Volume / Cilt / 16 Issue / Sayı / 1 April /Nisan / 2023

BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION

It is a peer-reviewed international journal that publishes on biological diversity and conservation
Biyolojik çeşitlilik ve koruma üzerine yayın yapan hakemli uluslararası bir dergidir

(jardí botànic de Barcelona)

Print: ISSN 1308-5301
Online: ISSN 1308-8084

http://www.biodicon.com

BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION
BİYOLOJİK ÇEŞİTLİLİK VE KORUMA

Biyolojik çeşitlilik ve koruma üzerine yayın yapan hakemli uluslararası bir dergidir
It is a peer-reviewed international journal that publishes on biological diversity and conservation
Volume / Cilt / 16 Issue / Sayı / 1 April /Nisan / 2023

Editor-in-Chief/ Editör*:* Prof.Dr. Ersin YÜCEL
ISSN 1308-5301 Print; ISSN 1308-8084 Online

Description

The journal "BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION" is an international journal that publishes in accordance with the principles of independent, impartial and double-blind peer review. The journal publishes experimental studies on all aspects of biodiversity, original articles, case reports, editorial comments and letters to the editor prepared in accordance with ethical rules. This journal accepts research in science and basic sciences, biodiversity conservation, biology, ecology, medicine, biochemistry, pharmacy and biotechnology. The editorial and publishing processes of the "BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION" journal are in line with the Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) guidelines, World Association of Medical Journal Editors (WAME) and National Information Standards Organization (NISO). Complies with Journal Openness Principles and Best Practice in Scientific Publishing. Three issues are published annually; place of publication is Türkiye.

Açıklama

"BİYOLOJİK ÇEŞİTLİLİK VE KORUMA" dergisi, bağımsız, tarafsız ve çift-kör akran değerlendirme ilkelerine uygun olarak yayın yapan uluslararası bir dergidir. Dergide biyolojik çeşitliliğin tüm yönleriyle ilgili deneysel çalışmalar, orijinal makaleler, vaka raporları, editör yorumları ve etik kurallara uygun olarak hazırlanan editöre mektuplar yayınlamaktadır. Bu dergi fen ve temel bilimler, biyolojik çeşitliliğinin korunması, biyoloji, ekoloji, tıp, biyokimya, eczacılık ve biyoteknoloji üzerine yapılmış araştırmaları kabul eder. "BİYOLOJİK ÇEŞİTLİLİK VE KORUMA" dergisinin editörlük ve yayın süreçleri Council of Science Editors (CSE) doğrultusunda, Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) yönergeleri, World Association of Medical Editors (WAME) ve National Information Standards Organization (NISO) göre şekillendirilmektedir. Dergi Açıklık İlkeleri ve Bilimsel Yayıncılıkta En İyi Uygulama ile uyumludur. Yılda üç sayı yayımlanır; yayımlanma yeri Türkiye'dir.

***Abstracted-Indexed in*/Dergiyi tarayan veri tabanları**

Web of Science {Zoological Records Indexed] Clavariate Analytic, CiteFactor, Türkiye Citation Index, JournalSeek Database, arastirmax, Index Copenicus,IPindexing, Google Scholar, Medical Reads (RRS), CrossRef;10.46309/biodicon.

***Libraries/*Kütüphaneler**

Aberystwyth University; All libraries; Bath University; Birmingham University; Cardiff University; City University London; CONSER (Not UK Holdings); Edinburgh University; Essex University; Eskişehir Teknik Üniversitesi Library, Exeter University; EZB Electronic Journals Library; Feng Chia University Library; GAZİ Gazi University Library; Glasgow University; HEC-National Digital Library; Hull University; Imperial College London; Kaohsinug Medical University Library; ANKOS; Anadolu University Library; Lancaster University; Libros PDF; Liverpool University; London Metropolitan University; London School of Economics and Political Science; Manchester University; National Cheng Kung University Library; National ILAN University Library; Nottingham University; Open University; Oxford University; Queen Mary,University of London;Robert Gordon University; Royal Botanic Gardens, Kew; Sheffield Hallam University; Sheffield University; Shih Hsin University Library; Smithsonian Institution Libraries; Southampton University; Stirling University; Strathclyde University; Sussex University; The National Agricultural Library (NAL); The Ohio Library and Information NetWork; Trinity College Dublin; University of Washington Libraries; Vaughan Memorial Library; York University.

Web of Science-Clarivate Analytics, Zoological Record
This journal is registered to "Türkiye Citation Index"/ "Türkiye Atıf Dizini"ne kayıtlıdır.
This journal is a CrossRef;10.46309/biodicon. Member/ Bu dergi CrossRef;10.46309/biodicon. üyesidir.
*Please visit " http:// www.biodicon.com***"** *for instructions about articles and all of the details about journal/* Makale yazım kuralları ve dergi ile ilgili diğer ayrıntılar için " http:// www.biodicon.com**"** adresini ziyaret ediniz.

Publisher: ERSİN YÜCEL
***Address*:** Ersin YÜCEL, Sazova Mahallesi, Ziraat Caddesi, No.277 F Blok, 26005, Tepebaşı-Eskişehir/Türkiye
E-mail* / E-posta / :** biodicon@gmail.com ; ***Web Address: http://www.biodicon.com
https://dergipark.org.tr/en/pub/biodicon

Biological Diversity and Conservation/ **Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma** *Volume / Cilt / 16 Issue / Sayı / 1 April /Nisan / 2023*
ISSN 1308-5301 Print; ISSN 1308-8084 Online ---------- *Derginin Yayına Başlama Tarihi / Start Date Published 2008*
© Copyright 2023 by Biological Diversity and Conservation/Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma - Available online at www.biodicon.com/Tüm hakları saklıdır
Publisher: ERSİN YÜCEL
This journal is published three numbers in a year. Printed in Eskişehir/*Türkiye /*Bu dergi yılda üç sayı yayınlanır. Yayınlanma yeri Eskişehir/Türkiye'dir.
All sorts of responsibilities of the articles published in this journal are belonging to the authors/ Dergide yayınlanan makalelerin her türlü sorumluluğu yazarlarına aittir

Editör / ***Editor-In-Chief*** : Prof.Dr. Ersin YÜCEL, https://orcid.org/0000-0001-8274-7578

Editor-In-Chief: Prof.Dr. Ersin YÜCEL,
Eskisehir Technical University, Faculty of Sciences, 26470 Tepebaşı / Eskişehir–Türkiye
E-mail: biodicon@gmail.com
https://orcid.org/0000-0001-8274-7578
https://www.ersinyucel.com.tr/

Editorial Board

İlkin YÜCEL ŞENGÜN; Ege University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Izmir, Türkiye
E-mail: ilkinyucel@yahoo.com

Münir ÖZTÜRK; Ege University, Botany Department and Centre for Environmental Studies, Izmir- 35040, Türkiye
E-mail: munirozturk@gmail.com

M.N.V. PRASAD; University of Hyderabad, Department of Plant Sciences, Hyderabad, India
E-mail: mnvsl@uohyd.ernet.in

Ayşe DELİGÖZ; Department of Forest Engineering, Faculty of Forestry, Suleyman Demirel University, Isparta, Türkiye
E-mail: aysedeligoz@isparta.edu.tr

Birgül YELKEN; Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Medicine, Department of Anesthesiology and Reanimation, Eskişehir, Türkiye
E-mail: birgulby@yahoo.com

Hatice Mehtap KUTLU; Eskisehir Technical University, Faculty of Sciences, Department of Biology, Tepebaşı / Eskişehir-Türkiye
E-mail: hmkutlu@eskisehir.edu.tr

İsmühan POTOĞLU ERKARA; Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Arts and Sciences, Eskişehir, Türkiye
E-mail: endo@gianlucaplotino.com

Ignacy KITOWSKI; State School of Higher Education in Chelm, Institute of Agricultural Sciences, Chelm, Poland
E-mail: kitowign@biotop.umcs.lublin.pl

Latif KURT; Ankara University, Science Faculty, Department of Biology, Ankara, Türkiye
E-mail: kurt@.ankara.edu.tr

Lyutsiya AUBAKIROVA; Lev Nikolaevich Gumilev Eurasian National University, Astana, Kazakhstan
E-mail: bls758@rambler.ru

M. Angeles Alonso VARGAS; University of Alicante, Department of Environmental Sciences and Natural Resources, Alicante, Spain
E-mail: ma.alonso@ua.es

Masoud HEDAYATIFARD; Islamic Azad University, Department of Fisheries, College of Agriculture, Iran
E-mail: hedayati.m@qaemiau.ac.ir

Semra AYDIN; Turkish Medicine and Medical Devices Agency, Department of Biotechnological Drug, Ankara, Türkiye
E-mail: semrasoydam@gmail.com

Sezgin AYAN; Kastamonu University, Faculty of Forestry, Kastamonu , Türkiye
E-mail: sezginayan@kastamonu.edu.tr

Stefano VALDESALICI; Associazione Italiana Killifish, Emilia-Romagna, Italy
E-mail: valdesalici.stefano@gmail.com, valdekil@tin.it

Zeki AYTAÇ; University of Gazi, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara, Türkiye
E-mail: zaytac@gazi.edu.tr

Deputy Editor in Chief

Aykut GÜVENSEN; Ege University, Science Faculty, Department of Biology, Izmir, Türkiye
E-mail: aykut.guvensen@ege.edu.tr

Emel SÖZEN; Eskisehir Technical University, Faculty of Sciences, Department of Biology, Tepebaşı / Eskişehir-Türkiye
E-mail: esozen@eskisehir.edu.tr

Latif KURT; Ankara University, Science Faculty, Department of Biology, Ankara, Türkiye
E-mail: kurt@.ankara.edu.tr

Muhsin KONUK; Üsküdar University, Engineering and Natural Sciences, Molecular Biology and Genetics, Istanbul, Türkiye
E-mail: mkonuk@gmail.com

Semra AYDIN; Turkish Medicine and Medical Devices Agency, Department of Biotechnological Drug, Ankara, Türkiye
E-mail: semrasoydam@gmail.com

Recep Sulhi ÖZKÜTÜK; Eskişehir Technical University, Science Faculty, Department of Biology, Eskisehir, Türkiye
E-mail: ozkotuk@eskisehir.edu.tr

Field Editors

Abdeslam ENNABİLİ;Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Superior School of Technology (GP), BP 2427 Route d'Imouzzer 30000 Fez Morocco
E-mail: aennabili@gmail.com

Adife ŞEYDA YARGIÇ;Bilecik Şeyh Edebali University, Department of Chemical Engineering, Bilecik, Türkiye
E-mail: seyda.guler@bilecik.edu.tr

Ahmed BAKRIM; Université Sultan Moulay Slimane, Faculté Polydisciplinaire de Khouribga, Morocco
E-mail: bakrim78@yahoo.fr

Atila OCAK; Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Arts and Sciences, Eskişehir, Türkiye
E-mail: atilaocak@gmail.com

Aykut GÜVENSEN; Ege University, Science Faculty, Department of Biology, Izmir, Türkiye
E-mail: aykut.guvensen@ege.edu.tr

Ayşe AK; Kocaeli University, Medical Imaging Techniques Program, Vocational School of Health Services, Kocaeli, Türkiye
E-mail: a_ak@hotmail.com

Bartu BADAK; Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Medicine, Department of Surgical Medical Sciences, Eskişehir, Türkiye
E-mail: bbadak@ogu.edu.tr

Carmen Galán SOLDEVILLA; University of Bristol, Organic and Biological Chemistry, Bristol, England
E-mail: m.c.galan@bristol.ac.uk

Dalila BOUSTA; University of Sidi Mohamed Ben Abdellah, Laboratory of Neuroendocrinology, Nutritional and Climatic Environment, Fez, Morocco
E-mail: Dalila_bousta@yahoo.fr

Dani SARSEKOVA; S.Seifullin Kazakh Agro Technical University, Department of Forestry, Astana
E-mail: dani999@mail.ru

Dimitris P. VASILAKIS; University of Patras, Department of Environmental and Natural Resources Manag., Patras, Greece
E-mail: vkati@upatras.gr

Elif YAMAÇ; Eskişehir Technical University, Science Faculty, Department of Biology, Eskisehir, Türkiye
E-mail: eerdogdu@eskisehir.edu.tr

E. Selcen DARÇIN; Gazi University, Faculty of Science and Arts, Department of Biology, Ankara, Türkiye
E-mail: darcin@gazi.edu.tr

Emel SÖZEN; Eskisehir Technical University, Faculty of Sciences, Department of Biology, Tepebaşı / Eskişehir-Türkiye
E-mail: esozen@eskisehir.edu.tr

Marjan KOMNENOV; University of Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Serbia
E-mail: mkomnenov@gmail.com
Murat KÜRŞAT; Bitlis Eren University, Faculty of Arts and Sciences Biology, Bitlis, Türkiye
E-mail: mkursat@beu.edu.tr

Muhsin KONUK; Üsküdar University, Engineering and Natural Sciences, Molecular Biology and Genetics, Istanbul, Türkiye
E-mail: mkonuk@gmail.com

Murat OLGUN; Eskişehir Osmangazi University, Department of Field Crops, Eskisehir, Türkiye
E-mail: molgun@ogu.edu.tr

Naime ARSLAN; Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Arts and Sciences, Meşelik Campus, Eskişehir, Türkiye
E-mail: oligo2009@gmail.com

Salman KHAN Forest Entomology Division, Forest Research Institute, P.O. New Forest Dehradun, Uttarkhand, India
E-mail: salman1315@gmail.com

Sezgin ÇELİK; Yıldız Technical University, Science Faculty, Department of Biology, İstanbul, Türkiye
E-mail: celik.sezgin@gmail.com

Shyam Singh YADAV; Indian Agricultural Research Institute, Division of Genetics, New Delhi, India
E-mail: shyamsinghyadav@yahoo.com

Snejana DONCHEVA; Bulgarican Academy of Sciences, Institute of Plant Physiology, Sofia, Bulgaria
E-mail: doncheva@obzor.bio21.bas.bg

Recep Sulhi ÖZKÜTÜK; Eskişehir Technical University, Science Faculty, Department of Biology, Eskisehir, Türkiye
E-mail: ozkotuk@eskisehir.edu.tr

Tamara SEDELNİKOVA; Department of Forestry , V.N. Sukachev Institute of Forest SB RAS, Federal Research Center Russia, 660036, Krasnoyarsk,Akademgorodok, 50/28
E-mail: tss@ksc.krasn.ru

Tarmo TİMM; Estonian University of Life Sciences, Faculty of Agriculture and Environment, Rannu 61117, Estonia
E-mail: tarmo.timm@emu.ee

Victoria RODİNKOVA; National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, 56, Pirogov Street, Ukraine
E-mail: vikarodi@gmail.com

Yavuz Bülent KÖSE; Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Eskişehir, Türkiye
E-mail: ybkose@anadolu.edu.tr

Statistical Editor
Alper YARGIÇ; Bilecik Şeyh Edebali University, Computer Engineering, Bilecik, Türkiye
E-mail: ayargic@gmail.com

Dizgi
Emrullah Yılmaz, Eskişehir Technical University,
E-mail: emrullahyilmaz@eskisehir.edu.tr

Biological Diversity and Conservation*/ Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma** ***Volume / Cilt / 16 Issue / Sayı / 1 April /Nisan / 2023
ISSN 1308-5301 Print; ISSN 1308-8084 Online ---------- Derginin Yayına Başlama Tarihi / Start Date Published 2008
© Copyright 2023 by Biological Diversity and Conservation/ Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma - Available online at www.biodicon.com/Tüm hakları saklıdır
Publisher: ERSİN YÜCEL
Bu dergi yılda üç sayı yayınlanır. Yayınlanma yeri Eskişehir/Türkiye'dir. / *This journal is published three numbers in a year. Printed in* Eskişehir/*Türkiye.*
Dergide yayınlanan makalelerin her türlü sorumluluğu yazarlarına aittir */ All sorts of responsibilities of the articles published in this journal are belonging to the authors*

Reviewer

Abdullah Altunışık, Rize (Türkiye)
Abdullah Kaya, Anakara (Türkiye)
Ahmed Bakrim, Kbouribga (Morocco)
Ahmet Aksoy, Antalya (Türkiye)
Ahmet Mert, Isparta (Türkiye)
Akın Kıraç, Çanakkale (Türkiye)
Alaaddin Yuksel, Bingöl (Türkiye)
Ali Dönmez, Ankara (Türkiye)
Ali Kandemir, Erzincan (Türkiye)
Ali Savaş Bülbül, Kahramanmaraş (Türkiye)
Ali Tarhan, Muğla (Türkiye)
Alptekin Karagöz, Aksaray (Türkiye)
Amed Aarab Azmani, Tangier (Morocco)
Anath Bandhu Das Ankara (Türkiye)
Arif Cemal Özsemir (Bafra) (Türkiye)
Arzu Morkoyunlu Yüce Kocaeli (Türkiye)
Atilla Ocak, Eskişehir (Türkiye)
Ayçin Akünal, Konya (Türkiye)
Ayçin Yılmaz, Konya (Türkiye)
Ayhan Şenkardeşler, İzmir (Türkiye)
Ayla Kaya, Eskişehir (Türkiye)
Aysel Bekleyen, Diyarbakır (Türkiye)
Ayşe Kaplan, Sivas(Türkiye)
Ayşen Türk, Eskişehir (Türkiye)
Aziz Gül Hatay, (Türkiye)
Aziz Türkoğlu, Muğla (Türkiye)
Bahar Gurdal, İstanbul (Türkiye)
Baran Yoğurtçuoğlu, Ankara (Türkiye)
Barış Bani Kastamonu, (Türkiye)
Barış Özüdoğru, Ankara (Türkiye)
Belgin Çamur Elipek, Trakya (Türkiye)
Betül Gıdık, Bayburt (Türkiye)
Betül Y. Öztürk, Eskişehir (Türkiye)
Bilal Şahin Çankırı, (Türkiye)
Burak Arıcak, Kastamonu (Türkiye)
Burcu Yılmaz Çıtak, Konya (Türkiye)
Bülent Turgut, Artvin (Türkiye)
Bülent Yorulmaz, Mugla (Türkiye)
Cahit Doğan, Ankara (Türkiye)
Carmen Galán Soldevilla, Cordoba (Spain)
Cem Dalyan, İstanbul (Türkiye)
Cemil Ata, İstanbul (Türkiye)
Cengiz Acar, Trabzon (Türkiye)
Cenk Burak Şahin, Hatay (Türkiye)
Cenk Paşa Balıkesir, (Türkiye)
Cihangir Kirazlı, Bolu (Türkiye)
Cüneyt Kaya Rize,, (Türkiye)
Cüneyt Nadir Solak, Kütahya (Türkiye)
Çiğdem Yamaner, Isparta (Türkiye)
Çiler Meriç, Trakya (Türkiye)
Dalila Bousta, Taounate (Morocco)
Dani Sarsekova, S. Seifullin (Kazakistan)
Deniz Ergüden, İskenderun (Türkiye)
Derviş Öztürk Eskişehir (Türkiye)
Derya Yıldırım, Isparta (Türkiye)
Didem Turgut Coşan, Eskişehir (Türkiye)
Dilek Düzgün Ergün, İstanbul (Türkiye)
Duran Katar, Eskişehir (Türkiye)
Duygu Nur Çobanoğlu, Bingöl (Türkiye)
Ebru Ataşlar, Eskişehir (Türkiye)
Elif Soylu, Rize (Türkiye)
E-mail: fakyuz@ogu.edu.tr
Emel Ulupınar, Eskişehir (Türkiye)
Emel Uslu, Bolu (Türkiye)
Emre Aydemir, Antalya (Türkiye)
Emre Sevindik, Aydın (Türkiye)
Erdi Can Aytar, Samsun (Türkiye)
Erdoğan Atmış, Bartın (Türkiye)
Ergin Hamzaoğlu, Ankara (Türkiye)
Erhan Çalışkan, Trabzon (Türkiye)
Ernaz Altundağ, Düzce (Türkiye)
Ersan Bektaş, Giresun (Türkiye)
Ersen Aydın Yağmur, Manisa (Türkiye)
Ersin Demirel, Antakya (Türkiye)
Ersin Karabacak, Çanakkkale (Türkiye)
Ersin Yücel, Eskişehir (Türkiye)
Esat Çetin, Sakarya (Türkiye)
Esra Martin, Konya (Türkiye)
Fahrettin AKYÜZ, Türkiye
Fahrettin Tilki, Artvin (Türkiye)
Faik Ceylan, Düzce (Türkiye)
Faruk Maraşlıoğlu, Çorum (Türkiye)
Faruk Selçuk, Kırşehir (Türkiye)
Fatih Kar, Kırşehir (Türkiye)
Fatih Satıl, Balıkesir (Türkiye)
Fatih Temel, Artvin (Türkiye)
Fatma Güneş, Edirne (Türkiye)
Fatma Kandemir Çevik, Adana (Türkiye)
Fatma Koyuncu, Eskişehir (Türkiye)
Fatma Yıldız, Antalya (Türkiye)
Fatmagül Geven, Ankara (Türkiye)
Fazle Subhan, Peshawar, (Pakistan)
Ferhat Altunsoy, Eskişehir (Türkiye)
Feyza Candan, Manisa (Türkiye)
Filiz Savaroğlu, Eskişehir (Türkiye)
Filiz Yılmaz, Eskişehir (Türkiye)
Gencay Akgül, Nevşehir, (Türkiye)
Gökhan Abay, Rize (Türkiye)
Gözde-Elgin Cebe, Izmir (Türkiye)
Gül Nilhan Tuğ, Ankara (Türkiye)
Gülçin Işık, Eskişehir (Türkiye)
Gülgün F. Ünal Şengör, İstanbul (Türkiye)
Gülriz Bayçu, İstanbul (Türkiye)
Gülsen Kendir, İstanbul (Türkiye)
Gülşah Çobanoğlu, İstanbul (Türkiye)
Gülşah Özyiğitoğlu, İstanbul (Türkiye)
Güngör Yılmaz, Tokat (Türkiye)
Gürkan Semiz, Denizli (Türkiye)
H. Barış Özel, Bartın (Türkiye)
H.Askin Akpulat, Erzurum (Türkiye)
Hacı Halil Bıyık,, Aydın (Türkiye)
Haider Abbas, Karachi (Pakistan)
Hakan Allı, Muğla (Türkiye)
Hakan Çalışkan Eskişehir (Türkiye)
Halil İbrahim Güler, Trabzon (Türkiye)
Halil Koç, Sinop (Türkiye)
Hamdi Aydın, Kocaeli (Türkiye)
Handan Ucun Özel, Bartın (Türkiye)
Hasan Akan, Şanlıurfa (Türkiye)
Hasan Akgül, Gaziantep (Türkiye)
Hasan Korkmaz, Elazığ (Türkiye)
Hasan Özçelik, Isparta (Türkiye)
Hatice Güneş Muğla, (Türkiye)
Hatice Kiremit Özenoğlu, Aydın (Türkiye)
Hatice Nurhan Büyükkartal, Ankara (Türkiye)
Hayri Duman, Ankara (Türkiye)
Hızır Uzuner, Ankara (Türkiye)
Hülya Altuntaş, Eskişehir (Türkiye)
Hüseyin Dural, Konya (Türkiye)
Ihsan A. Al-Shehbaz, Missouri (USA)
Ilgaz Akata, Ankara (Türkiye)
Iltaf Ullah, Nowshera (Pakistan)
İbrahim İlker Özyiğit, İstanbul (Türkiye)
İbrahim Turna, Trabzon (Türkiye)
İbrahim Türkekul, Tokat (Türkiye)
İlker Avan, Eskişehir (Türkiye)
İlknur Bağdatlı Niğde (Türkiye)
İlknur Dağ, Eskişehir (Türkiye)
İnci Kravkaz, Kastamonu (Türkiye)
İrem Ayran, Konya (Türkiye
İrfan Albayrak, Kırıkkale (Türkiye)
İsa Başköse Ankara (Türkiye)
İsa Telci, Isparta (Türkiye)
İsmail Döker, Adana (Türkiye)
İsmühan Potoğlu Erkara, Eskişehir (Türkiye)
Kadriye Uruç Parlak, Ağrı (Türkiye)
Kamil Koç, Manisa (Türkiye)
Kâmuran Aktaş, Manisa (Türkiye)
Kerim Çiçek, İzmir (Türkiye)
Khalıd M. Khawar, Ankara (Türkiye)
Koray Özrenk, Siirt (Türkiye)
Kübra Sağlam, İstanbul (Türkiye)
Levent İzci, Isparta (Türkiye)
M. Ufuk Özbek, Ankara (Türkiye)
Malik Faisal, İslamabad (Pakistan)
Manzoor Ahmad, İslamabad (Pakistan)
Marjan Komnenov, Skopje (Macedonia)
Maryam Keshavarzi, Tehran (Iran)
Matem Tunçdemir, İstanbul (Türkiye)
Mehmet Arslan, Kayseri (Türkiye)
Mehmet Burçin Mutlu, Eskişehir (Türkiye)
Mehmet Candan, Eskişehir (Türkiye)
Mehmet Cengiz Üstüner, Eskişehir (Türkiye)
Mehmet Karaismailoglu, Siirt (Türkiye)
Mehmet Karataş, Konya (Türkiye)
Mehmet Sağıroğlu, Sakarya (Türkiye)
Mehmet Sincik, Bursa (Türkiye)
Mehmet Tekin Sivas (Türkiye)
Mehmet Yavuz Paksoy, Tunceli (Türkiye)
Mehmet Zülfü Yıldız, İzmir (Türkiye)
Mehtap Usta, Trabzon (Türkiye)
Menderes Çenet, Osmaniye (Türkiye)
Meral Yılmaz Cankılıç, Eskişehir (Türkiye)
Mesut Kırmacı, Aydın (Türkiye)
Metin Armağan, Aydın (Türkiye)
Mikail Açar, Tunceli (Türkiye)
Mohammed Merzouki, Fez (Morocco)
Muammer Bahşi,Elazığ(Türkiye)
Muhammad Sarwar, Jam (Pakistan)
Muhammad Yasin Ashraf, (Pakistan)
Muhammed Mesud ,Hürkul Ankara (Türkiye)
Muhittin Dinç, Konya (Türkiye)
Murat Alan, Karabük (Türkiye)
Murat Kurşat, Bitlis (Türkiye)
Murat Olgun, Eskişehir (Türkiye)
Murat Özbek, İzmir (Türkiye)
Murat Turan, Denizli (Türkiye)
Mustafa Ateş, İzmir (Türkiye)
Mustafa Korkmaz, Erzincan (Türkiye)
Mustafa Yamaç, Eskişehir (Türkiye)
Mutlu Gültepe, Giresun (Türkiye)
Müge Sayitoğlu, İstanbul (Türkiye)
Nalan Yılmaz Sarıözlü, Eskişehir (Türkiye)
Naşit İğci, Nevsehir (Türkiye)
Nazmi Polat, Samsun (Türkiye)
Necdet Değermenci, Kastamonu (Türkiye)
Necmi İşler, Hatay (Türkiye)
Nesil Ertorun, Eskişehir (Türkiye)
Nilsun Demir, Ankara (Türkiye)
Nural Karagözlü, Manisa (Türkiye)
Nurcan Yiğit, Kastamonu (Türkiye)
Nurdilek Gülmezoğlu, Eskişehir (Türkiye)
Nurhayat Dalkıran, Bursa (Türkiye)
Nuri Öner, Çankırı (Türkiye)
Nursel Aşan Baydemir, Kırıkkale (Türkiye)
Nursel Aşan Baydemir, Kırıkkale(Türkiye)
Oğuzhan Kaygusuz, Denizli (Türkiye)
Olga Sak, Balıkesir (Türkiye)
Onur Koyuncu, Eskişehir (Türkiye)
Ömer Çeçen, Karaman (Türkiye)
Ömer Koray Yaylacı, Eskişehir (Türkiye)
Özge Tufan Çetin, Antalya (Türkiye)
Özgür Emiroğlu, Eskişehir (Türkiye)
Perihan Kendirci, İzmir (Türkiye)
Rasime Demirel, Eskişehir (Türkiye)
Recep Sulhi Özkütük, Eskişehir (Türkiye)

Rıza Binzet, Mersin (Türkiye)
Rıza Binzet, Mersin (Türkiye)
Robert Angus, London (England)
Rüstem Hayat, Antalya (Türkiye)
Saleem Ahmad, Islamabad (Pakistan)
Salim Serkan Güçlü, Isparta, (Türkiye)
Salman Khan, Uttarkhand (India)
Saye Nihan Çabuk, Eskişehir (Türkiye)
Seda Erkan Buğday, Kastamonu (Türkiye)
Seher Karaman Erkul, Aksaray (Türkiye)
Selami Selvi, Balıkesir (Türkiye)
Selen İlgün, Kayseri (Türkiye)
Selima Khatun, West Bengal (India)
Selma Helli, Sakarya (Türkiye)
Serap Pulatsü, Ankara (Türkiye)
Serdar Aslan, Düzce (Türkiye)
Serdar Gökhan Şenol,İzmir (Türkiye)
Serdar Makbul, Rize (Türkiye)
Serkan Gülsoy, Isparta (Türkiye)
Servet Arslan, Antalya (Türkiye)
Sevda Kırbağ, Elazığ (Türkiye)
Sevda Turkis, Ordu (Türkiye)
Sevil Sungur, Nevşehir (Türkiye)
Seyit Ahmet Sargın, Alanya (Türkiye)
Sezgin Özden, Çankırı (Türkiye)
Shyam Singh Yadav, Lae (New Guinea)
Sinan Güner, Artvin (Türkiye)
Snejana Doncheva, Sofia (Bulgaria)
Soner Çetinkaya, Isparta (Türkiye)
Sulhi Özkütük, Eskişehir (Türkiye)
Sumaira Sahren, Islamabad (Pakistan)
Sunil Kumarkhan,Magra,Hooghly (India)
Süphan Karaytuğ, Mersın (Türkiye)
Şahane F. Arslanoğlu, Samsun (Türkiye)
Şebnem Şimşek, İzmir (Türkiye)
Şengül Aksan, Akseki-Antalya (Türkiye)
Şeniz Karabıyıklı, Tokat (Türkiye)
Tahir Atıcı, Ankara (Türkiye)
Tamer Keçeli, Çankırı (Türkiye)
Taner Özcan, Balıkesir (Türkiye)
Tarkan Yorulmaz, Çankırı (Türkiye)
Temel Özek, Eskişehir (Türkiye)
Tuğba Bayrak Özbucak, Ordu (Türkiye)
Tuğba Ongun Sevindik, Sakarya (Türkiye)
Turan Arabacı, Malatya (Türkiye)
Turgay Dindaroğlu, K. Maraş (Türkiye)
Tülay Ezer, Niğde (Türkiye)
Ufuk Coşgun, Karabük (Türkiye)
Ümit Subaşı, İzmir (Türkiye)
Ümit Şirin, Eskişehir (Türkiye)
Ünal Özelmas, Eskişehir (Türkiye)
Volkan Altay, Hatay (Türkiye)
Yavuz Bülent Köse, Eskişehir (Türkiye)
Yeşim Dağlıoğlu, Ordu (Türkiye)
Yeşim Kara, Denizli (Türkiye)
Yusuf Uzun, Van (Türkiye)
Zafer Ölmez, Artvin (Türkiye)
Zafer Yücesan, Trabzon (Türkiye)
Zekiye Kocakaya, Yozgat (Türkiye)
Zeynel Arslangündoğdu, İstanbul (Türkiye)
Zia Ullah, Beijing (China)

***Executive Editor/* Genel Yayın Yönetmeni:** Ersin YÜCEL, Mine YÜCEL
***Production Editor*/Yayın Editörü**: İlkin YÜCEL ŞENGÜN
***Layount Editor/* Mizampaj Editörü:** Dilge YÜCEL
***Spelling and Language Editor*/Yazım ve Dil Editörü**: Mine YÜCEL
***Web Consultant/* Veb düzeni**; Alper YARGIÇ, Didem AYDAN, Elif Çağla DELİ, Şerife AKINCI

***Technical Editor/* Teknik Editör:** Recep Sulhi ÖZKÜTÜK
***Editorial Office/* Editörlük Ofisi**; Yasemin YÜCEL, Umut KILINÇ
***Subscription Manager*/Abonelik Yöneticisi**: Yasemin YÜCEL,
***Cover Layout*/Kapak Düzeni**; Mine YÜCEL
***Secretary/* Genel Sekreter:** Faik CEYLAN
***Printing Press*/Baskı**; Cetemenler, Eskişehir/Türkiye

BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION (ISSN: 1308-5301; e-ISSN: 1308-8084)
Journal General Information (Year 2008-2023)

Journal name	BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION / BİYOLOJİK ÇEŞİTLİLİK VE KORUMA
CODEN	BIODICON
Frequency	Tri-annual
Publisher	ERSİN YÜCEL
ISSN	ISSN: 1308-5301
e-ISSN	e-ISSN: 1308-8084
Journal Barcode No.	977130853001
Starting Year	2008
Editors-in-Chief	Prof.Dr. Ersin YÜCEL
Subject	Biological Diversity, Conservation, Ecology, Environment and Human Health
Language	English and/or Turkish
Type of Access	Print and Online
Phone No.	+905364189988
e-mail	biodicon@gmail.com ; info@ersinyucel.com.tr
Journal Internet Access	http://www.biodicon.com ; https://dergipark.org.tr/en/pub/biodicon
Publisher Address	ERSİN YÜCEL, Sazova Mahallesi, Ziraat Caddesi, No.277 F Blok, Eskisehir, Türkiye, 26005
Ethical Principles	The Copyright Agreement Form Conflict of Interest Form (ICMJE Form) Reviewer Evaluation Form
Authors Declaration and sign these forms	The Copyright Agreement Form Author Contribution Form Conflict of Interest Form (ICMJE Form)
Copyright © 2008-2022	© 2022 ERSİN YÜCEL All rights reserved
Owner	ERSİN YÜCEL
Publisher	ERSİN YÜCEL
Memberships	CrossRef;10.46309/biodicon. Medical Reads (RRS) Medical Journal Editors (ICMJE) PubMed
Publishing Processes	Council of Science Editors (CSE) Committee on Publication Ethics (COPE) European Association of Science Editors (EASE) World Association of Medical Journal Editors (WAME) National Information Standards Organization (NISO)
Editorial Board, Reviewers	Postal address, ORCID ID
Ethical issues	Permissions and copyright transfer policy specified
Corresponding Author Contact Information	Postal address, Phone, Fax, E-mail, ORCID ID
Authors Contact Information	Postal address, ORCID ID
Publication Process	3-15 week
Process of Review	Double-blind review
Editorial policy of the journal	This journal is an international, scientific, online and print published in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles.
Indexes	Web of Science {Zoological Records Indexed] Clavariate Analytic, Turkey Citation Index
Price Police	The article processing is free

www.biodicon.com Biological Diversity and Conservation

ISSN 1308-8084 Online ISSN 1308-5301 Print

Research article/Araştırma makalesi
DOI: 10.46309/biodicon.2022.1118983
16/1 (2023) 1-5

Chemical compositions of essential oil obtained from the fruits of *Laser trilobum* grown in Mersin

Elif FERAHOĞLU [*1], Saliha KIRICI [1]
ORCID: 0000-0002-2107-3482**;** 0000-0002-5798-857X

[1] Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Adana, Türkiye

Abstract

Laser trilobum (L.) Borkh. is a perennial herbaceous plant growing naturally in some parts of Turkey. Its dried and ground fruits are called 'Kefe kimyonu'. Kefe cumin, from which essential oil is obtained from its fruits rich in nutrients, is not cultivated in our country. In this study, the amount of essential oil obtained from the fruits of kefe cumin and the components of these essential oils were determined.

Kefe cumin (*Laser trilobum*) plant was obtained from Mersin region and the essential oils of its fruits were determined by clevenger aparatus and its components were determined by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectroscopy method. According to the research findings, the essential oil rate of the plant was determined as 4.4%, and it was determined that the main components of this essential oil were *d*-limonene and peryl aldehyde (with a total rate of 95.36%).

Keywords: Mersin, Kefe cumin, *Laser trilobum*, essential oil

---------- * ----------

Mersin' de yetişen kefe kimyonu (*Laser trilobum*) meyvelerinden elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşenleri

Özet

Laser trilobum (L.) Borkh. Türkiye'nin bazı bölgelerinde doğal olarak yetişen çok yıllık otsu bir bitkidir. Kurutulmuş ve öğütülmüş meyveleri 'Kefe kimyonu' olarak adlandırılır. Besin elementleri yönünden zengin olan meyvelerinden uçucu yağ elde edilen kefe kimyonunun ülkemizde yetiştiriciliği yapılmamaktadır. Bu çalışma ile kefe kimyonu meyvelerinden elde edilen uçucu yağ miktarını ve bu uçucu yağların bileşenlerini belirlenmiştir.

Kefe kimyonu (*Laser trilobum*) bitkisi Mersin yöresinden temin edilmiş olup meyvelerinin uçucu yağı clevenger cihazı ile bileşenleri ise Gaz Kromatografisi ve Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi yöntemiyle belirlenmiştir. Araştırma bulgularına göre bitkinin uçucu yağ oranı %4,4 olarak tespit edilmiş olup bu uçucu yağın ana bileşenlerini *d*-limonen ve peril aldehitin (toplam %95,36 oranında) oluşturduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Mersin, Kefe kimyonu, *Laser trilobum*, uçucu yağ

1. Giriş

Kefe kimyonu olarak bilinen bitki İran, Güneydoğu Asya, Balkan Yarımadası, Orta ve Doğu Avrupa'da yetişir. Ülkemizde ise Trakya ve Anadolu'da oldukça yaygındır. Adana Toroslarında yetişen bitkilerden elde edilen olgun meyveler Adana ve Mersin'de 'sıra' adıyla tanınır ve öğütülerek baharat olarak kullanılır [1,2].

Laser trilobum (L.) Borkh. (Apiaceae) 50-120 cm arasında boylanabilen, tüysüz, beyaz çiçekli çok yıllık otsu bir bitkidir. Yaprakları geniş parçalı ve 3 lobludur, meyveler ise 5-10 mm uzunluğunda, 2-4 mm genişliğinde esmer sarı renkte eliptik şekillidirler. Meyve kabuğu genellikle iki parçalı olup 5 primer, 4 sekonder kostadan oluşur. Bu kabuk yapısı *Laser trilobum* meyvelerini kimyon olarak kullanılan diğer bitki meyvelerinden (*Carum carvi* L., *Cuminum cyminum* L., *Grammosciadium daucoides*) morfolojik olarak ayırmaya yarar [1].

* *Corresponding author* / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +90 322 338 60 84; Fax.: +90 322 338 63 81; E-mail: elif.ferahoglu@gmail.com
© Copyright 2023 by Biological Diversity and Conservation Geliş tarihi: 20.05.2022; Yayın tarihi: 15.04.2023 BioDiCon. 1043-200522

L. trilobum‘un potasyum, kalsiyum, magnezyum, sodyum, arsenik, alüminyum yönünden zengin olan meyvelerinden elde edilen baharatın besinlerde kontaminasyonu önlediği bildirilmiş. Köftenin yapımında kullanıldığında ise doğal mikroflorasında yer alan bakteri ve mantarların büyümesini engellediği görülmüştür [3,4,5].

Etnabotanik çalışmaların bazılarında, Kefe kimyonunun öğütülen meyvelerinin doğrudan kullanımı veya meyvelerin kaynatılarak suyun içilmesinin geleneksel tıpta sindirim, karın ağrısı, diyabet ve tansiyon hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir [6,7].

Günümüzde ise *L. trilobum*’ un rizom ve olgun meyvelerinden elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal ve antibakteriyel özellik gösterdiği saptanırken, başka bir çalışmada sadece meyve ekstraktlarının bazı patojen bakteriler üzerinde etkili olduğu, uçucu yağın ise antimikrobiyal etki göstermediği bildirilmiştir [3,4,5]. Bitkinin yaprağının hidroalkol ekstraktının, yüksek seviyelerde fenolik ve flavonoid içeriğinden kaynaklı yüksek antioksidan ve anti-hemolitik aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir [8]. *L. trilobum*’un köklerinden izole edilen *trilobolide* (Tb) seskiterpeninin immünobiyolojik potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir [9,10,11]. Sentezledikleri beş *trilobolid*e steroidal konjugatın on beş kanser hücre hattı üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, bu konjugatların belirli kanser hücrelerinin hedeflenmesinde ve antimikobakteriyel ilaçların başarılı bir şekilde geliştirilmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir [12].

Bu çalışmada Mersin yöresinden temin edilen kefe kimyonu (*L. trilobum)* meyvelerinin uçucu yağ miktarını ve bu uçucu yağın bileşenleri analiz edilerek henüz ülkemizde tarımı yapılmayan bu bitkinin kimyasal içeriği belirlenmiştir.

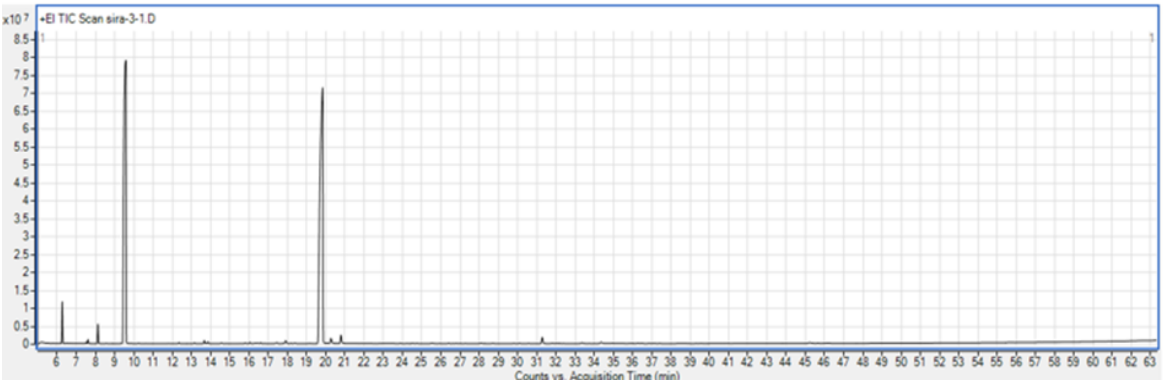
2. Materyal ve yöntem

Araştırmada Mersin’de yerel bir pazardan temin edilen Kefe kimyonu meyveleri kullanılmıştır. Meyveler teminden uçucu yağ analizine kadar geçen sürede oda koşullarında muhafaza edilmiştir. Uçucu yağı çıkarılan örnekler ise analize kadar -18℃ 'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Kefe kimyonu meyvelerinden alınan 50 gr örnek öğütülerek 1000 ml’lik balona alınmış ve üzerine 500 ml su eklenmiştir. Clevenger cihazına konulan öğütülmüş bitki meyveleri 3 saat su distilasyonu yöntemine tabi tutulmuş ve uçucu yağ elde edilmiştir. Elde edilen uçucu yağın miktarı volümetrik olarak ölçülmüş ve yağlar analiz için 1,5ml’lik cam viallere alınmıştır.

Clevenger cihazından su destilasyonuyla elde edilen uçucu yağ örneklerinin bileşimi, Gaz Kromatografisi ve Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi yöntemiyle Çukurova Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı’nda belirlenmiştir. Analizde kullanılan Agilent 7000 Series Triple Quad GC/MS cihazın çalışma koşulları aşağıda verilmiştir.

Enjeksiyon Blogu: 240 °C
Dedektör: 250 °C
Akış hızı: 40 ml/dak.
Gaz: Helyum
Kullanılan Kolon: HP- 5ms, 30 m uzunluk × 0,25 mm iç çaplı × 0,25 µm film kalınlığı, %5 phenyl methyl poly siloxane
Sıcaklık programı: 50 °C’ den 240 °C’ ye dakikada 3 °C’ lık artışla ulaşır.



Şekil 1. Kefe kimyonu uçucu yağının kromotografik fotoğrafı

3. Bulgular

Kefe kimyonun uçucu yağının açık sarı renkte keskin kimyon kokulu olduğu tespit edilmiştir. Bitki meyvelerinin uçucu yağ miktarı % 4.4 olarak bulunmuştur.

Çizelge 1. Kefe kimyonu uçucu yağının bileşenleri

Uçucu Yağ Bileşenleri	**Bileşen Sınıfı**	**RT**	**LRI**	**Oranı (%)**
α-pinen [a]	MH	6.26	917	1.83
β-Mirsen[a]	MH	8.12	981	0.95
d-Limonen[b]	MH	9.57	**995**	**45.17**
Peril aldehit[c]	OM	19.83	**1279.2**	**50.19**
Perilla alkol[c]	OM	20.79	1302.7	0.66
3-Metil-but-2-enoik asit (Bornyl tiglate)[d]	Diğer	31.28	1615.4	0.51
Toplam				99.31

RT: Alıkonma zamanı LRI: Linear alıkonma indeksi (LRI HP-5MS kapilar kolon üzerinden hesaplanmıştır) a:[13], b: [14], c:[15], d:[16]

Araştırmamızda kefe kimyonu bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın bileşenleri %99.31 oranında belirlenmiştir. Uçucu yağ bileşenleri sınıflandırıldığında %47.91 monoterpen hidrokarbonlar, %51.27 oksijenli monoterpenler ve %0.51 diğer' lerinden oluşmaktadır. Yağın içeriğini sırasıyla peril aldehit (%50.19), *d*-limonen (%45.17), *α*-Pinen (%1.83), *β*-Mirsen (%0.95), perilla alkol (%0.66), 3-Metil-but-2-enoik asit (0.51) bileşikleri oluşturmaktadır.

4. Sonuçlar ve tartışma

Araştırmamızda Mersin'den temin edilen meyvelerinin uçucu yağ oranı %4.4 olarak belirlenmiştir. Zonguldak çevresinden toplanan meyvelerin uçucu yağ oranı %2.7 olarak bulmuşlardır [17]. İran florasından toplanan şemsiyegiller familyasına ait üç farklı türü analiz eden araştırıcılar *L. trilobum* bitkilerinin uçucu yağ oranını %1.8 olarak bulmuşlardır [18]. Bitkinin uçucu yağının incelendiği çalışmamız dahil üç farklı floradan temin edilen *L. trilobum* meyvelerinin uçucu yağ oranlarındaki farklılıklar tıbbi ve aromatik bitkilerde uçucu yağ oranı ve içeriğinin bitkinin yetiştiği çevre koşullarından etkilenmesiyle açıklanabilir [19,20]. [5]'in araştırmamızla aynı lokasyondan (Mersin) temin ettiği meyvelerin uçucu yağ oranı bizim sonucumuzdan yüksek (%5.8) bulunmuştur. Bu durumun sebebi tıbbi ve aromatik bitkilerin uçucu yağ oranının genetik ve çevresel etmenlerin yanı sıra hasat zamanı, depolama koşulları, distilasyon yöntemi ve süresi gibi faktörlerin farklılıklarından da etkilenmesi olabilir [21,22,23,24].

Araştırmamızın sonucunda Kefe kimyonu uçucu yağının temel bileşenlerini toplamda %95.36 oranında *d*-limonen ve peril aldehit'in oluşturduğu belirlenmiştir. Çalışmamızla benzer şekilde farklı araştırıcılar tarafından yapılan çalışmalarda bu iki bileşenin uçucu yağ içerisindeki toplam oranının %81.20-93.00 arasında değiştiği bildirilmiştir [5,25,26,27]. Bitkinin rizomları ve meyvelerinin incelendiği bir çalışmada, rizomdan elde edilen uçucu yağın ana bileşenini *α*-pinen (%31.5) olurken meyvelerinden elde edilen uçucu yağın ana bileşenlerini ise yaptığımız çalışmaya paralel olarak limonen (%51.6) ve peril aldehit'in (%26.8) oluşturduğu belirlenmiştir [3]. Bitkinin yapraklarından elde edilen uçucu yağın incelendiği bir başka çalışmada ise uçucu yağın ana bileşenini borny angelate'ın (%67.3) oluşturduğu bulunmuştur [28]. Yapılan araştırmalarda *L. trilobum*' un farklı bitki kısımlarından elde edilen uçucu yağların içeriği incelendiğinde ana bileşenlerin farklılık gösterdiği görülmüştür. Bu durum tıbbi ve aromatik bitkilerde etken madde oranı ve içeriğinin bitkinin organlarına göre farklılık göstermesi ile açıklanabilir [29,30].

Araştırmamızda kullandığımınız *L. trilobum* meyveleri uçucu yağı %50.19 oranında perilaldehit içermektedir. İnsan sağlığını tehlikeye atacak genotoksik bir etki oluşturma olasılığın bulunmadığı yapılan çalışmalarca belirlenmiş olan perilaldehit, gıda ürünlerine baharat ve narenciye tadı vermek amacıyla aroma katkı maddesi olarak kullanılmaktadır [31,32]. Yapılan çalışmalarda perilaldehit'in özellikle mantar kaynaklı gıda bozulmalarına karşı çok etkili olduğu ve doğal gıda koruyucu olarak kullanılabileceği de belirlenmiştir [33,34]. Yapılan bazı çalışmalarda bu bileşenin antidepresan [35], antienflamatuar [36], antitümör [37], antikanser [38] etkiler göstermesi *L. trilobum*'un ilaç sanayi için önemli bir doğal periladehit kaynağı olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür.

Kefe kimyonu uçucu yağının %45.17 yüksek oranıyla diğer bir ana bileşeni olan *d*-limonen yeryüzünde 300 den fazla bitki tarafından farklı miktarlarda sentezlenen bir monoterpendir [39]. Yapılan klinik çalışmalarda kolesterol, safra taş ve midevi rahatsızlıkların tedavisinde olumlu etki yarattığı belirlenmiştir. Aynı zamanda birçok kanser türüne karşı kemopreventif ve antitümör etkiye sahip olduğu da tespit edilmiştir [40,41,42].

Ülkemizde doğal olarak yetişen kokusu ve tadıyla kimyona benzeyen *L. trilobum* (Kefe kimyonu) toplanarak baharat olarak tüketilmektedir. Bitkinin uçucu yağ içeriğinin temel bileşenleri olan olan *d*-limonen ve peril aldehit'in farklı endüstri kollarında ham madde olarak kullanılması; bu bileşenler üzerine yapılan çalışmalarda çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılabileceklerinin belirlenmesi, aynı zamanda insan sağlığına zararsız gıda katkı maddeleri olarak kullanılabilmeleri gibi sebepleriyle kefe kimyonun yetiştiriciliğinin yapılması bölge ve ülke ekonomisine katkı sağlayabilecektir. Bitkinin yetiştiriciliği üzerine farklı lokasyonlarda çalışmaların yapılması tavsiye edilmektedir.

Kaynaklar

[1] Baytop, T. (1984). Türkiye`de Bitkilerle Tedavi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları.

[2] Şenkardeş, İ., & Tuzlacı, E. (2014). Gündoğmuş (Antalya/Türkiye) yöresinden bazı etnobotanik bilgiler. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 4(2), 63-75. doi: 10.5455/musbed.20140303070652.

[3] Drobac, M., Petrović, S., Milenković, M., Couladis, M., Kukić-Marković, J., & Niketić, M. (2017). Composition and Antimicrobial Properties of Essential Oils of *Laser trilobum* Rhizomes and Fruits. *Natural Product Communications*, *12*(3), 1934578X1701200335.

[4] Kivanç, M., & Akgül, A. (1991). Effect of *Laser trilobum* spice on natural microflora of köfte, a Turkish ground meat product. *Food/Nahrung*, 35(2), 149-154. doi: 10.1002/food.19910350206

[5] Parlatan, A., Sariçoban, C., & Özcan, M. M. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the extracts of Kefe cumin (*Laser trilobum* L.) fruits from different regions. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(7), 606-617. doi: 10.3109/09637480801993938.

[6] Doğan, A., Bulut, G., Tuzlaci, E., Şenkardeş, İ., Tuzlacı, E., & Şenkardeş, İ. (2014). A review of edible plants on the Turkish Apiaceae species. *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University*, *44*(2), 251-262.

[7] Güneş, S., Savran, A., Paksoy, M. Y., Koşar, M., & Çakılcıoğlu, U. (2017). Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Karaisalı and its surrounding (Adana-Turkey). *Journal of Herbal Medicine*, 8, 68-75.

[8] Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M., Nabavi, S., Eslami, B., & Rahmani, Z. (2010). Antioxidant and antihaemolytic activities of the leaves of Kefe cumin (Laser trilobum L) Umbelliferae. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9 (5): 441-449.

[9] Harmatha, J., Buděšínský, M., Vokáč, K., Kostecká, P., Kmoníčková, E., & Zídek, Z. (2013). Trilobolide and related sesquiterpene lactones from *Laser trilobum* possessing immunobiological properties. *Fitoterapia*, 89, 157-166.

[10] Tomanová, P., Rimpelová, S., Jurášek, M., Buděšínský, M., Vejvodová, L., Ruml, T., ... & Dražar, P. B. (2015). Trilobolide–porphyrin conjugates: On synthesis and biological effects evaluation. *Steroids*, 97, 8-12.

[11] Kmonickova, E., Harmatha, J., & Zidek, Z. (2011). Inhibition of angiogenic factors by laserolide, a sesquiterpene lactone from *Laser trilobum* Borkh. ex Gaertn. *Planta Medica*, *77*(12), PM23.

[12] Jurášek, M., Džubák, P., Rimpelová, S., Sedlák, D., Konečný, P., Frydrych, I., ... & Dražar, P. B. (2017). Trilobolide-steroid hybrids: Synthesis, cytotoxic and antimycobacterial activity. *Steroids*, 117, 97-104.

[13] Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2007). Investigation of the antioxidant properties of Ferula orientalis L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100(2), 584-589.

[14] Tepe, B., Akpulat, H. A., Sokmen, M., Daferera, D., Yumrutas, O., Aydin, E., ... & Sokmen, A. (2006). Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chemistry*, 97(4), 719-724.

[15] Zeng, Y. X., Zhao, C. X., Liang, Y. Z., Yang, H., Fang, H. Z., Yi, L. Z., & Zeng, Z. D. (2007). Comparative analysis of volatile components from Clematis species growing in China. *Analytica Chimica Acta*, 595(1-2), 328-339.

[16] Andriamaharavo, N. R. (2014). Retention Data NIST Mass Spectrometry Data Center, NIST Mass Spectrometry Data Center. Retrieved March, 17, 2015.

[17] Meriçli, F., & Meriçli, A. H. (1986). *Laser trilobum* ve *Cuminum cyminum* meyvalarının uçucu yağları. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 2(1), 85-95.

[18] Masoudi, S., Ameri, N., Rustaiyan, A., Moradalizadeh, M., & Azar, P. A. (2005). Volatile constituents of three Umbelliferae herbs: Azilia eryngioedes (Pau) Hedge et Lamond, *Laser trilobum* (L.) Borkh. and Falcaria falcarioides (Bornm. et Wolff) growing wild in Iran. *Journal of Essential Oil Research*, *17*(1), 98-100.

[19] Telci, I., Demirtas, I., Bayram, E., Arabaci, O., & Kacar, O. (2010). Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products*, 32(3), 588-592.

[20] Katar, D., Kacar, O., Kara, N., Aytaç, Z., Göksu, E., Kara, S., ... & Elmastaş, M. (2017). Ecological variation of yield and aroma components of summer savory (*Satureja hortensis* L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 7, 131-135.

[21] Nimet, Kara, & Baydar, H. (2014). Kurutma yöntemleri, depolama koşulları ve sürelerinin lavanta (Lavandula spp.)'nın uçucu yağ oranı ve bileşenlerine etkisi. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 24(2), 185-192.

[22] Katar, N., & Katar, D. (2020). Eskişehir ekolojik koşullarında farklı hasat zamanlarının limon kekiğinin (*Thymus citriodorus* L.) verim ve kalitesi üzerine etkisi. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 34(1), 93-105.

[23] Katar, N., Katar, D., & Yıldız, E. (2021). Farklı kurutma sürelerinin Zufa/Çördük Otu (Hyssopus officinalis L.) bitkisinin verim ve uçucu yağ oranı üzerine etkisinin belirlenmesi. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, *14*(1), 28-34.

[24] Tuğlu, Ü., Baydar, H., & Erbaş, S.(2021). Distilasyon Yöntemlerinin, Sürelerinin ve Fraksiyonlarının Kekik (*Origanum onites* L.) Uçucu Yağ Oranları ve Bileşenleri Üzerine Etkisi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(4), 3195-3202. doi: 10.21597/jist.810615.

[25] Brunke, E. J., Hammerschmidt, F. J., & Köster, F. H. (1990). The essential oil of Laser trilobum L. Dragoco Rep, 37, 182-188.

[26] Akgül, A. (1992). The essential oil composition of turkish *Laser trilobum* (L.) borkh. fruits. *Journal of Essential Oil Research* ,4(1), 89-90.

[27] Baser, K. H. C., Özek, T., & Kirimer, N. (1993). The essential oil of *Laser trilobum* fruit of Turkish origin. *Journal of Essential Oil Research*, 5(4), 365-369.

[28] Chizzola, R. (2007). Composition of the essential oil from *Laser trilobum* grown in the wild in Vienna. *Chemistry of Natural Compounds*, *43*(4), 484-486.

[29] Güler, V., & Kırıcı S. (2008). Diyarbakır koşullarında çördük otu (*Hyssopus officinalis* L.)' nda farklı gelişme dönemlerinde verim ve morfogenetik varyabilitenin saptanması. *Ç.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü*, 17(4)

[30] Karık, Ü., Çınar, O., Tunçtürk, M., & Şekeroğlu, N. (2019). Morphological and diurnal variability of essential oil in lemon verbena (*Lippia citriodora* HBK). *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, *29*(2), 114-120.

[31] Joint, F.A.O., & WHO Expert Committee on Food Additives. (2002). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. World Health Organization, No. 50.

[32] Hobbs, C. A., Taylor, S. V., Beevers, C., Lloyd, M., Bowen, R., Lillford, L., ... & Hayashi, S. M. (2016). Genotoxicity assessment of the flavouring agent, perillaldehyde. *Food and Chemical Toxicology*, 97, 232-242. doi: 10.1016/j.fct.2016.08.029.

[33] Tian, J., Zeng, X., Lü, A., Zhu, A., Peng, X., & Wang, Y. (2015). Perillaldehyde, a potential preservative agent in foods: Assessment of antifungal activity against microbial spoilage of cherry tomatoes. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 63-70. doi: 10.1016/j.lwt.2014.08.014.

[34] Tian, J., Wang, Y., Lu, Z., Sun, C., Zhang, M., Zhu, A., & Peng, X. (2016). Perillaldehyde, a promising antifungal agent used in food preservation, triggers apoptosis through a metacaspase-dependent pathway in *Aspergillus flavus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64(39), 7404-7413.

[35] Ji, W. W., Wang, S. Y., Ma, Z. Q., Li, R. P., Li, S. S., Xue, J. S., ... & Ma, S. P. (2014). Effects of perillaldehyde on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 116, 1-8.

[36] Fan, Y., Li, C., Peng, X., Jiang, N., Hu, L., Gu, L., ... & Lin, J. (2020). Perillaldehyde ameliorates Aspergillus fumigatus keratitis by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway and inhibiting dectin-1-mediated inflammation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 61(6), 51-51.

[37] Andrade, L. N., Severino, P., Amaral, R. G., DÃria, G. A. A., da Silva, A., Alves, M., Albuquerque Jr, R. L. C., Luciano, M. C. S., Pessoa, C. Ã., Carvalho, A. A., & de Sousa, D. P. (2018). Evaluation of cytotoxic and antitumor activity of perillaldehyde 1,2-epoxide. *Journal of Medicinal Plants Research*, 12(30), 590-600.

[38] Zielińska-Błajet, M., Pietrusiak, P., & Feder-Kubis, J. (2021). Selected monocyclic monoterpenes and their derivatives as effective anticancer therapeutic agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4763.

[39] Burdock, G. A. (2016). Fenaroli's handbook of flavor ingredients. 6th Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida,2159.

[40] Crowell, P. L., Elson, C. E., Bailey, H. H., Elegbede, A., Haag, J. D., & Gould, M. N. (1994). Human metabolism of the experimental cancer therapeutic agentd-limonene. Cancer *Chemotherapy and Pharmacology*, 35(1), 31-37.

[41] Sun, J. (2007). D-Limonene: safety and clinical applications. *Alternative Medicine Review*, 12(3):259-64.

[42] Yu, X., Lin, H., Wang, Y., Lv, W., Zhang, S., Qian, Y., Deng, X., Feng, N., Yu, H., & Qian, B. (2018). D-limonene exhibits antitumor activity by inducing autophagy and apoptosis in lung cancer. *Onco Targets and Therapy*, *11*, 1833–1847. https://doi.org/10.2147/OTT.S155716.

www.biodicon.com BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION

ISSN 1308-8084 Online ISSN 1308-5301 Print

Research article/Araştırma makalesi
DOI: 14745/biodicon.2022.1148518
16/1 (2023) 6-9

Morphology and fruit micromorphology of *Pterocephalus plumosus* (L.) Coulter (Caprifoliaceae)

Emrah ŞİRİN [*1]
ORCID: 0000-0003-3408-7186

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Selçuk University, 42130 Konya, Türkiye

Abstract

In this study, the general morphology and fruit micromorphology of P. plumosus were studied. The dimensions of the base and upper leaves of the *P. plumosus*, the length of the peduncle, the number of involucral bracts, the length of the central and marginal flowers, the involucel shape and fruit micromorphology were revealed for the first time in this study. The obtained results were compared with the data from the flora of Turkey, Iran and the USSR of P. plumosus.

Key words: micromorphology, morphology, *Pterocephalus*, scanning electron microscope

---------- * ----------

Pterocephalus plumosus (L.) Coulter (Caprifoliaceae)'un morfolojisi ve meyve mikromorfolojisi

Özet

Bu çalışmada *P. plumosus* türünün genel morfolojisi ve meyve mikromorfolojisi çalışılmıştır. *P. plumosus* türüne ait taban ve üst yaprakların ölçüleri, pedünkül uzunluğu, involukral braktelerin sayısı, merkezi ve kenar çiçeklerin uzunlukları, involüsel şekli ve meyve mikromorfolojisi özellikleri ilk defa bu çalışmayla ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen sonuçlar *P. plumosus*'un Türkiye, İran ve USSR floralarındaki verilerle karşılaştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: mikromorfoloji, morfoloji, *Pterocephalus*, taramalı elektron mikroskopu

1. Giriş

Dipsaceae familyası dünyada 14 cins ve Türkiye'de 7 cins ile temsil edilirken moleküler tabanlı filogeni çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre Caprifoliaceae familyasına aktarılmıştır [1-4]. Caprifoliaceae tür çeşitliliği açısından Kuzey Amerika ve Asya'nın doğusunda geniş bir dağılıma sahipken Tropikaller ve Güney Afrika'da ise yayılış göstermemektedir. Dipsacales takımı içerisinde yer alan Caprifoliaceae familyası dünyada 41 cins ve yaklaşık 960 tür içermektedir [4]. Ülkemizde ise Caprifoliaceae familyası 12 cins ve 158 türle temsil edilmektedir [5].

Pterocephalus Adanson cinsi Türkiye Florası'nda sekiz türle temsil edilirken [1] Türkiye Bitkileri Listesi'nde bu sayı dokuza yükselmiştir [6]. *P. pinardii* Boiss. ve *P. shepardii* türleri Türkiye için endemik olup [6] *Pterocephalus* cinsinin ülkemiz için endemizm oranı %22.2'dir. *P. plumosus* türü Türkiye dışında Arnavutluk, Ermenistan, Bulgaristan, Hırvatistan, Mısır, Gürcistan, Yunanistan, İsrail, Ürdün, Lübnan, Suriye, Rusya, Kuzey Kafkasya ve Ukrayna'da yayılış göstermektedir [7]. Ülkemizde ise *P. plumosus* Çanakkale, Bilecik, Zonguldak, Samsun, Sivas, Artvin, İzmir, Uşak, Konya, Ankara, Niğde, Erzincan, Diyarbakır, Antalya, Kahramanmaraş, Mardin ve Hakkari illerinde dağılıma sahiptir [1]. Bu çalışmanın amacı Türkçe ismi "gök cücükotu" olarak da bilinen [6] *Pterocephalus plumosus* türünün detaylı morfolojisini ve meyve mikromorfolojisini ortaya çıkarmak ve *Pterocephalus* cinsinin revizyonunu yapacak bilim insanlarına referans olabilmektir.

[*] *Corresponding author* / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903322231881; Fax.: +903321881; E-mail: emrahsirin@selcuk.edu.tr
© Copyright 2023 by Biological Diversity and Conservation Geliş tarihi: 05.08.2022; Yayın tarihi: 15.04.2023 BioDiCon. 1049-250822

2. Materyal ve yöntem

Pterocephalus plumosus türüne ait örneklerimiz Konya'nın Çumra İlçesi'nden toplanmıştır. Toplanan bitki örnekleri morfolojik olarak incelemek üzere prese alınarak nemsiz, gölgeli ve hava akımı olan bir ortamda kurumaya bırakılmıştır. Bitkilere ait herbaryum örnekleri hazırlanmıştır. Herbaryum örnekleri Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi KNYA Herbaryumu'nda saklanmaktadır. Örneklerin teşhisinde "Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası" adlı kaynak kullanılmıştır [1].

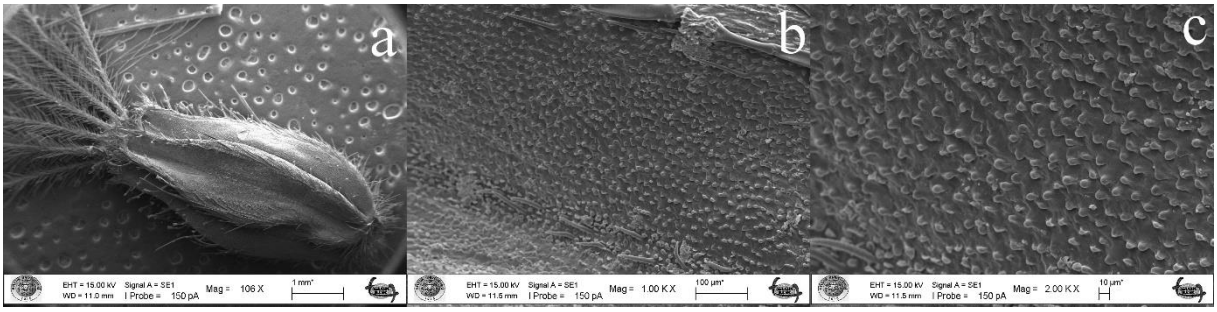
İncelenen türe ait örneklerin gövde şekli ve uzunluğu, taban ve üst yaprakların şekil ve ölçüleri, pedunkul tüy durumu ve ölçüsü, involukral braktelerin sayısı, şekli ve ölçüleri, merkezi ve kenar çiçeklerin ölçüleri, sitamen ve sitigma sayısı, involüsel ölçüleri, oluk sayısı ve ölçüleri, kaliks uzunluğu ve seta sayısı belirlenmiştir. Ölçülebilen karakterlerden en az 20 ölçüm yapılarak minimum ve maksimum değerler elde edilmiştir. Çalışılan türün morfolojik betimi "Resimli Türkiye Florası" birinci cildindeki Türkçe karakterler dikkate alınarak hazırlanmıştır [7].

P. plumosus'un meyve mikromorfolojisi çalışmaları için yapılan taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizlerinde kullanılan örneklerin iyice temizlenmesi için öncelikle alkol serilerinden (sırasıyla %70, %80, %96 ve %100'lük ve her seride 20'şer dakika) geçirilmiştir. Daha sonra ZEISS EVO LS–10 model elektron mikroskobunda yüksek vakum modunda 30x, 1000x ve 2000x'lik büyütmelerle yüzey gözlemleri yapılıp fotoğraflanmıştır.

Meyve mikromorfolojisi terminolojisi Stearn [8] ve Koul vd. [9]'a göre yapılmıştır.

3. Bulgular

P. plumosus'un morfolojik ve meyve mikromorfolojisi özellikleri şu şekildedir; basit veya gövdenin ortasından dallanmış tek yıllık otsular. Gövde dik, 33–66 cm uzunluğunda. Taban yaprakları dikdörtgensi, dalgalı-dişli veya geniş yumurtamsı-mızraksı derin teleksi, dişli veya dalgalı uç loplu, şeritsi-mızraksı yanal loplu, 15–45 × 3–8 mm, üst yapraklar az teleksi 16–24 × 4–7 mm. Pedünkül seyrek, salgı tüylü, 12–30 cm. Involukral brakteler 8–12 adet, mızraksı, hemen hemen çiçeklere eşit boyda bazen daha uzun, 10–16 mm. Kapitula ışınsal, corolla kirli-morumsu, kenar çiçekler genişlemiş, uçta akut, 16-22 mm uzunluğunda; merkezi çiçekler tam kenarlı, 12–15 mm uzunluğunda. Sitamenler 5 adet, sitigma 1 adet. Involusel yumurtamsı, yüzey strüktürü barbellat, açık kahverengi, ince yeşil çizgili, 4.5–5×2 mm, 8 oluklu, oluklar salgı tüylü, 1.5–2 × 0.1–0.5 mm uzunluğunda, uçta dişli fakat korona mevcut değil. Kaliks 9–9.5 mm, 10–24 setalı (Şekil 1).



Şekil 1. *P. plumosus* türünün meyve mikrografları:**(a)** Genel görünüm, **(b)** 1000 ×'lik büyütme ve **(c)** 2000 ×'lik büyütme

4. Sonuçlar ve tartışma

Pterocephalus cinsinin Türkiye Florası'ndaki teşhis anahtarı incelendiğinde gövde şekli ve uzunluğu, çiçek rengi, yaprak şekli, koronanın bulunup bulunmayışı, bitkinin yaşam süresi, korolla uzunluğu ve taban yaprak uzunluğu gibi karakterlerin tür ayrımında kullanıldıkları görülmektedir [1]. *P. plumosus* ise yakın olduğu *P. brevis* Coulter, *P. kurdicus* Vatke türlerinden koronaya sahip olmayışıyla ayrılmaktadır [1].

Yakın geçmişte İran'da *P. ramianensis* türü *P. plumosus*'tan morfolojik ve mikromorfolojik açıdan ayrılarak bilim dünyasına yeni bir tür olarak kazandırılmıştır [11].

P. plumosus türüne ait morfolojik verilerden taban ve üst yaprakların ölçüleri, pedünkül uzunluğu, involukral braktelerin sayısı, merkezi ve kenar çiçeklerin uzunlukları, involüsel şekli karakterline Türkiye Florası'nda değinilmemiş olup [1] ilk defa bu çalışmayla ortaya çıkarılmıştır (Tablo 1).

Elde edilen sonuçlar İran Florası'ndaki *P.plumosus*'un verileriyle [12] karşılaştırıldığında taban yapraklarının daha dar (3-8 mm bu çalışmada / 12-18 mm İran Florası'nda) merkezi çiçeğin ise daha kısa (12-15 mm bu çalışmada / 20 mm İran Florası'nda) olduğu tespit edilmiştir.

USSR Florası'nda *P.plumosus*'un yaprak ölçüleri, pedünkül uzunluğu, involukral brakte sayısı, çiçek uzunluğu karakterlerine değinilmemiş olup bu çalışmada bahsedilmiştir [13]. Yine aynı çalışmada *P.plumosus*'un iki yıllık olduğu belirtilirken arazi gözlemlerimize göre tek yıllık olduğu tespit edilmiştir [13].

Mikromorfolojik araştırmalar bitki sistematiğinde türlerin ayrımına önemli derecede katkı sağlamaktadır [14, 15]. *P. plumosus*'un SEM ile polen fotoğrafları çekilmiş ve palinolojik özellikleri daha önce incelenmiş olmasına rağmen [16] meyve mikromorfolojisi ilk defa çalışılmıştır. *Pterocephalus* cinsine ait herhangi bir türün meyve mikromorfolojisi daha önce çalışılmadığı için türlerarası karşılaştırma yapılamamıştır.

Tablo 1. *P. plumosus*'un morfolojik verilerinin Türkiye, İran ve Rusya floraları ile karşılaştırılması

Karakterler	**Mevcut sonuçlara göre**	**Türkiye Florası'na göre [1]**	**İran Florası'na göre [13]**	**USSR Florası'na göre [14]**
Taban yaprak ölçüleri (mm)	15–45 × 3–8	-	30-40× 12-18	-
Üst yaprak ölçüleri (mm)	16–24 × 4–7	-	-	-
Pedünkül uzunluğu (cm)	12–30	-	3-20	-
İnvolukral braktelerin sayısı	8–12 adet	-	-	-
Merkezi çiçek uzunluğu (mm)	12–15 mm, heteromorfik, beş loplu, lateral loplar 2-3 mm	-	20 mm, heteromorfik, beş loplu, lateral loplar 2-3 mm	-
Kenar çiçek uzunluğu (mm)	16–22	-	-	-
İnvolüsel şekli	yumurtamsı	-	-	-

Bu çalışma *P. plumosus* türünün detaylı morfolojisinin ve meyve mikromorfolojisinin ilk defa incelenmiş olması açısından önem taşımakta olup cinse ait diğer benzer araştırmalara katkı sağlayacak ve yol gösterici olacaktır.

Teşekkür

Bu çalışmanın meyve mikrografları Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen proje ile çekilmiştir (Proje no: 19601017).

Kaynaklar

[1] Matthews, W.A. (1972). Dipsaceae L. In: Davis, P.H. (Ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Cilt 4 (pp. 582-625). Edinburgh at the Unıversity Press, England.

[2] Mayer, V. (2016). Dipsacaceae (inclusive Triplostegia). In: Kadereit, J.W. & Bittrich, V. (Eds.), Flowering Plants. Eudicots, The Families and Genera of Vascular Plants 14 (pp. 145-163). Springer International Publishing, Switzerland.

[3] The Angiosperm Phylogeny Group, Chase, M. W., Christenhusz, M. J. M., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., Soltis, D. E., Mabberley, D. J., Sennikov, A. N., Soltis, P. S. & Stevens, P. F. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20. https://doi.org/10.1111/boj.12385

[4] Wang, H. X., Liu, H., Moore, M. J., Landrein, S., Liu, B., Zhu, Z. X. & Wang, H. F. (2020). Plastid phylogenomic insights into the evolution of the Caprifoliaceae s.l. (Dipsacales), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 142, 106641. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106641

[5] Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. & Babaç, M. T. (edlr.) (2012). Türkiye bitkileri listesi (Damarlı bitkiler) [Turkey plant list (Vascular plants)]. Turkey (pp. 1-1290). Flora Araştırmaları Derneği ve Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, İstanbul.

[6] Göktürk, R. S. (2012). *Pterocephalus* Adans. İçinde: Güner, A. (Ed.). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler) (pp. 319). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul.

[7] http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/ [erişim tarihi 27.09.2022].

[8] Güner, A. (ed.) (2014). Resimli Türkiye Florası cilt 1 (pp. 1-446). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi, Flora Araştırmaları Derneği ve Türkiye İş Bankası Kültür Yayınları, İstanbul.

[9] Stearn, W.T. (1992). Botanical Latin. David & Charles Pub, London.

[10] Koul, K., Ranjna, N. & Raina, S.N. (2000). Seed coat microsculpturing in *Brassica* and allied genera subtribes Brassicinae, Raphaninae, Moricandiinae), *Annals of Botany*, 86(2) 385–397.

[11] Ranjbar, M. & Ranjbar, Z. (2021). A taxonomic note of *Pterocephalus* (Caprifoliaceae) from N Iran. *Phytotaxa*, 494(1), 137-144.

[12] Lack, H.W. (1991) *Pterocephalus* Vaill. ex Adans. *In:* Rechinger KH, (Ed.) *Flora Iranica, vol. 168.* Akademische Druck-u Verlagsanstalt, Graz, pp. 18–33.

[13] Bobrov, E.G. (1957) *Pterocephalus* Vaill. ex Adans. *In:* Shishkin BK, (Ed.) *Flora of the USSR,* vol. 24. Akademiya Nauk SSSR, pp. 37–39.

[14] Yıldırım, B., Dural, H. & Çıtak, B. Y. (2021). Morphological, anatomical, palynological, and micromorphological study on *Diplotaxis tenuifolia* (Brassicaceae). *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 14(3), 365-371.

[15] Eroğlu, H., Karaismailoğlu, M. C., Pinar, S. M. & Fidan, M. (2021). Seed micromorphology and anatomy of 36 *Muscari* (Asparagaceae) taxa from Turkey with notes on their systematic importance. *Acta Botanica Croatica*, 80(2), 146-157.

[16] Mostafa, E. N., Sedigheh, S. N. & Rosa, E. (2017). Pollen characters as taxonomic evidence in some species of Dipsacaceae from Iran. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 24 (2), 129-136.

www.biodicon.com BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION

ISSN 1308-8084 Online ISSN 1308-5301 Print

Research article/Araştırma makalesi
DOI: 10.46309/biodicon.2022.1164430
16/1 (2023) 10-22

Pharmaceutical Botanical evaluation of Saffron (*Crocus sativus* L.) called samples sold in Türkiye

Yazel ÖZOĞUL[1], Ayşe BALDEMİR KILIÇ [*2]
ORCID: 0000-0002-7378-5094**;** 0000-0003-2473-4837

[1] Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Klinik Eczacılık Anabilim Dalı, 38280 Kayseri, Türkiye
[2] Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 06018 Ankara, Türkiye

Abstract

Crocus sativus L. (Saffron, Fam. Iridaceae) is a medicinal, commercial, historical and economically important plant that has been used in the treatment of various diseases since ancient times. Saffron, which is generally used by the public to add flavor and color to dishes, is difficult to cultivate and harvest due to the use of only dried stigmas and is known as the most expensive spice in the world. The macroscopic and microscopic properties of the samples sold under the name "Saffron" from 10 different cities of Turkey, as well as the drying loss, foreign matter amount determination, total ash amount determination, color density determination, phosphomolybdic acid reaction and elongation determination analysis tests were conducted and their conformity with European Pharmacopoeia standards was investigated. In this study, saffron samples purchased from a local producer in Safranbolu (Standard 1) and grown by ourselves (Standard 2) were used. As a result of our study, it was determined by morphological and microscopic studies that samples 2 and 4 completely belonged to the *Carthamus tinctorius* L. (Safflower) plant. On the other hand, it has been revealed by the analyzes that the sample number six contains very little saffron stigma and mainly contains Safflower bulk flowers.

Key words: *Crocus sativus*, Saffron, European Pharmacopeia, Iridaceae

---------- * ----------

Türkiye'de Safran (*Crocus sativus* L.) adı ile satılan örneklerin Farmasötik Botanik açıdan değerlendirilmesi

Özet

Crocus sativus L. (Safran, Fam. Iridaceae) antik çağlardan beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan tıbbi, ticari, tarihsel ve ekonomik olarak oldukça önemli olan bir bitkidir. Halk tarafından genel olarak yemeklere tat ve renk vermede kullanılan safran, yalnızca kurutulmuş stigmalarının kullanımından dolayı yetiştiriciliği ve hasadı zor olup dünyanın en pahalı baharatı olarak bilinir. Türkiye'nin 10 farklı ilinden "Safran" adı ile satılan örneklerin makroskobik ve mikroskobik özellikleri ile kurutma kaybı, yabancı madde miktar tayini, toplam kül miktar tayini, renk yoğunluğu tayini, fosfomolibdik asit reaksiyonu ve uzama tayini analizi testleri yapılarak Avrupa Farmakopesi (8.0) standartlarına uygunlukları araştırılmıştır. Bu çalışmada standart olarak Safranbolu'dan yerli bir üreticiden satın alınan (Standart 1) ve kendi yetiştirdiğimiz (Standart 2) safran örnekleri kullanılmıştır. Çalışmamız sonucunda 2 ve 4 numaralı örneklerin tamamen *Carthamus tinctorius* (Aspir) bitkisine ait olduğu morfolojik ve mikroskobik çalışmalarla tespit edilmiştir. Altı numaralı örneğin ise çok az safran stigması içerdiği ağırlıklı olarak Aspir toplu çiçek durumlarını içerdiği yine yapılan analizler ile ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: *Crocus sativus*, Safran, Avrupa Farmakopesi, Iridaceae

[*] *Corresponding author* / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905368350757; Fax.: +903123046091; E-mail: aysebaldemir@gmail.com
© Copyright 2023 by Biological Diversity and Conservation Geliş tarihi: 19.08.2022; Yayın tarihi: 15.04.2023 BioDiCon. 1050-190822

1. Giriş

Crocus sativus L. (Safran) Asya, Avrupa ve Amerika'da sıklıkla yetiştirilen Iridaceae familyasına ait çok yıllık bir bitkidir. Bitki 20-30 cm boyunda, sonbaharda yapraklar ile birlikte mor çiçekler veren soğanlı bir kültür bitkisidir [1]. Safran'ın ticari ürünü ve kullanımı tuğla kırmızısı renkli, acı tat ve yoğun aroma veren kurutulmuş stigmalarından gelir. Bu baharat aromatik lezzet, renk ve işlevsel özellikleri nedeniyle antik çağlardan beri kullanılmaktadır. Safran (çiçeklerin kuru stigmaları) pek çok gıda ürününde kullanılmasının yanı sıra Arabistan, Hindistan ve Çin'de kanser dahil olmak üzere çeşitli rahatsızlıklar için bitkisel ilaç olarak kullanılmıştır. Safran'ın ana kullanım yeri mutfak olmasına rağmen farmasötik ve klinik olarak da önemli bir yere sahiptir. Ayurveda'da astım, artrit, soğuk algınlığı ve öksürük tedavisinde yararlı olabileceğine dair bilgiler mevcuttur. Ayrıca Safran içeren ayurvedik ilaçlar akne ve çeşitli deri hastalıklarının tedavisi için macun formunda da kullanılmıştır. Geleneksel tıpta çok çeşitli amaçlarla örneğin afrodizyak, antispazmodik, balgam söktürücü, uykusuzluk, kızamık, dizanteri, sarılık, kolera ve mide rahatsızlıklarında kullanılmıştır. Ayrıca dokuma endüstrisinde boyama ajanı olarak ve çeşitli parfüm, tütsü çubuklarının hazırlanmasında da kullanılır. Toz haline getirilmiş stigmalar katarakt, gece körlüğü ve zayıf görme tedavisinde kullanılan ilaçlardan biri olmuştur. Aynı zamanda araştırmalar Safran'ın kuvvetli sedatif ve hipnotik etkiye sahip olduğunu göstermiştir ve bu etkilerinden dolayı İran'da uzun yıllar kullanılmıştır [2-4]. Safran'ın tarihsel ve ekonomik olarak önemli değeri bulunmaktadır. Tarihsel özelliği, Safranbolu ilçesine ismini vermiş olması ve antik çağlardan beri kullanımından ileri gelirken, ekonomik özelliği ise, dünyada çeşitli endüstri dallarında çok geniş kullanım alanına sahip olup en pahalı baharat olmasından ileri gelmektedir. Çok eski çağlardan beri Safran yalnızca baharat olarak değil hastalıkları iyileştirici ve koruyucu bir bitki olarak da değer görmüş, hatta çeşitli dönemlerde renginden ötürü kutsal sayılmıştır. Boya ve kozmetik sanayinde kullanımının yanı sıra, özellikle gıda ve ilaç sanayinde de çok geniş kullanım alanı bulunmaktadır. Örneğin gıda sanayinde, besin maddelerinin renklendirilmesi, tatlandırılması ve aromalandırılması için kullanıldığı gibi, mutfaklarda, safranla yemek, içecek hazırlanması ve sunulması, özel bir beğeni ve önem kazanmıştır [5]. Safran bitkisi taşıdığı tıbbi değer nedeniyle birçok eski medeniyette önemli bir yere sahip olmuştur. Safran'ın tentür ve ekstreleri yüzyıllar boyunca antispazmodik, karminatif, sakinleştirici, stimulan, stomaşik ve afrodizyak olarak kullanılmıştır. Ayrıca Safran birçok ülkenin Farmakopesi'nde de yer almıştır. Sümerliler safranı ilaç ve iksirlerine dâhil etmiş; Eski Mısırlılar ise sindirim sistemi hastalıkları ve yaraları iyileştirmek, aynı zamanda karaciğer ve mideyi güçlendirmek ve dalak rahatsızlıklarını tedavi etmek amacıyla kullanmışlardır. Devrinin önde gelen tıp âlimlerinden Erasitratus (MÖ IV-III. yüzyıl), Hipokrat (MÖ V-IV. yüzyıl) ve Dioskorides (MS I. yüzyıl) de eserlerinde safranın tıbbi özelliklerinden bahsederek bu bitkinin göz, kulak, diş ve baş ağrılarına karşı etkili olduğundan, kan durdurucu etki gösterdiğinden ve ülser tedavisinde kullanıldığından bahsetmişlerdir. Bunun dışında Eski Roma'da safranla hazırlanan yağ, aromatik su ve merhemler de tedavi amacıyla kullanılmıştır. Eski Romalılar safranı öksürüğü kesmek, karaciğeri rahatlatmak akciğer ve göz iltihaplarını gidermek için kullanmışlardır [6,7].

Safran'nın sadece stigmasının kullanımından ötürü yetiştiriciliği ve hasadı zor olan bir drogtur. Safran (*C. sativus*), çiçeğinin stigmalarının el ile toplanması, kurutulması ve ardından toz haline getirilmesi sonucu elde edilir. Ortalama 160 kg safran çiçeğinden yaklaşık 1 kg kuru stigma elde edilir. Günümüzde Safran yetiştiriciliği Avrupa, Türkiye, İsrail, Pakistan, Hindistan, İran, Mısır, Azerbaycan, Çin, Japonya ve Avustralya'da yapılmaktadır. Ülkemizde Osmanlı döneminde Safran yetiştiriciliği İstanbul, İzmir, Adana, Tokat, Şanlıurfa ve Safranbolu'nun 40 kadar köyünde yapılmaktayken, günümüzde Safranbolu'nun sadece Davutobaşı, Yörük, Aşağıgüney, Geren, Yazıköy ve Değirmencik köylerinde yapılmaktadır. Bu yüzden dünyanın en pahalı baharatı olarak görülür ve "Aspir" gibi bitkiler ile tağşiş yapılıp, mum yağ bal emdirilerek ağırlığı artırılarak halk tarafından yanlış şekilde alınıp kullanılabilir [5,8,9]. Aspir'in yanısıra mısır püskülü, nergis, enginar stigma ve stilusları ile de katıştırma çok fazla yapılmaktadır. Tespit için mikroskobik, mikroşimik ve kantitatif analizler yapılmalıdır [10].

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı illerinden satın alınan Safran örnekleri Avrupa Farmakopesi (8.0)'nde belirtilen makroskobik ve mikroskobik özellikler ile bazı fiziko-kimyasal çalışmalar (kurutma kaybı tayini, yabancı madde miktar tayini, renk yoğunluğu tayini, fosfomolibdik asit reaksiyonu ve toplam kül miktar tayini) yapılarak standart Safran örnekleri ile karşılaştırılmıştır. İlk olarak farklı illerde safran olarak satılan drogların morfolojik özellikleri tespit edilip, mikro-fotoğrafları çekilmiştir. Bu aşamadan sonra drogların anatomik karakterlerinin belirlenmesi için örneklerden bir miktar mekanik öğütücü ile toz edilerek preparatlar hazırlanmış ve tespit edilen karakteristik elemanlar fotoğraflanmıştır. Satın alınan bütün örnekler standart Safran örnekleri (Standart 1 ve Standart 2) ile kıyaslanarak incelemeler yapılmıştır.

Bu çalışmada halk arasında gıda ve tıbbi amaçlı olarak sıkça kullanılan, dünyanın en pahalı baharatı olarak bilinen "Safran"ın Türkiye'nin çeşitli illerinden bu adla satın alınan örneklerinin kalitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

1. Materyal ve yöntem

1.1. Bitki materyali

Bu çalışmada Türkiye'nin İstanbul, Ankara, İzmir, Şanlıurfa, Adana, Giresun, Kırıkkale, Kayseri, Sakarya, Elazığ olmak üzere 10 farklı ilinden alınan Safran (*C. sativus*) örnekleri materyal olarak kullanılmıştır. Çalışmada standart Safran örneği olarak Safranbolu'da yerli bir üreticiden satın alınan (Standart 1) ve kendi yetiştirdiğimiz (Standart 2) (Şekil 1) örnekler kullanılmıştır. Satın alınan örneklerin numaraları, temin edildiği iller, satış şekilleri Tablo 1.'de verilmiştir.

Tablo 1. Örneklerin temin edildiği yerler, tarihleri ve halka sunuş şekilleri

Örnek numarası	**Numunelerin satın alındığı iller**	**Satış şekli**
Örnek 1	Üsküdar/İstanbul	Açık
Örnek 2	Seyhan/Adana	Açık
Örnek 3	Bornova/İzmir	Cam şişede
Örnek 4	Şanlıurfa	Açık
Örnek 5	Talas/Kayseri	Açık
Örnek 6	Kırıkkale	Paketli
Örnek 7	Sakarya	Paketli
Örnek 8	Elazığ	Açık
Örnek 9	Bahçelievler/Ankara	Paketli
Örnek 10	Merkez/Giresun	Paketli
Standart 1	Safranbolu/Karabük	Paketli
Standart 2	Kültür	-

Bu çalışmada piyasadan satın alınan 10 adet Safran örnekleri üzerinde Avrupa Farmakopesi (8.0) monografında belirtilen bazı deneyler esas alınarak aşağıdaki analizler yapılmıştır.

1.2. Morfolojik analizler

Farklı illerden satın alınan her bir örnekten 1'er gram tartıldı. Örnekler ayrı ayrı A4 kağıtları üzerine yayılarak morfolojik özellikleri açısından incelendi. Her bir örnek standart numuneler ile kıyaslanarak drog ve mevcut varsa kirlilik oranları hesaplandı.

1.3. Mikroskobik analizler

Mikroskobik çalışmada ise her bir örneğin Avrupa Farmakopesi' nde (8.0) belirtildiği şekilde Kloralhidrat solüsyonu R kullanılarak preparatlar hazırlanmış ve mikroskop altında incelemeler yapılmıştır. On numune için ayrı ayrı preparatlar hazırlanarak Avrupa Farmakopesi (8.0) Safran bitkisine ait monografta belirtilen karakteristik yapıların olup olmadığı tespit edilerek ZEISS Primostar 415500'e bağlı kamera ile mikro-fotoğrafları alınmıştır [11].

1.4. Yabancı madde miktar tayini

Örneklerden 1'er gram tartılarak bir A4 kâğıdı üzerinde inceleme yapılmıştır. Örneklerin yabancı madde miktarları % olarak hesaplanmıştır. Avrupa Farmakopesi (8.0)'nde belirtilen hususlar dikkate alınarak değerlendirilmiştir [11].

1.5. Kurutma kaybı

Öğütücüde toz edilmiş örneklerden 0,2 g hassas tartılmış ve darası alınmış saat camları üzerinde alınarak 2 saat boyunca 100-105º C' lik etüvde kurutuldu. Kurutulan numuneler tekrar tartıldı ve kurutmayla meydana gelen kütle kayıpları hesaplanıp değerlendirildi. Bu drog için Avrupa Farmakopesi (8.0)' ne göre kurutma kaybı en fazla %10 olarak belirtilmiştir [11].

1.6. Bütün kül miktar tayini

Sabit tartıma getirilmiş krozelere eklenen yaklaşık 0,2' şer gramlık numuneler 600 ± 20˚C de kül fırınında yakıldı. Sonuçlar kaydedildi. Bu drog için Avrupa Farmakopesi (8.0)' ne göre toplam kül miktarı en fazla %7 olarak belirtilmiştir [11].

1.7. Fosfomolibdik asit reaksiyonu

Örneklerden bir miktar alınarak toz edildi ve petri kutularına konuldu. Üzerlerine 0.2 ml *fosfomolibdik asit solüsyonu R.* eklenerek örneklerin 1-2 dakika içerisinde Avrupa Farmakopesi (8.0)' nde belirtildiği üzere mavi renge dönmeleri ya da etraflarında mavi küçük halka oluşması beklendi. Deney sonuçları bu kriterler dikkate alınarak değerlendirildi [11].

1.8. Renk yoğunluğu tayini

Öğütücüde toz edilmiş örneklerden 0.1'er gram hassas tartılarak volumetrik şişelere konulup üzerlerine 5 ml *distile su R.* eklendi. Şişelerin ağzı kapatılarak 8 saat boyunca her 30 dk.'da bir çalkalanır. Daha sonra 16 saat beklemeye bırakılır. 1 ml distile su R ile 500 ml'ye seyreltilir. Negatif kontrol olarak distile su kullanıldı. 440 nm'de ölçülen absorbans değeri Avrupa Farmakopesi'ne (8.0) göre 0,44'ten düşük olmamalıdır [11].

1.9. Uzama tayini

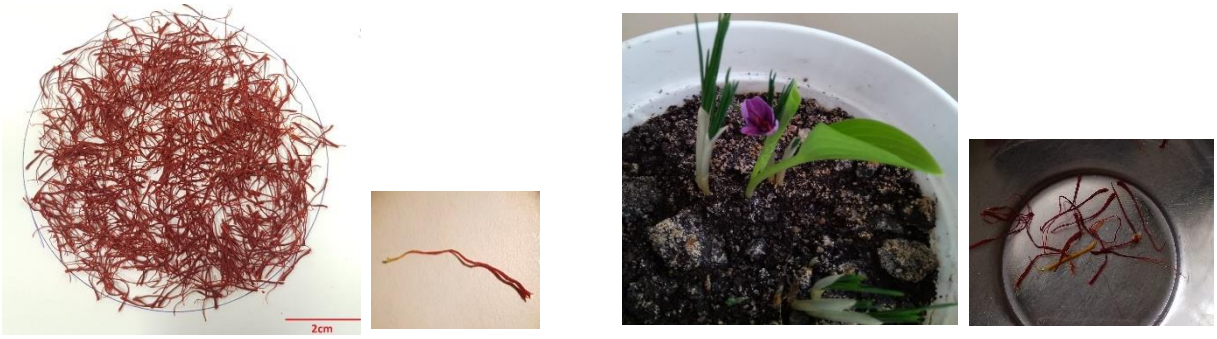
Avrupa Farmakopesi'nde (8.0) Safran droğuna ait monografta belirtildiği üzere her bir örnek için stigmalar uygun şartlarda suda bekletilerek uzama tayini deneyleri yapılmış olup sonuçlar standart örnekler ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir [11].

3. Bulgular

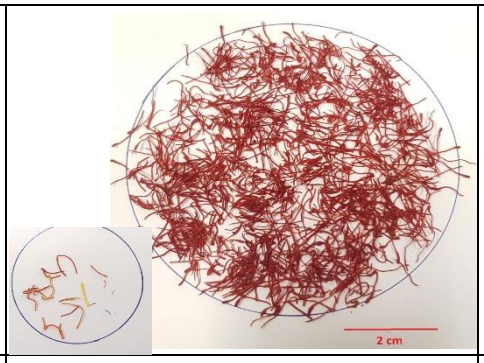
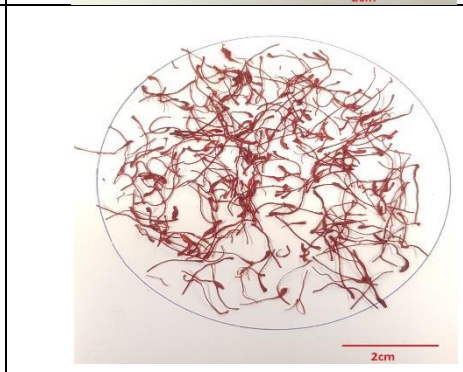
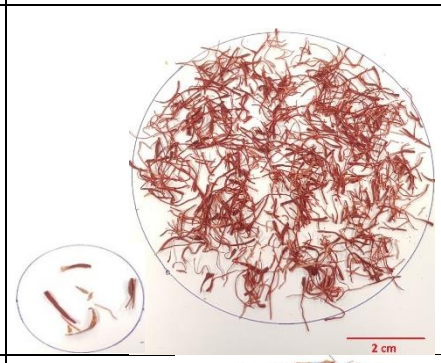
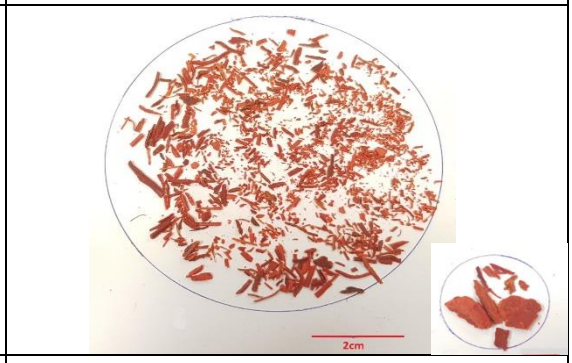
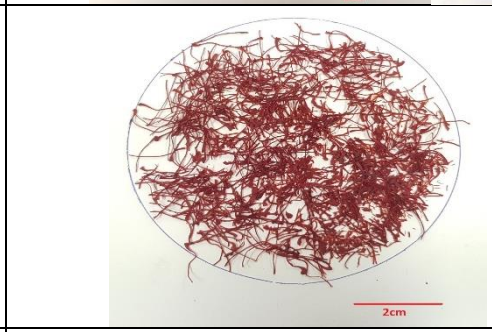
1.10. Morfolojik analizler

Piyasadan satın alınan safran örnekleri üzerinde yapılan morfolojik incelemenin sonuçları Tablo 2 ve Tablo 3' de detaylı olarak belirtilmiştir. Ayrıca bütün örneklerin morfolojik özellikleri incelenmiş ve mikro-fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 1).

Standart örnek-1 ***Standart örnek-2***



Şekil 1. Standart olarak kullanılan Safran örneklerinin morfolojik görüntüleri

Örnek-1		***Örnek-6***	
Örnek-2		***Örnek-7***	
Örnek-3		***Örnek-8***	
Örnek-4		***Örnek-9***	
Örnek-5		***Örnek-10***	

Şekil 2. Çalışmamızda incelenen ve piyasada "Safran" adı ile satılan numunelerin (Örnek 1-10) morfolojik görüntüleri

Tablo 2. Genel morfolojik inceleme sonuçları

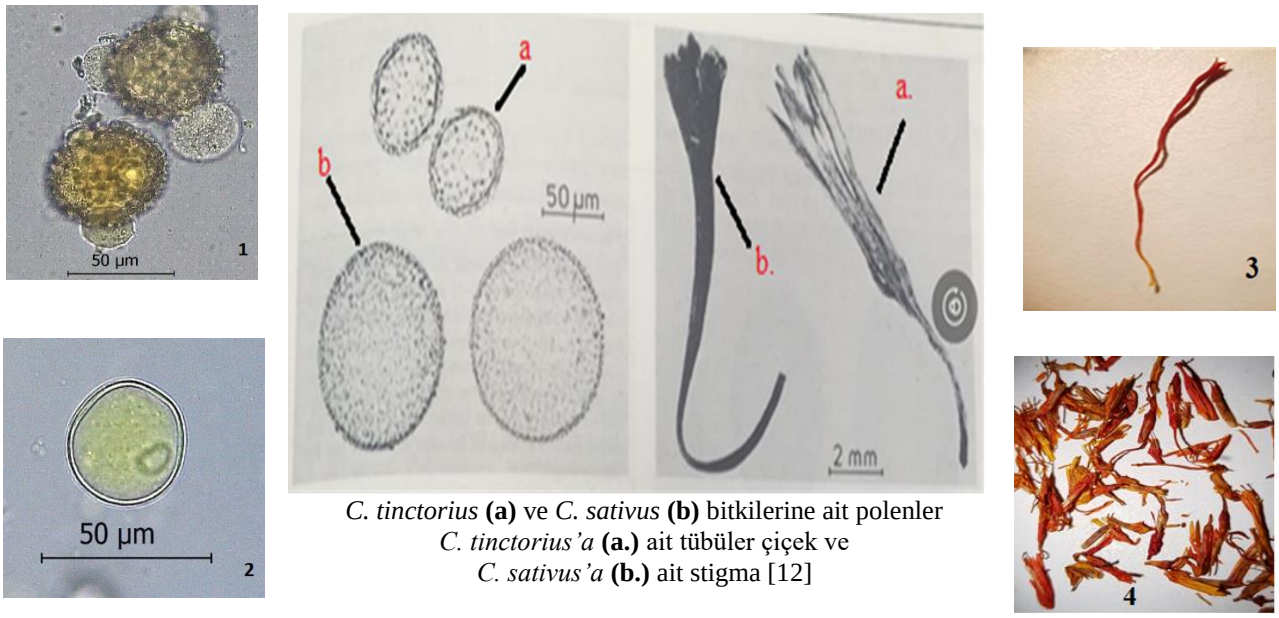
Örnek Numarası	**Safran örneklerinin morfolojik analizleri**
Örnek 1	Örnek genel olarak temiz ve parlak kırmızımsı görünümlüdür. Stigmalar arası renk farkı yok denecek kadar azdır. Koku hafif baharatlıdır.
Örnek 2	Örnek turuncu-sarı ve kırmızımsı renklerde çiçek parçaları içermekte olup safran standart droğu ile karşılaştırıldığında renk ve görünüş olarak farklı olduğu tespit edilmiştir.
Örnek 3	Safran droğuna ait olduğu düşünülen stigmalar genellikle parçalanmış, kırılgan yapılı ve uzun süredir beklemiş bir görüntüsü vardır. Stigmaların rengi standart örneklerdeki safranın karakteristik rengine göre daha açık kırmızı ve mattır. Koku yoğun ve baharatlıdır.
Örnek 4	Örnek sarı, turuncu ve kırmızımsı renklerde olup, safran droğuna ait olmadığı düşünülen çiçek parçalarına sahiptir. Kokusu hafif baharatlıdır.
Örnek 5	Stigmalar çok ince, kırılgan yapılı ve genellikle parçalanmıştır. Standart örneğe göre açık kırmızı ve mat görünümdedir. Uzun süre beklemiş bir drog görünümüne sahiptir. Koku hafif baharatlıdır.
Örnek 6	Örnek genel görünüşte kırmızımsı renkte olup yer yer turuncu renklerde çiçek parçalarını da içermektedir. Tüp şeklindeki korolla ve parçaları heterojen görünümlüdür. Koku hafif baharatlıdır.
Örnek 7	Örnek genel görünüşte kırmızımsı renkte olup stigmalar uç kısımlarda kalıplaşmıştır. Koku çok azdır.
Örnek 8	Örnek genel morfolojik incelemede drog tayini yapılabilecek özellikleri taşımamaktadır. Stigmalar genellikle parçalanmış, çoğunlukla ince toz halinde ve yer yer stigma uçları hafif kalınlaşarak kalıplaşmış ve sertleşmiştir. Renk açık kırmızımsıdır. Sağlıksız bir genel görünüşe sahiptir. Koku hafif baharatlıdır.
Örnek 9	Stigmalar özellikle uç kısımlarında yer yer birbirine yapışmış, kalıplaşarak kalın bir tabaka oluşturmuş ve sertleşmiştir. Drog genellikle mat görünümlüdür. Karakteristik safran kokusu alınmamıştır.
Örnek 10	Safran örneğine ait olduğu düşünülen stigmalar yer yer birbirlerine yapışık haldedir. Genel olarak stigmaların uç kısımlarda kahverengileşmeler ve kalıplaşmalar mevcuttur. Kokusu çok azdır.

Tablo 3. Örneklerin Avrupa Farmakopesi (8.0)'nde belirtilen *Crocus sativus* monografına ait bazı parametrelere göre incelenmesi

	Renk	**Tüplerin Durumu**	**Stigmaları bağlayan stil**
Örnek 1	Tuğla kırmızısı	Tüpler üstten giderek genişlemiş, üst kenar ince parçacıklı.	Stil açık sarı renkli ve 1-3 mm.
Örnek 2	Açık yeşil, sarı, Turuncu ve kırmızımsı parçalar	Toplu halde çiçekler ile korolla ve dişicik boruları ile anter tüpleri mevcuttur.	Stil sarı renkli ve 2 mm.
Örnek 3	Kırmızı	Tüpler üst kısma doğru saçaklanmış ve kırılmış.	Stil çok ince ve koyu renkli ve 3 mm.
Örnek 4	Turuncu, yeşil, sarı ve yer yer kırmızımsı parçalar	Tüpler üstten giderek genişlemiş ve ikiye bölünmüş, üst kenar ince parçacıklı.	Stil çok ince ve uzun (10 mm kadar uzunlukta)
Örnek 5	Kırmızı	Tüpler üst kısma doğru saçaklanmış, kırılmış ve incedir.	Stil çok ince, koyu renkli ve 3 mm.
Örnek 6	Genel olarak kırmızımsı ancak az miktarda sarımsı çiçek parçaları	Tüpler üstten giderek genişlemiş, yer yer ikiye ayrılmış ve üst kenar ince parçacıklı.	Stil açık sarı renkli ve 1 mm.
Örnek 7	Genel olarak kırmızımsı ancak yeryer sarımsı parçalar	Tüpler üstten giderek genişlemiş, üst kenar ince parçacıklı.	Görülmemektedir.
Örnek 8	Açık kırmızı	Tüpler üstten giderek genişlemiş, üst kenar ince parçacıklı.	Görülmemektedir.
Örnek 9	Açık kırmızı	Tüpler net olarak görülmemiştir. Yapışık bir durumda, kalın ve serttir.	Görülmemektedir.
Örnek 10	Tuğla kırmızısı	Tüpler tırtıklı, üstten giderek genişlemiş ve üst kenar ince parçacıklı.	Stil sarı renkli ve 1 mm.
Standart 1	Tuğla kırmızısı	Tüpler üstten giderek genişlemiş, üst kenar ince parçacıklı ve açık.	Stil sarı renkli ve belirgin ve 3 mm.
Standart 2	Tuğla kırmızısı	Tüpler üstten giderek genişlemiş, üst kenar ince parçacıklı ve açık.	Stil sarı renkli, belirgin ve 3 mm.

1.11. Organoleptik ve Mikroskobik Analizler

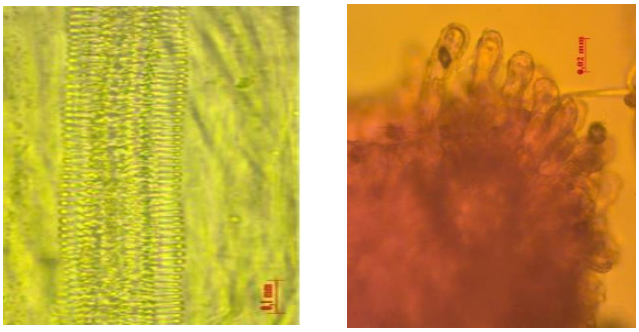
Örneklerin organoleptik ve mikroskobik analizlerinde örnek 1, Std 1 ve Std 2 Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen safrana ait özellikleri taşırken; 2 ve 4 numaralı örneklerimizin yine Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen "Aspir" bitkisine (*C. tinctorius*) ait monografta belirtilen organoleptik, makroskobik ve mikroskobik özellikleri göstermiştir. Çalışmada karşılaştırma amaçlı olarak *C. tinctorius* türünün kültür örneği de analizlerde kullanılmıştır. Özellikle 2 ve 4 numaralı örneklerimizin tamamen *Aspir* türüne ait olduğu tespit edilmiştir. 6 ve 7 numaralı örnekler incelendiğinde mikroskobik çalışmalarda Safran droğuna ait karakteristik elemanların görülmesine karşın *C. tinctorius*'a ait elemanlar da tespit edilmiştir (Şekil 3, Şekil 6). Diğer örneklerimizin (1, 3, 5, 8-10) analizlerinde ise Safran'a ait karakteristik elemanlar görülmüş olmakla birlikte standart örneklerimiz ile kıyaslandığında organoleptik analizlerdeki parametreleri (renk, tat, koku ve genel görünüş) tam olarak karşılamadıkları tespit edilmiştir (Tablo 2 ve Tablo 3). Organoleptik ve mikroskobik analizlerde sadece bir numaralı örnek standart numunelere en yakın sonuçları vermiştir. Dokuz numaralı örneğimiz incelendiğinde Safran olduğu ilk bakışta anlaşılamamakta olup, muhtemelen uygun koşullarda saklanmamış olması yahut uzun süredir bekletiliyor olmasından dolayıdır ki sağlıksız bir yapıya sahiptir.



C. tinctorius **(a)** ve *C. sativus* **(b)** bitkilerine ait polenler
C. tinctorius'a **(a.)** ait tübüler çiçek ve
C. sativus'a **(b.)** ait stigma [12]

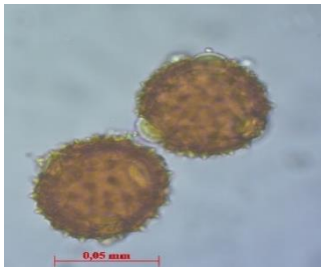
Şekil 3. 1.Ekinulat eksinli polen (Aspir); 2. Çukur eksinli polen (Safran); 3. Safran stigması; 4. Tübüler çiçek (Aspir)

Şekil 4. Çalışmamızda karşılaştırma amaçlı kullanılan standart Aspir örneğinin morfolojik görüntüsü

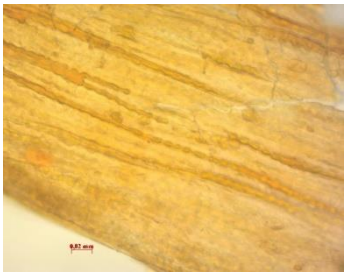


A **B**

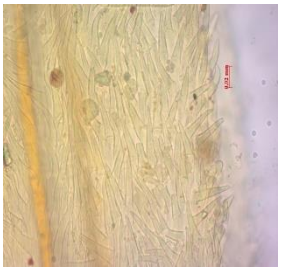
Şekil 5. Safran örneklerinde tespit edilen diğer karakteristik elemanlar **A.** Spiral odun boruları, **B.** Parmak şeklinde papillalar



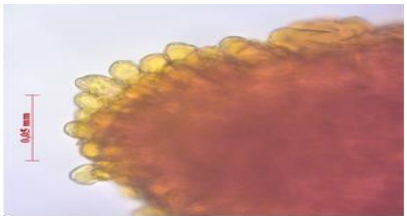
Üç porlu ekinulat eksinli polen



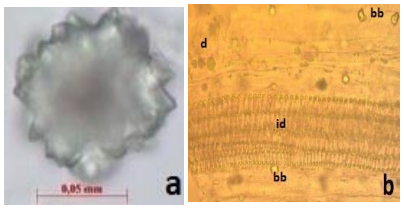
Boyuna uzamış ince çeperli kenarları loblu epidermalı korolla tüpü parçaları



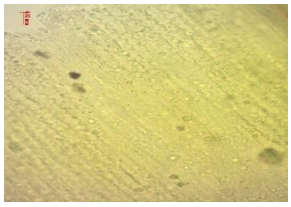
Koni şeklindeki papillerin eşlik ettiği anter tabakası



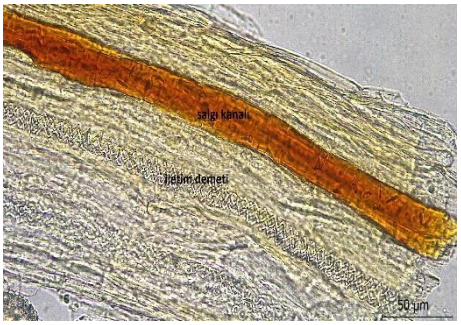
Çok belirgin papil taşıyan korolla tüpü parçaları



Kalsiyum oksalat kristalleri.
a. Druz **b.** Basit billur kristalleri
d: Druz, **id:** İletim demeti, **bb:** Basit billur

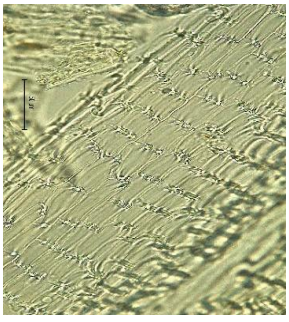


Boyuna uzamış ince çeperli kenarları loblu epidermalı korolla tüpü parçaları



Kırmızımsı-kahverengi içerikli salgı kanalları ile çevrelenen iletim demetleri

Polenlerin eşlik ettiği koni şeklindeki papillerle örtülü stigma parçaları



Anterin filament parçaları

Şekil 6. Mikroskobik inceleme ile 2, 4 ve 6 numaralı örneklerimizde tespit edilen Aspir droğuna ait karakteristik elemanlar

1.12. Farmakope testlerinin bulguları

1.12.1. Yabancı madde

Piyasadan satın alınan Safran örneklerinde yapılan yabancı madde inceleme sonuçları Tablo 4'de belirtilmiştir. Çalışma materyallerimizden olan 2 ve 4 numaralı örneklerin tamamının "Aspir" bitkisine ait olduğu tespit edilmiştir [11].

Tablo 4. Örneklerin yabancı madde miktarları

Örnek numarası	**Yabancı maddeler**	**Yabancı madde (%)**
Örnek 1	Safran stigmasına ait olmayan kirlilikler	% 0,1
Örnek 2	Aspir bitkisinin çiçek parçaları	% 100
Örnek 3	Safran stigmasına ait olmayan kirlilikler	% 0,1
Örnek 4	Aspir bitkisinin çiçek parçaları	% 100
Örnek 5	-	-
Örnek 6	Aspir bitkisinin çiçek parçaları	% 70
Örnek 7	-	-
Örnek 8	Safran stigmasına ait olmayan kirlilikler	%0.5
Örnek 9	-	-
Örnek 10	Safran stigmasına ait olmayan kirlilikler	%0,1

1.12.2. Kurutmada kayıp

Avrupa Farmakopesi'ne uygun olan droglar için kurutma kaybı oranı maksimum %10 olmalıdır. Yapılan incelemeler sonucunda bütün numuneler için bu oran %10' dan küçük bulunmuştur (Tablo 5) [11].

Tablo 5. Örneklerin kurutma kaybı sonuçları

Örnek numarası	**Nem oranları (%)**
Standart 1	6.2
Örnek 1	5.7
Örnek 2	5.47
Örnek 3	4.13
Örnek 4	4.79
Örnek 5	6.3
Örnek 6	8.9
Örnek 7	5.3
Örnek 8	3.7
Örnek 9	4.3
Örnek 10	5.6

1.12.3. Bütün kül miktar tayini

Avrupa Farmakopesi'ne uygun olan droglar için belirtilen bütün kül oranı maksimum %7 dir [11].

Yapılan deney sonucu bütün numunelerdeki bütün kül miktarı Tablo 6'da belirtilmiştir.

Tablo 6. Örneklerin bütün kül tayini sonuçları

Örnek Numarası	**Kül Oranları (%)**
Standart 1	3.46
Örnek 1	4.52
Örnek 2	7.10
Örnek 3	23.06
Örnek 4	7.13
Örnek 5	23.55
Örnek 6	7.08
Örnek 7	8.77
Örnek 8	41.56
Örnek 9	8.55
Örnek 10	23.62

1.12.4. Fosfomolibdik asit reaksiyonu

Fosfomolibdik asit reaksiyonu sonucu, Safran droglarında Avrupa Farmakopesi'nde belirtildiği üzere mavi rengin oluşumu beklenmektedir [11]. Mavi renk oluşumu standart örneklerimizde görülmüş olup piyasadan satın alınan örneklerden Safran olarak tespit edilenler arasında yalnızca örnek 7' de gözlenirken 10 numaralı örnekte maviye yakın bir halka oluşumu gözlenmiştir. Diğer safran olarak tespit edilen örneklerimizde mavi renk oluşumu net olarak gözlenmemiştir.

Standart 1 Standart 2 Örnek 7 Örnek 10

Şekil 7. Fosmolibdik asit reaksiyonu sonuçları.

1.12.5. Renk yoğunluğu tayini

Örneklerden 0.1'er gram tartılarak üzerine 5 ml'lik bir balonjoje'ye 5'er ml distile su eklenerek ağzı kapatıldı. 8 saat boyunca her 30 dak'da bir çalkandı. Daha sonra 16 saat beklemeye bırakıldı. 1 mL distile su ile 500 ml'ye seyreltilerek 440 nm'de absorbansları ölçüldü. Negatif kontrol olarak distile su kullanıldı. Ölçülen absorbans değerinin 0.44'den az olmaması beklendi [11]. Sonuçlar Tablo 7'de belirtilmiştir.

Tablo 7. Renk yoğunluğu tayini örneklerin absorbansları.

Örnek numarası	**Absorbans**
Standart 1	0,442
Örnek 1	0,088
Örnek 2	0,065
Örnek 3	0,026
Örnek 4	0,070
Örnek 5	0,030
Örnek 6	0,075
Örnek 7	0,071
Örnek 8	0,017
Örnek 9	0,071
Örnek 10	0,031

Şekil 8. Distile su ile seyreltilen örnekler

1.12.6. Uzama tayini testi

Avrupa Farmakopesi'nde (8.0) belirtildiği üzere ortalama 20-40 mm uzunluğunda bulunan stigmalar suda ıslatılınca 35-50 mm uzunluğuna gelmesi beklenmektedir. Safran standart örneği belirtilen aralıkta uzama göstermiş olup, Safran olarak tanımlanan diğer örnekler için Farmakope'de stigma uzunluğu için belirtilen aralıkta bir sonuç vermemiştir [11].

a. b. c.

Şekil 9. Safran stigmasında uzama tayini testi **a.** 1 saat sonra; **b.** 3 saat sonra, **c.** Standart örnekte görülen stigma uzama testi sonucu

2. Sonuçlar ve tartışma

Safran (*Crocus sativus* L.), dünyanın en pahalı baharatlarından biridir. Uluslararası ticaret ve ilaç pazarında, Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) spesifikasyonlarına, Avrupa İlaç Ajansı, Gıda ve İlaç İdaresi ve Avrupa Farmakopesi'ne uygun Safran kalitesinin oluşturulması zorunludur. Safran'ın tıbbi özellikleri, hammaddelerin kalitesi tüm üretim seviyelerinde açıkça kontrol edilirse ilaç, gıda ve kozmetik endüstrilerinde kullanılabilir [13]. Safran için uluslararası pazarlarda en fazla yapılan tağşişat "Aspir" (*C. tinctorius*) bitkisinin safran olarak piyasalarda satılmasıdır. Türkiye'deki pazarlarda da oldukça yaygın olan bu durum nedeniyle Aspir pazarlarda "Yalancı Safran" adıyla anılmaya

başlanmıştır. Aspir bitkisinin toplu çiçek durumunda kırmızı çiçeklerinde bulunması safranı çok iyi tanımayanlar için aldatıcı olabilmektedir. Çok değerli bir tarım ürünü olmasından dolayı farklı yollar ile de taklit ve tağşiş edilmektedir. Örneğin boyanmış hindistancevizi lifleri ve mısır püskülleri, makasla ince şeritler halinde kesilen karanfil ve gelincik taç yaprakları bu duruma örnek verilebilecek bitkilerdendir. Ayrıca iyi ve düşük kalite safranlarında karıştırılarak piyasaya sürülmesi diğer bir problem olarak ele alınmalıdır [14]. Çalışmamızda söz konusu iki problemle de karşılaşılmıştır. Farklı illerden "Safran" adı ile satın alınan örneklerin bazılarının tamamen farklı bir bitkiye ait olduğu, Safran olduğu düşünülen örneklerin ise birçoğunun düşük kalitede oldukları tespit edilmiştir. Örneklerin tamamının detaylı anatomik ve morfolojik incelemeleri yapılmıştır. Ayrıca Avrupa Farmakopesi (8.0)'nde yer alan yabancı madde miktar tayini, kurutma kaybı, bütün kül miktar tayini, fosfomolibdik asit reaksiyonu, renk yoğunluğu tayini ve uzama tayini gibi bazı testler de yapılmıştır (Tablo 4-7, Şekil 7-9). Çalışmada standart Safran örneklerimiz ile birlikte tağşiş yapılması muhtemel örnekler ile de (Aspir, mısır püskülü gibi) morfolojik ve mikroskobik olarak kıyaslamalar yapılmıştır. Aspir bitkisinin de dahil olduğu Compositae (Asteraceae) familyası toplu çiçek yapısına sahiptir. Taç yaprakların her birisi uçta serbest olup, açıldığında ortada kalan dişicik tepesinin etrafında bir yıldız görünümünü almaktadır [15,16]. Analiz çalışmaları neticesinde tağşiş yapılan örneklerin tamamında Aspir bitkisinin toplu çiçek durumunun kullanılmış olduğu görülmüştür. Özellikle 2 ve 4 numaralı örneklerin tamamen Aspir bitkisine ait çiçek parçalarını içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 2). Ayrıca tağşişin yapıldığı bitkinin kesin tespiti için karşılaştırma amaçlı kullandığımız standart Aspir çiçeğinin toz drogta mikroskobik ve makroskobik incelemeleri de yapılmış çalışmamızdaki örneklerde tespit edilen görüntüler ile eşleşen karakteristik elemanlar tespit edilmiş ve mikro-fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4, Şekil 6). Aspir, başta İran olmak üzere dünyanın farklı yerlerinde geleneksel ve halk kullanımına yönelik olarak terapötik potansiyeli için kullanılmaktadır. Bu bitki türü, kardiyovasküler sistem, kas-iskelet sistemi, sindirim sistemi ve benzerleri ile ilgili tıbbi durumlar üzerinde faydalı etkilere sahiptir. Aspir'in çok sayıda hayvan ve klinik çalışması yapılmış olmakla birlikte daha fazla fitokimyasal, klinik ve toksikolojik analizlere ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir [17]. Çalışmamızda tağşiş edilen örneklerimizde tespit edilmiş olan Aspir çiçekleri ile günümüze kadar yapılmış olan bilimsel çalışma sonuçları teselli edicidir. Son yıllarda piyasadan satın alınan örneklerin Farmakope'de yer alan drog tanımına uygun olup olmadığının araştırılması hususunda yapılan çalışmalarda örneklerin birçoğunun insan sağlığını tehdit edebilecek böcek, kum, taş, toz, naylon, tahta gibi yabancı maddeleri içerebildikleri tespit edilmiştir [18, 19]. Çalışmamızda incelenen örneklerden bazılarının oldukça sağlıksız bir genel görünüşe sahip olduğu hatta morfolojik olarak Safran olduğu ilk bakışta anlaşılmayan ancak yapılan analizler ile olabilirliği kanıtlanan Farmakope'de belirtilen drog tanımına kesinlikle uymayan örneklerin olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun temel nedenleri arasında Safran'ın oldukça popüler ve pahalı bir drog olmasından dolayı maalesef tağşişe açık olması, uzun süreli elde kalması, uygun olmayan kurutma ve saklama koşullarında bekletilmiş olması sayılabilir.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK 2209-A Üniversite öğrencileri yurt içi araştırma projeleri destek programı tarafından desteklenmiştir [1919B011703203]. Ayrıca bu çalışma Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'nda mezuniyet projesi olarak tamamlanmıştır.

Kaynaklar

[1] Davis, P.H. (1984). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Volume 8. Edinburgh University Press.
[2] Bhargava V. (2011). Medicinal uses and pharmacological properties of *Crocus sativus* L. (Saffron). *International Journal of Pharmacy Pharmaceutical Science*, 3(3), 22-26.
[3] Shahi T., Assadpour E., Jafari S.M. (2016). Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of 'red gold'; Saffron. *Trends in Food Science & Technology*, 58, 69-78. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.010
[4] Bhandari, P. R. (2016). *Crocus sativus* L. (Saffron) for cancer chemoprevention, a mini review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 5(2), 81-87. https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.10.009
[5] Açıkgöz ÖA (2010). Safran bitkisinin (*Crocus sativus* L.) yetiştirilmesi, kalitesi ve ticari önemi. Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
[6] Mousavi ,S.Z., Bathaie, S.Z. (2011). Historical uses of saffron, identifying potential new avenues for modern research. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 1(2), 57-66.
[7] Tekiner, H., Pasayeva, L. (2014). The Place of Saffron in Turkish-Islamic Medicine. *Lokman Hekim Journal*, 4(3), 11-15.
[8] Baytop, T. (1999). Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). İlaveli 2. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.
[9] Acar Sungur Y., İşkil R., Bürün B. (2017). Safran (*Crocus sativus* L.) Bitkisinde Biyoteknolojik Çalışmalar. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(2), 259-268. https://doi.org/10.21597/jist.2017.155
[10] Başer K.H.C., Kırımer N. (2022). Farmakognozi ve Fitoterapi. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevleri.
[11] European Pharmacopoeia 8.0 (2008). Monograph *Crocus sativus*. Volume 2. Strasburg, Council of Europe.
[12] Bisset, NG. (1994). Max Wictl's Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Boca Raton FL, CRC Press.

[13] Mykhailenko, O., Desenko, V., Ivanauskas, L., Georgiyants, V. (2020). Standard operating procedure of Ukrainian Saffron cultivation according with good agricultural and collection practices to assure quality and traceability. *Industrial crops and products*, 151, 112376. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112376

[14] Şahin, G. (2021). Tarihsel süreçte safran (*Crocus sativus* L.) ve Safran'ın günümüzdeki durumu. *Uluslararası Anadolu Sosyal Bilimler Dergisi*, 5(1), 173-214. https://doi.org/10.47525/ulasbid.850493

[15] Knowles, P.F. (1982). Safflower, genetics and breeding. International Atomic Energy Agency (IAEA), IAEA.

[16] Kayaçetin, F., Katar, D. & Arslan, Y. (2012). Aspir (*Carthamus tinctorius* L.)'in Döllenme Biyolojisi ve Çiçek Yapısı. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 21(2), 75-80. https://dergipark.org.tr/en/pub/tarbitderg/issue/11499/136987

[17] Delshad, E., Yousefi, M., Sasannezhad, P., Rakhshandeh, H., & Ayati, Z. (2018). Medical uses of *Carthamus tinctorius* L. (safflower), a comprehensive review from traditional medicine to modern medicine. *Electronic physician*, 10(4), 6672. https://dx.doi.org/ 10.19082/6672

[18] Kendir, G., & Köroğlu, A. (2019). "Kiraz Sapı" adı altında satılan bitkisel materyallerin morfolojik ve anatomik özelliklerinin incelenmesi. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 12(2), 92-102.

[19] Baldemir, A., & Güvenç, A. (2010). Morphological and anatomical studies on Crataegi folium cum flore which sold in herbalists in Adana and Ankara. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 39(2), 89-111.

www.biodicon.com BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION

ISSN 1308-8084 Online ISSN 1308-5301 Print

Research article/Araştırma makalesi
DOI: 10.46309/biodicon.2023.1187272
16/1 (2023) 23-30

Genetic diversity analysis of different bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes grown in Türkiye

Berru ŞAHİN HÜNDÜREL[1], İsmail POYRAZ[1, 2*], Evren ATMACA[3]
ORCID: 0000-0001-9139-6597**;** 0000-0003-3651-5885**;** 0000-0001-5072-8612

[1] Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 11230, Bilecik, Türkiye
[2] Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 11230, Bilecik, Türkiye
[3] Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Tarla Bitkileri Bölümü, 26080, Eskişehir, Türkiye

Abstract

Phaseolus vulgaris L. (bean), a member of *Fabaceae* (Legumes), is an important agricultural plant that is widely used in Turkey and the world. Breeding studies are carried out to increase productivity in bean production and the genetic diversity analyses of bean genotypes contribute to the selection of suitable parents for these studies. Traditional methods of parent selection are impractical due to long time and labour costs. Molecular methods using DNA-based markers are very successful in determining genetic similarities or differences and are faster and more effective than traditional methods. RAPD (random amplified polymorphic DNA) markers are widely used to determine intraspecies genetic diversity. In this study, thirty-seven bean (*P. vulgaris*) genotypes grown in Turkey and runner beans (*Phaseolus coccineus* L.) were used as the outgroup. Isolated plant DNAs were amplified using the PCR (polymerase chain reaction) method with RAPD markers. PCR band profiles were analysed using Phoretix 1D Pro software. A dendrogram showing genetic diversity among bean genotypes was created using UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) cluster analysis method with MEGA 6.0 software. It was seen that the *P. coccineus* genotype branched separately from other bean genotypes in the dendrogram, and the genetic diversity data obtained by the RAPD-PCR method could be used effectively in bean breeding studies.

Keywords: bean, genetic diversity, RAPD-PCR method, breeding studies

---------- * ----------

Türkiye'de yetiştirilen farklı fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) genotiplerinin genetik çeşitlilik analizi

Özet

Fabaceae (Baklagiller) üyesi olan *Phaseolus vulgaris* L. (fasulye), Türkiye ve dünyada yaygın olarak kullanıma sahip önemli bir tarım bitkisidir. Fasulye üretiminde verimliliği arttırmaya yönelik ıslah çalışmaları yapılmakta ve fasulye genotiplerinin genetik çeşitliliğine yönelik analizler, bu çalışmalar için uygun ebeveynlerin seçimine katkı sağlamaktadır. Ebeveyn seçiminde kullanılan geleneksel yöntemler, uzun zaman ve işçilik maliyetleri nedeniyle pratik değildir. DNA tabanlı markörlerin kullanıldığı moleküler yöntemler, genetik benzerlik ve farkları belirlemede oldukça başarılı olup geleneksel yöntemlere göre daha hızlı ve etkilidirler. RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) markörleri, tür içi genetik çeşitliliği belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye'de yetiştirilen otuz yedi adet fasulye (*P. vulgaris*) genotipi ve dış grup olarak ateş fasulyesi (*Phaseolus coccineus* L.) kullanılmıştır. İzole edilen bitki DNA'ları, RAPD markörleri kullanılarak PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemiyle çoğaltılmıştır. PCR bant profilleri Phoretix 1D Pro yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Fasulye genotipleri arasındaki genetik çeşitliliği gösteren dendrogram, MEGA 6.0 yazılımı ile UPGMA (aritmetik ortalamalı ağırlıksız çift grup yöntemi) kümeleme analiz yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Dendrogramda *P. coccineus* genotipinin diğer fasulye genotiplerinden ayrı olarak dallandığı görülmüş ve RAPD-PCR yöntemiyle elde edilen genetik çeşitlilik verilerinin fasulye ıslah çalışmalarında etkin olarak kullanılabileceği anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: fasulye, genetik çeşitlilik, RAPD-PCR yöntemi, ıslah çalışmaları

[*] *Corresponding author* / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902282141173; Fax.: +92282141162; E-mail: ismail.poyraz@bilecik.edu.tr
© Copyright 2023 by Biological Diversity and Conservation Geliş tarihi: 10.10.2022; Yayın tarihi: 15.04.2023 BioDiCon. 1060-11102022

1. Giriş

Baklagillerden fasulyenin içinde yer aldığı *Phaseolus sp.* cinsi, dünyada 230 tür ile temsil edilirken sadece yirmi tanesi insan beslenmesinde kullanılmakta ve bunların arasında en fazla üretilen türün ise *P. vulgaris* olduğu bilinmektedir[1-3]. Tarımsal amaçlı kültürü yapılan fasulyelerin de %90'ını bu tür oluşturmaktadır [4]. Ekonomik açıdan da oldukça önemli olan fasulye, sağlıklı yaşam ve beslenme için gerekli olan protein, vitamin ve mineralleri içermesi nedeniyle baklagiller arasında öne çıkmaktadır [5-7]. Teknolojinin ilerlemesine bağlı olarak yakın zamanda yapılan genom dizileme çalışmaları, fasulyenin kökeninin Orta Amerika'ya dayandığını göstermiştir [8-9]. Fasulye, muhtemelen Amerika'dan İber yarımadasını geçerek Avrupa'ya ulaşmıştır [10]. Ülkemize 17. yy 'da gelmiş olan fasulye, Türkiye'nin her yerinde yetiştirilebilecek kadar iyi adapte olmuş bir tarım bitkisidir [11-12] Türkiye'de fasulye tarımının diğer yemeklik baklagillerden sonra başladığı ve yaklaşık olarak iki yüz yıl boyunca kültürünün yapıldığı bilinmektedir [13].

Son yıllarda küresel ısınma, iklim değişikliğine bağlı kuraklık, dolu, don vb. küresel sorunların yanında bitkisel hastalıkların yaygınlaşması, tüm tarım ürünlerinde olduğu gibi fasulyede de ciddi verim kayıplarına neden olmaktadır [11]. Tüketici çeşitliliğine bağlı olarak dengeli ve sağlıklı beslenmeye yönelik artan farklı talepler de yeni çeşitlerin geliştirilmesi ihtiyacını doğurmuştur [11]. Bu durum genetik kaynakların önemini ve değerini daha iyi ortaya çıkarmaktadır [14]. Tarım bitkileri arasındaki genetik çeşitliliğin fazla olması, verimi yüksek ve hastalıklara dayanıklı çeşitlerin genetik ıslahı için çok önemlidir [13, 15]. Özellikle uygun ebeveyn seçimi aşamasının moleküler markörlerle desteklendiği çalışmalar (MAS), hem zaman hem de ekonomik olarak önemli avantaja sahiptir [16]. Kullanılan markörler çoğunlukla çeşitli DNA tabanlı markörler olup, bunlar aday ebeveynler arasındaki genetik farklılığın ortaya çıkarılmasını sağlamaktadır. Genetik olarak farklı karakterlere sahip ebeveynlerin belirlenmesi, sayı olarak daha fazla farklı karakterin bir arada ıslahına fırsat oluşturmaktadır [17]. Genetik benzerlik ve farklılıkları ortaya çıkarmada kullanılan DNA tabanlı moleküler markörler, popülasyon genetiği veya türler arası varyasyon gibi farklı kullanım ve amaçlara göre yaygın olarak tercih edilmektedir [18]. Genetik çeşitlilik analizlerinde yaygın olarak kullanılan RAPD-PCR yöntemi, kısa sentetik baz dizilerinin kullanıldığı ve genomda rastgele DNA fragmentlerinin çoğaltımını sağlayan bir tekniktir [19-22]. Az miktarda DNA'nın kullanıldığı bu yöntemde genetik çeşitlilik, farklı uzunluklarda çoğaltılmış DNA parçalarının agaroz jeldeki profil analiziyle belirlenir. Genetik çeşitlilik bilgisi, kısa zamanda ve ekonomik bir şekilde elde edilmektedir [23]. RAPD-PCR gibi DNA polimorfizmine dayanan teknolojiler, yüksek verimli ve kaliteli çeşitlerin ıslahında yaygın ve etkin olarak kullanılmaktadır [17-18, 24-25].

Bu çalışmanın amacı, Türkiye'de yetiştirilen farklı fasulye genotipleri arasındaki genetik çeşitlilik seviyelerini RAPD markörleri ile saptamak ve fasulye ıslah çalışmalarında kullanılacak bir veri oluşturmaktır.

2. Materyal ve yöntem

2.1 Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan 37 farklı fasulye genotipi ve *P. coccineus* türüne ait Ph. Corh genotipi Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir (Tablo 1). Her bir örneğin tarlada sağlıklı yaprak örnekleri toplanıp izolasyon aşamasına kadar -20oC'de muhafaza edilmiştir.

2.2 DNA İzolasyonu

Fasulye genotiplerine ait yaprak örnekleri, porselen havan tokmak yardımıyla sıvı azotta pudra haline gelene kadar öğütülmüştür. Her bir örnekten yaklaşık 20-25 mg alınarak 2 ml'lik eppendorf tüpler içinde klasik CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) yöntemiyle DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir [26]. Steril deiyonize suda çözündürülen DNA örneklerinin miktar ve kalite ölçümleri için nanodrop UV-spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) kullanılmıştır (Tablo 1).

2.3 RAPD-PCR Yöntemi

RAPD-PCR analizi ile fasulye genotipleri arasındaki polimorfizmi belirlemek için DNA dizileri British Colombia Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarından (Kanada) temin edilen farklı RAPD markör primerleri, Sentromer (İstanbul, Türkiye) firmasına sentezletilerek çalışmada kullanılmıştır (Tablo 2). Toplam 12 RAPD primeri ile tüm fasulye genotiplerinde genetik çeşitlilik analizinde kullanılacak nitelikte açık ve tekrarlanabilir bantlar elde edilmiştir.

RAPD-PCR reaksiyonu için 25 µL'lik toplam hacimde: 10 ng kalıp DNA, 1× Taq polimeraz tamponu, 1 U Taq polimeraz enzimi (Solis BioDyne, Estonya), 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP ve 1 µM primer final konsantrasyonları olacak şekilde karışım hazırlanmıştır. Tüm reaksiyonlar eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiş olup ısı döngüleyici cihazında (Thermo Thermal Arktik, ABD): Başlangıç denatürasyonu 1 döngü 95 ºC'de 4 dakika; 40 döngü 94 ºC'de 55 saniye denatürasyon, 30-34 ºC aralığında 60 saniye primer oturma ve 72 ºC'de 90 saniye uzama; 1 döngü 72 ºC'de 7

dakika final uzaması koşullarında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar her bir primer için aynı koşullarda en az iki tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan fasulye genotipleri ve DNA saflık dereceleri

Örnek Adı	Purity-Saflık (260/280 nm)	Örnek Adı	Purity-Saflık (260/280 nm)
1-Akman-98	1.8	20- Emerson	1.8
2- Bulduk	1.9	21- Konya dermasonu/Batallı	2.0
3-Cihan	1.8	22- Cardinal Yozgat barbunyası	2.0
4- Gina	1.8	23- CB-929 Cranberry	1.8
5- Güngör	1.9	24- UI-1140	2.0
6- Karacaşehir-90	2.0	25- Balıkesir barbunyası	2.0
7- Zülbiye	2.0	26- Yalancı dermason (Erzincan)	1.8
8- Novanbey-98	1.8	27- Es-855/4F2834-39	1.8
9- Sururbey	1.8	28- Erzurum Şekeri/4F-2813	2.0
10- 4F-2409	1.9	29- Aslan/Akman-98/Aslan	2.0
11- Akın	1.9	30- 17-SBarBVD-11	1.9
12- Batallı	1.9	31- 17-SBarBVD-12	2.0
13-Muzaffer	2.0	32- 17-SBVD-10	1.9
14-Topçu	1.9	33- 17-SBVD-14	1.9
15- Karaman	2.0	34- 17-SBVD-15	2.0
16- Göynük-98	2.0	35- 17-SBVD-18	2.0
17- İstanbul	1.8	36- 17-SBVD-19	1.9
18- Aslan/Konya Dermasonu	1.8	37- 17-SBVD-20	1.9
19- Aslan/Akman-98	1.8	38- Ph. coc (*P. coccineus*)- Dış Grup	1.9

Tablo 2. Kullanılan RAPD markör primerleri, oturma ısıları, polimorfizm oranları ve PIC değerleri.

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	Primer Isısı (ºC)	Toplam Bant sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm Oranı (%)	PIC Değeri
P5	AACGCGCAAC	32	22	22	100	0.331
P11	GGCCGATGAT	32	23	19	83.0	0.350
P13	ACCGCCTTGT	32	30	30	100	0.274
P14	CAGCACTGAC	32	22	22	100	0.469
P16	TGGTGGCCTT	32	15	14	93.3	0.538
P17	GTAGCACTCC	32	17	16	94.1	0.510
P21	ACGGTGCCTG	34	29	28	96.5	0.307
P23	CGCCCAAGCC	32	16	16	100	0.508
P24	CGCCCTGGTC	34	12	11	91.7	0.481
OPB-17	AGGGAACGAG	33	28	28	100	0.326
OPD-01	ACCGCGAAGG	32	26	26	100	0.392
OPD-07	TTGGCACGGG	38	18	17	97.5	0.563

PCR ürünleri, GeneRuler 100 bp plus DNA ladder (Fermentas, ABD) ile birlikte sırayla ilk 37 *P. vulgaris* genotipi ve ardından dış grup *P. coccineus* türünün PhCorh genotipi, etidium bromide içeren %1,3'lük agaroz jele yüklenmiştir. Agaroz jel, 90V'da 90 dakika yürütülmüş ve Gel Logic 212 Pro (Carestream, ABD) jel dökümantasyon cihazı kullanılarak fotoğraflanmıştır.

2.4 Biyoinformatik Analiz

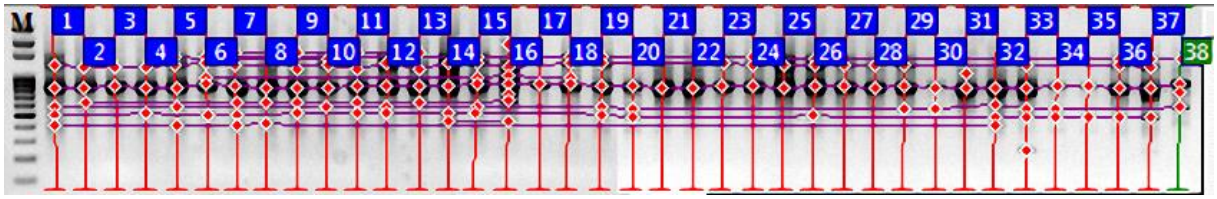
Farklı primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmış her bir fasulye genotipine ait DNA fragmentlerinin agaroz jelde oluşturduğu karakteristik bantlaşma, Phoretix1DPro yazılımı (TotalLab, İngiltere) kullanılarak, var (1) ya da yok (0) ikili matris bilgisi oluşturulmuştur. Her bir primer için polimorfizm bilgi içeriği (PIC) değeri PIC = $2f(1-f)$ formülü (f: allel frekansı) kullanılarak hesaplanmıştır[27]. Örneklere ait ikili matris bilgisi, UPGMA yöntemi kullanılarak

Jaccard benzerlik ve mesafe matrisini elde etmede kullanılmıştır. Jaccard matrisiyle birlikte oluşturulan Newick formatındaki bilgi kullanılarak MEGA 6.0 programı yardımıyla genetik çeşitliliği gösteren dendrogram oluşturulmuştur.

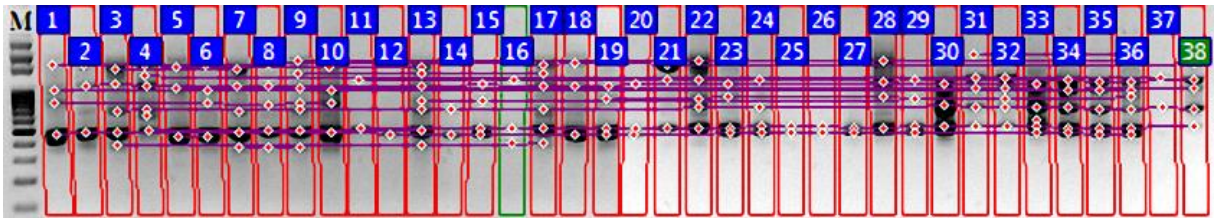
3. Bulgular

3.1 RAPD-PCR

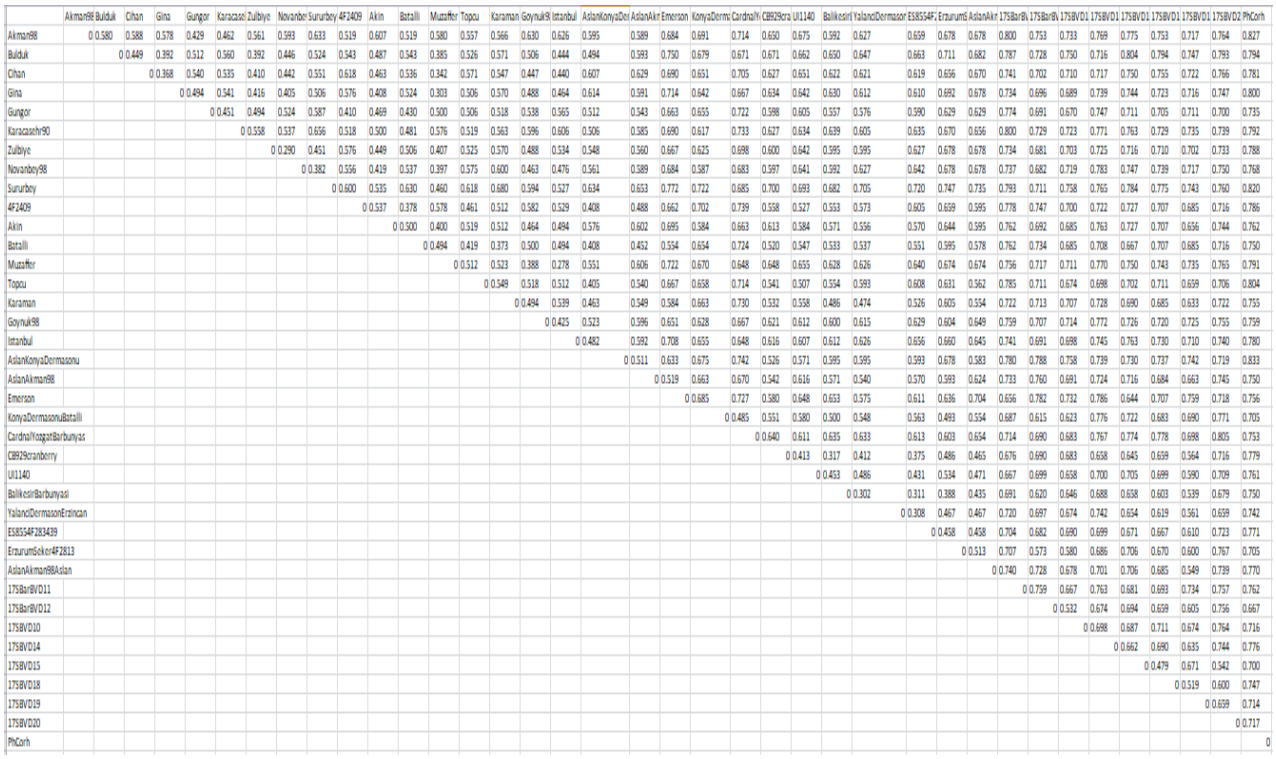
Fasulye genotiplerinin kalıp olarak kullanıldığı ve on iki RAPD markör primerleriyle gerçekleştirilen PCR çoğaltımı sonucunda elde edilen farklı DNA fragmentleri, agaroz jelde yürütülerek fotoğraflanmıştır. Her bir primere ait jel görüntüleri Phoretix1DPro yazılımında analiz edilmiştir. Analizi yapılan primerlerden örnek olarak iki tanesi (RAPD-P16 ve P17) Şekil 1 ve 2'de gösterilmektedir. RAPD markör primerleriyle gerçekleştirilen PCR çoğaltımları sonucunda toplam 247 bant elde edilmiş olup, bunların 240 tanesinin polimorfik olduğu gözlenmiştir. Primerlerin yüksek polimorfizme sahip olduğu ve polimorfizm oranlarının %83.3-%100 arasında değiştiği görülmüştür (Tablo 2).



Şekil 1. RAPD-P17 primeriyle oluşan PCR bant profilleri. M: Markör GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, 1-37: *P. vulgaris* genotipleri, 38: Dış grup *P. coccineus* PhCorh genotipi, ♦: DNA bantları



Şekil 2. OPD-01 primeriyle oluşan PCR bant profilleri. M: Markör GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, 1-37: *P. vulgaris* genotipleri, 38: Dış grup *P. coccineus* PhCorh genotipi, ♦: DNA bantları

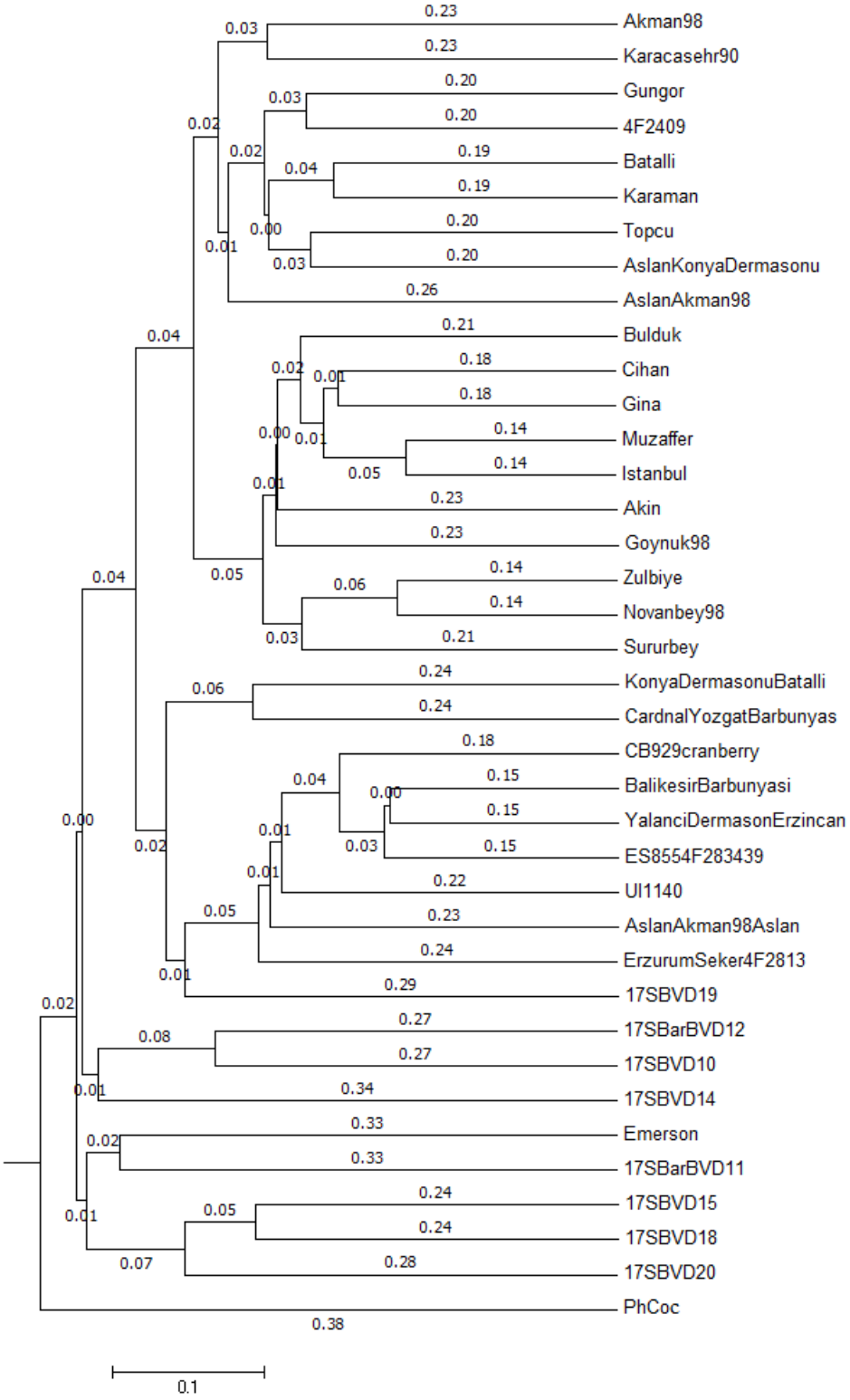


Şekil 3. Fasulye genotiplerinin genetik farklılıklarını gösteren Jaccard mesafe matrisi

3.2 Biyoinformatik Analiz

Phoretix1DPro yazılımıyla fasulye genotiplerinin her birinde bulunan DNA bant profillerine göre ikili veri matrisi oluşturulduktan sonra, karşılaştırmalı analiz için UPGMA yöntemi kullanılmış ve Jaccard benzerlik-mesafe matrisi elde edilmiştir. Bu matris verilerinden Jaccard mesafe matrisi Şekil 3'de gösterilmiştir.

Jaccard matrisi verisiyle birlikte oluşturulan Newick formatındaki bilgi, MEGA 6.0 programı kullanılarak genetik çeşitliliği gösteren dendrograma dönüştürülmüştür (Şekil 4).



Şekil 4. Fasulye fenotiplerinin genetik çeşitliliğini gösteren dendrogram

4. Sonuçlar ve tartışma

Klasik bitki ıslahında işlemler sadece gözlem ve seçim ile yürütüldüğünden dolayı çok uzun zaman ve emek gerektirmektedir. Moleküler tekniklerle desteklenen ıslah çalışmalarında, bitkilere ait genetik yapının ve çeşitliliğin belirlenmesi sayesinde, daha hızlı, güvenilir ve ekonomik melezleme yapılarak yeni çeşitler geliştirilebilmektedir [28-29].

Çeşit geliştirilmede önemli kriterler olan yüksek verim ve hastalıklara karşı direnç gibi özelliklerin bir bitkide toplanabilmesi için birbirine genetik olarak yakın bireylerin çaprazlanması istenmeyen bir durumdur [30]. Aynı gen havuzu içinde yapılan melezlemeler, yeni çeşit elde etmede kullanışsız ve anlamsız olmaktadır [31] Moleküler teknikler yardımıyla kısa sürelerde daha uzak akrabaların belirlenmesiyle yapılan çaprazlamalar sonucunda, farklı karakterlerin ve istenilen özelliklerin bir bitkide toplanma olasılığı da artmaktadır [6, 31].

Genellikle 10 baz uzunluğunda sentetik primerlerin kullanıldığı RAPD-PCR tekniği, canlı genomunda rastgele DNA parçalarının çoğaltıldığı ve parmak izi gibi karakteristik bantların elde edildiği bir tekniktir [19, 32] Bu primerler her iki DNA ipliğine de farklı yönlerde oturarak yaklaşık 0.5–5 kb arasında değişen DNA parçalarının çoğaltımını sağlar [33]. Genetik çeşitlilik, primerlerin bağlanma bölgelerinin çeşitlilik durumu ve buna bağlı olarak oluşan farklı uzunluktaki DNA parçalarının analiziyle gerçekleştirilir [19]. Az miktarda DNA'nın genetik çeşitliliği belirlemede yeterli olması ve düşük maliyeti, bu tekniğin önemli avantajlarıdır [23]. Deneysel bant verileri UPGMA gibi geniş veri setlerinin hızlı analizini sağlayan kümelenme temelli algoritma yöntemiyle genetik çeşitlilik verisine dönüştürülmektedir [4, 34].

Bu çalışmada, ülkemizde tarımı yapılan farklı fasulye genotiplerinden RAPD-PCR tekniği kullanılarak elde edilen bant profilleri, UPGMA yöntemiyle genetik çeşitliliği gösteren bir dendrogram oluşturulmasında kullanılmıştır. Dendrogramda, dış grup olarak çalışmaya dahil edilen Ph. coc. (*P. coccineus*)'un genotipinin diğer 37 *P. vulgaris* genotipinden ayrı olarak dallanma yaptığı görülmektedir (Şekil 4). Kullanılan on iki RAPD markörünün PIC değerleri 0.274-0.563 arasında bulunmuştur (Tablo 2). Bu sonuçlar, RAPD-PCR yönteminin iki ayrı türe ait fasulye genotiplerini ayırma gücüne sahip olduğu göstermektedir. Dış grup haricinde, *P. vulgaris* genotipleri kendi içinde iki ana grupta dallanmaktadır. Ana dallanma grubuna bağlı alt gruplarda tane tipi "horoz" olan; Cihan, Zülbiye, Noyanbey-98, Akın, Muzaffer ve Göynük-98 genotiplerinin tamamının aynı alt grupta dallanma göstermeleri dikkat çekmektedir. Jaccard genetik mesafe verileri incelendiğinde birbirine genetik olarak en uzak *P. vulgaris* genotiplerinin 0.805 mesafeye sahip Cardinal-Yozgat Barbunyası ve 17SBVD20 olduğu belirlenmiştir. Çalışılan genotipler arasında en yakın mesafeli olanların da 0.278 ile Muzaffer ve İstanbul; 0.290 genetik mesafe ile de Zülbiye ve Novanbey98 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3). Cardinal-Yozgat Barbunyasının tane yapısı barbunya olup bakteriyel hastalıklara orta toleranslı olduğu bilinmektedir. 17SBVD20 genotipinin de dermason tane yapısında ve bakteriyel hastalıklara karşı orta toleranslı olduğu [35] göz önüne alındığında, bu iki fasulye genotipinin fenotipik karakterler bakımında da sahip birbirinden farklı oldukları anlaşılmaktadır. Horoz tane yapısına sahip oldukları bilinen Zülbiye ve Novanbey98 genotiplerinden Zülbiye'nin Novanbey98'e göre bakteriyel hastalıklara karşı daha hassas olduğu bilinmektedir. Dendrogramda genetik olarak en yakın mesafeye sahip iki genotipten taze fasulye tipinde olan İstanbul'un hassas oluğu, horoz tane yapısına sahip Muzaffer çeşidinin ise orta hassasiyete sahip olduğu rapor edilmiştir [36]. Tüm genom düzeyinde karşılaştırma yapan dominant RAPD markörleriyle oluşturulan dendrogramda, birbirine yakın dallanan iki fasulye genotipinin bakteriyel hastalıklara hassasiyetlerinin yakın olmasına rağmen, tane yapısı bakımından benzer olmadıkları görülmektedir. Dendrogramda melez hatlar olarak bulunan genotiplerin diğer genotiplerden ayrı gruplarda dallanma yaptığı gözlenmektedir. Özellikle 17-SBarBVD-11, 17-SBVD-15, 17-SBVD-18 ve 17-SBVD-20 genotiplerinin Emerson genotipi ile bir arada bulunduğu grup dikkat çekmektedir. 17-SBarBVD-12, 17-SBVD-10 ve 17-SBVD-14 genotiplerinin de diğer fasulye genotiplerinden ayrı dallanma grubu oluşturdukları gözlenmiştir. Bu gruplardaki fasulye genotiplerinin ağırlıklı olarak dermason tane yapısına sahip oldukları göz önüne alındığında [35], barbunya tane yapısına sahip 17-SBarBVD-11 ve 17-SBarBVD-12 dışında, fenotipe yansıyan tane yapısı karakterine göre RAPD markörlerinin genetik çeşitlilik ağacı oluşturmada etkili bir ayırım gücüne sahip olduğu tespit edilmiştir.

Türkiye'de fasulye genotiplerinin karakterizasyonu ile ilgili 1998'den 2017 yılına kadar yapılmış çalışmaların % 42,4'ünün morfolojik, % 21,2'sinin morfolojik+fenolojik, %18,2'sinin moleküler, %15,2'sinin moleküler+morfolojik ve % 3'ünün de sadece fenolojik çalışmaları içerdiği rapor edilmiştir [11]. 2016 yılında Türkiye'nin farklı bölgelerinden belirlenen ümit-var 34 çeşit adayı fasulye genotipi ile üç ticari çeşit'in ISSR tekniği ile genetik benzerlik analizi yapılmış ve kullanılan primerlerin yüksek polimorfizm oranına sahip olduğu bildirilmiştir [11]. Erdinç ve ark. tarafından 2017 yılında Türkiye'nin farklı bölgelerine ait 123 fasulye genotipinde sadece antraknoza direnci tespit etme amacıyla SCAR ve RAPD markörlerinin kullanıldığı, ancak genetik çeşitlilik analizinin yapılmadığı görülmüştür [37]. 2020 yılında Erzincan ilinde yaygın olarak yetiştirilen 71 fasulye genotipi (41 barbunya ve 30 taze fasulye genotipi) ve dört ticari çeşit (Aleyna, Gina, Perolar ve Serra) arasındaki genetik çeşitliliği araştırmak için iPBS (primerler arası bağlanma bölgesi) markörleri kullanılmış ve PIC değerleri 0,19-0,42 arasında değişen markörlerin yüksek polimorfizme sahip olduğu bildirilmiştir. iPBS markörlerinin kullanıldığı çalışmada barbunya ve taze fasulye genotiplerinin dendrogramda farklı kümeler halinde dallanma gösterdiği rapor edilmiştir [38]. Çalışmamızda kullanılan RAPD markör primerleriyle oluşturulan dendrogramdaki dermason ve barbunya genotip ayrımının, iPBS markörleriyle oluşturulan

dendrogramdaki barbunya ve taze fasulye genotipleri için rapor edilen ayrı dallanma profili gibi ayırıcı nitelikte olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada elde edilen genetik çeşitlilik analiz verilerine dayalı fasulye genotip ayırım sonuçlarının, bilinen fenotipik özelliklere göre kıyaslandığında büyük oranda paralellik gösterdiği, ancak tam olarak örtüşme sağlamadığı görülmüştür. iPBS yöntemiyle karşılaştırıldığında primerlerin yakın aralıklarda PIC değerlerine sahip olmaları dikkat çekmektedir. Aynı koşulların sağlandığı tekrarlanabilir sonuçlara sahip RAPD markör verilerinin, tüm genom düzeyinde karşılaştırma yapmasına bağlı olarak, markör destekli fasulye ıslahı çalışmalarında kullanışlı olduğu anlaşılmaktadır.

Teşekkür

Çalışma materyali temininde desteğinden dolayı Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

[1] Madakbaş S.Y. & Ergin, M. (2011). Morphological and phenological characterization of Turkish bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes and their present variation states. *African Journal of Agricultural Research*, 6(28), 6155-6166.114. https://doi.org/10.5897/AJAR11.1361

[2] Górna, B., Szpakowska, M., JNowak, J., & Hołubowicz, R. (2016). Selected breeding characters and seed protein content of adzuki bean (*Phaseolus angularis* W.H. White) grown in central Europe. *Acta Agroph*., 23(4), 569-582.

[3] Dupliak O., Barban O., & Pysarets M. (2021). Inheritance of the performance and its constituents by common bean (*Phaseolus vulgaris* l.) hybrids and lines. *Селекціяі насінництво*, 15-21.

[4] Gepts P. (2001). The Encyclopedia of Life-Supporting Systems. In Tolba M.K. (eds.), Origins of plant agriculture and major crop plants in our fragile world (1st ed., pp. 629–637). Oxford, UK: EOLSS Publishers.

[5] Kaçar, O., Çakmak, F., Çöplü, N., & Azkan, N. (2004). Bursa koşullarında bazı kuru fasulye çeşitlerinde (*Phaseolus vulgaris* L.) bakteri aşılama ve değişik azot dozlarının verim ve verim unsurları üzerine etkisinin belirlenmesi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18 (1), 207-218.

[6] Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P., & Dinelli G. (2006). Characterization of some Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces by RAPD, semi-random and ISSR molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54 (1), 175-188.

[7] Ekincialp, A., & Şensoy, S. (2018). Phenotypic and molecular determination of anthracnose disease resistance in Lake Van Basin's bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.). *Legume Research*, 41(1), 135-142.

[8] Rossi, M., Bitocchi, E., Bellucci, E., Nanni, L., Rau, D., Attene, G., & Papa, R. (2009). Linkage disequilibrium and population structure in wild and domesticated populations of *Phaseolus vulgaris* L. *Evol. Appl*., *2*, 504–522.

[9] Bitocchi, E., Nanni, L., Belluci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P.S., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., & Attene, G.; et al. (2012). Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 109, 788–796.

[10] Ortwin-Sauer, C. (1966). The Early Spanish Man; University of California Press: Berkeley/Los Angeles, CA, USA. Kluwer Academic Publishers, 51–298.

[11] Karataş, A., Büyükdinç, D.T., İpek, A., Yağcıoğlu, M., Sönmez, K.& Ellialtıoğlu, Ş.Ş. (2017). Türkiye'de fasulyede yapılan morfolojik ve moleküler karakterizasyon çalışmaları. *Turkish Journal of Scientific Reviews*, 10 (1): 16-27.

[12] Poyraz, İ. , Şahin, B. & Atmaca, E. (2017). Detection of ten resistance genes against *P. syringae* pv. *phaseolicola* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* in twelve local bean varieties using scar markers. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 7 (2), 241-248.

[13] Veloso, J.S., Silva, W., Pinheiro, L.R., Dos Santos, J.B., Fonseca Jr, N.S., & Euzebio., M.P. et al. (2015). Genetic divergence of common bean cultivars is revealed by sequence data. *Genet. Mol. Res.*, 14 (3), 11281-11291.

[14] Galvan, M.Z., Menendez-Sevillano, M.C., De Ron, A.M., Santalla, M., & Balatti, P.A. (2006). Genetic diversity among wild common beans from Northwestern Argentina based on morphoagronomic and RAPD data. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 891-900.

[15] Singh, A., Dikshit, H.K., Mishra, G.P., Aski, M., Kumar, S., & Sarker, A. (2022). Breeding for abiotic stress tolerance in lentil in genomic era. In: Kole, C. (eds). Genomic Designing for Abiotic Stress Resistant Pulse Crops. Springer Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-91039-6_5

[16] Wu, Y.P., Chang, Y.C., Kuo, H.I., Lin, B.N., Wang, S.M., & Tseng, Y.C. (2022). The development of two high-yield and high-quality functional rice cultivars using marker-assisted selection and conventional breeding methods. *Int. J. Mol. Sci*., 23, 4678. https://doi.org/10.3390/ijms23094678

[17] Bilgin, O., & Korkut, K.Z. (2005). Bazı ekmeklik buğday çeşit ve hatlarının tane verimi ve bazı fenolojik özelliklerinin belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2(1), 5765.

[18] Madakbaş, S.Y., Hız M.C., Gültekin, Y. & Sayar, M.T. (2016). Genetic characterization of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions from Turkey with SCAR and SSR markers. *Biochem. Genet.*, 54: 495-505.

[19] Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., & Tingey, S.V. (1990). DNA polimorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res*., 18, 6531-6535.

[20] Poyraz, İ. E. , Sözen, E. , Ataşlar, E. & Poyraz, İ. (2012). Determination of genetic relationships among *Velezia* L. *Caryophyllaceae*) species using RAPD markers. *Turkish Journal of Biology*, 36 (3), 293-302.

[21] Sözen, E. & Yücel, E. (2015). Determination of genetic relationships between some endemic *Salvia* species using RAPD markers. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 8 (3), 248-253.

[22] Hasanah, Y., Mawarni, L., Hanum, H., & Lestami, A. (2022). Genetic diversity of shallots (*Allium ascalonicum* L.) from several locations in North Sumatra, Indonesia based on RAPD markers. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. https://doi.org/10.13057/biodiv%2Fd230518

[23] Chen, J., Zhao, J.T., Erickson, D.L., Xia, N.H., & Kress, W.J. (2015). Testing DNA barcodes in closely related species of Curcuma (*Zingiberaceae*) from Myanmar and China. *Molecular Ecology Resources*, 15, 337–348.

[24] Amiteye, S. (2021). Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, 7 (10), https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08093

[25] Al-Khayri, J.M., Mahdy, E.M.B., Taha, H.S.A., Eldomiaty, A.S., Abd-Elfattah, M.A.; Abdel Latef, A.A.H., Rezk, A.A., Shehata, W.F., Almaghasla, M.I., Shalaby, T.A., et al. (2022). Genetic and morphological diversity assessment of five kalanchoe genotypes by SCoT, ISSR and RAPD-PCR markers. *Plants*, 11, 1722. https://doi.org/10.3390/plants11131722

[26] Doyle, J.J., & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19, 11-15.

[27] De Riek, J., Calsyn, E., Everaert, I., Van Bockstaele, E., & De Loose, M. (2001). AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(8), 1254-1265.

[28] Pandurangan, S., Workman, C., Nilsen, K., & Kumar, S. (2022). Introduction to marker-assisted selection in wheat breeding. In Accelerated Breeding of Cereal Crops (pp. 77-117). New York, NY: Humana.

[29] Rani, M., Jinda, S.K., Vikal, Y., & Meena, O.P. (2021). Genetic male sterility breeding in heat tolerant bell pepper: Introgression of ms10 gene from hot pepper through marker-assisted backcrossing. *Scientia Horticulturae*, 285, 110172. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110172.

[30] Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J., & Owen, J.L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genetics*, 89, 998-1006.

[31] Papan, P., Chueakhunthod, W., Jinagool, W., Tharapreuksapong, A., Masari, A., Kaewkasi, C., Ngampongsai, S., Girdthai, T., & Tantasawat, P. (2021). Improvement of Cercospora leaf spot and powdery mildew resistance of mungbean variety KING through marker-assisted selection. *The Journal of Agricultural Science*, 159 (9-10), 676-687. https://doi:10.1017/S0021859621000976

[32] Nasution, F., Theanhom, A.A., Sukartini, Bhuyar, P., & Chumpookam, J. (2021). Genetic diversity evaluation in wild *Muntingia calabura* L. based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Gene Reports*, 25, 10133, http://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101335

[33] Soufy, H., Laila, A.M., & Iman, M.K.A. (2021). Application of RAPD-PCR for DNA-fingerprinting of Egyptian Tilapia. *New Visions in Science and Technology*, 1, 58-63, https://doi.org/10.9734/bpi/nvst/v1/10607D

[34] Videla, M.E., Iglesias, J., & Bruno, C. (2021). Relative performance of cluster algorithms and validation indices in maize genome-wide structure patterns. *Euphytica*, 217, 195, https://doi.org/10.1007/s10681-021-02926-5

[35] Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü 2017 Yılı Gelişme Raporu. (2018). Eskişehir, Türkiye: Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü.

[36] Tarım ve Orman Bakanlığı Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü Yemeklik Tane Baklagiller Tescil raporu. (2017). https://www.tarimorman.gov.tr/BUGEM/TTSM/Belgeler/Yay%C4%B1nlar/2017%20Faliyet/Yemeklik%20Tane%20Bklagiller%202017%20Tescil%20Raporu.pdf

[37] Erdinç, C., Turkmen, O., Demir, S., & Sensoy, S. (2017). Determination of the anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. and Magn.) Lambs. Scrib.) resistance in some Turkish bean genotypes by artificial inoculation and molecular methods. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 27(1), 175-185.

[38] Öztürk, H.İ., Dursun, A., Hosseinpour, A., & Haliloğlu, K. (2020). Genetic diversity of pinto and fresh bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm collected from Erzincan province of Turkey by inter-primer binding site (ipbs) retrotransposon markers. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 44 (4), 417-427.

www.biodicon.com BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION

ISSN 1308-8084 Online ISSN 1308-5301 Print

Research article/Araştırma makalesi
DOI: 10.46309/biodicon.2022.1201564
16/1 (2023) 31-37

Determination of genetic structure of Bald ibis population living in Birecik (Türkiye) using mtDNA COI sequences

Arif PARMAKSIZ [*1], Akin YİĞİN[2], Faruk BOZKAYA[2]
ORCID: 0000-0003-0321-8198**;** 0000-0001-9758-1697; 0000-0001-6423-8067

[1]Harran University, Faculty of Science-Literature, Department of Biology, 63100 Şanlıurfa, Türkiye
[2]Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Genetics, 63100 Şanlıurfa, Türkiye

Abstract

The rapid increase in the human population causes the expansion of urbanization and the need for food to increase day by day. As these needs lead to the formation of many agricultural activities, they change the habitats of natural and native species. Since this habitat change causes a decrease in the feeding and breeding areas of especially sensitive species, it may lead to the decrease or even extinction of the populations of these species. The endangered bald ibis (*Geronticus eremita*), bird species living in Birecik district, is one of the sensitive species and has been taken under protection in recent years. The endangered bald ibis (*Geronticus eremita*) bird species living in Birecik district in recent years is one of the sensitive species and has been taken under protection. The aim of this study is to perform genetic analysis of the genetic structure of the protected individuals, which live in Birecik, based on the mtDNA COI region. DNA was isolated from the feathers of these individuals, and the target mtDNA COI gene region was amplified by using the total DNAs obtained. Then, the genetic structure was determined by sequence analysis, and the analyzes were made by comparing them with the sequences in the gene bank. No variation was detected in the mtDNA COI gene region of all studied individuals. Comparisons were made with the sequences in the gene bank, a phylogenetic tree was drawn, and haplotypes were evaluated by comparing the results.

Key words: Bald ibis, genetic variation, *Geronticus eremita*, conservation, mtDNA COI

---------- * ----------

Birecik (Türkiye)'te yaşayan Kelaynak popülasyonunun genetik yapısının mtDNA COI dizileri kullanılarak belirlenmesi

Özet

İnsan nüfusunun hızla artması şehirleşmenin genişlemesine ve gıdaya olan ihtiyacın gün geçtikçe artmasına neden olmaktadır. Bu ihtiyaçlar birçok tarımsal faaliyetin oluşmasına yol açtığı için doğal ve yerli türlerin habitatlarını değiştirmektedir. Bu habitat değişimi özellikle hassas türlerin beslenme ve üreme alanlarının azalmasına neden olduğu için bu türlere ait popülasyonların azalmasına hatta yok olmasına neden olabilmektedir. Son yıllarda Birecik ilçesinde yaşayan ve nesli tehlike altında olan Kelaynak (*Geronticus eremita*) kuş türü hassas türlerden biri olup, koruma altına alınmıştır. Bu çalışmanın amacı, Birecik'te yaşayan ve koruma altına alınan bireylerin oluşturduğu popülasyona ait genetik yapının mtDNA COI bölgesine dayalı genetik analizinin yapılmasıdır. Bu bireylere ait tüylerden DNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen total DNA'lar kullanılarak hedef mtDNA COI gen bölgesi çoğaltılmıştır. Daha sonra dizi analizleri yapılarak genetik yapı belirlenmiş ve gen bankasındaki sekanslar ile karşılaştırılarak analizler yapılmıştır. Çalışılan tüm bireylerin mtDNA COI gen bölgesine ait herhangi bir varyasyon tespit edilmemiştir. Gen bankasındaki dizilerle karşılaştırma yapılmış, filogenetik ağaç çizilmiş ve sonuçlar karşılaştırılarak haplotipler değerlendirilmiştir.

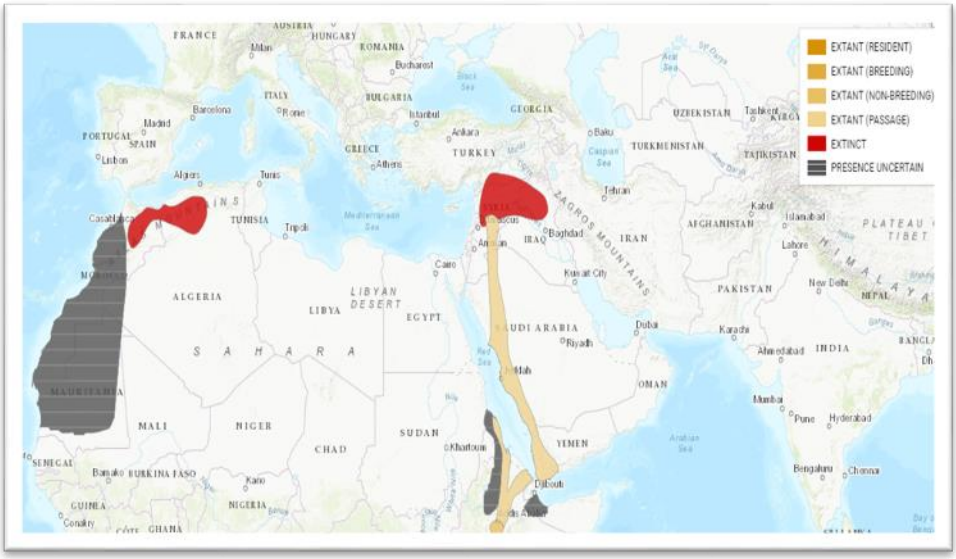
Anahtar kelimeler: kelaynak, genetik varyasyon, *Geronticus eremita*, koruma, mtDNA COI

[*] *Corresponding author* / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +904143183562; Fax.: +904143183541; E-mail: aprmksz@gmail.com
© Copyright 2023 by Biological Diversity and Conservation Geliş tarihi: 09.11.2022; Yayın tarihi: 15.04.2023 BioDiCon. 1033-091122

1. Giriş

Biyoçeşitlilik; genlerden popülasyonlara, türlere, işlevlere ve ekosistemlere kadar dünya üzerindeki tüm yaşamın çeşitliliği olup, günümüzde bir milyondan fazla tür yok olma tehlikesi altındadır ve bu yüzden biyoçeşitliliğin korunmasını en üst düzeye çıkaran koruma politikalarına acil ihtiyaç bulunmaktadır [1]. Hızla büyüyen insan popülasyonlarının beslenme, barınma ve enerji elde etme gibi birçok ihtiyaçlardan dolayı, dünyadaki ekosistemler ve içerdikleri canlı türleri üzerinde muazzam bir baskı oluşturmaya devam etmektedir. Bu baskılara maruz kalan türlerin sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Özellikle hassas türlere ait popülasyonlar hızlı bir şekilde küçülmekte ve bu türler büyük bir tehdit ile karşı karşıya kalmaktadır. Bu yüzden bazı hassas türler için acil önlemlerin alınması ve tür eylem planlarının gerçekleştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Günümüzde dünyadaki kuş popülasyonlarının yaklaşık %40'ı, çoğunlukla tarım, avcılık, istilacı türler ve iklim değişikliği nedeniyle tehdit altındadır [2,3] ve bu durum yeni koruma programlarının oluşturulması ve mevcut korumayı iyileştirme ihtiyacını vurgulamaktadır. Bu kuş türlerden biri olan Kelaynaklar (Northern bald ibis, *Geronticus eremita*) için koruma çalışmaları yapılmakta olup neslin devamlılığı için planlamalar gerçekleştirilmektedir. Göçmen bir kuş türü olan Kelaynak bir zamanlar Orta Doğu ve Kuzey Afrika'ya yayılmıştır [4]. IUCN tarafından küresel olarak kritik tehlike altındaki (CR) türler arasında listelenmiş olmasına rağmen; 2018'de nesli tükenmekte olan (EN) türler şeklinde değişmiştir [5,6]. Doğada serbest olarak yaşayanlarının sayısı 1000'den az olup farklı hayvanat bahçelerinde ve istasyonlarda bulunan kelaynaklar Fas kökenlidir [5,6]. Kuzey Afrika'da (Fas) Atlantik Okyanusu kıyılarında yaşayan kuzey kelaynak popülasyonu en büyüğüdür [7,8]. Bu türe ait yaşam ve yayılışının güncel durumu IUCN web sitesinde bulunmakta olup Şekil 1'de görülmektedir.



Şekil 1. Kelaynak dünyadaki yaşam durumu (https://www.iucnredlist.org/species/22697488/130895601)

Türkiye'deki kelaynak popülasyonu, Fas'ta bulunan kelaynak kuşlarından sonraki ikinci büyük popülasyon olup sadece Şanlıurfa'nın Birecik ilçesinde yaşamaktadır [6,9]. Sayılarının azalması nedeniyle göç etmelerine izin verilmeyen kelaynaklar üreme döneminin başında kafeslerden doğaya salınır ve üremelerini tabiatta doğal olarak gerçekleştirdikten sonra yeniden kafeslere alınarak uzun yıllardan bir sonraki üreme dönemine kadar bu kafeslerde tutulmaktadır [9]. Özellikle bu türün soyunun tükenmesinin temel nedenleri çoğunlukla insan kaynaklı tehditler olup, başlıca aşırı avlanma ve habitat kaybının olmasıdır [10,11]. Habitatların yok olması veya değişmesi popülasyondaki birey sayısının azalmasına neden olabilmektedir. Diğer taraftan sayıları azalan kelaynaklar enfeksiyon hastalıkları tarafından da tehdit edilmektedir [12]. Doğal olarak yaşamakta olan popülasyonların küçülmesi, bireylerin ortadan kaybolması gibi bazı nedenler benzersiz olan bazı genotiplerin tükenmesine yol açabilir [13]. Genetik bir bilgi kaybolduğu zaman onu geri getirmek neredeyse imkânsızdır [13]. Bu yüzden öncelikle genetik kaybın durdurulması ve hedef türün geleceği için gerekli önlemlerin alınması önem arz etmektedir. Etkin bir şekilde koruma programlarının yapılması için öncelikle popülasyon veya popülasyonların genetik özelliklerine ait verilerin elde edilmesi gerekmektedir.

Popülasyonların devamlılığı ve nesli tükenmekte olan türlerin korunmasında genetik çeşitlilik veya polimorfizm önemli katkıda bulunmaktadır [14]. Birçok türün düşük genetik çeşitlilik seviyeleri, üreme başarısının azalmasıyla, bulaşıcı hastalıklara karşı artan duyarlılık ve çevresel zorluklara uyum sağlama zorluğu ile ilişkilendirilmiştir [15,16]. Bu nedenle koruma çalışmalarında popülasyonun devamlılığının sağlanması için genetik çeşitlilik seviyesinin maksimum olması hedeflenmektedir. Genetik çeşitliliğin, artan tehditler altında tür çeşitliliğinden daha hızlı azaldığı tahmin edilmekte ancak mekânsal dağılımı küresel ölçekte yeterince belgelenmemiş durumdadır

[17]. Genetik çeşitlilik, türlerin veya popülasyonların, değişen çevre şartlarına uyum sağlama yeteneğini doğrudan yansıtır [18,19]. Bir türün hem korunması hem de yönetimi için popülasyona ait genetik analizlerin yapılması oldukça etkili bir araçtır [20,21]. Bu araştırmalar için DNA'ya dayalı birçok genetik marker bulunmakta olup, günümüzde sekans tekniklerindeki gelişmeler mtDNA çalışmalarını ön plana getirmiş durumdadır [22]. Yaygın olarak kullanılan mtDNA, önemli bir moleküler marker olup çoğu organizmanın genetik özelliklerini bulmak amacıyla kullanılmaktadır [23].

Bu çalışmada, nesli tükenmekte olan *Geronticus eremita* türünün Birecik'te yaşayan popülasyonunun mtDNA COI bölgesi dizi analizleri yapılarak genetik çeşitliliği belirlenmiş ve gen bankasındaki sekanslar ile karşılaştırılarak analizler yapılmıştır.

2. Materyal ve yöntem

Bu çalışma, Türkiye Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nün (Onay No: 198150/2015) izni ve desteği ile gerçekleştirilmiştir. Şanlıurfa ili Birecik ilçesindeki (37.01.29 N:37.58.38 D) Kelaynak yetiştirme istasyonunda koruma altında yetiştirilen kelaynaklardan (Şekil 2) rastgele seçilen 11 tanesinin kanat veya kuyruklarından alınan tüy örneklerinden DNA izolasyonu Potasyum Asetat kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

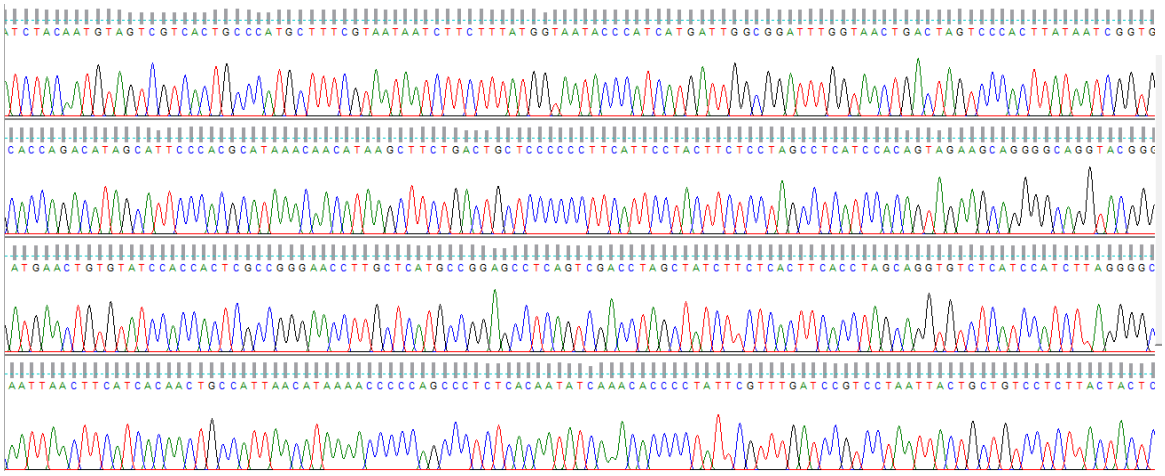
Şekil 2. Birecik'te Kelaynak yetiştirme istasyonunda yarı serbest olarak yetiştirilen kelaynaklar

İzole edilen DNA'lar mtDNA COI gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılmıştır. Kullanılan primer, Folmer [24] çalışmasından alınmıştır ve dizileri şöyledir; LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'), HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), BIO-RAD T100TM Termal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplamda 35 döngü olacak şekilde çalıştırılmıştır. İlk denatürasyon 95°C'de 3 dakika, denatürasyon 95°C'de 30 saniye, bağlanma 48°C'de 45 saniye ve uzama 72°C'de 45 saniye olacak şekilde ayarlanmıştır. Örnekler daha sonra 72°C'de 10 dakika tutularak işlem sonlandırılmıştır. Bu bölgenin amplifikasyonu için kullanılan PZR karışımı 13.9 µl dH2O, 1x PZR tamponu, 2.5mM MgCl2, 0.2 mM dNTP'ler, 1 µl 0.5 mM primer (F+R), 0.1 µl Taq polimeraz ve 50 ng/µl total DNA'dan oluşmuştur. PZR sonrası oluşan ürünleri kontrol etmek için %2 agaroz jel kullanılmıştır. SYBR Green eklenmiş 0.5x TBE (Tris/Borik asit/EDTA Tamponu) ile hazırlanmış agaroz jele PZR ürünleri yüklenmiş ve 100 V'de 30 dakika yürütülmüştür. Daha sonra ultraviyole ışık altında ürünler görüntülenmiştir. Hedef PZR ürünleri ticari bir firmaya gönderilmiş ve 3500 XL Genetic

Analyzer (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak dizi analizi yapılmıştır. Ham sekans verileri FinchTV programı kullanılarak FASTA formatına dönüştürülmüştür. Elde edilen diziler ile benzer baz dizileri BLAST programı (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) yardımıyla taranmış yüksek düzeyde benzerlik gösteren baz dizileri filogenetik analizler için kullanılmıştır. Filogenetik analizler MEGA5 programı yardımıyla yapılmıştır. Analize dahil edilen baz dizileri arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde en yüksek olasılık yöntemi ve Jukes-Cantor modeli kullanılmıştır. Ağaç kolları (Nodların) güvenirliğinin test edilmesinde Bootstrap testi (500 tekrarlı) kullanılmıştır.

3. Bulgular

Rastgele seçilmiş olan toplam 11 *G. eremita* örneğinde ortalama 604 bç'lik mtDNA COI bölgesi dizi analizi yapılmıştır. Bu analize ait bir bireyin FinchTV programına ait kromatogram görüntüsü Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. mtDNA COI bölgesine ait örnek bir dizi analizinin kromatogram görüntüsü

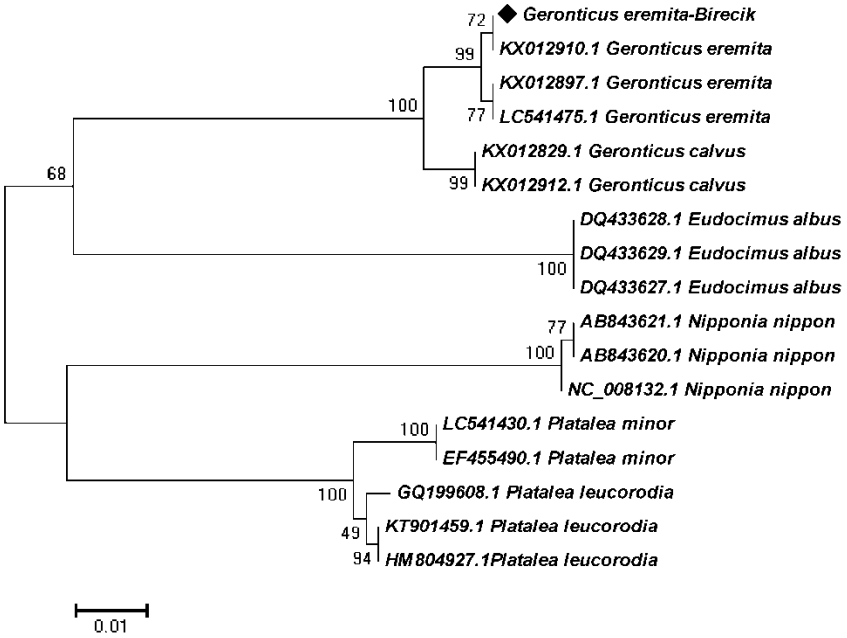
Bireylere ait dizilerde bir farklılık görülmemiştir ve tüm bireylere ait dizilerin tamamen aynı haplotipe sahip olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen haplotipin baz dizisi OP740519 kayıt numarası ile gen bankasına yüklenmiştir.

Gen bankasında BLAST tekniği uygulanarak *Geronticus* cinsine ait türlerin benzer sekansları tespit edilmiş ve bu çalışmada elde edilen sekanslarla karşılaştırılmıştır. Bu diziler arasındaki benzerlik oranları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Bu çalışmada mtDNA COI geninde tespit edilen haplotip ile (OP740519) NCBI veri tabanındaki haplotiplerin baz dizileri arasındaki benzerilik ve örtüşme oranları oranları

Tür adı	**Erişim Numarası**	Benzerlik	Örtüşme Oranı
Geronticus eremita	KX012910.1	100	100
Geronticus eremita	KX012897.1	99.67	100
Geronticus eremita	LC541475.1	99.67	100
Geronticus calvus	KX012829.1	98.48	97
Geronticus calvus	KX012912.1	98.47	97
Platalea leucorodia	GQ199608.1	89.88	99
Platalea leucorodia	KT901459.1	89.72	99
Platalea leucorodia	HM804927.1	89.78	98
Platalea minor	LC541430.1	89.72	98
Platalea minor	EF455490.1	89.72	99
Eudocimus albus	DQ433629.1	89.37	99
Eudocimus albus	DQ433628.1	89.37	99
Eudocimus albus	DQ433627.1	89.37	99
Nipponia nippon	NC 008132.1	87.60	98
Nipponia nippon	AB843621.1	87.44	98
Nipponia nippon	AB843620.1	87.44	98

Gen bankasında BLAST programı ile yapılan taramada hedef bölgede iki farklı haplotipin bulunduğu tespit edilmiştir. Sunulan çalışmada tespit edilen baz dizisi Afrika kökenli kelaynaklarda tespit edilen KX012910 erişim numaralı haplotiple aynı dizilime sahiptir. Diğer taraftan sunulan çalışmadaki haplotipin KX012897 ve LC541475 erişim numaralı haplotiplerdenfarklı olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada tespit edilen baz dizisi ile diğer ibis türlerine ait diziler arasındaki benzerlik oranı %87.44 ile %98.48 arasında değişmektedir.



Şekil 4. mtDNA COI sekanslarına dayalı *Geronticus* cinsine ait En Yüksek Olasılık yöntemine göre oluşturulmuş ağaç modeli. ◆Birecik Kelaynak Popülasyonunda tespit edilen baz dizisi

Şekil 4'te mtDNA COI bölgesine dayalı En Yüksek Olasılık yöntemine göre *G. eramita* ve *G. calvus* türlerinin gen bankasından alınan dizileri ile filogenetik ağaç oluşturulmuş ve bu çalışmada tespit edilen haplotipin diğer kelaynak haplotipleri ile aynı dal üzerinde yerleştiği görülmüştür. Filogenetik ağaç üzerinde *Geronticus eremita, Geronticus calvus* ve *Eudocimus albus*'a ait baz dizileri aynı grupta yer alırken, *Nipponia nippon*, *Platalea minör* ve *Platalea leucorodia* dizileri bir grupta yer almıştır. *Geronticus eremita* ile en yüksek benzerlik *Geronticus calvus* türünde gözlenmiştir.

4. Sonuçlar ve tartışma

Birecik'te yaşayan ve rastgele seçilen *G. eremita* örneklerinde ortalama 604 bç'lik mtDNA COI bölgesi ilk kez bu çalışmada dizi analizi yapılarak gen bankasındaki dizilerle karşılaştırılmıştır. Bulgular Afrika kökenli olan *G. eremita* mtDNA-COI dizilerinin Türkiye kökenli olanlarla hem benzer hem de farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Pegoraro [25] cyt b gen bölgesi üzerinde yaptıkları dizi analizlerinde her iki popülasyonun farklı haplotiplere sahip olduğu gözlemlemiştir. Pegoraro [25] cyt b genindeki nokta mutasyonunun, batı ve doğu popülasyonunda son birkaç bin yılda ayrı ayrı gelişmiş olup bölünme iklim sırasında meydana gelmiş insan yapımı çevresel değişiklikler sonucu olabileceğini bildirmiştir [25]. Ancak bizim çalışmamızda Türkiye'deki kelaynaklarda tespit edilen haplotipin Afrika kökenli kelaynaklarda da bulunması farklılığın göç ve popülasyon büyüklüğündeki azalma gibi popülasyon dinamiklerinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Sunulan çalışmaya 11 adet bireye ait DNA örnekleri kullanılmıştır. Birecik'te yaşayan ve koruma altına alınan tüm kelaynakların çalışmaya dahil edilmesi ve genoma ait daha ayrıntılı çalışmaların özellikle mtDNA d loop ve mikrosatellit markörleri kullanılarak analizlerin yapılması başka farklılıkların belirlenmesini sağlayabilir. Çünkü Birecik popülasyonunun genetik çalışmaları popülasyon düzeyinde yetersiz kalmakta ve popülasyon devamı için bu çalışmaların devamının yapılması gerekmektedir.

Geronticus eremita ve *Geronticus calvus* aynı cinste sınıflandırıldıklarından bu iki türün diğer kelaynak türlerinden daha yüksek düzeyde benzerlik göstermesi beklenen bir durumdur. Sunulan çalışmanın bulguları ile benzer şekilde Pegoraro ve ark [26] 16S RNA ve cyt-b genlerinin baz dizilerini kullanarak yaptıkları çalışmada bu iki tür arasındaki yakın akrabalığı göstermişlerdir.

Kılıç ve Uysal [9] çalışmasında; Birecik'te yaşayan, markalanan ve takip altında olan kelaynakların bir kısmının ölüm, kaçma veya kaybolma nedeniyle yok olduğu ve muhtemelen Suriye ve diğer Ortadoğu ülkelerinde görülen kelaynakların bir kısmının Birecik'ten göç eden bireyler olduğu ifade edilmiştir. Bunun tespit edilmesi için yüksek düzeyde polimorfizm gösteren genetik markörler kullanılması gerekmektedir. Aynı şekilde başka yerde yaşayıp Birecik'e göç eden bireyler de bu yöntem kullanılarak tespit edilebilir. Örneğin, Boev [27] ilk kez bir kelaynak bireyinin Bulgaristan'da tespit edildiğini ortaya çıkarmışlardır. Bu bireyin hangi popülasyona ait olduğu yine aynı genetik yöntem uygulanarak bulunabilir ve göç yolları hakkında bilgi verebilir. Kelaynak popülasyonunun üreme potansiyeli yüksek olduğu için bilimsel metotlarla sağlanacak destekle sayılarının kısa sürede arttırılması sağlanabilir [9]. Biyoçeşitlilik açısından, özellikle genetik çeşitlilik kayıplarının tespit edilmesi ile gelecekteki kayıpların tespiti mümkün olabilir [28]. Ayrıca yapılan düzenlemeler arasında genetik özelliklerinin dikkate alınması bu bakımdan önem arz etmektedir.

Teşekkür

Türkiye Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğüne, Birecik Kelaynak Üretme İstasyonu Çalışanlarına ve Alican GÜMÜŞ' e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

[1] Silvestro, D., Goria, S., Sterner, T., & Antonelli, A. (2022). Improving biodiversity protection through artificial intelligence. *Nature sustainability*, 5(5), 415-424.

[2] BirdLife International (2018). State of the world's birds: taking the pulse of the planet, Cambridge, UK: BirdLife International.

[3] Rosenberg, K. V., Dokter, A. M., Blancher, P. J., …& Marra, P. P. (2019). Decline of the North American avifauna. *Science,* 366(6461): 120–124.

[4] Yilmaz, B., Demircioglu, I., & Korkmaz, D. (2021). Macroanatomic, light and scanning electron microscopic structure of the pecten oculi in northern bald ibis (*Geronticus eremita*). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 2021;50: 73-378.

[5] Böhm, C., Bowden, C. G., Seddon, P. J., Hatipoğlu, T., Oubrou, W., El Bekkay, M., ... & Unsöld, M. (2021). The northern bald ibis *Geronticus eremita*: history, current status and future perspectives. *Oryx*, 55(6), 934-946.

[6] Kılıç, A., &Uysal, E. (2021). Incubation Sharıng Of Northern Bald Ibıs Partners.*Middle East Journal of Science*, 7(2),167-181.

[7] Bowden, C. G., Aghnaj, A., Smith, K. W., & Ribi, M. (2003). The status and recent breeding performance of the critically endangered Northern Bald Ibis *Geronticus eremita* population on the Atlantic coast of Morocco. *Ibis*, 145(3), 419-431.

[8] Bowden, C. G., Smith, K. W., El Bekkay, M., Oubrou, W., Aghnaj, A., & Jimenez-Armesto, M. (2008). Contribution of research to conservation action for the Northern Bald Ibis Geronticus eremita in Morocco. *Bird Conservation International*, 18(S1), 74-S90.

[9] Kılıç, A., & Uysal, E. (2015). Kelaynak Kuşlarının (*Geronticus eremita*) Türkiye'deki üreme başarısı – 2013. *Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(2), 87-94.

[10] Böhm, C., & Pegoraro, K. (2011). Der Waldrapp. Die Neue Brehmbücherei 659. Westarp, Hohenwarsleben.

[11] Bowden, C.G.R. (2015). International Single Species Action Plan for the Conservation of the Northern Bald Ibis (*Geronticus eremita*). *AEWA Technical Series*, No. 55. Bonn.

[12] Tel, O. Y., Bozkaya, F., & Keskin, O. (2013). Salmonella, Campylobacter, and Chlamydophila in bald ibis (*Geronticus eremita*) feces in Turkey. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(1), 21-26.

[13] Parmaksız, A. (2020). Population Genetic Diversity of Yellow Barbell (*Carasobarbus luteus*) from Kueik, Euphrates and Tigris Rivers Based on Mitochondrial DNA D-loop Sequences. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 20(1), 79-86.

[14] Frankham, R., Ballou, J.D., & Briscoe, D.A. (2010). Introduction to conservation genetics. 2nd ed. New York, Cambridge University Press.

[15] Reed, D.H., Frankham, R. (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17(1), 230–7.

[16] Vandewoestijne, S., Schtickzelle, N., & Baguette, M. (2008). Positive correlation between genetic diversity and fitness in a large, well-connected metapopulation. *BMC Biology*. 6, 46.

[17] Manel, S., Guerin, P. E., Mouillot, D., Blanchet, S., Velez, L., Albouy, C., & Pellissier, L. (2020). Global determinants of freshwater and marine fish genetic diversity. *Nature communications*. 11 (1): 1–9.

[18] Frankham, R., Briscoe, D.A., & Ballou, J. D. (2002). Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press.

[19] Spielman, D., Brook, B.W., & Frankham, R. (2004). Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 15261e15264.

[20] Ryman, N. (1991). Conservation genetics considerations in fishery management. *Journal of Fish Biology*, 39, 211-224.

[21] Ward, R.D. (2000). Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia, 420*, 191-201.

[22] Liu, G., & Zhou, L. (2016). Population genetic structure and molecular diversity of the red swamp crayfish in China based on mtDNA COI gene sequences. *Mitochondrial DNA Part A*, 28(6), 860-866.

[23] Xu, Z.H., Chen, J.L., Cheng, D.F., Liu, Y., & Eric, F. (2011). Genetic variation among the geographic population of the Grain Aphid, Sitobion avenae (Hemiptera: Aphididae) in China inferred from mitochondrial COI gene sequence. *Agricultural Sciences in China,* 10(7). 1041-1048.

[24] Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–299.

[25] Pegoraro, K., Föger, M., & Parson, W. (2001). First evidence of mtDNA sequence differences between Northern Bald Ibises (*Geronticus eremita*) of Moroccan and Turkish origin. *Journal für Ornithologie*, 142(4), 425-428.

[26] Pegoraro, K., Föger, M., & Parson, W. (2001). Mitochondrial DNA sequence evidence for close relationship of Bald Ibis, Geronticus calvus, and Waldrapp Ibis, *G. eremita*. *Ostrich-Journal of African Ornithology*, 72(3-4), 215-216.

[27] Boev, Z., Gradev, G., Klisurova, H., Klisurov, I., & Petrov, R. (2020). First record of the northern bald ibis *Geronticus eremita* (Linnaeus, 1758) in Bulgaria. *Historia Naturalis Bulgarica*, 41(3), 23-26.

[28] Demir, A. (2021). The impacts of climate change on genetic diversity. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 14(3), 511-518.

www.biodicon.com BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION

ISSN 1308-8084 Online ISSN 1308-5301 Print

Research article/Araştırma makalesi
DOI: 14745/biodicon.2023.1196742
16/1 (2023) 38-50

Morpho-anatomical, volatile compounds and ethnobotanical studies on *Thymus sibthorpii* Benth.

Ayşe TERLER BULUT[*1], Gülmira ÖZEK[2], Sevim KÜÇÜK[1]
ORCID: 0000-0002-7505-9811; 0000-0001-8908-6098; 0000-0002-3594-0364

[1]Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, 26470 Eskişehir, Turkey
[2]Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, 26470 Eskişehir, Turkey

[1]Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 26470 Eskişehir, Türkiye
[2]Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 26470 Eskişehir, Türkiye

Abstract

In this study, *Thymus sibthorpii* Benth. were identified, its morphology, anatomy and essential oil components were clarified, and its ethnobotanical usage areas were determined. In our morphological analysis, the definition of the species is given and its detailed characteristics are explained. General view of the plant, stem leaf, bract, bracteole, flower, fruit shapes are drawn. In our anatomical analysis, the root, flowering stem and internal structure of the leaves are explained. The schematic and anatomical shapes of the plant were photographed under the microscope. In our analysis of essential oil components, the oil yield percentage of the species was calculated and the main components in the essential oil were determined. In our ethnobotanical study, the ethnobotanical use of species belonging to the genus *Thymus* L. used as folk medicine in the Eskişehir region and for what purposes they were used, as well as the ethnobotanical use of species belonging to the genus *Thymus* in various regions of our country were determined.

As a result of our study, the stem leaves of *T. sibthorpii* are long (7-13mm), and the calyx length is up to 3.5 mm. The plant is gynodioic. The glandular hairs are of the Lamiaceae type. Corolla purple, lilac in color. Leaves are lanceolate, subacute or obtuse. In the section taken from the flowering stem, the square structure of the stem was observed. The leaves of the species show a bifacial structure. The essential oil yield of *T. sibthorpii* was calculated as 0.62%, and the main components of essential oil were geraniol (42.5%), timol (21.5%), geranil asetat (16.8%). In our ethnobotanical study, it was determined that it was used especially against flu and colds.

Key words: Lamiaceae, *Thymus,* morphology, anatomy, ethnobotany

---------- * ----------

Thymus sibthorpii Benth. üzerinde morfo-anatomik, uçucu yağ bileşenleri ve etnobotanik araştırmalar

Özet

Bu çalışmamızda tıbbi ve aromatik bitkilerden olan *Thymus* L. cinsi türlerinden *Thymus sibthorpii* Benth. teşhis edilerek, morfolojisi, anatomisi ve uçucu yağ bileşenleri aydınlatılmış, etnobotanik kullanım alanları tespit edilmiştir. Morfolojik incelememizde, türün tanımı verilmiş, ayrıntılı karakteristik özellikleri açıklanmıştır. Bitkinin genel görünüşü, gövde yaprağı, brakte, brakteol, çiçek, meyve şekilleri çizilmiştir. Anatomik incelememizde, türün kök, çiçekli gövde, yapraklarının içyapısı açıklanmıştır. Bitkinin şematik ve anatomik şekilleri mikroskop altında fotoğraflanmıştır. Uçucu yağ bileşenleri incelememizde, türün yağ verim yüzdesi hesaplanmış ve uçucu yağın içeriğindeki ana bileşenler tespit edilmiştir. Etnobotanik çalışmamızda, Eskişehir bölgesinde halk ilacı olarak kullanılan *Thymus* cinsine ait türlerin etnobotanik kullanım şekilleri ve hangi amaçlarla kullanıldığı ayrıca ülkemizin çeşitli bölgelerinde diğer bazı türlerin etnobotanik kullanımı tespit edilmiştir.

Çalışmamızın sonucunda *T. sibthorpii* gövde yaprakları uzun (7-13 mm), kaliks boyu en fazla 3,5 mm dir. Bitki ginodioiktir. Salgı tüyleri Lamiaceae tipindedir. Korolla mor, leylak rengindedir. Yapraklar lanseolat, subakut ya da

[*] *Corresponding author* / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905058691814; Fax.: +902223350750; E-mail: atb@anadolu.edu.tr
© Copyright 2023 by Biological Diversity and Conservation Received: 30.10.2022; Published: 15.04.2023 BioDiCon. 1068-301022

obtustur. Çiçekli gövdeden alınan kesitte gövdenin dörtköşe yapısı gözlemlenmiştir. Türün yaprakları bifasiyal yapı göstermektedir. *T. sibthorpii*'nin uçucu yağ verimi %0,62 olarak hesaplanmış, uçucu yağ ana bileşenleri geraniol (%42,5), timol (%21,5), geranil asetat (%16,8) olarak tespit edilmiştir. Etnobotanik çalışmamızda özellikle grip ve soğuk algınlığına karşı kullanıldığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Lamiaceae, *Thymus*, morfoloji, anatomi, etnobotanik

1. Giriş

Dört mevsimin yaşandığı ve üç fitocoğrafik bölgenin kesişim noktasında olan ülkemiz zengin bir bitki çeşitliliğine sahiptir. Türkiye'nin bitki örtüsünde oldukça zengin tıbbi, aromatik ve süs bitki türleri vardır [1]. Tıbbi ve aromatik bitkilerin başında Lamiaceae (Ballıbabagiller) Martinov familyası gelir. Lamiaceae familyası Angiospermlerin altıncı büyük familyası olup, dünya da 245 cins ve 7.886 tür ile temsil edilmektedir. Ülkemizde kullanılan aromatik bitki sayısının, yerli ve kayıtlı 120 kadar olduğu bilinmektedir. Bu bitkilerden %40'ı Lamiaceae familyası içinde yer almaktadır [2]. Familyaya ait türler içerdiği uçucu yağdan dolayı, tıp, diş hekimliği, eczacılık, kimya, gıda, zirai mücadele, kozmetik, ilaç ve parfümeri sanayinde kullanılmaktadır. Familya üyeleri antibiyotik kaynaklı kullanımı nedeniyle analjezik ve antiseptik etkisinden dolayı halk ilacı olarak kullanıldığından etnobotanik açıdan da önemli bir yere sahiptir. Ayrıca familyanın birçok türü süs bitkisi olarak kültüre alınmaktadır [2, 3]. Lamiaceae familyası kutup bölgeleri dışında yeryüzünün bütün bölgelerine yayılmıştır [4]. Başlıca Akdeniz havzasında yaygındır. Familya üyeleri, otsu bitki veya çalı formunda, salgı tüyleri taşır ve uçucu yağ içerir [5]. Ülkemizde halk arasında ''kekik'' olarak bilinen *Thymus, Origanum, Satureja, Thymbra* ve *Coridothymus* olmak üzere beş cins bulunmaktadır. *Thymus* cinsi türleri dünyanın değişik bölgelerine dağılmış olup çok yıllık ve hoş kokulu, çalımsı bitkilerdir. Türkiye'de *Thymus* 40 tür ile temsil edilir. Bunlardan 18'i endemiktir [4, 6].

Türk Farmakopesi kekik bitkisini *Thymus vulgaris* L. ve *Thymus zygis* L. türlerinin ayrı ayrı veya her iki türün karışımının, kurutulmuş olan gövdelerinden ayrılmış bütün yaprak ve çiçekleridir şeklinde vermiştir [7]. Kekik yağı ise *T. vulgaris* ve *T. zygis* ayrı ayrı veya her iki türün karışımının taze çiçekli toprak üstü kısımlarından buhar distilasyonu ile elde edilen uçucu yağdır [7,8]. *T. vulgaris* bitkisinin terapötik kullanımı antispazmodik, antioksidan, antihelmintik, kanser önleyici olarak verilmiştir [9].

Bu çalışmada halk arasında kekik olarak bilinen ve etnobotanik kullanımı olan *Thymus sibthorpii* Benth.'nin (top kekik) ayrıntılı olarak sistematik, morfolojik, anatomik, uçucu yağ bileşenleri ve etnobotanik özellikleri aydınlatılmıştır.

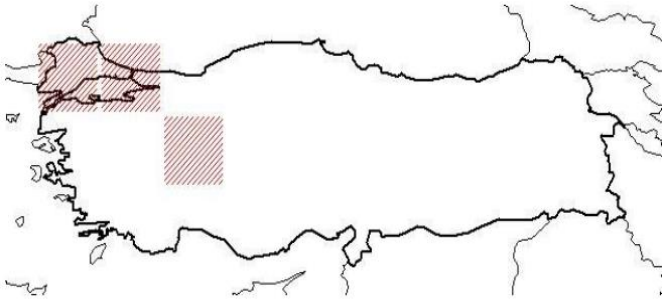
2. Materyal ve yöntem

Araştırmamızda kullanılan bitki örnekleri; B4: Ankara, Belpınar, Kızılcahamam Işık Dağı üst kısımları, 1610 m, 23.07.2021 tarihinde toplanmıştır. Bitkilerimiz numaralandırılarak herbiye örneği halinde Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'unda (ESSE: 15846) korunmaktadır.

T. sibthorpii Türkiye florasında "*top kekik*'' olarak isimlendirilmektedir. Avrupa Sibirya elementidir [11].

Çiçek açma zamanı	: Mayıs-Eylül
Yetişme ortamı	: Kurak bayırlar, çam ormanı açıklıkları
Yükseklik	: 1500 m
Genel yayılışı	: Balkan Yarımadası, Türkiye
Türkiye'deki yayılışı	: Kuzey-Batı ve İç Anadolu [4, 10]

Şekil 1. *T. sibthorpii'nin genel görünümü*



Şekil 2. *T. sibthorpii'nin Türkiye' deki yayılışı* [4, 10]

2.1. Morfolojik çalışmalar

Tür teşhis edilirken, arazi çalışmaları sırasında taze bitki örnekleri üzerinde çalışılmış, biyometrik ölçümler herbiye örnekleri suda yumuşatılarak yapılmıştır. Ölçümler, 15-20 örnek üzerinde yapılmıştır.

Türün morfolojik özelliklerini saptamak amacıyla bitkinin genel görünüşü çizilmiştir. Gövde yaprakları, demet yapraklar, brakte, brakteol, hermafrodit çiçek ve nuks şekilleri çizime ilave edilmiştir.

Bitkinin morfolojik çizimleri WILD M5 A stero mikroskop resim çizme tübünden faydalanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2. Anatomik çalışmalar

Anatomik incelememizde, doğal ortamlarından toplanarak %70 alkol içinde bulunan örnekler kullanılmıştır. İncelemelerimizde çiçekli bitkilerin kök, gövde ve yaprakları kullanılmıştır. Bu organlardan; yaprak üst ve alt kısmından yüzeysel kesitler ayrıca kök, çiçekli gövde ve yaprakların orta kısmından enine kesitler elle alınmıştır. Alınan bu kesitler Sartur reaktifi ile boyanmış bir süre beklendikten sonra gliserin-jelatin ile daimileştirilip mikroskop altında fotoğraflanmıştır. Kökün, gövdenin ve yaprakların anatomik yapıları NIKON E200 trinokuler dijital kameralı mikroskop ve Kameram dijital kamera kullanılarak fotoğraflanmıştır.

2.3. Kimyasal çalışmalar

Uçucu yağ analizi çalışmamızda bitkininin toprağından temizlenerek çiçekli gövdesinden alınan örnekler kaba terazide tartılmıştır. Analiz için 18 gr bitki kullanılmıştır. Bitki küçük parçalara ayrıldıktan sonra su distilasyonu yöntemi ile Clevenger apareyinde 3 saat kaynatılmış ve uçucu yağ elde edilmiştir. Elde edilen uçucu yağın yüzde verim miktarı hesaplanmıştır.

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi laboratuvarında; gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GK/KS) analizi; elde edilen uçucu yağların GK ve GK/KS sistemi ile eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. GK sisteminde alev iyonlaştırıcı dedektörü (AİD) ile tespit edilen bileşiklerin bağıl yüzdeleri tespit edilmiş. GK/KS sistemi ile bileşenlerin kütle spektrumları alınmıştır. Analizlerin değerlendirme işlemleri "Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi" ve Wiley ve MassFinder 4 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılarak yapılmıştır [11].

2.4. Etnobotanik çalışmalar

Thymus türlerine ait etnobotanik araştırmada anket yöntemi kullanılmıştır. Çalışmadaki sorular Eskişehir merkez ve ilçesi Sivrihisar'da yaşayan 25-65 yaş aralığındaki 20 kaynak kişiye sorulmuştur.

Etnobotanik çalışma için sorulan sorular aşağıda yer almaktadır:

- Şifalı olarak tanıdığı bitkilerin adları nelerdir?
- Bunların her biri neye iyidir?
- Kendisi hangilerini toplar? Hangilerini ailesi için kullanır? Hangi ayda toplar?
- Nereden toplar? (Yeri önemli, mevki adı, bulunulan yere mesafesi)

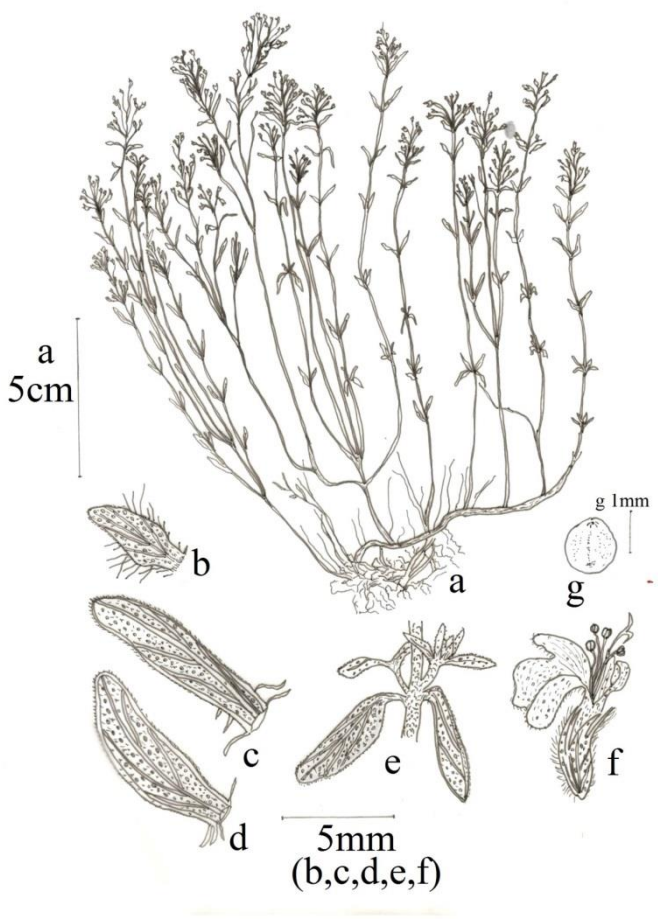
• Bitkilerin hangi kısmı kullanılır?
• Her biri nasıl hazırlanır? (Çay gibi demler mi? Kaynatır mı? Lapa/yakı mı hazırlar?)
• Kaç kez içilir/uygulanır? (Aç karnına mı? Akşamları mı? Ne miktarda ve süreyle?)
• Bu bilgileri kimden/kimlerden öğrenmiş? Annesinden ya da anneannesinden ise onlar da aynı köyden mi/ yöreden mi?

3. Bulgular

3.1. Morfolojik bulgular

Bitki; 5-20 cm uzunluğunda, odunsu gövdeler yatık ve uca doğru yükselicidir. Verimsiz sürünücü dallı, kümeler halinde, yarıçalımsı ve çok yıllıktır. Çiçekli gövdeler; 5-9 cm uzunluğunda, Lamiaceae gövde şekline uygun olarak dörtköşe ya da yuvarlağa kadar değişen şekillerdedir. Çiçekli gövdeler özellikle odunsu gövde üzerinde dik, sıralar halinde uzanan, basit veya dallı bir yapı göstermektedir. Gövdede örtü ve salgı tüyleri mevcuttur. Örtü tüyleri gövdeyi kaplayan, uzun veya kısa, kıvrık ya da düz, dalgalı şekillidir. Salgı tüyleri Lamiaceae tipindedir. Salgı tüyleri kırmızı, sarı veya renksizdir. Gövde yaprakları; 7-13 x 2-3 mm uzunluğunda, tabanda seyrek, üst kısımlarda sık ve daha büyüktür. Yapraklar basit, küçük, lanseolat, lanseolat-eliptik, uçta sivri ila yuvarlak arası ya da sivri değil (subakut ya da obtus), tabanda dar. Yapraklar, yeşil renkli, petiolsüz. Bazal siliat, tüysüz ya da kısa tüylü. Orta damar yan damarlara göre daha belirgindir. Yan damarlar iki çift, genellikle belirgin, nadiren belirsiz, kenarda birleşmiş kalınlaşmıştır. Salgı tüyleri Lamiaceae salgı tipindedir. Salgı tüyleri her iki yüzeyde de yoğun üst yüzeyin tabanına doğru seyrektir, genellikle kırmızı yoğunluktadır nadiren sarı ya da renksizdir. Yaprak kenarı revoluttur. Demet yapraklar; 2-6 x 0.5-1 mm uzunluğunda, çiçekli gövde yapraklarının alt kısmında sık, tabanda ise seyrektir. Yaprakçıklar seyrek dizilişlidir. Yaprak şekli gövde yapraklar gibidir. Orta damar yan damarlara göre daha belirgindir. Yan damarlar iki çift, genellikle belirgin, nadiren belirsiz, kenarda birleşmiş kalınlaşmıştır. Bazal siliat, tüysüz ya da kısa tüylü. Petiolsüzdür. Örtü ve salgı tüyleri gövde yapraklarındaki gibidir. Yaprak kenarı revoluttur. Çiçek durumu; çiçekler sık kümeler halinde, baş veya sütun şeklinde vertisillastrum durumludur. Üstteki vertisillastrumlar 2-5 cm uzunluğunda, baş veya sütun şeklinde, diktir. Altta bulunan 1-4 vertisillastrum uzunluğu 5-20 mm dir. Çiçeklerin hemen hemen çoğu saplıdır. Vertisillastrumda bulunan çiçek sayısı 2-20 arasındadır. Brakteler; 4-9 x1-2,5 mm uzunluğundadır. Genellikle lanseolat veya eliptik lanseolat, şekillidir. Lamina tepesi obtustur. Bazal siliat, tüysüz ya da kısa tüylüdür. Örtü ve salgı tüyleri gövde ve demek yapraklar gibidir. Bazı braktelerin tabana yakın kısmında uzun, düz ya da kıvrık örtü tüyleri bulunur. Salgı tüyleri genellikle kırmızı nadiren sarı ya da renksizdir. Yoğunluğu her iki yüzde de fazladır. Kenarı revoluttur. Brakteoller; 1-2,5 mm uzunluğundadır. Çiçek saplarından daha kısadır. Mızrak, ovat, genellikle eliptik linear şekillidir. Lamina tepesi obtustur. Bazal siliat, tüysüz ya da kısa tüylüdür. Örtü ve salgı tüyleri braketlere benzerdir. Braktelerin tabana yakın kısımlarında uzun, düz ya da kıvrık örtü tüyleri bulunur. Kenarı revoluttur. Bitki ginodioiktir. Hermafrodit çiçek yapısında: Çiçek sapı 1-3 mm uzunluğunda ve tüylüdür. Kaliks; 2-3,5 mm uzunluğunda, yeşil mor renklidir. Tubulat kampanulat şekillidir. Damarlar belirgindir. Kaliks bilabiat olup, üst dudak 3 dişli, dişler 0,5-1 x 0,8-1 mm, alt dudak 2 dişli, dişler 1-2 x 0,4-0,5 mm uzunluğundadır. Kaliks tübü uzunluğu 0,8x1 mm, silindiriktir. Diş uzunluğu tüp uzunluğuna göre daha fazladır. Üst dudak geriye doğru kıvrılmış, ovat triangular, uç kısmı akut akuminat, kenarları siliattır. Alt dudak subulat, kenarları siliattır. Dış yüzde yoğun örtü tüyleri mevcuttur. Örtü tüyleri düz veya kıvrık, yoğun ve uzundur. Lamiaceae tipi salgı tüyleri yoğun veya seyrek damarlar arasında bulunur. Salgı tüyleri genellikle sarı ve renksizdir. Korolla; 2-4 mm uzunluğunda, tubulat kampanulat şekillidir. Lamiaceae yapısına uygun olarak koralla bilabiattır. Dudaklar genellikle mor, leylak renklidir. Üst dudak 2 loblu, uç kısmı retus görünümlü, alt dudak 3 loblu, loblar rotundat görünümlüdür. Koralla dış yüzeyi örtü ve salgı tüylüdür. Örtü tüyleri kısa veya uzun, düz veya kıvrıktır. Salgı tüyleri kırmızı, sarı ya da renksizdir. Stamen; 4 tane, didinam yapıdadır. Alt stamenler üst stamenlerden daha uzundur. Stamenler korallayı aşmıştır. Filamentler; 1-2 mm uzunluğunda, beyaz renkli ve tüysüzdür. Anterler; 0,3-0,5 mm uzunluğunda, dorsifiks yapıdadır. Anterler mor renkli, polen taneleri krem renklidir. Ovaryum; 4 loblu, loblar 0,1-0,3 mm uzunluğunda oblong şekillidir. Stilus; 3-6 mm uzunluğunda, ginobazik durumludur. Tüysüz, belirgin yukarıya kıvrık, bifid, dallar subulattır. Stilus korolladan belirgin şekilde dışarıdadır. Nuks 0,5-1 x 0,4-0,8 mm uzunluğunda, açık ya da koyu kahve renklerdedir. Genellikle orbikulat veya rotundat şekillidir. Dış yüzü düzdür (Şekil 3).

***T. sibthorpii*'nin belirleyici morfolojik özellikleri:** Gövde yaprakları uzun (7-13 mm), kaliks boyu en fazla 3,5 mm.



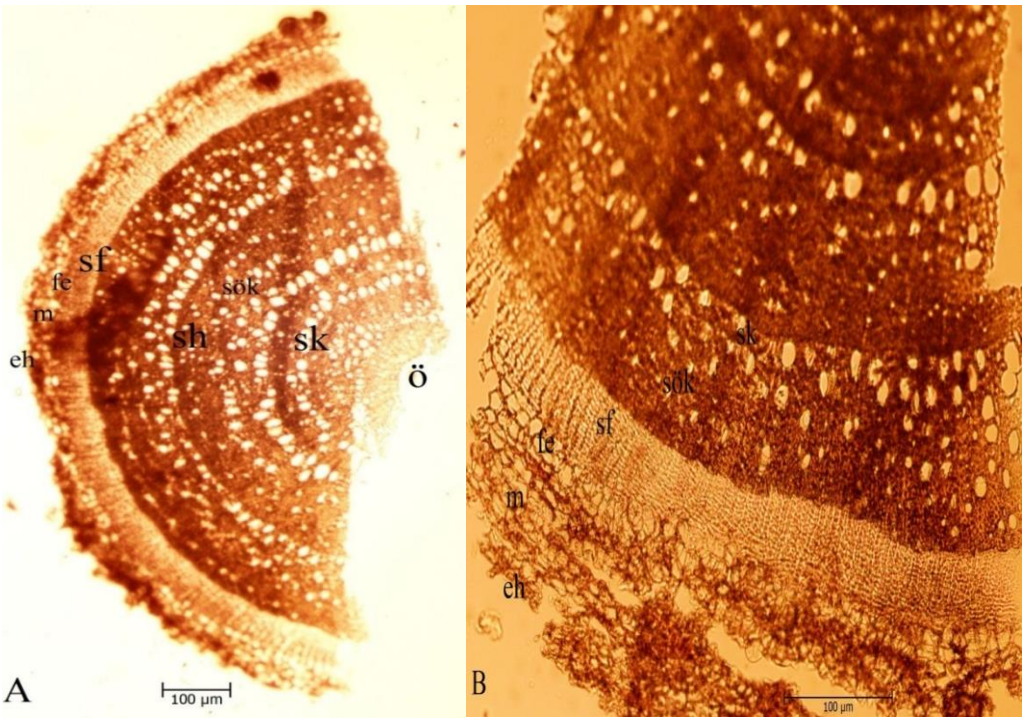
Şekil 3. *T. sibthorpii (ESSE 15846); a) Bitki, b) Brakteol, c) Brakte, d) Gövde yaprakları, e) Demet yapraklar, f) Hermafrodit çiçek, g) Nuks*

3.2. Anatomik bulgular

3.2.1. Kök

Kökten alınan enine kesitlerde aşağıdaki yapılar gözlenmiştir.

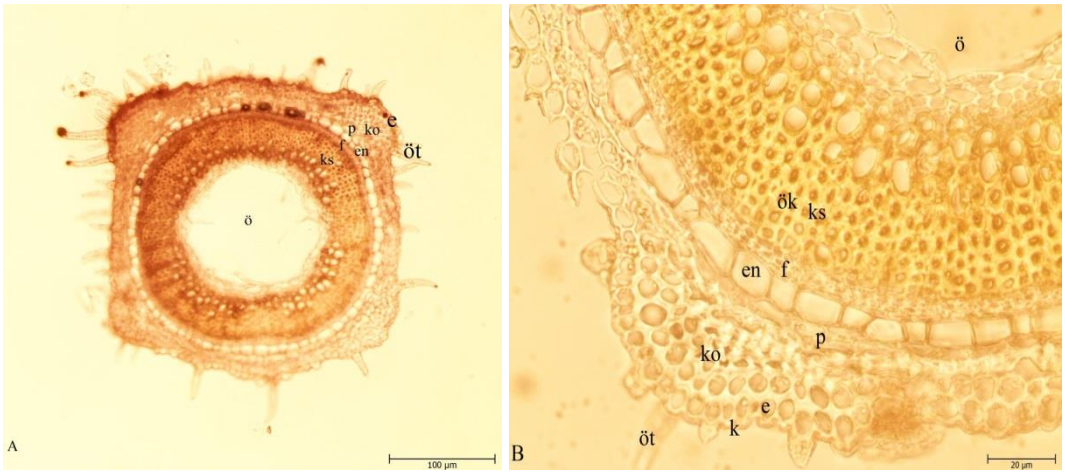
En dışta yer alan koruyucu doku periderma (eksoderma), 8-10 sıralı mantar doku ve 3-6 sıralı felloderma hücrelerinden oluşmuştur. En dıştaki mantar hücreleri tam ya da bütünlüğü bazı kısımlarda bozulmuş, parçalanmış hücrelerden oluşmaktadır. Üzerinde ezilmiş primer kortekse ait doku kalıntıları bulunmaktadır. Peridermis (eksodermis) 'in altında yer alan sekonder floem, 10-15 sıra, düzensiz sıralı, basık, dikdörtgen, oval veya şekilsiz hücrelerden oluşmuştur. Kambiyum, belirsizdir. Sekonder ksilem, geniş bir alanı kaplar ve sklerankimatik bir temel doku içinde büyük veya küçük çaplı trakeal elemanlardan oluşmuştur. Trakeal elemanlar ışınsal sıralıdır. Sene halkaları görülmektedir. Öz kolları, 1-2 sıralıdır. Öz bölgesi parenkimatiktir. Merkezde dar bir alanı kaplar (Şekil 4A-B).



Şekil 4. *T. sibthorpii (ESSE 15846); A) Kök enine kesit (şematik), B) Kök enine kesit (anatomik),* ***eh*** *ezilmiş hücreler,* ***m*** *mantar,* ***fe*** *felloderma,* ***sf*** *sekonder floem,* ***sh*** *sene halkası,* ***sök*** *sekonder öz kolları,* ***sk*** *sekonder ksilem.* ***ö*** *öz.*

3.2.2. Gövde

Çiçekli gövdeden alınan enine kesitlerde; epidermanın üzeri ince bir kutikula tabakasıyla kaplıdır. Epiderma hücreleri, tek sıralı, yuvarlak, dörtgen veya oval şekillidir. Salgı ve örtü tüyleri mevcuttur. Salgı tüyleri Lamiaceae tipindedir bir sap ve 8 hücreli baş kısmından oluşmaktadır, epidermaya gömülü durumdadır. Örtü tüyleri 1-2 hücreli, basittir. Bir hücreli tüyler dişsi tiptedir. Lamiaceae gövde tipine uygun olarak korteks elemanları gövdeye dörtköşe şeklini vermiştir. Kollenkima hücreleri epidermanın altında köşelerde 2-3 sıra, köşeler arasında 1-2 sıra, oval, hafif basık, yuvarlak şekilli hücrelerden oluşur. Kollenkima hücreleri gövde köşelerinde yoğun kümeleşmiştir. Kollenkimanın altında 2-5 sıra parankima dokusu yer alır. Hücreler yer yer ezilmiş ya da parçalanmıştır. Endoderma hücreleri, bol sitoplazmalı büyük, düzgün çeperli, oval ya da dikdörtgen şekillidir ve bir halka şeklinde tek sıralı gözükmektedir. Periskl, belirsizdir Kambiyum, belirsizdir. Floem hücreleri, basık şekilli, 3-5 sıradan oluşmuştur. Gövde de dar bir halka şeklinde gözükmektedir. Ksilem hücreleri gövde de geniş bir alanı kaplamaktadır. Trakeler oval veya yuvarlak şekilli, trakeidler ise çokgen şekillidir. Ksilem, özü silindir şeklinde çevrelemiştir. Öz kolları tek sıra halindedir. Öz bölgesi merkezde boşluk olup etrafında küçük çokgen veya yuvarlak şekilli parankimatik hücreler bulunmaktadır (Şekil 5).

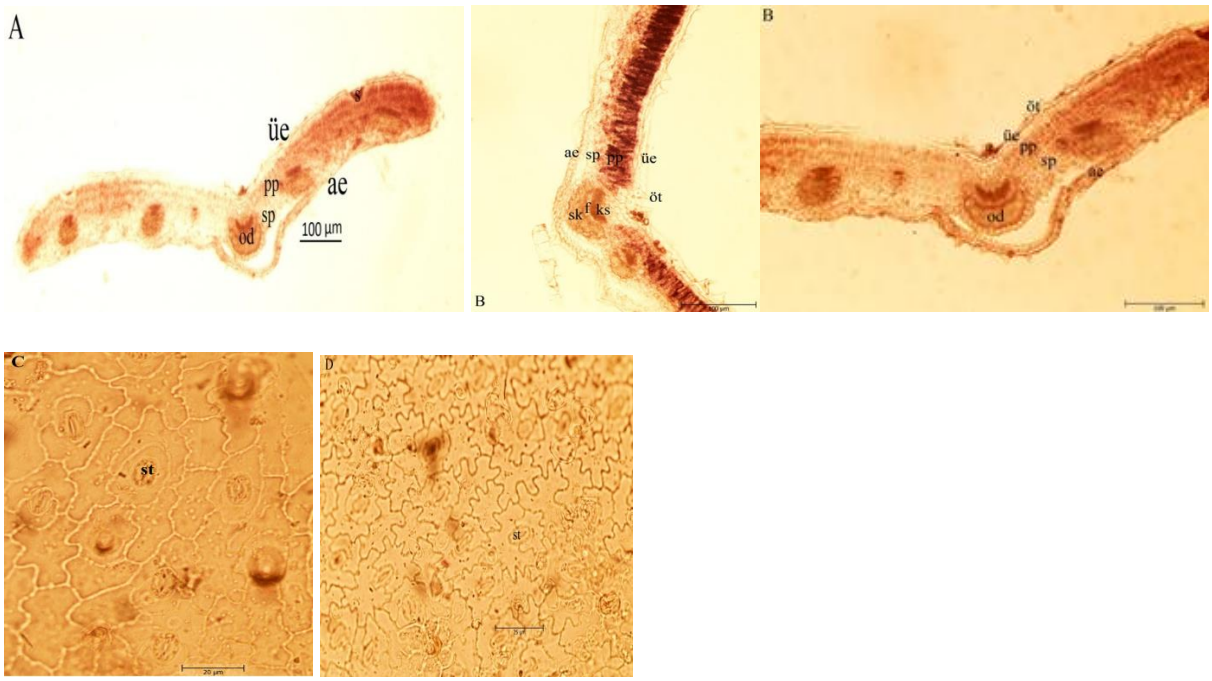


Şekil 5. *T. sibthorpii (ESSE 15846); A) Gövde enine kesit (şematik), B) Gövde enine kesit (anatomik),* ***öt*** *örtü tüyü,* ***e*** *epiderma,* ***ko*** *kollenkima,* ***p*** *parankima,* ***en*** *endoderma,* ***f*** *floem,* ***k*** *kutikula,* ***ks*** *ksilem,* ***ök*** *özkolu,* ***ö*** *öz*

3.2.3. Yaprak

Orta damar enine kesitlerle ve yaprak üst ve alt yüzeysel kesitlerde aşağıdaki yapılar gözlenmiştir.

Koruyucu doku epiderma hücrelerinin yüzeyi ince bir kutikula tabakasıyla kaplıdır. Epiderma hücreleri yaprağın alt ve üst yüzeyinde, tek sıralı, oval ya da dikdörtgen şekillidir. Hücreler sık dizilimlidir. Yüzeysel kesitte belirgin şekilde fark edilen, üst epiderma hücreleri çeperleri hafif dalgalı iken, alt epiderma hücrelerinde çeperler belirgin dalgalı, ondulalıdır. Üst epiderma hücreleri alt epidermaya göre daha büyük görünümlüdür. Yaprağın her iki yüzeyinde de örtü ve salgı tüyleri bulunur. Örtü tüyleri genelikle 1, seyrek olarak 2 hücrelidir. Tek hücreli tüyler dişsi tiptedir. Salgı tüyleri Lamiaceae tipindedir. Başı 8 hücreli, pulsudur. Epidermada gömülmüş halde gözlenir. Yaprağın her iki yüzeyinde stomalar mevcuttur, bu nedenle amfistomatik yapı gözlenir. Stomalar alt yüzeyde daha yoğundur. Yüzeysel kesitte hücreler oval şekillidir. Diasitik tipte, stoma eksenine paralel iki stoma komşu hücresi taşır. Mezofil, palizat ve sünger parankiması hücrelerinden oluşur. Palizat parankiması üst epidermanın altında yer alır. Hücreler düzenli dizilir ve hücreler arası boşluklar azdır. 1-2 sıra halindedir ve bol kloroplast taşır. Palizat parankimasının altında 2-5 sıra, hücreler arası boşlukları fazla, daha az kloroplastlı sünger parankiması yer alır. Yaprak bifasial (dorsiventral) tiptedir. Orta damarda ksilem ve floem hücreleri üst kısımda dar bir alanda bulunur. Ksilem hücreleri üst epiderma, floem hücreleri ise alt epiderma yönünde bulunur. Orta damarın büyük çoğunluğu destek doku elemanı sklarenkima hücrelerinden oluşur. Orta damarın her iki yanında aynı anatomik yapıda orta damardan daha ince yan damarlar yer alır, orta damar dışa doğru belirgin bir çıkıntı yaparken yan damarların çıkıntısı daha azdır, iletim demetleri orta damara göre daha dar çaptadır. Ayrıca orta damar üst epidermis yönünde parankimatik hücreler bulundurmaktadır. Alt epidermis yönünde ise sklerankimadan sonra yine bir kaç sıralı parankimatik hücre vardır (Şekil 6).



Şekil 6. *T. sibthorpii (ESSE 15846); A) Yaprağın enine kesiti (şematik), B) Orta damar bölgesi enine kesit (anatomik), C) Yaprağın üst yüzünün yüzeysel kesiti (anatomik), D) Yaprağın alt yüzünün yüzeysel kesiti (anatomik),* ***st*** *stoma.* ***öt*** *örtü tüyü,* ***üe*** *üst epiderma,* ***ks*** *ksilem,* ***f*** *floem,* ***pp*** *palizat parankiması,* ***sp*** *sünger parankiması,* ***sk*** *sklerankima,* ***od*** *orta damar,* ***ae*** *alt epiderma*

3.3. Kimyasal bulgular

3.3.1. Thymus sibthorpii'nin uçucu yağ bileşenleri

*T. sibthorpii'*nin çiçekli gövdesinden alınan 18 gr numune, su distilasyonu yöntemi ile Clevenger apereyinde 3 saat kaynatılmış ve uçucu yağ elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen uçucu yağın 18 gr numunede verim miktarı %0,62 olarak hesaplanmıştır.

Çalışmamızda *T. sibthorpii*'nin uçucu yağında 36 bileşik tespit edilmiş ve yağın % 99'u aydınlatılmıştır. Uçucu yağın ana bileşikleri geraniol (%42,5), timol (%21,5), geranil asetat (%16,8) olarak tespit edilmiş ve uçucu yağ bileşikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. *T. sibthorpii'nin uçucu yağ bileşenleri*

RRI*	**Bileşen**	**Bileşenlerin Miktarı %**
1032	α-Pinen	t
1035	α-Tuhujen	t
1076	Kamfen	0,1
1188	α-Terpinen	0,1
1255	γ-Terpinen	0,6
1280	*p*-Simen	2,1
1393	3-Oktanol	t
1452	1-Okten-3-ol	0,3
1474	*trans*-Sabinen hidrat	0,2
1505	Dihidroedulan II *	t
1528	α–Bourbonen	t
1535	β-Bourbonen	0,1
1553	Linalool	0,3
1555	1-nonen-3-ol	0,1
1590	Bornil asetat	0,1
1604	Timol methil eter (=*methil timol*)	0,1
1611	Terpinen-4-ol	t
1612	β-Karyofillen	2,5
1687	α–Humulen	0,1
1694	Neral	0,2
1706	α-Terpineol	0,1
1719	Borneol	1,7
1726	Germakren D	0,3
1733	Neril asetat	t
1741	β-Bisabolen	5,8
1742	Geranial	0,4
1765	**Geranil asetat**	**16,8**
1773	δ-Kadinen	0,2
1784	(*E*)-α-Bisabolen	0,2
1857	**Geraniol**	**42,5**
2008	Karyofillen oksid	0,9
2144	Spathulenol	0,1
2198	**Timol**	**21,5**
2239	Karvakrol	1,4
2316	Karyofilla-2(12),6(13)-dien-5b-ol (=Karyofilladienol I)	0,1
2392	Karyofilla-2(12),6-dien-5b-ol (=k*aryophyllenol II*)	0,1
	Total	**99,0**

* RRI: Bağıl Alıkonma İndeksi, t: eser miktarda

3.5. Etnobotanik bulgular

Çalışmamızın sonucunda *Thymus* sp. toprak üstü kısımlarının infüzyon ve dekoksiyon şeklinde, soğuk algınlığı, öksürük ve gribe karşı kullanıldığı ayrıca soğutularak elde edilen suyun ağız içindeki yaralar için gargara şeklinde uygulandığı, yağının ise alın bölgesine ve şakaklara sürülerek baş ağrısında ve sinüzitte kullanıldığı tespit edilmiştir.

Hastalıkların iyileştirilmesinde kullanılan bitkiler arasında olan kekik, hem halk ilâcı olarak kullanılması hem de birçok ilacın bileşimine girmesi nedeniyle önemli bir bitkidir [12].

Thymus türleri, uçucu yağlarının özelliklerinden dolayı, antioksidan, antiseptik, antibakteriyel, antifungal, olarak kullanılmaktadır. Gıda sanayinde tat verici olarak ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı gıdaların raf ömrünün uzatılmasında gıda koruyucu maddesi olarak, kozmetik sanayisinde ise losyonlarda, sabun ve kremlerde koku verici olarak kullanılır [13-16].

Araştırmalarda, halk arasında kekiklerin çiçekli dal ve yapraklarının taze ya da kurutularak demlenerek içildiği, kaynatılarak su buharının nefes açıcı olarak kullanıldığı, kekik suyunun gargara ve banyoda, yağının yara, morluk, yanık tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir. Kurutulmuş ve ufalanmış çiçekli ve yapraklı dalların yemeklerde baharat olarak ayrıca taze etin parazitlerden arındırılmasında kullanıldığı ve kekik balı olarak tüketildiği bildirilmiştir [17,18]. Tablo 2'de bazı *Thymus* türlerinin Türkiye'deki etnobotanik kullanımı, geleneksel adları, kullanılan kısmı, kullanım şekli ve kullanım amacı derlenerek verilmiştir.

Tablo 2. Bazı *Thymus* türlerinin Türkiye'deki etnobotanik kullanımı

Tür Adı	**Bölge**	**Geleneksel adı**	**Kullanılan kısmı**	**Kullanım şekli**	**Kullanım amacı**	**Kaynak**
Thymus zygioides* var. *lycaonicus	Uşak	Kekik, Bodur kekiği	Herba	İnfüzyon	Solunum yolu enfeksiyonu, soğuk algınlığı, tansiyon şeker düşürücü, mide ağrılarında, sinirleri yatıştırmada	6, 19
Thymus nummularius* Syn:*Thymus pseudopulegioides	Espiye-Giresun	Anzer çayı, Limon kekiği	Çiçekli dallar	İnfüzyon	Sakinleştirici, kan düzenleyici, bağırsak parazitlerine karşı, mide ve boğaz ağrısına	6, 20, 21
	Rize	Anzer çayı	Herba	İnfüzyon, dekoksiyon	Soğuk algınlığı, mide rahatsızlıkları	
Thymus sipyleus* subsp. *rosulans	Soğanlı-Artvin	Kekik, Sipil kekiği	Herba	-	Soğuk algınlığı ve mide rahatsızlıklarında	6, 22
Thymus praecox	Artvin	Dağ çayı, dağ kekiği	Yaprak, çiçek	İnfüzyon	Kalp-damar hastalıkları, kolesterol, soğuk algınlığı	23
Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii	Dereli-Giresun	Dağ kekiği, Kekik, Kekik	Toprak üstü kısımları	İnfüzyon	Kan şekerini düşürmek amacıyla, hazımsızlığa karşı, idrar yollarını açıcı, vücut direncini arttırıcı	27
	Çamlıdere-Ankara	Kekik	Yaprak	*Olea europaea* yaprakları ve *Cydonia oblonga*'nın sararmış yaprakları ile karıştırılarak infüzyon hazırlanır	Öksürük	25

Tablo 2. Devam ediyor

Thymus longicaulis	Pozantı-Adana	Kekik, Dağ kekiği	Herba	Dekoksiyon, gargara	Astım, bronşit, mide rahatsızlığına, diş etleri tahrişinde ve ishale karşı kullanılır, adet dönemindeki kramplı ağrıları geçirip, adet kanamalarını düzenler	6, 24
	Güdül-Ankara	Kekik	Yaprak	Kaynatılır	Öksürükte içilerek	25
Thymus longicaulis* subsp. *longicaulis* var. *longicaulis	Çamlıdere-Ankara	Kekik, Aş kekiği	Yaprak	Dekoksiyon	Soğuk algınlığı	6, 25
Thymus longicaulis* subsp. *longicaulis* var. *subisophyllus	Çamlıdere-Ankara	Kekik	Yaprak	*Mentha piperita* ve *Thymus longicaulis* subsp. *longicaulis* var. subisophyllus yaprakları, *Urtica dioica* toprak üstü kısımları ile birlikte dekoksiyon hazırlanır	Nefes darlığı	25
	Gönen-Balıkesir	Taş kekik	Toprak üstü kısımları	İnfüsyon	Kadınların menstürasyon dönemi sancılarının gderilmesinde, böbrek taşlarını düşürmek amacıyla, mide ağrılarının giderilmesinde	27
Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *alternatus	Eğirdir-Isparta	Aş kekik, Dağ kekiği	Bütün bitki	Dekoksiyon	Mide sancısının giderilmesinde	6, 27
Thymus leucotrichus* var. *leucotrichus	Çamlıdere-Ankara	Kekik	Yaprak	Dekoksiyon	Nefes darlığı	25
Thymus leucostomus* ssp. *leucostomus	Beypazarı-Ayaş-Güdül-Ankara	Kekik	Bütün bitki	İnfüzyon	Bronşit, ekspektoran	25
Thymus haussknechtii	Zeytinbahçe-Akarçay-Birecik-Şanlıurfa	Cade, Ververk, Kekik, Fırat kekiği	Toprak üstü kısımları (kuru ve taze yaprakları)	İnfüzyon, dekoksiyon	Baş ağrısı ve mide ağrılarında	6, 26

4. Sonuçlar ve Tartışma

4.1. Morfolojik sonuç ve tartışma

İncelediğimiz tür Lamiaceae familyası içinde yaygın bir özellik olan eşey bakımından ginodioik özellik sergilemektedir [4]. Araştırmamızdaki morfolojik sonuçlarımız Jalas'ın [4] bulguları ile uyumluluk göstermektedir. *T. sibthorpii*'nin üzerinde daha önce yapılan morfolojik ve anatomik çalışma "Eskişehir'de Yetişen *Thymus* L. (Labiatae)

Türleri Üzerinde Anatomik Araştırmalar" [15] incelendiğinde, bitki korolla ve nuks uzunluğu ölçümlerinden daha kısa ölçüm sonuçları elde ettiğimiz saptanmıştır. Kaliks renginde bizim çalışmamızda damarların mor renkte, damar arası boşlukların yeşil renkte olduğu gözlenmiştir. Koralla rengi ise bizde mor ve leylak rengindedir. Bu faklılıklar dışında genel morfolojik sonuçlarımızın uyumlu olduğu saptanmıştır.

türle ilgili morfolojik sonuçlar Tablo 3' te özetlenmiştir.

Tablo 3. *T. sibthorpii*'nin morfolojik-morfometrik özelliklerinin, Türkiye Florası ile karşılaştırılması

T. sibthorpii	Bu çalışmadaki sonuçlar (2022)	Alan & Koca (2007), [15]	Davis (1982), Türkiye Florası
Bitki	5-20 cm	4-20,5	12-40 cm
Gövde salgı ve örtü tüyleri	Tüylenme her tarafta çeşitli şekillerde (uzun veya kısa, kıvrık ya da düz, dalgalı), salgı tüyleri saplı, sarı, kırmızı renkli ya da renksiz.	Tüylenme her tarafı uzun ve kısa kıvrık, dalgalı, düz veya yalnızca uzun kıvrık tüylü, salgı tüyleri kırmızı, sarı veya renksiz.	Tüylenme her tarafta, çeşitli şekillerde. Salgı tüyleri saplı, sarı, kırmızı renkli.
Yaprak boyutu	7-13 x 2-3 mm	9,2-16 x 2-3 mm	10-17 x 1,7-6 mm
Yaprak şekli	Lanseolat, lanseolat-eliptik. Hemen hemen sivri ila yuvarlak arası ya da sivri değil (subakut ya da obtus). Bazal siliat, tüysüz ya da kısa tüylü.	Oblanseolat veya eliptik-linear, sapsız, subakut veya obtus, tabanda veya ortaya kadar siliat veya tepeye kadar siliat.	Lanseolat, Lanseolat-eliptik. Hemen hemen sivri ila yuvarlak arası ya da sivri değil. Bazal siliat, tüysüz ya da kısa tüylü.
Çiçek Durumu	2-5 cm	1-8 cm	2-5 cm
Brakteol	1-2,5 mm	1-2,5 mm	1-2,5 cm
Kaliks	2-3,5 mm	2,5-3,5 mm	2,8-3,5 mm
Koralla	Mor, leylak	Genellikle mor bazen beyaz	Soluk

4.2. Anatomik sonuç ve tartışma

T. sibthorpii üzerinde yaptığımız anatomik araştırmaların sonucunda, kollenkima hücrelerinin karakteristik bir yapı olarak gövdelerin köşelerinde kümelenmiş olduğu gözlenmiştir. Endoderma hücrelerinin belirgin bir halka şeklinde büyük hücrelerden oluşmuş olduğu gözlendi. Kambiyum ve periskl belirsizdir. Ksilem ve floem ve elementleri gövdeyi çevreleyen sürekli dokular halindedir. Örtü tüyleri 1-2 hücrelidir. Salgı tüyleri Lamiaceae tipindedir.

Türün yaprakları bifasiyal yapı göstermektedir. Enine kesitte epiderma tek sıra hücreden oluşmuştur. Yüzeysel kesitlerde üst epiderma hücreleri hafif dalgalı şekilde alt epiderma hücreleri çeperleri belirgin dalgalı, ondüleli yapı gösterir. Örtü ve salgı tüyleri gövdedeki gibidir. Stomalar diasitik tipte, her iki yüzde bulunup amfistomatik yapıdadır, alt yüzde daha yoğun gözlenmiştir. Mezofil hücreleri 1-2 sıra düzenli dizilişli palizat parankiması ile 3-6 sıra hücreler arası boşlukları fazla sünger parankiması hücrelerinden oluşmuştur. Damarların yapısında, iletim demetleri indirgenmiştir, sklerenkima dokusu fazladır.

Ülkemizde yayılış gösteren *Thymus* türleri ile ilgili anatomik çalışmalardan "Eskişehir'de Yetişen *Thymus* L. (Labiatae) Türleri Üzerinde Anatomik Araştırmalar" [15] incelendiğinde, örtü tüyü hücrelerinin 1-8 hücreli olduğu bizim çalışmamızda ise 1-2 hücreli olduğu gözlemlenmiştir. Bir başka çalışma "*T. zygioides* Grisebach var. *zygioides*'in Morfolojik, Anatomik ve Ekolojik Özellikleri" çalışması [28] incelenmiş, kök, gövde ve yaprak ile ilgili gözlemlerin bizim sonuçlarımızla genel olarak uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca *T. pulvinatus* ve *T. cherlerioides* (Lamiaceae) türleri ile yapılan anatomik çalışma [29] incelenmiş, *T. cherlerioides* türünün gövde anatomik şekillerinde gövdenin yuvarlağımsı, köşelerin belirgin olmadığı gözlenmiştir. *T. pulvinatus* türünde ise gövde karemsi, köşeler belirgindir. Yaprak ile ilgili gözlemler sonuçlarımızla genel olarak uyumludur.

4.3. Kimyasal bulgular sonuç ve tartışma

Bizim çalışmamızda *T. sibthorpii'*nin uçucu yağ verimi %0,62 olarak hesaplanmış ve uçucu yağ verimi bakımından orta seviyede olduğu tespit edilmiştir.

Bitkiye güzel kokusunu timol ve karvakrol vermektedir. Bunlar kekik uçucu yağının ana bileşeni oluşturur. Karvakrol daha çok *Thymbra, Origanum ve Satureja* türü kekiklerin, timol ise *Thymus* türü kekiklerin uçucu yağında

daha yüksek oranlarda bulunur. Bizim çalışmamız bazı değerlerdeki farklılıklarla birlikte timol değerinin yüksek çıkmasıyla *Thymus* türü kekiklerin uçucu yağ oranlarıyla paralellik göstermektedir. Timol kristalleşebilir özellikte olduğundan ilaç sanayinde kullanımı daha yaygındır ve güçlü bir antimikrobiyaldir. Gıda, eczacılık, kozmetik ve parfümeride de kullanılmaktadır. Timol cilt tedavisindeki olumlu etkisinden dolayı kozmetik ve parfümeri sanayisinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Karvakrol oda sıcaklığında sıvıdır, kristalleştirilemediğinden ilaç sanayinde kullanımı sınırlıdır [30-32]. Avrupa ilaç ajansı, kekik yağının geleneksel kullanımına dayanarak kekik yağı müstahzarının soğuk algınlığı ile ilişkili göğüs öksürüğünün tedavisi için ağızdan alınacak sıvılarda ve cilt, öksürük ve soğuk algınlığı semptomlarının giderilmesi için banyo katkı maddesi olarak yetişkinlerde kullanılabileceği, 3 yaş üstü çocuklarda ise sadece banyo katkı maddesi olarak kullanılabileceği sonucuna varmıştır. Semptomların bir haftadan uzun sürmesi durumunda uzman hekime başvurulması gerektiği bildirilmiştir. Ayrıca kekik yağına alerjisi olan hastalarda kekik yağı ilaçları kullanılmaması gerektiği, açık yaraları, geniş cilt yaralanmaları veya akut cilt hastalıkları, yüksek ateş, şiddetli enfeksiyon veya dolaşım ile ciddi sorunları, yüksek tansiyon veya kalp yetmezliği olan hastaların, kekik yağı ilaçları ile tam sıcak banyolar yapmaması gerektiği bildirilmiştir. Kekik yağı ilaçlarının yüze uygulanmaması gerektiğini bildirmiştir [8]. "Kekik Yağı Karvakrol'ün İnsan Sağlığına Etkileri'' çalışması incelenmiş, karvakrolün kalp-damar hastalıklarında, iştah açıcı, bağırsak parazitlerinde, safra yolları hastalıklarında kullanıldığı, antiinflamatuvar, antikanserojen, analjezik, antibakteriyel, antifungal, yara iyileşmesini ve hücre çoğalmasını hızlandırıcı etkileri olduğu, son yıllarda akciğer kanseri içindeki oranı artan adenokarsinomda, karvakrolün kanserli hücrelerin sayısını azalttığı ayrıca gıda bozulmasını engellemek için, herbisit olarak, insektisit olarak da yaygın olarak kullanıldığı tespit edilmiştir [33]. Daha önce yapılan, "*T. sibthorpii* antioksidan aktivitesinin incelenmesi" adlı çalışmada DPPH testinde önemli antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [34]. "*Thymus sibthorpii* Bentham Esansiyel Yağının Karakterizasyonu" isimli çalışmada *T. sibthorpii* çiçekli gövdelerinden elde edilen uçucu yağın %95.08' ini temsil eden elli bileşik karakterize edilmiş ve timol (%34,8) tek ana bileşen olarak tespit edilmiştir [35].

4.4. Genel sonuçlar

T. sibthorpii üzerinde yaptığımız, morfolojik, anatomik ve uçucu yağ bileşenleri çalışmasında, morfolojik olarak türün ayrıntılı tanımı yapılmış, karakteristik özellikleri belirlenmiş ve bulgularımızı destekleyen şekiller çalışmamızda yer almıştır. Anatomik olarak, türün kök, gövde ve yapraklarının iç yapısı aydınlatılmış ve bulgularımızı destekleyen fotoğraflar çalışmamızda yer almıştır. Uçucu yağ bileşenleri çalışmamızın sonucunda, türün uçucu yağ verim yüzdesi bulunmuş, içeriğindeki temel bileşenler ortaya konulmuştur. Etnobotanik çalışmamızda *Thymus* cinsine ait bazı türlerin ve Eskişehir bölgesinden toplanan çalışma konumuzu oluşturan *T. sibthorpii*'nin halk ilacı olarak etnobotanik kullanımı tespit edilmiş, ayrıca cinse ait bazı türlerin Türkiye'de etnobotanik kullanım şekli ve alanları Tablo 2'de derleme şeklinde verilmiştir.

Kaynaklar

[1] Tan, A. (2010). Türkiye bitki genetik kaynakları ve muhafazası. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, *20*(1), 9-37.

[2] Küçük, S., Kayalar, E., Kürkçüoğlu, M., & Eröz Poyraz, İ. (2021). Essential oils compositions and local names of some medicinal and aromatic plants from Lamiaceae family sold in local bazaars of Edremit-Akçay (Balıkesir-Turkey). *Biological Diversity and Conservation*, *14*(3), 372-379. doi: 10.46309/biodicon.2021.911991

[3] Çatak, E., & Atalay, A. (2022). Lamiaceae (Ballıbabagiller) Familyası'nın ekonomik ve tıbbi değerleri. *Euroasia Journal of Mathematics, Engineering, Natural & Medical Sciences, 9*(20), 150-157. https://doi.org/10.38065/euroasiaorg.941

[4] Davis P.H. (1982). *Flora of Turkey and East Eagean Island Vol.7*. Edinburg: University of Edinburg Press.

[5] Tanker, N., Koyuncu, M., & Çoşkun, M. (1998). *Farmasotik botanik ders kitabı*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları.

[6] Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., & Babaç, M. T. (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.

[7] Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu. (2016). *Türk Farmakopesi II Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu*. Ankara: T. C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu.

[8] EMA (European Medicines Agency). (2020). Thyme oil, *Thymus vulgaris* L. and *Thymus zygis* L., *aetheroleum*. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/thymi-aetheroleum. Erişim tarihi: 21.07.2022.

[9] Ateş, İ., Oğuz Ada, A., & Eke, B. C. (2017). Bitkisel ürünlerdeki pestisit kalıntılarının toksikolojik önemi. *Türk Farmakope Dergisi*, *2*(2), 11.

[10] Bakis, Y., Babac, M. T., & Uslu, E. (2011). Updates and improvements of Turkish Plants Data Service (TÜBİVES). In Health Informatics and Bioinformatics (HIBIT), 136-140. http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=1&tax_id=7981. Erişim tarihi: 21.07.2022.

[11] Alan, S., Köse, Y.B., Demirci, B., & Başer, K.H.C. (2015). Geographical variation of *Ajuga laxmannii* (L.) Bentham essential oil. *Natural Volatiles and Essential Oils*, *2*(1), 32-36.
[12] Tanker, N., & İlisulu F. (1981). Türkiye'de kekik olarak kullanılan bitkilerden *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, *11*(1), 127-135. https://doi.org/10.1501/Eczfak_0000000272
[13] Aljabeili, H.S., Barakat, H., & Abdel-Rahman, H.A. (2018) Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*). *Food and Nutrition Sciences*, *9*(5), 433-446. https://doi.org/10.4236/fns.2018.95034
[14] Nelson, R.R.S. (1997). In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant Enterococcus faecium. *Journal of Antimicrobial Chemoterapy*, *40*(2), 305-306. https://doi.org/10.1093/jac/40.2.305
[15] Alan, S., & Koca, F. (2007). Eskişehir'de yetişen *Thymus* L. (Labıatae) türleri üzerinde anatomik araştırmalar. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, *8*(1), 161-180.
[16] Bozdemir, Ç. (2019). Türkiye'de yetişen kekik türleri, ekonomik önemi ve kullanım alanları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, *29*(3), 583-594. doi: 10.29133/yyutbd.511777
[17] Güler, S. (2004). Erzurum yöresinde doğal yayılış gösteren bazı tıbbi ve aromatik bitkilerin etnobotanik özellikleri. *Çevre ve Orman Bakanlığı Doğu Anadolu Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Yayını*, *13*(5), 36-37.
[18] Pehlivan, T., & Gül, A. (2016). Türkiye'de üretilen keçiboynuzu, kekik ve sütleğen ballarının kimyasal özellikleri. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, *21*(1), 48-56.
[19] Deniz, L., Serteser, A., & Kargıoğlu, M. (2010). Uşak Üniversitesi ve yakın çevresindeki bazı bitkilerin mahalli adları ve etnobotanik özellikleri. *AKÜ Fen Bilimleri Dergisi*, *10*(1), 57-72.
[20] Karaköse, M., & Karaköse Çolak, G. (2017). Medicinal and aromatic plants of Esenli (Giresun) forest planning *Biological Diversity and Conservation*, *4*(3), 285-305. https://doi.org/10.21448/ijsm.372229
[21] Saraç, D.U., Özkan, Z.C., & Akbulut, S. (2013). Rize ilinin etnobotanik özellikleri. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, *6*(3), 57-66.
[22] Ergül Bozkurt, A., Özkan, Z.C., & Saraç, D.U. (2019). The floristic structure of the Artvin-Soğanlı village (Turkey) and the traditional usage of these plant taxa in this region. *Biological Diversity and Conservation*, *12*(2), 109-118. doi: 10.5505/biodicon.2019.04796
[23] Erşan Bak, F., & Çifci, K. (2020). Artvin'in merkez köylerinde bazı tıbbi bitkilerin yöresel kullanımları. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, *21*(2), 318-329. doi: 10.17474/artvinofd.782235
[24] Bağcı, Y., Savran, A., & Dural, H. (2006). Pozantı (Adana) ve çevresindeki bazı bitkilerin yerel adları ve etnobotanik özellikleri. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, *2*(27), 77- 82.
[25] Akıllıgöz, Y., & Başaran, A. (2021). Ankara ilinde yapılan etnobotanik çalışmaların, Covid-19 pandemisi üzerinde değerlendirilmesi. *Bütünleyici ve Anadolu Tıbbi Dergisi*, *2*(3), 20-55. doi: 10.53445/batd.934107
[26] Balos, M.M., & Akan, H. (2007). Zeytinbahçe - Akarçay (Birecik, Şanlıurfa) arasında kalan bölgenin etnobotanik özellikleri. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, *2*(29), 155-171.
[27] Tuzlacı, E. (2006). *Şifa niyetine Türkiye' nin bitkisel halk ilaçları*. İstanbul: Alfa Yayınları.
[28] Koyuncu, Ş., Uysal, İ., Esen, O., Kökçü, B., Şahin, F., Peksüsler, D., & Aktura, B. (2017). *Thymus zygioides* Grisebach var. *zygioides'*in morfolojik, anatomik ve ekolojik özellikleri. *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, *3*(1), 24-37. https://doi.org/10.28979/comufbed.277920
[29] Selvi, S., Açar, M., & Satıl, F. (2013). Kazdağları'nda Edremit /Balıkesir yetişen *Thymus pulvinatus* ve *T. cherlerioides* Lamiaceae türleri üzerinde karşılaştırmalı mikromorfolojik ve anatomik araştırmalar. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, *6*(3), 12-20.
[30] Tanker, N., & Tanker, M. (1990). *Farmakognozi II*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları.
[31] Paşa, C. (2019). Türkiye'de doğal olarak yetişen *Thymus zygioides* (Lamiaceae)'in uçucu yağı ve bileşenlerinin diurnal varyasyonu. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, *22*(1), 6-9. doi: 10.18016/ksutarimdoga.vi.556254
[32] Okut, N. (2018). *Thymus fedtschenkoi* (Ronniger) uçucu yağındaki kimyasal varyasyon. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, *28*(3), 325-330. doi: 10.29133/yyutbd.458247
[33] Yaman, S., Özdemir, Z., Şit, M., Özer, B., & Çatal, O. (2018). Kekik yağı karvakrolün insan sağlığına etkileri. *SETSCI Conference Indexing System*, *2*(1), 391-392.
[34] Kontogiorgis, C., Ntella, M., Mpompou, L., Karallaki, F., Athanasios, P., Hadjipavlou-Litina, D., & Lazari, D. (2016). *Thymus sibthorpii* Bentham'ın (Lamiaceae) antioksidan aktivitesinin incelenmesi. *Enzim İnhibisyonu ve Tıbbi Kimya Dergisi, 31*(4), 154-159. https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1222583
[35] Baser, K.H.C., Özek, T., Kürkçüoglu, M., & Tümen, G. (1992). *Thymus sibthorpii* Bentham esansiyel yağının karakterizasyonu. *Esansiyel Yağ Araştırmaları Dergisi, 4*(3), 303-304. https://doi.org/10.1080/10412905.1992.9698067

(Bu makale yüksek lisans tezinden üretilmiştir.)

www.biodicon.com BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION

ISSN 1308-8084 Online ISSN 1308-5301 Print

Research article/Araştırma makalesi
DOI: 10.46309/biodicon.2023.1219905
16/1 (2023) 51-55

Essential oil composition of *Nepeta isaurica* Boiss. Heldr. apud Bentham and *Nepeta sulfuriflora* P.H. Davis growing naturally in Türkiye

Hasan MARAL[*] [1], Ömer ÇEÇEN [2], Musa TÜRKMEN [3]
ORCID: 0000-0001-9074-1109**;** 0000-0002-1315-9876**;** 0000-0001-9914-9523

[1] Karamanoğlu Mehmetbey University, Ermenek Vocational School, 70400 Karaman, Türkiye
[2] Karamanoğlu Mehmetbey University, Vocational School of Technical sciences, 70000 Karaman, Türkiye
[3] Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, University of Mustafa Kemal, 31000 Hatay, Türkiye

Abstract

Nepeta species are widely used in folk medicine as a diaphoretic, diuretic, antiseptic, astringent, anti-asthmatic, cough suppressant, antispasmodic, antipyretic, sedative and stomachic. This study was designed to examine the chemical composition of the essential oil of *Nepeta isaurica and Nepeta sulfuriflora.* It was determined that the aerial parts of the *N. isaurica* plant contained 0.72% essential oil, 37 compounds were identified representing 98.86% of the total oil analyzed via GC-MS. The major components of the essential oil obtained from these plants were trans-pinocarveol, α-pinene, linalool, 1,8-cineole, α-terpineol, α-cadinol, spathulenol and β-pinene. It was determined that the aerial parts of *N. sulfuriflora* contained 0.64% essential oil. GC-MS analysis identified 37 compounds representing 99.07% of the total oil. It has been determined that the main component of the essential oil in *N. sulfuriflora* is 1,8-cineol (72.05%). As a result of the study, it was concluded that *N. sulfuriflora* could be used as a 1,8-cineol reservoir.

Keywords: essential oil, GC-MS, *Lamiaceae, Nepeta isaurica*, *Nepeta sulfuriflora*

---------- * ----------

Türkiye'de doğal olarak yetişen *Nepeta isaurica* Boiss. Heldr. apud Bentham and *Nepeta sulfuriflora* P.H. Davis'in uçucu yağ bileşimi

y

Özet

Nepeta türleri halk hekimliğinde terletici, idrar söktürücü, antiseptik, büzücü, astım önleyici, öksürük kesici, spazm çözücü, ateş düşürücü, yatıştırıcı ve mide söktürücü olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışma, *Nepeta isaurica* ve *Nepeta sulfuriflora* bitkilerinin uçucu yağının kimyasal bileşimini belirlemek için planlanmıştır. *N. isaurica* bitkisinin toprak üstü kısımlarının %0,72 oranında uçucu yağ içerdiği, GC-MS analizinde toplam yağın %98,86'sını temsil eden 37 bileşik tespit edilmiş ve uçucu yağın ana bileşenlerinin trans-pinokarveol, α-pinen, linalool, 1,8-sineol, α-terpineol, α-cadinol, spathulenol ve β-pinen olduğu belirlenmiştir. *N. sulfuriflora'*nın toprak üstü kısımlarının %0.64 oranında uçucu yağ içerdiği belirlenmiştir. GC-MS analizinde ise toplam yağın %99.07'sini temsil eden 37 bileşik tanımlanmıştır. *N.sulfuriflora'*da bulunan uçucu yağın ana bileşeninin 1,8-sineol (%72,05) olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *N. sulfuriflora*'nın 1,8-sineol deposu olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: uçucu yağ, GC-MS, *Lamiaceae, Nepeta isaurica*, *Nepeta sulfuriflora*

1. Introduction

Plants are a source of valuable, inexpensive and easily obtainable natural products. Natural products play a crucial role in pharmacy and agriculture to synthesize new herbal medicines. It has been proven by studies that many families such as *Myrtacea, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupessaceae, Poceace,*

[*] *Corresponding author* / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905066320448; Fax.: +903382262023; E-mail: hasmaral@kmu.edu.tr
© Copyright 2023 by Biological Diversity and Conservation Received: 16.12.2022; Published: 15.04.2023 BioDiCon. 1070-161222

Zingiberaceae and *Piperaceae* contain valuable essential oils with lipophilic structure and rich in many bioactive compounds. These active compounds, on the one hand, serve as alternatives to many synthetic pharmaceutical and agricultural drugs, on the other hand, they contribute to the discovery of new bioactive compounds extracted from plants [1, 2].

Turkey has a rich flora and fauna due to being at the intersection of three different phytogeographic regions and having different climate, environment and topography (Iran-Turonian, Mediterranean and Euro-Siberian) and being a transitional region between Europe and Asia. There are about 12.000 taxa in the flora of Türkiye and it is known that about 3,000 of these taxa are endemic. However, about 650 of these plant taxa are used as medicinal plants for therapeutic purposes by the public in various regions [3].

Aromatic plants belonging to the *Lamiaceae* family are annual or perennial, herbaceous or shrubby plants widely distributed in many parts of the world. *Nepeta*, which is one of the genera that contains the most taxa of the *Lamiaceae* family, is represented by approximately 250-300 taxa in the world [4, 5]. The genus *Nepeta* in the Flora of Turkey has been divided into 3 informal groups (designated as A, B and C) based on flower color and cluster characteristics. Group A (14 species): flowers white, yellow or pinkish, nutlets entire or tuberculous at the apex; group B (16 species): flowers lilac or dark blue, nutlets tuberculous or smooth; group C (3 species): flowers white, lilac or purple, nutlets tuberous, spherical [6, 7].

In studies on *Nepeta* species used as traditional herbal medicine, it has been determined that it has various pharmacological effects such as antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, sedative, relaxant, antihyperlipidemic, antiasthmatic, carminative, diuretic, diaphoretic, antipyretic, anthelmintic, herbicide and insecticide. It is known that lotions prepared from some *Nepeta* species are also used against snake and scorpion bites. While some of the *Nepeta* species are used to flavor foods, it is known that some of them are used as herbal tea in the treatment of stomach disorders, and some of them are used in the treatment of dental and rheumatic pains [8, 9]. In this article, we describe the essential oil content and chemical composition, antioxidant activity and total phenolic content of *N. isaurica* and *N. sulfuriflora*.

2. Materials and methods

Plant materials were collected in the Anamur district of Mersin, in southern Turkey. The aerial parts of *N. isaurica*, which is in the endemic and least concern (LC) category, were collected between Sugözü village and Tamtır Plateau (39° 19' 07" N, 32° 43' 18" E and 1950 m elevation) on 16 June 2021. Aerial parts of *N. isaurica*, which is in the endemic and conservation dependent (CD) category, were collected on June 16, 2021 between Sugözü and Boguntu Villages (36° 17' 50" N, 32° 47' 48" E and 1100 m elevation). The plant samples were identified by Dr. Ömer ÇEÇEN and voucher specimens have been deposited in the Biodiversity Application and Research Center at Karamanoglu Mehmetbey University.

Isolation of the essential oils: The air dried aerial parts of the plants were hydro distilled for 3h using a Clevenger type apparatus. The obtained oils were stored at +4°C until analyzed.

GC-MS analyses: The analysis of the main components of the essential oils of each samples were performed using Thermo Scientific ISQ Single Quadrupole Gas Chromatography- Mass Spectrometry device (Milan, Italy) fitted with TR- FAME capillary column (5% Phenyl Polysilphenylene- siloxane, 60 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm film thickness). Helium (99.9%) was used as the carrier gas at a flow rate of 1 ml/min. Mass spectra were recorded at 70 eV, the mass range was from 1.2 to 1,200 m/z. Scan Mode was used for data collection. MS transfer line, ionization source and the injection port temperatures were 250, 230, and 220 ℃, respectively [10].

3. Results

The essential oil content and components of *N. isaurica* and *N. sulfuriflora* are summarized in Table 1. The essential oil content of *N. isaurica* was obtained as 0.72%, while the oil content of *N. sulfuriflora* was obtained as 0.64%.

The chemical composition of *N. isaurica* essential oil included of 40 compounds and these compounds were identified representing 99.98% of the total composition. The major components of essential oil were determined as trans-pinocarveol, (8.30%), α-pinene (7.73%), linalool (7.33%), 1,8-cineole (6.80%), α-terpineol (6.77%), α-cadinol (6.57%), spathulenol (6.39%) and β-pinene (6.13%) (Table 1).

The chemical composition of *N. sulfuriflora* essential oil included of 37 compounds and these compounds were identified representing 99.07% of the total composition. While the main component of the essential oil was 1,8-cineole with 71.62%, only verbenol (2.81%) and caryophyllene oxide (2.27%) were greater than 2% and the other 33 components were less than 2% (Table 1).

1,8-Cineole is a colorless liquid natural compound and is used as a flavoring in food products and in cosmetics due to its pleasant aroma and taste. According to data from the five major cigarette manufacturers, 1,8-Cineole is one of the 599 contributors to cigarettes. 1,8-Cineole is used in the treatment of upper and lower respiratory tract diseases. In addition, 1,8-Cineole is used as an insecticide and insect repellent [11-14]. Loi et al [15] reported that 1,8-Cineole has allelopathic effects on plants.

Table 1. Chemical composition of *Nepeta isaurica and Nepeta sulfuriflora*

RT	Compounds	*N. isaurica*	*N. sulfuriflora*
6.57	α-Pinene	7.73	1.66
8.39	β-Pinene	6.13	1.46
8.70	β-Phellandrene	1.18	0.85
10.04	Limonene	4.71	0.20
11.03	γ-Terpinene	0.32	0.30
11.98	1.8-cineole	6.80	71.62
12.67	o-Cymene	1.02	1.42
17.22	1-Octen-3-ol	0.15	0.14
18.13	Linalool oxide	1.49	-
20.33	Linalool	7.33	0.21
23.27	α-Campholenal	0.96	0.40
24.03	trans-Caryophyllene	1.35	0.73
24.19	Terpinen-4-ol	1.76	1.28
24.94	α-Muurolene	0.49	0.30
25.17	trans-Pinocarveol	8.30	1.03
25.91	Camphor	0.96	-
26.26	Verbenol	4.21	2.81
26.42	Eremophylene	0.97	0.32
27.12	α-Terpineol	6.77	1.66
27.48	Borneol	1.25	0.71
28.41	Bicycloelemene	0.46	-
28.64	Myrtenal	2.36	0.91
28.81	Trans-pinane	-	0.31
29.50	Myrtenol	1.56	0.47
30.62	trans-Carveol	1.0	0.37
31.12	Germacrene B	-	0.75
31.59	Carvone	1.45	0.35
32.49	p-Cumic aldehyde	-	0.18
33.54	D-Verbenone	1.33	0.95
35.49	Palustrol	1.54	0.12
37.77	Ledene	0.20	0.89
38.48	Ledol	4.72	-
38.73	Veridiflorol	0.46	-
40.10	Caryophyllene oxide	4.05	2.27
40.36	Spathulenol	6.39	-
41.66	β-Bourbonene	0.99	1.79
42.24	α-Cadinol	6.57	0.64
43.60	β-Eudesmol	0.93	0.26
42.51	Levantenolide	0.24	-
46.11	Junipene	0.54	0.19
46.50	Patchoulane	-	0.75
46.52	Ethyl linoleate	0.31	0.34
49.02	Cedrenol	0.40	-
49.37	cis-Jasmone	0.60	0.26
52.54	Cyperone	-	0.17
Number of identified compounds		40	37
Total (%)		99.98	99.07
Essential oil content (%)		0.72	0.64

RT: Retention time

References

[1] Cardona, J., Celis, A., Cuca, L., Delgado, W., et al. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores conenfasis enla familia *Piperacea*. *Una Revision Agronomia Colombiana*, 26, 97-106.

[2] Sharma, A. & Sing Cannoo, D. (2013). Phytochemical composition of essential oils isolated from different species of genus *Nepeta* of *Labiatae* family: A Review. *Pharmacophore*, 4 (6), 181-211.

[3] Baytop, T. (1984). Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. (Vol 40, pp. 240-376). *Istanbul Üniv. Eczacılık Fakültesi Yayınları.*

[4] Asparganah, J., Sarabian, S. & Ziarati, P. (2013). Essential oil of *Nepeta* genus (Lamiaceae) from Iran: a review. *J Essent Oil Res.*, 26 (1), 1-12.

[5] Kharazian, N., Shourabi, S. Z. & Yousefi, M. (2013). Chromosome count and study of eleven *Nepeta* L. (Lamiaceae) species from Iran. *Biodicon*, 6 (1), 76-87.

[6] Hedge, I. C. & Lamond J. M. (1982). *Nepeta* L. In P. H. Davis, Flora of Turkey and East Aegean Islands. (*Vol 7, pp. 264-288*). Edinburgh: *Edinburgh University Press*.

[7] Ayla, K. & Dirmenci, T. (2008). Nutlet surface micromorphology of the *Genus Nepeta* L. (Lamiaceae) in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 32 (2), 103-112.

[8] Sarıkürkçü, C., Eskici, M., Karanfil, A. & Tepe, B. (2019). Phenolic profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of two endemic *Nepeta* species: *Nepeta nuda* subsp. *glandulifera* and *N. Cadmea*. *South African Journal of Botany*, 120, 298-301.

[9] Maral, H., Kayıcılar, F. R., Cecen, O., Turkmen, M. & Turk Baydır, A. (2022). Antioxidant activity and chemical composition of the essential oil of *Nepeta cilicica* Boiss. Apud Bentham from Turkey. *3rd International Conference on Applied Engineering and Natural Sciences (ICAENS 2022)* July 20-23, 2022, Konya, Turkey.

[10] Türkmen, M., Kara, M., Maral, H. & Soylu, S. (2022). Determination of chemical component of essential oil of *Origanum dubium* plants grown at different altitudes and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Food Process Preserv. 2022;46: e15787.* doi: 10.1111/jfpp.15787.

[11] Harborne, J. B. & Baxter, H. (2001). Chemical dictionary of economic plants, *John Wiley & Sons*, 224 p.

[12] Dorsam, B., WU, C. F., Efferth, T., Kaina, B. & Fahrer, J. (2015). The eucalyptus oil ingredient 1,8-cineol induces oxidation DNA damage. *Arch Toxicol*, 89 (5), 797-805.

[13] Klocke, J. A., Darlington, M. V. & Balandrin, M. F. (1987). 1,8- Cineole (Eucalyptol), a mosquito feeding and ovipositional repellent from volatile oil of *Hemizonia fitchii* (Asteraceae). *J Chem Ecol*, 13 (12), 2131- 2141.

[14] Sfara, V., Zerba, E. N. & Alzogaray, R. A. (2009). Fumigant insecticidal activity and repellent effect of and essential oils and seandn monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. *J Med Entomol*, 46 (3), 511-515.

[15] Loi, R. X., Solar, M. C. & Weidenhamer, J. D. (2008). Solid-phase microextraction method for in vivo measurement of allelochemical uptake. *J Chem Ecol*, 34 (1), 70-75.

[16] Baser, K. H. C., Demircakmak, B. & Duman, H. (1997). Composition of the essential oils of *Nepeta flavida* Hub. -Mor and *Nepeta sulfuriflora* P.H. Davis. *Proceedings of the XIth Symposium on Plant Originated Crude Drugs*. Ankara, May 22-24, 450-456.

[17] Baser, K. H. C., Kirimer, N., Kurkcuoglu, M. & Demirci, B. (2000). Essential oil of *Nepeta* species growing in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 36 (4): 356-359.

[18] Kökdil, G., Kurucu, S. & Topçu, G. (1997). Investigation on the essential oil of some *Nepeta* species growing in South Anatolia. *Proceedings of the XIth Symposium on Plant Originated Crude Drugs*. Ankara, May 22-24, 446-449.

[19] Dehghan, G., Torbati, S., Mohammadian, R., Movafeghi A. & Talebpour, A.H. (2018). Essential oil composition, total phenol and flavonoid contents and antioxidant activity of *Salvia sahendica* at different developmental stages," *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21 (4), 1030-1040.

[20] Javazi, H., Saadatmand, S., Delazar, A. & Khavari Nejad, R.A. (2016). Influence of different developmental stages on content and composition of the essential oil and antioxidant activity of *Nepeta scrophularioides* Rech.f. essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19, 693-698.

[21] Sellami, I. H., Maamouri, E., Chahed, T., Wannes, W. A., Kchouk, M. E. & Marzouk, B. (2009). Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Industrial Crops and Products*, 30, 395-402.

[22] Maksimovic, M., Vidic, D., Miloš, M., Edita Šolic, M., Abadic, S. & Siljak-Yakovlev, S. (2007). Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S.brachyodon vandas* and *S. officinalis* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 473-478.

[23] Lattoo, S. K., Dhar, R. S., Dhar, A. K., Sharma, P. R. & Agarwal, S. G. (2006). Dynamics of essential oil biosynthesis in relation to inflorescence and glandular ontogeny in *Salvia sclarea*. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 817-821.

[24] Oliveira, M. J., Campos, I. F. P., Oliveira, C. B. A., Santos, M. R., Souza, P. S., Santos S. C., Seraphin, J. C. & Ferri, P. H. (2005). Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. *Biochemical Syst. and Ecol*., 33, 275-285.

[25] Thappa, R. K., Agarwal, S. G., Srivastava, T. N. & Kapahi, B. K. (2001). Essential oils of four Himalayan *Nepeta* species. *J Essent Oil Res.* 13:189–191.

[26] Kashyap, T. K., Melkani, A.B., Mathela, C. S., Dev, V., Olmstead, M. M., Hope, H. & Bottini, A. T. (2003). Essential oil from *Nepeta govaniana* Benth. study of its major terpenes. *J Essent Oil Res.* 15:28–30.

[27] Alim, A., Goze, I., Cetin, A., Atlas, A. D., Cetinus, S.A. & Vural, N. 2009. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil *Nepeta nuda* L. subsp. *albiflora* (Boiss.) gams. *Afr J Microbiol Res*. 3:463–467.

[28] Bisht, D. S., Padalia, R. C., Singh, L., Pande, V., Lal, P. & Mathela, C. S. (2010). Constituents and antimicrobial activity of the essential oils of six Himalayan *Nepeta* species. *J Serb Chem Soc.* 75:739–747.

[29] Shafaghat, A. & Oji, K. (2010). Nepetalactone content & antibacterial activity of essential oils from different parts of *Nepeta persica*. *Nat Prod Commun*. 5:625–628.

[30] Bisht, D. S., Joshi, S. C., Padalia, R. C. & Mathela, C. S. (2012). Isoiridomyrmecin rich essential oil from *Nepeta erecta* Benth. and its antioxidant activity. *Nat Prod Res*. 26:29–35.

[31] Rather, M. A., Hassan, T., Dar, B. A., Shawl, A. S., Qurishi, M. A. & Ganai, B. A. (2012). Essential oil composition of *Nepeta raphanorhiza* Benth growing in Kashmir valley. *Rec Nat Prod*. 6:67–70.

[32] Soltanbeigi, A. & Sakartepe, E. (2020). Chemical specification of wild *Salvia tomentosa* Mill. collected from Inner Aegean Region of Turkey. *Z Arznei Gewurzpfla* 24(1): 31-35.

[33] Soltanbeigi, A. & Maral, H. (2022). Agronomic yield and essential oil properties of Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* L. Moench) with different nutrient applications. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia*, 38 (2): 164-175.

www.biodicon.com BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION

ISSN 1308-8084 Online ISSN 1308-5301 Print

Research article/Araştırma makalesi
DOI: 14745/biodicon.2022.1205855
16/1 (2023) 56-62

Changes of oil and fatty acid ratios during germination of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds

Yusuf Ziya AYGÜN [*1], Mehmet MERT [1]
ORCID: 0000-0001-9842-006X; 0000-0002-0457-0532

[1] Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, 31060 Hatay, Türkiye

Abstract

This study aimed to investigate the change of oil ratio and fatty acid contents during germination of industrial hemp seeds. Oil content and fatty acid contents were determined from the samples taken at 0 (control), 24, 48, 72 and 96 hours from industrial hemp (*Cannabis sativa* L. cv. Vezir-55) seeds germinated under controlled conditions. The effects of germination hours on behenic, lignoceric, linoleic, palmitic, gamma-linolenic acid ratios and polyunsaturated fatty acid ratios were statistically significant. The lowest and highest values for these parameters were determined as 0.22-0.35%, 0.40-0.70%, 47.33-49.11%, 7.96-9.01%, 1.29-1.61% and 69.96-71.69%, respectively. Seed oil ratio, arachidic, eicosapentaenoic, lauric, alpha-linolenic, margaric, myristic, oleic, palmitoleic, ricinoleic, stearic acid ratios and saturated and monounsaturated fatty acids ratios were not affected by germination hours. According to the values obtained in the study, changes in the ratio of fatty acids during germination were similar to previous studies, while the selective use and synthesis of fatty acids by the seed differed according to the plant species.

Key words: Industrial hemp, oil ratio, fatty acid, germination, *Cannabis sativa* L.

---------- * ----------

Endüstriyel kenevir (*Cannabis sativa* L.) tohumlarının çimlenme süresince yağ ve yağ asidi oranlarının değişimleri

Özet

Bu çalışma endüstriyel kenevir tohumlarının çimlenmesi boyunca yağ oranı ve yağ asidi içeriklerinin değişimini incelemeyi amaçlamıştır. Kontrollü koşullarda çimlenen endüstriyel kenevir (*Cannabis sativa* L. çeşit Vezir-55) tohumlarından 0 (kontrol), 24, 48, 72 ve 96. saatlerde alınan örneklerden yağ elde edilerek yağ oranı ve yağ asidi içerikleri tayin edilmiştir. Behenik, lignoserik, linoleik, palmitik, gamma-linolenik asit oranları ve çoklu doymamış yağ oranları üzerine çimlenme saatlerinin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bu parametreler için en düşük ve yüksek değerler sırasıyla %0.22-0.35, %0.40-0.70, %47.33-49.11, %9.96-9.01, %1.29-1.61 ve %69.96-71.69 olarak tespit edilmiştir. Tohumdaki yağ oranı, araşidik, eykosapentaenoik, laurik, alfa-linolenik, margarik, miristik, oleik, palmitoleik, risinoleik, stearik asit oranları ve doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri oranları ise çimlenme saatlerinden etkilenmemiştir. Çalışmada elde edilen değerlere göre çimlenme sırasında yağ asitleri oranlarında değişimler olduğu önceki çalışmalarla benzerlik gösterirken yağ asitlerinin tohum tarafından seçici kullanımı ve sentezlenmesinin bitki türüne göre farklılık gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Endüstriyel kenevir, yağ oranı, yağ asidi, çimlenme, *Cannabis sativa* L.

1. Giriş

Kenevir (*Cannabis sativa* L.) Rosales takımının Cannabaceae familyasına dahil tek yıllık otsu bir bitkidir. Çeşitli faydalanma yönleri bulunan kenevirin adaptasyon kabiliyeti yüksek olup üretimi kolay ve maliyeti düşüktür [4]. Bu faydalanılma yönleri açısından öncelikli üretim lif ve psikoaktif maddelerin eldesi olarak temelde iki amaç

[*] *Corresponding author* / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905455463632; Fax.: +905455463632; E-mail: yusufziyaaygun@mku.edu.tr
© Copyright 2023 by Biological Diversity and Conservation Geliş tarihi: 16.11.2022; Yayın tarihi: 15.04.2023 BioDiCon. 1067-161122

gütmektedir. Her iki üretim amacında da elde edilen tohum, yapraklar ve sap artıkları farklı endüstri alanlarında değerlendirilmektedir [1,2,3,4].

Tarihsel kayıtlara göre kenevir tohumları bir analjezik olarak yaralar ve cilt hastalıklarında ve öksürük, sarılık ve kolik için bir tedavi olarak kullanılmıştır [5]. Tohumlarından elde edilen yağ ise boya, vernik, biyodizel ve kozmetik ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır [1]. Kenevir tohumlarının hayvan beslenmesinde de yeri vardır. Ayrıca yağı alındıktan sonra ortaya çıkan küspesi de yem rasyonlarına dahil edilebilmektedir [4]. Bununla beraber tohumların doğrudan insan gıdası olarak kullanımı da mevcuttur. İnsan beslenmesinde çokça omega-3 yağ asidi kaynağı gıda bulunsa da kenevir, yağında 3:1 oranında bulunan omega-6 (linoleik asit) ve omega-3 (linolenik asit) yağ asitlerinin dengesi ile oldukça zengindir [6]. Bu iki yağ asidi için bahsedilen 3:1 oranı aynı zamanda insan beslenmesindeki günlük diyetlerde alınması gerekli olan orandır. Günlük 2500 kalori için bu miktarlar 9-18 g linoleik asit, 6-7 g linolenik asittir [6]. Bu oranlar sağlıklı ve dengeli beslenme için ideal sınırlar olsa da vücuttaki bazı stresler omega-3 yağ asitlerinin tüketimini artırabilmektedir [7]. Ek olarak omega-3 yağ asitleri metabolik hızı artırıp yağ yakımını teşvik etmektedir [6,8].

Bitkilerde sabit yağ oranları ve bu yağlara ait yağ asitlerinin kompozisyonu bitkinin ya da yağ elde edilen bitki kısımlarının olgunluğuna, bitkinin yetiştirildiği dönemdeki biyotik ve abiyotik faktörlere göre değişebilmektedir. Diğer yandan tohumlarda ise çimlenme sırasında bu oranlarda değişiklik gözlenebilmektedir. Bu konuda farklı bitki türlerinde daha önce yapılan çalışmalar bulunmaktadır [13, 14, 15, 16]. Bu sebeple bu çalışma kenevir tohumlarının çimlenmesi sırasında yağ oranlarının ve yağ asidi değişikliklerinin değişimini belirlemeyi amaçlamıştır.

2. Materyal ve yöntem

Çalışmada bitki materyali olarak *Cannabis sativa* türüne ait Vezir-55 çeşidinin tohumları kullanılmıştır. Bu çeşit endüstriyel kenevir olup Δ^9-THC (tetrahydrocannabinol) oranı yok veya çok düşük olarak sınıflandırılmıştır. Tohumlar çimlenme ortamına yerleştirilmeden önce muhtemel patojen kontaminasyonunu engellemek için önce %70 etil alkol ile 1 dakika ardından %2.5 ticari sodyum hipoklorit ile 5 dakika muamele edilmiş ve yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonunun ardından kimyasal bulaşıklığı önlemek adına 5 kez steril saf su ile durulanmıştır [18, 19]. Bu işlemlerin ardından tohumlar ıslak filtre kağıdı metodu [9] ile hiçbir besin maddesi takviyesi yapılmadan çimlenme kabinine yerleştirilmiştir. Çimlenme ortamı 22 °C ve %70 oransal nem ile çalışmanın son gününe kadar sabit tutulmuştur. Çalışmada çimlenmenin 0 (kontrol), 24, 48, 72 ve 96. saatlerinde alınan örnekler 50 °C sıcaklıkta kurutularak çimlenme sonlandırılmış ve bu örnekler yağ ekstraksiyonu için 1 mm çapında öğütülmüştür [10].

Yağ ekstraksiyonu Buchi B811 Ekstraksiyon Cihazı yardımı ile yapılmıştır. Ekstraksiyonda çözücü olarak hekzan kullanılmıştır ve her bir örnek 4 saat işleme tabi tutulmuştur. Bu işlem neticesinde ekstrakttan çözücü uzaklaştırılarak yağ oranı tayin edilmiştir ve kuru madde oranına göre standart hale getirilmiştir.

Yağ asidi metil esterleri eldesi için 100 µL yağ 3 mL n-Heptan ve 400 µL 2 N Metanollü KOH çözeltisine eklenmiştir. Elde edilen yağ asidi metil esterleri GC-MS yardımı ile analiz edilmiştir. Sabit yağ bileşenlerinin tayini Thermo Scientific ISQ Single Quadrupole model gaz kromatograf cihazı ile aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir. TR-FAME MS modeli, %5 Fenil Polisilfenilen-siloheksan, 0.25 mm iç çap x 60 m uzunluk, 0.25 µm film kalınlığına sahip bir kolon kullanılmıştır. Helyum (%99.9) 1 mL dk^{-1} akış hızında taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. İyonizasyon enerjisi 70 eV'ye ve kütle aralığı m/z 1.2-1200 amu'ya ayarlanmıştır. Veri toplama için Tarama Modu kullanılmıştır. MS transfer hattı, MS iyonizasyon, enjeksiyon portu ve ilk kolon sıcaklıkları sırasıyla 250, 220, 220 ve 120 °C olarak belirlenmiştir. Esterleştirilmiş numunenin 1 µL'si otomatik numune alıcı tarafından alınmış ve enjeksiyon portuna yerleştirilmiştir. Numuneler başlangıçta kolon sıcaklığında 1 dakika tutulmuştur. Kolon sıcaklığı dakikada 10 °C artarak 175 °C'ye yükselmiştir ve numuneler burada 10 dakika tutulmuştur. Kolon sıcaklığı dakikada 5 °C artarak 210 °C'ye yükselmiş ve numuneler burada 5 dakika tutulmuştur. Daha sonra kolon sıcaklığı dakikada 5 °C artarak 230 °C'ye çıkarılmış ve burada 6 dakika bekletilerek analiz sonlandırılmıştır. Toplam analiz süresi 38.5 dakikaydı. Her bir bileşiğin yapısı kütle spektrumları kullanılarak Xcalibur programı ile tanımlanmıştır [11, 17].

Tesadüf parsellerinde yürütülmüş olan bu çalışmada elde edilen değerler IBM SPSS Statistics 24 [12] programı ile varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar Duncan çoklu aralık testi ile gruplandırılmıştır.

3. Bulgular

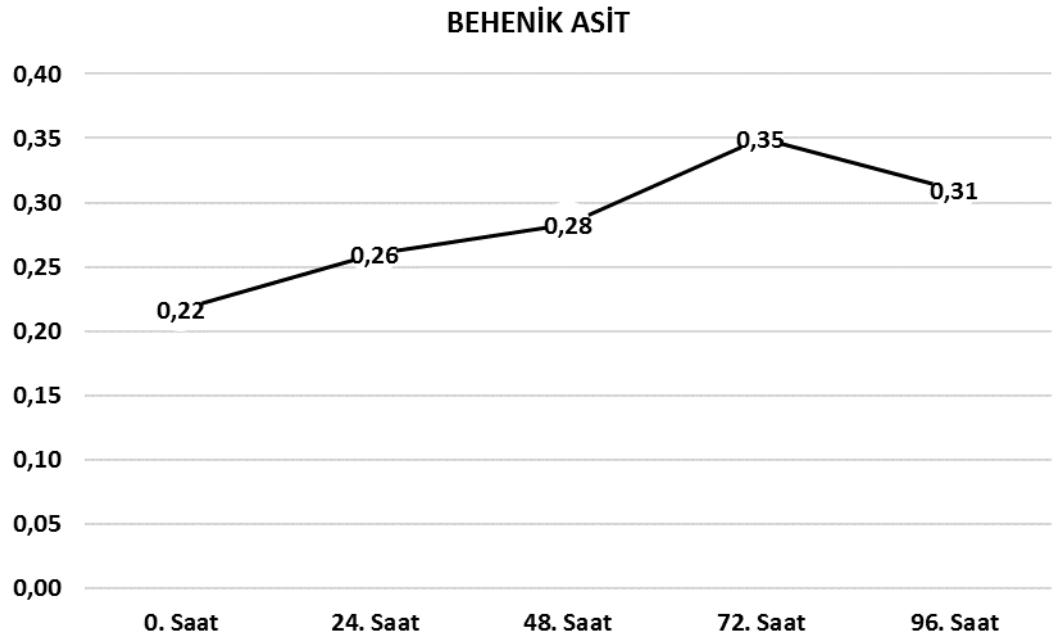
Ekstraksiyon sonucu elde edilen veriler incelendiğinde yağ oranı yönünden çimlenme saatleri arasındaki değişiklik anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. Yağ oranları %39.76-40.47 arasında değişmiştir. Kontrol grubundan 48. saate kadar yağ oranında artış, akabinde düşüş gözlenmiştir (Tablo 1).

Araşidik asit (C20:0) yönünden çimlenme saatleri arasında farklılık önemli bulunmamıştır. Araşidik asit oranları %0.99-1.19 arasında değişmiştir. Çimlenmenin 72. saatine kadar araşidik asit oranı artmış ancak 96. saatte bir miktar düşüş gözlenmiştir. Benzer durum behenik asit (C22:0) oranı için de söylenebilir (Şekil 1). Ancak behenik asit oranları arasındaki farklılık çimlenme günlerinden istatistiksel olarak etkilenmiştir. Özellikle çimlenmenin 0. ve 72. saatleri arasında bu oran anlamlı olarak birbirlerinden ayrılmışlardır (sırasıyla %0.22 ve %0.35).

Tablo 1. Çimlenme saatlerine göre kenevir tohumunun yağ ve yağ asidi oranlarının değişimi

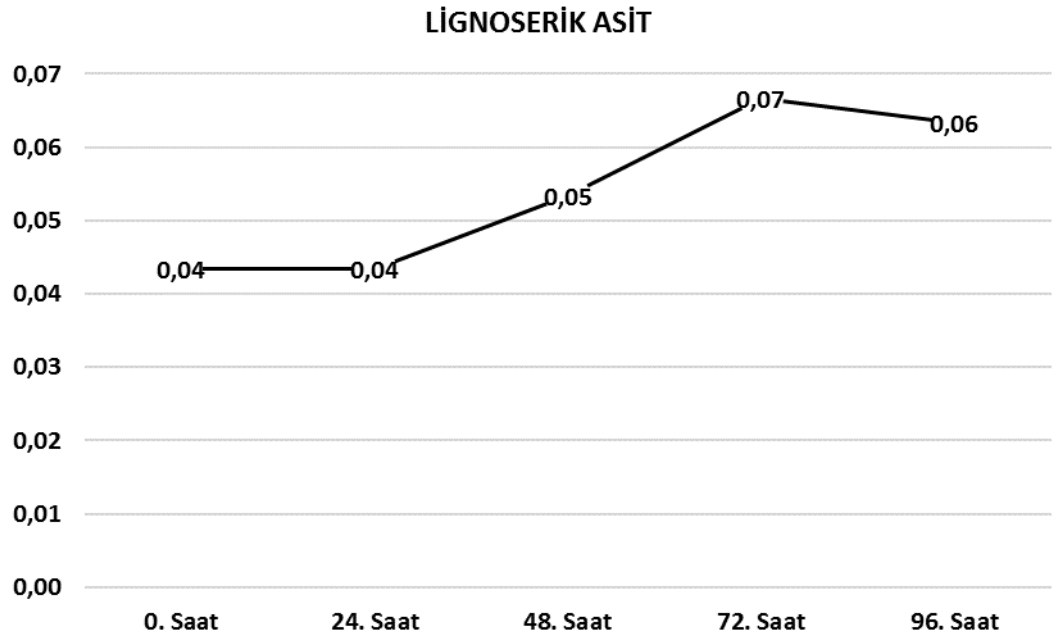
	Çimlenme Saatleri					
	0. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat	P
Yağ oranı	39.82±0.26	39.93±0.12	40.47±0.15	39.90±0.15	39.76±0.22	öd
Araşidik (C20:0)	0.99±0.05	1.03±0.06	1.10±0.03	1.19±0.04	1.13±0.11	öd
Behenik (C22:0)	0.22±0.02 c	0.26±0.02 bc	0.28±0.01 abc	0.35±0.03 a	0.31±0.02 ab	*
Eykosapentaenoik (C20:5)	0.57±0.04	0.57±0.05	0.64±0.04	0.67±0.02	0.69±0.05	öd
Laurik (C12:0)	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.02	İz miktar	öd
Lignoserik (C24:0)	0.04±0.00 b	0.04±0.00 b	0.05±0.00 ab	0.07±0.00 a	0.06±0.01 a	*
Linoleik (C18:2)	**49.11±0.16 a**	**48.56±0.33 ab**	**48.05±0.01 bc**	**47.33±0.16 c**	**48.38±0.3 ab**	**
α-Linolenik (C18:3)	**20.69±0.54**	**20.79±0.18**	**20.82±0.30**	**20.38±0.17**	**20.62±0.23**	**öd**
Margarik (C17:0)	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.02	0.04±0.01	öd
Miristik (C14:0)	0.03±0.00	0.03±0.00	0.04±0.00	0.04±.00	0.03±0.01	öd
Oleik (C18:1)	**15.44±0.42**	**16.22±0.34**	**15.82±0.05**	**16.58±0.35**	**16.24±0.07**	**öd**
Palmitik (C16:0)	**9.01±0.21 a**	**8.65±0.03 ab**	**8.55±0.03 b**	**8.5±0.04 b**	**7.96±0.20 c**	**
Palmitoleik (C16:1)	0.34±0.21	0.14±0.00	0.38±0.24	0.15±0.00	0.12±0.02	öd
Risinoleik (C18:2)	0.03±0.00	0.04±0.01	0.04±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	öd
Stearik (C18:0)	1.93±0.17	2.00±0.13	2.38±0.29	2.63±0.23	2.33±0.24	öd
γ-Linolenik (C18:3)	1.29±0.09 c	1.36±0.10 bc	1.53±0.06 ab	1.55±0.01 ab	1.61±0.03 a	*
Doymuş	12.27±0.31	12.07±0.04	12.46±0.23	12.84±0.2	11.87±0.5	öd
Tekli Doymamış	15.79±0.55	16.36±0.34	16.2±0.26	16.73±0.35	16.37±0.08	öd
Çoklu Doymamış	71.69±0.26 a	71.32±0.33 a	71.09±0.21 a	69.96±0.3 b	71.34±0.43 a	*

öd: önemli değil, *: p<0.05, **<0.01, Major yağ asitleri koyu yazı tipi ile belirtilmiştir.



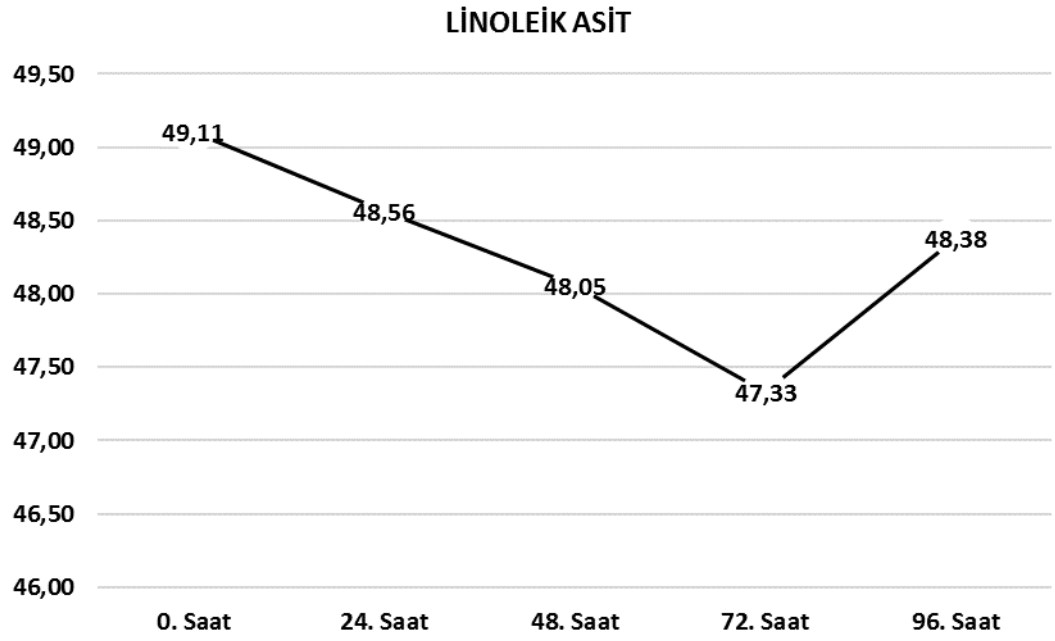
Şekil 1. Çimlenme saatleri yönünden behenik asit oranının değişimi

Eykosapentaenoik asit (C20:5) yönünden çimlenme saatlerinin etkisi önemli bir farklılık oluşturmamıştır. Ancak 0. ve 24. saatlerde %0.57 olan eykosapentaenoik asit oranı ilerleyen saatlerde artma eğilimi göstermiş ve 96. saatte %0.69 olarak en yüksek değere ulaşmıştır (Tablo 1). Laurik asit (C12:0) oranı yönünden de çimlenme saatleri arasında anlamlı bir farklılık oluşmamıştır. Kontrol grubundan 48. saate kadar %0.01 olan laurik asit 72. saatte %0.02 olup son gözlem saati olan 96. saatte ise eser miktarda gözlenmiştir. Lignoserik asit (C24:0) oranı yönünden çimlenme saatlerinin etkisi istatistiksel olarak önemli bir farklılık oluşturmuştur (Tablo 1). En yükek oran %0.07 ile 72. saatte görülürken en düşük oranı %0.04 ile kontrol ve 24. saat paylaşmışlardır. Yine 72. saate kadar görülen artış etkisini yitirmiş ve 96. saatte lignoserik asit oranında küçük bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 2). Bu düşüş yine de farklı bir istatistiksel grup oluşturmamıştır.



Şekil 2. Çimlenme saatleri yönünden lignoserik asit oranının değişimi

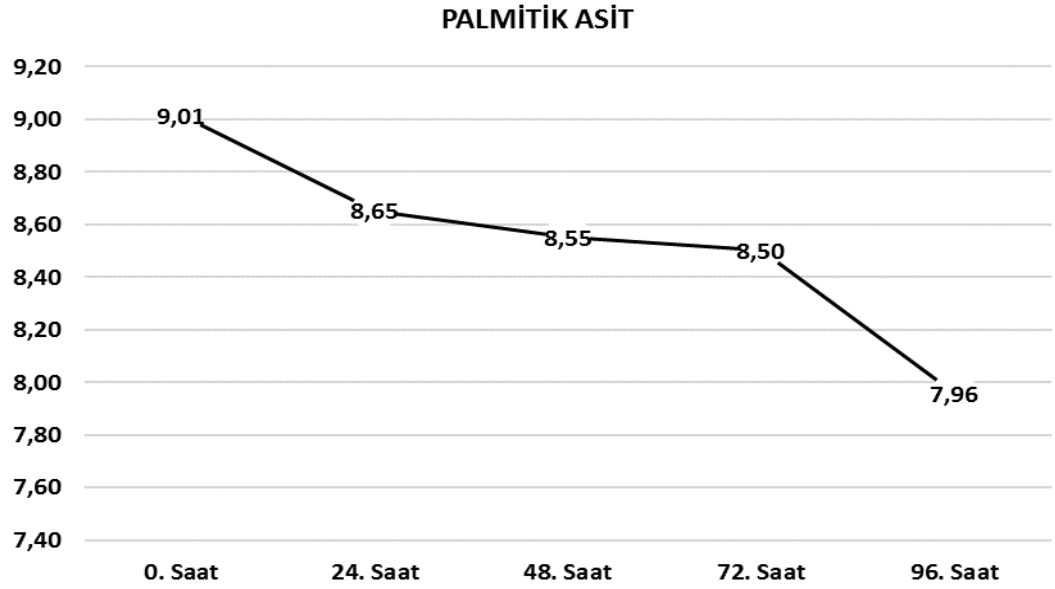
Linoleik asit (C18:2) asit oranı yönünden çimlenme saatlerinin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Tablo 1). En yüksek oran %49.11 ile 0. saatte, en düşük oran ise %47.33 ile 72. saatte gözlenmiştir. Kontrol grubundan çimlenmenin 72. saatine kadar düşen linoleik asit oranı 96. saatte tekrar artış göstermiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Çimlenme saatleri yönünden linoleik asit oranının değişimi

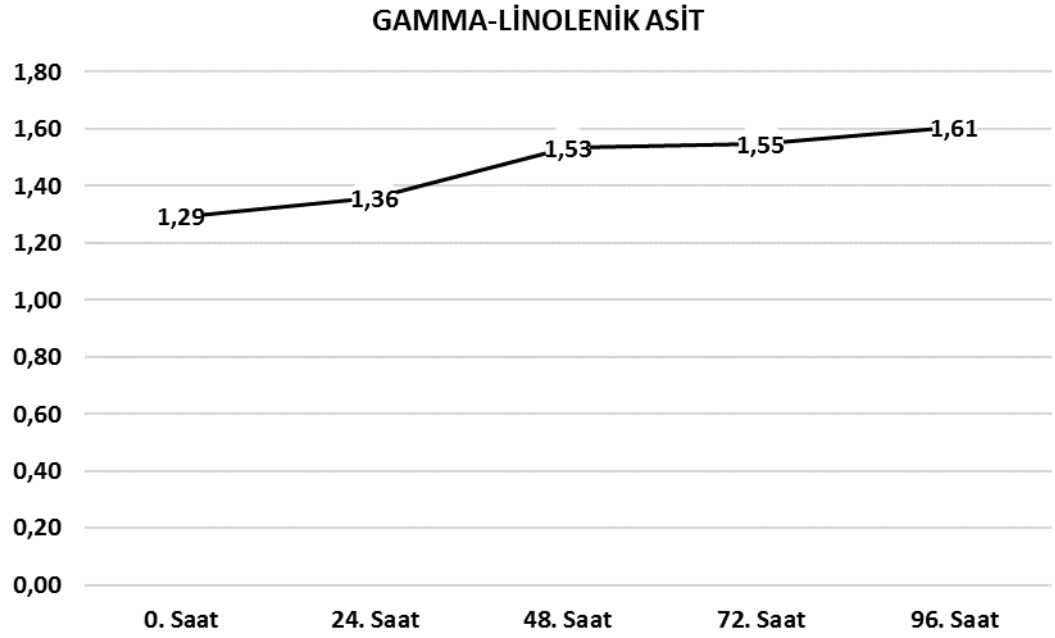
Çimlenme saatlerinin α-linolenik asit (C18:3) oranı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Tablo 1). En düşük oran %20.38 ile 72. saatte, en yüksek oran ise %20.82 ile 48. saatte gözlenmiştir. Margarik asit (C17:0) ise çimlenmenin hiçbir saatinden etkilenmemiş olup 0. saatten 96. saate kadar %0.04 olan oranını korumuştur. Miristik asit (C14:0) oranı ise 48. ve 72. saatlerde %0.04 olup kontrol grubu dahil diğer tüm saatlerde %0.03 olarak kaydedilmiştir. Bu farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Tablo 1). Benzer şekilde oleik asit (18:1) oranı da çimlenme saatlerinden etkilenmemiştir ve oluşan farklılıkların istatistiksel bir önemi gözlenmemiştir. En düşük oleik asit oranı %15.44 ile 0. saatte, en yüksek ise %16.58 ile 72. saatte rapor edilmiştir. Ancak bu farklılıkların istatistiksel olarak önemsiz olmasının yanında, oranlar sıralı bir şekilde artış ve azalış göstermemişlerdir. Palmitik asit (C16:0) yönünden çimlenme saatlerinin etkisi istatistiksel olarak önemli farklılıklar oluşturmuştur (Tablo 1). Çalışmanın 0.

saatinde %9.01 olan palmitik asit oranı 96. saate kadar doğrusal bir düşüş yaşamış ve %7.96 ile en düşük değeri göstermiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Çimlenme saatleri yönünden palmitik asit oranının değişimi

Palmitoleik asit (C16:1) oranı yönünden çimlenmenin farklı saatlerinin etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. En düşük oran %0.12 ile 96. saatte, en yüksek oran ise %0.38 ile 48. saatte gözlenmiştir. Ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz olmakla beraber çimlenme saatlerinin değişimi ile sıralı bir şekilde artış veya azalış göstermemiştir. Risinoleik asit (C18:2) oranı yönünden de çimlenme saatleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark oluşmamıştır. Çimlenmenin 0. saati %0.03 olan bu oran devam eden tüm saatler %0.04 oranında sabit kalmıştır. Stearik asit (C18:0) oranı kontrol grubundan (% 1.93) 72. saate kadar artış göstermiş ve %2.63'e ulaşmıştır. Bu oran çimlenme boyunca stearik asit yönünden en yüksek oran olup 96. saatte düşüş gözlenmiştir ve %2.33 olarak kaydedilmiştir (Tablo 1). Ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Gamma-linolenik asit (C18:3) oranı yönünden ise çimlenme saatleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar oluşmuştur. En düşük oran %1.29 ile 0. saatte, en yüksek oran ise %1.61 ile 96. saatte görülmüştür. Çimlenme süresince gamma-linolenik asit oranları artış göstermiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Çimlenme saatleri yönünden gamma-linolenik asit oranının değişimi

Yağ asitleri kompozisyonunun doymuş, tekli doymamış ve çoklu doymamış yağ asidi oranları incelendiğinde doymuş yağ ve tekli doymamış yağ oranları çimlenme saatlerinden etkilenmemiştir. Çoklu doymamış yağ oranlarının çimlenme saatlerine göre farklılığı ise istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Çimlenmenin başlangıcından 72. saatine kadar düşüş gözlenmiş ancak sadece 72. saat istatistiksel olarak ayrı bir grupta yer almıştır. Gözlem alınan son saat olan 96. saatte ise tekrar yükselmiştir.

4. Sonuçlar ve tartışma

Kenevir tohumlarının çimlenmesi süresince yağ oranı ve yağ asidi kompozisyonundaki değişimlerin incelendiği bu çalışmada yağ oranları çimlenme boyunca anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Ancak behenik asit, lignoserik asit, linoleik asit, palmitik asit ve gamma-linolenik asit oranları çimlenme süresince önemli değişiklikler göstermiştir. Tohumların çimlenme ve gelişim sürecinde yağ asitleri kompozisyonlarının değişiminin iki açıdan çok önemli olduğu anlaşılmaktadır. Bunlar bitki fizyolojisinin incelenmesi ve yağdan faydalanılma amaçlarıdır. Çimlenme ve fide büyümesi sırasında tohumların yağ asitlerini seçici kullanma eğilimleri ve yağ asidi sentezleri ve tüm bu sürecin incelenmesi tohum ve bitki fizyolojisi açısından önemli bir konudur. Diğer bir konu ise tohumdan elde edilecek yağın kullanım alanı ve bu amaca olan uygunluğudur. Örneğin, Yaniv ve ark. [13] *Sinapis alba* L. ve *Crambe abyssinica* L. tohum yağlarının sırasıyla %53 ve %55 olan erusik asit oranlarının çimlenmenin 8. gününde yüksek oranlarda düştüğünü belirtirken, 15. günde ve özellikle ışıkla uyarılan fidelerin köklerinde bu oranın %5'i geçmediğini bildirmiştir. Ek olarak köklerde linolenik asit oranı fazlaca artarken palmitik asit ve stearik asit sentezlenerek bu yağ asitlerinin oranları da yaklaşık on kat artış göstermiştir [13]. Bu ise bitki tohumlarından elde edilen yağın kullanım amacına yönelik bir uygulamayı beraberinde getirmektedir. Erusik asit tüketiminin insan sağlığı açısından sınırlandırılması sebebi ile bu bitkilerden elde edilecek yağlar yalnızca tohumun çimlendirilmesi süreci ile gıda olarak tüketimine daha uygun hale getirilebilmektedir. Ancak bitkisel yağların gıda olarak tüketiminin yanı sıra endüstrinin birçok alanında hammadde kaynağı olması da bir üretim amacıdır.

Cho ve ark. [14] başlıca yağ asitleri oleik asit, linoleik ve eikosenoik asit olan kolzada (*Brassica napus* L.) 60 saatlik çimlenme süresince yağ asidi değişimlerini incelemiştir. Oleik ve stearik asitlerde düşüş gözlenmişken linolenik, eikosenoik ve erusik asitlerde önce düşüş ve ardından kademeli artış rapor edilmiştir [14]. Bunun tam tersi durum ise çalışmamızda araşidik asit, behenik asit, laurik asit, lignoserik asit, miristik asit ve stearik asit için 72. saate kadar artış sonra düşüşle kendini göstermiştir. Palmitik asit oranının zamanla azalması, eykosapentaenoik asit oranının ise zamanla yükselmesi durumu Wanasundara ve ark. [15]'ın keten (*Linum usitatissimum* L.) tohumlarında yaptığı çalışmanın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Elde edilen bulgulara göre kenevir tohumlarının çimlenmesi süresince palmitik asit oranı önemli düşüşler gösterirken Mostafa ve ark. [16]'a göre ise soya (*Glycine max* L.) tohumlarında çimlenme boyunca palmitik asit oranları artmıştır. Bu durum tohumların çimlenmesi sırasında yağ asidi oranlarındaki değişimin bitki türlerinin yağ asitlerini seçici kullanımı ve sentezlemesindeki fizyolojik farklılığı göstermektedir.

Kaynaklar

[1] Vandenhove, H., & Van Hees, M. (2005). Fibre crops as alternative land use for radioactively contaminated arable land. *Journal of Environmental Radioactivity*, 81(2-3), 131-141.

[2] Salentijn, E. M., Zhang, Q., Amaducci, S., Yang, M., & Trindade, L. M. (2015). New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products*, 68, 32-41.

[3] Fike, J. (2016). Industrial hemp: renewed opportunities for an ancient crop. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 35(5-6), 406-424.

[4] Mert, M. (2020). Lif bitkileri (3. Baskı). Ankara: Nobel Yayınları.

[5] Leson, G., & Pless, P. (2002). Hemp seed and hemp oil. Cannabis and cannabinoids: *Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Potential*, 411-425.

[6] Erasmus, U. (1999). Fats that heal, fats that kill. Burnaby: Alive Books.

[7] Leizer, C., Ribnicky, D., Poulev, A., Dushenkov, S., & Raskin, I. (2000). The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition. *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods*, 2(4), 35-53.

[8] Simopoulos, A. P. (1994). Fatty acids: Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals. New York: Chapman & Hall.

[9] ISTA (1996). International Rules for Seed Testing. Rules. *Seed Science and Technology* 24. Supplement.

[10] Ertekin, İ., Atış, İ., Yılmaz, Ş., Can, E., & Kızılşimşek M. (2019). Comparison of shrub leaves in terms of chemical composition and nutritive value. *KSU Journal of Natural Sciences*, 22, 781-786.

[11] Türkmen, M. & Koçer, O. (2021). Variation of components in laurel (*Laurus nobilis* L.) fixed oil extracted by different methods. *International Journal of Chemistry and Technology*, 5(2), 167-171.

[12] IBM Corp. Released. (2016). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY: IBM Corp.

[13] Yaniv, Z., Shabelsky, E., Schafferman, D., Granot, I., & Kipnis, T. (1998). Oil and fatty acid changes in Sinapis and Crambe seeds during germination and early development. *Industrial Crops and Products*, 9(1), 1-8.

[14] Cho, B. M., Yoon, S. K., & Kim, W. J. (1985). Changes in amino acids and fatty acids composition during germination of rapeseed. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 17(5), 371-376.

[15] Wanasundara, P. K. J. P. D., Wanasundara, U. N., & Shahidi, F. (1999). Changes in flax (*Linum usitatissimum* L.) seed lipids during germination. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(1), 41-48.

[16] Mostafa, M. M., Rahma, E. H., & Rady, A. H. (1987). Chemical and nutritional changes in soybean during germination. *Food Chemistry*, 23(4), 257-275.

[17] Türkmen, M., Eren, Y., Aygün, Y. Z. & Ertekin, E. N. (2022). Determination of seed yield, quality and fixed oil components of different basil (*Ocimum basilicum* L.) genotypes: Evaluation of fatty acid profile by PCA biplot analysis. *Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences*. 8(3), 453-462. DOI: 10.28979/jarnas.1052498

[18] Ertekin, E. N. & Bilgen, M. (2021). Bazı ağır metallerin at dişi mısır (*Zea mays* L.)'da çimlenme ve erken fide gelişimi üzerine etkileri. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 14 (2), 198-207. DOI: 10.46309/biodicon.2021.889901

[19] Aygün, C., Olgun, M., Sever, A. L., Kara, İ., Erdoğdu, İ. & Atalay, A. K. (2011). Evaluation of germinabilities of different shrubs by some methods. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 4(3), 1-6.

www.biodicon.com BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION

ISSN 1308-8084 Online ISSN 1308-5301 Print

Research article/Araştırma makalesi
DOI: 10.46309/biodicon.2023.1209696
16/1 (2023) 63-69

Association of PTEN gene polymorphisms, protein levels and endometrial cancer: A hospital-based case-control study

Emine YAGCİ*[1], Hikmet MELİKE OZTURK[1], Tufan OGE[2], Cansu OZBAYER[3], Hulyam KURT[1]
0000-0003-2179-1318, 0000-0001-5395-9205, 0000-0002-1951-9713,0000-0002-1120-1874, 0000-0003-2433-9925

[1]Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Eskisehir, Türkiye
[2] Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Medicine, Department of Gynecology, Eskisehir, Türkiye
[3] Kutahya Health Sciences University, Medical Faculty, Department of Medical Biology, Kutahya, Türkiye

Abstract

Endometrial cancer is a type of cancer that develops in the inner lining of the uterus, called the endometrium. After breast, lung, and colon cancer, endometrial cancer is the most prevalent malignancy of the female genital system in industrialized nations like North America and Europe.

Phosphatase and Tensin homolog (PTEN), deleted on chromosome 10, is a tumor suppressor gene located on chromosome 10q23.31, which encodes a 403 amino acid protein with both lipid and protein phosphatase activities. One of the most common genetic abnormalities identified in human malignancies are somatic mutations in the PTEN gene. The tumor suppressor activity of the PTEN enzyme is reduced or completely lost as a result of PTEN gene mutations.

Considering this information, it is thought that PTEN gene polymorphisms may be associated with the pathogenesis of the disease. The purpose of our study is to determine the relationship between functional PTEN polymorphisms IVS4 (–/+) and -9 C/G and endometrial cancer.

DNAs belonging to 63 endometrial cancer patients and 63 control individuals were genotyped by PCR-RFLP method for 2 genetic variants of PTEN IVS4 (–/+) and -9 C/G gene. The expression level of PTEN protein was measured by the Elisa method from serum samples. Our results were evaluated with appropriate statistical methods.

As a result of our study, no statistically significant difference was found in the risk of endometrial cancer and genotype frequencies of –9 C/G and IVS4 (-/+) variants ($p > 0.05$). It was detected that the serum level of PTEN lessened significantly in patients with endometrial cancer in comparison to the control ($p < 0.001$).

As a consequence, there was no evidence that the PTEN gene variations -9 C/G and IVS4 (-/+), whose efficacy we examined in our investigation, increased the incidence of endometrial cancer in the Turkish population. However, endometrial cancer patients were shown to have lower serum levels of the tumor suppressor protein PTEN.

Key words: *Endometrial cancer, PTEN, polymorphism, IVS4 and -9C/G.*

---------- * ----------

PTEN gen polimorfizmleri, protein seviyeleri ve endometrium kanseri ilişkisi: Hastane bazlı vaka-kontrol çalışması

Özet

Endometrium kanseri endometrium olarak isimlendirilen rahim iç zarında ortaya çıkan kanser türüdür. Endometrium kanseri Kuzey Amerika ve Avrupa bölgelerde kadınlarda meme, akciğer ve kolon kanserinden sonra 4. sıklıktadır ve kadın genital sisteminde en sık görülen kanserdir.

Kromozom 10 (PTEN) üzerinde silinen fosfataz ve Tensin homologu, hem lipit hem de protein fosfataz aktivitelerine sahip olan bir 403-amino asit proteinini kodlayan, kromozom 10q23.31'de bulunan bir tümör baskılayıcı genidir. PTEN genindeki somatik mutasyonlar, insan kanserlerinde bulunan en yaygın genetik değişiklikler arasındadır. PTEN genindeki mutasyonlar PTEN enziminin tümör süpresör fonksiyonunu azaltır veya ortadan kaldırır. Verilen bilgiler eşliğinde Bu çalışmada endometrium kanserinde arttığı bildirilen PTEN ekspresyonunun ve olası azalan PTEN

* *Corresponding author* / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902222392979; Fax.: +902222392979; E-mail: eminetsci@gmail.com
© Copyright 2023 by Biological Diversity and Conservation Geliş tarihi: 28.11.2022; Yayın tarihi: 15.04.2023 BioDiCon. 1072-281122

protein ekspresyon seviyesi nedeninin fonksiyonel PTEN polimorfizmleri (IVS4 (rs no: 3830675) ve -9 C/G) olup olmadığını ve endometrium kanseri ile PTEN gen polimorfizmleri arasındaki ilişkinin hastalık patogenezine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

63 endometrium kanser hastası ve 63 kontrol bireye ait DNA'lar PTEN IVS4 (–/+) ve -9 C/G, genine ait 2 genetik varyant için PCR-RFLP yöntemi ile genotiplendirildi. PTEN protein seviyesi serum örneklerinden Eliza yöntemi ile belirlendi. Sonuçlarımız uygun istatistik yöntemler ile değerlendirildi.

Çalışmamız sonucunda –9 C/G ve IVS4(–/+) varyantlarına ait genotip frekansları ile endometrium kanseri riski arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p>0.05$). PTEN serum seviyeleri kontrole göre endometrium kanserli hastalarda anlamlı oranda düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$).

Sonuç olarak araştırmamızda etkinliğini araştırdığımız PTEN genine ait –9 C/G ve IVS4(–/+) varyantların, Türk toplumunda endometrium kanser riski ile ilişkili bulunmadı. Ancak bir tümör süpresör olan PTEN proteinin serum seviyelerinin endometrium kanserli hastalarda azaldığı belirlendi.

Anahtar kelimeler: *Endometrium kanseri, PTEN, polimorfizm, IVS4(–/+), -9 C/G.*

1. Introduction

The endometrium is a structure that covers the uterus and the inner layer of the uterus, is prepared for a possible pregnancy every month by shedding a layer in each menstrual period, and in case of pregnancy, the baby clings. Cancers originating from here are also called endometrial cancer. Worldwide, approximately 142,000 women show endometrial cancer each year, and roughly 42,000 die from this cancer. It ranks fourth among cancers seen in women [1].

About 75% of all endometrial carcinomas are of the endometrioid type. Various endometrioid carcinoma variants, including secretory and villoglandular, with squamous differentiation with ciliated cells have been identified. Based on their molecular characteristics, Type 1 and Type 2 endometrial malignancies are separated. Long-term estrogen exposure is the cause of type 1 endometrial cancer, which spreads more slowly. This variety is typically diagnosed sooner, has a better prognosis, and is linked to obesity [2].

About 10-20% of sporadic endometrial carcinomas, termed type 2, are not estrogen-dependent and most can be associated with atrophic endometrium. Type 2 usually occurs at a later age, approximately 5-10 years after type 1 tumors, estrogen and progesterone receptor expression is usually negative. Most endometrial cancers, especially type 1, are hormone-dependent. The most important risk factor associated with endometrial cancer is exposure to excessive amounts of the hormone estrogen [3].

Previous studies have shown that in endometrial carcinomas, PTEN inactivation occurs as a result of a mutation in chromosome 10q23, which acts as a tumor suppressor, by coding a protein with tyrosine kinase effect, resulting in loss of expression [4]. PTEN mutations are observed in 83% of endometrial cancers [5].

PTEN is a well-known tumor suppressor gene with germline mutations that is one of the most often mutated genes in human cancers and causes cancer susceptibility syndromes. It was first discovered in 1997. The protein, which has a tensin-like domain and a phosphatase catalytic domain, is expressed in all body tissues [4, 6].

The PTEN gene, which is found on chromosome 10q23, produces a 403 amino acid, 48 kDa dominant protein that has sequence homology with tensin, oxylin, and exon 9 of the tyrosine phosphatase superfamily. The catalytic N-terminal phosphatase domain, which is necessary for membrane binding, and the C2 domain, which is present in the human PTEN crystal structure, are two strongly connected domains [7].

The PI3K/AKT cascade, which regulates cell growth, proliferation, survival, and metabolism, is negatively regulated by PTEN. This pathway's regulation is essential for oncogenic transformation [6]. PTEN is a crucial negative regulator of the signaling pathway made up of class I phosphoinositide 3 kinase (PI3K), AKT, and the mechanical target of rapamycin (mTOR) and is essential for regulating some crucial cellular functions, including cell growth, proliferation, survival, and metabolism. Lipid phosphatase PTEN prevents PI3K signal activation by turning PIP3 which PI3K produces back to PIP2. Loss of PTEN results in non-regulation of PIP3 levels, which promotes hyperactivation of the pathway and, as seen in experiments with PTEN-deficient tumor cell lines, immortalized fibroblasts, and tumors developing in PTEN-deficient mice causes cellular transformation and carcinogenesis [7].

Beyond its lipid phosphatase function, PTEN also promotes protein phosphatase activity, which results in actions unrelated to PI3K-AKT signaling. A study of PTEN mutations that lose lipid phosphatase but retain protein phosphatase activity in cell lines has shown that PTEN has multiple functions in regulating numerous novel protein substrates and cell adhesions via focal adhesion kinase 1 (FADK1) and non-receptor proto-oncogene tyrosine-protein kinase SRC10 [8].

PTEN has a critical role in managing the tumor microenvironment, and the initiation, development, and spread of illness by interacting with cancer cells, the stromal compartment, and the immune system at various levels. This is in addition to its ability to limit tumor growth. Loss of PTEN causes the tumor microenvironment to change by increasing tumor angiogenesis, macrophage recruitment, and malignant transformation in breast stromal fibroblasts [6].

PTEN deletions and mutations that impair or inactivate PTEN function typically arise during tumor formation. Glioblastomas, melanomas, and endometrial, prostate, colon, and bladder cancers are frequently reported to have genetically inactivated PTEN, while breast and lung malignancies have been discovered to have decreased PTEN expression [4, 6].

PTEN deletion, mutation, or change is present in a large number of sporadic cancers. Approximately 80% of people with Cowden syndrome have germline mutations that result in loss of PTEN function or low PTEN levels. A database of 1,904 PTEN mutations for 30 different tumor types is kept at the Sanger Institute. While there are greater frequency mutations in particular amino acids, known as mutation hotspots, PTEN mutations, minor insertions, and deletions seem to occur in sporadic cancers in this database. However, these hotspots do not only contain mutations in one form of cancer. For instance, although there have been more than 250 distinct PTEN mutations found in endometrial cancers, 19% of the 632 published alterations are related to the amino acid Arg130 in the phosphatase catalytic region. Mutations in Arg130 occur in other tumor types (4% of central nervous system tumors) but are most common in endometrial and ovarian tumors (19%) [9].

Endometrial hyperplasia, which is regarded to be a precursor lesion for endometrial cancer, has PTEN mutations as well. Short insertion or frameshift mutations, which are indicative of microsatellite instability, are present in the majority of endometrial cancers. Particularly, endometrial carcinomas linked to familial nonpolyposis colon cancer syndrome exhibit PTEN frameshift mutations (HNPCC). Additionally, DNA mismatch repair gene polymorphisms influence the incidence of endometrial cancers, indicating that alterations in PTEN that cause endometrial tumors may come from DNA repair processes [9].

In view of the available data, the goal of our investigation was to examine the association between endometrial cancer, PTEN IVS4 (-/+), and -9 C/G gene polymorphisms, PTEN protein serum level, and these variables.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

The subject group consists of 63 cases with endometrium cancer and 63 control individualities of Turkish origin signed from the Department of Gynecology, Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine in Eskisehir, Turkey.

2.2. Ethics Committee Approval

Informed concurrence by our protocol, and approval by the Ethics Committee of Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine (approval number 2018/86), was attained from all cases and control individualities. We conducted the study by the ethical principles of the 1975 declaration of Helsinki.

2.3. DNA Isolation and Purity Determination

Genomic DNA isolation was performed from the collected blood samples using the PureLinkTM Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA). The amount and purity of DNA samples were measured with NanoDrop (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer uDrop, Thermo Scientific™). The DNA was diluted with elution solution to a stock concentration of 50 ng/µL and stored at -20 °C until use.

2.4. Polymerase Chain Reaction

PCR- RFLP system was used in the genotyping phase of our study. Applicable primer sequences were identified for PTEN IVS4(-/) and-9 C/ G gene variants, and gene regions were amplified by primers and PCR mix. A twenty-five (25) µl admixture was prepared for PCR amplification. PCR amplification was made ready with DNA, master mix (OneTaq ® Quick- cargo ® 2X Master Mix with Standard Buffer, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), forward-revers primers (Table1), and water (ddH2O). PCR reactions were performed in Bio-Rad Thermal Cycler (T100 ™, Foster City, CA, USA). After amplification, shearing was done with restriction endonucleases, and the cut products were subordinated to agarose gel electrophoresis to determine the genotype frequency with the gel attestation system. The sequences of PCR- RFLP primers, restriction enzymes, and annealing temperatures of manuals are presented in Table 1.

Table 1. Forward and reverse primer pairs designed for PCR, annealing temperatures and restriction enzymes

Gene	Forward (5'-3') Primer Sequence	Reverse (5'-3') Primer Sequence	Annealing temperature	Restriction enzyme
PTEN -9 C/G	GCAGCCGTTCGGAGGATT	GCCGCAGAAATGGATACAGG	57.3 ºC	*DraII*
PTEN IVS4 (-/+)	GGGGGTGATAACAGTATCTA	CTTTATGCAATACTTTTTCCTA	54 ºC	*AflII*

2.5. Elisa

The blood taken from the patient and control groups was placed in vacuum tubes with 5 ml gel. Then it was centrifuged for 15 min at 2500 g for serum. Supernatants were carefully collected. Serum PTEN levels were measured with the YL Biont Human Elisa Kit (Shanghai YL Biotech Co., Ltd) following the manufacturer's instructions.

Serum samples, standards, and reactants were prepared by the kit protocol. Biotin-stained secondary antibodies were annexed to the prepared samples and standards and incubated at 37ºC for 60 minutes. The plate was washed 5 times. Chromogens A and B were then added. After 10 min of incubation at 37ºC, the stop solution was added. Samples were read at 450 nm in a Thermo Scientific Multiskan GO spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finland) device within 10 minutes. The results were calculated according to the standard curve plot.

2.6. Statistical analysis

Continuous data are presented as Mean ± Standard Deviation. Categorical values are shown as percentages (%). Shapiro Wilk test was used to determine the suitability of the data for normal distribution. Mann-Whitney U test was used compared to the groups that did not fit the normal distribution, and Pearson Chi-Square and Monte Carlo Pearson Chi-Square analyzes were used in the analysis of the cross tables.

Allele frequencies and genotype distributions, Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) values were determined with the FINNETI program (https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl). P values less than 0.05 were accepted as substantial in all analyses.

3. Results

A total of 126 individuals, 63 patients with endometrial cancer and 63 control individuals, were included in our study. PCR-RFLP method was used for genotyping.

The amplification product for the PTEN -9 C/G region is 371 bp. In the presence of variation, *DraII* is cut into 266 and 105 bp fragments as a result of restriction enzyme cleavage. The uncut product has the CC genotype (371 bp), while the 371-266-105bp product CG has the 266-105bp product GG genotype. In our study, all individuals had the ancestral CC genotype and the PCR-RFLP image for the PTEN-9 C/G region is presented in **Figure 1**.

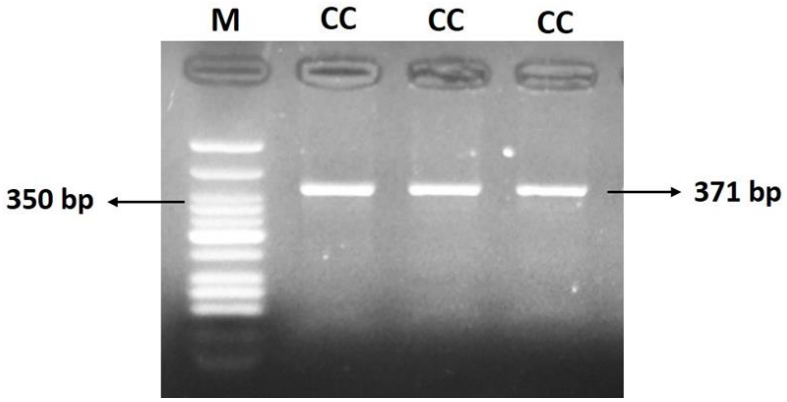


Figure 1. PCR product cut by the *DraII* restriction for the PTEN –9 C/G polymorphism. M: Marker 50bp, CC: 371bp

The amplification product for the PTEN IVS4 (-/+) region is 403 bp. In the presence of variation, a 5bp insertion occurs as a result of AflII restriction enzyme cleavage, and fragments of 335 and 73 bp are formed. Uncut product (ancestral genotype, no insertion,-/-) 403 bp, in the presence of insertion (5bp insertion) heterozygous genotype (-/+) 403-335-73 bp product, homozygous genotype (+/+) 335-73 bp constitutes a product. (+/+) genotype was not determined in our study. The PCR-RFLP image for the PTEN IVS4 (-/+) region is shown in Figure 2.

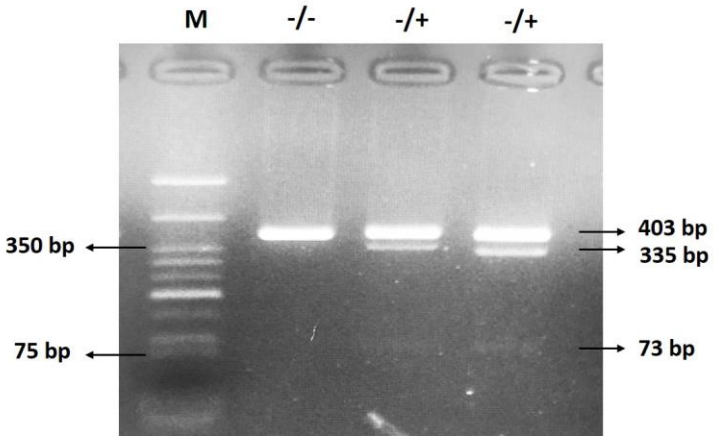


Figure 2. PCR product cut by *AflII* restriction for PTEN IVS4(–/+) polymorphism. M: Marker 50 bp, -/-: 403 bp, -/+: 403, 335, 73 bp

The genotype frequencies for PTEN IVS4 (-/+) and -9 C/G polymorphisms in endometrial cancer patients and controls are given in Table 3, respectively.

As a result of our study, when the PTEN gene IVS4 (-/+) genotypes of the control group and endometrial cancer were compared, no statistically significant difference was determined in point of disease risk and genotype frequency ($p>0.05$) (Table 2).

Table 2. Genotype and allele frequencies of PTEN IVS4 (-/+) polymorphisms in the endometrium cancer and control

Gene IVS4 (-/+)	**Allele**		Statistic P	OR (95 % CI)	**Genotype**			Statistic P	HWE
	- n(%)	+ n(%)			-/-	-/+	+/+		
Control	87 (69.0)	39 (31.0)	0.679	0.892 (0.520-1.532)	24	39	0	0.586	<0,001
Endometrium cancer	90 (71.4)	36 (28.6)			27	36	0		0.001
OR (95 % CI) (Risk allele +)									
Heterozygous -/- vs -/+		Homozygous -/- vs +/+		Dominant -/- vs -/+ + +/+		Recessive -/- + -/+ vs +/+		Armitage's trend test	
0.821 (0.402-1.673) p=0.586		0.891 (0.017-46.621) p=1.000		0.821 (0.402-1.673) p=0.586		1.000 (0.020-51.179) p=1.000		Common OR: 0.821 p=0.586	
OR: Odds ratio, CI: Confidence interval, HWE: Hardy-Weinberg equilibrium									

For the -9C/G variant of the PTEN gene, all of the patient and control individuals were determined to have the CC genotype, which is the ancestral genotype. Since there is no genotype difference, statistical evaluation was not made for this region.

The mean serum PTEN levels of endometrial cancer and control groups are presented in Table 4. The mean serum PTEN level of the endometrial cancer group was 5.322±1.62, and the mean serum PTEN level of the control group was 6.822 ± 2.72. PTEN serum levels were found to be significantly lower in patients with endometrial cancer in comparison to controls ($p<0.001$) (Table 3).

Table 3. Serum PTEN levels in the study population

Group	Control **(M ± SD) (n=63)**	Endometrium cancer **(M ± SD) (n=63)**	Statistic
PTEN (ng/ml)	6,822 ± 2,72	5,322 ± 1,62	p<0,001
Total **(n=126)**	6,072 ± 2,35		
M ± SD : Mean ± Standard Deviation			

4. Conclusions and discussion

Endometrial cancer is the most common gynecological cancer and the sixth most common cancer among women worldwide. The 5-year survival of patients with stage I endometrial carcinoma is 75-88%, whereas it is 50% for stage III disease and 15% for stage IV disease. For this reason, early detection can increase survival rates [10].

Determination of the basic molecular mechanisms related to cancer biogenesis and cancer, its prevention, early diagnosis, and the development of drugs and treatments for effective treatment are of great importance for the prevention and treatment of cancer, one of the most important diseases of our time. A study aimed at evaluating the efficacy of cancer gene mutations from endometrial biopsies to predict the development of malignant lesions used fifty cancer genes targeting a next-generation sequencing panel to search for mutations in matched non-cancerous and malignant samples. As a result of all biopsies taken from cancer tissues, mutations were detected in one or more of the APC, CTNNB1, FBXW7, HNF1A, KRAS, MTOR, NRAS, PIK3CA, PTEN, RB1, and TP53 genes. In addition, 50% of biopsies from matched non-cancerous tissues were found to exhibit mutations in the PTEN, KRAS, or PIK3CA genes. These findings indicate that the detection of pathogenic mutations in oncogenes or tumor suppressor genes in benign situations is associated with the risk of developing the malignant disease. Given the advantage of identifying mutations several months or years before the onset of malignancy, this information is invaluable as it warrants closer monitoring of patients who show such molecular changes in non-cancerous uterine mass [10].

Therefore, in our study, we planned to determine the relationship between PTEN genetic variants and protein levels, which have an active role in cancer, and endometrial cancer. Identification of these variants, which are seen to be studied very limitedly, will make an important scientific contribution to the field of prevention, early diagnosis, and treatment of endometrial cancer.

In this part of our study, the relationship between PTEN IVS4 (-/+) and -9 C/G gene variants, which have substantial functions in the pathogenesis of endometrial cancer, and PTEN protein levels and the disease will be discussed.

PTEN takes charge of cell cycle regulation by preventing cells from growing and dividing too quickly [11]. The tumor suppressor gene PTEN is a gene that is frequently mutated in endometrioid-type endometrial cancers (mutation rate is 30-50%). PTEN can exert its tumor suppressor function by inhibiting very rapidly growing and dividing cells as a negative regulator in the PI3K signaling pathway and can act as a regulator in cell cycle regulation, promoting apoptosis and cell adhesion, migration, diffusion, and differentiation. Loss of PTEN activity has been described in several human malignant cancers. [11-13].

PTEN inactivation occurs as a result of a mutation and results in loss of expression [14]. It has been stated that mice with homozygous deletion of the PTEN gene die in the early stages of embryogenesis, while those with heterozygous deletion show normal development but pose a risk for many cancers, including endometrial carcinoma [15-17].

Sun et al. (2014), in a meta-analysis study investigating whether the PTEN IVS4 polymorphism is associated with cancer risk, including seven case-control studies, individuals with the PTEN IVS4 (-/-) genotype compared to the (+/+) genotype have an increased risk of cancer and digestive system cancer shown to be significantly related. Allele analysis also detected that the (-) allele was substantially associated with increased cancer risk and gastrointestinal (tract) cancer compared to the (+) allele. In our study, it was determined that the (-/-) genotype and (-) allele were higher in endometrial cancer patients in comparison to the control, but this difference was not statistically important. In studies where the number of samples is increased, this difference may become significant as stated in the meta-analysis [18].

The PTEN IVS4 polymorphism (rs3830675), formed by ATCTT insertion 109 bp downstream of exon 4, is one of the common PTEN polymorphisms. Recently, there are some studies investigating the association of PTEN IVS4 polymorphism with different cancer risks. Recently, there are some studies investigating the association of PTEN IVS4 polymorphism with different cancer risks. The PTEN IVS4 polymorphism has been associated with several types of cancer. Wang et al. (2015) showed in their meta-analysis studies that the PTEN IVS4 (-/-) genotype was substantially associated with cancer risk, especially for tract cancer, compared to the (+/+) genotype. Moreover, the (-) allele of the PTEN IVS4 polymorphism was significantly associated with cancer risk, especially for digestive cancer, compared to the (+) allele. No significant association was observed between PTEN IVS4 (+/–) genotype and cancer risk [19].

Another study aimed at investigating the relationship between the PTEN IVS4 polymorphism and gastric cancer (GC) risk included 93 patients with GC and 113 healthy controls, and a hospital-based case-control study was made. As in our study, individuals were selected from the Turkish population and the PTEN IVS4 (rs no: 3830675) polymorphism was determined using the PCR-RFLP analysis used in our study. The PTEN IVS4 (-/-) genotype exhibited a significantly higher risk for GC compared to controls. Analyzes of clinicopathological parameters showed that PTEN IVS4 genotypes were not associated with any variant of patients with GC. As a result, it was determined that PTEN IVS4 polymorphism may contribute to the development of GC in the Turkish population [20].

In our study, individuals with PTEN IVS4 (+/+) genotypes were not determined in the Turkish population, and no significant difference was found for (-/-) and (+/-) genotypes when control and endometrial cancer individuals were compared. For the -9 C/G variant of the PTEN gene, all individuals were found to have the ancestral CC genotype, and

this region was defined as a conserved region. In our study, by the literature findings, significantly lower PTEN serum levels were determined in patients with endometrial cancer in comparison to the control.

As a result, PTEN serum levels were determined to be substantially lower in patients with endometrial cancer compared to controls, and it can be used as an important biomarker for endometrial cancer. PTEN IVS4 (-/+) and -9 C/G variations are not associated with endometrial cancer risk in individuals originating from Turkey. However, studies in larger populations related to the PTEN gene are needed.

Further studies, including a comparison of PTEN IVS4 polymorphism with plasma and tissue expressions of PTEN in larger study size groups, will enable further evaluation of PTEN IVS4 polymorphism in endometrial cancer patients.

Acknowledgements

This research was funded by the Research Foundation of Eskisehir Osmangazi University, grant number 201811A124. We express our gratitude to the volunteers who participated in the study.

References

1. Amant, F., *Moerm an P, Neven P,[et al.]. Endometrial cancer.* Lancet, 2005. **366**(9484): p. 491-505.
2. Cibula, D., *Onkogynekologie*. 2009: Grada Publishing as.
3. Ambros, R.A., et al., *Endometrial intraepithelial carcinoma: a distinctive lesion specifically associated with tumors displaying serous differentiation.* Human pathology, 1995. **26**(11): p. 1260-1267.
4. Ortega-Molina, A. and M. Serrano, *PTEN in cancer, metabolism, and aging.* Trends in Endocrinology & Metabolism, 2013. **24**(4): p. 184-189.
5. Gougelet, A., et al., *Estrogen receptor α and β subtype expression and transactivation capacity are differentially affected by receptor-, hsp90-and immunophilin-ligands in human breast cancer cells.* The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2005. **94**(1-3): p. 71-81.
6. Luongo, F., et al., *PTEN tumor-suppressor: the dam of stemness in cancer.* Cancers, 2019. **11**(8): p. 1076.
7. Álvarez-Garcia, V., et al. *Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity*. in *Seminars in Cancer Biology*. 2019. Elsevier.
8. Jamaspishvili, T., et al., *Clinical implications of PTEN loss in prostate cancer.* Nature Reviews Urology, 2018. **15**(4): p. 222-234.
9. Hollander, M.C., G.M. Blumenthal, and P.A. Dennis, *PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models.* Nature Reviews Cancer, 2011. **11**(4): p. 289-301.
10. Lupini, L., et al., *Molecular biomarkers predicting early development of endometrial carcinoma: A pilot study.* European Journal of Cancer Care, 2019. **28**(6): p. e13137.
11. Reddy, P., et al., *Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool.* Science, 2008. **319**(5863): p. 611-613.
12. Djordjevic, B., et al., *Clinical assessment of PTEN loss in endometrial carcinoma: immunohistochemistry outperforms gene sequencing.* Modern pathology, 2012. **25**(5): p. 699-708.
13. Ozturk, O., et al., *HER2 Ile655Val and PTEN IVS4 polymorphisms in patients with breast cancer.* Molecular biology reports, 2013. **40**(2): p. 1813-1818.
14. Bansal, N., V. Yendluri, and R.M. Wenham, *The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies.* Cancer control, 2009. **16**(1): p. 8-13.
15. Suzuki, A., et al., *High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice.* Current biology, 1998. **8**(21): p. 1169-1178.
16. Cristofano, A.D., et al., *Pten is essential for embryonic development and tumour suppression.* Nature genetics, 1998. **19**(4): p. 348-355.
17. Wu, H., V. Goel, and F.G. Haluska, *PTEN signaling pathways in melanoma.* Oncogene, 2003. **22**(20): p. 3113-3122.
18. Sun, L., et al., *Association between PTEN Gene IVS4 polymorphism and risk of cancer: a meta-analysis.* PloS one, 2014. **9**(6): p. e98851.
19. Wang, Y., et al., *Impact of PTEN IVS4 polymorphism (rs3830675) on cancer susceptibility: an updated meta-analysis.* Cancer Genomics & Proteomics, 2015. **12**(5): p. 263-269.
20. Canbay, E., et al., *Increased gastric cancer risk with PTEN IVS4 polymorphism in a Turkish population.* Genetic testing and molecular biomarkers, 2013. **17**(3): p. 249-253.

www.biodicon.com BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION

ISSN 1308-8084 Online ISSN 1308-5301 Print

Research article/Araştırma makalesi
DOI: 14745/biodicon.2023.1227860
16/1 (2023) 70-74

Pseudoboletus parasiticus (Bull.) Šutara, a New Record for Turkish Mycobiota

Faruk YEŞİLYURT[1], Yasin UZUN[2], Abdullah KAYA[*3]
ORCID: 0000-0002-5573-4509**;** 0000-0002-6423-6085**;** 0000-0002-4654-1406

[1]Yenice Mahallesi, Yeşilyurt Sokak No 4, 61250 Trabzon, Türkiye
[2] Karamanoğlu Mehmetbey University, Ermenek Uysal and Hasan Kalan Health Services Vocational School, Department of Pharmacy Services, 70400 Karaman, Türkiye
[3] Gazi University, Science Faculty, Department of Biology, 06560 Ankara, Türkiye

Abstract

The boletoid species, *Pseudoboletus parasiticus,* is reported as a new record for Türkiye, based on the identification of the sample collected from Trabzon province. This species is the first member of the genus *Pseudoboletus* in Türkiye. A brief description of the species is provided together with the suggested Turkish name, and the photographs, related to the macroscopy and microscopy.

Key words: Biodiversity, Boletaceae, New record, Türkiye

---------- * ----------

Pseudoboletus parasiticus (Bull.) Šutara, Türkiye Mikobiyotası İçin Yeni Bir Kayıt

Özet

Boletoid bir tür olan *Pseudoboletus parasiticus,* Trabzon'dan toplanan örneklerin teşhis edilmesiyle, Türkiye için yeni kayıt olarak rapor edilmiştir. Bu tür, *Pseudoboletus* cinsinin Türkiye'deki ilk üyesidir. Türün kısa bir betimlemesi, önerilen Türkçe ismi ve makroskobi ve mikroskobisine ilişkin fotoğraflarıyla birlikte verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyoçeşitlilik, Boletaceae, Yeni kayıt, Türkiye

1. Introduction

Pseudoboletus Šutara is a genus of the family Boletaceae, and characterized by the fruit bodies growing parasitically on carpophores of *Scleroderma* Pers. spp., filamentous trichoderm, sterile stipe surface, basidiospores similar to those *Boletus* and *Xerocomus,* and scattered, smooth and thin-walled cystidia without incrustation. The genus has two species (*Pseudoboletus astraeicola* (Imazeki) Šutara, *P. parasiticus* (Bull.) Šutara) worldwide [1].

During a field study in Trabzon province, a boletoid fruit body growing on a *Scleroderma* sp. fruit body was collected. Upon required investigation, it was identified as *Pseudoboletus parasiticus.* The survey of the current checklist on Turkish macrofungi [2] and the latest contributions [3-16] indicated that, any member of the genus has been reported from Türkiye before.

The study aims to make a contribution to the mybiota of Türkiye.

2. Materials and methods

The fruit body of *Pseudoboletus parasiticus* was collected from Trabzon province in 2022, during a routine field study. Fruit bodies were photographed at its natural habitat, and necessary notes were taken related to its ecological characteristics and geographic position. Microscopic structures were investigated from the sections obtained

[*] *Corresponding author* / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: + 90 312 202 12 35; Fax.: + 90 312 221 32 02; E-mail: kayaabd@hotmail.com
© Copyright 2023 by Biological Diversity and Conservation Received: 01.01.2023; Published: 15.04.2023 BioDiCon. 1075-010123

from fresh material. A Leica DM500 trinocular light microscope was used for microscopic investigations and an Omax A3550U camera, equipped with Topview software, was used to obtain photographs related to micromorphology. Identification was performed by comparing the obtained data with Philips [17], Breitenbach and Kränzlin [18], Šutara [19-20], Hansen and Knudsen [21], Kibby [22], McKnight and McKnight [23], Knudsen and Vesterholt [24], Bessette et al. [25].

The specimen is kept at Karamanoğlu Mehmetbey University, Science Faculty, Department of Biology.

3. Results

Fungi R.T. Moore
Basidiomycota R.T. Moore
Boletales E.-J. Gilbert
Boletaceae Chevall.
Pseudoboletus parasiticus (Bull.) Šutara, Česká Mykol. 45(1-2): 2 (1991)

Syn: [*Boletus parasiticus* Bull., *Boletus parasiticus* f. *peylii* Kavina, *Boletus parasiticus* var. *piperatoides* J. Blum, *Ceriomyces parasiticus* (Bull.) Murrill, *Pseudoboletus parasiticus* f. *peylii* (Kavina) Blanco-Dios, *Pseudoboletus parasiticus* f. *piperatoides* (J. Blum) Blanco-Dios, *Pseudoboletus parasiticus* var. *piperatoides* (J. Blum) C. Hahn, in Guthmann & Hahn, *Suillus parasiticus* (Bull.) Kuntze, *Versipellis parasitica* (Bull.) Quél., *Xerocomus parasiticus* (Bull.) Quél., *Xerocomus parasiticus* f. *piperatoides* (J. Blum) R. Mazza.]

Macroscopic and microscopic features

Cap 20-60 mm across, convex when young, broadly convex at maturity, surface smooth to velvety or suedelike, some becoming cracked in age, yellowish brown to olive brown, sometimes bruising reddish to brownish, margin incurved to somewhat inrolled when young. Hymenophore porous, surface yellow, becoming olive yellow to yellowish brown or reddish brown in age, adnate to somewhat depressed around the apex of the stem. Flesh pale yellowish. Odor and taste not distinctive. Stem 35-75 × 10-19 mm, cylindrical to somewhat ventricose, usually curved toward the base, more or less concolorous with the cap, somewhat lighter toward the base, solid, pruinose or covered with fine brownish aggregations of fibrils (Fig.1).

Figure 1. Basidiocarps of *Pseudoboletus parasiticus*

Basidia 40-50(56) × 4.8-7.2 µm, subclavate with 4 sterigmata (Fig. 2a). Cheilocystidia 35-55 x 7-14 µm, fusiform to somewhat clavate. Pleurocystidia 40-65 x 8-13 µm, cylindrical to ventricose-fusiform or lageniform, with a long neck, smooth (Fig. 2b). Basidiospores 11-15.5 x 4-4.5 µm, subfusiform to fusiform, smooth with usually a large central, and some with small polar guttules (Fig. 2c). Pileipellis a trichoderm with long cylindrical hypha. Stipitipellis a trichoderm with 3-8 µm wide, smooth and elongated elements (Fig. 2d,e). Caulohymenium not observed.

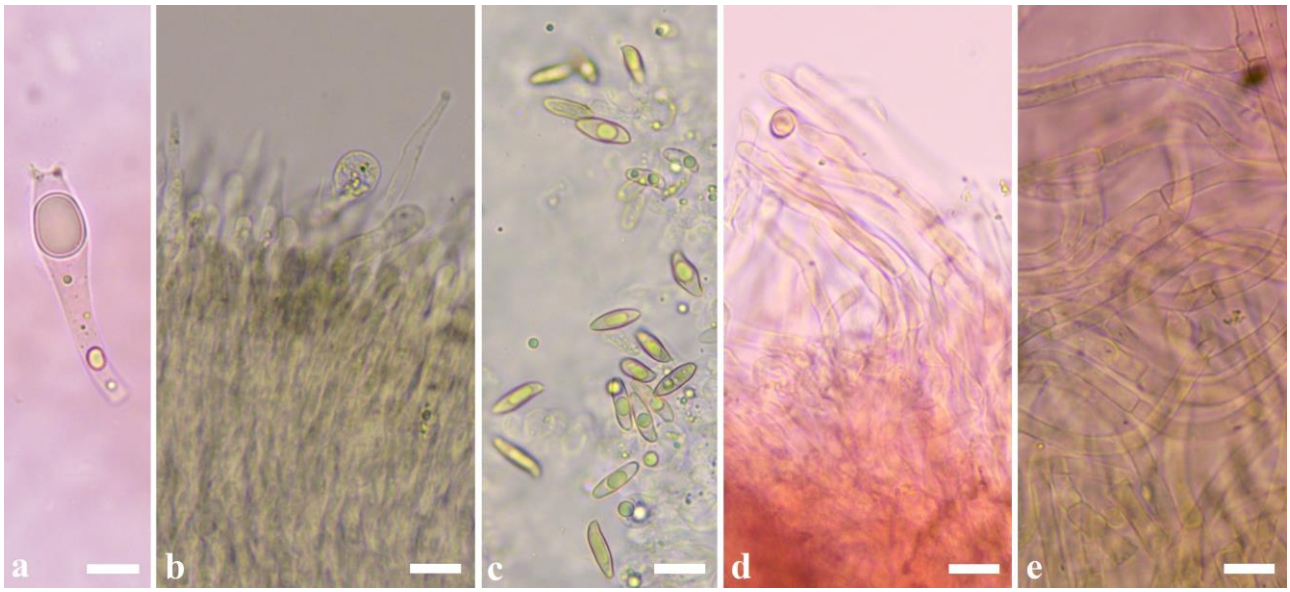


Figure 2. Basidia (a), Cystydia (b) and basidiospores (c) and pileipellis (d,e) of *Pseudoboletus parasiticus* (bars- a-e: 10 µm) (a,d,e in Congo-Red; b,c in water)

Pseudoboletus parasiticus was reported to grow as a parasite on carpophores of gasteromycetes such as *Scleroderma* or *Astraeus* [20] especially on *Scleroderma citrinum* [18, 19, 22, 25-29].

Specimen examined: Trabzon, Pelitli, Kavala village, on *Scleroderma* sp. fruiting body growing around moss covered decaying *Carpinus betulus* L. roots, 40°58′2″N, 39°47′33″E, 370 m, 06.09.2022, Faruk Yeşilyurt-1.

Suggested Turkish name for the presented species is “Parazit Yalancıçörek”.

4. Conclusions and discussion

Pseudoboletus parasiticus was added as a new record for the mycobiota of Türkiye. This species is the first member of the genus *Pseudoboletus* in Türkiye. General characteristics of the studied collection are in agreement with Philips [17], Breitenbach and Kränzlin [18], Šutara [19,20], Hansen and Knudsen [21], McKnight and McKnight [23], Knudsen and Vesterholt [24], Bessette et al. [25]. A small difference was observed in basidium lenght. Breitenbach and Kränzlin [18], Šutara [19], and Kuo [30], give the basidium lenght up to 50 µm, but our sample bares basidia up to 57 µm.

In terms of macromorphology, *Pseudoboletus parasiticus* is very similar to xerocomoid boletes. But the infertile stipe surface and the growth on a gasteromycete differs it from other members of Boletaceae. A considerable majority of the members of Boletaceae are mycorrhizal, and a few species are saprophitic. Except the members of *Pseudoboletus*, it contains no mycoparasitic member. Though there are many other examples of mycoparasitic mushrooms, *Pseudoboletus parasiticus* is the only example of the case where a bolete parasitizes an earthball [30]. *Pseudoboletus astraeicola* (Imazeki) Šutara, the other member of the genus *Pseudoboletus*, is also a fungicolous mushroom but it grows on *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan [31].

References

[1] Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. & Stalpers, J.A. (2008). *Dictionary of the Fungi, 10th ed.* Wallingford, UK: CAB International.

[2] Sesli, E., Asan, A., Selçuk, F., (Eds.), Abacı Günyar, Ö., Akata, I., Akgül, H., Aktaş, S., Alkan, S., Allı, H., Aydoğdu, H., Berikten, D., Demirel, K., Demirel, R., Doğan, H.H., Erdoğdu, M., Ergül, C.C., Eroğlu, G., Giray, G., Haliki Uztan, A., Kabaktepe, Ş., Kadaifçiler, D., Kalyoncu, F., Karaltı, İ., Kaşık, G., Kaya, A., Keleş, A., Kırbağ, S., Kıvanç, M., Ocak, İ., Ökten, S., Özkale, E., Öztürk, C., Sevindik, M., Şen, B., Şen, İ., Türkekul, İ.,

Ulukapı, M., Uzun, Ya., Uzun, Yu. & Yoltaş, A. (2020). *Türkiye Mantarları Listesi* (*The Checklist of Fungi of Turkey*). İstanbul: Ali Nihat Gökyiğit Vakfı Yayını.

[3] Acar, İ., Uzun, Y., Akçay, M.E. & Kesici, S. (2021). A New Record from Hakkâri Province, Turkey (*Leratiomyces percevalii* (Berk. & Broome) Bridge & Spooner). *The Journal of Fungus*, 12(2), 108-112.

[4] Çetinkaya, A. & Uzun, Y. (2021). *Hymenoscyphus caudatus*, a new ascomycete record for the mycobiota of Turkey. *Anatolian Journal of Botany*, 5(1), 19-22.

[5] Doğan, H.H., Öztürk, Ö. & Şanda, M.A. (2021). The mycobiota of Samanlı Mountains in Turkey. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 22(2), 215-243.

[6] Şelem, E., Keleş, A. & İşler, S. (2021). Macrofungal biodiversity of Gürpınar (Van) district. *Anatolian Journal of Botany*, 5(1), 23-28.

[7] Sadullahoğlu, C., Uzun, Y. & Kesici, S. (2021). Oltu ve Narman (Erzurum) Yöresinin Yenen Makromantarları. *Sirnak University Journal of Sciences*, 2(1), 39-52.

[8] Kaygusuz, O., Türkekul, İ., Knudsen, H. & Menolli, N. (2021). *Volvopluteus* and *Pluteus* section *Pluteus* (Agaricales: Pluteaceae) in Turkey based on morphological and molecular data. *Turkish Journal of Botany*, 45(3), 224-243.

[9] Akçay, M.E., Denğiz, Y. & Kesici, S. (2022). *Coprotus* Korf & Kimbr.: A new coprophilous genus record for the mycobiota of Turkiye. *Anatolian Journal of Botany*, 6(2), 75-77.

[10] Allı, H. (2022). Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Kampüsünde Yetişen Makromantarlar. *Mantar Dergisi*, 13(2), 96-104.

[11] Kaşık, G., Alkan, S., Aktaş, S., Öztürk, C. & Akgül, H.E. (2022). Macrofungi of Yenice (Karabük) District and New Records for Turkey. *KSU Journal of Agriculture and Nature*, 25(6), 1264-1278.

[12] Polat, T. & Keleş, A. (2022). Macrofungal biodiversity of Kop Mount (Bayburt-Erzurum). *Anatolian Journal of Botany*, 6(2), 109-114.

[13] Sesli, E. (2022). *Suillus mediterraneensis* (Jacquet. & J. Blum) Redeuilh (Suillaceae): Türkiye Mikotası İçin Yeni Bir Kayıt. *Mantar Dergisi*, 13(1), 66-70.

[14] Şengül Demirak, M.Ş., Işık, H. & Türkekul, İ. (2022). Molecular and morphological identification of *Cortinarius eucaeruleus* Rob. Henry (subgenus Phlegmacium) from Türkiye. *Anatolian Journal of Botany*, 6(1), 27-33.

[15] Uzun, Y. & Kaya, A. (2022). *Octospora tuberculata*, a new record for Turkish Pyronemataceae. *BioDiCon*, 15(2), 245-248.

[16] Acar, İ. & Uzun, Y. (2022). *Stictis bengalensis* (Stictidaceae, Ostropales) – A new addition to fungal genera and species for Turkey. *Austrian Journal of Mycology*, 30, 7-10.

[17] Philips, R. (1981). *Mushrooms and Other Fungi of Great Britain and Europe*. London: Pan Books Ltd.

[18] Breitenbach, J. & Kränzlin, F. (1991). *Fungi of Switzerland Vol. 3*. Lucerne: Verlag Mykologia.

[19] Šutara, J. (1991). *Pseudoboletus*, nový rod rádu Boletales. *Ceská Mykologie*, 45, 1-9.

[20] Šutara, J. (2005). Central European genera of the Boletaceae and Suillaceae, with notes on their anatomical characters. *Czech Mycology*, 57(1-2), 1-50.

[21] Hansen, L. & Knudsen, H. (1992). *Nordic Macromycetes. Vol. 2. Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales*. Copenhagen: Nordsvamp.

[22] Kibby, G. (1997). *An Illustrated Guide to Mushrooms and Other Fungi of Britain and Northern Europe*. London: Parkgate Books Ltd.

[23] McKnight, K.H. & McKnight, V.B. (1987). *A Field Guide to Mushrooms North America*. Boston: Houghton Mifflin Co.

[24] Knudsen, H. & Vesterholt, J. (2008). *Funga Nordica*. Kopenhagen: Nordsvamp.

[25] Bessette, A.E., Roody, W.C. & Bessette, A.R. (2010). *North American Boletes: A Color Guide to the Fleshy Pored Mushrooms*. Syracuse: Syracuse University Press.

[26] Krawczyszyn, J. (1969). *Xerocomus parasiticus* (Bull. Ex Fr.) Quel. İn Lower Silesia. *Acta Mycologica*, 5, 9-12.

[27] Szczepkowski, A. & Byk, A. (2010). New localities of *Xerocomus parasiticus* (Bull.: Fr.) Quél in Poland. *Przegląd Przyrodniczy*, 11(4), 16-22.

[28] Nuhn, M.E., Binder, M., Taylor, A.F., Halling, R.E. & Hibbett, D.S. (2013). Phylogenetic overview of the Boletineae. *Fungal Biology*. 117(7-8), 479-511.

[29] Tajer, C.J. (2015). *Xerocomus parasiticus* in the Barycz Valley Landscape Park. *Chrońmy Przyr. Ojcz.*, 71(3), 216-220.

[30] Kuo, M. (2020). *Pseudoboletus parasiticus*. Retrieved from the MushroomExpert.Com Web site: http://www.mushroomexpert.com/pseudoboletus_parasiticus.html

[31] Sun, J-Z., Liu, X.Z., McKenzie, E.H.C., Jeewon, R., Liu, J.K., Zhang, X.L., Zhao, Q. & Hyde, K.D. (2019). Fungicolous fungi: terminology, diversity, distribution, evolution, and species checklist. *Fungal Diversity*, 95, 431-432.

BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION
Volume / Cilt / 16 Issue / Sayı / 1 April /Nisan / 2023

***Contents* / İçindekiler**

Page No. Order No.

01. **1 Chemical compositions of essential oil obtained from the fruits of *Laser trilobum* grown in Mersin**
02. **6 Morphology and fruit micromorphology of *Pterocephalus plumosus* (L.) Coulter (Caprifoliaceae)**
03. **10 Pharmaceutical Botanical evaluation of Saffron (*Crocus sativus* L.) called samples sold in Türkiye**
04. **23 Genetic diversity analysis of different bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes grown in Türkiye**
05. **31 Determination of genetic structure of Bald ibis population living in Birecik (Türkiye) using mtDNA COI sequences**
06. **38 Morpho-anatomical, volatile compounds and ethnobotanical studies on *Thymus sibthorpii* Benth.**
07. **51 Essential oil composition of *Nepeta isaurica* Boiss. Heldr. apud Bentham and *Nepeta sulfuriflora* P.H. Davis growing naturally in Türkiye**
08. **56 Changes of oil and fatty acid ratios during germination of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds**
09. **63 Association of PTEN gene polymorphisms, protein levels and endometrial cancer: A hospital-based case-control study**
10. **70 *Pseudoboletus parasiticus* (Bull.) Šutara, a New Record for Turkish Mycobiota**

***Abstracted-Indexed in* / Dergiyi tarayan veri tabanları:** Web of Science {Zoological Records Indexed] Clavariate Analytic, CiteFactor, Turkey Citation Index, JournalSeek Database, arastirmax, Medical Reads (RRS), CrossRef;10.46309/biodicon.

***Libraries* / Kütüphaneler:** *Aberystwyth University; All libraries; Bath University; Birmingham University; Cardiff University ;City University London; CONSER (Not UK Holdings); Edinburgh University; Essex University; Exeter University; Eskişehir Teknik Üniversitesi Library, EZB Electronic Journals Library; Feng Chia University Library; GAZİ Gazi University Library; Glasgow University; HEC-National Digital Library; Hull University; Imperial College London; Kaohsinug Medical University Library; KYBELE Anadolu University Library; Lancaster University; Libros PDF; Liverpool University; London Metropolitan University; London School of Economics and Political Science; Manchester University; National Cheng Kung University Library; National ILAN University Library; Nottingham University; Open University; Oxford University; Queen Mary,University of London;Robert Gordon University; Royal Botanic Gardens, Kew; Sheffield Hallam University; Sheffield University; Shih Hsin University Library; Smithsonian Institution Libraries; Southampton University; Stirling University; Strathclyde University; Sussex University; The National Agricultural Library (NAL); The Ohio Library and Information NetWork; Trinity College Dublin; University of Washington Libraries; Vaughan Memorial Library; York University.*

Web of Science-Clarivate Analytics, Zoological Records Indexed
This journal is registered to "Turkey Citation Index" ("Türkiye Atıf Dizini"ne kayıtlıdır)
This journal is a CrossRef member (DOI;10.46309/biodicon (*Bu dergi CrossRef* (DOI;10.46309/biodicon) *üyesidir)*

"BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION" has been added to the journal list of the Medical Reads (RRS) program together with the "Biology and Medical Journals**".**
Dergide yayınlanan makalelere" http:// www.biodicon.com" adresinden ulaşabilir.
This journal is available online at http:// www.biodicon.com
Copyright 2023 ©ERSİN YÜCEL *All rights reserved/*Tüm hakları saklıdır.

ISSN 1308-5301 Print / ISSN 1308-8084 Online

ISSN 1308-5301
9 771308 530001

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

"BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION (BioDiCon)" is an international, peer-reviewed scientific journal published in online and printed form, in accordance with the principles of independency and impartiality. This journal is a peer reviewed journal on the topics of biological diversity and conservation that uses independent, unbiased double-blinded peer review principles.

"BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION" publishes experimental studies, compilations on current issues, case reports, editorial comments and editorial letters prepared in accordance with the ethical guidelines, about on all areas of biological diversities. Descriptive or experimental studies presenting clear research questions are accepted. 'BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION' has been added to the journal list of the Medical Reads (RRS) program together with the "Biology and Medical Journals". The journal's publication language are English and Turkish.

The manuscripts submitted to Biological Diversity and Conservation will go through a double-blind peer-review process. Each submission will be reviewed by at least two external, independent peer reviewers who are experts in their fields in order to ensure an unbiased evaluation process. The editorial board will invite an external and independent editor to manage the evaluation processes of manuscripts submitted by editors or by the editorial board members of the journal.

An approval of research protocols by the Ethics Committee in accordance with international agreements is required for experimental, clinical, and drug studies and for some case reports. If required, ethics committee reports or an equivalent official document will be requested from the authors.

A declaration text including the written consent should be added in the manuscripts concerning experimental research on humans related to that the patients and the volunteers were informed about the procedures of the performed and to be performed studies on them. In addition, information about patients' approval, the name of the ethics committee, and the ethics committee approval number should be addressed in the Materials and Methods section of the manuscript. In the studies carried out on animals, the precautions taken to prevent pain and suffering of the animals should be clearly indicated.

Authorship Contribution Form

The journal of Biological Diversity and Conservation, in order to protect the rights of the authors and to prevent such situations as ghost / honorary authorship, requires the author to submit a signed and a scanned copy of the **Authorship Contribution Form** (which can be downloaded from http://www.biodicon.com).

Policy of Screening for Plagiarism

All submissions are checked by a similarity detection software iThenticate program for determination of plagiarism and non-ethical situations. In cases where the application is alleged or suspected as plagiarism, citation manipulation and data forgery/production, the Editorial Board will follow and act in accordance with the COPE rules.

If the editorial board gets suspicious about a case of 'gift authorship', the application will be rejected without being reviewed. As a part of article submission the responsible author should send a short statement text affirming that s/he takes all the responsibilty of the article during the submission and review stages of the manuscript.

ICMJE Conflict of Interest form

Biological Diversity and Conservation journal asks and encourages its authors and submitted articles to disclose any existing or potential conflicts of interests, including financial, consultant and institutional ones, that may lead to potential bias or conflicts among individuals involved in the evaluation process. Any material grants or other support received for a study sent from individuals or institutions should be reported to the Editorial Board. In order to disclose a potential conflict of interest, **The Potential Conflict of Interest Disclosure Form (ICMJE)** must be signed by all contributing authors and forwarded to the journal editorial board.

Appeals and Complaint

All appeals and complaint cases are dealt with in the framework of the COPE trial rules by The Editorial Board of the journal. In such cases, the authors should directly make a contact with the editorial office in relation to their appeal and complaints.

Copyright

When submitting an article to the journal of Biological Diversity and Conservation, the authors agree to give the copyright of their articles to the journal. If the publication is rejected, the copyright of the article will be assigned back to the authors. Biological Diversity and Conservation requires each article application to be carried out together with the **Copyright Transfer Form** (which can be downloaded from

When using previously published content, permission from the copyright owner must be obtained by the authors.

The statements or opinions contained in the articles published in the Journal of Biological Diversity and Conservation reflect the views of the author(s); the editors, the editorial board, and the publisher don't accept any responsibility or liability for such materials. All the responsiblity belongs to the authors about the published content.

PREPARATION OF MANUSCRIPT

Authors are required to prepare manuscripts in accordance with the STROBE guidelines for observational original research studies, STARD guidelines for studies on diagnostic accuracy, PRISMA guidelines for systematic reviews and meta-analysis, ARRIVE guidelines for experimental animal studies, TREND guidelines and CONSORT guidelines for randomized research studies for non-randomized public behaviour. The manuscripts should be prepared in accordance with ICMJE-Recommendations for the Conducting (http://www.icmje.org/icmje-recommendations).

Manuscripts can only be submitted through the journal's online manuscript submission and evaluation system, available at Submissions that do not comply with the rules of the journal will be returned to the submitting author with the requests of correction requets.

Authors are required to submit the following

a) Copyright Transfer Form,
b) Author Contributions Form,
c) ICMJE Potential Conflict of Interest Disclosure Form (should be filled in by all contributing authors) during the initial submission. These forms are available for download at
d) Similarity Form (iThenticate: According to the Plagiarism Detection Software programme the similarity index of the article should not exceed 20% after all references and less than 1% matches have been removed.)

Preparation of the Manuscript (General rules for all manuscript types)

Title page: The first page of the article should include the title of manuscript, authors' names and institutions, an abstract, and keywords. Title, abstract, and keywords must be provided both in English and Turkish. The corresponding author should be indicated by a footnote and besides his/her full open mail address, and an e-mail address should also be provided.
A separate title page should be submitted for all submissions and this page should include:

- Full title of manuscript as well as a short title of up to 50 characters (title)
- Name(s) , address and highest academic degree of the author (s),
- Providing information about supporting institutions (if any),
- Name, address, telephone, fax numbers and e-mail address of the corresponding author,
- Acknowledgment of the individuals who contributed to the preparation of the manuscript.

Abstract: The abstract of Original Articles should be structured with subheadings (Objective, Methods, Results, and Conclusion). Abstract should be written both in English and in Turkish up to 300 words. First the English name of the article, then the English abstract should be written. After that the Turkish name of the article and a summary in Turkish should be written If the article is written in English and sent from outside Turkey, Turkish abstract it is not necessary. Please check Table 1 below for word count specifications.

Keywords: Key words should not exceed 3-5 words. Keywords should start with lowercase letters except for italic words and special names.

MANUSCRIPT TYPES

Original Research

The first page of the article should include the title of manuscript, authors' names and institutions, an abstract, and keywords. Title, abstract, and keywords must be provided both in English and Turkish. . If the article is written in English and sent from outside Turkey, Turkish Title, abstract and Keywords it is not necessary. The corresponding author should be indicated by a footnote and besides his/her full open mail address, and an e-mail address should also be provided.

Title: Must be provided both in English and Turkish.
Abstract: It should not include subheadings and should be limited to 350 words
Keywords: This section should contain at least three and at most six items and should be provided just below the abstract.
Main Text: The text should start with the Introduction, and be divided into appropriate sections. Sections must be numbered consecutively. Section headings must be written minisculely flush left and bold with their numbers (as, 1. Introduction, 2. Material and method, 3. Results, 4. Conclusions and discussion). Subsections must be numbered as "1.1", "1.2", etc., using the section number and must be written minisclulely flush left. All acronyms and abbreviations used in the manuscript should be defined at first use, both in the abstract and in the main text. In the final section there must be Acknowledgements (if any) , References and Appendices (if any).Please check Table 1 for the limitations. It should include Introduction, other subheadings and Conclusion sections and should be limited to 5000 words except for the references.
References: The reference list should be placed just below the main text and the number of references should not exceed 50.
Tables, Figures and Images: The appearance of Tables, Figures and Images should be provided in the text. The visuals should be original or the written permission obtained from the copyright holder should be sent to the Editor-in-Chief's Office.

Review

Reviews prepared by the authors who have a broad knowledge in a specific area and represented in the international literatüre by a high number of publications and citations, are evaluated.
Title: Must be provided both in English and Turkish.
Abstract: Abstract shouldn't include subheadings and should be limited to 350 words.
Key words: This section should include at least three and at most six items and should be provided just below the abstract.
Main Text: It should include Introduction, other subheadings and Conclusion sections and should be limited to 5000 words excluding the references.
References: The reference list should be placed below the main text and the number of references should not exceed 55.
Tables, Figures and Images: Tables, Figures and Images: The appearance of Tables, Figures and Images sholud be provided in the text. The visuals should be original or the written permission obtained from the copyright holder should be sent to the Editor-in-Chief's Office. Please check Table 1 for the limitations.

Research note, Case Reports, Case Series and Literature Review

The text should include Introduction, Case reports, Discussion and Conclusion subheadings. Please check Table 1 for the limitations for Research Note.

Letters to the Editor

Discusses important parts, unobserved aspects or missing parts of a previously published article. Letters to the Editor should not include Abstract, Keywords and Tables, Figures, Images, and other media. The text should be unstructured. The commented article must be properly identified in the letter to the editor (Table 1).

Table 1. Limitations for each manuscript type

Type of manuscript	Word limit	Abstract word limit	Reference limit	Table limit	Figure limit
Original Research	5000	350	35	7	maximum 20 images
Review Article	5000	350	55	7	maximum 20 images
Research note, Case Report	1000	250	15	No tables	maximum 15 images
Case Series	1500	250	20	maximum 15 images	maximum 15 images
Literature of Review	3500	250	35	maximum 15 images	maximum 15 images
Letter to the Editor	500	No abstract	7	No tables	No figure

Tables

Tables should be included in the main document, and they should be numbered consecutively in the order they are referred to within the main text. Their appearance in the text should be provided. A descriptive title must be placed above the tables. Abbreviations used in the tables should be defined below the tables by footnotes. Tables should be created using the "insert table" command of the word processing software.

Figures, Graphics and Photographs

Figures, graphics, and photographs should be submitted as separate files (JPEG format) through the submission system. The files should not be embedded in a Word document or in the main document. Any information within the images that may indicate an individual or institution should be blacked out. The minimum resolution of each submitted figure should be 300 DPI. All submitted figures should be clear in resolution and large in size. Figures , tables and illustrations should be inserted to the appropriate positions where they are mentioned in the text. All drawings, graphics, photographs, etc. should be regarded as figures. Figures should be numbered consecutively (as Figure 1.).

References

While citing publications, the latest and the most current publications should be preferred. At least half (50%) of the references should be published within the last 10 years. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. Journal titles should be abbreviated in accordance with the journal abbreviations in Index Medicus/ MEDLINE/PubMed. When there are 6 or fewer authors, all authors should be listed. If there are 7 or more authors, the first 6 authors should be written, the space should be **"..."** left behind and the last author should be written. In the main text of the manuscript, references should be cited by using numbers in parentheses [as 3]. Authors are responsible for the accuracy of references. The reference styles for different types of publications are presented in the following examples. Reference must be made according to APA 6th. Please refer to the details;

Reference form

Reference form

No author

[1] *Regional perspectives on aid for trade*. (2014). Paris, FR: Organisation for Economic Cooperation and Development.

Journal article with DOI

[1] Sengün, Y. (2012). The wild plants consumed as a food in Afyonkarahisar. *Biological Diversity and Conservation*, 5(*2*), 95-105. https://doi:10.1242/jeb.103937
[2] Yücel, E., & Ezer, T. (2018). The bryophyte flora of Eskisehir Province (Turkey). *Arctoa* 27(*2*), 164–171. https://doi: 10.15298/arctoa.27.16
[3] Author, A. (year). Title of article: *Title of Journal*, volume(issue), page range. Doi:xx xxxxxxxxxx.

Journal article with DOI

[1] Eroğlu, G., Kaşik, G., & Öztürk, C. (2015). Three new myxomycete records from Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 8(*1*), 16-18.

[2] Brown, L. F., Yeo, K., Berse, B., Yeo, T. K., Senger, D. R., Dvorak, H. F., & Van De Water, L. (1992). Expression of vascular permeability factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(*5*), 1375-1379.

Journal article published in a supplement

[1] Lock, M. (2015). Eclipse of the gene and the return of divination. *Current Anthropology, 46*(Suppl. 5), S47-S70. Retrieved from https://www.jstor.org/stable/10.1086/432452

Books

[1] Fleer, M. (2015). *Science for children*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
[2] Berkes, F. & Kışlalıoğlu, M. (1990). *Ekoloji ve çevre bilimleri*. İstanbul: Remzi Kitabevi.
[3] Langlais, B., Reckhow, D. A., & Brink, D. R. (1991). *Ozone in water treatment*. London: UK: CRC Press.
[4] Brown, M., Shields, J., Kaine, S., Dolle-Samuel, C., North-Samardzic, A., McLean, P., … O'Leary, P. (2016). *Managing employee performance and reward: Concepts, practices, strategies (2nd ed.).* Port Melbourne, VIC: Cambridge University Press.

eBook

[1] Bull, M. (2015). *Punishment and sentencing: Risk, rehabilitation and restitution*. Retrieved from http://CURTIN.eblib.com.au/patron/FullRecord.aspx?p=1985996

Chapter in an edited print book

[1] Petermann, E. (2015). Monster mash-ups: Features of the horror musical. In L. Piatti-Farnell & D. L. Brien (Eds.), *New directions in 21st century gothic: The gothic compass* (4th ed., pp. 71-83). New York, NY: Taylor and Francis.

Conference paper

[1] Novak, D., & Verber, D. (2015, July 21). *Assessment of the influence caused by random events within real- time strategy game engine on a game bot gameplay*. Paper presented at the 8th Annual International Conference on Computer Games, Multimedia and Allied Technology, Singapore. https://doi.org/10.5176/2251-1679_CGAT15.27

www.biodicon.com
ISSN: 1308-8084 Online

Biological Diversity and Conservation
Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma
ISSN: 1308-5301 Print

Hakem Değerlendirme Formu / Reviewer Evaluation Form

Makale adı / Article Title:
Makale No / Article No:

Lütfen sizin için uygun olan seçeneği "**X**" koyarak işaretleyiniz / Please indicate your answer with an "**X**".

1. Makale orijinal mi? / Is the article original?
   - ☐ Evet / Yes
   - ☐ Hayır / No
2. Problem uygun şekilde belirlenmiş mi? / Is the problem properly stated?
   - ☐ Evet / Yes
   - ☐ Hayır / No
3. Problem uygun şekilde ele alınmış mı veya çözülmüş mü? / Is the problem adequately treated or solved?
   - ☐ Evet / Yes
   - ☐ Değişiklikler veya ekler gerekli /Changes or elaborations required
   - ☐ Hayır / No
4. Belgeleme / Documentation:

   Tablolar / Tables:
   - ☐ İyi / Good
   - ☐ Zor anlaşılır (Tablo no:) / Unclear (Table no:)
   - ☐ Gereksiz (Tablo no:) / Unnecessary (Table no:)
   - ☐ Doğru değil (Tablo no:) / Incorrect (Table no:)

   Grafikler / Graphs:
   - ☐ İyi / Good
   - ☐ Zor anlaşılır (Şekil no:) / Unclear (Figure no:)
   - ☐ Gereksiz (Şekil no:) / Unnecessary (Figure no:)
   - ☐ Doğru değil (Şekil no:) / Incorrect (Figure no:)

   Diğer çizimler / Other illustrations:
   - ☐ İyi / Good
   - ☐ Değişiklik gerekli (Şekil no:) / Change needed (Figure no:)
   - ☐ Gereksiz (Şekil no:) / Unnecessary (Figure no:)
   - ☐ Düşük kalitede (Şekil no:) / Poor quality (Figure no:)

   İstatistikler / Statistics:
   - ☐ Uygun / Suitable
   - ☐ Uygun değil / Unsuitable
5. Sonuçların yorumu / Interpretation of results:
   - ☐ Doğru veya uygun / Correct or appropriate
   - ☐ Düzeltilmeli / Should be amended
   - ☐ Bulunamadı / Not found
6. Literatür alıntısı / Literature cited:
   - ☐ Uygun / Appropriate
   - ☐ Çok geniş / Too broad
   - ☐ Tam değil / Incomplete
7. Dil ve üslup / Language and style:
   - ☐ İyi yazılmış / Well written
   - ☐ Daha kısa ve öz olmalı / Should be made more concise
   - ☐ Tekrar yazılmalı veya düzenlenmeli / Should be rewritten or edited
8. Makale başlığı / Article title:
   - ☐ Uygun / Appropriate
   - ☐ Çok uzun / Too long
   - ☐ Çok genel / Too general

9. Özet / Abstract:
   - □ Uygun / Appropriate
   - □ Çok uzun / Too long
   - □ Çok genel / Too general
   - □ Makalenin içeriğini yansıtmıyor / Does not reflect the paper's content
10. Anahtar kelimeler / Key words:
   - □ Uygun / Appropriate
   - □ Uygun değil / Inappropriate
11. Makale hakkında genel fikir / General opinion about the paper:
   - □ Yeni bulgular sağlıyor / Provides new findings
   - □ Yeni bulgular sağlıyor ama az etkili / Provides new findings but is of marginal interest
   - □ Önceki bulguların gerekli bilgisini sağlıyor / Provides needed confirmation of previous findings
   - □ Önceden bilinen çalışmaların tekrarı / Repeats already known work
12. Öneriler / Recommendations:
   - □ Değiştirilmeden basılmalı / Should be published without changes
   - □ Değişikliklerden sonra basılmalı / Should be published after changes
   - □ Yeniden yazım veya düzeltme sonrasında bir karar için yeniden sunulmalı / Should be resubmitted for a decision after rewriting or editing
   - □ Basılmamalı / Should not be published
13. Detaylı işaretlemeler (Lütfen eğer gerekliyse sayfaları ekleyin) / Detailed remarks (Please attach pages if necessary):

Belirtmek istediğiniz diğer ayrıntılar (varsa) / Other details wanted to be indicated (if exist)

Hakemin adı / Name of reviewer:
Adres / Address:
Tel / Fax no:
e-mail:

(Hakem adı gizli tutulur / Reviewer name is kept secret)

Telif Hakkı Devir Formu/ *The Copyright Agreement Form*

Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma/*Biological Diversity and Conservation*
ISSN 1308-5301 Print; ISSN 1308-8084 Online
Prof. Dr. Ersin YÜCEL, P.K. 86, İki Eylül PTT Merkez, 26000 Eskişehir / Türkiye

Derginin Adı / *Journal Title*: Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma/*Biological Diversity and Conservation*
Makalenin Adı / *Manuscript title*: ……
……
……
……
Yazarların Adı / *Full Names of All Authers*: ……
……
……
Yazışmaların Yapılacağı Yazarın Adı ve Adresi / *Name, Adres Of Corresponding Author*: ……..
……
……
TC Kimlik No. / *ID Number*: …… e-posta: ……

Yazar(lar) / The Author(s) warrant(s) that:
Sunulan makalenin orijinal olduğunu; makalenin başka bir yerde basılmadığını veya basılmak için sunulmadığını; diğer şahıslara ait telif haklarını ihlal etmediğini taahüt eder. /
The manuscript submitted is his own orijinale work; the manuscript has not been published and is not being submitted or considered for publication elsewhere; the manuscript do not infringre upon any existing copyright.

"Telif Hakkı Devir Formu" tüm yazarlarca imzalanmalıdır. / *This copyright form must be signed by all authors.*

TC Kimlik No. / *ID Number*:……
Adı Soyadı / *Full name*:……
Tarih / *Date*: ……İmza / *Signature*……

TC Kimlik No. / ID *Number*:……
Adı Soyadı / *Full name*:……
Tarih / Date: ……İmza / *Signature*……

TC Kimlik No. / *ID Number*:……
Adı Soyadı / *Full name*:……
Tarih / *Date*: ……İmza / *Signature*……

TC Kimlik No. / *ID Number*:……
Adı Soyadı / *Full name*:……
Tarih / *Date*: ……İmza / *Signature*……

TC Kimlik No. / *ID Number*:……
Adı Soyadı / *Full name*:……
Tarih / *Date*: ……İmza / *Signature*……

TC Kimlik No. / *ID Number*:……
Adı Soyadı / *Full name*:……
Tarih / *Date*: ……İmza / *Signature*……

TC Kimlik No. / *ID Number*:……
Adı Soyadı / *Full name*:……
Tarih / *Date*: ……İmza / *Signature*……

Address:
Prof. Dr. Ersin YÜCEL
Sazova Mahallesi, Ziraat Caddesi, No.277 F Blok, Eskisehir, Türkiye, 26005
Phone: +90364189988; E-mail: biodicon@gmail.com

www.biodicon.com
ISSN: 1308-8084 Online

Biological Diversity and Conservation
Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma
ISSN: 1308-5301 Print

ABONE FORMU / SUBSCRIPTION FORM

Adı /	Name	:
Soyadı /	Surname	:
Adres /	Address	:
Semt – İlçe /	City- State	:
Posta kodu /	Postal Code	:
İl /	Country	:
Telefon /	Telephone	:
Faks /	Fax	:
e-posta /	e-mail	:

* Yurtiçi Abone Ücreti, **Yıllık 3 Sayı 150TL** / Annual Subscirption Rate for Outside Turkey is **70 USD or 60 EUR for 3 issues.**

*Abone olmayanlar için her bir sayı 100 TL 'dir (Türkiye içi) / Each volume is **50 USD or 40 EUR** for non-subscribers (Outside of Turkey).

Sadece belirttiğim sayıyı olmak istiyorum / I would like to have an issue;

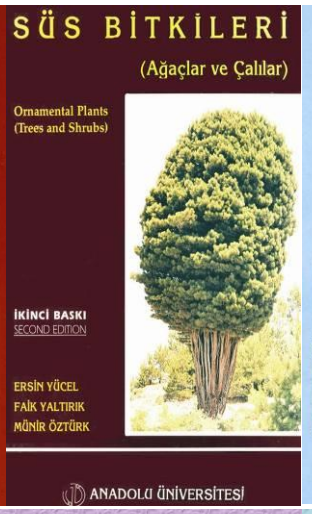
Vol. 1/1…….( ), Vol. 1/2 …….. ( )
Vol. 2/1 ……..( ) , Vol. 2/2 ……. ( ) , Vol. 2/3…..…. ( )
Vol 3/1. ……( ) , Vol. 3/2……. ( ) , Vol .3/3…….( )
Vol 4/1. ……( ) , Vol. 4/2……. ( ) , Vol .4/3……..( )
Vol 5/1. ……( ) , Vol. 5/2……. ( ) , Vol .5/3……. ( )
Vol 6/1. ……( ) , Vol. 6/2……. ( ) , Vol .6/3……. ( )
Vol 8/1. ……( ) , Vol. 8/2……. ( ) , Vol .8/3……. ( )
Vol 9/1. ……( ) , Vol. 9/2……. ( ) , Vol .9/3…….... ( )
Vol 10/1. ..…( ) , Vol. 10/2….. ( ) , Vol .10/3……. ( )
Vol 11/1. ….( ) , Vol. 11/2….. ( ) , Vol .11/3……..….( )
Vol 12/1. ….( ) , Vol. 12/2….. ( ) , Vol .12/3……..….( )
Vol 13/1. ….( ) , Vol. 13/2….. ( ) , Vol .13/3……..….( )
Vol 14/1. ….( ) , Vol. 14/2….. ( ) , Vol .14/3……..….( )
Vol 15/1. ….( ) , Vol. 15/2….. ( ) , Vol .15/3……..….( )
Vol 16/1. ….( ) , Vol. 16/2….. ( ) , Vol .16/3……..….( )

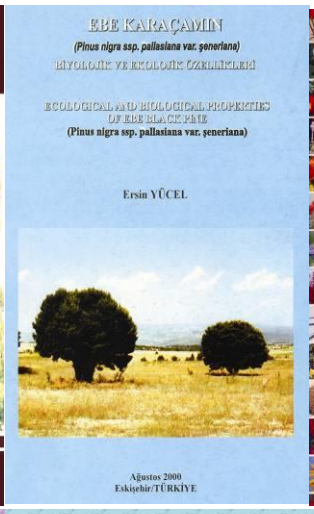
Abone olmak istiyorum / I would like to have an annual subscription;
……...…… ( ) 2023…….( ) 20

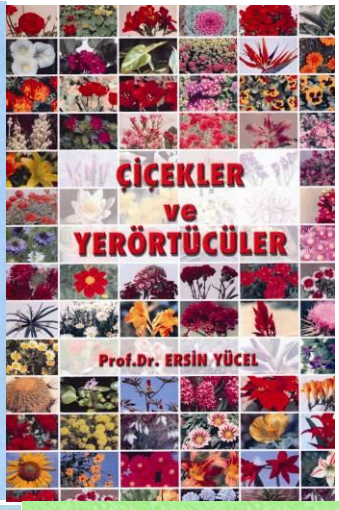
Dergi aboneliğiniz ile ilgili ücreti **"AKBANK, Ersin Yücel, IBAN: TR24 0004 6011 0088 8000 0256 06"** numaralı hesaba yatırdıktan sonra bu formu "**biodicon@gmail.com**" adresine ulaştırınız. Dergi adresinize posta ile adresinize gönderilecektir.

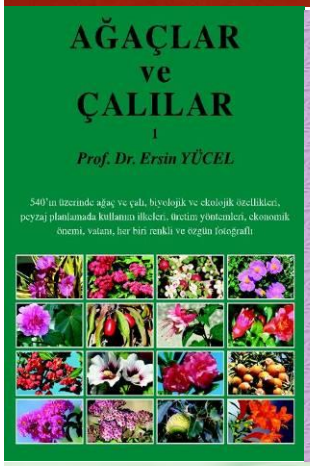
The payment of the article offering, please transfer total amount to the following bank account: "**AKBANK, Ersin Yücel, IBAN: TR24 0004 6011 0088 8000 0256 06".** After that, this form is going to be sent the following address "**biodicon@gmail.com**". The journal with cash on delivery will be sent your address.

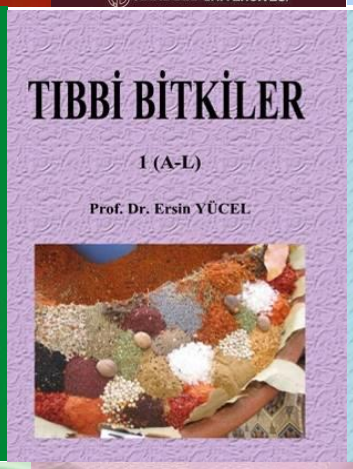
Tarih / Date: ……/……/20 İmza / Signature:
(Abone formunu Word belgesi olarak gönderiniz/Please send subscription form as a Word document)

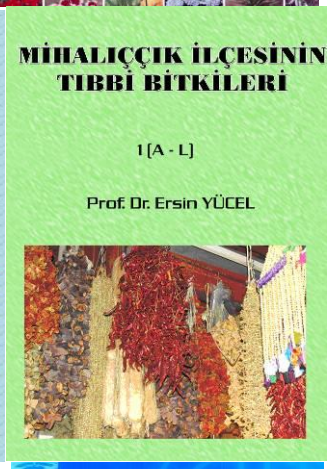


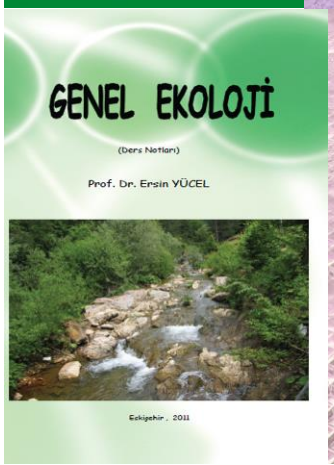


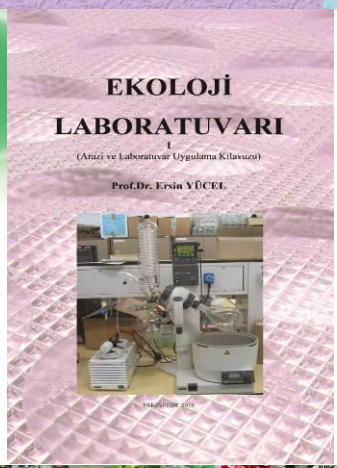


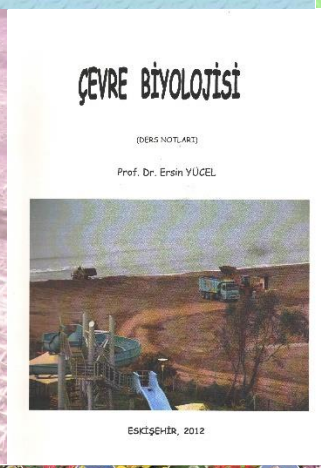


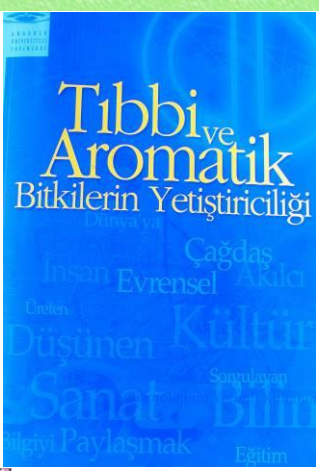


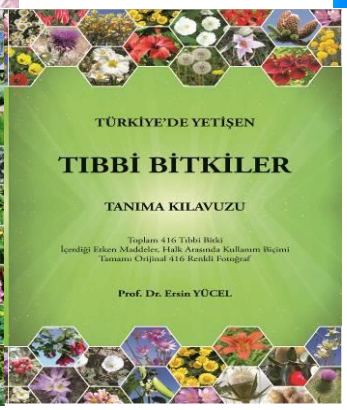












İletişim Adresi: ebitki@gmail.com
http://www.bitkilerim.com