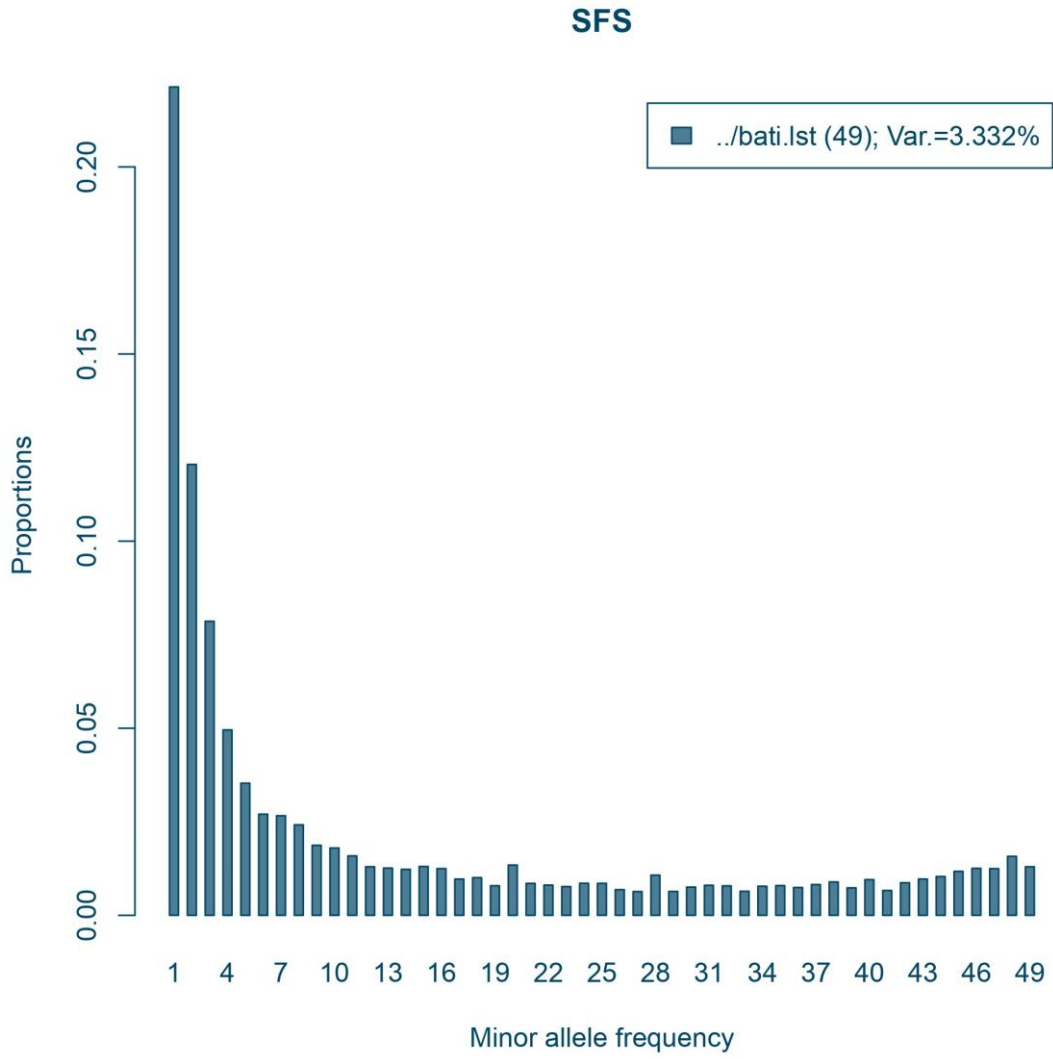
4.5. Demografik Analizler

Phyllolepidum cyclocarpum subsp. *cyclocarpum*'un sırasıyla batı, doğu ve tüm popülasyonlarına ait etkin popülasyon büyüklüklerindeki dalgalanmaları Şekil 4.22, 4.24 ve Şekil 4.26'da gösterilmiştir.



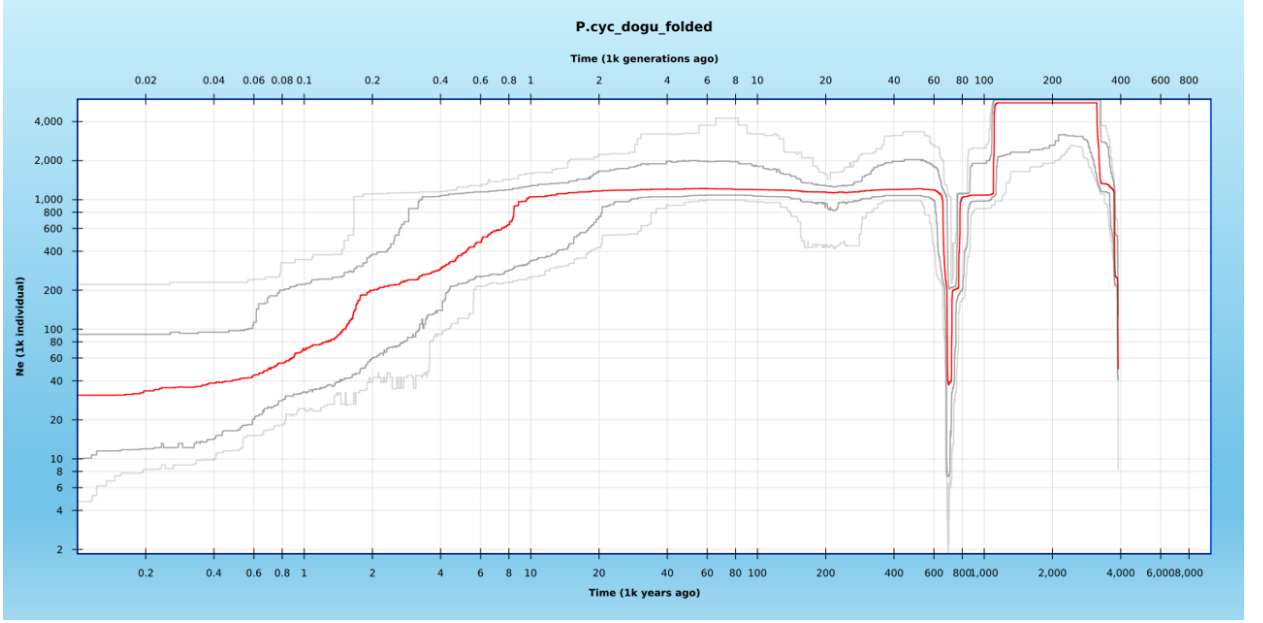
Şekil 4.22. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'un batı popülasyonlarına ait etkin popülasyon büyüklüğünün (N_e) zamana bağlı değişimi. X eksenini 1000 yıl ölçeğinde zamanı, Y eksenini ise popülasyon büyüklüğünü göstermektedir. Kırmızı çizgi N_e 'nin medyan değerini, gri çizgiler ise N_e 'nin sırasıyla 2,5 ve 97,5 yüzdeleri dilimlerini temsil etmektedir.

Şekil 4.22'ye göre Batı popülasyonları 200 bin yıl önce önemli bir daralma-genişleme yaşayıp 20 bin yıl öncesine kadar aşağı yukarı sabit kalmıştır. 20 bin yıl öncesinden günümüze doğru ise bu popülasyon grubunun etkin popülasyon büyüklüğünde belirgin bir şekilde azalma görülmektedir.



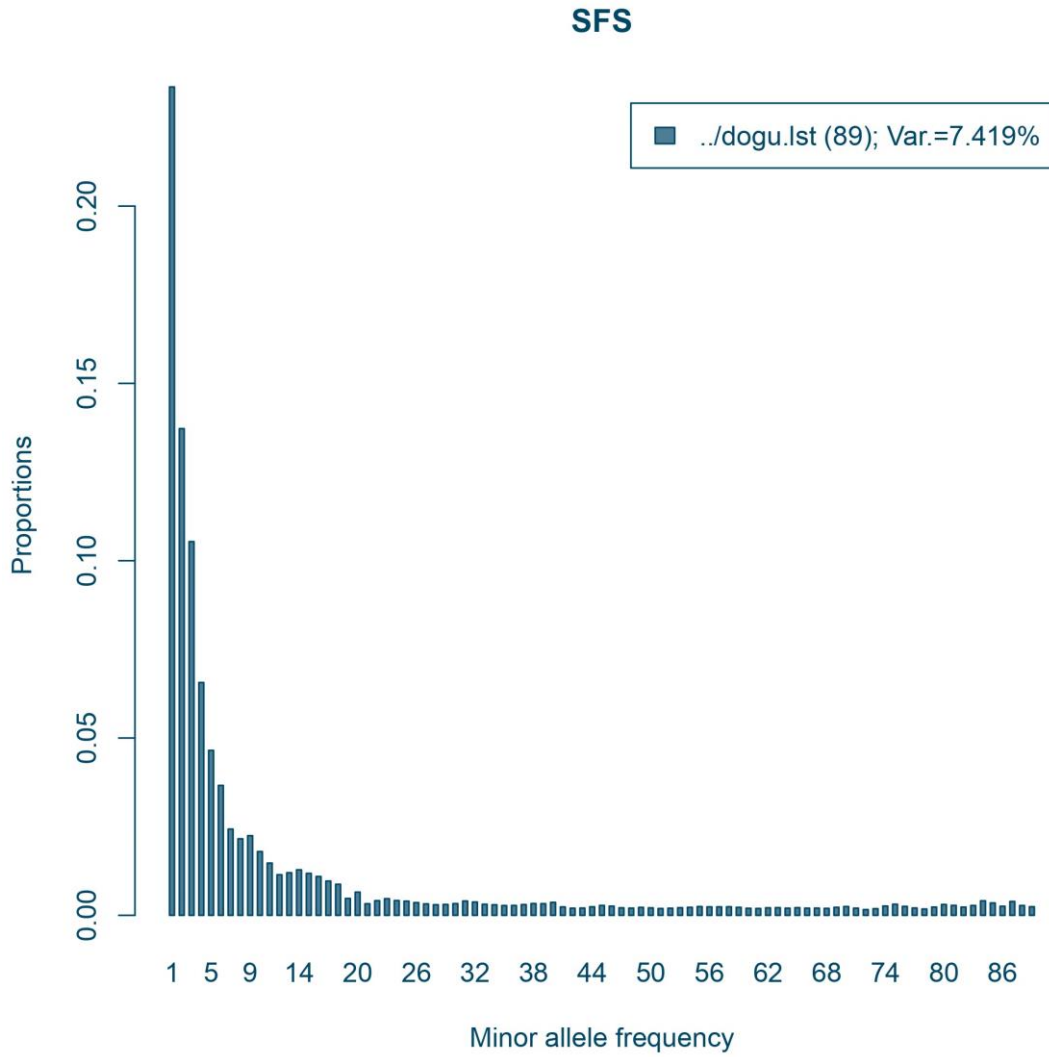
Şekil 4.23. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'un batı popülasyonlarına ait Minör Alel Frekans Spektrumu (folded SFS).

Şekil 4.23'te bulunan MAF grafiğine göre, düşük frekanslı alellerin oranının fazla, yüksek frekanslı alellerin ise düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca, MAF grafiğinde 10-49 arasına bakıldığında; yüksek frekanslı alellerin düşük olması, popülasyondaki genetik çeşitliliğin belirli alellerde odaklandığını göstermektedir. Grafik incelendiğinde, düşük frekanslı alellerin fazlalığı, popülasyonun yakın zamanda genişlediğini veya bir dar boğazdan geçtiğini göstermektedir. Sonuç olarak, şekilde yer alan SFS yüksek genetik çeşitlilik içerir ve popülasyonun uyum sağlama potansiyelinin yüksek olduğunu gösterir.



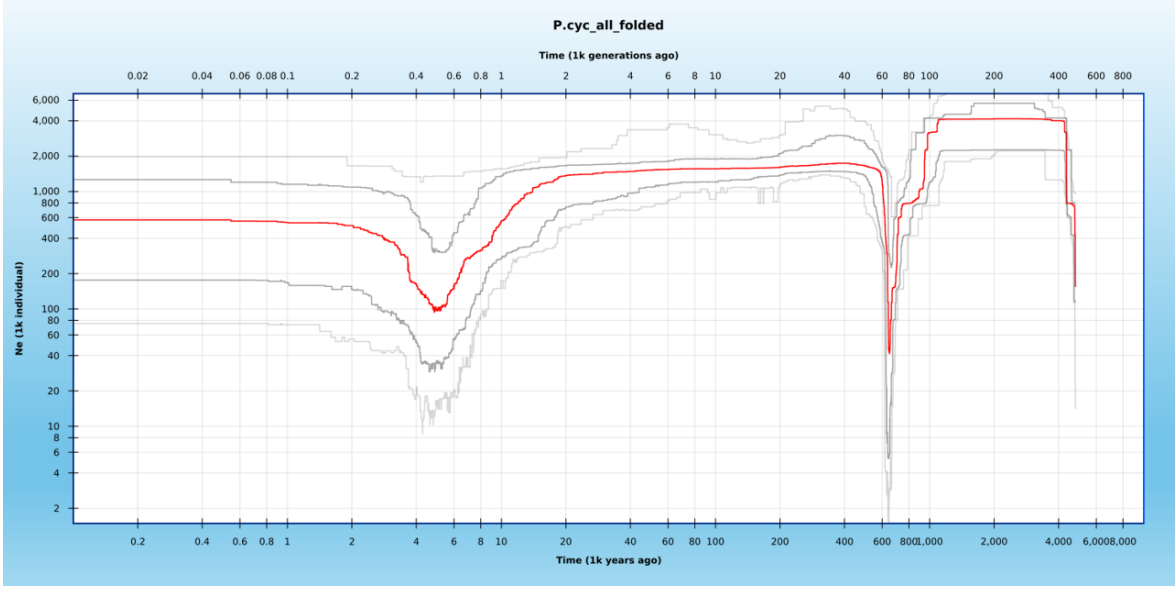
Şekil 4.24. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cylocarpum*'un doğu popülasyonlarına ait etkin popülasyon büyüklüğünün (N_e) zamana bağlı değişimi. X eksenini 1000 yıl ölçeğinde zamanı, Y eksenini ise popülasyon büyüklüğünü göstermektedir. Kırmızı çizgi N_e 'nin medyan değerini, gri çizgiler ise N_e 'nin sırasıyla 2,5 ve 97,5 yüzdalık dilimlerini temsil etmektedir.

Doğu popülasyonlarında ise eski tarihli daralma daha geriye, 700 bin yıl öncesine gitmekte, son daralma ise medyan değeri 10 bin yıl olmak üzere, yine 20 bin yıl öncesinden günümüze doğru sürmektedir (Şekil 4.24).



Şekil 4.25. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'un doğu popülasyonlarına ait Minör Alel Frekans Spektrumu (folded SFS).

Şekil 4.25'te bulunan MAF grafiğine göre, batı popülasyonda olduğu gibi düşük frekanslı aleller fazla, yüksek frekanslı alellerin oranı düşüktür. Dolayısıyla doğu popülasyonu da yakın zamanda bir büyüme ya da seleksiyon yaşamıştır. Ayrıca, MAF grafiğinde 21-89 arasına bakıldığında; yüksek frekanslı alellerin düşük olması, popülasyondaki genetik çeşitliliğin belirli alellerde odaklandığını göstermektedir. Grafik incelendiğinde, düşük frekanslı alellerin fazlalığı, popülasyonun yakın zamanda genişlediğini veya bir dar boğazdan geçtiğini göstermektedir. Sonuç olarak, şekilde yer alan SFS yüksek genetik çeşitlilik içerir ve popülasyonun uyum sağlama potansiyelinin yüksek olduğunu gösterir.



Şekil 4.26. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'un tüm popülasyonlarına ait etkin popülasyon büyüklüğünün (N_e) zamana bağlı değişimi. X eksenini 1000 yıl ölçeğinde zamanı, Y eksenini ise popülasyon büyüklüğünü göstermektedir. Kırmızı çizgi N_e 'nin medyan değerini, gri çizgiler ise N_e 'nin sırasıyla 2,5 ve 97,5 yüzdelik dilimlerini temsil etmektedir.

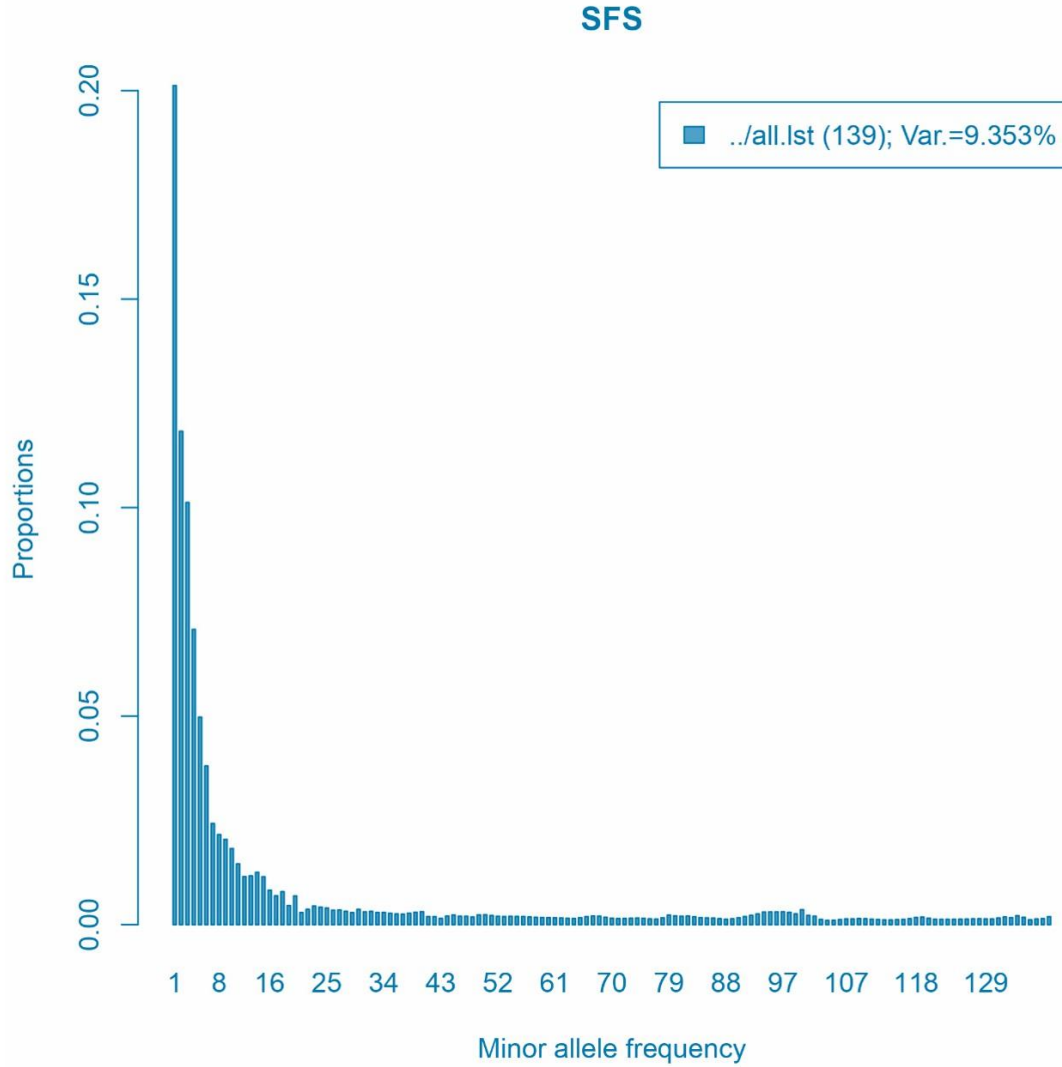
Şekil 4.26'ya göre tüm popülasyonlarla yapılan analizde etkin popülasyon büyüklüğünde 650 bin yıl öncesi için önemli bir daralma-genişleme olayı görülmektedir. Bir sonraki daralma ise 10 bin yıl öncesinde başlayıp 5 bin yıl öncesinde biterek günümüze kadar önce bir genişleme yaşamış sonrasında ise sabit kalmıştır.

Sonuç olarak Stairway Plot 2 ile yapılan demografik analizlerde demografik daralma ve genişlemeler doğu ve batı popülasyonları açısından değerlendirilmiştir. Doğu popülasyonlarında birincisi yaklaşık 700 bin yıl önce, diğeri ise yaklaşık 10 bin yıl önce başlayan iki ana daralma dönemi görülmektedir: Bu popülasyon grubunda batı popülasyon grubunda olduğu gibi, birçok alelin düşük frekanslarda bulunduğu tespit edilmektedir. Geçmişte yaşanan popülasyon daralmaları, gen havuzunda düşük frekanslı alellerin birikmesine yol açmaktadır. Saavedra ve Cordero (2024)'un yaptıkları çalışmada, daralma ve genişleme döngülerinin, gen havuzunda düşük frekanslı alellerin birikimine yol açabileceği bulunmuştur. *Ruditapes decussatus* popülasyonları üzerine yapılan araştırmada, geçmişteki popülasyon daralmaları ve ardından gelen genişlemeler nedeniyle düşük frekansta birçok alelin bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, özellikle Doğu Akdeniz

popülasyonlarında belirgin olup, düşük heterozigotluk ve yüksek sayıda düşük frekanslı alellerin varlığı ile açıklanmaktadır. Bu bulgular, Pleistosen dönemi buzul-buzullar arası döngülerinin genetik çeşitlilik üzerindeki etkisini göstermektedir (Saavedra ve Cordero, 2024). Dolayısıyla, doğu popülasyonu daralma yaşarken, bazı aleller kaybolmuş olabilir veya düşük frekanslarda kalmaya devam edebilir (Allendorf ve Luikart, 2006). Bu da SFS grafiğinde görüldüğü üzere düşük frekanslı alellerin yoğunluğuna neden olmaktadır. Ayrıca tüm popülasyon gruplarına ait demografik analiz yaklaşık 13 bin yıl önce, erken Dryas devrinden sonra etkin popülasyon büyüklüğünde büyük bir düşüş (Ne yaklaşık 2 milyondan 40 bine düşmüştür) yaşandığını göstermektedir. Bahsedilen daralmalar, düşük frekanslı alellerin popülasyonda birikmesine ve yüksek frekanslı alellerin azalmasına neden olmuştur. Sonuç olarak, tezin hipotezlerinden biri olan türün geçmişinde iklim değişikliklerine bağlı olarak farklı periyotlarda popülasyon genişlemesi ve daralması yaşadığı gösterilmiştir.

Her ne kadar güney kesimleri hariç Avrupa Alplerinde buzul dönemleri için buzullaşmaların etkisi ile türlerin yayılış alanını küçülttükleri, buzul dönemi sonrasında ise yayılış alanlarını büyüttükleri iyi bilinen bir olgu olsa da bu bölge dışında kalan coğrafyalardaki alpinik bir türün havalar ısındığında yayılış alanını genişletmesi beklenir (Ansell ve ark., 2011; Ehlers, Gibbard ve Hughers, 2011; Guerrina ve ark., 2021). Anadolu'da bitkilerle gerçekleştirilen diğer çalışmalarda da bu durum *Vavilovia formasa* (Steven) Fed., *Noccaea iberidea* (Boiss.) Al-Shehbaz & Menke gibi bitkilerde gösterilmiştir (Smýkal ve ark., 2017; Özüdoğru ve ark., 2020). Demografik analizlerden elde edilen sonuçlar da bu senaryoyla genel olarak uyumlu olup, buzullararası dönemlerde *P. cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'un popülasyonlarının etkin popülasyon büyüklüklerini arttırdıkları görülmektedir. Ancak popülasyon genişlemesi alpin kuşak etrafında lokal yaşam alanlarında oluşan parçalı bir ağ şeklinde de olabilir. Bu durum özellikle Güney Anadolu'nun daha nemli kıyı Toros Dağları'nda muhtemeldir (Ansell ve ark., 2011). Bu bölgelerdeki türler Pleistosen dönemi iklimsel dalgalanmalarına kuzey enlemlerindeki türler gibi tepki vermeyip, lokal hareketlerle olumsuz koşullardan korunabilmektedirler (Özüdoğru ve ark., 2022). Alplerdeki çok az sayıdaki çalışma (özellikle güney Alplerde) da benzer sonuçlar ortaya koyup, bu bölgelerdeki bitkilerin geç Kuvaterner dönemi buzullaşmalarından in sitü sığınaklar ya da çok kısa mesafe yayılış alanı değişiklikleriyle korunduklarını göstermiştir (Patsiou ve ark., 2014; Casazza ve ark., 2016). Avrupa Alplerinin geri kalanı için hiçbir zaman kanıtlanamamış bu olgu, Anadolu'nun güney kesimleri gibi Akdeniz iklimi etkisi altında kalan İber yarımadası türleri için ise bazı

çalışmalarla desteklenmiş olup, (Martín-Bravo ve ark., 2009; Peredo ve ark., 2009) Akdeniz kuşağı alpinik türlerinin kuzey enlemlerinde görülen klasik buzul dönemi daralma-genişleme modeline uymadığını göstermektedir.



Şekil 4.27. *Phyllolepidum cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'un doğu popülasyonlarına ait Minör Alel Frekans Spektrumu (folded SFS).

Son olarak taksonomik bakış açısı ile *P. cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'un doğu ve batı popülasyonları değerlendirildiğinde ise, moleküler düzeyde hem lokuslarla gerçekleştirilen filogenetik analizler hem de SNP verisi ile gerçekleştirilen TBA ve karışım analizleri ile iki popülasyon grubu arasında hesaplanan yüksek F_{st} değerleri, bu popülasyon grupları arasında belirgin bir farklılaşmayı ortaya koymuştur. Bu farklılık morfolojik ölçümlere dayalı olarak

gerçekleştirilen TBA analizinde de bir ölçüde gösterilmiştir. Ayrıca batı popülasyonlarının kısa ve kompakt görünümlü genel habitusu, yapraklarının kısalığı ve tohumlarındaki geniş kanat yapısı gibi morfolojik farklılıklar, iki popülasyon grubunun farklı iki taksona karşılık gelmesi gerektiğini işaret etmektedir. Türün tip örneğinin Munzur Dağları, yani doğu popülasyon grubuna ait olduğu düşünüldüğünde, batı popülasyon grubunun yeni bir takson olması sonucu ortaya çıkmaktadır. Ancak bu taksonun alt tür ya da tür seviyesinde tanımlanması sonucuna mevcut verilerle ulaşmak mümkün değildir, çünkü gerçekleştirilen çalışma sadece *P. cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'a ait örnekler içerip, ne türün diğer alttürü olan *P. cyclocarpum* subsp. *pindicum*, ne de *Phyllolepidum* cinsinin ikinci türü olan *P. rupestre*'ye ait örnekler içermektedir. *P. cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* ve *P. cyclocarpum* subsp. *pindicum* için diyagnostik karakterler subsp. *cyclocarpum*'da meyve tüsüz, tohum kanadı ise 0.2-0.3 mm iken, subsp. *pindicum*'da meyvenin kısa tüylü, tohum kanadının ise 0.1 mm'ye kadar olmasıdır (Hartvig, 1986). Bu tez kapsamında çalışılan popülasyon gruplarından her ikisinde de meyve tüsüzken, doğu popülasyon grubunda tohum kanadı 0.4 mm'ye kadar, batı popülasyonlarında 0.6-0.7 mm civarındadır. Buradaki ilginç nokta ise, bahsi geçen diyagnostik karakterler çıkarılırken kullanılan *P. cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* örneklerinin günümüzde *P. rupestre* altında değerlendirilen Yunanistan örnekleri olmasıdır. *P. rupestre* ve *P. cyclocarpum* subsp. *pindicum*'a ait bilinen tek moleküler çalışma ise Cecchi 2011'deki ITS dizilerine dayanmakta olup, kanımızca Türkiye'deki *P. cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum*'a ait batı ve doğu popülasyonlarına ait ITS dizilerinin kullanılması ile batı popülasyonlarının taksonomik durumu netleşebilir.

5. YORUM

Yirminci yüzyılın başlarından beri, ekosistemlerin karmaşık çeşitliliğini ve dağılımını anlamak adına yoğun araştırmalar hala devam etmektedir; bu çalışmalar, dünyanın her yerinde farklı ekosistemlerdeki türlerin popülasyon dinamikleri, genetik yapıları ve evrimsel geçmişleri gibi canlılık adına önemli bileşenleri ele alarak biyoçeşitliliğin temel mekanizmalarını açığa kavuşturmayı hedeflemektedir. Bu mekanizmalar; genetik, tür ve ekosistem çeşitliliğinden ibaret olup genel olarak herhangi bir takson içindeki gen farklılığı ve belli bir coğrafi alandaki takson sayısı ile ölçülebilmektedir. Ancak, ekosistem çeşitliliği sadece taksonlarla değil, aynı zamanda ilgili coğrafyanın evrimiyle de alakalıdır. Coğrafyanın evrimi, jeolojik ve iklimsel değişimler gibi doğal süreçlerle beraber doğal

olmayan etmenlerle de şekillenir. Bu süreçler, biyoçeşitliliğe pozitif veya negatif etki etmektedir. Negatif etkilere, organizmanın yaşadığı habitatın bozulması, göç yollarının kesilmesi veya kirlilik gibi örnekler verilirken; pozitif etkilere allopatri örnek verilebilir. (Demirayak, 2002; Clarke, 2007). Allopatrik türleşme, türlerin: dağ oluşumu, kıtaların ayrılması, coğrafik izolasyonların oluşması gibi jeolojik olaylar ilgili popülasyonu ayırarak zamanla gen akışını engeller. Dolayısıyla, farklı coğrafyalar ve farklı adaptasyonlar arasında türleşme zamanla oluşabilmektedir. Bu açıdan bakıldığında; Anadolu coğrafyası, özellikle coğrafi izolasyonlarla türlerin içinde farklılıklar oluşmasını sağlarken aynı zamanda evrimsel süreçlerin de şekillenmesine olanak verir. Bu duruma için önemli örnekler ise Anadolu Diyagonali'ni oluşturan Toros Dağları ve Kuzey Anadolu Dağları olabilir (Hoskin ve ark., 2005; Gür, 2017).

Çalışma kapsamında ele alınan *P. cyclocarpum* subsp. *cyclocarpum* için gerçekleştirilen yüksek çözünürlüklü DNA verisine dayalı filogenetik ve popülasyon genetiği analizleri ile yayılışı Toros ve Anadolu Diyagonali dağları olan bir tür ilk defa bu kapsamda ele alınmıştır. Sonuç olarak sınırlı sayıda çalışma ile ele alınmış ve kısıtlı bilgi sahibi olduğumuz Anadolu bitkilerinin Pleistosen dönemi iklimsel dalgalanmalarına verdikleri yanıtlar (popülasyon genişlemeleri ve daralmaları) bu takson özelinde detaylı bir şekilde ele alınmış ve gelecekte yapılacak çalışmalar için önemli bir ön çalışma ortaya konulmuştur. Karmaşık bir jeolojik tarihçe ve bununla ilişkili iklimsel heterojenliğe sahip bir coğrafya olan Anadolu'da, özellikle dağlık alanlarda gerçekleştirilecek gelecek dönem çalışmalarının Anadolu'nun Avrupa'da çok sayıda çalışma ile gösterilmiş örüntülerden daha farklı tarihsel biyocoğrafik örüntülere sahip olduğunu ve biyolojik çeşitliliğimizin geri planında yatan tarihsel süreçleri anlamamızı kolaylaştıracağı açıktır.

6. KAYNAKLAR

- Alexander, D. H., Novembre, J., ve Lange, K., Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome research*, 19(9), 1655–1664 (2009).
- Allendorf, F. ve Luikart, G., *Conservation and genetics of populations*, Blackwell Publishing (2006).
- Al-Shehbaz, I.A., A generic and tribal synopsis of the Brassicaceae (Cruciferae). *Taxon*, 61: 931-954. (2012).
- Andrews, K., Good, J., Miller, M., Luikart, G., Hohenlohe, P., Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature reviews. Genetics*. 17 (2016).
- Andrews, S. FastQC, version 0.11.9. Babraham Bioinformatics, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (2010).
- Atalay, I., Palaeosoils as indicators of the climatic changes during Quaternary period in S. Anatolia, *Journal of Arid Environments*. 32, 23-35 (1996).
- Atalay, İ., Efe, R., *Türkiye Biyocoğrafyası*. İzmir: META Basım matbaacılık hizmetleri (2015).
- Avcı, M., The floristic regions of Turkey and a geographical approach for Anatolian Diagonal, *Review of the Department of Geography University of İstanbul*. 3, 59-91 (1996).
- Avice, J.C., *Phylogeography*. Cambridge: Harvard University Press (2000).
- Bailey, C.D., Koch, M.A., Mayer, M., Mummenhoff, K., O'Kane, S.L., Jr, Warwick, S.I., Windham, M.D., Al-Shehbaz, I.A., Toward a global phylogeny of the Brassicaceae. *Molecular biology and evolution*. 23(11), 2142–2160 (2006).
- Baird, N.A., Etter P.D., Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A., Selker, E.U., Cresko, W.A., Johnson, E.A., Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS One*. 3 (10) (2008)
- Barthlott, W., Mutke, J., Rafiqpoor, M.D., Kier, G., Kreft, H, Global centers of vascular plant diversity, *Nova Acta Leopoldina*. 92, 61-83 (2005).

- Bouckaert, R., Vaughan, T.G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., Heled, J., Jones, G., Kühnert, D., De Maio, N., Matschiner, M., Mendes, F.K., Müller, N.F., Ogilvie, H.A., du Plessis, L., Poppinga, A., Rambaut, A., Rasmussen, D., Siveroni, I., Drummond, A.J., BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*. 15(4) (2019)
- Bouckaert, R.R., DensiTree: making sense of sets of phylogenetic trees, *Bioinformatics*. 1372-1373 (2010).
- BrassiBase, BrassiBase Morphology Tool, <https://brassibase.cos.uni-heidelberg.de/?action=traiplo> (Erişim Tarihi: 6 Nisan 2024)
- Casazza, G., Grassi, F., Zecca, G. and Minuto, L., Phylogeographic insights into a peripheral refugium: The importance of cumulative effect of glaciation on the genetic structure of two endemic plants. *PLoS One*. 11 (11) (2016).
- Cecchi, L., A reappraisal of *Phyllolepidum* (Brassicaceae), a neglected genus of the European flora, and its relationships in tribe Alyseae, *Plant Biosystems*. 145. 818-831 (2011).
- Clarke, H., Conserving Biodiversity in the Face of Climate Change, *Agenda*. 14 (2), 157-170 (2007).
- Comes, H.P., Kadereit, J.W., Spatial and temporal patterns in the evolution of the flora of the European Alpine System, *Taxon*. 52, 451-462 (2003).
- Comes, H.P., Kadereit, J.W., The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution, *Trends in Ecology and Evolution*. 3 (11), 432-438 (1998).
- Conservation International. Biodiversity Hotspots and Conservation Priorities. <https://www.conservation.org/priorities/biodiversity-hotspots>. (Erişim Tarihi: 1 Şubat 2024).
- Çıplak, B., Distribution of Tettigoniinae (Orthoptera, Tettigoniidae) bush-crickets in Turkey: the importance of the Anatolian Taurus Mountains in biodiversity and implications for conservation. *Biodiversity and Conservation*. 12, 47–64 (2003).
- Çıplak, B., The analogy between glacial cycles and global warming for the glacial relicts in a refugium: a biogeographic perspective for conservation of Anatolian Orthoptera. Editor: Fattorini, S. *Thiruvananthapuram: Research Signpost*. 135-163 (2008).

Davey, J., Hohenlohe, P.A., Etter, P.D., Boone, J.O., Catchen, J.M., ve Blaxter, M.L., Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat Rev Genet.* 12, 499–510 (2011).

Davey, J.W., Blaxter, M.L., RADSeq: next-generation population genetics, *Brief Funct Genomics.* 9(5-6), 416-423 (2010).

Davis, P. H., Distribution patterns in Anatolia with particular reference to endemism. *Plant Life of SouthWest Asia.* Editors: Davis, P. H., Harper, P. C., Hedge, I. C. Edinburgh: The Botanical Society of Edinburgh (1971).

Drummond, A.J. ve A. Rambaut., BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7, 214 (2007).

Dudley T.R., *Aurinia (L.) Desv. Flora of Turkey and the East Aegean Islands 1.* Editor: Davis, P. H. Edinburgh: Edinburgh University Press (1965).

Ehlers, J., Gibbard, P. L., & Hughes, P. D., Quaternary glaciations— Extent and chronology, Elsevier. 15 (1), (2011).

Ekim, T., Güner, A., The Anatolian diagonal: fact or fiction?, *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B, Biological Sciences.* 89, 69-77 (1986).

Emerson, K.J., Merz, C.R., Catchen, J.M., Hohenlohe, P.A., Cresko, W.A., Bradshaw, W.E., ve Holzapfel, C.M., Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing, *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 107(37), 16196-16200 (2010).

Erik, S., Hacıoğlu, B.T. *Türkiye Florası Üzerine, Kebikeç.* 9, 139-163 (2004).

Fumagalli, M., *plotSFS.R* [Script], GitHub Repository. <https://github.com/mfumagalli/ngsTools/blob/master/Scripts/plotSFS.R> (2017)

Demirayak, F., *Biyolojik çeşitlilik-Doğa koruma ve sürdürülebilir kalkınma. TÜBİTAK Vizyon 2023 Projesi Çevre ve Sürdürülebilir Kalkınma Paneli* (2002).

German, D.A., Hendriks, K.P., Koch, M.A., Lens, F., Lysak, M. A., Bailey, C. D., Mummenhoff, K., & Al-Shehbaz, I. A., An updated classification of the Brassicaceae (Cruciferae), *PhytoKeys.* 220, 127–144 (2023).

- Guerrina, M., Theodoridis, S., Minuto, L., Conti, E., ve Casazza, G., First evidence of post-glacial contraction of Alpine endemics: Insights from *Berardia subacaulis* in the European Alps. *Journal of Biogeography*, 49, 79–93 (2022).
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M.T., Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), Flora Araştırmaları Derneği ve Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi, İstanbul, 1290, (2012).
- Gür, H., Geç Kuvaterner buzul buzullararası döngülerinin Anadolu'nun biyolojik çeşitliliği üzerine etkileri, *Türkiye Jeoloji Bülteni*. 60, 507-528 (2017).
- Gürkan, H., Arabacı, H., Demircan, M., Eskioğlu, O., Şensoy, S., Yazıcı, B., GFDL-ESM2M Modeli temelinde RCP4.5 ve RCP8.5 senaryolarına göre Türkiye için sıcaklık ve yağış projeksiyonları, *Coğrafi Bilimler Dergisi*. 14(2), 77-88 (2016).
- Habel, J.C., Lens, L., Rödder, D., Schmitt, T., From Africa to Europe and back: refugia and range shifts cause high genetic differentiation in the Marbled White butterfly *Melanargia galathea*. *BMC Evol Biol*, 11, 215 (2011).
- Hartvig P., *Ptilotrichum* C.A. Meyer. In: Strid A, editor. Mountain flora of Greece 1. Cambridge: Cambridge University Press. 304–305 (1986).
- Hasegawa, M., Kishino, H., ve Yano, T., Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22(2), 160-174 (1985).
- Hendriks, K.P., Kiefer, C., Al-Shehbaz, I.A., Bailey, C.D., Hooft, H.A., Nikolov, L. A., Nauheimer, L., Zuntini, A.R., German, D.A., Franzke, A., Koch, M.A., Lysak, M.A., Toro-Núñez, Ó., Özüdoğru, B., Invernón, V.R., Walden, N., Maurin, O., Hay, N.M., Shushkov, P., Mandáková, T., Lens, F., Global Brassicaceae phylogeny based on filtering of 1,000-gene dataset. *Current biology : CB*, 33(19), 4052–4068 (2023).
- Hewitt, G. M., Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 359, 183-195 (2004).
- Hoskin, C., Higgie, M., McDonald, K., ve Craig, M., Reinforcement drives rapid allopatric speciation. *Nature*. 437, 1353–1356 (2005).
- Hoskin, C., Higgie, M., McDonald, K.R., and Moritz, C., Reinforcement drives rapid allopatric speciation, *Nature*. 437, 1353-1356 (2005).
- Jolliffe, I.T., *Principal component analysis* (2nd ed.), Springer (2002).

- Kaya, S., Çıplak, B., Phylogeography of *Psorodonotus caucasicus* group: Independent double invasion of Balkans from Transcaucasia, *Systematic Entomology*. 42,118-133 (2017).
- Korneliussen, T.S., Albrechtsen, A. ve Nielsen, R, ANGSD: Analysis of Next Generation Sequencing Data. *BMC Bioinformatics* **15**, 356 (2014)
- Li H., Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM, *q-bio.GN*. (2013).
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R. ve 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 25(16), 2078–2079 (2009).
- Liu, X., Fu, Y.X., Stairway Plot 2: demographic history inference with folded SNP frequency spectra, *Genome Biol.* 21, 280 (2020).
- Malav, L.C., Kumar, S., Malav, P. K., Global Status of Biodiversity and Threats, *Biotica Research Today*. 2, 330-332 (2020).
- Martín-Bravo, S., Valcárcel, V., Vargas, P., & Luceño, M., Geographical speciation related to Pleistocene range shifts in the western Mediterranean mountains (*Reseda* sect. *Glaucoreseda*, Resedaceae). *Taxon*, 59(2), 466–482 (2009).
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., ve DePristo, M.A., The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome research*, 20(9), 1297–1303 (2010).
- Meisner, J., Albrechtsen, A., Inferring Population Structure and Admixture Proportions in Low-Depth NGS Data. *Genetics*. 210 (2), 719–731 (2018).
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A., Kent, J., Biodiversity hotspots for conservation priorities, *Nature*. 403(6772), 853-858 (2000).
- Nielsen, R., Korneliussen, T., Albrechtsen, A., Li, Y. ve Wang, J., SNP Calling, Genotype Calling, and Sample Allele Frequency Estimation from New-Generation Sequencing Data. *PLoS ONE*, (2012).

- Noroozi, J., Talebi, A., Doostmohammadi, M., Rumpf, S.B., Linder, H.P., Schneeweiss, G.M., Hotspots within a global biodiversity hotspot - areas of endemism are associated with high mountain ranges. *Sci Rep*, 8, 10345 (2018).
- Ossowski, S., Schneeberger, K., Lucas-Lledó, J.I., Warthmann, N., Clark, R.M., Shaw, R.G., Weigel, D., ve Lynch, M., The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5961), 92–94 (2010).
- Özüdoğru, B., Karacaoğlu Ç., Akaydın, G., Erik, G., Mummenhoff, K. ve Sağlam, İ.K., Ecological specialization promotes diversity and diversification in the Eastern Mediterranean genus *Ricotia* (Brassicaceae), *Journal of Systematics and Evolution*. 64,727-740 (2015).
- Özüdoğru, B., Karacaoğlu, Ç., Akaydın, G., Erik, S., Mummenhoff, K, Sağlam, İ.K., Ecological specialization promotes diversity and diversification in the Eastern Mediterranean genus *Ricotia* (Brassicaceae), *Journal of Systematics and Evolution*. 60 (2), 331-343 (2022).
- Özüdoğru, B., Özgişi, K., Perктаş, U. ve Gür, H., The Quaternary range dynamics of *Noccaea iberidea* (Brassicaceae), a typical representative of subalpine/alpine steppe communities of Anatolian mountains, *Biological Journal of the Linnean Society*, 131 (4), 986–1001 (2020).
- Pante, E., Abdelkrim, J., Viricel, A., Gey, D., France, S.C., Boisselier, M.C., Samadi, S., Use of RAD sequencing for delimiting species. *Heredity*, 114(5), 450-459 (2015).
- Patsiou, T., Conti, E., Zimmermann, N. E., Theodoridis, S., ve Randin, C. (2014). Topo-climatic microrefugia explain the persistence of a rare endemic plant in the Alps during the last 21 millennia. *Global Change Biology*, 20(7), 2286–2300 (2014).
- Pearson, K, On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine*, 2(11), 559-572 (1901).
- Peredo, E. L., Revilla, M. A., Jiménez-Alfaro, B., Bueno, A., Fernández Prieto, J. A., ve Abbott, R. J., Historical biogeography of a disjunctly distributed, Spanish alpine plant, *Senecio boissieri* (Asteraceae). *Taxon*, 58(3), 883–892 (2009).
- Pluess, A.R., Stöcklin, J., Population genetic diversity of the clonal plant *Geum reptans* (Rosaceae) in the Swiss Alps, *American Journal of Botany*. 91 (12), 2013-2021 (2004).

- R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org> (2023).
- Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G. ve Suchard, M.A., Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7.2., *Systematic Biology*. syy032 (2018).
- Rambaut, A., Figtree v 1.4.4., Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh (2018).
- Rota, F., Carnicero, P., Casazza, G., Nascimbene, J., Schönswetter, P. ve Wellstein, C., Survival in nunatak and peripheral glacial refugia of three alpine plant species is partly predicted by altitudinal segregation, *Molecular Ecology*. 33 (9) (2024).
- RStudio Team, RStudio: Integrated Development Environment for R (Version 2023-04-21 ucrt). Posit Software, PBC. <https://posit.co> (2022).
- Saavedra, C., Cordero, D., Genetic Variability and Genetic Differentiation of Populations in the Grooved Carpet Shell Clam (*Ruditapes decussatus*) Based on Intron Polymorphisms, *Oceans*. 5(2), 257-275 (2024).
- Schoch, C.L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hotton, C.L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D.D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J.P., Sun, L., Turner, S., ve Karsch-Mizrachi, I., NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database, The journal of Biological Databases and Curation*. (2020).
- Skotte, L., Korneliussen, T.S., ve Albrechtsen, A., Estimating individual admixture proportions from next generation sequencing data. *Genetics*, 195(3), 693–702 (2013).
- Şekercioğlu, Ç.H., Anderson, S., Akçay, E., Bilgin, R., Can, Ö.E., Semiz, G., Tavşanoğlu, Ç., Yokeş M.B., Soyumert, A., İpekdal K., Sağlam, İ.K., k Yücel M., Dalfes, H.N. Turkey's globally important biodiversity in crisis, *Biological Conservation*. 144: 2752-2769 (2011).
- Şenkul, Ç., Doğan, U., Vegetation and climate of Anatolia and adjacent regions during the Last Glacial period, *Quaternary International*. 302, 110-122 (2013).
- Trinajstić, N., *Phyllolepidum* Razprave Slovenske akademije znanosti, Umetnosti. 31, 362 (1990).
- Tzedakis, P.C., Emerson, B.C., Hewitt, G.M., Cryptic or mystic? Glacial tree refugia in northern Europe, *Trends in Ecology and Evolution*. 28 (12), 696-704 (2013).

Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, D., ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. R package version 3.4.0. <https://CRAN.R-project.org/package=ggplot2> (2024).

Wilson, E.O., The Diversity of Life, *Bulletin of Science, Technology & Society*, 14(1), 51-51 (1992).

Wright S., *Evolution and the genetic of population, variability within and among natural populations*. Volume 4. Chicago: University of Chicago Press (1978).

Wu, Q., Dong, S., Zhao, Y., Yang, L., Qi, X., Ren, Z., Dong, S. ve Cheng, J., Genetic diversity, population genetic structure and gene flow in the rare and endangered wild plant *Cypripedium macranthos* revealed by genotyping-by-sequencing. *BMC Plant Biol* 23, 254 (2023).

Yılmaz, E., Özgüşi, K., Sağlam, İ. K., Özüdoğru, B., Genomic and Morphometric Analyses of *Phyllolepidum cyclocarpum* (Boiss.) L. Cecchi, Dr. Mirza Gökgöl Uluslararası Bitki Genetik Kaynakları Sempozyumu, İzmir, 6-9 Kasım 2023, IPGRS, İzmir, **2023**, s. 71.