

FRONTIERS IN LIFE SCIENCES AND RELATED TECHNOLOGIES



SCIENCE
AND
TECHNOLOGY

AGRICULTURAL SCIENCES BIOLOGY BIOCHEMISTRY
BIOINFORMATICS BIOTECHNOLOGY BIOCONTROL
BIOMECHANICS BIOCOMPUTERS BIOENGINEERING
BIOELECTRONICS BIOPHYSICS BIOMATERIALS
BIOMEDICAL SCIENCES BIOMONITORING BIOPOLYMERS
CELL BIOLOGY CONSERVATION BIOLOGY CRYOBIOLOGY
ECOLOGY ENVIRONMENTAL SCIENCES FOOD SCIENCES
GENETICS GENOMICS IMMUNOTHERAPY MARINE SCIENCES
MEDICAL SCIENCES MICROBIOLOGY MOLECULAR BIOLOGY
METABOLOMICS NANOTECHNOLOGY NEUROSCIENCES
PHYSIOLOGY PHARMACOGENOMICS PHARMACOLOGY
POPULATION DYNAMICS PROTEOMICS REMEDIATION
SYNTHETIC BIOLOGY SYSTEMATICS TOXICOLOGY

APRIL, 2022, VOLUME 3, ISSUE 1

Contents

Research Articles

- Seçilmiş bir sektördeki iç ortam hava kalitesinin işçi sağlığı ve iş güvenliği temelinde değerlendirilmesi
- Evaluation of indoor air quality in a selected sector on the basis of occupational health and safety

Ahmet Gokcan, Hacer Handan Demir, Cevriye Ebrar Aktas, Rabia Gur, Hatice Uygun, Goksel Demir

Pages: 1-6

- Genotype × environment interaction and adaptation of cowpea genotypes across six planting seasons

Abiola Toyin Ajayi, Alaba Emmanuel Gbadamosi, Oluwatoyin Sunday Osekita, Babatunde Hakim Taiwo,

Fawibe Ato Babawole, Iyanu Adedeji, Temitope Folukemi Omisakin

Pages: 7-15

- The Genus *Dichodon* (Caryophyllaceae) in Turkey

Mustafa Keskin

Pages: 16-20

- Epidemiological analysis of the diagnostic results of COVID-19 infection in Bishkek by real-time PCR method

Aizhan Sadyrbaeva, Kadyrbai Chekirov

Pages: 21-24

- Citric acid production using rotating biodisc reactor (RBR)

Ugur Sidal

Pages: 25-29

- Domates (*Lycopersicum esculentum* L.)'te sentetik tohum üretiminde aljinat oranlarının depolama zamanına etkisi

- The effect of alginate ratios on storage time in the production of synthetic seeds in tomato (*Lycopersicum esculentum* L.)

Zafer Secgin, Ahmet Okumus

Pages: 30-35

Review Articles

- CRISPR/Cas9 teknolojisi ve gıda alanında kullanımı
- CRISPR/Cas9 technology and usage in the food industry

Aysegul Bolukbas, Ali Gucukoglu

Pages: 36-42

Issue Editorial Board

Prof. Dr. Ahmet AKSOY

Institution: Akdeniz University

Prof. Dr. Shamsheer Singh NARWAL

Institution: Allelopathy Journal

Prof. Dr. Huseyin OGUT

Institution: Selcuk University

Assist. Prof. Dr. Ilyas Samet ERGUN

Institution: Bezmialem Vakif University

Editor

Prof. Dr. Ibrahim Ilker OZYIGIT







Co-Editor

Ibrahim Ertugrul YALCIN



Araştırma makalesi / Research article

Seçilmiş bir sektördeki iç ortam hava kalitesinin işçi sağlığı ve iş güvenliği temelinde değerlendirilmesi

Ahmet Gokcan^{*1} , Hacer Handan Demir² , Cevriye Ebrar Aktas¹ , Rabia Gur¹ ,
Hatice Uygun¹ , Goksel Demir¹ 

¹ University of Health Sciences Turkey, Hamidiye Faculty of Health Sciences, Department of Occupational Health and Safety, 34668, Uskudar, Istanbul, Turkey

² Istanbul Gelisim University, Faculty of Applied Sciences, Department of Logistics Management, 34310 Avcilar, Istanbul, Turkey

Öz

Maden sektörü, taş ocağı işletmeleri, cam ve seramik sektörleri gibi birçok sektörde yoğun olarak karşılaşılan ve çalışan sağlığı üzerinde ciddi meslek hastalıklarına sebep olan silika tozu iç ortam hava kalitesini olumsuz bir şekilde etkilemektedir. Bu çalışmada kapalı ortamlarda yapılan çalışmalarda iç ortam hava kalitesine etki eden faktörlerden birisi olan ve maden sektöründe yoğun olarak görülen kristal yapıdaki silika tozunun çalışma ortamında ve çalışanlar üzerindeki maruziyeti analiz edilmiş ve çalışanların sağlığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde, çalışanlara yapılan kişisel silika tozu maruziyet ölçümleri, yasal mevzuatta $2,4 \text{ mg(m}^3)^{-1}$ olarak belirlenen eşik sınır değerine yakın olduğu, çalışma ortamlarında alınan silika tozu maruziyet ölçümlerinin ise yasal mevzuatta belirtilen $2,4 \text{ mg(m}^3)^{-1}$ 'ün altında olduğu gözlemlenmiştir. Analiz sonucunda elde edilen bulgular literatür ışığında tartışılmış ve sonuçlandırılmıştır.

Anahtar kelimeler: İç ortam havası; iş sağlığı ve güvenliği; kirlilik; meslek hastalığı; silika tozu

Evaluation of indoor air quality in a selected sector on the basis of occupational health and safety

Abstract

Silica dust, which is intensely encountered in many sectors such as the mining industry, quarry operations, glass and ceramic industries, and causes serious occupational diseases on employee health, adversely affects indoor air quality. In this study, the exposure of crystalline silica dust, which is one of the factors affecting indoor air quality in indoor studies and which is intensely seen in the mining sector, in the working environment and on the employees was analyzed and its effects on the health of the employees were examined. When the data obtained are examined, it is seen that the personal silica dust exposure measurements made to the employees are close to the threshold limit value determined as $2.4 \text{ mg(m}^3)^{-1}$ in the legal legislation, and the silica dust exposure measurements taken in the working environments are observed below the $2.4 \text{ mg(m}^3)^{-1}$ specified in the legal legislation. The findings obtained as a result of the analysis were discussed and concluded in the light of the literature.

Keywords: Indoor air; occupational diseases; occupational health and safety; pollution; silica powder

* Sorumlu yazar / Corresponding author.

E-mail: ahmet.gokcan@sbu.edu.tr (A. Gokcan).

<https://doi.org/10.51753/flsrt.1024910> Yazar katkıları / Author contributions

Geliş tarihi / Received 17 Kasım 2021 / 17 November 2021; Kabul tarihi / Accepted 18 Ocak 2021/ 18 January 2022

Çevrimiçi yayın / Available online 25 Mart 2022 / 25 March 2022

2718-062X © 2022 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

1. Giriş / Introduction

Hava kirliliği, küresel sağlık için büyük bir zorluk teşkil etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü/World Health Organization (DSÖ/WHO) tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmaya göre; dünya çapındaki 8 ölümden birinin hava kirliliğinden kaynaklanmaktadır. Yine Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınlamış olduğu istatistiki verilere göre, her yıl 4.6 milyon insan doğrudan kötü hava kalitesinden kaynaklanan çeşitli hastalıklar sebebiyle ölmektedir (Cohen ve ark., 2017). Bu nedenle kötü hava kalitesi her yıl ölüm sayısının artmasından sorumlu olmaktadır (Kuzu ve ark., 2015). Bu veriler göz önüne alındığında özellikle kapalı alanlarda, iç ortam hava kalitesinin değerlendirilmesi önem teşkil etmektedir. İnsanlar günlük yaşamlarının neredeyse %85-90'ını ev, işyeri, okul, hastane ve alışveriş merkezi gibi kapalı ortamlarda geçirmektedir. Bu sebeple kapalı alanlarda, iç ortam hava kalitesinin, insan sağlığı üzerinde önemli bir etkisi vardır (Castro ve ark., 2015).

İş sağlığı ve güvenliği açısından değerlendirildiğinde, çalışma ortamlarındaki iç ortam hava kirleticileri, çalışan sağlığı için önemli bir rol almakta, küresel olarak meslek hastalıklarına ve hatta erken ölümlere neden olan bir ajan oluşturmaktadır (Kalimeri ve ark., 2019). Kapalı ortamlarda yapılan çalışmalardan elde edilen değerlerinin ölçümleri incelendiğinde; iç ortamlardaki kirli hava düzeyinin, dış ortamlardaki kirli hava düzeyinden yaklaşık % 70 daha kirli olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuç doğrultusunda kapalı ortamlarda çalışan kişiler, dış ortam yani açık ortamlarda çalışan kişilere oranla daha fazla kirli havayı solumaktadırlar (Soysal ve Demiral, 2007).

İş sağlığı ve güvenliği dâhilinde iş yerinde iş hijyeni ölçüm, test ve analizlerinin yapılması, raporlanması ve mevzuatlara göre değerlendirilmesi yapılmaktadır. İş sağlığı ve güvenliği ölçüm hizmetleri; aydınlatma ölçümü, ortam gürültüsü ölçümü, kişisel gürültü ölçümü, titreşim ölçümü, toz ölçümü, gaz ölçümü ve termal konfor ölçümlerini içermektedir (Alptekin ve Celebi, 2015). Ölçümler ile birlikte çalışma ortamlarındaki muhtemel tehlikelerin belirlenmesi ve gerekli önlemlerin alınabilmesi için risk analizinin yapılması da büyük önem arz etmektedir (Ersoy ve Kaya, 2019). Bu ölçümler doğrultusunda iç ortam havası içerisinde ne kadar kirletici yoğunluğu olduğu ortaya çıkmaktadır. Ölçümlerin sonucunda da ortamın kirletici değerleri ve maruziyete bağlı olarak ortaya çıkabilecek sağlık etkileri değerlendirilmektedir (Turk, 2021).

İç hava kalitesini etkileyen parametreler arasında; karbon monoksit, karbondioksit, uçucu organik bileşikler, partikül madde, silis tozu (silika), sigara dumanı, ozon, asbest, radon, kurşun, azot dioksit, kükürt dioksit, kimyasal maddeler, temizlik ürünleri, dezenfektan gibi maddeler yer almaktadır. Bu maddeler hava kirliliğine ve çalışan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir (Zhu ve ark. 2021).

İç ortam hava kirliliği; iç ortam havasında insan sağlığına etki eden zararlı maddelerin belirlenen standartların üzerindeki değerlere çıkmasından kaynaklanmaktadır (Flores ve ark., 2020). Kapalı ortamlarda yapılan çalışmalarda, çalışanlar iç ortam hava kirleticilerine; solunum yolu, deri teması ve kirli hava ile kontamine olmuş gıdaların tüketimi yoluyla maruz kalabilmektedirler (Baysan, 2013).

Bunlarla birlikte ortamda bulunan kişi sayısı, kişinin fiziksel özellikleri, maruz kalınan süre ve maruziyet konsantrasyonu, kirliliğin neden olabileceği sağlık etkilerinin derecesini belirlemektedir (Skinner ve ark., 2006).

Konu ile ilgili kapalı mekânlarda yapılan çalışmalarda iç ortam hava kirleticilerine maruziyet sonucunda çalışanlarda;

- Akciğer kanseri,
- Kronik astım,
- Kardiyovasküler hastalıklar,
- Böbrek rahatsızlıkları,
- Hasta bina sendromu (HBS)
- Orta kulak iltihabı,
- Tüberküloz,
- Enfeksiyon,
- Bağışıklık sistemi hastalıkları,
- Psikolojik rahatsızlıklar,
- Mide rahatsızlıkları,
- Güç ve motivasyon kaybı

gibi akut ve kronik rahatsızlıkların oluşmasına ve hatta ölümlerin meydana gelmesine neden olabilmektedir (Polatli, ve ark., 2001).

Maden sektörü, döküm işlerinde, taş ocağı işletmelerinde, dış teknisyenliğinde, cam ve seramik sektörü ve tünel açma işlemleri gibi çalışma alanlarında yoğun olarak karşılaşılan ve çalışanlarda ciddi meslek hastalıklarına sebep olan silika tozu iç ortam hava kalitesini olumsuz bir şekilde etkilemektedir (CDC, 2021a). Çalışanlarda solunum yolu ile nüfuz eden silika tozları akciğerlere kadar ulaşmakta ve akciğerlerde birikerek tahribata yol açmaktadır. Akciğerlerde açtığı bu tahribata "silikozis" denmekte ve bir meslek hastalığı olarak kabul edilmektedir. Silika tozuna maruziyet, başlangıçtan itibaren maruziyet yoğunluğuna bağlı olarak 10 yıl sonuna kadar ortaya çıkan bir kronik tablo içermektedir. Silikozis uzun süre belli bir semptom göstermediği için tanı koyulamamakta ve bu nedenle "sinsi hastalık" da denilmektedir. Hastalık başlangıç evresinde dispne veya öksürük semptomları göstermekte, ilerleyen aşamalarda üst akciğer zonlarında küçük silikotik nodüller oluşturarak hastalığın seyrini geliştirmektedir. Hastalık ilerleyen evrelerde hipoksemik solunum yetmezliğine ve kor pulmonale seviyelerine gelerek ciddi vakaya dönüşmektedir. Günümüzde silikozis hastalığı için etkin tedavi yöntemleri ne yazık ki bulunmamaktadır. Bu nedenle özellikle maden ocakları gibi kapalı çalışma ortamlarında iç ortam hava kalitesinin sürekli olarak değerlendirilmesi elzem bir konudur (Turk, 2021).

Tozlar hem iç ortam hava kalitesi, hem de çalışan sağlığı açısından oldukça önem teşkil ettiğinden 6331 sayılı iş sağlığı ve güvenliği kanununda "Tozla Mücadele Yönetmeliği" oluşturulmuştur. Bu yönetmelikte çalışma ortamlarında tozlardan kaynaklanan tehlike ve risklerle mücadele etmek ve iç ortam hava kalitesinin normal düzeylere getirilmesini sağlamak amacıyla çalışanların maruziyet düzeylerinin sınırlanmasını hedefleyen usul ve esaslar yer almaktadır (Tozla Mücadele Yönetmeliği, 2013).

Yönetmelikte belirtilen, günlük 8 saatlik çalışma süresince çalışanların solunum bölgesindeki havada bulunan silika toz yoğunluğunun zaman ağırlıklı ortalamasına ilişkin üst sınırlar Tablo 1'de verilmiştir.

Bu çalışmada, maden sektöründeki iç ortam hava kalitesini etkileyen faktörlerden biri olan silika tozunun konsantrasyonunun uygun ölçüm cihazları ile ölçülerek analiz edilmesi ve bu sektördeki çalışanların ve çalışma ortamının iç ortam hava kalitesine yönelik maruziyet düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma ortamlarında silika tozu ölçümü ve sağlık etkileri konusu literatürde çok az çalışılmış bir araştırma alanıdır. Bu bağlamda yapılan bu çalışma nitelik bakımından önemli sayılabilecek bir araştırma olacaktır.

Tablo 1 / Table 1

Tozla mücadele yönetmeliğinde belirtilen silika eşik sınır değerleri (ESD) / Silica threshold limit values (ESD) specified in the dust fighting regulation (Tozla Mücadele Yönetmeliği, 2013).

Kayaç-Mineral	TWA
Silika Tozu (Kristal Yapıda)	
Kuvars Miktarı (Solunabilir formda)	$\frac{10 \text{ mg(m}^3)^{-1}}{\% \text{SiO}_2+2}$
Kuvars Miktarı (Toplam)	$\frac{30 \text{ mg(m}^3)^{-1}}{\% \text{SiO}_2+2}$
Kömür Tozu [Silika (SiO₂) İçeren]	
%5 ve daha az SiO ₂ içeren solunabilir toz miktarı	2,4 mg(m ³) ⁻¹
%5 ve daha fazla SiO ₂ içeren solunabilir toz miktarı	$\frac{10 \text{ mg(m}^3)^{-1}}{\% \text{SiO}_2+2}$

2. Gereç ve yöntemler / Materials and methods

Araştırmada, analiz edilen örnekler çalışma ortamlarındaki farklı ölçüm noktalarından ve farklı çalışanlar üzerinden alınmıştır. Yapılan ölçümlerin sonuçları “İş Hijyeni Ölçüm, Test ve Analiz Laboratuvarları Hakkında Yönetmelik” in 2. maddesinde belirtilen ön yeterlilik ve/veya yeterlilik belgesine sahip laboratuvar tarafından elde edilmiştir. Kapalı ortamlarda toz ölçümü yapılırken; gravimetrik ölçüm yöntemi, radyometri/β ışını absorpsiyonu ölçüm yöntemi, reflektometri ölçüm yöntemi, nefhelometri ölçüm yöntemi ve piezoelektrik terazi ölçüm yöntemi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden en sık kullanılan ve daha doğru sonuçların elde edildiği yöntem gravimetrik ölçüm yöntemidir.

Gravimetrik ölçüm yöntemi, incelenen toz partiküllerine ait kütlelerin, alınan örneğin saf halinin veya bileşiklerin elementlerine ayrılması yoluyla elde edilen numunenin tartılması temeline dayanan nicel bir analiz yöntemidir. Çalışma alanlarında bulunan toz maruziyeti gravimetrik analiz ile tayin edilirken ilk olarak örneklem alınacak çalışma bölgeleri ve numune alınacak çalışanlar belirlenir. Çalışanların solunum bölgesine yerleştirilen kişisel toz ölçüm pompalarıyla bir filtre üzerinde tozlar toplanır. Ölçüm yapmadan önce 24 saat kirden ve nemden uzak bir şekilde bekletilmiş filtrelerin hassas terazi yardımıyla darası alınır. Ölçümler en az 3 kez ve minimum 30 dakika olmak koşuluyla tekrarlanır. Ölçüm sonucunda filtreler tekrar tartılarak gerekli hesaplamalar yapılır. Hesaplama yapılırken kullanılan formüller ile günlük 8 saatlik çalışmanın sonucunda maruz kalınacak toz miktarı belirlenir. Çalışmamızda gravimetrik analizde NIOSH 600 (çalışma ortamında bulunan

Tablo 2 / Table 2

Çalışanların kişisel maruziyet silika ölçüm sonuçları / Employees' personal exposure silica measurement results.

Ölçüm Yapılan Personel	Çalıştığı Bölüm / Görevi	Sıcaklık (°C)	Nem (mbar)	Maruziyet Sınır Değeri	Silika Tozu Maruziyet Değeri TWA mg(m ³) ⁻¹	Eşik Sınır Değeri (ESD) mg(m ³) ⁻¹
A Kişisi	Silis bölümü öğütme	19,8	892,1	420	0,4	
B Kişisi	Döküm / Kaynak ağız açma	24,4	892,3	240	<0,03 ¹	
C Kişisi	Savurma döküm kalıbı operatör	24,7	892,3	420	<0,03 ¹	
Ç Kişisi	Redüksiyon bölümü operatör	29,3	892,1	420	0,11	2,4 mg(m ³) ⁻¹
D Kişisi	Peletleme bölümü operatör	23,4	890,1	240	0,05	
E Kişisi	Redüksiyon operatör	24,1	890,3	420	<0,03 ¹	
F Kişisi	Cüruf taşıma	25,1	890,3	420	0,11	

¹ Görülebilecek en alt seviyededir / It is at the lowest visible level.

solunabilir toz tayini) ve NIOSH 7602 (çalışma alanında kristal silika tayini) olarak adlandırılan metotların formülleri kullanılmıştır. Alınan toz numuneleri ve örneklem pompaları doğru sonuçlar elde edilebilmesi için kül fırınında ısıtılarak tayin edilmiştir (Tankut ve ark., 2014).

NIOSH 600 metodunda kullanılan formül (CDC, 2021b)

$$C = \frac{(W_1 - W_2) - (B_1 - B_2)}{V} * 10^3 \text{ mg(m}^3)^{-1}$$

C=Toplam toz miktarı

W₁=Ölçümden önceki filtre ağırlığı

W₂=Ölçümden sonraki filtre ağırlığı

B₁=Boş filtrelerin dara ağırlığı

B₂=Numune alındıktan sonra filtrelerin ağırlığının ortalaması

V=Hacim

NIOSH 7602 metodunda kullanılan formül;

$$C = \frac{W_s}{V} \text{ mg(m}^3)^{-1}$$

C=Toplam toz miktarı

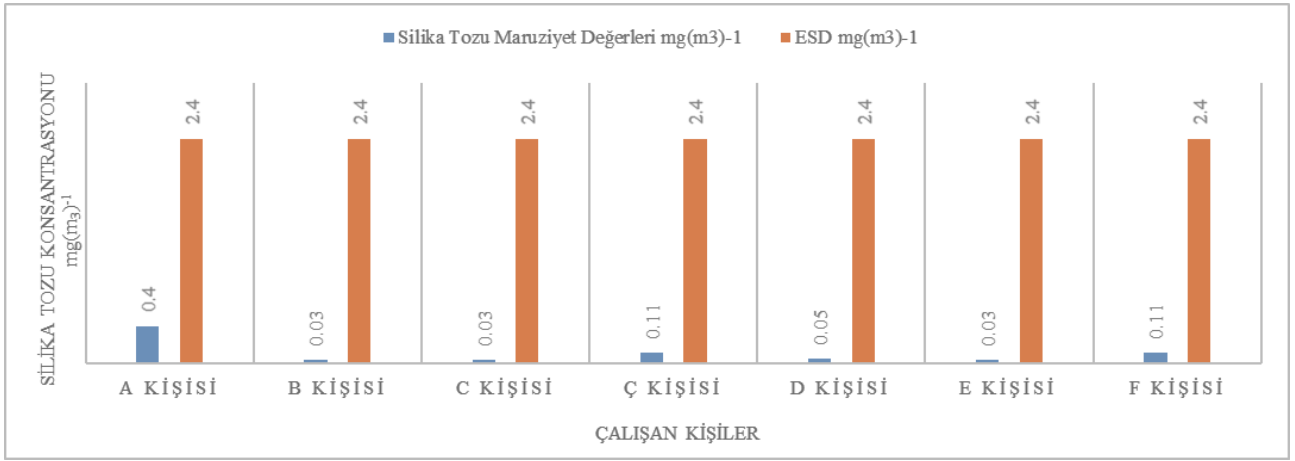
W_s=Silika ağırlığı konsantrasyonu

V=Hacim

Silika sınır değeri hesaplanırken, analizde kullanılan filtrelerin üzerinde toplanmış olan tozdaki silika yüzdesi Tablo 1'deki belirtilen faktörlere göre değerlendirilmektedir. Hesaplama sonucu ortaya çıkan silika tozu sınır değeri maruziyet değeri olarak kabul edilir. Ortamdaki silika değerleri ile maruziyet değeri karşılaştırılmamalıdır.

3. Bulgular ve tartışma / Results and discussion

Maden sektöründe yoğun olarak görülen silika tozları çalışanlar için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Uluslararası Kanser Araştırma Örgütü tarafından yapılan çalışmalarda silika maddesinin insanlarda kesin olarak kansere yol açtığı kanıtlanmış ve karsinogenik maddeler arasında yer almıştır (Anlar ve ark., 2019). Maden sektöründe, çalışanlarda kişisel maruziyet silika tozu ve çalışma ortamında silika tozu ölçümleri yapılmıştır. Çalışma ortamında maruziyet grupları ve süreleri belirlenmiş temsili çalışanlar için NIOSH 7602 standartlarına uygun ölçüm süreleri ve pozisyonlarda çalışanlarda kişisel ölçümler gerçekleştirilmiştir. Çalışanların maruziyet sınır değerleri (TWA), silika tozunun konsantrasyonuna bağlı olarak maruz kalma süresi ve şiddeti üzerinden bir çalışma periyodu için hesaplanmıştır.



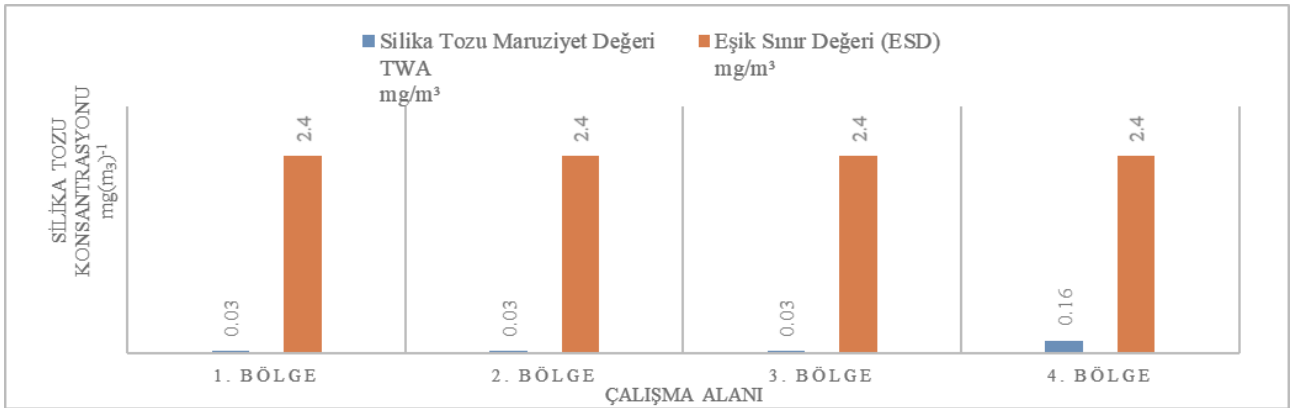
Şekil 1 / Figure 1. Çalışanların kişisel maruziyet silika ölçüm sonuçları / Employees' personal exposure silica measurement.

Tablo 3 / Table 3

Çalışma ortamındaki silika ölçüm sonuçları / Silica measurement results in the working environment.

Ölçüm Yapılan Bölüm	Ölçüm Saatleri	Ortam Şartları		Silika Tozu Maruziyet Değeri TWA mg(m³) ⁻¹	Eşik Sınır Değeri (ESD) mg(m³) ⁻¹
		Sıcaklık (°C)	Basınç (mbar)		
Peletleme orta nokta	13.00- 16.00	23,40	890,1	<0,03 ¹	2,4 mg(m³) ⁻¹
Rafinasyon orta alan	9.50- 12.50	23,40	892,2	<0,03 ¹	
Hammadde depolama alanı	9.40- 12.40	20,60	892,5	<0,03 ¹	
Ferro silis bölümü	9.30-9.50	23,40	890,1	0,16	

¹ Görülebilecek en alt seviye / The lowest visible level.



Şekil 2 / Figure 2. Çalışma ortamındaki silika ölçüm sonuçları / Silica measurement results in the working environment.

Yapılan ölçümlerde uygun ölçüm cihazları kullanılmıştır. Silika örnekleme ve analizi; NIOSH 7602 standardında yer alan analiz yöntemlerine göre hesaplanmıştır (Karadağ ve ark. 2001).

Tesiste belirlenen yeterli sayıdaki çalışanlar üzerinde yapılan kişisel maruziyet silika ölçümlerinin sonuçları Tablo 2 ve Şekil 1'de verilmiştir. Ölçüm sonuçlarında ve yapılan hesaplamalar neticesinde çalışanlarda ölçülen silika tozu maruziyet değerleri normal seviyelerde olduğu tespit edilmiş ve 3 çalışandan alınan numunelerde silika tozu maruziyet sınır değeri görülebilecek en alt sınır değer olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen ölçüm sonuçlarına göre araştırmanın yapıldığı maden ocağında, çalışanların maruz kaldıkları silika tozu maruziyet seviyesi, tozla mücadele yönetmeliğinde yer alan "Eşik Sınır Değeri" (ESD)'nde belirtilen 2.4 mg(m³)⁻¹'ün altında olduğu (Tozla Mücadele Yönetmeliği, 2013) ve bu sonuçların çalışanlar için ciddi tehlikeler içermediği sonucuna ulaşılmıştır.

Çalışma ortamında yapılan silika ölçüm sonuçları incelendiğinde; çalışma ortamında belirlenmiş bölgelerde, silika

konsantrasyonunun yoğun olduğu noktalardan NIOSH 7601 standartlarına uygun olarak belli sürelerde ve standartlara uygun ölçüm pozisyonlarda numuneler alınmış ve analiz gerçekleştirilmiştir. Analizde elde edilen sonuçlar; "İş Hijyeni, Ölçüm, Test, Analiz Laboratuvarları Hakkında Yönetmeliği"ne göre çalışma ortamından alınan sabit nokta ölçümleri gerekiyorsa çalışanların, çalışma ortamlarındaki maruziyetlerinin değerlendirilmesi için kullanılabilir. Çalışmanın sürekli yapıldığı çalışma ortamlarında maruziyetin en yüksek olabileceği nokta ölçüm noktası olarak kabul edilir. Çalışma ortamında alınan analiz sonuçları kişisel maruziyet seviyesini göstermemektedir. Bu sebeple çalışma ortamından alınan silika tozu ölçüm sonuçları, kişisel maruziyet sınır değerleri ile karşılaştırılmamıştır.

Elde edilen analiz sonucunda filtrelerden alınan numuneler ile gerekli hesaplamalar yapılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 3 ve Şekil 2'de sunulmuştur. Sonuçlara göre belirlenen çalışma ortamlarında bulunan silika konsantrasyonları standartların altındadır. Elde edilen değerlerin normal seviyelerde olduğu,

çalışanlar için bir tehdit oluşturmadığı görülmektedir. Buna göre; elde edilen değerlerin normal seviyelerde olduğu, çalışanlar için bir tehdit oluşturmadığı görülmektedir.

4. Sonuç ve öneriler / Conclusion and recommendations

Bu araştırma, iç ortam hava kirleticilerinden biri olan ve çalışan sağlığı için büyük tehlike eden silika tozunun, maruziyet seviyelerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Çalışanlardan alınan örneklerde ve çalışma ortamında alınan numune örneklerinde silika tozunun varlığı tespit edilmiştir. Çalışanlardan alınan silika tozu örneklerinin analiz ve hesaplama sonuçları, tozla mücadele yönetmeliğinde yer alan eşik sınır değerleri ile karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlarda, silika tozunun, belirtilen eşik sınır değerlerine yakın veya alt sınırlarda seyrettiği görülmüştür. Çalışma ortamlarından alınan numunelerin analiz ve hesaplama sonuçları da yine benzer şekilde ilgili yönetmelikte belirtilen eşik sınır değerinin altında olduğunu göstermiştir. Eşik sınır değerlerinin altında ölçüm sonuçlarının alınması, silika tozuna maruziyetin var olduğu gerçeğini ortadan kaldırmamaktadır.

Çalışanların silika tozuna maruz kalmaları ve çalışma ortamlarında silika tozunun var olması çalışanlar için her zaman ciddi bir tehlike oluşturmaktadır. Silika tozunun başlangıç evresinde herhangi bir semptom göstermemesi de bu tehlikenin önemini ortaya koymaktadır. Silika tozunun çalışma ortamında var olması ve çalışanların az da olsa toza maruz kalması, maruziyetin sıklığına, yoğunluğuna ve maruz kalma süresine bağlı olarak ileride çalışanlarda ciddi meslek hastalıklarına sebep olmaktadır (Borm ve ark., 2011).

İç ortam hava kirleticileri arasında yer alan silika tozunun "Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı" tarafından da kansere sebep olduğu kesin olarak kanıtlanmış ve literatürde de silika tozunun insan sağlığı için çok tehlikeli bir madde olduğu ilgili çalışmalar yer almıştır (Anlar ve ark., 2019). Yapmış olduğumuz araştırma sonucunda maden sektöründeki silika tozunun hem çalışan sağlığını korumak ve daha güvenli çalışma ortamı

Kaynaklar / References

- Alptekin, O., & Celebi, G. (2015). Toz partiküllerinin iç mekân hava kalitesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(1), 30-49.
- Anlar, H. G., Bacanlı, M., & Basaran, N. (2019). Silikanın kullanım alanları ve silika maruziyetine bağlı olası toksik etkiler. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 39(1), 17-29.
- Baysan, S. (2013). Bina içi hava kalitesinin önemi ve sağlığa etkileri üzerine bir deneme. *Marmara Coğrafya Dergisi*, (2), 224-236.
- Borm, P. J., Tran, L., & Donaldson, K. (2011). The carcinogenic action of crystalline silica: a review of the evidence supporting secondary inflammation-driven genotoxicity as a principal mechanism. *Critical Reviews in Toxicology*, 41(9), 756-770.
- Castro, A., Calvo, A. I., Alves, C., Alonso-Blanco, E., Coz, E., Marques, L., ... & Fraile, R. (2015). Indoor aerosol size distributions in a gymnasium. *Science of the Total Environment*, 524, 178-186.
- CDC, (2021a). Centers for Disease Control and Prevention, The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Crystalline Silica, <https://www.cdc.gov/niosh/topics/silica/>, Son erişim 23 Şubat 2022.
- CDC, (2021b). Centers for Disease Control and Prevention, Particulates Not Otherwise Regulated, Respirable, <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/0600.pdf>, Son erişim 13 Şubat 2022.
- Cohen, A. J., Brauer, M., Burnett, R., Anderson, H. R., Frostad, J., Estep, K., ... & Forouzanfar, M. H. (2017). Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. *The Lancet*, 389(10082), 1907-1918.

oluşturmak hem de iç ortam hava kalitesinin daha temiz olmasını sağlamak amacıyla öneriler hazırlanmıştır.

Bu öneriler:

İşletmede silika tozu konsantrasyonunun yoğun olduğu bölgeler için risk değerlendirilmesi yapılmalı ve risk değerlendirmesinde belirlenecek periyotlar ile toz maruziyet ölçümleri yapılmalıdır.

İşletmede iç ortam hava kalitesini yükseltmek ve temiz hava girişini artırmak için hem lokal hem bölgesel havalandırma sayısı artırılmalı, mevcut bulunan havalandırma sistemlerinin periyodik kontrollerine ve hava filtrelerinin temizliğine önem verilmelidir.

Tozlu ortamlarda temizlik yapılırken kesinlikle kuru süpürülme işlemi yapılmamalı, sulu süpürme işlemi uygulanmalıdır.

Çalışanlara, iş elbiselerinin temiz kullanılması konusunda düzenli olarak ikazda bulunulmalı, iş elbisesinin temizliğiyle ilgili iş hijyeni eğitimi verilmeli ve çalışanlara işletme tarafından uygun kişisel koruyucu donanımlar temin edilmelidir.

Çalışanlara daha güvenli çalışma ortamının sağlanması için işletme genelinde iş sağlığı ve güvenliği kültürünün oluşturulması için eğitici çalışmaların yapılması şeklinde özetlenebilir.

Sonuç olarak; yapılan bu çalışma ile çalışan sağlığına önemli derece etki eden iç ortam hava kirleticilerinden biri olan silika tozu değerlendirilerek, çalışma ortamında alınması gereken önlemler belirlenmeye çalışılmıştır.

Çıkar çatışması / Conflict of interest: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder / The authors declare that they have no conflict of interests.

Etik beyanı / Informed consent: Bu çalışmada, yazarlar, hiç bir insan ya da hayvan denek kullanılmadığını ve Etik Kurul iznine gerek olmadığını beyan eder / The authors declare that this manuscript did not involve human or animal participants and informed consent was not collected.

- Ersoy, S., & Kaya, E. C. (2019). Bir kamu üniversitesi gıda mühendisliği laboratuvarları risk analiz uygulaması. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 8(4), 411-423.
- Flores, R. M., Mertoglu, E., Ozdemir, H., Akkoyunlu, B. O., Demir, G., Unal, A., & Tayanc, M. (2020). A high-time resolution study of PM2.5, organic carbon, and elemental carbon at an urban traffic site in Istanbul. *Atmospheric Environment*, 223, 117241.
- Kalimeri, K. K., Bartzis, J. G., Sakellaris, I. A., & de Oliveira Fernandes, E. (2019). Investigation of the PM2.5, NO2 and O3 I/O ratios for office and school microenvironments. *Environmental Research*, 179, 108791.
- Karadag, O. K., Akkurt, I., Onal, B., Altınors, M., Bilir, N., Ersoy, N., ... & Ardiç, S. (2001). Taş ocakları işçilerinde silikozis ve solunumsal bulgular. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 49(1), 73-80.
- Kuzu, S. L., Yavuz, E., Akyuz, E., Saral, A., Akkoyunlu, B. O., Özdemir, H., ... & Ünal, A. (2020). Black carbon and size-segregated elemental carbon, organic carbon compositions in a megacity: A case study for Istanbul. *Air Quality, Atmosphere & Health*, 13(7), 827-837.
- Polatli, M., Turkan, H., Akdilli, A., & Cildag, O. (2001). Kuvars İşçilerinde Silikozis Riski. *Solumum Hastalıkları*, 12(2), 90-95.
- Skinner, I., Farmer, A., & Kuik, O. (2006). The thematic strategy on air pollution. *Policy Brief for the EP Environment Committee*.
- Soysal, A., & Demiral, Y. (2007). Kapalı ortam hava kirliliği. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 6(3), 221-226.
- Tankut, A. N., Kurban, H., & Melemes, K. (2014). Orman endüstri işletmelerinde odun tozunun ergonomik etkilerinin incelenmesi. II. *Ulusal Akdeniz Orman ve Çevre Sempozyumu*, Isparta, Türkiye. 785-792.

Tozla Mücadele Yönetmeliği, (2013). Resmî Gazete 28812 (05 Kasım 2013), <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/11/20131105-9.htm>, Son erişim 16 Şubat 2022.

Turk, M., (2021). *Olgularla meslek hastalıkları (1. Baskı)*. (pp. 1-342).

Ankara Nobel Tıp Kitapevleri.








Zhu, Y. D., Li, X., Fan, L., Li, L., Wang, J., Yang, W. J., ... & Wang, X. L. (2021). Indoor air quality in the primary school of China-results from CIEHS 2018 study. *Environmental Pollution*, 291, 118094.

Cite as / Atıf şekli: Gokcan, A., Demir, H. H., Aktas, C. E., Gur, R., Uygun, H., & Demir, G. (2022). Seçilmiş bir sektördeki iç ortam hava kalitesinin işçi sağlığı ve iş güvenliği temelinde değerlendirilmesi. *Front Life Sci RT*, 3(1), 1-6.



Research article

Genotype × environment interaction and adaptation of cowpea genotypes across six planting seasons

Abiola Toyin Ajayi¹ , Alaba Emmanuel Gbadamosi¹ , Oluwatoyin Sunday Osekita¹ ,
Babatunde Hakim Taiwo² , Fawibe Ato Babawole¹ , Iyanu Adedeji¹ ,
Temitope Folukemi Omisakin¹ 

¹ Plant Breeding Unit, Department of Plant Science and Biotechnology, Adekunle Ajasin University, Akungba-Akoko, Nigeria

² Global Emerging Pathogens Treatment Consortium, Ibadan, Nigeria

Abstract

Cowpea exhibits significantly inconsistent performances across different environments, and hence demands performance evaluation of genotypes prior release or cultivation in every breeding program. Hence, the goal of this study was to compare 16 cowpea genotypes over six planting seasons (2014-2019) in Akungba-Akoko, Nigeria for their stability and adaptation through Finlay and Wilkinson (FW), Additive Main Effects and Multiplicative Interaction (AMMI) and Genotype and Genotype × Environment (GGE) analyses. ANOVA revealed high significant genotype (15.33%), environment (14.71%) and GEI (64.34%) effects for seed yield among genotypes. All analyses were able to pinpoint stable high-yielding genotypes including G14 and G9. Genotypes G14, G3, G4, G5, G6 and G9 were high yielding and stable according to FW; AMMI showed G10, G9, G16, G14 and G13 stable high-yielding while GGE showed G14, G16, G9 and G13 as stable high-yielding. As analyses explored the variation in the data due to GEI, they also complemented one another, in that where one erroneously included a wrong genotype as stable; the other excluded such genotype, making recommendation possible on the basis of consistency to gain reliability.

Keywords: *Adaptation; cowpea; g × e interaction; stability; yield*

1. Introduction

Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], one of Nigeria's most popular grain legumes, and in all the tropical and subtropical countries (Ajayi and Gbadamosi, 2020). This legume is vital for its contribution to the nutrition of people and livestock. Its high plasticity nature allows it to adapt to wide range of environmental conditions. Its inherent ability at fixing atmospheric nitrogen in soil with consequent soil enhancement (Olayiwola et al., 2015; Gomes et al., 2019; Aliyu et al., 2019) and being a source of income to millions of people of these regions (Kebede and Bekeko, 2020) make it a choice crop for cultivation. Cowpea seeds are rich in protein and minerals

(Gerrano et al., 2015). Its capacity in biological nitrogen fixation ranges between 70 and 350 kg of nitrogen per hectare with its impact projected to reach 77, 320 tons in 2020. Presently, Africa accounts for 94.9 percent of the total worldwide cowpea production (7.23 MT/annum) and harvested area of land (12.59M ha), with more than 36 percent of the total production accounted for by Nigeria (at 2.61 MT/annum) as the largest world's producer (FAOSTAT, 2020). In spite of this, grain yield of cowpea in Nigeria has been seriously compromised by inappropriate cultural practices, abiotic and biotic factors (Ajayi and Gbadamosi, 2020) making its productivity grossly inadequate to cater for the protein needs of the ever-increasing population of the country.

* Corresponding author.

E-mail address: toyin.ajayi@aau.edu.ng (A. T. Ajayi).

<https://doi.org/10.51753/flsrt.1036051> Author contributions

Received 14 December 2021; Accepted 20 February 2022

Available online 28 March 2022

2718-062X © 2022 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

According to the United Nations (UN), the current world population explosion is predicted to be increased from Africa; with an expected addition of 1.2 billion people of the projected 1.9 billion increase between 2020 and 2050. Also, the Nigerian population is expected to surpass that of the United States during the same period (UN, 2019) demanding an accelerated food production to meet the Nigerian growing population. In the same vein, climate change is expected to aggravate rising temperature and free CO₂, disorganize rainfall patterns and soil salinity thereby, making occurrence of drought highly unpredictable; when combined with population growth, their impacts on food and nutritional security would be devastating (Gomes et al., 2019; Ajayi et al., 2020). Therefore, in line with the present reality, there is need for quick and sustainable increase in domestic cowpea production in Nigeria. However, the biggest challenge associated with the improvement of yield is the complexity of the trait, in that it is polygenic in nature with strong environmental influences.

Cowpea genotypes have been found to exhibit significantly inconsistent performances across different environments (Ajayi and Gbadamosi, 2020), which is regarded as genotype-by-environment interaction (GEI / $G \times E$). Before the release of novel genotypes or varieties, their GEI must be evaluated to pinpoint individuals that show both superior performances (in terms of mean yield) coupled with extraordinary stability across multiple environment trials (MET) (Agahi et al., 2020; Pour-Aboughadareh et al., 2022).

Innumerable multivariate techniques have previously been employed to assess the existence of yield stability and $G \times E$ in crop species (Bocianowski and Prazak, 2022; Pour-Aboughadareh et al., 2022). Among them, the Finlay and Wilkinson analysis (FW), Additive Main Effects and Multiplicative Interaction (AMMI) model and Genotype and Genotype \times Environment (GGE) Biplot analysis are the most commonly used ones in plant breeding research, recently. These three analyses have been proven to be highly effective, sophisticated and efficient (Olayiwola et al., 2015). FW relies on the regression of the performance of each genotype on environmental means in two-step procedure; step one computes environmental sample means, while the second step deals with the estimation of intercepts and slopes of each line, by regressing within line the performance of each line on estimated environmental means (Olayiwola et al., 2015; Lian and Campos, 2016).

AMMI pools Principal Component Analysis (PCA) and Analysis of Variance (ANOVA) for effective interpretation of GEI (Aremu et al., 2020) whereas the GGE analysis uses the Sites Regression (SREG) model with emphasis on the importance of genotype main effects and effects of GEI. While both AMMI and GGE combine G and GE in mega environment study and assessment, the GGE superiority over AMMI lies in the fact that it elucidates more of the $G+GE$ plus possession of inner product property of the biplot, and has higher discerning and representative power which is effective for test environment evaluation (Yan et al., 2007; Neisse et al., 2018; Maniruzzaman et al., 2019; Kebede and Bekeko, 2020). To improve and sustain yield, it is imperative to identify cowpea genotypes suitable for specific regions in Nigeria because of its diverse agro-ecological zones.

The goal of this study was therefore to evaluate, through FW, GGE and AMMI analysis, sixteen cowpea genotypes over six years in Akungba-Akoko, to identify stable high-yielding genotypes that are appropriate for cultivation in tropical regions.

2. Materials and methods

2.1. Collection procedure of materials

The 16 selected cowpea genotypes came from a germplasm of 25 genotypes collected from the International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Nigeria. The selection was based on their consistency in both germination rate and vigorous growth pattern at the same field across 6 years survey spanning 2014 through 2019 at Adekunle Ajasin University, Plant Breeding Unit Experimental Field, Department of Plant Science and Biotechnology. The Latitude, Longitude and Altitude of the site lie between 7.2° N, 5.44' E and 423 m above the sea level, respectively. The planting season of 2014 fell between March and June, while that of 2015 through 2019 fell between May and October; all of which fell within the raining seasons.

The site of the study is characterized with tropical climate located within the southwestern Nigeria. It has variable rainy and dry seasons, with rainy season lasting from March to November accompanied by an August break which is an interruption of rains leading to a short dry season. The region has a mean annual rainfall ranging between 800 mm and 1,500 mm with about 85% of the rains falling from June to September. The average air temperature of the location is 24.7°C, and the type of soil is sandy loam ultisol (Salami and Sangoyomi, 2013; Oladele et al., 2019; Akinde et al., 2020). Besides, the initial physico-chemical properties of the experimental site were done in 2014 according to procedures cited in Oladele et al. (2019; 2022). The soil initial pH was 6.50, total organic matter (TOM) of 2.60, total nitrogen, TN (%) of 0.70, available phosphorus, (P) of 2.20 cmol kg⁻¹, cation exchange capacity (CEC) of 11.74 cmol kg⁻¹, and texture class of sandy loam.

The selected genotypes, their origins, biological status and identification codes are provided in Table 1. In each year, plant materials were sown in randomized complete block design (RCBD) with three replications.

Table 1

List of cowpea genotypes used in $G \times E$ analysis with their origin.

S/N	Genotype ID	Biological Status	Origin	Code
1	TVu-7362	Landrace	Ghana	G1
2	TVu-199	Breeding material	USA	G2
3	TVu-207	Breeding material	USA	G3
4	TVu-224	Breeding material	USA	G4
5	TVu-235	Breeding material	Ghana	G5
6	TVu-236	Breeding material	Ghana	G6
7	Tvu-239	Breeding material	South Africa	G7
8	TVu-241	Breeding material	USA	G8
9	IT98K-205-8	Unknown	Nigeria	G9
10	IT98K-555-1	Unknown	Nigeria	G10
11	TVu-4886	Landrace	Niger	G11
12	TVu-4866	Landrace	Niger	G12
13	TVu-9225	Landrace	Tanzania	G13
14	TVu-9256	Landrace	Burkina Faso	G14
15	TVu-9252	Landrace	Burkina Faso	G15
16	TVu-11979	Landrace	Sudan	G16

Two rows within plots were utilized; spacing within and between rows were 30 cm and 50 cm, respectively. Each plot was 5 m x 1 m in dimension. Each plot was separated from the other by 1 m, while each replicate was separated from the other by 2 m. No fertilizer application was performed during the seasons in order to access the natural genetic potentials of the genotypes. Hand weeding of the field was done when required. During the flowering and podding phases, 10% EC Cypermethrin was applied to control insect pest. Determination

of the yield (in grams) for data analyses was performed on a plant basis in each season.

2.2. Data analysis

ANOVA was adopted for determining the effect of genotype, environments, and their interaction across the years using the version 20 of the SPSS Program (SPSS, 2017). Significant differences of the means were performed at $P \leq 0.05$ level of probability by DMRT. The AMMI and GGE analyses were performed by using the version 1.4 of the Plant Breeding Tools (PBTools, 2014).

The AMMI model was determined in line with Agahi et al. (2020) as:

$$Y_{ge} = \mu + \alpha_g + \beta_e + \sum_n \lambda_n \delta_{gn} \delta_{en} + \rho_{ge} ;$$

Where, Y_{ge} = mean yield of genotype g in environment e ; μ = grand mean; α_g = genotype deviation from the grand mean; β_e = environmental deviation; λ_n = the singular value for principal component (PC) n ; δ_{gn} = eigenvector value for genotype g and component n ; δ_{en} = eigenvector value for environment e and component n ; ρ_{ge} = residual.

The GGE biplot was determined in line with Das et al. (2019) as:

$$Y_{ij} = \mu + e_j + \sum_{n=1}^N \lambda_n \gamma_{in} \delta_{jn} + \epsilon_{ij} ;$$

Where, Y_{ij} = mean response of i th genotype in the j th environment; μ = grand mean; e_j = environment deviations from the grand mean; λ_n = the eigen value of PC analysis axis; δ_{in} and δ_{jn} = genotype and environment PCs scores for axis n ; N = number of PCs retained in the model; ϵ_{ij} = residual effect.

3. Results and discussion

The focus of plant breeding programs is principally on yield as it relates to stability and adaptability of genotypes. Ability of a genotype to utilize the environmental stimuli and show a highly predictable behavior is referred to as stability (Almeida et al., 2012). ANOVA revealed noteworthy differences amongst the 16 genotypes (15.33%) of cowpea for seed yield. Highly significant environment (14.71%), replication (0.05%) and genotype x environment (64.34%) effects were observed (Table 2).

Table 2

Analysis of variance and degree of freedom (DF) for seed yield (g plant⁻¹) measured among 16 cowpea genotypes evaluated in Akungba-Akoko, Nigeria across 6 seasons (2014-2019).

Source of Variation	DF	SS	MS	%TSS
Environment (E)	5	32124.35	6424.87**	14.71
Genotype (G)	15	33461.55	2230.77**	15.33
Replicate	2	114.56	57.28**	0.05
G×E	75	140467.42	1871.57**	64.34
Residual	190	12149.23	63.94	5.56
Total	287	218317.11	10648.43	

In literature, large magnitude of $G \times E$ interactions have been observed in cowpea (Olayiwola et al., 2015; Tariku et al., 2018; Horn et al., 2018; Odeseye et al., 2018; Sousa et al., 2018; Owusu et al., 2020) and other crop species (Baraki et al., 2020; Verma et al., 2020). The variations among the present genotypes may be due to genotype and environment factors because in

most cases, different genotypes won in different environments. This level of variation indicates the importance of multi-environment evaluation of genotypes since the aim is to pinpoint genotypes possessing predictable characters across diverse environments to guide against errors afflicting recommendation of genotypes (Almeida et al., 2012; Aremu et al., 2020). The level of diversity displayed among the genotypes in the present study would be useful for selection of parents for breeding programs and also for exploiting heterosis in the development of hybrids (Gerrano et al., 2020).

Yield for the genotypes studied across the six (6) environments are shown in Table 3. G14 won in E1 (134.97 g), G16 won in E2 (54.09 g) with G2 producing no seeds (0.00 g), G6 won in E3 (98.67 g), G3 consistently won in E4 (57.56 g) and E6 (63.88 g), whereas the performance of G15 was consistently the poorest in five of the six environments (E1, E2, E4, E5 and E6). The poor performance of G15 in terms of yield was due to the fact that it was unable to flower in most of the environments included in the study, which indicated low adaptability of the genotype to these environments (Oliveira et al., 2020). The overall best across the six environments was G10 (49.05 g), followed by G16 (45.08 g), while G14 fell in the third position with mean yield of 43.85 g per plant. The best environment for the genotypes was E1 with pooled mean yield of 47.75 g per plant, followed by E3 (44.23 g), and E6 (32.84 g) taking the third position. According to Aremu et al. (2020), differences in weather across years (environments) cause differential responses of genotypes indicating the presence of $G \times E$, hence justifying the adoption of stability, AMMI and GGE for further analysis of the performance of the crop as also opined by others (Olayiwola et al., 2015; Das et al., 2019).

FW utilizes regression coefficient as a measure of stability, and it states that regression coefficients approaching 1.0 is an indication of average stability and in turn must be linked and inferred with the mean of genotype yield to confirm adaptability (Lian and de lo Campos, 2016; Osekita, 2019). From the present FW stability analysis and ranking of seed yield across test environments (Table 4), nine out of the sixteen genotypes showed average stability with high mean yield. Genotypes 10, 16, 13 and 8 which had very high mean yield were found unstable due to the low slope of regression. The first two genotypes with the highest mean yield (G10 and G16), were unstable whereas, from the rear genotypes 12 and 2 with very low mean yields were stable judging from the slope of regression in Table 4. At the same time, selecting on the basis of stability and average yield identified the following genotypes; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12 and 14 as the best stable genotypes out of the sixteen genotypes evaluated across the test environments. These findings indicate that genotypes identified as the most stable by FW may not necessarily be the most productive as established in the present study (Padi, 2007; Almeida et al., 2012).

AMMI and GGE concepts are useful methodologies in genotype evaluation. AMMI combines ANOVA and PCA into a unified approach (Agahi et al., 2020; Verma et al., 2020), while GGE visually analyzes the results of site regression analysis for multi-environment trial data (Osekita, 2019; Tena et al., 2019). Comparison of the two analytical techniques is presented in Table 5. IPCs 1 to 3 jointly accounted for 94.7% of the entire variation among the genotypes in AMMI analysis, whereas in GGE analysis, same IPCs (1 to 3) jointly accounted for 94.1% of the entire variation. These are higher than the contributions of three PCs reported by Tariku et al. (2018) among sixteen accessions of cowpea, but similar to the findings of Baraki et al.

Table 3

Mean yield (g plant⁻¹) of 16 cowpea genotypes evaluated in Akungba-Akoko, Nigeria across 6 seasons (2014-2019).

Genotype	E1 (2014)	E2 (2015)	E3 (2016)	E4 (2017)	E5 (2018)	E6 (2019)	Genotype Mean
G1	12.59 ^{ab}	27.07 ^{bcd}	30.11 ^b	23.66 ^{fg}	21.57 ^{bcd}	28.47 ^c	23.91 ^{bc}
G2	12.04 ^{ab}	50.83 ^{de}	0.00 ^a	28.94 ^h	35.20 ^{ef}	14.33 ^b	23.56 ^b
G3	15.75 ^{ab}	34.38 ^{cde}	38.34 ^{bc}	57.56ⁱ	44.33 ^{fg}	63.88^g	42.38 ^f
G4	16.12 ^{ab}	27.71 ^{bcd}	84.13 ^{fg}	18.81 ^d	20.1 ^{bc}	46.35 ^d	35.54 ^e
G5	14.50 ^{ab}	27.40 ^{bcd}	69.01 ^{ef}	25.27 ^{gh}	53.3^g	27.45 ^c	36.16 ^e
G6	22.71 ^b	28.43 ^{bcd}	98.67^g	15.45 ^{cd}	33.37 ^{def}	53.48 ^{ef}	42.02 ^f
G7	8.39 ^{ab}	28.19 ^{bcd}	57.65 ^{de}	20.74 ^{ef}	40.57 ^{ef}	30.21 ^c	30.96 ^{de}
G8	10.24 ^{ab}	32.78 ^{b-e}	51.81 ^{cd}	19.55 ^e	28.8 ^{cde}	31.78 ^c	29.16 ^{cd}
G9	98.43 ^d	15.49 ^{abc}	31.74 ^b	12.92 ^{bc}	22.17 ^{bcd}	31.89 ^c	35.44 ^e
G10	98.45 ^d	52.91 ^e	35.06 ^{bc}	18.26 ^{de}	33.53 ^{def}	56.07 ^f	49.05^g
G11	50.81 ^c	34.68 ^{cde}	40.57 ^{bc}	11.29 ^b	0.44 ^a	1.26 ^a	23.18 ^b
G12	37.39 ^c	8.315 ^{ab}	43.85 ^{bcd}	12.65 ^{de}	0.52 ^a	18.92 ^b	20.27 ^b
G13	123.99 ^e	16.23 ^{abc}	30.51 ^b	8.93 ^{ab}	3.27 ^a	19.95 ^b	33.81 ^{de}
G14	134.97^e	31.62 ^{bcd}	31.37 ^b	9.09 ^{ab}	3.05 ^a	53.04 ^{def}	43.85 ^{fg}
G15	0.00 ^a	0.00 ^a	33.84 ^b	5.46 ^a	0.00 ^a	6.55 ^a	6.55 ^a
G16	107.68 ^e	54.09^e	31.09 ^b	17.13 ^{de}	12.23 ^{ab}	48.25 ^{de}	45.08 ^{fg}
Env. Mean	47.75	29.38	44.23	19.11	22.03	32.84	32.56

Table 4

Finlay-Wilkinson stability analysis and ranking for seed yield (g plant⁻¹) of 16 cowpea genotypes evaluated in Akungba-Akoko, Nigeria across 6 seasons (2014-2019).

Code	Slope	Standard Error	Mean Yield	Yield Rank	Stable Genotype
G1	-0.12	0.27	23.91	5	
G2	2.12	0.88	23.56	4	+
G3	1.73	0.84	42.38	13	+
G4	1.46	0.58	35.54	10	+
G5	1.32	0.32	36.16	11	+
G6	3.05	1.21	42.02	12	+
G7	3.25	1.29	30.96	7	+
G8	0.48	0.53	29.16	6	
G9	0.21	1.02	35.44	9	+
G10	-1.1	0.57	49.05	16	
G11	-0.96	0.57	23.18	3	
G12	1.03	1.01	20.27	2	+
G13	0.07	0.89	33.81	8	
G14	1.29	1.15	43.85	14	+
G15	0.02	0.02	6.55	1	
G16	0.15	0.15	45.08	15	

Note: + stable genotypes across environments

(2020) among six genotypes of mung bean. At the fifth PC, AMMI analysis accounted for 100% of the total variation, while 100% variation was accounted for at PC6 in GGE analysis indicating that wide differences was quickly achieved in AMMI compared to GGE analysis among genotypes tested in various test environments. The complete AMMI model showed the presence of significance of the G × E interactions partitioned among the five IPCAs (100%) without residuals in line with Osekita et al. (2019), and the six IPCAs for the GGE analysis. However, only the IPCA1 was significant among cowpea genotypes evaluated in South Africa (Gerrano et al., 2020) due to GEI. The observed interaction captured in a diatonic sequence among the IPCAs has been reported among many workers

Table 5

AMMI and GGE analyses for seed yield (g plant⁻¹) of 16 cowpea genotypes evaluated in Akungba-Akoko, Nigeria across 6 seasons (2014-2019).

Source	DF	AMMI Analysis				GGE Analysis			
		Variance (%)	Acum Variance (%)	SS	MS	Variance (%)	Acum Variance (%)	SS	MS
IPC1	19	74.30	74.30	104238.35	5486.23**	63.20	63.20	109840.89	5781.09**
IPC2	17	15.90	90.20	22327.29	1313.37**	18.30	81.50	31776.18	1869.18**
IPC3	15	4.50	94.70	6326.71	421.78**	12.60	94.10	21902.75	1460.18**
IPC4	13	3.10	97.80	4403.80	338.75**	2.90	97.00	5053.56	388.74**
IPC5	11	2.20	100.00	3071.27	279.21**	2.40	99.40	4120.47	374.59**
IPC6	9	0.00	100.00	0.00	0.00 ^{ns}	0.70	100.00	1135.12	126.12**

** : Highly significant; ns: Not significant.

DF: Degree of freedom; SS: Sum of squares; MS: Mean squares

(Aremu et al., 2020).

Fig. 1 presents the AMMI biplot of the first PC for yield stability among sixteen genotypes evaluated in six environments. The biplot is often used to investigate the response pattern of G, E, and their interaction (GEI) (Verma et al., 2020) utilizing means' main effect versus the first interaction principal component axis (IPCA1) (Yan et al., 2007). It is also used to discover genotypes for seed yield that have broad and particular adaptation to target conditions. By graphically combining genotypes and environments on a graph, the link between genotypes and environments became clearer. In the case of seed yield, displacement along the horizontal axis revealed variations in the main effect, but displacement along the vertical axis revealed differences in the first PCA. Furthermore, the biplot accounted for 90.2% of the treatment sum of squares, whereas the residual accounted for 9.8%. This indicates sufficient variability as 70% is the minimal amount of variability required for the AMMI to be reasonably trustworthy (Neisse et al., 2018). In addition, Tariku et al. (2018) suggested that the first three multiplicative component axes are adequate for the authentication of variation explained by GEI. This value is higher than the values reported by many workers, especially in cowpea (Tariku et al., 2018) and sugarcane (Tena et al., 2019). G11 and G12 were considered the most stable genotypes, with suitable adaptation to test environments (Fig. 2) and being the genotypes closest to zero. Since AMMI positioned them on the right-hand side of the biplot, genotypes G9, G10, G13, G14, and G16 were significantly greater yielding (Fig. 1). Likewise, in terms of both major effects and interaction, the environments were heterogeneous. Nonetheless, E2, E3, E4, E5 and E6 exhibited consistency in their responses to genotypes, and while E1 was significantly different from other environments, it was shown that E2 and E6 had relatively similar mean yield.

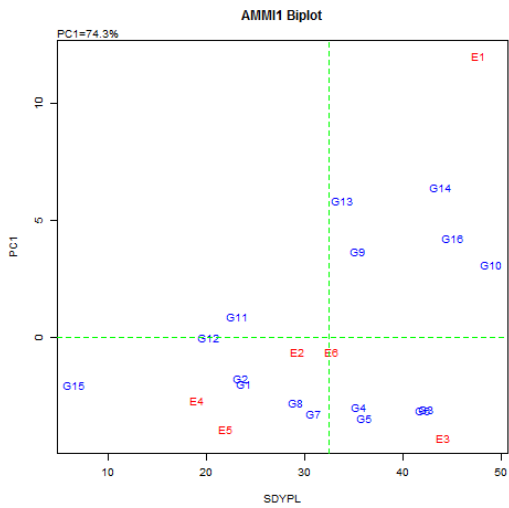


Fig. 1. AMMI Biplot showing yield (g plant^{-1}) stability on axis 1 of the Principal Component for 16 cowpea genotypes evaluated in Akungba-Akoko, Nigeria across 6 seasons (2014-2019).

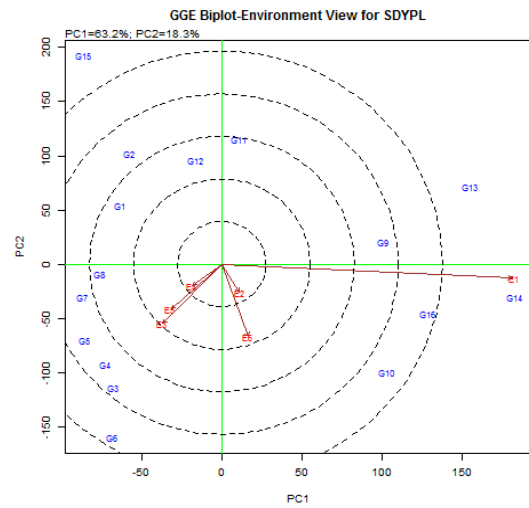


Fig. 4. Environment-vector view of the GGE biplot to show similarity among test environments in discriminating the 16 cowpea genotypes.

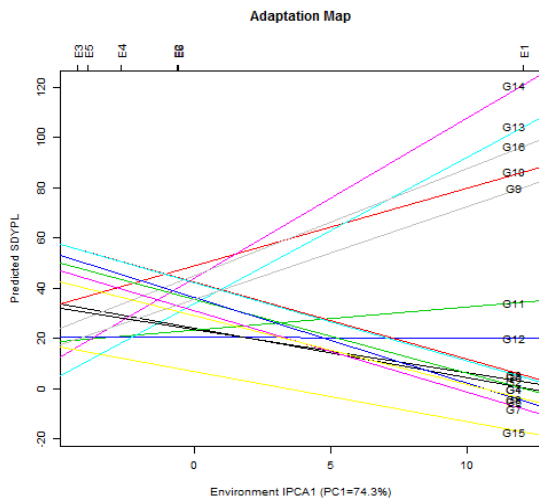


Fig. 2. Adaptation map showing stability of genotype interaction with the first Principal Component for seed yield (g plant^{-1}) of 16 cowpea genotypes evaluated in Akungba-Akoko, Nigeria across 6 seasons (2014-2019).

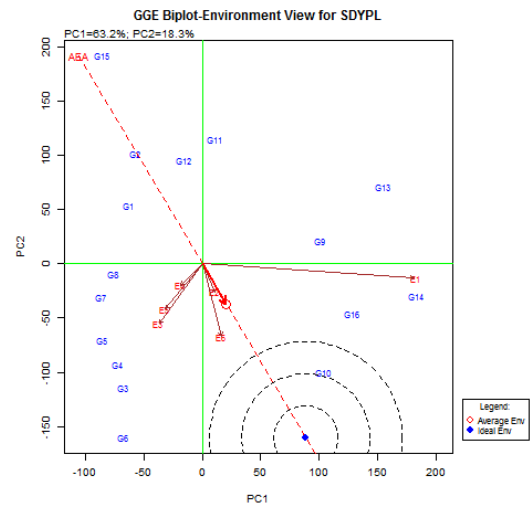


Fig. 5. The discrimination and representativeness view of the GGE biplot to rank test genotypes relative to an ideal test environment (season).

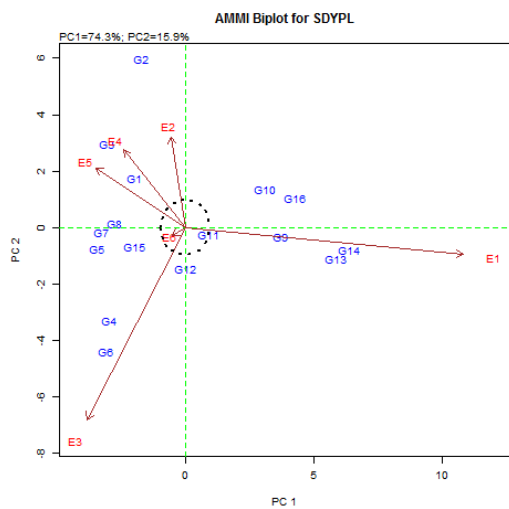


Fig. 3. AMMI Biplot for Axis 1 and 2 of the Principal Component for seed yield (g plant^{-1}) of 16 cowpea genotypes evaluated in Akungba-Akoko, Nigeria across 6 seasons (2014-2019).

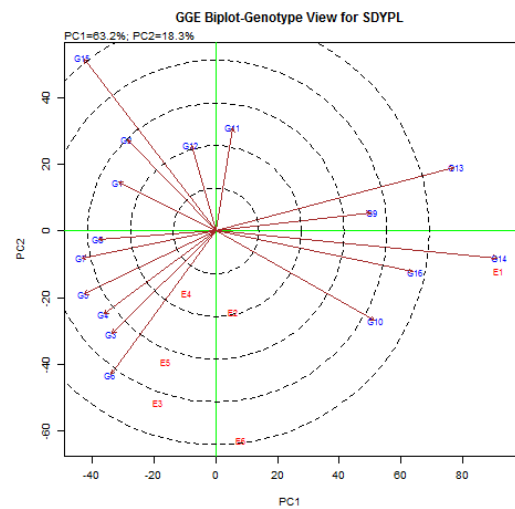


Fig. 6. The Genotype-vector view of the GGE biplot showing the performance of 16 cowpea genotypes in test environments (6 seasons).

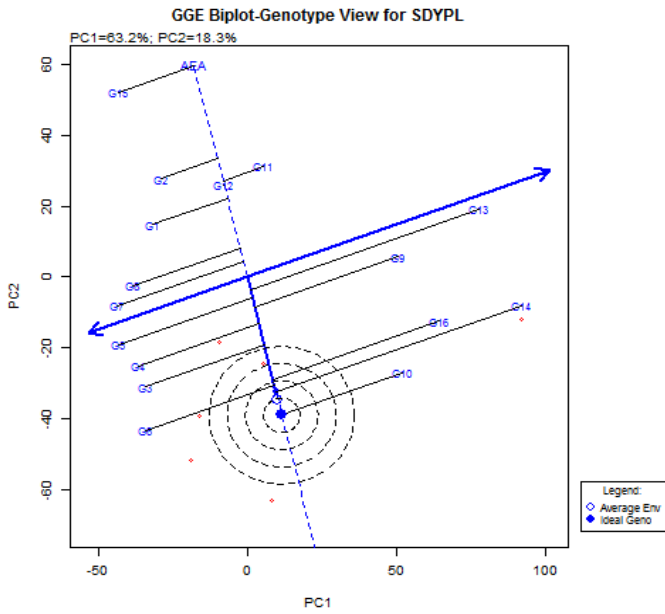


Fig. 7. Ranking of 16 cowpea genotypes based on mean yield (g plant⁻¹) and stability relative to an ideal genotype.

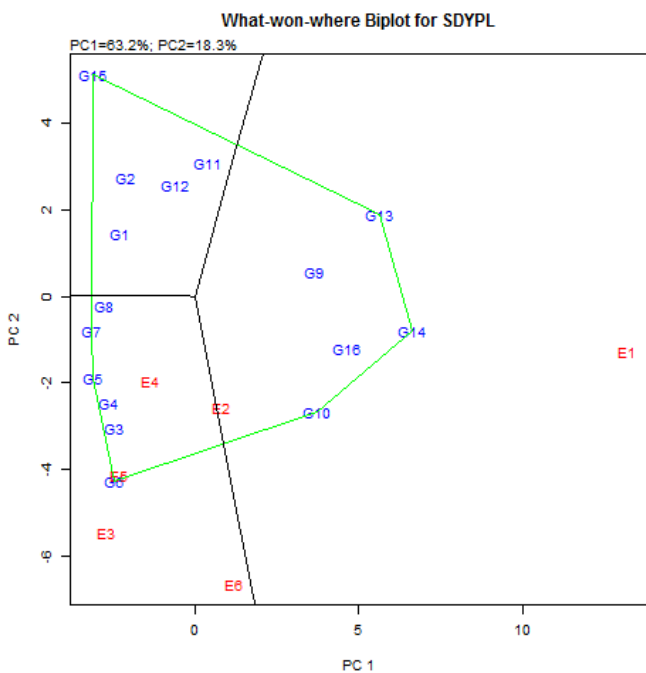


Fig. 8. Polygon view of the GGE biplot based on symmetrical scaling for the which-won-where pattern for genotypes and environments (seasons).

Fig. 3 illustrates AMMI biplot for cowpea seed yield indicating the pattern of reflection of the six environments from the biplot origin. Six rays originated from the biplot origin to show the extent of variation across the test environments. E1 had the longest ray and make an obtuse angle with the biplot origin. E2, E4 and E5 were on the same quadrant with almost equal rays making an acute angle with the biplot origin in the anti-clockwise direction. E6 had the shortest ray from the biplot origin. All the six environments make an obtuse angle with E1 in reference to the biplot origin which is an indication that differences exist between the test environment and the genotypes. G11 that falls within the circle towards the biplot

origin was considered the most stable genotype across the environment; whereas, G9, G10, G13, G14, and G16 did not differ in terms of yield, because AMMI model retained them on the right-hand side of the biplot. The present observation indicates the appropriateness of AMMI in agricultural analyses for the effective separation of G and E from GE interaction (Neisse et al., 2018). These are comparable to the outcomes of Aremu et al. (2020) in African yam bean.

Fig. 4 shows the environment-vector perception of the GGE biplot; it is predicated on an environment-centered (centering = 2) G by E table with no scaling (i.e. zero), is environment-metric preserving (SVP=2), and its axes are scaled (Yan et al., 2007; Neisse et al., 2018). This biplot described 81.5% of the overall variation in the environment-centered G × E (PC1 = 63.2 percent, PC2 = 18.3 percent). This is similar to the value reported by Gerrano et al. (2020) in cowpea genotypes. Vectors are the lines that connect the test environments to the biplot origin. The cosine of angle between two vectors approximates the correlation between them (Yan and Tinker, 2006; Maniruzzaman et al., 2019; Baraki et al., 2020). In this figure, E1, E2 and E6 are positively correlated (acute angle). Similarly, E3, E4 and E5 are positively correlated. The gap between adjacent environments indicates their disparity in respect of genotype classification. As a result, the consistency (covariance) of two environments is dictated by the length of respective vectors as well as the cosine of the angle between them. The biplot's concentric circles aid in visualizing the extent of the environment vectors, which is equal to the standard deviation inside the distinct environments and is a gauge of discriminating power (Yan and Tinker, 2006; Neisse et al., 2018). Hence, E1, E5 and E6 were the most discriminating whereas E2 and E3 the least discriminating (non-informative). Test environments found continuously non-discriminatory yield minimal information on genotypes and should thus not be used as test environments.

Fig. 5 shows the discriminatory plus representativeness perspective of the GGE biplot to classify test environments compared to an ideal test environment. The optimum test environment inside a single mega environment should be the most discriminating (informative) as well as the most reflective of the target environment (Yan and Tinker, 2006; Tariku et al., 2018; Tena et al., 2019; Gerrano et al., 2020). As a result, the center of the concentric circles in this figure represents an “ideal test environment”. It is a positive point on the Average Environment Axis (AEA) (most informative) (Sharma et al., 2016; Maniruzzaman et al., 2019; Baraki et al., 2020); E2 in addition to E6 with the smallest angle to AEA are the most representative. However, E1 with longer vector length is considered as the unsurpassed environment for choosing far and wide adapted genotypes, whereas E5 is a little bit farther and may not be adequate for choosing genotype adapted to the test environment although extra years may be necessary to ratify that an exact test environment is “ideal”. This is corroborated by the reports of Yan et al. (2007). Because E6 is both discriminating and representative, it can be an excellent test environment for choosing genotypes with broad adaptation, however E2 (most representative and least discriminative) is less useful with no appreciable information as suggested by Yan and Tinker (2006). Fig. 6 portrays the genotype-vector view of the GGE biplot depicting genotype performance in test environments. The genotype and environment vectors are both drawn here in order to visualize the specific interactions between a genotype and an environment. A genotype's productivity in an environment is

better than average if the angle between its vector and the vector of the environment is less than 90°, worse than average if the angle is greater than 90°, and near average if the angle is approximately 90° (Baraki et al., 2020). Based on the above, genotypes G9, G10, G11, G13, G14 and G16 were greater than average in E1 forming acute angles, whereas, other genotypes were below average indicating that they made obtuse angles with E1 which is the ideal environment. Fayeun et al. (2016) and Osekita et al. (2019) obtained similar results.

Fig. 7 displays the classification of genotypes founded on mean yield and stability comparative to an ideal genotype. Properties of an ideal genotype are high mean productivity and stability across environments (Maniruzzaman et al., 2019). This figure defines an ideal genotype as a positive point on the AEA with a vector length equal to the longest vectors of the genotypes along AEA positive side (highest mean performance). Consequently, genotypes positioned closer to the ‘ideal genotype’ are superior to others (Yan et al., 2007; Tena et al., 2019; Gerrano et al., 2020). Thus, G14 was superior to G10, despite the fact that G10 had higher average yield showing that it had high yield and stability. Other genotypes next to G14 with high stability and yield that could be selected for breeding programs include G16, G9 and G13. G15 was the poorest genotype for the reason that it was consistent the lowest in terms of average yield. This figure also depicts the concept of stability; the term “high stability” is only relevant when combined with “average performance”. G15 was highly unstable and poor yielding whereas others were unstable and low yielding except G2, G7, and G12 which had yield below average and highly stable. Similar results were obtained by Yan and Kang (2003), Tena et al. (2019) and Gerrano et al. (2020).

Fig. 8 displays a polygon view of the which-won-where trend of cowpea genotypes tested in six environments. The GGE biplot's polygon view reveals which genotype achieved the best performance in which environment (Yan and Tinker, 2006; Horn et al., 2018; Das et al., 2019; Maniruzzaman et al., 2019; Tena et al., 2019; Baraki et al., 2020; De Melo et al., 2020). A polygon is constructed on genotypes farthest from the biplot origin so that all other genotypes are confined inside the polygon, and then perpendicular lines are drawn beginning from the biplot origin on each side of the polygon (Yan et al., 2007). In this figure a pentagon was drawn with genotypes G13, G14, G10, G6 and G15 at the vertex of the pentagon. Perpendicular lines drawn from the biplot's origin divide the pentagon into three sectors. The equality between G13 and G14 indicates that G13 and G14 were better in all the environments, it is also noted that G9 falls within the line that connects G13 and G14, also G16 falls within the line which connects G14 and G10, by ranking it means that G13>G9>G14>G16>G10 through the environments. The equality lines that partition the biplot into sectors, with the winning genotype located on the respective vertex, which are G13, G14, G10, G6 and G15. The following genotypes; G9, G10, G13, G14 and G16 fell into sector 1 and perform best in environments E1 and E2, while G3, G4, G5, G6, G7 and G8 fell into sector 2 having environments E3, E4, E5 and E6 in common, G1, G2, G11, G12 and G15 fell into the third sector. G15 located on the vertex of the polygon without any corresponding environment is considered as low yielder as reported by Baraki et al. (2020), hence cannot be recommended for breeding programs as described by Gerrano et al. (2020).

Fig. 9 indicates the outlook of the genotypes in response to the sixteen cowpea genotypes. The performance of the genotypes varied widely in environment 1. The extent of

variation in environment 4 is convergent except for G3 that separated widely. In other environments the dispersibility of the genotypes followed a unique pattern and better response of the cowpea genotypes in terms of mean yield.

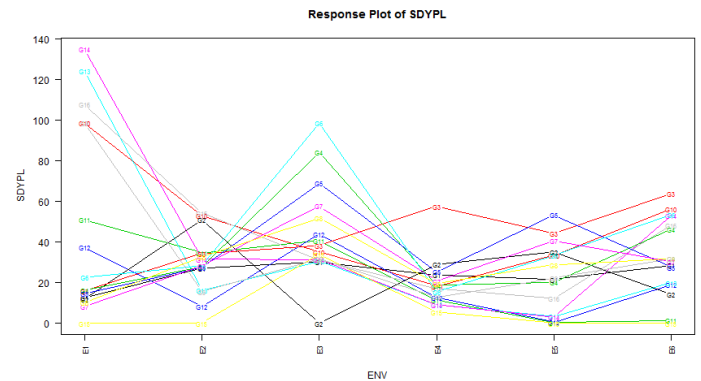


Fig. 9. Environment (season) response view of the GGE Biplot among the 16 cowpea genotypes.

Fig. 10 displays the environment view based on the cowpea genotypes, environment 4 and 6 were consistently the poorest for evaluation of the sixteen cowpea genotypes according to the graphical representation of the environment view, while others show diversity in performance in the remaining four environments. Similar results were reported by Osekita (2018).

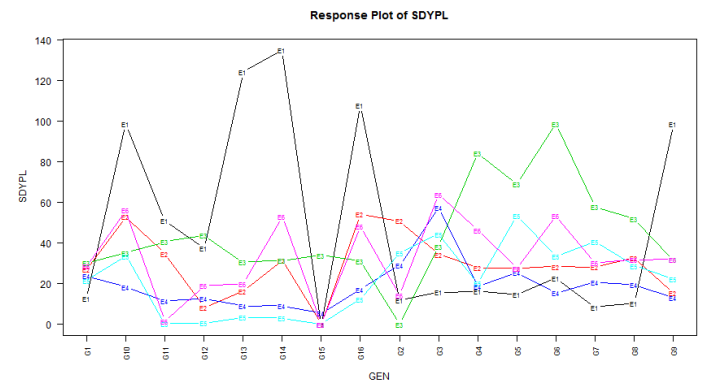


Fig. 10. Genotype response view of the GGE Biplot across test environments (seasons).

The outcomes of the current study indicate that the existing genotypes of cowpea in Nigeria and other tropical countries of the world have high stability and yield potential that could be exploited in breeding programs of the crop. For instance, G14 and G9 which were the most stable genotypes were respectively, from Burkina Faso and Nigeria in West Africa, these genotypes outperformed others which are all of tropical origins. Adoption of these genotypes in tropical countries of the world will contribute positively to the productivity of cowpea in those regions. Regions of the world where the present information could be useful include Central America, Mexico, the Caribbean islands, all of Africa excluding Tunisia, Lesotho and Swaziland. Others include part of Middle East, part of India and all countries in the South East Asia. Countries situated within the tropic are known as Tropical countries (Morgan, 2011).

4. Conclusion

In the present evaluation, seed yield was highly influenced by genotype effect, environment, and GEI. All analyses were able to pinpoint high yielding and stable genotypes in Akungba-

Akoko environment; and these included G14 and G9 as the consistent high yielding stable genotypes adopted by FW, GGE and AMMI. G14, G3, G4, G5, G6 and G9 were high yielding and stable according to FW; AMMI showed G10, G9, G16, G14 and G13 as high yielding and stable, while GGE showed G14, G16, G9 and G13 as high yielding and stable. However, consistencies of G14 and G9 with the three methods make them the candidates of choice for Akungba-Akoko environment, other parts of south west Nigeria, and are hence recommended for cultivation.

These genotypes may also exhibit similar stability and yield performances in other tropical regions of similar characteristics in Africa, Asia, America, and hence could be

References

- Agahi, K., Ahmadi, J., Oghan, H. A., Fotokian, M. H., & Orang, S. F. (2020). Analysis of genotype \times environment interaction for seed yield in spring oilseed rape using the AMMI model. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 20(1), 1-8. <https://doi.org/10.1590/1984-70332020v20n1a2>.
- Ajayi, A. T., & Gbadamosi, A. E. (2020). Genetic variability, character association and yield potentials of twenty five accessions of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Journal of Pure and Applied Agriculture*, 5, 1-16. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3956157>.
- Ajayi, A. T., Gbadamosi, A. E., Olotuah, O. F., & David, E. A. (2020). Crossability and inheritance of seed coat colour in cowpea at F₁ generation. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, 1(2), 58-62.
- Akide, B. P., Olakayode, A. O., Oyedele, D. J., & Tijani, F. O. (2020). Selected physical and chemical properties of soil under different agricultural land-use types in Ile-Ife, Nigeria. *Heliyon*, 6, e5090.
- Aliyu, O. M., Lawal, O. O., Wahab, A. A., & Ibrahim, U. Y. (2019). Evaluation of advanced breeding lines of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) for high seed yield under farmers' field conditions. *Plant Breeding and Biotechnology*, 7(1), 12-23. <https://doi.org/10.9787/PBB.2019.7.1.12>.
- Almeida, W. S., Fernandes, F. R. B., Teófilo, E. M., & Bertini, C. H. (2012). Adaptability and stability of grain yield in cowpea under different biometrics. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola*, 18, 221-228.
- Aremu, C., Ige, S. A., Ibirinde, D., Raji, I., Abolusoro, S., Ajiboye, B., Obaniyi, S., Adekiya, A., & Asaley, A. (2020). Assessing yield stability in African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) performance using year effect. *Open Agriculture*, 5(1), 202-212. <https://doi.org/10.1515/opag-2020-0020>.
- Baraki, F., Gebregergis, Z., Belay, Y., Berhe, M., & Zibelo, H. (2020). Genotype \times environment interaction and yield stability analysis of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) genotypes in Northern Ethiopia. *Cogent Food and Agriculture*, 6(1), 1-14.
- Bocianowski, J., & Prazak, R. (2022). Genotype by year interaction for selected quantitative traits in hybrid lines of *Triticum aestivum* L. with *Aegilops kotschy* Boiss. and *Ae. Variabilis* Eig. Using the additive main effects and multiplicative interaction model. *Euphytica*, 218, 11.
- Das, A., Parihar, A. K., Saxena, D., Singh, D., Singha, K. D., Kushwaha, K. P. S., Chand, R., Bal, R. S., Chandra, S., & Gupta, S. (2019). Deciphering genotype-by-environment interaction for targeting test environments and rust resistant genotypes in field pea (*Pisum sativum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 10, 825. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00825>.
- De Melo, L. F., Pinheiro, M. D. S., De Matos, R. F., Dovale, J. C., & De Magalhães Bertini, C. H. C. (2020). GGE biplot analysis to recommend cowpea cultivars for green grain production. *Revista Caatinga*, 33(2), 321-331. <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n205rc>.
- FAOSTAT, (2020). Official Website of Food and Agriculture Organization, FAOSTAT_data_8-29-2020-Excel, <http://faostat.fao.org>, Last Accessed on January 29, 2022.
- Fayeun, L. S., Hammed, L. A., Oduwaye, O. A., Madike, J. U., & Ushie, E. U. (2016). Estimates of genetic variability for seedling traits in fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook. F). *Plant Breeding and Biotechnology*, 4(2), 262-270. <https://doi.org/10.9787/pbb.2016.4.2.262>.
- Gerrano, A. S., Adebola, P. O., Jansen van Rensburg, W. S., & Laurie, S. M. (2015). Genetic variability in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) genotypes. *South African Journal of Plant and Soil*, 32(3), 165-174. <https://doi.org/10.1080/02571862.2015.1014435>
- Gerrano, A. S., Jansen van Rensburg, W. S., Mathew, I., Shayanowako, A. I., Bairu, M. W., Venter, S. L., ... & Labuschagne, M. (2020). Genotype and genotype \times environment interaction effects on the grain yield performance of cowpea genotypes in dryland farming system in South Africa. *Euphytica*, 216(5), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02611-z>.
- Gomes, A., Nhantumbo, N., Ferreira-Pinto, M., Massinga, R., Ramalho, J. C., & Ribeiro-Barros, A. (2019). Breeding elite cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] varieties for improved food security and income in Africa: Opportunities and challenges. *Legume Crops-Characterization and Breeding for Improved Food Security*, 626-640.
- Horn, L., Shimelis, H., Sarsu, F., Mwadzingeni, L., & Laing, M. D. (2018). Genotype-by-environment interaction for grain yield among novel cowpea (*Vigna unguiculata* L.) selections derived by gamma irradiation. *The Crop Journal*, 6, 306-313.
- Kebede, E., & Bekeko, Z. (2020). Expounding the production and importance of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in Ethiopia. *Cogent Food and Agriculture*, 6(1), 1769805. <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1769805>.
- Lian, L., & De Los Campos, G. (2016). FW: An R package for Finlay-Wilkinson regression that incorporates genomic/pedigree information and covariance structures between environments. G3: *Genes, Genomes, Genetics*, 6(3), 589-597. <https://doi.org/10.1534/g3.115.026328>.
- Maniruzzaman, I. M. Z., Begum, F., Khan, M. A. A., Amiruzzaman, M., & Hossain, A. (2019). Evaluation of yield stability of seven barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes in multiple environments using GGE biplot and AMMI model. *Open Agriculture*, 4(1), 284-293. <https://doi.org/10.1515/opag-2019-0027>.
- Morgan, R. F. (2011). A new journal for Torrid Zone. *Journal of Tropical Psychology*, 1(1), 1-1.
- Neisse, A. C., Kirch, J. L., & Hongyu, K. (2018). AMMI and GGE Biplot for genotype \times environment interaction: a medoid-based hierarchical cluster analysis approach for high-dimensional data. *Biometrical Letters*, 55(2), 97-121. <https://doi.org/10.2478/bile-2018-0008>.
- Odeseye, A. O., Amusa, N. A., Ijagbone, I. F., Aladele, S. E., & Ogunkanmi, L. A. (2018). Genotype by environment interactions of twenty accessions of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] across two locations in Nigeria. *Annals of Agrarian Science*, 16, 481-489.
- Oladele, S. O., Adeyemo, A. J., & Awodun, M. A. (2019). Influence of rice husk biochar and inorganic fertilizer on soil nutrients availability and rain-fed rice yield in two contrasting soils. *Geoderma*, 336, 1-11.
- Oladele, S. O., Adeyemo, A., Awodun, M., Adegaye, A., & Ingold, M. (2022). Impact of biochar amendment on soil nematode communities in a West African rain-fed rice cropland. *Nematology*, 24, 159-170.
- Olayiwola, M. O., Soremi, P. A. S., & Okeleye, K. A. (2015). Evaluation of some cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) genotypes for stability of performance over 4 years. *Current Research in Agricultural Science*, 2(1), 22-30.
- Oliveira, D. P., Soares, B. L., Ferreira, P. A. A., Passos, T. R., da Silva, J. S., Ferreira, D. F., Messias de Andrade, J. B., & de Souza Moreira, F. M. (2020). Adaptability and phenotypic stability of elite strains of

- rhizobia for inoculation in cowpea confirmed by biometric techniques. *Soil Science Society of America Journal*, 84(4), 1125-1138. <https://doi.org/10.1002/saj2.20084>.
- Osekita, O. S. (2018). Genotype × Environment interaction and molecular diversity studies of selected rice (*Oryza sativa* L.) genotypes across three Nigerian agro-ecological zones, Doctoral Dissertation, (pp. 1-194). Federal University of Technology, Akure, Nigeria.
- Osekita, O. S. (2019). Stability and yield of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes at three agro ecological zones of South west Nigeria. *South Asian Research Journal of Biology and Applied Biosciences*, 1(2), 38-42. <https://doi.org/10.36346/sarjbab.2019.v01i02.002>.
- Owusu, E. Y., Amegbor, I. K., Mohammed, H., Kusi, F., Atopkle, I., Sie, E. K., ... & Nutsugah, S. K. (2020). Genotype × environment interactions of yield of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) inbred lines in the Guinea and Sudan savanna ecologies of Ghana. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 23(5), 453-460. <https://doi.org/10.1007/s12892-020-00054-5>.
- Padi, F. K. (2007). Genotype × environment interaction and yield stability in a cowpea-based cropping system. *Euphytica*, 158, 11-25.
- PBTools, (2014). PBT App (Version 1.4). Biometrics and Breeding Informatics, <https://www.irri.org/bbi/products>, Last Accessed on February 13, 2022.
- Pour-Aboughadareh, A., Barati, A., Koohkan, S. A., Jabari, M., Marzoghian, A., Gholipour, A., ... & Kheirgo, M. (2022). Dissection of genotype-by-environment interaction and yield stability analysis in barley using AMMI model and stability statistics. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1), 1-12.
- Salami, B. T., & Sangoyomi, T. E. (2013). Soil fertility status of cassava fields in South Western Nigeria. *American Journal of Experimental Agriculture*, 3(1), 152-164.
- Sharma, M., Ghosh, R., Telangre, R., Rathore, A., Saifulla, M., Mahalinga, D. M., ... & Jain, Y. K. (2016). Environmental influences on pigeonpea-Fusarium udum interactions and stability of genotypes to Fusarium wilt. *Frontiers in Plant Science*, 7, 253. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00253>.
- SPSS, (2017). SPSS App (Version 20). SPSS Inc., Chicago IL, USA.
- Sousa, M. B., Damasceno-Silva, K. J., Rocha, M. D. M., De Menezes Júnior, J. Á. N., & Lima, L. R. L. (2018). Genotype by environment interaction in cowpea lines using GGE biplot method. *Revista Caatinga*, 31(1), 64-71. <https://doi.org/10.1590/1983-21252018v31n108rc>
- Tariku, S., Wassu, M., & Berhanu, A. (2018). Genotype by environment interaction and stability analysis of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] genotypes for yield in Ethiopia. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 10(9), 249-257. <https://doi.org/10.5897/jpbcs2018.0753>.
- Tena, E., Goshu, F., Mohamad, H., Tesfa, M., Tesfaye, D., & Seife, A. (2019). Genotype × environment interaction by AMMI and GGE-biplot analysis for sugar yield in three crop cycles of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) clones in Ethiopia. *Cogent Food and Agriculture*, 5, 1-14.
- United Nation, (2019). World Population Prospects, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12283219>, Last Accessed on January 15, 2022.
- Verma, A., Kumar, V., & Kharab, A. S. (2020). G × E interaction analysis by AMMI model for fodder yield of dual purpose barley genotypes. *International Journal of Bio-Resource and Stress Management*, 11(1), 051-056. <https://doi.org/10.23910/ijbsm/2020.11.1.2064>.
- Yan, W., & Kang, M. S. (2003). *GGE-biplot analysis: a graphical tool for breeders, geneticists and agronomists*. CRD Press, Boca Raton, FL, USA.
- Yan, W., & Tinker, N. A. (2006). Biplot analysis of multi-environment trial data: Principles and applications. *Canadian Journal of Plant Science*, 86(3), 623-645. <https://doi.org/10.4141/P05-169>.
- Yan, W., Kang, M. S., Ma, B., Woods, S., & Cornelius, P. L. (2007). GGE biplot vs. AMMI analysis of genotype-by-environment data. *Crop Science*, 47, 643-653.

Cite as: Ajayi, A. T., Gbadamosi, A. E., Osekita, O. S., Taiwo, B. H., Babawole, F. A., Adedeji, I., & Omisakin, T. F. (2022). Genotype × environment interaction and adaptation of cowpea genotypes across six planting seasons. *Front Life Sci RT*, 3(1), 7-15.



Research article

The Genus *Dichodon* (Caryophyllaceae) in Turkey

Mustafa Keskin*¹ ¹ Marmara University, Institute of Pure and Applied Sciences, Biology Program, 34722, Goztepe, Istanbul, Turkey

Abstract

Dichodon (Bartl. ex Rchb.) Rchb. is a small genus and was formerly included in *Cerastium*. However, the first specimens of this genus were introduced to the literature as *Stellaria*. *Dichodon*, taxonomically, remains in between *Cerastium* and *Stellaria* genera. Although there are 16 identified species worldwide, the status of some of them is doubtful. There are three species identified so far in Turkey. In this study, the taxonomic status of the species belonging to the genus *Dichodon* is discussed. A species previously mentioned as a synonym has been validated. The distribution of all species in Turkey is shown on the maps and scientific Turkish names are suggested for the species. In addition, a new identification key was proposed for the first time and herbarium photographs of the species were added to the study.

Keywords: *Cerastium*; *Dichodon*; distribution; key; new combination; Turkey

1. Introduction

The Genus *Dichodon* was first published by Reichenbach (1841a). *D. anomalum* and *D. cerastoides* was reported again by Reichenbach (1841b).

After this genus was published, it was generally accepted by most floras as a subgenus of the genus *Cerastium* (Cullen, 1967). Later, Ikonnikov (1973, 1976) was the first author to accept *Dichodon* as separate genus from *Cerastium* basically based on the number of stylus.

There are 16 species which are mostly treated as synonyms of *Cerastium* reported under the generic name *Dichodon* according to The Plant List database (2013).

Finally, a published study stated that the genus *Dichodon* includes five species without specific name (Hernandez-Ledesma et al., 2015).

Species delimitation in *Dichodon* is uncertain and requires more detailed investigation to address the taxonomic problems (Arabi et al., 2018).

The biggest reason for this uncertainty in the genus *Dichodon* can be explained by its similarity to the genus *Cerastium* and *Stellaria*. In addition, low number of species and

limited distribution is another factor. Finally, the lack of current studies focusing on the distinction between the genera stands out as another problem. There is a need for monographic work around the world.

2. Materials and methods

The investigated specimens were obtained during both field studies and herbarium works.

Herbarium specimens from various herbaria such as E, ANK, GAZI, HUB, EGE, ISTE, ISTF, ISTO, VANF, HARRAN and KNYA were also used for detailed morphological studies. Measurable morphological features of each species were noted in detail and photographs of the specimens were taken.

The maps presented in the article have been prepared in the light of the data obtained during the herbarium studies and the samples collected by the author during his field trips.

3. Results

3.1. *Dichodon* (Bart. ex Reich.) Reichenbach, Deut. Bot. Herb.-Buch 205 (1841). *üçboynuz* (proposal).

* Corresponding author.

E-mail address: trifolium@hotmail.com (M. Keskin).<https://doi.org/10.51753/flsrt.1000995> Author contributions

Received 26 September 2021; Accepted 09 January 2022

Available online 01 April 2022

2718-062X © 2022 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

Syn.: *Cerastium* subg. *Dichodon* (Bartling ex Reichenbach 785 (1832). *Cerastium* sect. *Dichodon* (Bartling ex Reichenbach 785 (1832). *Stellaria* [unranked] *Dichodon* Bartl. ex Rchb., Fl. Germ. Excurs.: 785 (1832). *Provancheria* B.Boivin, Naturaliste Canad. 93: 644 (1967).

Lectotype: *Dichodon viscidus* (M.Bieb.) Holub.

Annuals, biennials, or perennials herbs. Stems glabrous or glandular hairy at upper parts of stem; strict, ascending, or prostrate. Leaves somewhat fresh, linear-lanceolate or spatulate. Bracts herbaceous. Inflorescences a few flowered. Pedicels strict or recurved at fruiting time. Sepals ovoid to lanceolate, usually membranous at edges on inner parts; entire to narrowly membranous on outers parts. Petals 5 pieces, white, sub entire to deeply cutting. Styles 3. Stamens (5-) 10. Capsules oblong to cylindrical; opening 6 teeth; teeth strict, sub recurved to circinate. Seeds more with tuberculate.

3.2. Identification key for Turkish *Dichodon* species

1. Perennials; stems prostrate with non-flowered branches, caespitose

1. Annuals; stems strict, only a few branch

cerastoides

2. Stems densely glandular-viscid; alar pedicels 12-45 mm; petal 2-times longer than sepal

viscidus

2. Stems only inflorescence area glandular; alar pedicels 8-12 mm; petal slightly longer than sepal

kotschyi

3.3. *Dichodon cerastoides* (L.) Rchb., Icon. Fl. Germ. Helv. 5: f. 4915 (1841).

Perennials. Stems 5-25 cm, shallow striate, caespitose; glabrous to hairy sometimes glandular-viscid. Leaves 7-25 × 1.5-3 mm, linear to lanceolate, glabrous to hairy at upper. Inflorescence 3-7 flowered rarely 1-flowered. Bracts ovoid to lanceolate. Pedicel 10-25 mm, usually glandular, sometimes shortly hairy, or almost glabrous; recurved at fruiting times. Sepal 4-7 mm, linear to lanceolate, one nerved, membranous at edges; loosely hairy or almost glabrous. Petal 8-15 mm, obovoid, deeply notched; longer than sepal or almost equal to sepal; clav glabrous. Stamen 10; filaments glabrous. Styles 3. Capsule 10-12 mm, cylindrical, opening with 6-teeth; teeth sub recurved. Seeds cordate-globose with tuberculate.

a. Plants glabrous or loosely hairy with or without a few glandular hairs

var. *cerastoides*

a. Plants glandular-viscid

var. *argaeum*

3.3.1. var. *cerastoides* / üçboynuz (proposal). Fig. 1 & 2

Syn. *Alsine multicaulis* E.H.L.Krause, Deutschl. Fl., ed. 2. 5: 68 (1901). *Centunculus alpinus* Scop., Fl. Carniol., ed. 2. 1: 321 (1771). *Cerastium cerastoides* (L.) Britton, Mem. Torrey Bot. Club v. 152 (1894). *Cerastium elegans* Fisch. ex Ser., Prodr. 1: 400 (1824). *C. lagascanum* C.Vicioso, Anales Jard.

Bot. Madrid 6(2): 27 (1946). *C. lapponicum* Crantz, Inst. Rei Herb. 2: 402 (1766). *C. nivale* D.Don ex Nyman, Consp. Fl. Eur. 1: 110 (1878). *C. refractum* All., Fl. Pedem. ii. 117 (1785). *C. rupestre* Fisch. ex Ser., Prodr. 1: 417 (1824). *C. stellarioides* Hartm., Handb. Skand. Fl. 181 (1820). *C. stellarioides* Hegetschw., Fl. Schweiz 434 (1838). *C. trigynum* Vill. var. *brachypetala* Lange, Meddel. Grønland 3: 244 (1909). *C. trigynum* Vill., Prosp. Hist. Pl. Dauphiné 48 (1779). *Provancheria cerastioides* (L.) B.Boivin, Naturaliste Canad. xciii. 645 (1966). *Stellaria cerastoides* L., Sp. Pl. 1: 422 (1753).

Lectotype: Herb. Linn. No.584/10 (LINN! <<http://linnean-online.org/6101/>> accessed: 12.09.2021>). Flowering time: 5-9. month.



Fig. 1. General view of *Dichodon cerastoides* var. *cerastoides*.



Fig. 2. Distribution of *Dichodon cerastoides* var. *cerastoides* in Turkey.

3.3.2. var. *argaeum* (Boiss. & Balansa) M. Keskin comb. nov. / rana üçboynuz (proposal). Fig. 3 & 4

Syn. *Arenaria argaea* (Boiss. & Balansa) Shinnars, Sida 1: 50 (1962). *Cerastium argaeum* Boiss. & Balansa, Diagn. Pl. Orient. ser. 2, 6: 38 (1859). *Dichodon argaeus* (Boiss. & Balansa) Ikonn., Novosti Sist. Vyssh. Rast. (New Delhi) 10: 142 (1973).

Type: in regione alpina superiori montis Argaei Cappadociae alt. 3650 m, Fl. Aug. cl. Balansa.

Flowering time: 2-8. Month 3

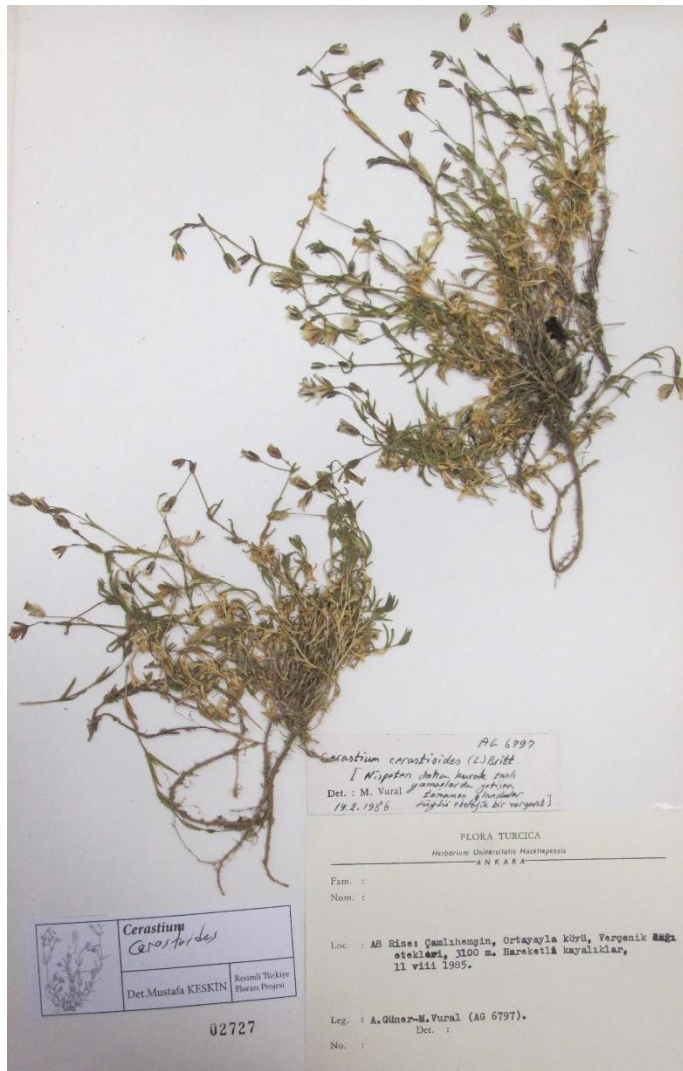


Fig. 3. General view of *Dichodon cerastoides* var. *argaeum*.



Fig. 4. Distribution of *Dichodon cerastoides* var. *argaeum* in Turkey.

3.4. *Dichodon viscidus* (M.Bieb.) Holub, Folia Geobot. Phytotax. 9(3): 273 (1974). / guddeli üçboynuzotu. (proposal). Fig. 5 & 6

Syn. *Arenaria anomala* (Waldst. & Kit. ex Willd.) Shinnars, Sida 1: 50 (1962). *Cerastium anomalum* Waldst. & Kit. ex Willd., Sp. Pl. ed. 4: 2(1): 812 (1799). nom. illeg. *C. dubium* (Bastard) O.Schwarz, Mitt. Thüring. Bot. Ges. i. 98 (1949). *C. mauritanicum* Pomel, Nouv. Mat. Fl. Atl. 206 (1874). *Dichodon anomalum* (Willd.) Reichenb, Icon. Fl. Germ. 5: 34 (1841). *D. anomalus* Rchb., Icon. Fl. Germ. Helv. 5: 34 (1841). nom. illeg. *D. dubium* (Bastard) Ikonn., Novosti Sist. Vyssh. Rast. 10: 141 (1973). *Holosteum dichotomum* K.Koch, Linnaea 15(6): 708 (1842). *Provancheria dubia* (Bastard) B.Boivin, Naturaliste Canad. xciii. 644 (1966). *Stellaria anomala* Rchb., Fl. Germ. Excurs. 785 (1832). nom. illeg. *S. dubia* Bastard, Suppl. Essai Fl. Maine-et-Loire 24 (1812). *S. viscida* M. Bieb., Fl. Taur.-Caucas. 1: 342 (1808).

Lectotype: *Dichodon dubium* (Bastard) Ikonn. (= *Dichodon viscidus* (M.Bieb.) Holub) (Bas. *Stellaria dubia* Bastard) by Ikonnikov: “Novosti Sistematiki Vysshikh Rastenii 10: 141 (1973)”.

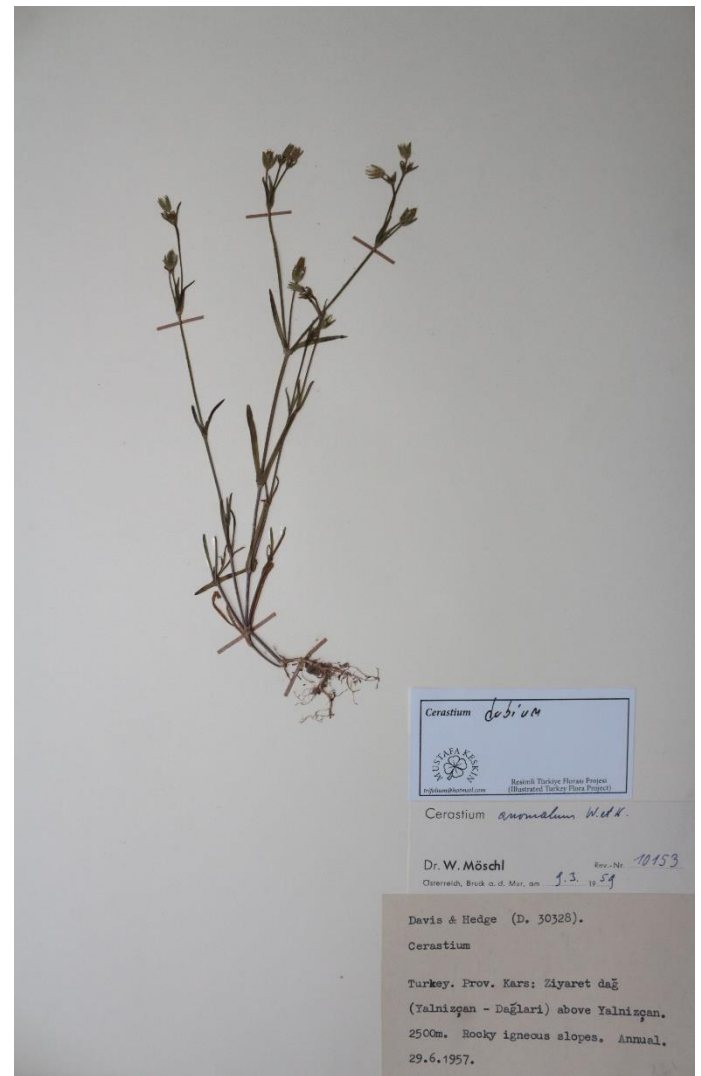


Fig. 5. General view of *Dichodon viscidus*.

herbarium photographs were added to the study.

Table 1

The distinction between *Cerastium* and *Dichodon*.

	<i>Cerastium</i>	<i>Dichodon</i>
Style	(4-) 5	3
Petal	At most notched to middle, usually less	deeply notched
Capsule teeth	(8-) 10	6
Seed surface	tuberculate or colliculate	typical verrucate type

It was understood that *D. viscidus* is the most common species in the genus *Dichodon* in Turkey. This species is often known as *Cerastium dubium* (syn.: *C. anomalum*). However, the first name of this species, *Stellaria viscida*, was ignored because a false first specimen was studied for years. This mistake was noticed and corrected by Holub (1974). Therefore, in this article, *Dichodon viscidus* is used as the real name of the species.

The species *D. cerastoides* is a perennial, usually ground cover, and grows in an ascending form. This species is more likely to be distributed because it generally likes to grow at high altitudes. While *Dichodon argaeum* (syn.: *Cerastium argaeum*) was accepted as a synonym of *D. cerastoides* (syn.: *C.*

cerastoides) in previous studies, in this study it was concluded that it should be a variety of *D. cerastoides*. It is distinguished by its glandular hairs.

D. kotschyi (as *C. kotschyi*) has been described as an indeterminate species in the Flora of Turkey (Cullen, 1967) since it was reported from Van with only one record examined. Although one more record from Hatay was mentioned, this example was not seen by the author in the Flora of Turkey (Cullen, 1967), and no sample from Hatay was seen in this study.

Based on the samples examined, the distribution of this species was expanded, and it was concluded that there was no problem in the taxonomic status of the species.

Acknowledgments: I would like to thank the ANG foundation for their financial contribution to herbarium trips.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interests.

Informed consent: The authors declare that this manuscript did not involve human or animal participants and informed consent was not collected.

References

- Arabi, Z., Ghahremaninejad, F., Rabeler, R.K., Sokolova, I., Heubl, G., & Zarre, S. (2018). On the taxonomic status of the genus *Dichodon* (Caryophyllaceae: tribe Alsineae): morphological and molecular evidence reassessed. *Phytotaxa* 360 (3): 220-236.
- Cullen, J. (1967). *Cerastium*. In: Davis, P.H. (ed.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 2 (pp. 73-85). Edinburgh University Press.
- Hernandez-Ledesma, P., Berendsohn, W. G., Borsch, T., Von Mering, S., Akhani, H., Arias, S., ... & Uotila, P. (2015). A taxonomic backbone for the global synthesis of species diversity in the angiosperm order Caryophyllales. *Willdenowia*, 45(3), 281-383. <https://doi.org/10.3372/wi.45.45301>.
- Holub, J. (1974). New names in Phanerogamae 3. *Folia Geobot. Phytotax*, 9, 261-275. <https://doi.org/10.1007/BF02853148>.
- Ikonnikov, S. S. (1973). Notae de Caryophyllaceis, 1. [Notes on Caryophyllaceae, 1. On the genus *Dichodon* (Bartl.) Reichb.]. *Novosti Sistematiki Vysshikh Rastenii*, 10, 136-142.
- Ikonnikov, S. S. (1976). Notae de Caryophyllaceis, 3. [Notes on Caryophyllaceae, 3. On the genus *Dichodon* (Bartl.) Reichb.]. *Novosti Sistematiki Vysshikh Rastenii*, 13, 113-120.
- Reichenbach, H. G. L. (1841a). *Der Deutsche Botaniker. Erster Band. Das Herbarienbuch* (pp. 1-236). Arnoldische Buchhandlung, Dresden and Leipzig.
- Reichenbach, H. G. L. (1841b). *Icones Florae Germanicae et Helveticae*, vol. 5. (pp. 1-38). Sumptibus Friderici Hofmeister Lipsiae [Leipzig].
- The Plant List (2013). *Dichodon*. The Plant List. A working list of all plant species. Available from: www.theplantlist.org. Last Accessed on 12 February 2022.

Cite as: Keskin, M. (2022). The Genus *Dichodon* (Caryophyllaceae) in Turkey. *Front Life Sci RT*, 3(1), 16-20.



Research article

Epidemiological analysis of the diagnostic results of COVID-19 infection in Bishkek by real-time PCR method

Aizhan Sadyrbaeva^{*1,2} , Kadyrbai Chekirov³ 

¹ Kyrgyz-Turkish Manas University, Institute of Pure and Applied Sciences, Biology Program, 720038, Bishkek, Kyrgyzstan

² Republican Center for Quarantine and Especially Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Laboratory of Virology and Rare Infections, 720005, Bishkek, Kyrgyzstan

³ Kyrgyz-Turkish Manas University, Faculty of Science, Department of Biology, 720038, Bishkek, Kyrgyzstan

Abstract

The aim of the research is to analyze the diagnostic results of infected people with the COVID-19 in Bishkek. Therefore, in this study, with the aim of epidemiologically analyzing the COVID-19 infection in the city, diagnostic PCR research was carried out at the Center for Quarantine and Highly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic in the Laboratory of Virology and Rare Infections. During the period of operation from 01st May 2020 to 31st March 2021, 28,863 samples from patients of the Sverdlovsky and Pervomaisky districts of Bishkek were examined by the real-time PCR. For laboratory diagnostics of COVID-19, according to the recommendations of the WHO and Russian regulatory documents, obtained biomaterials from the upper respiratory tract like swabs from the nasopharynx and oropharynx were used. Biological materials were collected from patients with symptoms of upper respiratory tract infections and from patients who contacted with COVID-19 infected people applied to Family Medicine Centers in Bishkek city for the purpose of preventive examination and treatment. The samples were identified by real-time PCR, in accordance with the “biological safety” rules. From 28,863 samples 3,255 positive and 25,575 negative results were found. In the study, the largest number of samples from patients with symptoms of COVID-19 infection was recorded in June, and July, 2021, as 7,604, and 4,074, respectively. In June, 738 positive results were detected from 7,604 samples, while in July, 540 positive results were detected from 4,074 samples. This period is estimated to be the acute dynamic period of the epidemiological situation in Bishkek (Pervomaisky and Sverdlovsky districts). The epidemiological situation was stable in August and September, with the number of infected in August was 17 cases, and in September 2 cases. However, since September 2020, the number of infected people with COVID-19 has been growing. Besides, the results of PCR diagnostics from 01st January to 31st March 2021 indicated that the epidemiological situation was assessed as “relatively stable”.

Keywords: Amplification; cDNA; COVID-19; RdRP; RT-PCR; SARS-CoV-2

1. Introduction

Humanity has been in eternal confrontation with the micro world for all the time of existence. The struggle between human and microbes is going on for centuries resulting in great losses of human’s lives since ancient times (Kolodkina et al., 2020). Throughout the history of society, mankind has faced a number

of epidemics of infectious diseases as smallpox, plague, cholera, swine flu, Ebola and many others (Razumenko, 2022).

SARS-CoV (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus) is an -enveloped single-stranded (+) RNA virus belonging to the subgenus Sarbecovirus of the genus Betacoronavirus (Genc, 2020). The new virus was named SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus

* Corresponding author.

E-mail address: aikasadyrbaeva80@gmail.com (A. Sadyrbaeva).

<https://doi.org/10.51753/flsrt.1050857> Author contributions

Received 30 December 2021; Accepted 13 March 2022

Available online 05 April 2022

2718-062X © 2022 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

2) coronavirus of the second type, causing severe acute respiratory syndrome by the International Committee on the Taxonomy of Viruses (WHO, 2020a).

In December 2019, for the first time, World Health Organization (WHO) was informed about the appearance of a severe acute illness in Wuhan (Hubei Province, China), accompanied in some cases by the development of respiratory distress syndrome. The disease caused by the new coronavirus was named by WHO “COVID-19”, and the virus “SARS-CoV-2” (Gu et al., 2016; Tokel, 2021). On 30th of January 2020 WHO declared the outbreak of COVID-19 as a public health emergency (WHO, 2020b). On 11st of March 2020, due to the rapid and widespread infection, WHO declared the COVID-19 as a pandemic (WHO, 2020c).

Since March 2020, the first cases of COVID-19 infection have been registered in Kyrgyzstan, and these cases were identified using the real-time PCR technique (Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, 2020). A number of factors influenced the numerous registered cases of infection such as the organization of testing processes in the country, the potential resource of the healthcare system, the accuracy of the test systems used, the speed and quality of patient isolation and quarantine measures.

The purpose of the research is to analyze the diagnostic results of infected people with the COVID-19 and to assess the dynamics of the epidemiological situation in the capital of Kyrgyzstan, Bishkek (Sverdlovsky and Pervomaisky districts).

Biological materials were collected from patients with symptoms of upper respiratory tract infections (fever, cough, fatigue, shortness of breath, muscle pain, sore throat and headache) and from patients who contacted with COVID-19 infected people applied to “Family Medicine Centers” in Bishkek city for the purpose of preventive examination and treatment. The samples were identified by real-time PCR, in accordance with the “biological safety” rules.

2. Materials and methods

The real-time PCR method was used to analyze the results of PCR diagnostics of COVID-19 infection, to research and assess the dynamics of the epidemiological situation. It is recognized as the standard reference for laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 coronavirus infection. The main advantages of the system are; high sensitivity, specificity and the fact that the reaction and analysis are carried out simultaneously in a closed system, which minimizes the likelihood of obtaining false positive results due to contamination with amplification products. WHO recommends using the real-time PCR method together with reverse transcription of viral Ribonucleic acid (RNA) to confirm cases of COVID-19 infection (WHO, 2020d).

In this study, 28,863 samples from patients of the Sverdlovsky and Pervomaisky districts of Bishkek city were used as the source of material (Table 1).

In the process of PCR diagnostics of COVID-19, “AmpliSens RIBO-PREP” diagnostic kit was used for RNA extraction as recommended by the Central Research Institute of

Epidemiology of Russia. Then, “REVERTA-L” kit (AmpliSens) was used for obtaining cDNA to carry out the RT-PCR reaction. The AmpliSens Cov-Bat-FL kit was used for amplification with hybridization-fluorescence detection of amplification products (Table 2).

Table 2

The analysis of the accumulation curves of fluorescent signals was carried out on three channels.

Fluorophore Channel	FAM	Hex/Rox
cDNA target sequences	cDNA IC sample	SARS-CoV-2
Amplification area	Artificial nucleotide sequence	RdRP gene (RNA-dependent RNA polymerase)

The diagnostic sensitivity of the kit for detecting SARS-CoV-2 coronavirus RNA is 100% (93-100), with a confidence level of 95%, while the diagnostic specificity of the kit for detecting SARS-CoV-2 coronavirus RNA is 100% (94-100), with a confidence level of 95% (Amplisens, 2020).

3. Results

During the process of operation from 01st May 2020 to 31st March 2021, 28,863 samples from patients of the Sverdlovsky and Pervomaisky districts of Bishkek were examined by the real-time PCR. From 28,863 samples, 3,255 patients were found infected with SARS-CoV-2, and the remaining 25,575 were negative (Table 3).

As obvious from the data in Table 1, the results of PCR diagnostics carried out from 01st May to 31st December 2020 indicate that the largest number of samples from patients with symptoms of COVID-19 infection was in June. There were 738 COVID-19 positive results out of 7604 tested samples (9.70%). This period can be called an “acute period” of the dynamics of the epidemiological situation in Bishkek. The change in the epidemiological situation during this period is clearly illustrated in Fig. 1.

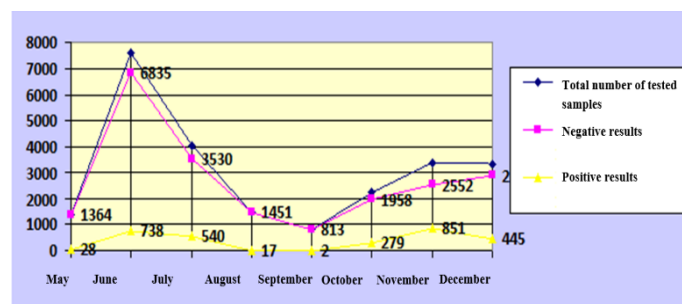


Fig. 1. Graph of the dynamics of the epidemiological situation in Bishkek (Pervomaisky and Sverdlovsky districts) from 01st May 2020 to 31st December 2020 period.

The graph above (Fig. 1) shows that the epidemiological situation stabilized in August and September, while the number of those registered in the database with suspected contamination

Table 1

The total number of tested samples by months of 2020-2021.

Number of Samples for PCR Diagnostics by Months											Total Number of Samples
2020 Year							2021 Year				
May	June	July	August	September	October	November	December	January	February	March	
1392	7604	4074	1468	815	2237	3403	3341	1946	1585	998	28863

Table 3

Dynamics of the epidemiological situation in Bishkek (Pervomaisky and Sverdlovsky districts) from 01st May 2020 to 31st March 2021 (monthly determined dynamic on the base of the results of PCR diagnostics).

Months	Total Number of Tested Samples	From the Total Number of Tested Samples					
		Identified Negative Results		Identified Positive Results		Questionable Results	
		Quantity	%	Quantity	%	Quantity	%
2020 Year							
May	1,392	1,364	97.99	28	2.01	-	-
June	7,604	6,835	89.89	738	9.70	31	0.41
July	4,074	3,530	86.65	540	13.25	4	0.1
August	1,468	1,451	98.84	17	1.16	-	-
September	815	813	99.75	2	0.25	-	-
October	2,237	1,958	87.53	279	12.47	-	-
November	3,403	2,552	74.99	851	25.01	-	-
December	3,341	2,895	86.65	445	13.32	1	0.03
2021 Year							
January	1,946	1,785	91.73	161	8.27	-	-
February	1,585	1,523	96.09	62	3.91	-	-
March	998	866	88.78	132	13.22	-	-

was 1,451 and 813, respectively. However, since October, the number of people infected began to rise again. In November, 3,403 patients were registered out of which 851 (25.1%) were infected, and the remaining 2,552 (74.9%) patients had negative PCR results. The total number of applications in December was 3,341, with 445 (13.32%) positive and 2,895 (86.65%) negative results.

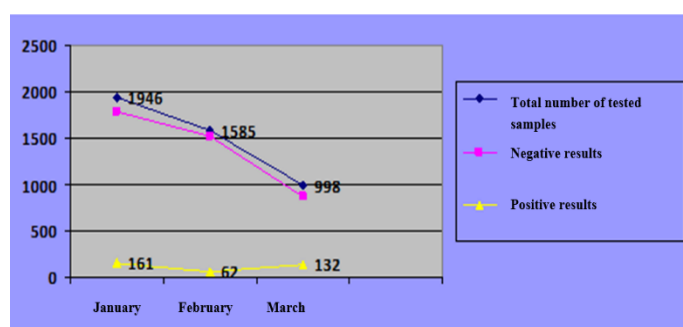


Fig. 2. Graph of the dynamics of the epidemiological situation in Bishkek (Pervomaisky and Sverdlovsky districts) from 01st January 2021 to 31st March 2021 period.

The results of the PCR research carried out from 01st January to 31st March 2021 compared with the results of the PCR research conducted from 01st May to 31st December 2020. The number of registered patients with general symptoms in February was 1,585, including 62 (3.91%) infected cases of COVID-19, while 1,523 (96.09%) results were negative (Fig. 2). In March, 998 patients came with suspicion of infection of which 132 (13.22%) were positive and 866 (88.78%) were negative. Thus, the dynamics of the epidemiological situation in the Sverdlovsky and Pervomaisky districts of Bishkek at the beginning of 2021 (January, February, March) can be assessed as “relatively stable”.

4. Discussion

When the epidemiological situation of COVID-19 infection in Kyrgyzstan from March 2020 to 31st March 2021 is assessed, the total number of patients infected with COVID-19 in Kyrgyzstan according to the Ministry of Health and Social Development of the Kyrgyz Republic, were 88,809, and the

number of deaths were 1,499 (1.69%).

Analyzing the general statistics of the laboratory’s research in two districts (Sverdlovsky and Pervomaisky) of Bishkek on 31st March 2021 showed that the number of detected positive results are 3,255 cases. According to the Ministry of Health and Social Development of the Kyrgyz Republic, the number of positive results accounted as 4% from the total number of detected cases throughout Kyrgyzstan (Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, 2021).

For the analysis of the dynamics of the epidemiological situation by months in Pervomaisky and Sverdlovsky districts of Bishkek for the period from 01st May to 31st December 2020, it can be noted that the maximum number of positive PCR results occurred in June and July as 738 and 540 cases, relatively. This period can be called the “first wave” of the spread of COVID-19 infection. From August to October, the epidemiological situation with COVID-19 in the country was stabilized slightly. But in the following months (November, December) of 2020, the number of infections began to grow again due to various factors. This testifies the “growth” of the dynamics of the epidemiological situation in Kyrgyzstan.

Assessing the epidemiological situation for the period from 01st January to 31st March 2021, it can be concluded as “relatively stable”, since the number of tested samples and detected positive results during this period is significantly lower than the same indicators for the period from 01st May to 31st December 2020.

5. Conclusion

According to the results of PCR diagnostics that carried out from 01st May 2020 and 31st March 2021, the greatest dynamics of the epidemiological situation in the Sverdlovsky and Pervomaisky districts of Bishkek were registered in June, July, November and December of 2020. The results of PCR diagnostics that carried out from 01st January 2021 to 31st March 2021 indicated that, the epidemiological situation in Bishkek city is assessed as “stable”.

Acknowledgments: This research was carried out as a part of master’s dissertation by Kyrgyz-Turkish Manas University, Institute of Pure and Applied Sciences, Biology Program.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interests.

Informed consent: The study was conducted with the permis-

sion of the Center for Quarantine and Especially Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, No. P.30.2021-011-011 dated January 15, 2021.

References

- Amplisens, (2020). Instructions for use of a set of reagents for detecting coronavirus RNA causing severe respiratory infection Amplisens, <https://www.amplisens.ru/upload/iblock/d99/Cov-Bat-FL.pdf>, Last Accessed on March 12, 2022.
- Genç, B. N. (2020). Critical management of COVID-19 pandemic in Turkey. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, 1(2), 69-73.
- Gu, H., Xie, Z., Li, T., Zhang, S., Lai, C., Zhu, P., ... & Yang, P. (2016). Angiotensin-converting enzyme 2 inhibits lung injury induced by respiratory syncytial virus. *Scientific Reports*, 6(1), 1-10.
- Kolodkina, E. B., Bakulina, E. A., & Becker, E. D. (2020). Etiology of coronavirus infection / Этиология коронавирусной инфекции. *Медицинское образование сегодня*, (3), 157-164.
- Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, (2020). The Official Website of Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Statistical data on COVID-19 in Kyrgyzstan for 2020, <https://med.kg>, Last Accessed on March 12, 2022.
- Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, (2021). The Official Website of Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Statistical data on COVID-19 in Kyrgyzstan for 2021, <https://med.kg>, Last Accessed on March 12, 2022.
- Razumenko, F. (2022). From the Great Influenza to COVID-19: Epidemics of Scale through a Historical Lens. *Journal of Military and Strategic Studies*, 21(3).
- Tokel, D. (2021). Dünya pamuk tarımı ve ekonomiye katkısı. *Manas Sosyal Araştırmalar Dergisi*, 10(2), 1022-1037.
- WHO, (2020a). The Official Website of World Health Organization, Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it, [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it), Last Accessed on March 24, 2022.
- WHO, (2020b). The Official Website of World Health Organization, Novel Coronavirus(2019-nCoV) Situation Report-11. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330776/nCoVsitrep31Jan2020-eng.pdf>, Last Accessed on February 01, 2022.
- WHO, (2020c). The Official Website of World Health Organization, WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19, <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>, Last Accessed on March 12, 2022.
- WHO, (2020d). The Official Website of World Health Organization, Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>, Last Accessed on March 23, 2022.

Cite as: Sadyrbaeva, A., & Chekirov, K. (2022). Epidemiological analysis of the diagnostic results of COVID-19 infection in Bishkek by real-time PCR method. *Front Life Sci RT*, 3(1), 21-24.



Research article

Citric acid production using rotating biodisc reactor (RBR)

Ugur Sidal^{*1} ¹ Manisa Celal Bayar University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, 45030, Manisa, Turkey

Abstract

Citric acid is one of the most remarkable industrial goods fabricated by industrial fermentation using filamentous fungus. When *Aspergillus niger*, a filamentous fungus, is produced under suitable conditions, high amounts of citric acid are obtained. This study aims to explain the citric acid synthesis studied in a biodisc reactor using *A. niger*. Various physiological parameters have been investigated in order to determine the optimum citric acid synthesis in biodisc reactor. Optimum incubation time was found to be 168 hours in the study. The optimum value of the incubation temperature was determined to be 30°C. The optimum value of the initial pH was found to be 3.8. Optimum citric acid synthesis occurred when the disc rotation speed was 2 rpm. In addition, the optimum value of the initial sugar (sucrose) concentration was determined to be 20%. In a semi-continuous production study with the renewal of the medium after a certain incubation period, it was determined that the citric acid yield increased approximately 3 times compared to the batch system. As a result, the highest value of citric acid was determined as 67.65 g/L.

Keywords: *Aspergillus niger*; citric acid; rotating biodisc reactor; semi-continuous production

1. Introduction

Organic acids are one of the most important groups among organic molecules that include one or more carboxyl categories and are profoundly found in the structure of most living things. Acids including lactic acid, acetate, citrate, isocitrate, α -ketoglutarate, succinate, propionate, butyrate, fumarate, sorbic acid, malic acid and their salts are members of this group (Verhoff, 2003). Among these, citric acid (CA) is one of the most functional tricarboxylic acids among the organic acids of biological origin that find wide use in many industries. Citric acid is an indispensable food additive used in the food industry, food and beverage industry. It is stated that citric acid is added to the composition of many foods as an acidifier, aroma enhancer, preservative, emulsifier, stabilizer and antioxidant in the food industry. The use of citric acid as a food additive has been approved by the Food and Agricultural Organization (FAO) and the World Health Organization (WHO) without any restrictions, and this substance is also included in the Generally Recognized as Safe (GRAS) lists (FAO/WHO, 2002). It is

known that the food field uses nearly 70% of the entire citric acid yielded in the world (Sahasrabudhe and Sankpal, 2001; Dhillon et al., 2017). The main feature that makes citric acid more usable than other acidifiers is shown to have low toxicity (Lotfy et al., 2007; Kamzolova et al., 2011).

As reported, citric acid (2-hydroxy-1,2,3-propane tricarboxylic acid) was initially being crystallized from citrus extract by Scheele in 1784 (Mattey, 1992). According to the researchers, it is known that over 90% of citric acid fabrication in the globe is handled by fermentation. In the yield of citric acid by fermentation, the filamentous fungus *Aspergillus niger* and the yeast *Yarrowia lipolytica* are mainly used (Max et al., 2010; Wyrzykowski et al., 2011; Souza et al., 2014; Apelblat, 2016). In recent studies, it has been reported that the yield of citric acid by microorganisms is a complex process involving many metabolic and morphological changes in the cell and is affected by many parameters (Anastassiadis et al., 2002; Kamzolova et al., 2011; Morgunov et al., 2013). It is reported that the type of substrate used in the medium and its initial concentration, mineral content, nitrogen type and nitrogen concentration source

* Corresponding author.

E-mail address: ugur.sidal@bayar.edu.tr (U. Sidal).<https://doi.org/10.51753/flsrt.1035228> Author contributions

Received 10 December 2021; Accepted 22 January 2022

Available online 06 April 2022

2718-062X © 2022 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

are the effective parameters for production. Besides these; it is stated that some parameters including pH, temperature, oxygen concentration and mixing speed should be kept at optimum values (Soccol et al., 2006; Moeller et al., 2007). Another important parameter is the selection of the strain to be used to increase the yield or the development of new strains. Therefore, from the early 2000s, researchers have focused on obtaining new strains that can produce high levels of citric acid by genetic modifications or mutation (Soccol et al., 2006). It is known that the most important thing in the yield of citric acid is to reduce the process cost by using some natural substrate resources to make the process more economical. The use of some raw materials, industrial residues, wastes and by-products as substrates is quite important in terms of waste removal and process costs (Gonçalves et al., 2009).

Yeast and yeast-like organisms responsible for the fermentation constitute a homogeneous and very large group of fungi. About 1500 species have been identified to date, but the taxonomy of yeast is constantly changing with the development of molecular biological methods. In addition, the increasing interest in yeast and yeast taxonomy lead to a raise in the number of species (Corbaci, 2008; Akpınar et al., 2011). One of the most important members of this group is *A. niger*. In 1917, Currie discovered that *A. niger* could produce significant amounts of citric acid in sugar-containing media. Later, it was determined that other *Aspergillus* species can also produce citric acid. However, studies have indicated that the most suitable mold for the yield of citric acid is *A. niger* (Yalcin et al., 2010). Mainly citric acid obtained from molds including *A. niger* is affected from different conditions including carbon source, substrate, pH, nitrogen amount, temperature, trace elements, thiamine amount, aeration. Another important factor is the fermentation type. It is stated that a great amount of the world's citric acid production is handled by fermentation (Soccol et al., 2006). Industry-related citric acid yield is performed in three distinct methods: surface fermentation (SF), submerged culture fermentation (SmF) and solid state fermentation (SSF), also known as the "koji process". Today, approximately 80% of citric acid production is done by submerged culture fermentation (SmF) carried out with batch, batch fed or continuous systems (Dhillon et al., 2017).

In this study, a rotating biodisc reactor (RBD) was utilized for citric acid production. The rotating biodisc reactor, which is most commonly used for wastewater treatment, was used for fermentation in this study. Controlling the conditions of environment and thickness of biofilm in rotating biodiscs is easier than biological filters because the liquid phase is more homogeneous and the biofilm is apparent and accessible in the process of the procedure. In addition, ventilation is highly more influential for rotation of biodiscs as a consequence of direct connection of biofilm and air turning process (Kargi and Eker, 2002). Considering these advantages, rotating biodisc reactor was preferred in this study.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and growth conditions

A. niger culture was obtained from Hacettepe University Faculty of Science Biology Department Culture Collection. Cultures were prepared by seeding on Sabouraud Potato dextrose-agar (SPA) media and incubated at 30°C for 5 days in the incubator. The continuity of the cultures was provided by periodic passages to SPA media. The microorganism was

planted in a sterile medium prepared in petri dishes, and spores in black color were formed in the incubator for 7 days at 30°C. Since the duration of the microorganism's activity in the solid medium is approximately 30 days, the continuity of the culture was ensured by planting in the solid medium and storing it at +4°C.

2.2. Citric acid production medium

The ingredients of the medium used in citric acid production are as follows; sucrose: 200 g/L, KH_2PO_4 : 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.25 g/L, NH_4NO_3 : 0.05 g/L, CaCl_2 : 3 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.06×10^{-3} g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.25×10^{-3} g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1.3×10^{-3} g/L. Sucrose/saline solutions were prepared separately and sterilized by adjusted to pH 3.5.

2.3. Determination of citric acid concentration

The concentration of citric acid was determined by the pyridine-acetic anhydride (PAA) assay (Marier and Boulet, 1958). Citric acid analysis was performed at 425 nm wavelength with a Cecil 5000 UV/VIS model spectrophotometer.

2.4. Biodisc reactor and citric acid production

The reactor used in this study is made of glass and 19x25x27 cm in size. 8 pellet discs with 17 cm diameters connected to a shaft are placed in this container (Fig. 1). Disc rotations are provided by a DC-type electric motor connected to the shaft. An exchangeable transformer has been integrated into the system to adjust the rotation speed of the discs. The prepared production medium (total volume 4 L) was filled into the reactor to cover the half surfaces of the discs and the system was placed in the incubator (Sanyo). The microorganism in the stock medium was added to the medium at a ratio of 1: 20 (200 mL culture / 4 L production medium). Under these conditions, production was continued for 7 days. Periodically (12 hours) specimens were taken to detect the overall amount of sugar and citric acid in the biodisc reactor. The growth in the biodiscs was determined by measuring the thickness of the biofilm with a millimeter caliper.



Fig. 1. (a) Top view of rotating biodisc reactor, (b) Side view of rotating biodisc reactor.

2.5. Analysis of the effect of disc rotation speed on growth and citric acid synthesis

To analyze the impact of disc rotation speed on growth and citric acid synthesis, the disc rotation speeds were adjusted to 1, 2, 3, 4 and 5 cycles/min by an exchangeable transformer.

3. Results and discussion

3.1. Reproduction and citric acid synthesis in *A. niger* depending on time in biodisc reactor

The production of citric acid and increase rate of the growth of *A. niger* strain at the initial sucrose concentration of 20% are shown in Table 1. As indicated in Table 1, the highest growth and citric acid production amount were obtained at 168 hours. Results are given as the average of three replicates.

3.2. The effect of temperature on reproduction and citric acid production with *A. niger* in biodisc reactor

As given in Table 2, the optimum incubation temperature both for production of citric acid and for the growth rate of *A. niger* strain was found to be 30°C. Results are given as the average of three replicates.

3.3. The effect of preliminary incubation pH on reproduction and citric acid production with *A. niger* in biodisc reactor

As seen in Table 3, the optimum initial incubation pH for both citric acid production and the growth rate of *A. niger* strain was found to be 3.8. Results are given as the average of three replicates.

Table 1

Reproduction and citric acid synthesis in *A. niger* depending on time in biodisc reactor.

Time (Hour)	24	48	72	96	120	144	168	192
Citric acid (g/L)	0.69±0.578	2.04±0.079	3.19±0.07	4.54±0.02	6.4±0.003	11.52±0.055	17.14±0.026	16.87±0.017
Biofilm thickness (mm)	0.8	1.4	2	3.6	5.8	7.6	9.4	9.6

Table 2

The effect of temperature on reproduction and citric acid production with *A. niger* in biodisc reactor.

Temperature (°C)	20	25	30	35	40
Citric acid (g/L)	12.24±0.025	14.69±0.003	17.14±0.026	13.71±0.005	13.17±0.003
Biofilm thickness (mm)	6.7	8.0	9.4	7.5	7.4

Table 3

The effect of preliminary incubation pH on reproduction and citric acid production with *A. niger* in biodisc reactor.

Initial pH	3.2	3.5	3.8	4.1	4.4
Citric acid (g/L)	14.69±0.001	15.28±0.026	17.14±0.026	12.73±0.005	12.24±0.025
Biofilm thickness (mm)	8.1	8.4	9.4	7.0	6.7

Table 4

The effect of preliminary sucrose concentration on reproduction and citric acid production with *A. niger* in biodisc reactor (here, lower case used for biodisc reactor, but upper case used in the above title).

Initial Sucrose Concentration (g/L)	14	16	18	20	22
Citric acid (g/L)	15.34±0.01	15.78±0.9	16.23±0.028	17.14±0.026	16.69±0.015
Biofilm thickness (mm)	8.4	8.6	8.9	9.4	9.4

Table 5

The effect of disc rotation speed on reproduction and citric acid production with *A. niger* in biodisc reactor.

Disc Rotation Speed cycles/min	1	2	3	4	5
Citric acid (g/L)	16.29±0.577	17.14±0.026	15.43±0.003	14.57±0.05	12.68±0.05
Biofilm thickness (mm)	8.9	9.4	8.5	8.0	7.0

Table 6

The effect of preliminary incubation pH on reproduction and citric acid production with *A. niger* in biodisc reactor.

Time (day)	7	9	11	13	15	17	19	21
Citric acid (g/L)	17.14±0.026	24.51±0.577	34.08±0.002	42.85±0.079	51.42±0.055	58.92±0.052	67.65±0.017	67.56±0.001
Biofilm thickness (mm)	9.4	9.4	9.5	9.6	9.7	9.8	9.9	10.0

3.4. The effect of initial sucrose concentration on reproduction and citric acid production with *A. niger* in biodisc reactor

As seen in Table 4, the optimum initial sucrose concentration for both citric acid production and the growth rate of *A. niger* strain was obtained at 20% g/L. Results are given as the average of three replicates.

3.5. The effect of disc rotation speed on reproduction and citric acid production with *A. niger* in biodisc reactor

As seen in Table 5, the optimum disc rotation speed for both citric acid production and the growth rate of *A. niger* strain was found to be 2 cycles/min. Results are given as the average of three replicates.

3.6. Citric acid production with semi-continuous production system

In semi-continuous production analysis performed by renewing the medium after a certain incubation period (1.5 mL of medium per minute addition), the citric acid yield increased approximately 3 times compared to the batch system. As a result of the analyzes, the highest value of citric acid was determined as 67.65 g/L (Table 6).

This study consists of two stages. The first stage is for the optimization of the bioreactor working in batch order with sucrose, while the second stage is the production of citric acid with a semi-continuous system in optimized conditions obtained in the first stage. The optimum incubation time for the highest amount of citric acid production rely on the production conditions, the species and the fermentation process. The ratio of citric acid biosynthesis was examined (Table 1) and a maximal profit of citric acid (17.14 ± 0.026 g/L) was obtained 168 hours after inoculation. The production started following a one-day lag period in citric acid fermentation with *A. niger* and achieved its maximal rate at the beginning of stationary period. Biofilm thickness was measured as 9.4 mm. Prolonged incubation did not further increase the citric acid production. In similar studies, the researchers reported the optimum incubation time as between 144-240 hours (Currie, 1917; Wiczorek and Brauer, 1998; Demirel, 2003; Peksel, 2003; Max et al., 2010; Apelblat, 2016). Rajoka et al. (1998) reported that they achieved a product formation rate of 0.0506 g/L/hour. This result is lower than our presented results.

The temperature of the fermentation mixture is known as one of the significant issues that have a limiting effect on fungal citric acid production. In the present study, it was found that the best temperature for citric acid fermentation was 30 °C (Table 2). When ambient temperature is low, it certainly had no positive impact on citric acid production, as well as on the enzymatic activity. However, the citric acid biosynthesis decreased when the production temperature increased above 30 °C. This may have occurred as a result of the accumulation of by-products, including oxalic acid. Various researchers made use of 30°C as the production temperature in different studies and gained higher level of amounts of the concrete yield (Vergano et al., 1996; Arzumanov et al., 2000; Ramesh and Kalaiselvam, 2011). However, as the reported values are proportional to the fermentation time, it is observed that the values obtained with the strain used in this survey are close to the values obtained in other researches, and some values are even lower. It is very important to maintain a proper pH for the desired level of citric acid production. The effect of various initial pHs (3.2 - 4.4) on citric acid production in the medium was investigated and maximum yield was calculated with the initial pH of 3.8 (Table 3). Lowering pH values resulted in a decline in citric acid production amount, because low pH may inhibit mycelium growth. This finding is in agreement with the result reported by Pessoa et al. (1982). In addition, during the fermentation process with *Aspegillus niger* in the production of citric acid, the pH of the medium is of great importance and nitrogen metabolism causes proton release that lowers the pH (Amenaghawon et al., 2013). The pH of a culture can change as a response to microbiological metabolism. The most remarkable cause for this change is the discharge of organic acids including citric acid that will lead a drop in pH. Fluctuations in pH are mostly dependent on microorganisms. The origin of the substances and the manufacturing procedures also affects the pH kinetics. Therefore, the initial pH is to be defined elaborately and made efficiently use of depending on the microorganism, substrate and production technique. A higher initial pH was also an inhibitory factor for *A. niger* growth and citric acid production. *A. niger* has an invertase enzyme active at low pH values which utilizes sucrose, rather than glucose, as the main substrate for citric acid production. Due to its low molecular weight, sucrose is simply transferred by intracellular enzymes in microbial cells for

hydrolysis (Kareem et al., 2010; Padvi and Pawar, 2011). Kudzai et al. (2016) found that the medium supplemented with sucrose produces more citric acid than the glucose medium stating that sucrose is the main substrate for citric acid production. In addition, it has been pointed out that the concentration, as well as the type of sugar, play an important role in citric acid production. The maximum level of production is generally occurs between 14-22% sugar concentrations and no citric acid production has been reported in environments containing less than 2.5% sugar. We investigated the effect of initial sucrose concentration (14-22 g/L) on growth and citric acid production and had the maximum results at 20% sucrose concentration (Table 4). Increased sugar concentration in the medium causes a decrease in citric acid produced by *A. niger*. This may be attributed to the fact that high levels of sugar concentrations are caused by an excessive growth of mycelium leading to an increase in viscosity in the environment which reduces the citric acid production in the fermentation medium. On the other hand, it has been reported that low sugar levels cause low citric acid production because of oxalic acid accumulation in the culture medium (Prasad et al., 2013).

Taking the advantages of bioreactor systems into account, rotating biodiscs are mostly utilized in biological treatment. However, one of today's economic principles is to reduce raw material costs and increase the production. This is the specificity of our work towards this purpose, because such a method was rarely encountered in previous studies on production of citric acid. For this reason, citric acid production with this type of reactor becomes important due to its rarity, as well as its numerous advantages. A similar study on obtaining different products was reported by Sidal and Taskin-Ozkale (2003). From this point on, the effect of disc rotation speed on citric acid synthesis was investigated and it was observed that the results obtained at 2 cycles / minute were maximum (Table 5). Similar results were reported by Guven (1995). As can be seen from the results of our study, biodiscs rotation caused by direct contact of the biofilm with the ventilation in the return process is very important. Because, the contact time of the biofilm with air increases the yield. In a semi-continuous production study with the renewal of the medium (1.5 mL of medium per minute) after 7 days of incubation under optimized conditions, it was determined that the yield of citric acid increased approximately 3 times compared to the batch system. After 21 days of incubation, the highest value of citric acid was found to be 67.65 g/L on the 19th day (Table 6). As an important finding, incubation time longer than 19 days did not cause an increase in citric acid production.

4. Conclusion

Our results show that this type of reactor can be used for citric acid production. However, studies that increase productivity as to raise the amount of citric acid to more suitable levels on an industrial scale may increase the possibility of using this process in the future.

Conflict of interest: The author declares that he has no conflict of interests.

Informed consent: The author declares that this manuscript did not involve human or animal participants and informed consent was not collected.

References

- Akpınar, O., Ucar, B. F., & Yalcin, H. T. (2011). Screening and regulation of alkaline extracellular protease and ribonuclease production of *Yarrowia lipolytica* strains isolated and identified from different cheeses in Turkey. *Annals of Microbiology*, 61(4), 907-915.
- Amenaghawon, N. A., Areguamen, S. O., Agbroko, N. T., Ogbiede, S. E., & Okieimen, C. O. (2013). Modelling and statistical optimisation of acid production from solid state fermentation of sugar cane bagasse using *Aspergillus niger*. *International Journal of Sciences*, 2, 56-62.
- Anastassiadis, S., Aivaidis, A., & Wandrey C. (2002). Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 81-87.
- Apelblat, A. (2016). Representation of volumetric and compressibility properties in binary and ternary system. *Journal of Solution Chemistry*, 45, 1530-1547.
- Arzumanov, T. E., Shishkanova, N. V., & Finogenova, T. V. (2000). Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 525-529.
- Currie, J. N. (1917). The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. *Journal of Biological Chemistry*, 31,15-37.
- Corbaci, C. (2008). The effect of sodium on the growth of *Debaryomyces hansenii* strains at high temperature and extreme pH, Master Thesis, (pp.1-186). Ege University, Institute of Science, Turkey.
- Demirel, G. (2003). Citric acid production using immobilized *Aspergillus niger* and investigation of various effects on citric acid production, Master Thesis, (pp. 1-56). Gazi University Institute of Science and Technology, Turkey.
- Dhillon, G. S., Lea Rosine, G. M., Kaur, S., Hedge, K., Brar, S. K., Drogui, P., & Verma, M. (2017). Novel biomaterials from citric acid fermentation as biosorbents for removal of metals from waste chromated copper arsenate wood leachate. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 119,147-154.
- FAO/WHO (2002) Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Human Vitamin and Mineral Requirements, Rome. <https://www.fao.org/3/y2809e/y2809e.pdf>, Last Accessed on March 13, 2022.
- Gonçalves, C., Lopes, M., Ferreira, P. J., & Belo, I. (2009). Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *Bioresource Technology*, 100, 3759-3763.
- Guven, M. (1995). Citric acid production using *Aspergillus niger* (Fürsan) in Biodisc Reactor, Doctoral Dissertation, (pp.1-85). Hacettepe University, Institute of Science and Technology, Turkey.
- Kamzolova, S. V., Lunina, J. N., & Morgunov, I. G. (2011). Biochemistry of citric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 88, 1965-1976.
- Kareem, S. O., Akpan, I., & Alebiowu, O. O. (2010). Production of citric acid by *Aspergillus niger* using pineapple waste. *Malaysian Journal of Microbiology*, 6(2), 161-165.
- Kargi, F., & Eker, S. (2002). Comparison of performances of rotating perforated tubes and rotating biodiscs biofilm reactors for wastewater treatment. *Process Biochemistry*, 37, 1201-1206.
- Kudzai, C. T., Ajay, K. & Ambika, P. (2016). Citric acid production by *Aspergillus niger* using different substrates. *Malaysian Journal of Microbiology*, 12(3), 199-204.
- Lotfy, W. A., Ghanem, K. M., & El-Helow, E. R. (2007). Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, 98, 3470-3477.
- Marier, J. R., & Boulet M. (1958). Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method. *Journal of Dairy Science*, 4, 1683-1692.
- Mattey, M. (1992). The production of organic acids. *Critical Reviews Biotechnology*, 12(1/2), 87-132.
- Max, B., Salgado, J. M., Rodriguez, N., Cortes, S., Converti, A., & Dominguez, J. M. (2010). Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 862-875.
- Moeller, L., Strehlitz, B., Aurich, A., Zehnsdorf, A. & Bley, T., (2007). Optimization of citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*. *Engineering in Life Sciences*, 7(5), 504-511.
- Morgunov, I., Kamzolova, S., & Lunina, J. (2013). The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation. *Applied Microbiology Biotechnology*, 97, 7387-7397.
- Padvi, M. A., & Pawar, S. V. (2011). Factors affecting production of citric acid. *International Referred Research Journal*, 3, 37-38.
- Peksel, A., Tokatman, K. A., & Arisan Ataç, İ. (2003). Investigation of the effects of some polyols on yield during citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Journal of Yildiz Technical University*, 4, 1-6.
- Pessoa, D. F., Diasde, C., & Angela, C. (1982). Production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Revista de Microbiologia*, 13(2), 225-229.
- Prasad, M. P. D., Sridevi, V., Surendra N. V., Reddy, O. V. S., & Harsha, N. (2013). Studies on fermentative production of citric acid by *Aspergillus niger* isolate using sorghum malt and it's optimization. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 2, 2961-2968.
- Rajoka, M. I., Ahmad, M. N., Shahid, R., Latif, F., & Parvez, S. (1998). Citric acid production from sugar-cane molasses by cultures of *Aspergillus niger*. *Biologia*, 44(1), 241-253.
- Ramesh, T., & Kalaiselvam, M. (2011). An experimental study on citric acid production by *Aspergillus niger* using *Gelidiella acerosa* as a substrate. *Indian Journal of Microbiology*, 51(3), 289-293.
- Sahasrabudhe, N. A., & Sankpal, N. V. (2001). Production of organic acids and metabolites of fungi for food industry. In: Arora D. K., Berka R. M., Singh (eds) *Applied Mycology and Biotechnology* (pp. 387-425). Elsevier Amsterdam.
- Sidal, U., & Taskin-Ozkale, E. (2003). Rhamnolipid production from olive oil mill effluent (OOME) using the rotating biodisc reactor. *Biologia, Bratislava*, 58(6),1083-1088.
- Soccol, C.R., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., & Pandey, A. (2006). New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 141-149.
- Souza, K., Schwan, R., & Dias, D. (2014). Lipid and citric acid production by wild yeasts grown in glycerol. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 497-506.
- Vergano, M. G., Fernandez, N., Soria, M. A., & Kerber, M. S. (1996). Influence of inoculum preparation on citric acid preparation by *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology*, 12(6), 655-656.
- Verhoff, F. H. (2003). Citric acid. In: Elvers B., Hawkins S., Harrer R., Pikart-Müller M. (eds) *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (pp. 8:525-531). Germany.
- Yalcin, S. K., Bozdemir, M. T., & Ozbas, Z. Y. (2010). Citric acid production by yeasts: Fermentation conditions, process optimization and strain improvement, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 9, 1374-1382.
- Wieczorek, S., & Brauer, H. (1998). Continuous production of citric acid with recirculation of the fermentation broth after product recovery. *Bioprocess Engineering*, 18(1), 1-6.
- Wyrzykowski, D., Hebanowska, E., Nowak-Wicz, G., Makowski, M., & Chmurzyński, L. (2011). Thermal behaviour of citric acid and isomeric aconitic acids. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 104(2), 731-735.

Cite as: Sidal, U. (2022). Citric acid production using rotating biodisc reactor (RBR). *Front Life Sci RT*, 3(1), 25-29.



Araştırma makalesi / Research article

Domates (*Lycopersicon esculentum* L.)’te sentetik tohum üretiminde aljinat oranlarının depolama zamanına etkisi

Zafer Secgin¹ , Ahmet Okumus*² 

¹ Ondokuz Mayıs University, Agricultural Biotechnology Department, Agriculture Faculty, 55270, Samsun, Turkey

² Adnan Menderes University, Agricultural Biotechnology Department, Agriculture Faculty, 09100, Aydın, Turkey

Öz

Bitki ıslahı, daha yüksek verim ve hastalıklara karşı dayanıklılık için bitki genotipleri arasında bir seçim ve çaprazlama sürecini kapsamaktadır. “Elit” adı verilen kademede ebeveyn tohumu, ıslah sürecinin yeni ve ilk ürünüdür. Elit kademe tohumun daha hızlı üretilmesi, tohumların pazarlanması için çok önemlidir. Sentetik tohum teknolojisi, elit tohumların daha kolay ve daha hızlı geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu çalışmada, domates bitkisinin hipokotil eksplantları kullanılarak elde edilen kapsül tohumunun MS kültür ortamı ile çimlenme gücünün belirlenerek tohumların saklama süresinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla domates bitkisi eksplantlarından elde edilen sentetik tohumlar, kaplama sonrası +4 °C’de saklanmış ve depolama sürelerinin rejenerasyona etkileri 0, 30, 60 ve 90 gün sonraki rejenerasyonlarına bakılarak değerlendirilmiştir. Çimlenme gücü ilk gün %80 iken 30 günde %10’a düşmüş ve çimlenme süresi 20 günden 50 güne çıkmıştır. Sonuç olarak hipokotillerin, domates bitkilerinde “Synseed” adı verilen sentetik tohum üretiminde eksplant kaynağı olarak kullanılabilceği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Çimlenme gücü; depolama süresi; domates; sentetik tohum; sodyum aljinat

The effect of alginate ratios on storage time in the production of synthetic seeds in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.)

Abstract

Plant breeding covers a period of time selection and crossing among plant genotypes for higher yield and resistant to diseases. Breeder seed named “Elit” is a recent product of breeding process. The faster production of elit seed is so important for marketing of seeds. Synthetic seed technology enables an opportunity for developing elit seeds, easily and faster. In this study, it was aimed to determine the storage time of the seeds by determining the germination power of the capsule seed obtained by using hypocotyl explants of tomato plant by MS culture media. Synthetic seeds obtained from explants of tomato plant were stored at +4 °C after coating and then the effects of storage times on regeneration were evaluated by looking at their regeneration after 0, 30, 60 and 90 days. While the germination vigor was 80 % in first day, it decreased to 10 % in 30 days and germination time increased from 20 days to 50 days. As a result, hypocotyls can be used as an explant source in the production of synthetic seeds “Synseed” in tomato plants.

Keywords: Germination power; sodium alginate; storage time; synthetic seed; tomato

* Sorumlu yazar / Corresponding author.

E-mail: drzirmuh@gmail.com (A. Okumus).

<https://doi.org/10.51753/flsrt.1041120> Yazar katkıları / Author contributions

Geliş tarihi / Received 23 Aralık 2021 / 23 December 2021; Kabul tarihi / Accepted 10 Nisan 2022 / 10 April 2022

Çevrimiçi yayın / Available online 28 Nisan 2022 / 28 April 2022

2718-062X © 2022 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

1. Giriş / Introduction

Bitki ıslahında en önemli husus, verimli ve hastalıklara dayanıklı ürünlerin geliştirilmesidir. İslah işlemi oldukça uzun süren bir süreç olmakla beraber, ıslah edilen materyalin hızlı geliştirilmesi ve piyasaya sürülmesi tohumculuk açısından önemlidir. Bugüne kadar doku kültürü uygulamaları değişik alanlarda; kallus üretiminden fide elde etmek amacıyla ya da genotipin hızlı üretilmesinde kullanılarak patates, pancar, fidan ve peyzaj bitkileri üretmek için kullanılmıştır (Danial ve Ibrahim, 2018; Das ve ark., 2021; Erdem ve Uysal, 2021). Doku kültürü ile yapılan çalışmalarda, kallustan "somatik embriyo" olarak adlandırılan embriyo ve embriyo benzeri yapıların geliştiği gözlenmiştir. Somatik embriyolar ve zigotik embriyoların geçirdiği evreler incelendiğinde benzerdir. Somatik embriyolar ve bazı bitki eksplantları; sodyum aljinat, kalsiyum klorür, fungusit, insektisit ve besin elementleri ile kaplamak gibi değişik uygulamalarla sentetik tohumlara dönüştürülmektedir (Nongdam, 2016; Nugrahani ve ark., 2018). Farklı yöntemlerle sentetik tohum üretilmesi; özellikle verimli olan fakat tohum üretemeyen bitkilerin klonal çoğaltılması, hastalıklardan arı bitki elde edilmesi, gen kaynaklarını korumak açısından faydalı ve kullanışlı olmuştur. Bu metot transgenik bitkilerin hızlı çoğaltımı için de önemli olup elit genotiplerin saklanması ve hibritlerin klonal çoğaltımında da kullanılmaktadır. Nesli tükenmekte olan türlerin germplasmlarının ve tohumları kurumayan tropik türlerin üretilmesi ve saklanması da bu teknik temeldir. Sentetik tohum teknolojisinin ülkemiz açısından gen kaynaklarının korunması, tohumla üretilmesi zor olan türlerin üretilmesine alternatif olması, üstün genotiplerin klonal çoğaltılması ve hibrit bitkilerin hızlı ve kolay çoğaltılması açısından önemlidir (Parrot ve ark., 1993; Ozden-Tokatli ve ark., 2008).

Sentetik tohum teknolojisi ile, elit bitki çeşitleri klon olarak çoğaltılabilir, tehlike altındaki bitkiler korunabilir, meristem kültürü ile virüssüz bitkiler elde edilebilir, bitkisel gen kaynakları saklanabilir veya bitki hücre kültürlerinden sekonder metabolitler elde edilebilir. Bütün bu uygulamaya alanlarının yanında, doku kültürü ayrıca transgenik bitki üretimi içinde vazgeçilmez bir araçtır. Ekonomik öneme sahip, endemik ve nesli tehlike altında olan bitkilerin korunması ve çoğaltılması için bitki doku kültürü çalışmaları önem kazanmıştır. Dünyada pek çok bilim adamı bu yolla endemik ve nesli tükenme tehlikesi altında olan bitkilerin çoğaltımı ve korunması yoluna başvurmuştur. Tehlike altındaki çok sayıda bitkinin çoğaltımında *in vitro* tekniklerin yararlı olduğu bulunmuştur (Lledó ve ark., 1996).

Bitki ıslahında yoğun bir şekilde kullanılan biyoteknolojik yöntemlerden birisi de somatik embriyogenezdir. Somatik embriyogenez, bitkinin somatik dokularından kapalı iletim sistemine sahip bipolar embriyonun üretilmesini sağlayan eşeysiz gelişme sürecidir. Somatik embriyogenez doku kültüründe kitlesel klonal çoğaltım için en güçlü tekniklerden birisidir. Somatik embriyogenez birçok bitki türünün, özellikle de orman ağaçlarının hızla klonal çoğaltılmasında önemli bir potansiyele sahiptir (Babaoglu ve ark., 2001). Teorik olarak tek bir eksplant sınırsız sayıda somatik embriyo üretebilir. Bu sınırsız üretim, anaç bitkiden alınan kısıtlı miktardaki materyale bağlı olan çelikle çoğaltım karşısında çok büyük avantaja sahip olmaktadır. Özellikle, birçok bitki türü için geliştirilen hücre süspansiyon teknikleriyle az bir işçilikle, çok kısa bir sürede çok sayıda iyi gelişmiş embriyo elde etmek mümkün olmaktadır

(Parrot ve ark., 1993; Parrot ve Bailey, 1993).

Klonal popülasyonların taşınması ve saklanması *in vitro* sentetik tohum üretimi ile mümkün olabilmektedir. Sentetik tohum ekim için fonksiyonel yapay tohum olarak kullanılabilen *in-vitro* ya da *ex-vitro* koşullar altında bitkiye dönüşme kabiliyetine sahip ve saklanabilen yapay olarak kapsülleşmiş somatik embriyonun oluşturulması için, sürgün, tomurcuk ya da herhangi diğer meristem dokular kullanılabilir ve bu dokular sodyum aljinat gibi bir matriksle kaplanabilmektedir (Standardi ve Piccioni, 1998). Farklı eksplant kaynaklarının saklama ve kaplama çalışmalarını geliştirmek, nesli tükenmekte olan ve gen kaynağı açısından önemli bitki türlerini sentetik tohum teknolojisiyle üretme potansiyelini artırabilmektedir. Önemli bir besin kaynağı ve model bir bitki olan domates bitkisinin de sentetik tohum üretimini ve bu sentetik tohumların saklama sürelerinin optimizasyonu gen kaynağı olan diğer türler açısından da önem arz etmektedir (Sakamoto ve ark., 1992; Porter, 2008; Reddy ve ark., 2012).

Somatik embriyoların döllenme sonucunda gelişen zigotik embriyolarla göre en önemli üstünlükleri genetik açılmaların olmamasıdır. Somatik embriyolar, kültüre alınan eksplantın somatik hücrelerinden gelişerek eksplantın alındığı bitkinin genotipini muhafaza ettirdiklerinden dolayı klon oluştururlar. Somatik embriyogenez yoluyla oluşan ürün embriyo olup, tohum içerisinde bulunan embriyonun benzeridir. Daha da önemlisi somatik embriyolar tam bitki oluşturabilme programına da sahiptirler. Bu yüzden somatik embriyolar kaplanmış tohum olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptirler (Sakamoto ve ark., 1992; Parrot ve ark., 1993).

Sentetik tohum teknolojisi ile vejetatif olarak çoğalma yeteneğine sahip somatik embriyo; protokorm, protokorm benzeri yapılar veya nodal kısımların, yapay endosperm ve sonrasında uygun bir kapsülleme maddesi ile kaplanması sonucu bazı avantajlar kazanır. Tesis kurma ve dağıtım engellerini kaldırmak, depolanmaları süresince güçlü ve yüksek adapte olabilirliklerini sürdürmek, ambalajlama taşıma ve depolamada kolaylık sağlamak bu hususta akla gelen ilk örneklerdendir. Bu tür çalışmaların devam etmesi, hatta uzun bir zaman diliminde pratiğe aktarılan sonuçların alınması ülke ekonomisine büyük ölçüde katkıda bulunacağı gibi gen kaynaklarının yok olma riskini de ortadan kaldıracaktır (Porter, 2008; Bektas ve ark., 2011; Gantait ve Mitra, 2019).

Domates bitkisi ekonomik öneminden dolayı birçok araştırmaya konu olmuş sentetik tohum üretimi ise "SynSeed" kısaltma ismiyle bazı kaynaklar tarafından kullanılmıştır (Porter, 2008). Domates bitkisinde sentetik tohum üretimi ve saklanması optimizasyonu; gen kaynağını korumada, üstün özelliklere sahip genotiplerin çoğaltılması ve transgenik bitki üretilmesi gibi alanlarda kullanılabilmesine imkan tanınması açısından önemlidir. Bu araştırmada domates bitkisinin hipokotil eksplantları kullanılarak elde edilen kapsül tohumda, çimlenme gücü belirlenerek sentetik tohum üretimi ve tohumların saklanma sürelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Gereç ve yöntemler / Materials and methods

Araştırmada kullanılan materyal özel firma tarafından Ar-Ge yapmak amacıyla kullanılmasına izin verilen TBT-20 ve TBT-31 nolu genotiplere ait tohumlardır. Başlangıç materyali olarak kullanılacak domates tohumları, steril kabinde ilk olarak % 20'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 20 dakika bekletildikten sonra 5 kez steril su ile yıkanmıştır. Steril edilen

tohumlar steril kurutma kağıdında 5 dakika bekletilmiştir. Yüze sterilizasyonu yapıldıktan sonra tohumlar çimlendirilmek üzere 121 °C otoklavlanan kavanozlara 100 ml MS dökülerek hazırlanmış, 1 lt'lik cam kavanozlara 4'er adet tohum ekimi yapılmıştır (Şekil 1). Ekimi yapılan tohumlar çimlendirilmek üzere iklim odasında 25 °C'de 10 gün bekletilmiştir. Domates çimlendirme besisi ortamı olarak 2,2 gr/lt MS (Duchefa Marka M0222 MS + vitamin) + 30 gr/lt sükröz + 2,8 gr/lt phytigel kullanılmıştır. Çimlenen bitkilerin hipokotillerinden alınan örnekler eksplant olarak kullanılmıştır.



Şekil 1 / Figure 1. MS ortamında tohumdan yetiştirilen domates bitkileri / Tomato plants growing from the seed in MS media.

2.1. Besi ortamlarının hazırlanması ve sentetik tohum elde edilmesi / Growing media preparation and handling of sythetic seed

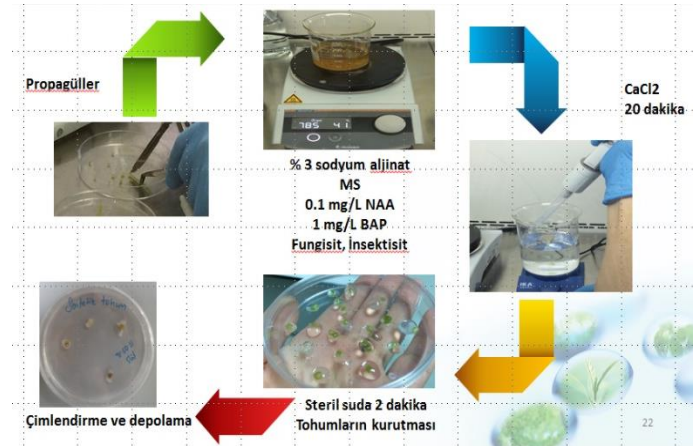
Domates eksplantları üzerine hormonların etkisini belirlemek amacıyla IAA, BAP, NAA, 2,4-D ve Kinetin'in farklı konsantrasyonları denenmiş ve araştırmada litreye 4,4 gr/lt MS (Duchefa Marka M0222 MS+vitamin) 30 gr/lt sükröz, 2,8 gr/lt phytigel kullanılmıştır. Çalışma sonucunda en etkili sonuç veren ortam sentetik tohum üretimi için kullanılmıştır. Mümkün olduğu kadar küçük parçalara ayrılan propagül dokulardan elde edilen hipokotil eksplantı sentetik tohum elde etmek amacıyla sodyum aljinatın ve kalsiyum klorit (CaCl_2)'in farklı konsantrasyonları kullanılarak kaplanmıştır. Bu amaçla 100 ml farklı konsantrasyonlarda sodyum aljinat (% 1, 2, 3, 4 ve 5) ve 100 ml farklı konsantrasyonlarda CaCl_2 çözeltisi (50 mM ve 100 mM) hazırlanmıştır. Çözeltiler otoklavda steril edilerek steril kabin içerisinde manyetik karıştırıcı üzerine alınan sodyum aljinat çözeltisi içerisine steril manyetik balık konularak karıştırılmıştır.

Olgunlaşan eksplantlar steril bir pens ve bisturi yardımıyla 0.5 mm büyüklüğünde kesilerek çözeltinin içine bırakılarak ve bir müddet karışması sağlanmıştır. Manyetik karıştırıcı üzerine alınan CaCl_2 çözeltisi içerisine manyetik balık konulmuş ve 5ml'lik mikropipet aracılığıyla alınan sodyum aljinatlı eksplant, karışmakta olan CaCl_2 çözeltisi içerisine yavaş yavaş bırakılmıştır. Örneklerin 20-30 dakika CaCl_2 çözeltisi içinde karışması için beklenmiştir. Elde edilen sentetik tohumlar daha sonra steril saf su ile kalsiyum tuzlarını uzaklaştırmak amacıyla 5 dakika yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen sentetik tohumların bir kısmı doğrudan MS besisi yerine alınırken bir kısmı + 4 °C'de saklanmıştır (Şekil 2). Saklanan sentetik tohumlar çimlendirme işlemine kadar 0, 30, 60 ve 90 gün periyotlarda bekletilmiştir.

2.2. İstatistik analiz / Statistical analysis

Araştırma sonucu elde edilen sentetik tohumlardan yetiştirilen fidelerde, her damlada eksplant içeren ve içermeyen bilye tipi boncuklar sayılmıştır. Ayrıca, ortaya çıkan kaplı tohum

boncuklarında saklama süresinin etkili olup olmadığı ile ilgili değerlendirme yapılmıştır. Değerlendirme korelasyon testi ile test edilerek saklama süresi ile olan ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 2 / Figure 2. Sentetik tohum elde edilme aşaması / Synthetic seed production stage.

3. Bulgular ve tartışma / Results and discussion

Sentetik tohum üzerine yapılan çalışma 3 kısımda incelenmiştir. İlk olarak; Sodyum aljinat ve CaCl_2 konsantrasyonlarının optimizasyonu, ikinci olarak tohum içeren boncukların ayırımı ve üçüncü olarak sentetik tohumların saklanma süresi olarak aşağıda özetlenmiştir.

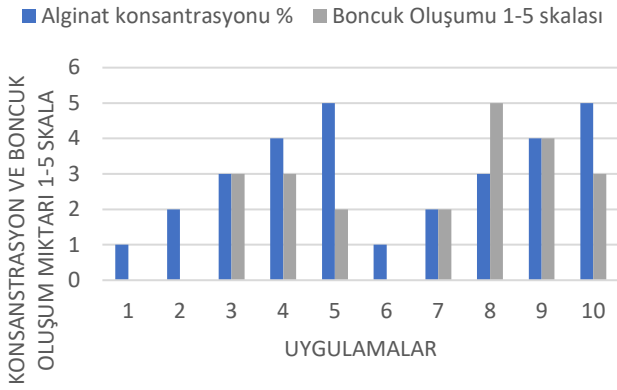
3.1. Sodyum aljinat ve CaCl_2 konsantrasyonlarının optimizasyonu / Optimization of sodium alginate and CaCl_2 concentrations

Çalışmada kullanılan domates bitkisinin sentetik tohum üretiminde; farklı konsantrasyonlarda sodyum aljinat ve kalsiyum klorür çözeltileri kullanılmıştır. Elde edilen sentetik tohumlarda sodyum aljinatın % 1 ve 2'lik konsantrasyonlarında tohum boncuğu oluşmamışken % 5 sodyum aljinat kullanımında ise aşırı sert sentetik tohum boncukları elde edilmiştir. En iyi sentetik tohumun oluşumu % 3 sodyum aljinat ile 100 mM CaCl_2 kombinasyonundan elde edilmiştir. CaCl_2 farklı konsantrasyonları; tohum boncuğu oluşumu üzerine etki ederken 50 mM konsantrasyonlarında 1-5 skalasına göre yapılan değerlendirme sonucunda boncuk oluşumunun daha az şekilsiz olduğu görülmüştür. Sodyum aljinat ve CaCl_2 kombinasyonunun boncuk oluşumu üzerine etkisi Tablo 1. ve Şekil 3'te özetlenmiştir.

Tablo 1 / Table 1

Sodyum aljinat ve CaCl_2 kombinasyonunun boncuk oluşumu üzerine etkisi / The effect of sodium alginate and CaCl_2 combinations on capsule formation.

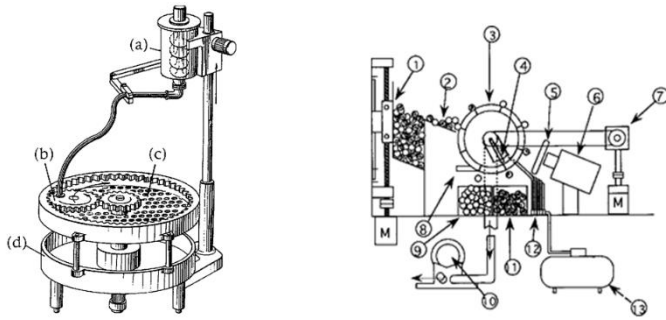
Aljinat Kons. %	CaCl_2 μM	Boncuk Oluşumu 1-5 Skalası
1	50	0
2	50	0
3	50	3
4	50	3
5	50	2
1	100	0
2	100	2
3	100	5
4	100	4
5	100	3



Şekil 3 / Figure 3. Domates hipokotil eksplantlarının kaplanması sonucunda sodyum aljinat ve CaCl₂'nin boncuk oluşumuna etkisi / The effect of sodium alginate and CaCl₂ on bead formation as a result of coating tomato hypocotyl explants.

3.2. Tohum içeren boncukların ayırımı / Separation of capsules containing seed

Domates genotiplerinde yapılan çalışmada genotipler arası fark istatistikî anlamda önemli bulunmamıştır (0,05<P). Yapılan değerlendirmede, % 3'lük aljinat ve 100 µM CaCl₂ kombinasyonu en uygun tohum boncuk oluşumunu vermiştir. Genel olarak boncuk üretimi başarılı olsa da, tohumlarda eksplant içeren ve içermeyen boncuk yapıların ayırımı çok önemli bir husustur. Bu amaçla araştırmacılar tarafından ayırma işlemi için Şekil 4'te görülen değişik makinalar geliştirilmiştir (Onishi ve ark., 1994).



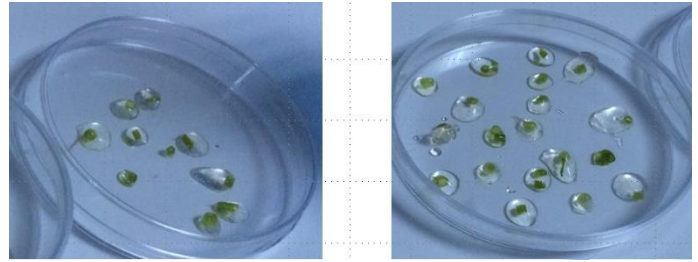
Şekil 4 / Figure 4. Delikli plakalı kapsülasyon makinesi (üst solda) ve dijital jel seleksiyon makinesi (üst sağda) / Perforated plate encapsulation machine (above on the left) and digital gel selection machine (above on the right) (Onishi ve ark., 1994).

Delikli plakalı kapsülleme aparatı. Aljinat embriyolu çözelti, bir besleme tankından (a) yakındaki depodan beslenir. Gezgin dişlisinin (b) dış çevresi delikli plakadan yapılmıştır (c) Delikli plaka delik çapı 5 mm olup 1,200 delik içerir. Aljinat çözeltisi damlacıkları kanaldan sertleştirme kabının (d) içine düşer.

Dijital Jel Selektör. (1) Depo alanı, (2) taşıyıcı ünite, (3) dönen tambur, (4) kapsül ayırma başlığı, (5) ışık, (6) CCD kamera, (7) taşıyıcı aparat, (8) sıyırıcı fırça, (9) eksplantsız atık kabı, (10) üfleyici, (11) eksplantlı ürün konteyner, (12) elektrikli valf, (13) hava kompresörü.

3.3. Sentetik tohumların saklanma süresi / Storage time of synthetic seeds

Çalışmada tohum içeren boncuklar ile içermeyenler birbirinden göz yordamı ile ayır edilmişlerdir. Araştırmada, sertlik bakımından en uygun olan % 3 aljinat içeren tohum boncuklarında saklama süresi ile ilgili çalışma yapılmıştır (Şekil 5). Yapılan çalışmada; 0, 30, 60, 90 gün saklanan tohumların çimlenme özelliklerini kaybedip kaybetmeyecekleri incelenmiştir. Çalışmada 0 gün olarak, boncuk elde edildikten sonraki gün kabul edilmiştir. Tohumlar 30, 60 ve 90. günler için, çimlenme ortamı hazırlanarak test edilmişlerdir. Yapılan değerlendirmede elde edilen sonuçlar Tablo 2 ve Şekil 6 da verilmiştir. Buna göre 0. günde; çimlenme yüzdesi % 80 olmuş ancak 20 gün sonra çimlenmişlerdir. Oysa, 30 gün depolamadan sonra çimlenenlerin yüzdesi % 10 olmuş çimlenme süresi ise 50 güne çıkmıştır. Diğer tarihlerde ise çimlenme olmamıştır. Gün sayısı artışına bağlı olarak yapılan değerlendirmede; gün sayısı ile çimlenme arasında negatif korelasyon ($r^2=-0,835$) çimlenme yüzdesi ile çimlenme arasında pozitif korelasyon ($r^2=0,958$) bulunmuştur.

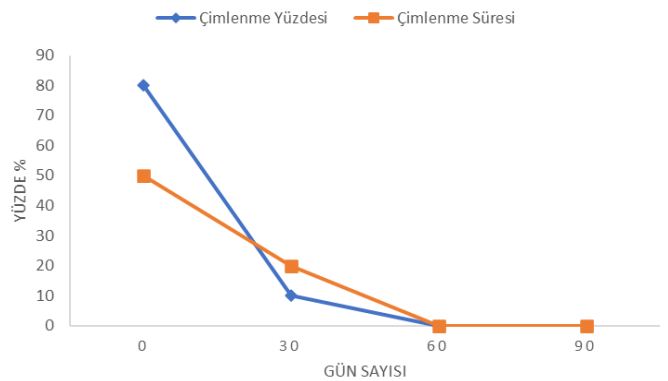


Şekil 5 / Figure 5. Petri içerisinde % 2 (soldaki) ve % 3 (sağdaki) sodyum aljinat ve 100 mM CaCl₂ konsantrasyonları sonucunda elde edilen boncuk oluşumu / Capsule formation obtained as a result of 2% (left) and 3% (right) sodium alginate and 100 mM CaCl₂ concentrations in the Petri dish.

Tablo 2 / Table 2

Domates hipokotil eksplantlarından elde edilen sentetik tohumların farklı sürelerde depolanması sonucunda elde edilen bitki sayısı / The number of plants obtained as a result of storing synthetic seeds obtained from tomato hypocotyl explants for different periods.

Depolama Süresi (gün)	Çimlenme Yüzdesi	Kapsül Tohumlar	Çimlenme Süresi
0	80	Canlı	20
30	10	Canlı	50
60	0	Bozuk	-
90	0	Bozuk	-



Şekil 6 / Figure 6. Domates hipokotil eksplantlerinde elde edilen sentetik tohumların farklı sürelerde depolanması sonucunda elde edilen bitki sayısı / Number of plants obtained as a result of storage of synthetic seeds obtained from tomato hypocotyl explants for different periods.

Elde edilen sonuçlar, diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında aljinatın toksik etkisi tohum çimlenmesini etkileyebilmektedir (Patel ve ark., 2000). Diğer taraftan kullanılan kaplama materyali domates için uygun olmayabilir (Sokamoto ve ark., 1992). Besin solüsyonları canlılığı etkilemektedir. Orkide bitkisinde yapılan çalışmalarda MS tuzlarının sentetik tohumu desteklediği ve faydalı olduğu sonucu bildirilmiştir (Gardi ve ark., 1999; Saiprasad ve Polisetty, 2003; Huda ve ark., 2007; Ozden-Tokatli, 2008; Bektas ve ark., 2011). Bu çalışmada uygulanan metotlarda yer alan çimlenme ve saklama koşullarında domatesin soğuğa karşı etkisi bilinmediğinden dikkate alınmamıştır. Domatesin soğuğa toleransı da çimlenmeyi etkileyebilmektedir (Zhang ve ark., 2004).

4. Sonuç / Conclusion

Elde edilen verilere göre, domates bitkisinin farklı eksplantlarından elde edilen sentetik tohumlar kaplandıktan sonra +4 °C de saklanmış ve 0, 30, 60 ve 90 gün sonra rejenerasyonlarına bakılarak saklama sürelerinin rejenerasyon üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Sentetik tohumların çimlenme yüzdesi ve çimlenme süresi hakkında bilgi sahibi olmak için depolama yapılmıştır. Depolamanın ilk gününde % 80 çimlenme gücüne sahip tohumlar, canlı tohum olarak 20 günde çimlenmişlerdir. İkinci uygulamada 30 gündeki sentetik

tohumlarda ise çimlenme % 10 a düşmüş ve çimlenme süresi ise 50 gün sürmüştür. Çalışmanın diğer uygulamaları olan 60 ve 90 gündeki çimlenmede herhangi bir canlılık görülmemiştir. Bu çalışmanın, depolama süresi uzadıkça sentetik tohum canlılığının kaybolduğu görülmesine rağmen, sentetik tohum üretiminde depolama sürelerinin kısaltılmasının avantaj sağlayacağı beklenmektedir. Bu çalışmada, ekonomik önemi olan bitkilerin klon olarak çoğaltılması için sentetik tohum teknolojisini geliştirilmesinde ülkemize katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Domates bitkisinde sentetik tohum teknoloji sayesinde hibrit tohumların ebeveynlerinin ve değerli bitkiler için klon şeklinde üretimi yapılabilmesi muhtemeldir. Buna ilaveten, sentetik tohum teknolojisinde, tohum saklama süresini uzatmak, maliyeti ve işçiliği düşürebilmek adına bu teknolojinin makineleştirilmesi gerekmektedir.

Çıkar çatışması / Conflict of interest: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder / The authors declare that they have no conflict of interests.

Etik beyanı / Informed consent: Bu çalışmada, yazarlar, hiç bir insan ya da hayvan denek kullanılmadığını ve etik kurul iznine gerek olmadığını beyan eder / The authors declare that this manuscript did not involve human or animal participants and informed consent was not collected.

Kaynaklar / References

- Babaoglu, M., Gurel, E., & Ozcan, S. (2001). *Bitki biyoteknolojisi doku kültürü ve uygulamaları*. (pp. 1-374). Selçuk Üniversitesi Yayınları.
- Bektas, E., Sokmen, A., & Cuce, M. (2011). Salep bitkisinin tohumlarından sentetik tohum üretimi. *I. Salep Orkide Çalıştayı*, 117-120.
- Daniel, G. H., & Ibrahim, D. A. (2018) New protocol of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro* propagation, Kurdistan, Iraq. *Innovaciencia*, 6(1), 1-13.
- Das, A., Mahanta, M., Pramanik, B., & Gantait, S. (2021). Artificial seed development of selected anti-diabetic plants, their storage and regeneration: progress and prospect. In: Gantait S., Verma S. K., Sharangi A. B. (eds) *Biotechnology of Anti-diabetic Medicinal Plants* (pp. 409-436). Springer, Singapore.
- Erdem, M., & Uysal, H. (2021). Sentetik tohum. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, 2(2), 68-74.
- Gantait, S., & Mitra, M. (2019). Applications of synthetic seed technology for propagation, storage, and conservation of orchid germplasm. In: Faisal M., Alatar A. (eds) *Synthetic Seeds* (pp. 301-321). Springer, Cham.
- Gardi, T., Piccioni, E., & Standardi, A. (1999). Effect of bead nutrient composition on regrowth of stored vitro-derived encapsulated microcuttings of different woody species. *Journal of Microencapsulation*, 16(1), 13-25.
- Huda, A. K. M. N., Rahnau, M., & Bari, M. A. (2007). Effect of carbon source in alginate bead on synthetic seed germination in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of Plant Sciences*, 2, 538-544.
- Lledó, M. D., Crespo, M. B., & Amo-Marco, J. B. (1996). Micropropagation of *Limonium thiniense* Erben (Plumbaginaceae) using herbarium material. *Botanic Gardens Micropropagation News (United Kingdom)*, 2(2), 18-21.
- Nongdam, P. (2016). Development of synthetic seed technology in plants and its applications: a review. *International Journal of Current Science Research and Review*, 19(4), 86-101.
- Nugrahani, P., Moeljani, I. R., & Lydiana, I. (2018). Encapsulation and germination of synthetic seeds of Chrysanthemum. *Proceedings of the International Conference on Science and Technology (ICST 2018)*, Atlantis Press. 126-129.
- Onishi, N., Sakamoto, Y., & Hirokawa, T. (1994). Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39(2), 137-145.
- Ozden-Tokatli, Y., De Carlo, A., Gumusel, F., Pignattelli, S., & Lambardi, M. (2008). Development of encapsulation techniques for the production and conservation of synthetic seeds in ornamental plants. *Propagation of Ornamental Plants*, 8(1), 17-22.
- Parrot, W. A., Merkle, S. A., & Williams E. G. (1993). Somatic embryogenesis: potential for use in propagation and gene transfer systems. In: Murray D. R. (ed) *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology* (pp. 158-200). International Press, UK.
- Parrott, W. A., & Bailey, M. A. (1993). Characterization of recurrent somatic embryogenesis of alfalfa on auxin-free medium. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 32(1), 69-76.
- Patel, A. V., Pusch, I., Mix-Wagner, G., & Vorlop, K. D. (2000). A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. *Plant Cell Reports*, 19(9), 868-874.
- Porter, J. E. (2008). Analysis of tomato synthetic seeds for the development of an optimized encapsulation system, Master Thesis, (pp. 1-45). West Virginia University.
- Reddy, M. C., Murthy, K. S. R., & Pullaiah, T. (2012). Synthetic seeds: A review in agriculture and forestry. *African Journal of Biotechnology*, 11(78), 14254-14275.
- Saiprasad, G. V. S., & Polisetty, R. (2003). Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39(1), 42-48.
- Sakamoto, Y., Mashiko, T., Suzuki, A., Kawata, H., & Iwasaki, A. (1992). Development of encapsulation technology for synthetic seeds. *International Symposium on Transplant Production Systems*, 319, 71-76.
- Standardi, A., & Piccioni, E. (1998). Recent perspectives on synthetic seed technology using nonembryogenic *in vitro*-derived explants. *International Journal of Plant Sciences*, 159(6), 968-978.
- Zhang, X., Fowler, S. G., Cheng, H., Lou, Y., Rhee, S. Y., Stockinger, E. J., & Thomashow, M. F. (2004). Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis. *The Plant Journal*, 39(6), 905-919.

Cite as / Atıf şekli: Secgin, Z., & Okumus, A. (2022). Domates (*Lycopersicon esculentum* L.)'te sentetik tohum üretiminde aljinat oranlarının depolama zamanına etkisi. *Front Life Sci RT*, 3(1), 30-35.



Derleme / Review article

CRISPR/Cas9 teknolojisi ve gıda alanında kullanımı

Aysegul Bolukbas^{*1} , Ali Gucukoglu¹ 

¹ Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Food Hygiene and Technology, 55200, Samsun, Turkey

Öz

Artan dünya nüfusu ile birlikte, tarıma elverişli araziler azalmakta ve buna bağlı olarak gıda güvenliğine ilişkin endişeler artmaktadır. Bu endişelerin önüne geçmek için moleküler ıslah yöntemlerinin yanı sıra modern biyoteknolojik araçlarında kullanılması gerekmektedir. CRISPR/Cas9, bölgeye özgü nükleaz enzimini kullanarak çift sarmallı kırılmalar oluşturan genom düzenleme yöntemidir. Çiftlik hayvanlarında hastalıklara karşı direnç oluşturulması, verim özelliklerinin yükseltilmesi, bakteriyofajlara karşı dirençli başlangıç kültürlerinin (starter kültürler) elde edilmesi, tıp alanında kanser türleri ve kalıtsal hastalıkların elemine edilmesi, tarım alanında kuraklık ve zararlılara karşı daha dirençli ve yüksek verimli bitkilerin yetiştirilmesi için kullanılmaktadır. CRISPR/Cas9 teknolojisinin yasal mevzuat çerçevesinde ve bilimsel araştırmalar kontrolünde gerçekleştirildiğinde yararlı olacağı düşünülmektedir. Ancak teknolojik uygulamaların toplum üzerinde kolay kabul görmemesi ve yöntemin kullanımı konusunda etik tartışmalar devam etmektedir.

Anahtar kelimeler: CRISPR/Cas9; CRISPR/GDO farkı; CRISPR teknoloji; genom düzenleme; gıda

CRISPR/Cas9 technology and usage in the food industry

Abstract

By the increase of world population, arable lands are decreasing and related to this, food security concerns are increasing. In order to avoid these concerns, it is necessary to use modern biotechnological tools and molecular breeding methods. CRISPR/Cas9 is a genome editing method that creates double-stranded breaks using the site-specific nuclease enzyme. This method is used for providing disease resistance in farm animals, increasing yield characteristics, obtaining starter cultures resistant to bacteriophages, eliminating cancer types and hereditary diseases in medicine, growing more resistant and high yielding plants against drought and pests in agriculture. In the field, it is used for the cultivation of high-yielding plants that are more resistant to drought and pests. It is thought that CRISPR/Cas9 technology will be useful when it is carried out within the framework of legal regulations and under the control of scientific research. However, ethical debates continue regarding the use of the method and the fact that technological applications are not easily accepted by the society.

Keywords: CRISPR/Cas9; CRISPR/GMO difference; CRISPR technology; food; genomic regulation

* Sorumlu yazar / Corresponding author.

E-mail: aysegul.korkmaz00@gmail.com (A. Bolukbas).

<https://doi.org/10.51753/flsrt.997899> Yazar katkıları / Author contributions

Geliş tarihi / Received 20 Eylül 2021 / 20 September 2021; Kabul tarihi / Accepted 08 Ocak 2022/ 08 January 2022

Çevrimiçi yayın / Available online 29 Nisan 2022 / 29 April 2022

2718-062X © 2022 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

1. Giriş / Introduction

Dünyada her geçen gün artan nüfusa bağlı olarak gıda arzı oluşmakta ve üretilen gıdalar bu ihtiyacı karşılamaya yetersiz kalmaktadır. Hayvansal gıdaların üretimi için yetiştirilen çiftlik hayvanlarının yetiştirme koşullarını etkileyen iklimsel farklılıklar, çevresel problemler ve bakım-besleme koşullarının değişkenliği sebebiyle adaptasyon güçlükleri meydana gelmekte ve buna bağlı olarak çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Uzun yıllardan beri artan gıda ihtiyacını karşılamaya yönelik sorunların çözüme ulaşması için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Esen ve ark., 2020). Günümüzde tüketiciler, gıdaların açlığı gidermesinin yanı sıra hastalıkların önlenmesine de önemli katkılar sağladığına inanmakta, bu nedenle gıda endüstrisinin küresel ekonomi üzerindeki güçlü etkisinin katkısıyla tüketicilerin özel gereksinimlerini karşılamak için genom düzenleme tekniklerinin kullanıldığı yeni teknolojik uygulamalar ön plana çıkmaktadır (Bigliardi ve Galati, 2013; Ouyang ve ark., 2017; Es ve ark., 2019).

Canlı bir organizmanın sahip olduğu genomda çeşitli manipülasyonlar ile istenilen bir nükleotid dizisinin hedeflenen noktaya eklenmesine, istenilen noktadan çıkartılmasına ve yer değişikliği yapılmasına genom düzenleme (GD) denilmektedir (Proudfoot ve ark., 2015). Genom düzenleme çalışmaları 1991 yılında ZFN (Zinc Finger Nucleases-Çinko Parmak Nükleaz)'lerin keşfi ile başlamış, 2012 yılında TALEN (Transcription Activator Like Effector Nucleases-Transkripsiyon Etketör Benzeri Nükleazlar) tekniğinin ortaya çıkması ile artmış ve 2013 yılından itibaren çok daha kolay uygulanan ve maliyeti diğer uygulamalara göre daha düşük olan CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat - Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Polindromik Tekrar Kümeleri/ CRISPR Associated) yöntemiyle devam etmiştir (Mali ve ark., 2013; Ruan ve ark., 2017; Ozyigit ve ark., 2021). Science dergisi 2015 yılında CRISPR yöntemini yılın buluşu seçerek bu yöntemin araştırmacılar için ilgi odağı olmasını ve çalışmalar yapmasını hızlandırmıştır. 2020 yılında Emmanuelle Charpentier ve Jennifer Doudna'nın "Genom düzenleme için bir yöntem geliştirmelerinden dolayı" Nobel Kimya Ödülünü alması ile CRISPR yöntemine olan ilgi tüm dünyada artmıştır (Ruan ve ark., 2017; Anonim, 2020).

CRISPR, bakterilerin savunma sistemlerinin araştırılmasıyla ortaya çıkmış olup, hücrelerdeki DNA yapısının değişime uğraması ile tıp alanında kalp hastalıkları, kanser türleri ve görme kaybına neden olan bazı kalıtsal hastalıkların tedavisinde yeni bir teknik olarak kullanılmıştır (Zhan ve ark., 2019; Luthra ve ark., 2021; Seok ve ark., 2021). Tarım ve gıda alanında ise yalnızca yüksek verimli bitkiler değil, aynı zamanda besin değeri yüksek, kuraklığa ve tarım zararlılarına karşı daha dayanıklı bitkilerin yetiştirilmesinde de kullanılabilir. Herbisit toleransı, böcek direnci, tane verimi, bitki boyu ve ağırlığı gibi temel agronomik özelliklerin yanı sıra, ürünlerin duysal ve besleyici özellikleri gibi agronomik olmayan özellikleri iyileştirilerek gıda endüstrisine önemli ölçüde fayda sağlamıştır (Es ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2020).

Çiftlik hayvanlarında hastalıklara karşı direnci arttırmak ve buna bağlı olarak üretimi geliştirmek için genom düzenleme yöntemleri kullanılmaktadır (Proudfoot ve ark., 2015). CRISPR yöntemi embriyo transfer teknolojisi ile birleştirilerek hayvan ıslahında kullanılmakta, hayvansal ürünlerde verim ve kaliteyi artırmanın yanında hayvan refahında da artış ve hastalıklara karşı direnç sağlanmasına katkı sunmaktadır (Ruan ve ark., 2017; Esen ve ark., 2020).

Genomik seleksiyonlar, hastalıklara karşı direncin artırılmasını sağladığı gibi verimin artırılmasında da avantaj sağlamaktadır. Bu amaçla CRISPR/Cas9 sisteminin bu alanda kullanımı ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur. Çalışmalarda hayvanlarda alerjiye sebep olan genin inaktive edilmesinden farelerin sperm kuyruklarının uzatılmasına, kolesterol seviyelerinin düşürülmesinden karaciğer kanser hücrelerinin azaltılmasına kadar birçok araştırma yapılmıştır (Ding ve ark., 2014; Xue ve ark., 2014; Veron ve ark., 2015; Young ve ark., 2015). CRISPR teknolojisinde kullanılan Cas9 proteininin çalışma prensibi üzerine yapılan araştırmalar bilim insanlarına yeni alanlarda çalışma fırsatları veren ve istenmeyen DNA parçalarının hücre içerisinden hassas bir şekilde çıkarılmasının yanında istenen özelliklerin DNA içerisine eklenmesini sağlayan bir yol olarak değerlendirilmektedir (Ruan ve ark., 2017). Bu derlemede birçok alanda araştırmaya ve geliştirmeye müsait olan CRISPR/Cas9 teknolojilerinden, çiftlik hayvanları ve hayvan sağlığında kullanımı ile gıda alanındaki uygulamalarından bahsedilecek ayrıca kullanımındaki avantajları, dezavantajları ve etik sorunları hakkında bilgi verilecektir.

2. CRISPR teknolojisi / CRISPR technology

Genom düzenleme, DNA üzerinde belirlenen alanlarda değişiklik ya da düzenlemeler yapılmasıdır. Hücrelerin genomlarında özelleşmiş DNA bölümlerinde hedeflenen değişiklikleri yapabilmek için tasarlanan genom düzenleme, hücre içerisindeki DNA'nın verimli ve hatasız şekilde değiştirilebilmesi için kullanılan bir tekniktir. Bu tekniğin yaygın olarak kullanılmasında ve araştırmacıların ilgi alanı haline gelmesinde özelleştirilebilirlik kolaylığı ve çoklu hücre tiplerinde uygulanması etkili olmuştur (Ruan ve ark., 2017). Genom düzenleme sistemi ile ilgili yapılan çalışmalarda ZFN ve TALEN sistemleri en çok bilinen ve kullanılan yöntemlerdendi (Deng ve ark., 2012). Bununla birlikte 2013 yılında CRISPR/Cas sistemi olarak tanımlanan, bakteriyel adaptif immün sistemi ve DNA bağlanma proteini yerine küçük rehber RNA bulunduran sistematik yapı üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır (Cong ve ark., 2013; Hwang ve ark., 2013; Jinek ve ark., 2013; Cho ve ark., 2014).

CRISPR'dan önce kullanılan genom düzenleme araçları zor kullanımlı, uygulanması zaman alan ve maliyeti yüksek olan uygulamalardır. DNA çift zincir kırıklarını tamir etmeleri, gen delesyonu, gen insersiyonu, nokta mutasyonları ve kromozomların yeniden düzenlenmesi ZFN, TALEN ve CRISPR gibi programlanabilir nükleazların ortak özellikleridir (Mali ve ark., 2013). ZFN ve TALEN, temelde kültüre edilmiş memeli hücrelerinde gen düzenlenmesi amacıyla kullanılmasının yanı sıra virüs, bakteri, nematod, kurbağa, bitki, böcek, fare, sıçan, domuz gibi organizmalarda endojen gen sisteminin modifiye edilmesi amacıyla da kullanılmaktadır (Gaj ve ark., 2013; Segal ve Meckler, 2013). TALEN'ler yapı bakımından ZFN'ye benzemekte, fakat TALEN'lerin herhangi bir DNA dizisine göre dizayn edilebilirlik özelliği diğer nükleazlarla karşılaştırıldığında avantaj olarak görülmektedir. TALEN'lerin dizayn edilmesindeki zorluk, hedef dizinin 5' ucunda iki amino-terminal şifreli tekrar içeren katlanmalar tarafından tanıyan timin nükleotidinde ihtiyaç duymasıdır (Miller ve ark., 2011; Mak ve ark., 2012; Ozyigit ve ark., 2021).

Prokaryot canlılarda CRISPR olarak adlandırılan belirli DNA bölgeleri kazanılmış bağışıklık sisteminin oluşturulmasında ilk sırada yer alan en önemli unsurdur (Jansen

ve ark., 2002; Barrangou ve ark., 2007). Ishino ve ark. (1987) tarafından *Escherichia coli* üzerinde yapılan bir çalışma sırasında apoptoz inhibitör protein (IAP) gen dizi analizleri yapılırken CRISPR bölgelerinin tekrarlayan palindromik dizilerinin varlığı belirlenmiştir. Apoptoz inhibitör protein gen dizi analizleri sırasında belirli tekrarlar ile karakterize yaklaşık 29 nükleotid ve bu tekrar kümelerinin arasında bulunan yaklaşık 32 nükleotidlik bölgeler (ara DNA bölgeleri) belirlenmiş, fakat tam olarak özellikleri anlaşılamamıştır. Son dönemde yapılan çalışmalar ile tekrar eden DNA bölgelerinin dizi analizleri sonucu transpozonların, bakteriyofajların ve plazmidlerin ekzojen genetik materyaller ile özdeş yapıya sahip olduğu, bununla birlikte bu tekrarlayan DNA bölgelerinin çok sayıda bakteride bulunduğu bildirilmiştir (Bolotin ve ark., 2005).

Biyoinformatik analizler neticesinde CRISPR bölgeleri çevresinde *Cas* (CRISPR Associated) adı verilen genlerin bulunduğu ve CRISPR bölgeleri ile ilişkili olduğu ifade edilmekle birlikte çoğu *Cas* geninin helikaz ve nükleaz gen ailelerine ait benzer özellik gösteren dizi grupları içerdiği belirtilmiştir (Jansen ve ark., 2002). Bu bilgiler ışığında CRISPR/*Cas* sistemine ait bilgilerin RNA aracılı bir savunma sisteminden kaynaklanabileceği düşüncesi ortaya konmuştur. Barrangou ve ark. (2007)'nin yaptıkları çalışma ile bu hipotez doğrulanmış olup, bakteriyofaj durumuna karşı CRISPR dizilerinin ve protein yapılarının müdahalede bulunduğu ispatlanmıştır. Son yıllarda CRISPR/*Cas* mekanizmasının, RNA aracılı müdahale yöntemiyle ilişkili yapmış olduğu değişiklikler ve bu değişikliklere ait veriler büyük oranda açığa kavuşturulmuştur (Barrangou ve ark., 2007).

CRISPR dizilerine ait bölgelerin en spesifik özelliği, içerdikleri tekrarlayan kısa DNA dizileridir. Aralayıcı (spacer) olarak adlandırılan DNA bölgeleri ise palindromik DNA dizi tekrarlarının arasında yer almakla birlikte, bu aralayıcı bölgeler özgün DNA dizilerinden oluşturulan ve kazanılmış bağışıklık sisteminin temel yapısını oluşturan etmenlerdir (Ozyigit ve ark., 2021).

Prokaryotik bir yapının daha önce karşılaşmış olduğu virüs ile tekrar karşılaşmasından sonra bu aralayıcı diziler patojene karşı tanıma bölgesi olarak tepki vermekte, istilacı yapıyı ortadan kaldırmak için harekete geçmektedir. Bu durum aralayıcı bölgelerin virüs ya da plazmidlerin nükleik asit yapılarının prokaryot genomuna aktarılması esasına dayanmaktadır (Barrangou ve Oost., 2013). CRISPR bölgesinde yer alan tekrar dizileri ve boyutları çoğunlukla korunmakta, fakat farklı genom yapılarında bu durum değişebilmektedir. CRISPR lokusu içinde tekrar dizilerinin boyutları 21-48 baz çifti arasındayken, aralayıcı bölgelerinin boyutları 26-72 baz çifti aralığında bulunmaktadır (Bolotin ve ark., 2005; Garneau ve ark., 2010; Horvath ve Barrangou, 2010).

Tek bir genom üzerinde bulunan CRISPR bölgesi bir ya da daha fazla sayıda olabilmektedir. CRISPR bölgesinde bulunan ve "lider dizi" olarak adlandırılan korunmuş bölgeler, transkripsiyon yönünün belirlenmesine imkân sağlamaktadır (Jansen ve ark., 2002). *Cas* gen bölgeleri, CRISPR sistemine ait diğer önemli bileşendir. *Cas* genleri genel olarak CRISPR sisteminin yakınında bulunmakla birlikte, prokaryotların savunma sistemleri için oldukça önem arz etmektedir. Çünkü bu gen dizilerinin içinde helikaz ve nükleaz yapılarının bulunması DNA dizilerinin açılmasına ve kesilmesine imkân sağlamaktadır. Bunun için proteinlerinin nükleaz, helikaz ya da RNA bağlanma proteini şeklinde fonksiyon gösterebilmesi için nükleik asitlerle etkileşim halinde olması gerekmektedir (Makarova ve ark., 2002; Horvath ve Barrangou, 2010).

3. Gıda alanında CRISPR kullanımı / Use of CRISPR in food

Gıda bilimi hızla büyüyen dünya nüfusu için güvenli ve sürdürülebilir gıda üretimini iyileştirmek amacıyla tüm biyolojik, kimyasal ve fiziksel süreçleri araştıran, birçok bilim ve disiplinin araştırma faaliyetlerinin ortak alanı olarak tanımlanmaktadır. Gıda teknolojisinde formülasyon, işleme, depolama ve ürün geliştirilmeye yönelik zaman içinde birçok farklı yöntemler uygulanmıştır (Selle ve Barrangou, 2015). Gıdalarda var olan mikroorganizmaların bazıları ürün prosesinde fayda sağlarken bazılarının ise zararlı etkileri nedeniyle kontrol altına tutulmaları gerekmektedir. Zararlı mikroorganizmalar gıda ürünlerindeki varlıkları ile gıda kaynaklı hastalıklara ve gıdalarda bozulma gibi pek çok olumsuzluğa yol açarken, faydalı mikroorganizmalar gıdaları uzun süre koruma ve bireylerin sindirim sisteminde düzen sağlama gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Gıdaların yapısında bulunan basit karbonhidratlar, lipitler, proteinler, mineral ve vitaminler gibi değerli substratların varlığı yararlı ve zararlı mikroorganizmaların üreme ve çoğalması için uygun ortamı sağlamaktadır (Papadimitriou ve ark., 2015; Stout ve ark., 2017).

Fermente gıdalar, gıda biliminin temelini oluşturmakta ve süt, et, sebzeler ve tahıllar en yaygın substratlardan sayılmaktadır. Başlangıç kültürleri bu substratları ilgili ürünlere dönüştürmede önemli bir rol almaktadır (Caplice ve Fitzgerald, 1999). Son zamanlarda üzerinde yoğunlaşılacak mikroorganizmalar ise probiyotiklerdir. Probiyotikler "yeterli miktarda uygulandıklarında konağa yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmaktadır (Hill ve ark., 2014; Stout ve ark., 2017).

Başlangıç kültürleri ve probiyotikler binlerce yıldır kullanılmaktadır, fakat bazı durumlarda bakteriyofaj probleminden dolayı fermentasyon işlemi aksayabilmektedir. Yapılan araştırmalarda laktik asit üreten mikroorganizmalarda analiz edilen laktobasil genomlarının %62,9'unda ve bifidobakteri genomlarının %77'sinde CRISPR/*Cas9* lokuslarının olduğu tespit edilmiştir (Briner ve ark., 2015; Sun ve ark., 2015; Stout ve ark., 2017). CRISPR/*Cas9* sistemlerinin bu mikroorganizmalarda bulunuyor olması faj kaynaklı fermentasyon işlemlerindeki başarısızlıklara engel olmak için bir bakış açısı sağlamaktadır. Ek olarak suş tipleme, plazmid aşılama, genom düzenleme ve antimikrobiyal aktivite uygulamalarıyla fermentasyon süreçlerinde güçlü bir araç olabilmektedir. Bu uygulamaların birçoğu her yıl gıda kayıplarının oluşmasına neden olan zararlı mikroorganizmaların kontrolünde ve yararlı mikroorganizmaların yönetilmesinde CRISPR/*Cas9* sisteminin kullanımı ile yapılabileceği değerlendirilmektedir (Scallan ve ark., 2011; Scharff, 2012; Stout ve ark., 2017).

FDA (U.S. Food and Drug Administration-Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi), insan tüketimi için Maynard Aqua Bounty Teknoloji tarafından üretilmiş hızlı büyüyen somon balıklarını onaylamış ve bu hayvanlar ilk CRISPR/*Cas9* sistemi ile üretilmiş transgenik hayvanlar olarak kayıtlanmıştır. Fakat bu üretim etik olarak tartışılmakta ve bazı bilim insanları bu transgenik hayvanların kaçması durumunda ekolojik dengeyi bozabileceklerini düşünmektedir. Bu tür endişeleri gidermek için ise Alabama'da bulunan Auburn Üniversitesi'nde bir grup araştırmacı transgenik balıklar üzerinde üreme hormonlarını kontrol eden genleri CRISPR/*Cas9* ile etkisiz hale getirmek için çalışmalar yapmış, sonuç olarak kısırlaştırılmış balıkların popülasyon üzerinde istenmeyen herhangi bir genetik etki

yaratamayacağını ileri sürmüşlerdir (Tan ve ark., 2013; FDA, 2015; Ledford, 2015; Reardon, 2016).

Et endüstrisinde genellikle besi hayvanı olarak erkek hayvan tercih edilmektedir. Konu ile ilgili araştırmacılar üretimde ya sadece erkek hayvanların ya da daha kaslı dişi sığırların doğması konusunda çalışmalar yapmaktadır. Ayrıca uzun boynuzlarından dolayı yaralanmalara sebep olan sığır ırklarında olası sağlık problemlerine engel olmak için boynuz kesimleri yapıldığı bilinmektedir (Tan ve ark., 2013). Boynuz kesim işlemine önüne geçmek için CRISPR/Cas9 kullanarak boynuzsuz hayvan üretme çalışmaları yapılmış ve doğan iki adet buzağı bu konuda araştırmalara konu olmuştur (Tan ve ark., 2013; Ledford, 2015; Reardon, 2016). Kanatlı endüstrisinde ise yumurtacı olarak kullanılan tavukların erkek civciv yumurtalamasına karşın, erkek embriyolarının ultraviyole ışık altında parlaması için tavukların cinsiyet kromozomlarına yeşil floresan proteini için bir gen eklemektedirler. Bu sayede, erkek civcivler yumurtadan çıkmadan saptanabilmekte ve başta aşı üretimi gibi farklı alanlarda kullanabilmektedirler (Tan ve ark., 2013; Reardon, 2016).

Hayvan ıslahında yapılan çalışmalarda karşılaşılan bazı sorunlar bulunmaktadır. Bunlardan biri ekonomik özellikleri kontrol eden gen bölgeleri arasındaki negatif korelasyonlardır. Örneğin et verimi iyi olan bir sığırın süt verimindeki zayıflık ya da yumurta verimi iyi olan bir tavuğunun yaşama süresinin kısa olması gibi durumlar yıllardır bilinmektedir. CRISPR/Cas9 sistemi sayesinde bu gibi olumsuz durumların ıslahının mümkün olacağı düşünülmektedir. Bunların yanı sıra çiftlik hayvanlarında yapılacak olan genom düzenleme çalışmaları ile hastalıklara karşı direnç geliştirmede, ürün verimini ve ürünlerin kalitesini arttırmada, yeni biyomedikal modelleri oluşturmada, adaptasyon kabiliyetini arttırmada, döl verimini yükseltmede, yemden yararlanımı arttırmada, kalıtsal hastalıkları tedavide ve yeni nesle aktarımına engel olmada bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Proudfoot ve ark., 2015). Gerçekleştirilen genom modifikasyonları ile hayvansal gıda üretimi ve tarım alanındaki hayvanların verimlerini arttırma çalışmalarının yanı sıra organ nakilleri konusunda da çalışmalar yapılmaktadır. Bu kapsamda domuz embriyolarına verilen insan kök hücrelerinin nakil bekleyen insanlara aktarımına yönelik çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir (Hackett ve ark., 2014). Bitkilerin tat ve besin değerlerini arttırmak ya da yapılan işlemler sonrasında aroma kaybını önlemek, bitkilerin hastalıklara dirençlerini arttırmak ve hastalıklarını azaltmak, verimi arttırmak, zehirli ağaçları gıdaya döndürmek ve gluten gibi alerjenlerde değişimler sağlamak CRISPR/Cas9'un tarım alanındaki kullanım amaçlarıdır (Zhang ve ark., 2020). CRISPR sisteminin keşfinden sonra ilk çalışma Feng ve ark. (2013) tarafından pirinç genomu üzerine yapılmıştır. Bu ilk çalışmanın ardından sistemin uygulanabilirliği ispatlanmış olup ardından buğday (Wang ve ark., 2014), mısır (Liang ve ark., 2014), pirinç (Miao ve ark., 2013) gibi yüksek besin değerine sahip mahsullerde de çalışmalar yapılmıştır.

CRISPR/Cas9 sisteminin avantajları ve olumlu yönlerde yapılan öngörülerini yanında dezavantajları ve etik problemleri de mevcuttur. ZFN ve TALEN gibi spesifik bölgeleri hedef alan genom düzenleme yöntemlerine nazaran düşük maliyetli, tasarımı kolay ve birçok geni değiştirmeye olanak sağlayan bu yöntemin bitkiler ve hayvanlarda kullanımını kısıtlayan bazı faktörler mevcuttur (O'Geen ve ark., 2015). Bunlardan birisi değişiklik yapılması istenen bölgeye bağlanması istenen yaklaşık 20 bazlık gRNA'ların, genomun herhangi bir yerine bağlanabilme olasılığı bulunmasıdır (Ozyigit ve ark., 2021). Bu

da aktarımı gerçekleşen CRISPR/Cas9 sisteminin genomun farklı bölgelerinde hedef dışı etkilerin olma olasılığını arttırarak, çeşitli hastalıkları ortaya çıkarabileceği ve hedef bölgede komşu genlerinde etkilenmesi gibi birçok problemin oluşmasına sebep olabileceği akla gelmektedir. CRISPR'la ilgili yapılan çalışmaların çoğu, hedef bölgenin spesifitesini arttırmak için yeni yöntemler geliştirmektedir. Bu sayede hedef dışı etkiyi azaltarak istenilen değişiklikleri gerçekleştirmek amaçlanmaktadır (O'Geen ve ark., 2015). CRISPR/Cas9 sisteminin teması DNA'da istenen yönde değişiklik yapmak olduğundan, istenmeyen olası bir durumda organizma yarardan ziyade zarar görecektir. Ayrıca çiftlik hayvanlarında yapılmış çalışmaların hiçbirinde yetişkin bir hayvan kullanılmamış ve kullanılabileceği herhangi bir transfeksiyon metodu üstünde çalışılmamıştır (Cildir ve Ozmen 2018). Sistemin günümüzde kullanılma şekli yalnızca istenilen değişiklikleri barındıran yavrular elde etmeye olanak sağlamasıdır. Bir başka dezavantaj ise embriyolara yönelik yapılan çalışmalarda aktarımı gerçekleşen sistemin hücrelerin her birinde aynı zamanda çalışmamasıdır (Crispo ve ark., 2015; Peterson ve Niemann, 2015; Bevacqua ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016; Zuo ve ark., 2016; Niu ve ark., 2017).

Etik tartışmaların en önemlisi geliştirilen bu yöntemin canlıların eşey hücrelerini manipüle etmede kullanılabilme olasılığıdır. İnsan dahil tüm canlı organizmaların embriyolarında herhangi bir özelliğin istenen yönde değiştirilebilmesi hatta istenen özelliklere sahip bebeklerin tasarlanabilmesi mümkün olmaktadır (Kose ve ark., 2020). Değiştirilmesi düşünülen genin bütün özellikleri bilinmiyor ise bu geni inaktive etmenin bir sonraki nesilde nasıl etkiler doğuracağı öngörülemezdir (Bilgi ve ark., 2016).

4. GDO ile arasındaki farklar ve yasal mevzuat / Differences with GMO and legal legislation

CRISPR/Cas9 ile genetik olarak düzenlenmiş bir organizmanın, genetiği değiştirilmiş bir organizma (GDO) olup olmadığı konusunda devam eden bir tartışma bulunmaktadır. Son zamanlarda, ABAD (Court of Justice of the European Union-Avrupa Birliği Adalet Divanı), bu tür ürünlerin en azından Avrupa Birliği'nde GDO olarak kabul edildiği kararını almıştır (Sands ve Galizzi, 2006; ABAD, 2018; Es ve ark., 2019). GDO, kromozom boyunca rastgele konumlara entegre edilen, bilinen fonksiyon genlerinin aktarıldığı bir organizma iken, genetiği düzenlenmiş bir organizma, genomun kesin konumlarına hedeflenen gen işlevlerinin belirli değişiklikleriyle, ekspresyonunu inaktive etmek veya iyileştirmek için eklenen rastgele değişikliklerden kaçınan bir organizmadır (Georges ve Ray, 2017). Bu özelliklere sahip yeni bir teknoloji ortaya çıktığında, insanlar arasında güvenli kullanımı, düzenlenmesi ve etik kuralları ile ilgili soruların ortaya çıkması olasıdır (Araki ve Ishii, 2015). Fakat CRISPR/Cas9 sistemi genetiği değiştirilmiş organizmalardan farklı bir durum içerir. Bu sistemin temeli organizmada bulunan potansiyelin ortaya çıkarılması üzerinedir ve bu durum sistemin daha kolay benimsenmesine neden olacağı düşünülmektedir. CRISPR/Cas9 sistemiyle ilgili yapılan çalışmalar genel olarak insanların genetik yapısında bulunan kalıtsal hastalıklar üzerine yoğunlaşmıştır. Bunun nedeni olarak kalıtsal hastalığa sahip kişinin ve gelecek nesillerinin bu hastalıktan kurtarılabilir olmasıdır. Bununla birlikte kompleks organizmalarda gen ifadesinin düzenlenmesi ile ilgili aşamaların karmaşıklığı, bu yöntemle düzeltilmeye çalışan olumsuzlukların şimdilik sadece basit kalıtsal modellere sahip

gen bölgeleriyle kısıtlı kalmasına neden olmaktadır (Bilgi ve ark., 2016; ABAD, 2018).

Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA (Food and Drug Administration-Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi), EPA (United States Environmental Protection Agency - Çevre Koruma Kurumu) gibi resmi otoriteler GDO düzenlemesi, mikroorganizma ve pestisitlerin denetim ve düzenlenmesi gerçekleştirilir (EPA, 2013; Es ve ark., 2019). Türkiye'de ise tarımsal biyoteknoloji yönünden çalışma yapan 8 araştırma merkezi bulunmaktadır ve bu konuda çalışmalar yapan ar-ge kuruluşları ve konu ile ilgili bölümleri olan üniversitelerde çalışan personeller yeterli alt yapıya sahiptir. Ancak var olan yasal düzenlemeler bu konuda yetersiz kalmaktadır ve yeni kaynaklara, yatırımlara ve bazı teşviklere ihtiyaç duyulmaktadır. Türkiye'de GDO'yu ilgilendiren yönetmelik 26.03.2010 tarihinde "Biyogüvenlik Kanunu" adı altında yürürlüğe girmiştir. Ülkemizde genetiği değiştirilmiş ürünler ile ilgili ithalatçı firmaların yaptığı başvurular Tarım ve Orman Bakanlığı çalışanları ve risk değerlendirme komiteleri tarafından biyogüvenlik kanununda bulunan kurallar kapsamında incelenip rapor edilmektedir. 2017'den günümüze kadar kanuna uygun görülen ve hayvansal yem olarak kullanımına izin verilen 36 çeşit soya ve mısır vardır (Elpe, 2021).

Avrupa Yüksek Mahkemesi 25 Temmuz 2018 tarihinde "Gen düzenlenmiş gıdalar, geleneksel genetiği değiştirilmiş organizmaları yöneten aynı katı düzenlemelere tabi olmalıdır" kararı vermiştir (ABAD, 2018).

Bazı araştırmacılar CRISPR/Cas9 gibi yeni olan ve hassas gen düzenleme teknolojileri kullanılarak oluşturulan organizmaların, GDO'lu ürünlerin ekimini ve satışını sınırlayan mevcut Avrupa Birliği mevzuatından muaf tutulması gerektiğini savunmuşlardır (Callaway, 2018; Verma ve ark., 2021; Mali, 2022).

5. Sonuç ve öneriler / Conclusion and recommendations

Kaynaklar / References

- Araki, M., & Ishii, T. (2015). Towards social acceptance of plant breeding by genome editing. *Trends in plant science*, 20(3), 145-149.
- ABAD, (2018). Court of Justice of the European Union, Organisms obtained by mutagenesis are GMOs and are, in principle, subject to the obligations laid down by the GMO Directive. No: 111/18, C-528/16.
- Anonim, (2020). The Nobel Prize News, <https://www.nobelprize.org/all-nobel-prizes-2020/> Last accessed on March 2022.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709-1712.
- Barrangou, R., & van der Oost, J. (2013). RNA-mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea. In CRISPR-Cas Systems. Springer Verlag.
- Berkeley News, (2018). Doudna-Charpentier team awarded U.S. patent for CRISPR-Cas9. Berkeley News. <https://news.berkeley.edu/2018/06/19/doudna-charpentier-team-awarded-u-s-patent-for-crispr-cas9/> Erişim tarihi: 12.03.2022.
- Bevacqua, R. J., Fernandez-Martín, R., Savy, V., Canel, N. G., Gismond, M. I., Kues, W. A., & Salamone, D. F. (2016). Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. *Theriogenology*, 86(8), 1886-1896.
- Bigliardi, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 118-129.
- Bilgi, F., Demirtaş, Z., & Mercan, L. (2016). Hayvan İslahında Güncel Bir Yaklaşım: CRISPR/Cas9 Genom Modifikasyon Sistemi. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 4(12), 1118-1122.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), 2551-2561.
- Briner, A. E., Lugli, G. A., Milani, C., Duranti, S., Turroni, F., Gueimonde, M., & Barrangou, R. (2015). Occurrence and diversity of CRISPR-Cas systems in the genus *Bifidobacterium*. *PLoS one*, 10(7), e0133661.
- Callaway, E. (2018) EU law deals blow to CRISPR crops. *Nature*. 560(7716), 16.
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50(1-2), 131-149.
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S., & Kim, J. S. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome research*, 24(1), 132-141.
- Cildir, O. S., & Ozmen, O. (2018). Çiftlik Hayvanlarında CRISPR/Cas9 Uygulamaları. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 32(3), 559-566.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
- Crispo, M., Mulet, A. P., Tesson, L., Barrera, N., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., & Menchaca, A. (2015). Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS one*, 10(8), e0136690.
- Deng, L., Kenchappa, C. S., Peng, X., She, Q., & Garrett, R. A. (2012). Modulation of CRISPR locus transcription by the repeat-binding protein Cbp1 in *Sulfolobus*. *Nucleic acids research*, 40(6), 2470-2480.
- Ding, Q., Strong, A., Patel, K. M., Ng, S. L., Gosis, B. S., Regan, S. N., &

- Musunuru, K. (2014). Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circulation research*, 115(5), 488-492.
- Elpe, S. (2021). Are Genetically Modified Organisms Safe for Human Health and the Environment? *Journal of Medical Sciences*, 2(4), 10-19.
- EPA. (2013). United States Environmental Protection Agency, Regulation of Genetically Engineered Microorganisms Under FIFRA, FFDCA and TSCA. Regulation of Biotechnology under TSCA and FIFRA, 57-94.
- Es, I., Gavahian, M., Marti-Quijal, F. J., Lorenzo, J. M., Khaneghah, A. M., Tsatsanis, C., & Barba, F. J. (2019). The application of the CRISPR-Cas9 genome editing machinery in food and agricultural science: Current status, future perspectives, and associated challenges. *Biotechnology advances*, 37(3), 410-421.
- Esen, V.K., Cemal, I., & Elmali, C. (2020). Genom Düzenleme Teknikleri ve Hayvan İslahında Kullanılabilirliği. *Hayvan Bilim ve Ürünleri Dergisi*, 3(2): 189-209.
- FDA. (2015). Food and Drug Administration, AquaBounty Technologies' application to produce AquaAdvantage Salmon, a genetically engineered (GE) Atlantic salmon. AquaBounty Technologies, Inc. NADA 141-454.
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D. L., Wei, P., ... & Zhu, J. K. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell research*, 23(10), 1229-1232.
- Gaj, T., Gersbach, C. A., & Barbas III, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*, 31(7), 397-405.
- Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., ... & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67-71.
- Georges, F., & Ray, H. (2017). Genome editing of crops: a renewed opportunity for food security. *GM Crops and Food*, 8(1), 1-12.
- Hackett, P.B., Fahrenkrug, S.C., & Carlson, D.F. (2014) The Promises and Challenges of Precision Gene Editing in Animals of Agricultural Importance. *NABC Report*. 26: 39-45.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology and hepatology*.
- Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327(5962), 167-170.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., & Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, 31(3), 227-229.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5429-5433.
- Jansen, R., Embden, J. D. V., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565-1575.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., & Doudna, J. (2013) RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*. 2: e00471.
- Kose, S.B.E., Sura, Ü., Yirun, A., Balcı, A., Gümüşel, B.K., & Erkekoglu, P. (2020) CRISPR-Cas9 Teknolojisi, Güvenliliği ve Etik Açından Değerlendirilmesi. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 9(1): 50-64.
- Ledford, H. (2015). Salmon approval heralds rethink of transgenic animals. *Nature News*, 527(7579), 417.
- Liang, Z., Zhang, K., Chen, K., & Gao, C. (2014). Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal of Genetics and Genomics*, 41(2), 63-68.
- Luthra, R., Kaur, S., & Bhandari, K. (2021). Applications of CRISPR as a potential therapeutic. *Life Sciences*, 284, 119908.
- Mak, A.N., Bradley, P., Cernadas, R.A., Bogdanove, A.J., & Stoddard, B.L. (2012) The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science*. 335: 716-719.
- Makarova, K. S., Aravind, L., Grishin, N. V., Rogozin, I. B., & Koonin, E. V. (2002). A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic acids research*, 30(2), 482-496.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., & Church, G.M. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 339: 823-826.
- Mali, F. (2022). Key Socio-Economic and (Bio) Ethical Challenges in the CRISPR-Cas9 Patent Landscape. *Genome Editing in Drug Discovery*, 315-327.
- Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., ... & Qu, L. J. (2013). Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell research*, 23(10), 1233-1236.
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., & Rebar, E. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology*, 29(2), 143-148.
- Niu, Y., Jin, M., Li, Y., Li, P., Zhou, J., Wang, X., & Chen, Y. (2017). Biallelic β -carotene oxygenase 2 knockout results in yellow fat in sheep via CRISPR/Cas9. *Animal genetics*, 48(2), 242-244.
- O'Geen, H., Abigail, S. Y., & Segal, D. J. (2015). How specific is CRISPR/Cas9 really?. *Current opinion in chemical biology*, 29, 72-78.
- Ouyang, B., Gu, X., & Holford, P. (2017). Plant genetic engineering and biotechnology: a sustainable solution for future food security and industry. *Plant Growth Regulation*, 83(2), 171-173.
- Ozyigit, I. I., Can, H., & Dogan, I. (2021). Phytoremediation using genetically engineered plants to remove metals: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(1), 669-698.
- Papadimitriou, K., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2015). How microbes adapt to a diversity of food niches. *Current Opinion in Food Science*, 2, 29-35.
- Petersen, B., & Niemann, H. (2015). Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals. *Transgenic research*, 24(3), 381-396.
- Proudfoot, C., Carlson, D. F., Huddart, R., Long, C. R., Pryor, J. H., King, T. J., & Fahrenkrug, S. C. (2015). Genome edited sheep and cattle. *Transgenic research*, 24(1), 147-153.
- Reardon, S. (2016) Welcome to the CRISPR zoo. *Nature*. 531(7593), 160.
- Ruan, J., Xu, J., Chen-Tsai, R. Y., & Li, K. (2017). Genome editing in livestock: Are we ready for a revolution in animal breeding industry?. *Transgenic research*, 26(6), 715-726.
- Sands, P., & Galizzi, P. (2006). Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC (OJ L 106 17.04.2001 1) In: Documents in European Community Environmental Law. (pp 787-836). Cambridge University Press, Cambridge.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging infectious diseases*, 17(1), 7.
- Scharff, R. L. (2012). Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *Journal of food protection*, 75(1), 123-131.
- Segal, D. J., & Meckler, J. F. (2013). Genome engineering at the dawn of the golden age. *Annual review of genomics and human genetics*, 14, 135-158.
- Selle, K., & Barrangou, R. (2015). CRISPR-Based technologies and the future of food science. *Journal of food science*, 80(11), R2367-R2372.
- Seok, H., Deng, R., Cowan, D. B., & Wang, D. Z. (2021). Application of CRISPR-Cas9 gene editing for congenital heart disease. *Clinical and experimental pediatrics*, 64(6), 269.
- Stout, E., Klaenhammer, T., & Barrangou, R. (2017). CRISPR-Cas technologies and applications in food bacteria. *Annual review of food science and technology*, 8, 413-437.
- Sun, Z., Harris, H. M., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., & O'Toole, P. W. (2015). Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nature communications*, 6(1), 1-13.
- Tan, W., Carlson, D. F., Lancto, C. A., Garbe, J. R., Webster, D. A., Hackett, P. B., & Fahrenkrug, S. C. (2013). Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(41), 16526-16531.
- Verma, A. K., Mandal, S., Tiwari, A., Monachesi, C., Catassi, G. N., Srivastava, A., ... & Catassi, C. (2021). Current status and perspectives on the application of CRISPR/Cas9 Gene-editing system to develop a low-gluten, non-transgenic wheat variety. *Foods*, 10(10), 2351.
- Veron, N., Qu, Z., Kipen, P. A., Hirst, C. E., & Marcelle, C. (2015). CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Developmental biology*, 407(1), 68-74.
- Wang, X., Cai, B., Zhou, J., Zhu, H., Niu, Y., Ma, B., Yu, H., Lei, A., Yan, H., Shen, X., Shi, L., Zhao, X., Hua, J., Huang, X., Qu, L., & Chen, Y. (2016). Disruption of FGF5 in Cashmere Goats Using CRISPR/Cas9 Results in More Secondary Hair Follicles and Longer Fibers. *PLoS One*

- 11 (10).
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., & Qiu, J. L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature biotechnology*, 32(9), 947-951.
- Xue, W., Chen, S., Yin, H., Tammela, T., Papagiannakopoulos, T., Joshi, N.S., Cai, W., Yang, G., Bronson, R., Crowley, D.G., Zhang, F., Anderson, D.G., Sharp, P.A., & Jacks, T. (2014) CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*. 514(7522): 380-384.
- Young, S. A., Miyata, H., Satouh, Y., Kato, H., Nozawa, K., Isotani, A., & Ikawa, M. (2015). CRISPR/Cas9-mediated rapid generation of multiple mouse lines identified *Ccdc63* as essential for spermiogenesis. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 24732-24750.
- Zhan, T., Rindtorff, N., Betge, J., Ebert, M. P., & Boutros, M. (2019, April). CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 55, pp. 106-119). Academic Press.
- Zhang, Y., Pribil, M., Palmgren, M., & Gao, C. (2020) A CRISPR way for accelerating improvement of food crops. *Nature Food* 1(4): 200-205.
- ZMO, (2020b) Türkiye Ziraat Mühendisliği IX. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-1. https://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/3e99ecaf98a5e17_ek.pdf Erişim tarihi: 12.03.2022.
- Zuo, Q., Wang, Y., Cheng, S., Lian, C., Tang, B., Wang, F., & Li, B. (2016). Site-directed genome knockout in chicken cell line and embryos can use CRISPR/Cas gene editing technology. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(6), 1787-1792.

Cite as/Atf şekli: Bolukbas, A., & Gucukoglu, A. (2022). CRISPR/Cas9 teknolojisi ve gıda alanında kullanımı. *Front Life Sci RT*, 3(1), 36-42.