

**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**



**LOKAL ENDEMİK *Trigonella coerulescens* subsp. *ayvalikensis* (Fabaceae)  
TAKSONU ÜZERİNDE MİKROMORFOLOJİK, ANATOMİK VE SİTOTOKSİK  
ARAŞTIRMALAR**

**SELİN KOÇ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Jüri Üyeleri :** Prof. Dr. Selami SELVİ (Tez Danışmanı)  
Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU (Eş Danışman)  
Dr. Öğr. Üyesi Selma ÇELEN YÜCETÜRK  
Dr. Öğr. Üyesi Sema ÇARIKÇI

**BALIKESİR, ŞUBAT - 2022**

## ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Lokal endemik *Trigonella coerulescens* subsp. *ayvalikensis* (Fabaceae) taksonu üzerinde mikromorfolojik, anatomik ve sitotoksik araştırmalar**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

**Selin KOÇ**  
(imza)

## ÖZET

**LOKAL ENDEMİK *Trigonella coerulescens* subsp. *ayvalikensis* (Fabaceae)  
TAKSONU ÜZERİNDE MİKROMORFOLOJİK, ANATOMİK VE SİTOTOKSİK  
ARAŞTIRMALAR  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
SELİN KOÇ  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SELAMİ SELVİ)  
(EŞ DANIŞMAN: DOÇ. DR. SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKÖĞLU)  
BALIKESİR, OCAK-2022**

*Trigonella coerulescens* subsp. *ayvalikensis*, ülkemizde sadece Ayvalık/Balıkesir ilçesinde yayılışı tespit edilen ve VU (zarar görebilir) kategorisinde değerlendirilen tek yıllık lokal endemik taksondur. Çalışmada, takson üzerinde ilk defa ayrıntılı olarak mikromorfolojik, anatomik ve sitotoksik araştırmalar yapılmıştır. Mikromorfolojik ve anatomik çalışmalarda subsp. *ayvalikensis* taksonuna morfolojik olarak çok benzeyen iki alttür de (subsp. *coerulescens*, subsp. *kemerensis*) incelenmiştir. Mikromorfolojik çalışmalarda; taksonların trikom yapıları (gövde-yaprak); tohum ve polen ornamentasyonu SEM-EDX cihazında incelenmiştir. Anatomik çalışmalar için üç taksonun yaprak, gövde ve petiyollerinden elle kesitler alınarak, Floroglusinol-HCl reaktifi ile boyandıktan sonra gliserin-jelatin yöntemi ile daimi preparat haline getirilmiştir. Kesitlerin mikrofotografaları çekilmiş ve “Alamet006” ölçüm programı kullanılarak mikro ölçümler yapılmıştır. Bitkinin tohumundan farklı çözücülerle elde edilen (saf su-hekzan-metanol-etanol-aseton) ekstraktların sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Sitotoksik etkiyi incelemek için MTT testi yardımıyla sağlıklı hücre hattı olarak HUVEC, kanser hücre hatları olarak PC-3 ve SW480 kullanılmıştır. Farklı çözücülerle hazırlanan ekstraktlar farklı doz ve sürelerle (24sa, 48sa, 72sa) hücrelere uygulanarak, spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda absorbans alınmıştır. Çalışma sonunda; subsp. *ayvalikensis*' in diğer iki alttüre mikromorfolojik ve anatomik karakterler açısından oldukça benzer olduğu gözlemlenmiştir. Taksonlar arasındaki en önemli karakterlerin; polen ornamentasyonu, öz/gövde oranı, petiyol şekli ve petiyoldeki damar dizilişi olduğu görülmüştür. Sitotoksik çalışmalarda istatistiksel olarak en anlamlı azaltıcı etki PC-3 hücre hattında metanol, etanol, aseton ve hekzan ekstraktlarında görülmüştür.

**ANAHTAR KELİMELELER:** Fabaceae, *Trigonella*, Anatomik, Mikromorfolojik, Sitotoksikite, PC-3.

## ABSTRACT

### MICROMORPHOLOGICAL, ANATOMICAL AND CYTOTOXIC STUDIES ON THE LOCAL ENDEMIC *Trigonella coerulescens* subsp. *ayvalikensis* (Fabaceae)

TAXON

MSC THESIS

SELIN KOC

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: PROF. DR. SELAMI SELVI )

(CO-SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. SUMEYYE AYDOGAN TURKOGLU )

BALIKESİR, JANUARY-2022

*Trigonella coerulescens* subsp. *ayvalikensis* is a annual local endemic taxon, which is distributed only in Ayvalık/Balıkesir district in our country and evaluated in the vulnerable category. In this study, detailed micromorphological, anatomical and cytotoxic studies were carried out on the taxon for the first time. In micromorphological and anatomical studies, subsp. *coerulescens*, subsp. *kemerensis* that are morphologically very similar to the subsp. *ayvalikensis* taxon were also examined. In micromorphological studies; trichome structures of taxa (stem-leaf); seed-pollen ornamentation were examined in SEM-EDX device. In anatomical studies, sections were taken from the leaves, stems and petioles of three taxa, stained with phloroglucinol-HCl reagent and made into a permanent preparation with the glycerine-gelatin method. Microphotographs of the sections were taken and micro measurements were made with “Alamet006”. The cytotoxic effect of the extract obtained from the seed of the plant with different solvents (pure water-hexane-methanol-ethanol-acetone) was investigated. In cytotoxic studies, HUVEC as healthy cell line, PC-3 and SW480 as cancer cell lines were used with the help of MTT test. The extracts prepared with different solvents were applied to the cells at different doses and times (24h-48h-72h), and absorbance was taken at 550 nm wavelength in the spectrophotometer. Consequently; subsp. *ayvalikensis* was found to be quite similar to the other two subspecies in terms of micromorphological and anatomical characters. The most important characters among taxa; pollen ornamentation, pith/stem ratio, number of petiole veins and shape of petiole. In cytotoxic studies, the most statistically significant reducing effect was seen (in methanol-ethanol-acetone-hexane extracts) in PC-3 cell line.

**KEYWORDS:** Fabaceae, *Trigonella*, Anatomical, Micromorphological, Cytotoxicity, PC-3.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Fabaceae Familyasının Dünya ve Türkiye'deki Takson Sayısı .....	4
1.2 Fabaceae Familyasının Ekonomik ve Tıbbi Olarak Değerlendirilmesi .....	4
1.3 Fabaceae Familyasının Genel Özellikleri .....	7
1.4 <i>Trigonella</i> L. Cinsinin Genel Özellikleri .....	7
1.5 <i>Trigonella</i> L. Cinsinin İçeriğinde Bulunan Etken Maddeler .....	9
1.6 <i>Trigonella</i> L. Üzerine Yapılmış Çalışmalar.....	10
1.6.1 <i>Trigonella</i> L. cinsi ile ilgili yapılan mikromorfolojik-anatomik çalışmalar .....	10
1.6.2 <i>Trigonella</i> L. cinsi ile ilgili yapılan sitotoksisite çalışmaları .....	12
1.6.3 <i>Trigonella</i> L. cinsi ile ilgili yapılan diğer çalışmalar .....	15
1.7 Çalışmanın Amacı.....	17
<b>2. MATERYAL-METOT</b> .....	<b>20</b>
2.1 Materyal .....	20
2.1.1 Bitkisel Materyal .....	20
2.1.2 Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar .....	21
2.1.3 Çalışmalarda Kullanılan Araç-Gereçler .....	22
2.2 Metot .....	23
2.2.1 Deneylede Kullanılan Malzemelerin ve Ortamın Sterilizasyonu .....	23
2.2.2 Mikromorfolojik ve Anatomik Çalışmalar .....	24
2.2.2.1 Mikromorfolojik Çalışmalar.....	24
2.2.2.2 Anatomik Çalışmalar.....	24
2.2.3 Ekstrakt Hazırlanması .....	25
2.2.4 Sitotoksik Çalışmalar .....	27
2.2.4.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemelerin Hazırlığı .....	27
2.2.4.2 Hücre Hattının Büyütülmesi.....	28
2.2.4.3 Hücre Hattının Pasajlanması .....	28
2.2.4.4 Hücrelerin Dondurulması .....	28
2.2.4.5 Canlı Hücrelerin Sayılması ve Deney Tasarımı .....	29
2.2.4.6 MTT.....	30
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>31</b>
3.1 Anatomik Bulgular.....	31
3.1.1 Gövde Anatomisi .....	31
3.1.1.1 <i>Trigonella coerulescens</i> subsp. <i>coerulescens</i> .....	31
3.1.1.2 <i>Trigonella coerulescens</i> subsp. <i>kemerensis</i> .....	33
3.1.1.3 <i>Trigonella coerulescens</i> subsp. <i>ayvalikensis</i> .....	35
3.1.2 Yaprak Anatomisi (Lamina Anatomisi).....	37

3.1.2.1	<i>Trigonella coerulescens</i> subsp. <i>coerulescens</i> .....	37
3.1.2.2	<i>Trigonella coerulescens</i> subsp. <i>kemerensis</i> .....	39
3.1.2.3	<i>Trigonella coerulescens</i> subsp. <i>ayvalikensis</i> .....	41
3.1.3	Yaprak Anatomisi (Petiyol Anatomisi).....	43
3.1.3.1	<i>Trigonella coerulescens</i> subsp. <i>coerulescens</i> .....	43
3.1.3.2	<i>Trigonella coerulescens</i> subsp. <i>kemerensis</i> .....	45
3.1.3.3	<i>Trigonella coerulescens</i> subsp. <i>ayvalikensis</i> .....	47
3.2	Mikromorfolojik Bulgular .....	49
3.2.1	Gövde ve Yaprak Mikromorfolojisi.....	49
3.2.2	Tohum Mikromorfolojisi .....	51
3.2.3	Polen Mikromorfolojisi.....	53
3.3	Hücre ve Dokuların Biyometrik Ölçümleri .....	55
3.4	MTT Analizi .....	60
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA-SONUÇ</b> .....	<b>70</b>
4.1	Mikromorfolojik ve Anatomik Tartışma .....	70
4.2	Sitotoksik Tartışma .....	73
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR (APA)</b> .....	<b>76</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>85</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: Ülkemizde görülen fitocoğrafik bölgelerin dağılımı. ....	1
Şekil 1.2: <i>Trigonella</i> cinsinin dünya üzerindeki yayılışı (Plants of the World online, 2021).....	2
Şekil 1.3: Bakterilerin baklagil köklerinde oluşturduğu nodüller (Özdermirpharma, 2017).5	
Şekil 1.4: <i>T. coerulescens</i> taksonlarının ülkemizdeki yayılış alanları. A) subsp. <i>coerulescens</i> , B) subsp. <i>kemerensis</i> , C) subsp. <i>ayvalikensis</i> (Bizim Bitkiler, 2013).....	8
Şekil 1.5: Tez çalışmasına ait akış diyagramı. ....	19
Şekil 2.1: <i>Trigonella coerulescens</i> subsp. <i>ayvalikensis</i> . A) Genel görünüş, B) Çiçek, C) Meyve. ....	20
Şekil 2.2: İncelenen taksonun toplandığı lokaliteler (Toplanma lokaliteleri yıldız ile gösterilmiştir.).....	21
Şekil 2.3: Ekstrakt elde edilmesinde kullanılmış vakumlu döner buharlaştırıcı (rotary evaporatör) cihazı. ....	26
Şekil 2.4: Hemositometre.....	29
Şekil 3.1: Gövde genel görünüş. Ep: epidermis, öt: örtü tüyü, kol: kollenkima parankiması, id: iletim demeti, ks: ksilem, öp: öz parankiması. ....	32
Şekil 3.2: Gövde köşe görünüşü. Ep: epidermis, öt: örtü tüyü, kol: kollenkima parankiması, ku: kutikula, ks: ksilem, öp: öz parankiması, fl: floem, p: parankima. ....	32
Şekil 3.3: Gövde gemel görünüş. Ep: epidermis, öt: örtü tüyü, kol: kollenkima parankiması, pa: parankima, ks: ksilem, öp: öz parankiması, en: endodermis, fl: floem. ....	34
Şekil 3.4: Gövde köşe görünüşü. Ep: epidermis, pa: parankima, kol: kollenkima parankiması, ks: ksilem, öp: öz parankiması, fl: floem, tr: trake hücresi, en: endodermis.....	34
Şekil 3.5: Gövde gemel görünüş. Ep: epidermis, öt: örtü tüyü, kol: kollenkima parankiması, id: iletim demeti, öp: öz parankiması, pa: parankima. ....	36
Şekil 3.6: Gövde köşe görünüşü. Ep: epidermis, en: endodermis, kol: kollenkima parankiması, ks: ksilem, öp: öz parankiması, tr: trake hücresi, fl: floem, ..... 36	
Şekil 3.7: Lamina mezofil tabakası. Mt: mezofil tabakası, pp: palizat parankiması, sp: sünger parankiması, üe: üst epidermis, ae: alt epidermis. ....	38
Şekil 3.8: Lamina orta damarı. Me: mezofil tabakası, pp: palizat parankiması, sp: sünger parankiması, üe: üst epidermis, ae: alt epidermis, öt: örtü tüyü, ks: ksilem, fl: floem. ....	38
Şekil 3.9: Lamina mezofil tabakası. pp: palizat parankiması, me: mezofil tabakası, sp: sünger parankiması, ae: alt epidermis, üe: üst epidermis, id: iletim demeti, öt: örtü tüyü.....	40
Şekil 3.10: Lamina orta damarı. Tr: trake hücresi, p: parankima, sk: sklerankima, ae: alt epidermis, öt: örtü tüyü, fl: floem, ku: kutikula.....	40
Şekil 3.11: Lamina mezofil tabakası. Mt: mezofil tabakası, pp: palizat parankiması, sp: sünger parankiması, üe: üst epidermis, ae: alt epidermis, ks: ksilem, öt: örtü tüyü. ....	42

<b>Şekil 3.12:</b> Lamina orta damarı. Pp: palizat parankiması, sp: sünger parankiması, üe: üst epidermis, ae: alt epidermis, ks: ksilem, öt: örtü tüyü, fl: floem, pa: parankima.....	42
<b>Şekil 3.13:</b> Petiyol genel görünüşü. Öt: örtü tüyü, ep: epidermis, pa: parankima, sk: sklerenkima, ks: ksilem, fl: floem.....	44
<b>Şekil 3.14:</b> Petiyol orta damarı. Pa: parankima, sk: sklerenkima, fl: floem, tr: trake hücresi.....	44
<b>Şekil 3.15:</b> Petiyol genel görünüşü. Pa: parankima, fl: floem, sk: sklerenkima, öt: örtü tüyü, ks: ksilem, ad: adaksiyel, ab: abaksiyel, kd: ksilem demeti. ....	46
<b>Şekil 3.16:</b> Petiyol orta damarı. Pa: parankima, sk: sklerenkima, fl: floem, tr: trake hücresi.....	46
<b>Şekil 3.17:</b> Petiyol genel görünüşü. Öt: örtü tüyü, kd: ksilem demeti, od: orta damar, pa: parankima, ep: epidermis.....	48
<b>Şekil 3.18:</b> Petiyol orta damarı. Pa: parankima, ks: ksilem, tr: trake hücresi, kol: kollenkima parankiması, fl: floem, ep: epidermis, sk: sklerenkima. ....	48
<b>Şekil 3.19:</b> <i>Trigonella coerulescens</i> alttürlerinin karşılaştırmalı SEM Gövde mikromorfolojisi. <i>T. coerulescens</i> subsp. <i>coerulescens</i> (A-C); <i>T. coerulescens</i> subsp. <i>kemerensis</i> (D-F); <i>T. coerulescens</i> subsp. <i>ayvalikensis</i> (G-I). st: stoma, gt: salgı tüyü. (Mikropapiller okla gösterilmiştir). ....	49
<b>Şekil 3.20:</b> <i>Trigonella coerulescens</i> alttürlerinin karşılaştırmalı SEM yaprak mikromorfolojisi. <i>T. coerulescens</i> subsp. <i>coerulescens</i> (A-C); <i>T. coerulescens</i> subsp. <i>kemerensis</i> (D-F); <i>T. coerulescens</i> subsp. <i>ayvalikensis</i> (G-I). ad: adaksiyel epiermis, st: stoma, gt: salgı tüyü. (Mikropapiller okla gösterilmiştir).....	50
<b>Şekil 3.21:</b> <i>Trigonella coerulescens</i> alttürlerinin tohum morfolojik yapısı. A) subsp. <i>coerulescens</i> , B) subsp. <i>kemerensis</i> , C) subsp. <i>ayvalikensis</i> .....	52
<b>Şekil 3.22:</b> <i>Trigonella coerulescens</i> alttürlerinin karşılaştırmalı SEM polen mikromorfolojisi. A,C,E: Polen ekvatorial görünüş; B,D,F: Polen yüzey ornamentasyonu. <i>T. coerulescens</i> subsp. <i>coerulescens</i> (A-B); <i>T. coerulescens</i> subsp. <i>kemerensis</i> (C-D); <i>T. coerulescens</i> subsp. <i>ayvalikensis</i> (E-F). ....	54
<b>Şekil 3.23:</b> Metanol ile hazırlanmış ekstraktın PC-3 hücre hattına ait sitotoksisite grafiği.60	
<b>Şekil 3.24:</b> Etanol ile hazırlanmış ekstraktın PC-3 hücre hattına ait sitotoksisite grafiği... 61	
<b>Şekil 3.25:</b> Aseton ile hazırlanmış ekstraktın PC-3 hücre hattına ait sitotoksisite grafiği. . 61	
<b>Şekil 3.26:</b> Hekzan ile hazırlanmış ekstraktın PC-3 hücre hattına ait sitotoksisite grafiği. 62	
<b>Şekil 3.27:</b> Saf su ile hazırlanmış ekstraktın PC-3 hücre hattına ait sitotoksisite grafiği. .. 62	
<b>Şekil 3.28:</b> Metanol ile hazırlanmış ekstraktın SW480 hücre hattına ait sitotoksisite grafiği.....	63
<b>Şekil 3.29:</b> Etanol ile hazırlanmış ekstraktın SW480 hücre hattına ait sitotoksisite grafiği 64	
<b>Şekil 3.30:</b> Aseton ile hazırlanmış ekstraktın SW480 hücre hattına ait sitotoksisite grafiği.....	64
<b>Şekil 3.31:</b> Hekzan ile hazırlanmış ekstraktın SW480 hücre hattına ait sitotoksisite grafiği.....	65
<b>Şekil 3.32:</b> Saf su ile hazırlanmış ekstraktın SW480 hücre hattına ait sitotoksisite grafiği.66	
<b>Şekil 3.33:</b> Metanol ile hazırlanmış ekstraktın HUVEC hücre hattına ait sitotoksisite grafiği.....	66
<b>Şekil 3.34:</b> Etanol ile hazırlanmış ekstraktın HUVEC hücre hattına ait sitotoksisite grafiği.....	67
<b>Şekil 3.35:</b> Aseton ile hazırlanmış ekstraktın HUVEC hücre hattına ait sitotoksisite grafiği.....	68

<b>Şekil 3.36:</b> Hekzan ile hazırlanmış ekstraktın HUVEC hücre hattına ait sitotoksisite grafiği.....	68
<b>Şekil 3.37:</b> Saf su ile hazırlanmış ekstraktın HUVEC hücre hattına ait sitotoksisite grafiği.....	69



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b> Ülkemizde Yayılışı Olan Fabaceae Familyasındaki Bazı Bitkilerin Kullanım Amaçları (Güner ve Ekim, 2014). .....	5
<b>Tablo 2.1:</b> Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üreticileri .....	22
<b>Tablo 2.2:</b> Çalışmadan kullanılan cihazlar-modelleri.....	22
<b>Tablo 2.3:</b> MTT yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	30
<b>Tablo 3.1:</b> <i>T. coerulescens</i> alttürlerinin karşılaştırmalı tohum karakterleri.....	51
<b>Tablo 3.2:</b> <i>T. coerulescens</i> taksonlarının karşılaştırmalı kantitatif polen özellikleri (değerler µm olarak verilmiştir.) .....	53
<b>Tablo 3.3:</b> <i>T. coerulescens</i> taksonlarının karşılaştırmalı kalitatif polen özellikleri.....	53
<b>Tablo 3.4:</b> <i>Trigonella coerulescens</i> subsp. <i>coerulescens</i> taksonu üzerinde biyometrik ölçümler .....	57
<b>Tablo 3.5:</b> <i>Trigonella coerulescens</i> subsp. <i>kemerensis</i> taksonu üzerinde biyometrik ölçümler .....	58
<b>Tablo 3.6:</b> <i>Trigonella coerulescens</i> subsp. <i>ayvalikensis</i> taksonu üzerinde biyometrik ölçümler .....	59
<b>Tablo 4.1:</b> <i>T. coerulescens</i> alttürlerinin karşılaştırmalı gövde anatomik karakterleri .....	71
<b>Tablo 4.2:</b> <i>T. coerulescens</i> alttürlerinin karşılaştırmalı yaprak anatomik karakterleri .....	72
<b>Tablo 4.3:</b> <i>T. coerulescens</i> alttürlerinin karşılaştırmalı petiyol anatomik karakterleri.....	72
<b>Tablo 4.4:</b> <i>T. coerulescens</i> alttürlerinin stoma özellikleri. ....	73

## SEMBOL LİSTESİ

<b>Subps</b>	: Alttür
<b>E</b>	: Polenin ekvatorial çapı
<b>P</b>	: Polar eksen uzunluğu
<b>LM</b>	: Işık mikroskobu
<b>SEM</b>	: Taramalı elektron mikroskobu
<b>sl.</b>	: Sensu lato, geniş anlamda
<b>VU</b>	: Zarar görebilir
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
<b>FBS</b>	: Fetal Sığır Serum
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetraasetik asit
<b>MTT</b>	: Tiyazolil mavi tetrazolyum bromür
<b>PBS</b>	: Fosfat buffer salin
<b>HUVEC</b>	: İnsan Sağlıklı Endotelyal Hücre Hattı
<b>PC-3</b>	: İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
<b>SW480</b>	: İnsan Kolon Kanseri hücre hattı
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>spp.</b>	: Türleri
<b>SKOV-3</b>	: Over kanseri
<b>HeLa</b>	: Henrietta Lacks (Hücre hattı)
<b>MCF-7</b>	: Meme kanseri hücre hattı
<b>Mg</b>	: milligram
<b>µl</b>	: mikrolitre
<b>µm</b>	: mikrometre
<b>µg</b>	: mikrogram
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>nm</b>	: Nanometer
<b>CDK1</b>	: Siklin bağımlı kinaz 1
<b>CDK2</b>	: Siklin bağımlı kinaz 2
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>vd.</b>	: ve diğerleri
<b>AgNP</b>	: Gümüş nanopartikül
<b>HCEC</b>	: İnsan kornea epiteli
<b>sa</b>	: Saat

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimin deneysel aşamaları Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarında, Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (BÜBTAM) ve Altınoluk Meslek Yüksek Okulu Botanik Laboratuvarında gerçekleştirilerek, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyeleri Prof. Dr. Selami SELVİ danışmanlığında ve eş danışmanım Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU danışmanlığında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek Lisans tezim süresince, tezimin botanik ile ilgili kısımları başta olmak üzere her süreçte yanımda olan; benden bilgi, birikim, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen; her türlü zorlu arazi koşullarında yanımda olan, tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Selami SELVİ' ye,

Tez çalışmam boyunca her zaman bana yol gösteren, karşılaştığım zorluklarda desteğini hiç esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olup, yolumu aydınlatan, değerli hocam, eş danışmanım Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU' na

Tez çalışmam süresince engin bilgi ve tecrübesiyle desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR' a ve bölümümüzün değerli tüm hocalarına,

Laboratuvar çalışmaları ve akademik faaliyetlerde bilgi ve tecrübelerini paylaşarak yanımda olan, kıymetli vakitler geçirdiğim değerli hocalarım Doç. Dr. Hatice YILDIRIM, Dr. Öğr. Üyesi Derya BABACAN, Dr. Esra TOKAY, Araş. Gör. Dr. Nelin HACIOĞLU'na,

BÜBTAM'da gerçekleştirmiş olduğum deneysel çalışmalarda, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşıp bana destek olan Dr. Öğr. Görevlisi Mehmet Emin DİKEN'e,

Zorlu çalışma günlerimde sevgi ve desteğini her zaman yüreğimde hissettiğim, kendime güvenemediğim zamanlarda beni cesaretlendiren, karamsarlığa düştüğüm zamanlarda yolumu bulmamı sağlayan canım hocam Fatma POYRAZLI'ya,

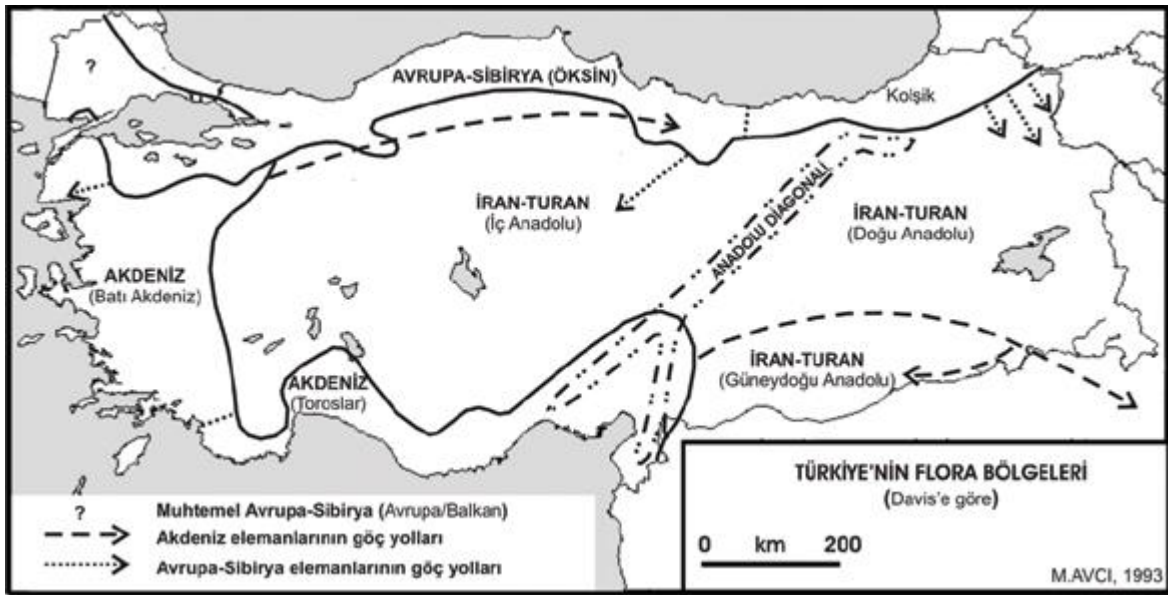
Laboratuvarda vakit geçirdiğim, çalıştığım bütün ekibe,

Bu eğitim sürecinde bana güvenen, inanan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, biricik annem Kadriye KOÇ'a, sevgili babam İbrahim KOÇ'a, canım abim Selçuk KOÇ'a ve tüm yakınlarıma,

Teşekkürlerimi sunuyorum.

## 1. GİRİŞ

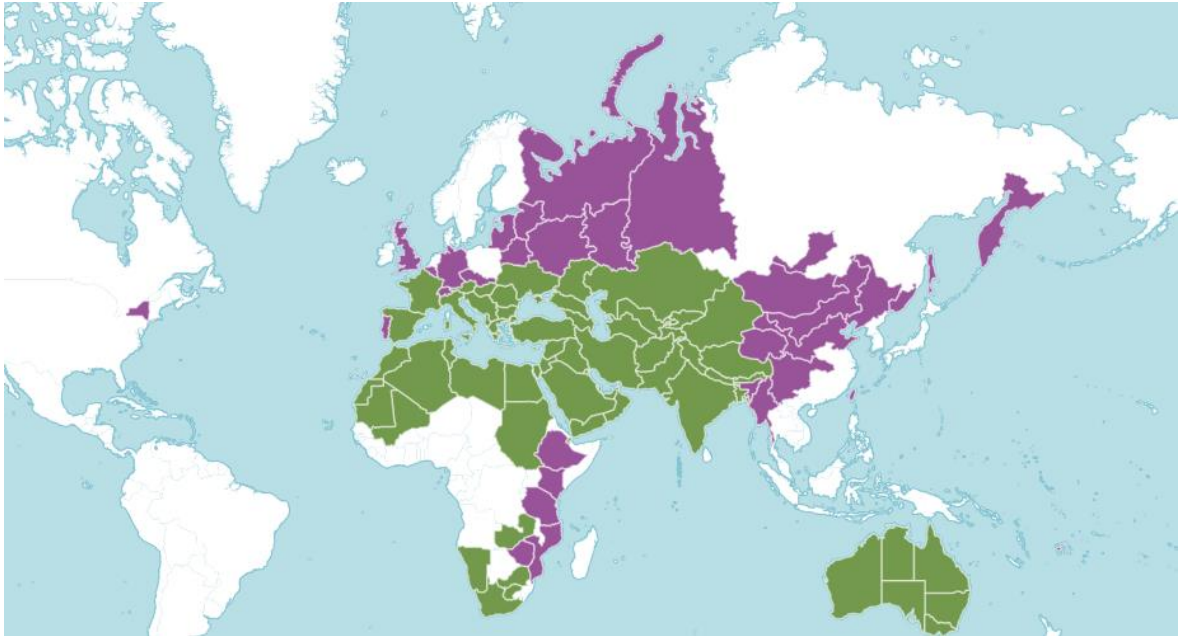
Dünya üzerinde Türkiye'nin konumu kuzey yarımkürede 26-45° doğu meridyenleri ile 36-42° kuzey paralelleri arasındadır. Bu alan ılıman kuşakta yer almaktadır ve bitki çeşitliliği çevresinde yer alan birçok ülkeye göre farklılık gösterdiği için yazarlardan bazıları bölgeyi "Asia Mineure" veya "Küçük Asya" olarak adlandırmaktadır (Akkemik, 2014). Son zamanlarda yapılan çalışmaların da eklenmesiyle Türkiye'nin yaklaşık 12.000 bitki taksonuna (tür, alt tür ve varyete) sahip olduğu tespit edilmiştir (Avcı, 2005). Sadece belirli bir coğrafik bölgede yayılış gösteren bitki türleri endemik olarak adlandırılmaktadır. Ülkemiz endemik tür bakımından Avrupa ülkelerine kıyasla zengin bir çeşitliliğe sahiptir. Türkiye florasının yaklaşık 3649'unu (1/3 'lük kısmı) endemik taksonlar oluşturmaktadır (Güner vd., 2012; Şenkul ve Kaya, 2017). Ülkemizin bu özelliği, coğrafi faktörlerin çeşitliliğinin sonuçlarındandır. İklim özelliklerinde kısa mesafelerde ortaya çıkan değişiklikler, toprak tiplerinin farklılıkları, morfolojik özelliklerinden kaynaklanan değişiklikler gibi çok sayıda coğrafi faktör, bitki formasyonlarının çeşitlenmesini ve türce farklılaşmasını sağlamaktadır (Demir, 2013). Ülkemizin bitki çeşitliliğine katkı sağlayan bu özellikler yanında, Türkiye'de üç farklı fitocoğrafik elementin (Avrupa-Sibirya, İran-Turan ve Akdeniz) temsil edilmesi de büyük önem taşımaktadır (Akkemik, 2014). Bu belirtilen özelliklere ek olarak tarih boyunca Anadolu'nun göç yolları üzerinde bulunması ve birçok medeniyete ev sahipliği yapması da bitki çeşitliliğinin artmasında önemli rol oynamıştır (Demir, 2013).



Şekil 1.1: Ülkemizde görülen fitocoğrafik bölgelerin dağılımı.

Şekil 1.1 de ülkemizde görülen fitocoğrafik bölgelerin dağılımı gösterilmiştir. Türkiye'nin zengin bitki florasından dolayı birçok tıbbi ve aromatik bitkiye de sahip olduğu bilinmektedir (Avcı 1993; Akkemik, 2014). Ülkemiz iklim ve bitki çeşitliliği, coğrafi konum ve tarımsal potansiyeli sayesinde tıbbi ve aromatik bitkiler ticaretinde önde gelen ülkelerden biridir. Ülkemizde, tıbbi amaçla kullanılan bitkilerin sayısı net olarak bilinmemektedir, fakat 500 civarında olduğu düşünülmektedir. Yaklaşık 200 tıbbi ve aromatik bitkinin ise ihraç potansiyelinin olduğu ileri sürülmektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

*Trigonella* L. Fabaceae familyasında yer alan tıbbi ve ekonomik değeri olan önemli bir cinstir. *Trigonella* cinsi üyeleri dünyada Doğu Akdeniz, Batı Asya, Güney Avrupa, Kuzey ve Güney Afrika, Yakın Doğu, Hindistan, Etiyopya gibi alanlarda yayılış göstermektedir (Koç, 2002; Akan vd., 2020). Cinsin dünya üzerinde genel yayılışı Şekil 1.2' de gösterilmiştir. Bu cins The Plant List'e göre dünyada 98' i tanımlanmış (Accepted), ve 97' si henüz tanımlanmamış (Unresolved) 195 takson ile temsil edilmektedir (The Plant List, 2021). Ülkemizde ise 10'u endemik olmak üzere 32 türle (34 takson) temsil edilmektedir (Güner vd. 2012).



**Şekil 1.2:** *Trigonella* cinsinin dünya üzerindeki yayılışı (Plants of the World online, 2021).

Şekil 1.2 incelendiğinde; yeşil renk ile gösterilen kısımlar; *Trigonella* taksonlarının doğal olarak yetiştiği ülkeleri temsil ederken; mor renk ile gösterilen ülkeler ise sonradan oluşan

ya da kültüre alınan ülkeleri temsil etmektedir. Kültüre alınan en önemli türü ise *T. foenum graecum* oluşturmaktadır.

Bitkilerin taksonomik açıdan anlaşılır bir şekilde incelenebilmesi için mikromorfolojik ve anatomik çalışmaların titizlikle yapılması gerekmektedir (Aytaç ve Kaptaner İğci, 2012). Anatomik ve mikromorfolojik çalışmaların sistematikteki yeri oldukça önemlidir. Anatomik çalışmalarda epidermal yüzey, trikomlar, demet yapıları, kollenkima ve sklerankimanın varlığı, petiyol demet yapısı ve şekli ile trake çapları gibi çeşitli yapılar familya ve alt taksonlar da önemli ayırt edici karakterlere sahip olmaktadır (Metcalf ve Chalk, 1950).

Vücudun herhangi bir yerinde (organ ya da doku) hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalıp büyümesiyle ortaya çıkan hastalıklara kanser denir. Kanser türleri oluştuğu dokuya göre isimlendirilir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre 2020 yılında kanserden yaklaşık 10 milyon kişi hayatını kaybetmiştir. Daha sık görülen ve erken teşhis edilmediği zamanlarda ölüme sonuçlanan kanser türleri; akciğer, mide, kolon, karaciğer, mide ve meme kanseri şeklinde sıralanmaktadır (World Health Organization, 2021). Kanser tedavisi ile ilgili birçok araştırmalar yapılmaktadır. Kanserle ilgili yapılan çalışmalardan biri de sitotoksisite deneyleridir. Sitotoksisite çalışmaları *invivo* ve *invitro* ortamlarda gerçekleştirilebilmektedir. *In vitro* çalışmalar hücre kültürü ortamlarında yapılmaktadır. Hücre kültürü, çok hücreli organizmalara ait hücrelerin, laboratuvarlarda özel olarak tasarlanmış ortamda, besin, ısı, nem gibi ortam şartlarının kontrol edilerek kontaminasyondan arındırılarak yaşatılmasıdır.

Sitotoksik, hücre ölümüne neden olan anlamında kullanılmaktadır. İncelenen maddenin dozuna ve etki süresine bağlı olarak hücrelere farklı derecelerde zarar veren olaya sitotoksisite denir. Hücreler sitotoksik madde ile etkileşim sonucunda otofaji, apoptoz ve nekroz gibi olaylardan dolayı ölebilir ya da sitostazis durumundan dolayı proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler. Sitotoksik maddeye maruz bırakılan hücrelerin, sonrasında canlılık oranlarının (canlı/ölü hücre miktarı) belirlenmesi bu sitotoksisite çalışmalarının amacını oluşturmaktadır (Tokur ve Aksoy, 2017).

*T. coerulescens* subsp. *ayvalikensis* taksonu 2017 yılında Erdoğan ve ark (2017) tarafından bir uluslararası bir makale ile bilim dünyasına tanıtılmıştır. Bu bitkinin yayılış popülasyonunun sadece Ayvalık ilçesinin Badavut sahilleri ile Küçükköy' ün sahil kenarları

üzerinde bulunmasından ve antropojenik baskılara maruz kalma riski taşımasından dolayı VU (Vulnerable / Zarar görebilir) kategorisinde değerlendirilmiştir (Erdoğan vd., 2017).

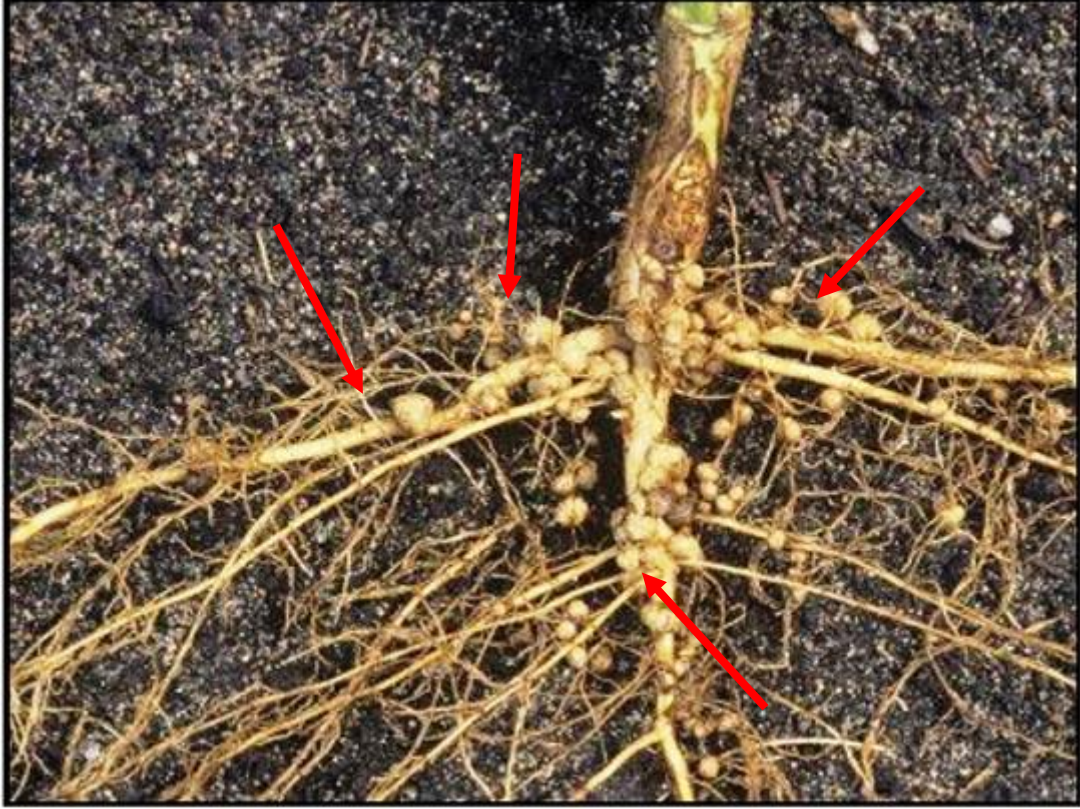
### **1.1 Fabaceae Familyasının Dünya ve Türkiye’deki Takson Sayısı**

Fabaceae (Leguminosae) familyası yaklaşık 730 cins ve 19400’den fazla tür ile dünyanın en zengin üç familyasından biridir. İnsanlık için önemli bir familya olan Fabaceae ekonomik açıdan da önemli bitki grubudur. Bu familyanın üyeleri; Antartika kıtası hariç dünyanın hemen hemen her yerinde yayılış gösteren geniş toleranslı taksonlar içermektedir (Gözen, 2012; Rahman ve Ara Parvin, 2015).

Ülkemiz fitocoğrafyasında Fabaceae familyası 72 cins ve 383’ ü endemik olmak üzere toplamda 1228 takson ile temsil edilmektedir (Güner vd., 2012).

### **1.2 Fabaceae Familyasının Ekonomik ve Tıbbi Olarak Değerlendirilmesi**

Fabaceae familyası, Buğdaygillerden (Poaceae) sonra gıdalarda en çok tüketilen ikinci besin kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Yapılarında bulunan proteinden dolayı hayvansal besin maddelerine daha yakın olup, hayvansal proteinlerin yeterli olmadığı durumlarda protein açığının kapatılmasında önemli bitkisel besin kaynaklarını oluşturmaktadırlar. Ülkemizde et ve et ürünlerine kıyasla daha ucuz olmaları ve kolay saklama koşullarından dolayı tercih edilmektedirler. Tohumları, protein yanında karbonhidrat, yağ, çeşitli vitaminler, potasyum, fosfor, kalsiyum ve demir gibi minareller açısından da zengindir. Ayrıca yüksek oranda diyetsel lif içermektedirler. Yüksek miktarda protein içermeleri, köklerinde havanın serbest azotunu tespit eden bakterilerin yaşadığı nodüllerin bulunmasına bağlıdır. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* spp. bakterileri bu bitkilerin köklerinde nodüller oluşturup, azot fiksasyonunu gerçekleştirmektedirler. Şekil 1.3’de bu bakterilerin bitki köklerinde oluşturduğu nodüller ok işaretiyle gösterilmiştir. Fabaceae familyasında azot fiksasyonu, nodül denilen yumrucuklar sayesinde gerçekleşmektedir. Gerçekleştirilen bu azot fiksasyonu etkin olarak kullanıldığı zaman, baklagil bitkileri köklerinde yaşayan *Rhizobium* bakterileri yoluyla atmosfer azotundan faydalanarak, tarımsal üretimde daha az azotlu gübre kullanımı sağlanmaktadır (Ketenoğlu vd., 2011; Uyanık vd., 2011; Özsoy Altunkaynak ve Ceyhan, 2018).



**Şekil 1.3:** Bakterilerin baklagil köklerinde oluşturduğu nodüller (Özdermirpharma, 2017).

Fabaceae familyasının çoğu üyesi ülkemizde gıda, yem ve süs bitkisi olarak kullanılmaktadır. Tablo 1.1’ de ülkemizde doğal yetişen ve çeşitli amaçlarla kullanılan bitkiler verilmiştir.

**Tablo 1.1:** Ülkemizde Yayılışı Olan Fabaceae Familyasındaki Bazı Bitkilerin Kullanım Amaçları (Güner ve Ekim, 2014).

Bilimsel Adı	Türkçe Adı	Kullanım Amacı
<i>Acacia dealbata</i> Link	Gümüşü akasya	Süs bitkisi
<i>A. farnesiana</i> (L.) Willd.	Tatlı akasya	Süs bitkisi
<i>A. karroo</i> Hayne	Akasya	Süs bitkisi
<i>A. longifolia</i> (Andrews) Willd.	Uzun akasya	Süs bitkisi
<i>A. mearnsii</i> De Wild.	Mersin akasyası	Süs bitkisi
<i>A. retinodes</i> Schldtl.	İzmir akasyası	Süs bitkisi
<i>A. saligna</i> (Labill.) H.L.Wendl.	Kıbrıs akasyası	Süs bitkisi
<i>Amorpha fruticosa</i> L.	Çivit ağacı	Süs bitkisi
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Yer fıstığı	Gıda
<i>Caesalpinia gilliesii</i> (Hook) D.Dietr	Zampara bıyığı	Süs bitkisi
<i>Ceratonia siliqua</i> L.	Keçiboynuzu	Gıda

<i>Cercis siliquastrum</i> L.	Erguvan	Süs bitkisi
<i>Cicer arietinum</i> L.	Nohut	Gıda
<i>C. reticulatum</i> Ladizinsky	Siğilli nohut	Gıda
<i>Gleditsia triacanthos</i> L.	Gilediçya	Süs bitkisi
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Soya	Gıda
<i>Lathyrus cicera</i> L.	Colban	Yem bitkisi
<i>L. hirsutus</i> L.	Kaba mürdümük	Yem bitkisi
<i>L. odoratus</i> L.	Kokulu mürdümük	Süs bitkisi
<i>L. sativus</i> L.	Mürdümük	Yem bitkisi
<i>Lens culinaris</i> Medik. subsp. <i>culinaris</i>	Mercimek	Gıda
<i>Lupinus albus</i> L.	Termiye	Yem bitkisi-Gıda
<i>Medicago sativa</i> L.	Karayonca	Yem bitkisi
<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop.	Korunga	Yem bitkisi
<i>Parkinsonia aculeata</i> L.	Sülunağacı	Süs bitkisi
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>vulgaris</i>	Fasulye	Gıda
<i>P. vulgaris</i> L. var. <i>nanus</i> Asch.	Bodur fasulye	Gıda
<i>P. coccineus</i> L.	Bombay fasulyesi	Gıda
<i>Pisum sativum</i> L.	Bezelye	Gıda
<i>P. sativum</i> L. subsp. <i>sativum</i> var <i>arvense</i> (L.) Poir.	Yemlik bezelye	Yem bitkisi
<i>Robinia hispida</i> L.	Kıllı akasya	Süs bitkisi
<i>R. pseudoacacia</i> L.	Yalancı akasya	Süs bitkisi
<i>Styphnolobium japonicum</i> (L.) Schott.	Sofora	Süs bitkisi
<i>Trifolium pratense</i> L. var. <i>villosum</i> DC.	Çayır üçgülü	Yem bitkisi
<i>T. repens</i> L.	Ak gül	Yem bitkisi
<i>T. resupinatum</i> L.	Anadolu üçgülü	Yem bitkisi
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	Çemenotu	Yem bitkisi-Gıda
<i>Vicia ervilia</i> (L.) Willd.	Burçak	Yem bitkisi
<i>V. faba</i> L. var. <i>faba</i>	Bakla	Gıda
<i>V. narbonensis</i> L.	Koca fiğ	Yem bitkisi
<i>V. pannonica</i> Crantz.	Macar Fiği	Yem bitkisi
<i>V. sativa</i> L.	Fiğ	Yem bitkisi
<i>V. sativa</i> L. subsp. <i>nigra</i> (L.) Ehrh. var. <i>nigra</i>	Eşek gürülü	Yem bitkisi
<i>V. sativa</i> L. subsp. <i>sativa</i>	Fiğ	Yem bitkisi
<i>V. sericocarpa</i> Fenzl. var. <i>sericocarpa</i>	Çitfiği	Yem bitkisi
<i>V. villosa</i> Roth subsp. <i>dasycarpa</i> (Ten.) Cav.	Dağ eferiği	Yem bitkisi

<i>V. villosa</i> Roth subsp. <i>villosa</i>	Tüylü fiğ	Yem bitkisi
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. subsp. <i>Börülce unguiculata</i>	Börülce	Gıda

### 1.3 Fabaceae Familyasının Genel Özellikleri

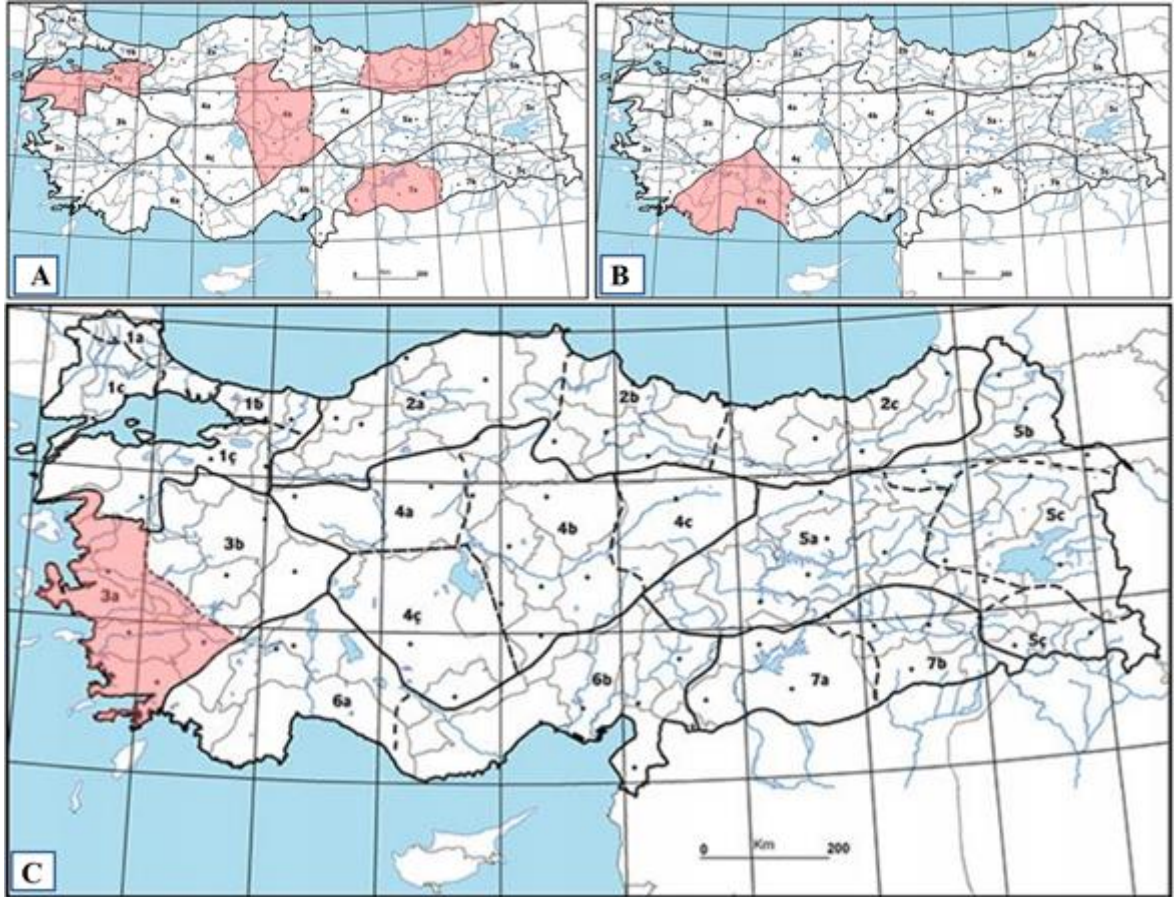
Fabaceae familyası tek yıllık otsulardan ağaçlara kadar geniş bir hayat formuna sahip ve kozmopolit özellikte olup, dünya üzerinde geniş bir alanda yayılış gösterir. Dünya üzerinde 750 cins ve yaklaşık 20.000 tür içermektedir. Türkiye Florası'nda ise 83 cins ve 1145 türle temsil edilmekte olup bunların 472' si (%41.2) Türkiye için endemiktir. Fabaceae familyası Papilionoideae, Mimosoideae ve Caesalpinioideae olmak üzere 3 alt familyaya sahiptir. Bu familyanın karakteristik ortak özelliği legümen tipi meyveye sahip olmasıdır. Fabaceae familyası otsu, çalılar, ağaçlar ve sarılıcılardan oluşan dikenli ya da dikensiz taksonlardır. Yaprakları; paripinnat, imparipinnat, bipinnat veya nadiren palmat loblu ya da trifoliat, tendrilli veya dikenlidir. Genellikle stipulaya (kulakçık) sahip familya üyelerinin bazılarında stipullar diken şeklini almıştır. Çiçekler düzenli ya da düzensiz (aktinomorf veya zigomorf) simetridir; ovaryum yapısına göre hipogin veya perigin ve çiçekler hermafrodit (iki eşeyli) yapıdadır. Çiçekler tek, rasem, spika veya şemsiye hallerinde görülür. Sepaller (4-) 5, petaller (1-) 5, tabanda serbest veya birleşik. Stamenler 5 veya genelde 10 adet, monodelfus (birleşik) veya diadelfus (ayrı) ya da bazen tamamı serbesttir. Meyveler bir veya çok tohumludur (Davis,1970; Denarie vd., 1992; Brockwell 1995;Kocabaş 2014).

### 1.4 *Trigonella* L. Cinsinin Genel Özellikleri

Tüylü ya da tüysüz tek yıllık (Türkiye'de) trifoliat yapraklı otsular. Yaprakçıklar genellikle dişli, emarginat; stipüller petiyole bitişik; 1-5-9 x 0.5-4 mm boyutlarında, ovat, lanseolat kuneat, obovat, oblong, obkordat, orbikular, romboid şekillerdedir. Çiçekler koltuk altlarında tek ya da çoğunlukla başçıklarda, başak (spika) ya da kısa rasemli. Kaliks 5 dişli, kampanulat ya da bazen tüpsü; düzenli ya da dudaklı, 1.5-1 mm uzunluğundadır. Korolla sarı, menekşe, pembemsi, soluk lila, mavi, portakal ya da nadiren beyaz renklidir. Standart oblong ya da obovat, 2.5-0 x 1-8 mm. Kayıkçık obtuz, şeritsi-obovat, oblong kanatlardan daha kısadır. Stamenler petallerden ayrı, diadelfus. Filamentler uçta genişlememiş, beyazımsı, tüysüz; anterler dorsifiks, stigma kapitat. Meyve çoğunlukla kaliksten taşmış, düz ya da bükülmüş; şeritsiden oblong ya da ovata kadar bazen subovat, gagalı ya da gagasız; kanatsız, 1-çok tohumlu. Tohumlar çoğunlukla tüberküllü ya da buruşuk, nadiren

düzdür (Akan vd, 2020). Türkiye'de doğal olarak yayılış gösteren *Trigonella coerulescens*'in üç alt türü bulunmaktadır Türün teşhis anahtarı aşağıda verilmiştir (Erdoğan vd., 2017).

1. Brakte 3-6 mm, kaliks 6-9 mm, dişler subulat, yaprakçıklar obovat-kuneat ve yoğunca villoz, tohumlar ovoid-oblong.....2
1. Brakteler 2-2.5 mm, kaliks 5 mm, dişler linear, yaprakçıklar obovat ve yoğunca tomentoz, tohumlar ovat.....**subsp. kemerensis**
2. Brakteler 4-6 x 2.25 mm, kaliks 7-9 mm, çiçek durumu 6-15 çiçekli, pedunkul 15-65 mm uzunlukta ve yoğun hirsut, stipüller 6-7 mm.....**subsp. coerulescens**
2. Brakteler 3-5x5-10 mm, kaliks 6-7 mm, çiçek durumu 15-25 çiçekli, pedunkul 6-30 mm, uzun ve yoğun tomentoz, stipül 3-6 mm.....**subsp. ayvalikensis**



**Şekil 1.4:** *T. coerulescens* taksonlarının ülkemizdeki yayılış alanları. A) subsp. *coerulescens*, B) subsp. *kemerensis*, C) subsp. *ayvalikensis* (Bizim Bitkiler, 2013).

*T. coerulescens* taksonlarının ülkemizdeki genel yayılış alanları Şekil 1.4' te gösterilmiştir. Bu taksonlardan ülkemizde en geniş yayılışa sahip olan subsp. *coerulescens* taksonudur. Bu takson; Güney Marmara Bölümü, Doğu Karadeniz Bölümü, Orta

Kızılırmak Bölümü, ve Orta Fırat Bölümünde doğal olarak yayılış göstermektedir. Diğer iki takson lokal endemiktir. Subsp. *kemerensis* sadece Antalya, Çıralı’da yayılış gösterirken; subsp. *ayvalikensis*’te Balıkesir Ayvalık ilçesinde yayılış göstermektedir (Şekil 1.4).

*T. coerulescens* subsp. *ayvalikensis* taksonu *Trigonella* cinsinin “*Biebersteiniana*” seksiyonunda yer almaktadır. Takson morfolojik olarak; tabandan itibaren dallanmış, kadifemsi tüylü; gövde dik ya da hafif yatık, 5-20 cm boylarındadır. Stipüller ovat, dişli; yaprakçıklar obovat, yoğun villoz tüylü, 8-15 x 3-10 mm. Pedünkül 1.5-5 cm. Çiçek başları 12-15 çiçekli, yoğun ovat; meyvede oblong, 15-30 x 10-15 mm. Kaliks tubular, 7-9 mm, dişler subulat. Korolla mavi, 11-15 mm. Meyve hirsut, lanseolat, oldukça kavisli, 10-15 x 2-3 mm, 4-6 tohumlu. Tohumlar ovat, 2 mm boyundadır.

### **1.5 *Trigonella* L. Cinsinin İçeriğinde Bulunan Etken Maddeler**

*Trigonella* cinsi tohumları, flavonlar, izoflavonlar ve polisakkaritlerin yanında en çok bulunan bileşikler steroidal saponinler olan birkaç sekonder metabolit grubunu içerdiği bilinmektedir. Tohumlardaki steroidal saponin kompleksi, düz veya dallı şeker zincirlerine sahip farklı spirostanol ve furostanol saponinlerden oluşmaktadır. Ana aglikonlar (steroid saponinler) diosgenin ve 25 epimer yamogenin olduğu bilinmektedir. *T. foenum-graecum* tohumlarında meydana gelen saponinler üzerine yapılan araştırmalar, birçok bağımsız çalışmanın konusu olmuştur ve sonuç olarak, aynı kimyasal yapıya sahip bileşiklere, örneğin protodiosin/bileşik C, protoneodiosin/trigonellasit C gibi farklı ortak isimler verilmiştir (Krol-Kogus vd., 2020) .

Krol-Kogus vd., (2021) tarafında yapılan çalışmada, *T. foenum-graecum* tohumlarından %70’lik metanol çözültisi ile elde ettikleri ekstraktı HPLC yöntemiyle analiz ederek içeriğinde en çok flavon C-glikozitlerinden; izoviteksin, vicienin-1 ve viteksin bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Stefanowicz-Hajduk vd. (2021) yapmış oldukları çalışmada, *T. foenum-graecum* bitkisinin tohumlarını fitokimyasal olarak analiz ederek, steroid saponinler ( yamogenin, tigogenin, diosgenin), flavon C-glikozitler (viteksin, orientin, izoorientin, vicienin-1, vicienin-2, vicienin-3) ve alkaloid (trigonellin) bileşiklerinin bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Abas ve Naguib (2019) tarafından yapılan çalışmada *T. foneum* ekstraktının fitokimyasal bileşenlerinin, alkaloid, flavonoid, fenolik, steroid, saponin, trigonellin, fitat, glikozidik siyanür ve tanenden oluştuğunu tespit etmişlerdir.

## 1.6 *Trigonella* L. Üzerine Yapılmış Çalışmalar

### 1.6.1 *Trigonella* L. cinsi ile ilgili yapılan mikromorfolojik-anatomik çalışmalar

Literatür araştırmalarında; *Trigonella* türleri üzerine yapılmış az sayıda mikromorfolojik ve anatomik çalışmalara rastlanmıştır. Bu çalışmalarda daha çok; gövde, yaprak ve pedunkul gibi organların anatomik yapısı araştırılmıştır. Morfolojik çalışmalarda ise polen ve tohum yüzeyleri incelenmiştir. *T. coerulescens*' in alt türleriyle yapılmış herhangi bir morfolojik ve anatomik çalışmalara rastlanmamıştır.

Ranjbar ve Hajmoradi (2016); *T. spruneriana* Boiss. türünün yetiştiği 15 farklı popülasyondan alınan örnekler üzerinde anatomik araştırmalar gerçekleştirmişlerdir. Anatomik çalışmalarda; kollenkima, parankima, sklerenkima lifi tabaka sayısı ve damar demetlerinin sayısı, enine kesit şekli, yaprakların adaksiyal yüzeyindeki stomaların yoğunluğu ve boyutu, stoma tipi ve epidermal hücre şekli gibi çeşitli anatomik karakterler üzerinde yürütölmüştür. Ayrıca, çalışmadan elde edilen anatomik karakterlere dayalı karşılaştırmalı tabloda verilmiştir. Sonuç olarak türün intraspesifik bir özellik taşıdığı anatomik verilere göre ortaya konulmuştur.

Ranjbar ve Hajmoradi (2015); *Trigonella* seksiyonundan yeni bir tür olan *Trigonella bakhtiarica* türü üzerinde sitogenetik ve anatomik çalışmalarda gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmalarda *T. bakhtiarica* türü ile birlikte bu türe çok yakın olan *T. aphanoneura* türünün karşılaştırmalı gövde anatomik yapısı ile yaprak üst ve alt yüzeyinin anatomisini araştırmışlardır.

Ghadri vd. (2014); *Trigonella* cinsine ait 5 takson üzerinde (*T. monantha* subsp. *monantha*, *T. orthocera*, *T. foenum-graecum*, *T. monspeliaca*, *T. grandiflora*) karşılaştırmalı morfolojik, anatomik ve palinolojik araştırma yürütmüşlerdir. Morfolojik çalışmalarda; vejetatif ve floral yapıda gözlenen karakterler UPGMA kullanılarak cluster analiziyle yakınlık dereceleri ortaya konulmuştur. Anatomik çalışmalarda gövde ve yaprakların anatomik özellikleri incelenmiş ve karşılaştırmalı olarak farklılıklar ve benzerlikler gösterilmiştir. Palinolojik çalışmalarda polen örnekleri üzerinde asetoliz yöntemi uygulanmış ve sonra örnekler SEM' de incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda; türler arasında gövdedeki ksilem sklerankimanın tipinde ve trake çaplarında önemli varyasyonlar tespit edildiği belirtilmiştir. Palinolojik çalışmalarda da polen ornamentasyonunun taksonların sınıflandırılmasında önemli katkıları olduğunu ifade etmişlerdir.

Pınar vd. (2014); Türkiye’de yetişen 38 *Trigonella* türünün polenlerini ışık (LM) ve taramalı elektron mikroskopunda (SEM) morfolojik olarak incelemişlerdir. Çalışmada incelenen polenler Wodehouse yöntemine göre hazırlanmıştır. Çalışmada, *T. coerulescens* subsp. *coerulescens* taksonunun polen morfolojisi de ele alınmıştır.

Ranjbar vd. (2014); İran’ da yeni bir tür olarak tespit edilen ve Ellipticae seksiyonunda yer alan *Trigonella khalkhalica* türü üzerinde mikromorfolojik ve anatomik çalışmalar yürütmüşlerdir. Bu çalışmalarında *T. khalkhalica* türü sistematik açıdan yakın olan *T. elliptica* türü ile karşılaştırılmıştır. Anatomik çalışmalarda; gövde anatomik yapısı ile yaprak üst ve alt yüzeyinin anatomisini araştırılmıştır. Morfolojik çalışmalarda ışık mikroskopunda polen de (Wodehouse yöntemiyle) araştırılmıştır.

Dinu vd. (2013); *T. foenum graecum* ve *T. caerulea* türlerinin tohumlarını morfolojik ve kimyasal açıdan değerlendirmişlerdir. Ayrıca SEM’ de çiçek yapısını da araştırmışlardır.

Turki vd. (2013); *Trigonella* cinsine ait 19 türün tohum morfolojisini LM ve SEM’de incelemişlerdir. Tohum morfolojisinde; şekil, renk, hilum şekli ve konumu ile tohum yüzeyi gibi karakterleri incelemişlerdir. Daha sonra elde edilen karakterlere dayalı filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

Ranjbar vd. (2012) İran’da Ellipticae seksiyonuna dahil edilen yeni bir tür (*T. yasujensis* Ranjbar, Z. Hajmoradi & Karamian) üzerinde taksonomik çalışmalar yürütmüşlerdir. Bu çalışmalarında yeni türün anatomik ve palinolojik özellikleri de araştırılmıştır. Anatomik çalışmalarda yeni türle beraber bu türe en yakın olan *T. elliptica* türünün gövde ve pedunkul yapısı LM’ de incelenmiştir. Palinolojik çalışmalar LM’de gerçekleştirilmiştir. Sonuçta iki tür arasında benzerlik ve farklılıklar tablo halinde sunulmuştur.

Çeter vd. (2012); Türkiye’de doğal olarak yetişen *Trigonella* taksonlarının tohum morfolojisi araştırmışlardır. Çalışmada 37 taksonun tohum morfolojisi ayrıntılı olarak hem stereomikroskop hem de SEM ile ayrıntılı olarak çalışılmıştır. Çalışılan taksonlardan birisini de *T. coerulescens* subsp. *coerulescens* oluşturmaktadır.

Ranjbar vd. (2010); tarafından İran’da yayılış gösteren *T. disperma* Bornm. ex Vassilcz türünün yaprak epidermis morfolojisi ve pedunkul anatomisi araştırılmıştır. Anatomik çalışmalarda; kollenkima, parankima, sklerenkima fibrilleri, vaskuler demet sayı yoğunluğu, stoma tipi, yaprakçıkların adaksiyal ve abaksiyal stoma yoğunlukları gibi önemli anatomik karakterler ortaya konmuştur.

### 1.6.2 *Trigonella L.* cinsi ile ilgili yapılan sitotoksikite çalışmaları

Stefanowicz-Hajduk vd. (2021), *T. foenum-graecum* bitkisinin tohumlarındaki bileşiklerden (saponinler, flavon C-glikozitler, alkaloid trigonellin) ekstrakt elde ederek, SKOV-3, HeLa ve MOLT-4 kanserli hücre hatlarının sitotoksik aktivitelerini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Araştırmacılar tohumlardan iki farklı ekstrakt (metanol-su) ve ayrıca tohumları petrol eteri-kloroform ile saflaştırılıp metanol ile ekstrakte ederek fraksiyon hazırlamışlardır. Hazırlanan bu fraksiyonun kanserli hücre hatları üzerinde güçlü sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca fraksiyonun, ROS üretimini ve hücrelerdeki kaspaz aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı gözlenmiştir.

Mahapatra vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada; *T. foenum-graecum* bitkisindeki Fe (II) Schiff baz kompleksinin etki mekanizması; morfolojik, sitolojik, biyokimyasal ve moleküler yaklaşımlar kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada Fe (II) Schiff baz kompleksinin anti-tümör aktivitesinin değerlendirilmesi için MCF-7 hücre hattı ve katı tümör modeli kullanılarak daha fazla fonksiyonel karakterizasyon gerçekleştirilmiştir. Araştırmacıların yaptığı deney sonuçları, DNA'da çift sarmal kırılmaların indüksiyonunda Fe (II) Schiff baz kompleksinin etkinliğini göstermiştir. Bu duruma göre de *Trigonella* fidelerinde açıkça sitotoksik ve genotoksik hasarın tetiklendiğini bildirmişlerdir. Çalışmada, Fe-kompleks tedavisi, *Trigonella* fidelerinde riskli CDK1, CDK2 ve CyclinB1 proteini ekspresyonu ile ATM-ATR kinaz aracılı DNA hasarı yanıt yolunun aktivasyonu ile hücre döngüsünün durmasına neden olduğunu gözlemlemişler, ayrıca kültürlenmiş MCF-7 hücrelerinde, Fe (II) Schiff baz kompleksinin hücre içi ROS üretimi yoluyla sitotoksikiteyi ve DNA parçalanmasını indüklediğini de bildirmişlerdir. Fe-kompleks tedavisinin, katı tümör modelinde de tümör büyümesinin herhangi bir yan etki olmaksızın inhibe ettiğini saptamışlardır.

Thakur ve Ahirwar (2019) tarafından yapılmış çalışmada; *T. foenum graecum* tohumlarından izole edilen steroidal bileşik, etil izo-allokolat'ın A549 akciğer kanseri hücrelerine in vitro ve in vivo olarak sitotoksikitesi, antitümör, antimetastatik ve antianjiyojenik etkilerini araştırmışlardır. İzole edilen tüm bileşikler arasında etil izo-allokolat'ın, en yüksek sitotoksikite potansiyeli sağladığını gözlemlemişlerdir. İn vitro verilerle tutarlı olarak, zebra balıklarında etil izo-allokolat, en yüksek yüzde tümör büyümesi inhibisyonunu gösterdiğini saptamışlardır. Araştırmacılar yapmış oldukları bu deney sonuçlarına göre, *T. foenum-graecum* tohumlarından izole edilen steroidal türevin, kanser hücrelerinde kaspaz bağımlı apoptozu indüklediğini ve in vivo tümör büyümesini,

metastazı ve anjiyogenezi azalttığını ve normal dokular üzerinde güvenli olduğunu gözlemlemişlerdir.

Allaoui vd. (2019); *T. foenum graecum*'un iki tane protein hidrolizatının (Purafect ve Esperase) kolorektal kanserin tedavisi ve ilerlemesi üzerindeki olası etkisini araştırmışlardır. Purafect ve Esperase adlı iki enzimi ayrı ayrı kullanarak hidrolize etmişler ve daha sonra farklılaşmış ve farklılaşmamış insan kolonik adenokarsinomu Caco2 / TC7 hücreleri üzerinde test etmişlerdir. Her iki hidrolizatın, farklılaşmış hücrelerin büyümesini etkilemezken, G1 fazında erken apoptoz ve hücre döngüsü durması ile farklılaşmamış hücre proliferasyonunda bir azalmaya neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu durumun, mitokondriyal membran geçirgenliği, sitokrom C'nin sitoplazmaya salınması ve kaspaz-3 aktivasyonu ile tetiklendiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar ek olarak, *T. foenum graecum* proteinlerinin hidrolizatları, ROS'un hücre içi seviyelerini düşürdükleri için antioksidan aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Bu bulgulara göre araştırmacılar, *T. foenum graecum* proteininin hidrolizatlarının kolorektal kanser tedavisinde nutrasötik moleküller olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Rao ve Grant (2019) tarafından yapılan çalışmada, *T. foenum-graecum* ekstratının iyi huylu prostat hiperplazisi (BPH) semptomları üzerindeki etkisini çift-kör randomize, plasebo kontrollü bir çalışma kullanarak değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında, BPH semptomları olan 45 ile 80 yaşları arasındaki 100 sağlıklı erkeği dikkate almışlardır. Katılımcıları, günde 600 mg *T. foenum-graecum* veya 12 hafta boyunca plasebo oral dozuna randomize etmişlerdir. Araştırmacılar deney sonuçlarına göre, *T. foenum-graecum*'un BPH semptomlarını iyileştirme üzerinde bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Hormon seviyelerinin, güvenlik markörleri ve prostata özgü antijenin 12 hafta sonra değişmeden ve normal sınırlar içinde kaldığını gözlemlemişlerdir.

Abas ve Naguib (2019) tarafından yapılan çalışmada *T. foenum graecum*' un kuru tohumundan ve çimlenmiş tohumundan iki farklı sulu ekstrat hazırlayarak, antikanser aktivitesi üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Her iki ekstraktın da MCF7 insan göğsü ve pankreas (AsPC-1) hücreleri üzerindeki büyümeyi önleyici etkisini araştırmışlardır. Deney sonuçlarına göre araştırmacılar, hem kuru hem de çimlenmiş ekstratların her iki hücre hattında da apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Çimlendirilmiş ekstraktın etkisinin kuru ekstraktından daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir.

Goyal vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada, *T. foenum-graecum* (TFG) tohum ekstratı kullanılarak gümüş nanopartiküllerin (AgNP'ler) sentezi için basit ve çevre dostu bir yöntem belirlenmiştir. Antibakteriyel aktivitelerde; *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* kullanılmıştır. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlardan, TFG-AgNP'lerin gram pozitif bakteri üzerinde daha fazla etkiye sahip olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca biyosentezlenmiş TFG-AgNP'lerin, deri kanseri hücre hattına (A431) karşı kayda değer antikanser etkinliği gösterdiğini ve önemli antioksidan etkinlik sergilediğini tespit etmişlerdir.

Al-Dabbagh vd. (2018) tarafından yapılan in vitro çalışmada; *T. foenum-graecum* türünün ekstraktlarının antioksidan aktiviteyi, toplam fenoller ve flavonoidleri belirleyerek antiproliferatif aktivitesini değerlendirmişlerdir. Çalışmada, test edilen ekstraktların etkilerini insan hepasellüler kanser hücre hattına (HepG2) karşı araştırmışlardır. Test edilen tüm ekstratlarla tedavi edilen hücrelerde hücre canlılığında doza bağlı bir azalma rapor edilmiş ve HepG2 kanser hücre hattını yok edici etkisi gözlemlenmiştir.

Iranmanesh vd. (2018); *T. foenum-graecum* tohumunun hidroalkolik ekstratının anti-anjiyojenik aktivitesini in vitro ve in vivo olarak araştırmışlardır. Araştırmacılar, tohumun hidroalkolik ekstratını ve talidomidini (kanser tedavi edici olduğundan pozitif kontrol olarak kullanılmış) insan sağlıklı endotelial hücre hattı (HUVEC'ler) ve 3T3 fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini, tiyazolil mavi tetrazolyum bromür (MTT) deneyi ile değerlendirmişlerdir. *T. foenum-graecum* tohumunun hidroalkolik ekstratının anti-anjiyojenik etkisini incelemek için in vivo model olarak civciv koryoallantoik membranı (CAM) kullanmışlardır. Deney sonuçlarına göre, tohumun hidroalkolik ekstratının, talidomide benzer şekilde, HUVEC'lerin ve 3T3 hücrelerinin canlılığını 24 saat sonra doza bağlı olarak önemli ölçüde inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. CAM modelinde tohumun hidroalkolik ekstratı ve talidomid, neovasküler noktaların sayısında ve 1. ve 2. derece damarların miktarında önemli bir düşüşe neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak; *T. foenum-graecum*'un vitro ve in vivo olarak sitotoksik ve anti-anjiyojenik etkilere sahip olduğu ortaya konulmuştur.

Habib-Martin vd. (2017); *T. foenum-graecum*'un ham ekstraktlarının farklı fraksiyonlarını hazırlamışlar ve bunların antianjiyojenik özelliklerini, ex vivo sıçan aortik halka deneyi ve in vivo tavuk embriyo koryoallantoik membranı (CAM) deneyini kullanarak değerlendirmişlerdir. MTT testini kullanarak MCF7 hücrelerinde doğrudan sitotoksik

aktivite tayini yapmışlardır. Araştırmacıların yapmış oldukları deney sonuçlarına göre, etanol ekstratı, sıçan aortik halka deneyinde birincil doku eksplantlarından kan damarı büyümesine %100 inhibisyon gösterdiğini, diğer ekstratların anlamlı antianjiyojenik aktivite göstermediğini belirtmişlerdir. Etanol ekstratının bu nedenle çeşitli konsantrasyonlarda denemişler ve önemli bir doza bağımlı etki sergilediğini ortaya çıkartmışlardır. Etanol ekstratının, yeni kan damarları oluşumunda önemli bir inhibisyon gösterdiğini, CAM testi aortik halka testinin sonuçlarıyla aynı zamana denk geldiğini gözlemlemişlerdir. Ekstratların yalnızca MTT testinde MCF7 göğüs kanseri hücre hatlarına karşı en yüksek konsantrasyonda anti-proliferatif aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Ahmed vd. (2017) tarafından yürütülen çalışmada *T. foenum graecum* türünün metanol ve etil asetat ekstraktlarının, fare beyninde kanser hücre hatları ve NaNO<sub>2</sub> kaynaklı nörodejenerasyona karşı koruyucu etkilerini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Deneylerde yetişkin erkek albino farelerine, 15 gün boyunca 300 mg / kg'lık bir dozda ağızdan NaNO<sub>2</sub> uygulamışlardır. Kontrol grubunda damıtılmış su ve normal fare beslenmesini uygulamışlardır. Deney gruplarına *T. foenum graecum*' un metanol ve etil asetat ekstraktları 15 gün süreyle ağızdan 100 ve 200 mg / kg olmak üzere iki farklı doz şeklinde verilmiştir. Beynin histopatolojik incelenmesi kresil moru ve H&E boyama yardımı ile yapılmıştır. Ekstratların sitotoksitesini, insan kornea epitel (HCEC), MCF-7 ve Hep2 hücre hatlarına karşı MTT deneyi ile değerlendirmişlerdir. Deney sonuçlarına göre araştırmacılar, *T. foenum graecum* tohumlarının metanol ve etil asetat ekstraktları, kontrol grubuna kıyasla beyin hipokamp ve korteks bölgelerinde nörodejenerasyonu inhibe ettiğini saptamışlardır. Ayrıca ekstratların, Hep2 ve MCF-7 hücrelerine karşı antikanser aktivite ve HCEC'ye karşı düşük sitotoksite sergilediğini ve in vitro sağlıklı hücrelerini koruduğunu gözlemlemişlerdir.

### **1.6.3 *Trigonella L.* cinsi ile ilgili yapılan diğer çalışmalar**

Noohpishah vd. (2020)' nin yapmış oldukları çalışmada; *T. foenum-graecum* üzerinde Ag-ZnO nanokompozitlerinin antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri değerlendirilmiştir. Antimikrobiyal aktivite için; gram-pozitif *Staphylococcus aureus* ve Gram-negatif *Escherichia coli* bakterileri, antifungal aktivite için; *Candida albicans* kullanılmıştır. Çalışma sonucunda; Ag-ZnO nanokompozitlerinin, test edilen tüm mikrobiyal ve fungal suşlara karşı toksik olduğu ortaya konulmuş; ayrıca, Ag-ZnO nanokompozitlerinin DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikallerine karşı önemli antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Khan vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada; *T. foenum-graecum*' un sulu yaprak özütü kullanılarak sentezledikleri gümüş nanopartiküller (AgNP), bitki patojenik bakterisi *Pseudomonas syringae* ve bitki patojenik fungusu *Alternaria alternata*' ya karşı in vitro antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için kullanılmıştır. Antifungal deney sonuçlarında, çeşitli yerlerde mantar miselyumunun bozulduğunu gözlemlemişlerdir. Benzer şekilde, antibakteriyel deney sonuçlarında da inhibisyon bölgelerini gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar bu protokolün AgNP'lerin sentezi için zararsız yani toksik olmayan bir yöntem olduğunu tespit etmişlerdir. Deney sonuçlarına göre araştırmacılar, sentezlenen AgNP'lerin çeşitli patojenik mikroorganizmalar için etkili bir büyüme inhibitörü olarak kullanılabileceğini ve mikrobiyal sistemleri kontrol etmek için uygulanabileceğini kanıtlamışlardır.

Ashraf vd. (2019) yapmış oldukları çalışmalarında; *T. foenum-graecum*' un uçucu yağının kimyasal bileşimini gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) ile analiz ederek, uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitelerini belirlemişlerdir. Çalışmalarda; *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Penicillium pinophilium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodococcus equi*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Cronobacter sakazakii*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica*, *Shigella*, *Enterococcus hirae*, *Listeria ivanovii* ve *Listeria innocua* mikroorganizmalarını kullanmışlardır. Çalışma sonucunda; *T. foenum-graecum* uçucu yağının mikrobiyal suşlara karşı önemli bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Varghese vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada; *T. foenum graecum*' un tohum ekstresini kullanarak sentezledikleri AgNP'lerin antimikrobiyal mekanizmaları ve antikanser özellikleri araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre; AgNP'ler önemli gram pozitif bakterilerin, gram negatif ve filamentli mantarlara göre klinik olarak önemli antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, gram negatif bakterilerin büyümesinin AgNP'ler tarafından gram pozitif bakterilere kıyasla nispeten baskılandığı ortaya konulmuştur. Bunlara ilaveten, deney sonuçlarından AgNP'lerin MCF7 ve vero hücre hatlarına karşı önemli antikanser aktivite sergilediği bildirilmiştir.

Subhapriya ve Gomathipriya (2018) tarafından yapılan çalışmada; sentezlenmiş biyosentezlenmiş nanopartiküllerin (TF-TiO<sub>2</sub>NP) antimikrobiyal aktivitesini ve bu etkinin seçilen mikrobiyal türler (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus subtilis* ve fungus *Candida albicans*) ile olan bağımlılığını değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Biyosentezlenmiş nanopartiküllerin (TF-TiO<sub>2</sub>NPs) antimikrobiyal aktivitelerini Kirby-Bauer yöntemini kullanarak incelemiştirler. Deneysel sonuçlarına göre, TF-TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin, test edilen tüm mikroorganizmalara karşı önemli antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Nateqi ve Mirghazanfari (2018) tarafından yapılan çalışmada; *T. foenum graecum*'dan elde edilen ekstraktların antioksidan kapasitesini, toplam fenolik içeriğini, insanlarda ve hayvanlarda fusariosis etkenlerinden biri olan toprak saprofiti ve önemli bir bitki patojeni olan *Fusarium solani*'nin büyümesi üzerindeki antifungal aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırmacılar deneysel sonuçlarına göre *T. foenum-graecum*'un önceki çalışmalarında önemli ölçüde antibakteriyel ve antifungal aktiviteler göstermesine rağmen, mevcut çalışmada referans bitkinin etkili olmadığını ve *F. solani* suşunu inhibe etme kabiliyetinin az olduğunu bildirmişlerdir.

Omezzine vd. (2017) tarafından yapılmış araştırmada; üç gelişim safhasında (vejetatif, çiçeklenme ve meyve verme) hasat edilen diploid ve miksoptoid *T. foenum-graecum* türünün toprak üstü kısımlarının organik ekstraktlarının etkinliği, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) ve *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) antifungal aktiviteleri açısından değerlendirmişlerdir. Test edilen tüm ekstraktların, FORL ve FOL miselyal büyümesini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre; *T. foenum-graecum*' un toprak üstü kısımlarının metanolik ekstraktlarının FOL ve FORL'ye karşı oldukça aktif olduğu ve fungal bitki patojenlerine karşı aktif olan doğal ürünlerin kaynaklarından biri olarak kabul edilebileceği vurgulanmıştır.

### **1.7 Çalışmanın Amacı**

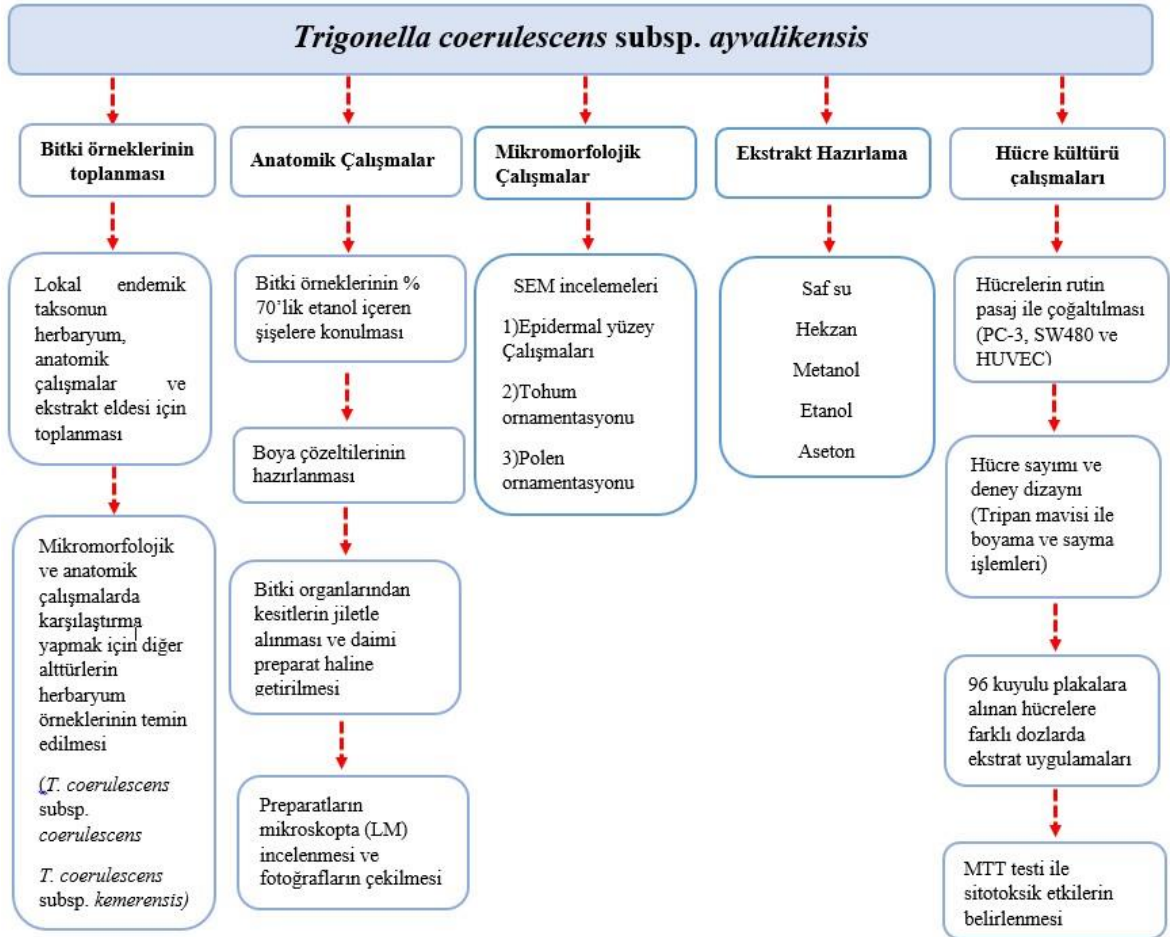
Bu çalışmada ülkemizde lokal endemik olarak tespit edilen *T. coerulea* subsp. *ayvalikensis* üzerinde mikromorfolojik, anatomik ve sitotoksik aktiviteleri ayrıntılı olarak ilk defa araştırılmıştır. Bu kapsamda çalışmalar 3 ana basamakta yürütülmüştür (Bknz akış diyagramı (Şekil 1.5)).

Lokal endemik takson toplanırken, mikromorfolojik ve anatomik çalışmalarda karşılaştırma yapmak için diğer alttürler de (*T. coerulescens* subsp. *coerulescens*, *T. coerulescens* subsp. *kemerensis*) temin edilmiştir.

- a. Mikromorfolojik çalışmalarda; taksonların trikoma yapıları (gövde ve yaprak) ile birlikte tohum yüzeyi ve polen ornamentasyonu çalışılmıştır. Fotoğraflar Zeiss EVO 50 taramalı elektron mikroskopu ile çekilmiştir. Tohum mikromorfolojisi çalışmaları SEM-EDX cihazında gerçekleştirilmiştir.
- b. Anatomik çalışmalarda; gerekli olan bitki materyalleri toplanarak %70' lik etanol içeren plastik kapaklı cam şişelerde saklanmıştır. Her takson için farklı lokalitelerden toplanan çiçekli bitkilerin gövde, yaprak ve petiyolleri kullanılmıştır. Yaprakların orta bölgelerinden elle enine ve yüzeysel; gövde ve petiyolün orta bölgelerinden ise elle enine kesitler alınmıştır. Bu kesitler floroglusinol-HCl reaktifi ile boyandıktan sonra gliserin-jelatin yöntemi ile (Yakar Tan, 1982) daimi preparat halinde preparat kutusunda anatomik çalışmalarda kullanılmak üzere saklanmıştır. Preparatlar Olympus BX 53 marka mikroskopta incelenmiş ve her bir preparattaki örneğin mikro fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen fotoğraflar üzerinde "Alamet 006" ölçüm programı kullanılarak kesitler üzerinde mikro ölçümler yapılmıştır. Elde edilen ölçümlerin ortalama ve standart sapmaları bulunmuştur.
- c. Antikanser aktivite çalışmalarında (Sitotoksik aktivite deneyleri); MTT yöntemi kullanılmıştır. MTT metodu; sitotoksik analiz, hücre canlılığı ve poliferasyonu için tercih edilen, kantitatif kolorometrik yöntemlerden biridir. Bu metod apoptozun erken evresindeki veya canlı hücrelerin mitokondrileri vasıtasıyla gerçekleştirdiği reaksiyonda, MTT çözeltisindeki tetrazolium halkası hücre mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri tarafından parçalanıp, renkli formazan kristallerini meydana getirir. MTT metodu, sağlıklı hücrelerin mitokondrilerinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalaması yöntemi olarak bilinmektedir. Deneyden önceki gün hücre sayımı yapılarak, hücreler 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 5000-15000 (hücre hattına göre değişkenlik göstermektedir, HUVEC için 5000, PC3 için 10000, SW480 için 5000) hücre olacak şekilde paylaştırılmıştır. Farklı çözücülerle (saf su, hekzan, metanol, etanol, aseton) hazırlanan ekstratlar farklı dozlarda (Metanol, Etanol, Hekzan, Aseton için: 325 µg/µl - 187,5 µg/µl - 93,75 µg/µl - 46,875 µg/µl - 23,45 µg/µl ; Saf su için: 250 µg/µl - 125 µg/µl - 62,5 µg/µl - 31,25 µg/µl - 15,62 µg/µl ) hücrelere uygulanmıştır. İnsan Sağlıklı Endotelial Hücre Hattı (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)

kontrol grubu olarak kullanılıp, İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı (Human Prostate Cancer Cell Line, PC-3) ve İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı (Human Colon Cancer Cell Line, SW480) ile karşılaştırılmıştır. Uygulamadan 24 sa, 48 sa ve 72 sa saat sonrasında son konsantrasyonu 0.5 mg/mL olacak şekilde her kuyuya stok MTT solüsyonu eklenip, 4 saat boyunca 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda medyum uzaklaştırılıp, 0.004 M HCl içeren izopropanol ile kristaller çözülmüş ve spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda absorpsiyon alınmıştır.

Bu çalışmanın ileride, benzer cins ya da taksonlarla yapılacak sistematik çalışmalara ve sitotoksikite deneylerinde kullanılmak üzere elde edilen ekstraktların farklı kanserli hücre hatları üzerindeki etkisini gösteren araştırmalara önemli bir kaynak olacağını ümit etmekteyiz.



**Şekil 1.5:** Tez çalışmasına ait akış diyagramı.

## 2. MATERYAL-METOT

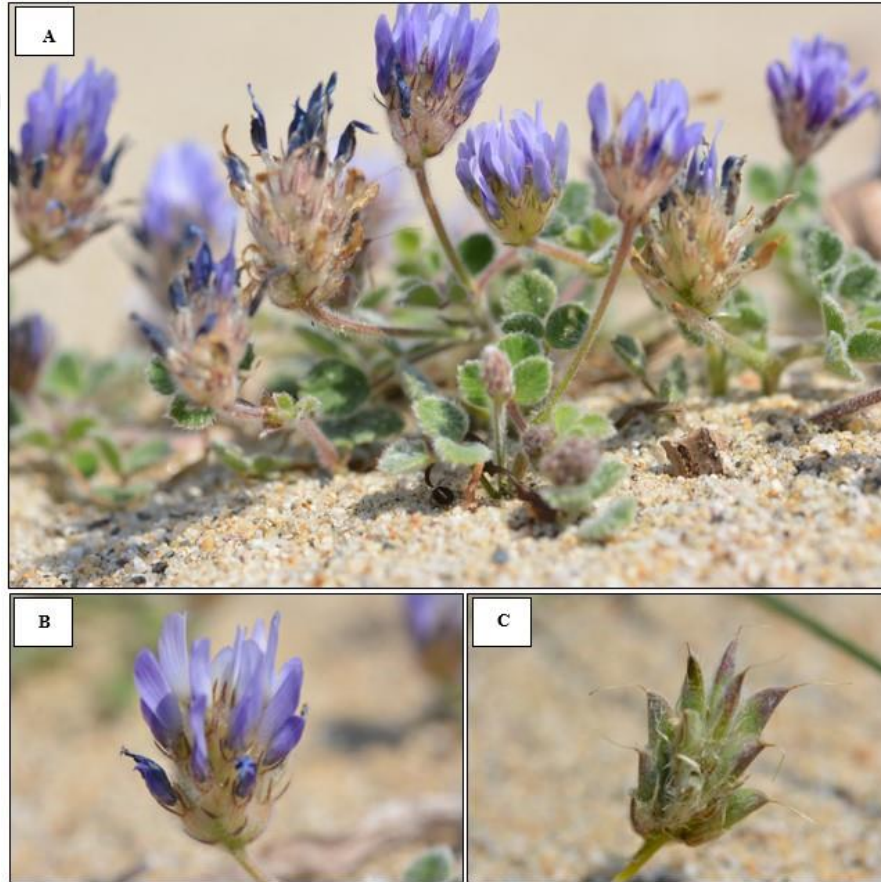
### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Bitkisel Materyal

Çalışmanın materyalini oluşturan lokal endemik *Trigonella coerulescens* subsp. *ayvalikensis* taksonu, Balıkesir' in Ayvalık ilçesinin iki farklı lokasyonundan toplanmıştır. Bitki tek yıllık hayat formunda (annual) olduğundan; çiçeklenme dönemi, Mart - Nisan; tohum dönemi ise Mayıs - Haziran aylarında arazi çalışmaları yapılmış ve taksonun hem çiçekli hem de meyveli örnekleri habitat alanı, deniz seviyesindeki kıyı kumulları ve sahil kenarlarından toplanmıştır. Taksonun toplandığı lokaliteler aşağıda verilmiştir. Ayrıca Şekil 2.1 ' de bitkinin genel görüntüsü ve Şekil 2.2' de de taksonun toplandığı lokaliteler harita üzerinde sunulmuştur.

B1 Balıkesir: Ayvalık, Küçükköy, Badavut sahil kenarı, kumul alanlar, deniz seviyesi, 12.03.2020, 39°16'23" K, 26°37'43" D, SV 1616.

B1 Balıkesir, Ayvalık, İzmir-Çanakkale Yolu Üzeri, Küçükköy Tuz Gölü, 1-2 m, 7.06.2020, 39°15'44" K, 26°42'39" D, SV 1644.



Şekil 2.1: *Trigonella coerulescens* subsp. *ayvalikensis*. A) Genel görünüş, B) Çiçek, C) Meyve.

Tez çalışması için toplanmış olan bitki örneklerinin belirli bir miktarı herbaryum örneği yapıp, etiketlenerek Balıkesir Üniversitesi Altınoluk Meslek Yüksekokulu Botanik Laboratuvarında saklanmıştır. Belirli miktarı da anatomik çalışmalarda kullanılmak üzere %70'lik alkol içeren plastik kapaklı cam kavanozlara konularak üzeri etiketlenmiştir. Mikromorfolojik ve anatomik incelemeler, taze ve kuru herbaryum örnekleri üzerinden yapılmıştır.



**Şekil 2.2:** İncelenen taksonun toplandığı lokaliteler (Toplanma lokaliteleri yıldız ile gösterilmiştir.)

### 2.1.2 Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında gerekli kimyasal materyallerin hepsi deneysel süreçler için uygun sterillik ve saflıktadır. Ekstrakt elde edilmesinde ve sitotoksisite deneylerinde kullanılan kimyasal malzemeler Fermantas ve Thermo Scientific üreticilerinden sağlanmıştır.

**Tablo 2.1:** Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üreticileri

<b>Kimyasallar</b>	<b>Üretici</b>
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide - Tiazolil Mavi Tetrazolyum Bromür)	Sigma
PBS (Phosphate Buffered Saline - Fosfat Tamponlu Salin)	Sigma
İsopropanol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O)	Thermo Fisher Scientific
HCl (Hidroklorik asit)	Sigma-Aldrich
DMEM	EuroClone
FBS (Fetal Bovine Serum – Fetal Sığır Serumu)	EuroClone
EDTA (Etilendiamin Tetraasetik Asit)	Sigma
Tripsin	Sigma
DMSO (Dimethyl Sulfoxide - Dimetil Sülfoksit)	Sigma-Aldrich
Hekzan (CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> )	Kimetsan
Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Merck
Aseton (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O)	Sigma-Aldrich
Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	Sigma-Aldrich

### 2.1.3 Çalışmalarda Kullanılan Araç-Gereçler

**Tablo 2.2:** Çalışmadan kullanılan cihazlar-modelleri

<b>Kullanılan Cihazlar</b>	<b>Modelleri</b>
Otomatik Pipetler	Axygen, Thermo
Vorteks	Elektromag
Santrifüj (15 ml'lik falkon)	Nüve NF 815
Santrifüj (50 ml'lik falkon)	Rotofix 32 A Hettich Zentrifugen
Evaporatör	Heidolph Hei-VAP Precision
Hassas Terazi	Denver Instrument
Laminar Air Flow	Telstar BIO II
Buz Makinesi	Fiochetti Frigoriferi Scientifici

Inverted Mikroskop Cihazı	Nikon
Buzdolabı	Arçelik
-80°C Derin Dondurucu	Thermo
Saf Su Cihazı	Thermo, Comecta Sa
CO2 'li inkübatör Nuair	Nuair
Spektrofotometre Cihazı	Thermo
Otoklav	Hirayama HG-80
Etüv	WTB, Germany, Nüve, Türkiye
Çalkalayıcı	Biosan 3D, Sunflower Mini-Shaker
SEM-EDX	Zeiss EVO 50
Işık Mikroskopi	Olympus BX 53
Kaplama Cihazı	BAL – TEC SCD 005
SEM Cihazı	NeoScope JCM-5000

## 2.2 Metot

### 2.2.1 DeneYlerde Kullanılan Malzemelerin ve Ortamın Sterilizasyonu

Çalışmalarda kullanılan solüsyonlar ve cam malzemelerin tamamı, ependorf, pipet uçları, erlen gibi yüksek sıcaklıklara dayanıklılık gösteren malzemeler 20 dakika 121°C'de otoklavda steril edilmiştir. Otoklav cihazından çıkarılan solüsyonlar normal sıcaklığa geldikten sonra uygun saklama koşullarına alınıp, diğer materyaller ise 80 °C 'de bulunan etüve yerleştirilerek kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Mikromorfolojik ve anotamik çalışmalarda kullanılan mikroskop çeşitlerinden kaliteli fotoğraf görüntüsü elde edebilmek için mikroskopların oküler ve objektif kısımlarının temiz olmasına dikkat edilmiştir. Hazırlanan preparatlarda hava boşluğu kalmamasına dikkat edilerek lam ve lamel yüzeyinin temiz olması sağlanmıştır.

Hücre kültürü laboratuvarında çalışmaya başlamadan önce laminar flow içerisinde bulunan UV lamba en az yarım saat açılarak ortamın sterilliği sağlanmış, sonrasında virkonlu su, sodyum hipoklorit (NaOCl) ve seyreltilmiş etil alkolle (%70'lik) silinip temizlenmiştir. Hücrelerin çoğalması için hücre kültürü laboratuvarlarında kullanılan inkübatör cihazında bulunan, ortamın nemini ayarlayan su tablasının herhangi bir kontaminasyona yol açmaması için saf su otoklavlanarak konulmuş ve saf su düzenli aralıklarla yenilenmiştir. İnkübatör cihazına bağlı CO<sub>2</sub> tüpünün çalışır durumda olduğunun kontrolü sağlanmıştır.

## **2.2.2 Mikromorfolojik ve Anatomik Çalışmalar**

### **2.2.2.1 Mikromorfolojik Çalışmalar**

Mikromorfolojik çalışmalarda taksonların trikom yapıları (gövde ve yaprak) ve tohum yüzeyi ornamentasyonu çalışılmıştır. Çalışma süresince bitkinin gövde ve yapraklarından alınan parçalar ile tohum örnekleri her iki yüzeyinde yapışkan karbon bant bulunan disklerle uygun şekilde yerleştirilmiş ve altın ile kaplanmıştır. Fotoğraflar Zeiss EVO 50 taramalı elektron mikroskopu ile çekilmiştir. SEM çalışmaları Manisa Celal Bayar Üniversitesinde gerçekleştirilmiştir. Tohum mikromorfolojisi çalışmaları SEM-EDX cihazında gerçekleştirilmiştir. Tohumların yüzey ornamentasyonlarının görüntüsü Manisa Celal Bayar Üniversitesi Araştırma Laboratuvarındaki SEM-EDX cihazında gerçekleştirilmiştir.

Tohum morfolojisinde her bir taksondan 10 olgun tohum örneği alınmış ve ölçümler yapılmıştır. Tohum morfolojisinde Bojnansky & Fargasova (2007) ve Corner (1976)' in eserinden faydalanılmıştır.

Polenler her iki yüzeyi de yapışkan karbon bant bulunan alüminyum disklerle uygun şekilde yerleştirilmiş ve BAL – TEC SCD 005 kaplama cihazı yardımıyla Altın–Paladyum ile 160 saniye süreyle kaplanmıştır. Kaplanmış olan örnekler, Balıkesir Üniversitesi Araştırma Merkezi'nde bulunan NeoScope JCM-5000 SEM cihazı ile 10 kV'de incelenmiş ve mikrofotoğrafları çekilmiştir.

Palinolojik isimlendirmelerde Erdtman (1969), Kapp (1969), Faegri ve Iversen (1975), Wagstaff (1992) ve Punt (2007) terminolojileri kullanılmıştır.

### **2.2.2.2 Anatomik Çalışmalar**

Anatomik incelemeler için gerekli olan bitki materyali toplanarak %70' lik etanol içeren plastik kapaklı cam şişelerde saklanmıştır. Anatomik çalışmalarda her bir takson için farklı lokalitelerden toplanan çiçekli bitkilerin gövde, yaprak ve petiyolları kullanılmıştır. Yaprakların orta bölgelerinden elle enine ve yüzeysel; gövde ve petiyolün orta bölgelerinden ise elle enine kesitler alınmıştır. Bu kesitler floroglusinol-HCl reaktifi ile boyandıktan sonra gliserin-jelatin yöntemi ile (Yakar Tan, 1982) daimi preparat halinde preparat kutusunda anatomik çalışmalarda kullanılmak üzere saklanmıştır. Preparatlar Olympus BX 53 marka mikroskopta incelenmiş ve her bir preparattaki örneğin mikro fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen fotoğraflar üzerinde “Alamet 006” ölçüm programı

kullanılarak kesitler üzerinde mikro ölçümler yapılmıştır. Elde edilen ölçümlerin ortalama ve standart sapmaları bulunmuştur.

Yaprakların üst ve alt yüzeylerinden alınan kesitlerde mm<sup>2</sup> deki stoma ve epidermis sayısı sayılarak stoma indeksi hesaplanmıştır. Bunun için kesitler Olympus BX 53 mikroskopunda, 4 X Objektif ve 1 mm<sup>2</sup> lik kareli oküler ile incelenerek sayılmıştır.

Stoma indeksi ve stoma indeks oranının hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır (Meidner ve Mansifield, 1968).

$$\text{Stoma İndeksi} = \frac{\text{Stoma Sayısı}}{\text{Stoma Sayısı} + \text{Epidermis Sayısı}} \times 100$$

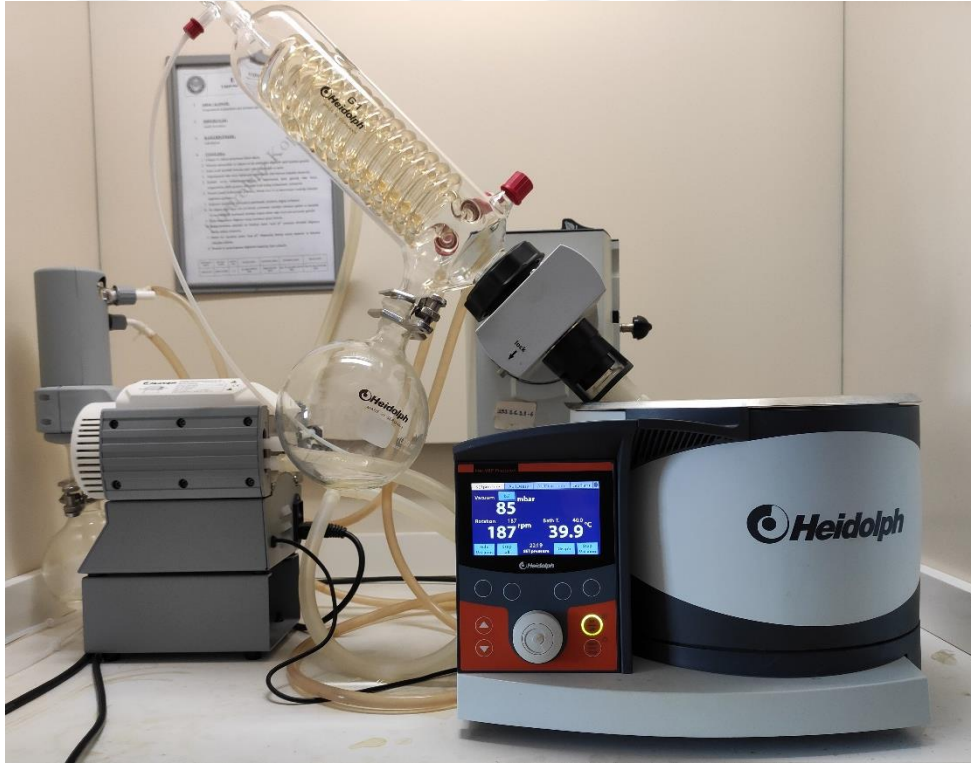
$$\text{Stoma İndeks Oranı} = \frac{\text{Üst Stoma İndeksi}}{\text{Alt Stoma İndeksi}}$$

Anatomik çalışmalarda gövde, yaprak ve petiyolden alınan kesitlerin yorumlanmasında çeşitli anatomik kitaplarından faydalanılmıştır (Metcalf ve Chalk, 1950; Esau, 1962; Fahn, 1990; Metcalfe ve Chalk, 1971; Yentür, 1973; Mauseth, 2008; Dickison, 2000).

### 2.2.3 Ekstrakt Hazırlanması

Balıkesir' in Ayvalık ilçesine bağlı Badavut mevkiinde toplanan *Trigonella coerulescens* subsp. *ayvalikensis* bitkisinin tohumları oda koşullarında ışık almayan serin ve havadar bir ortamda 2 gün süreyle bekletilerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruma aşaması gerçekleşmiş olan tohumlar daha sonra metal havanda iyice öğütülüp toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen bitki örneğinden hasas terazi ile 0.75 gram tartılarak 50 ml'lik 5 tane falkona konulmuştur. Bu çalışmada 5 farklı çözücü ile (etanol, metanol, hekzan, aseton, saf su) ekstrakt hazırlanmıştır. Tartılıp falkonlara konulan toz halindeki tohum örnekleri üzerini her bir çözücünden 10 ml eklenerek, + 4 °C'de çalkalamalı inkübatörde 1 gece bekletilmiştir. Bekleme işleminden sonra üstte kalan sıvı kısımlar dikkatli bir şekilde 5 ayrı falkona aktarılıp, tüm falkonların üzerine çözücüleri yazılarak etiketlenmiştir. Altta katı kısımların kaldığı falkonların her birine kendi çözücülerinden 10'ar mL eklenerek oda koşullarında dibe çökene kadar (yaklaşık olarak 1 saat) bekletilmiştir. Bekleme süresinden sonra çözücülerine göre etiketlenirilmiş falkonlara (sıvı kısımların bulunduğu falkonlar) üstte kalan sıvı kısımlar dikkatli bir şekilde aktarılmıştır. Altta kalan katı kısımların üzerine tekrar aynı şekilde kendi çözücülerinden 10'ar ml eklenip, 4000 RCF 'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Bu işlemten sonra her bir falkonun üzerindeki sıvı kısımlar alınıp

kendi çözücüleri ile etiketlenmiş falkonlara (sıvı kısımların bulunduğu falkonlar) alınarak, altta kalan katı kısımlar ortamdan uzaklaştırılmıştır. Sonuç olarak 5 farklı çözücünden hazırlanmış olan ekstraktlar kendi çözücülerine göre etiketlenmiş falkonlarda birleştirilmiştir. Elde edilen bu ekstraktlar sırayla 100 mL hacminde balona konulup, vakumlu döner buharlaştırıcı (rotary evaporatör) cihazı kullanılarak çözücüler uzaklaştırılmış ve ekstre alım işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.3). Elde edilen ekstraktlar balonlardan DMSO ile çözdürülerek stok çözelti haline getirilmiştir. Su ile elde edilen ekstrakt yoğun olduğu için 1,5 ml DMSO'da, diğer 4 çözücü ile (metanol, etanol, hekzan, aseton) elde edilen ekstraktlar ise 1 ml DMSO'da çözdürülerek stok çözelti elde edilmiştir. Etanol, metanol, hekzan ve asetonun elde edilen ekstraktların stok çözelti konsantrasyonu 750 µg/µl iken saf sudan elde edilen ekstraktın stok çözelti konsantrasyonu 500 µg/µl'dir. Hazırlanan stok çözelti daha sonra veya hemen kullanılabilmesi için -20°C buzdolabında muhafaza altına alınmıştır (Habib-Martin vd. 2017).



**Şekil 2.3:** Ekstrakt elde edilmesinde kullanılmış vakumlu döner buharlaştırıcı (rotary evaporatör) cihazı.

## **2.2.4 Sitotoksik Çalışmalar**

### **2.2.4.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemelerin Hazırlığı**

#### **2.2.4.1.1 FBS (Fetal Sığır Serum) Hazırlanması**

FBS (Fetal Sığır Serum) taşınması soğuk zincirle yapıp, -20 °C’de saklanmıştır. Stok serum ilk kullanımdan önce +4 °C’de bir gece boyunca buzlarının çözünmesi sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra 37 °C’ de 15 dakika ve 56 °C’ de 35 dakika ısı ile inaktive edilerek alikotları yapıp filtrelendikten sonra tekrar -20 °C de saklanmıştır.

#### **2.2.4.1.2 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması**

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücre hatlarına besiyeri oluşturmak için ticari olarak alınan DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium) kullanılmıştır. Bu besiyeri bazı hücre hatları için yüksek miktarda glukoz içerirken, bazı hücre hatları için de düşük miktarda glukoz içermektedir. Her iki besiyerinde de yüksek miktarda glutamin bulunmaktadır. Bu besiyerinin içerisine %10’luk FBS eklenerek kültür medyumu hazırlanmıştır.

Bu çalışmada SW480 (İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı), HUVEC (İnsan Sağlıklı Endotelial Hücre Hattı) ve PC-3 (İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı) hücre hatları kullanılmıştır. SW480 ve HUVEC hücre hatlarında ticari olarak temin edilen EuroClone markalı besiyerinden yüksek miktarda glukoz içeren, PC-3 hücre hattında ise EuroClone markalı F12 besiyeri tercih edilmiştir. PC3 hücreleri Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü’nden Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz’dan; SW480 hücreleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümü’nden Prof. Dr. Sreperna Banerjee’nden temin edilmiştir.

#### **2.2.4.1.3 PBS (Fosfat Tamponlu Salin) Solüsyonunun Hazırlanması**

Sigma firmasından ticari olarak temin edilen PBS tabletleri, her 200 mL başına 1 tablet olacak şekilde saf su içerisinde çözdürülerek, 121 °C’ de 20 dakika otoklav yapıp steril edildikten sonra +4 °C’ de muhafaza edilmiştir. Hücrelerin ortamları uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyi yıkamalarında kullanılmıştır.

#### **2.2.4.1.4 Tripsin-EDTA Solüsyonunun Hazırlanması**

Tripsin-EDTA solüsyonu hazırlamak için steril cam malzemeler kullanılmıştır. %0,05 Tripsin ve 0,5 mM EDTA, steril (otoklavlanmış) PBS (1 X) içerisinde çözülerek, 0,22

µm'luk filtrelerden geçirilip, -20 °C'de saklanmıştır. Tripsin-EDTA hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılması işleminde kullanılmıştır.

#### **2.2.4.2 Hücre Hattının Büyütülmesi**

Uzun süreliğine -80 °C'de korunan hücreler dondurucudan çıkarılarak, 37 °C'deki su banyosunda hızlıca çözümleri sağlanmıştır. Çözülmüş hücreler %10 FBS içeren 5 ml DMEM ortamına alınarak, alt üst edilip, 5 dakika süreyle 1000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ortaya çıkan pellet %10'luk FBS içeren DMEM'le çözülüp, son hacmi 15 ml şeklinde 75 cm<sup>2</sup>'lik flaslara ekim yapılmıştır. Flaskların her biri isim, pasaj numarası ve tarih yazılıp etiketlenerek, 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre kaldırılan hücreler büyümeye bırakılmıştır.

#### **2.2.4.3 Hücre Hattının Pasajlanması**

Hücrelerin büyümesi rutin aralıklarla mikroskopta incelenerek kontrol edilmiştir. Flask yüzeyini %80-90 civarında dolduran hücreler için pasajlama yapılmıştır. Flask içerisindeki eski medyum uzaklaştırılarak, PBS ile yıkama işlemi yapıp daha sonra PBS'de ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Hücreleri buldukları yüzeyden kaldırmak için 25 cm<sup>2</sup> flaslara 1 ml, 75 cm<sup>2</sup> flaslara 3 ml Tripsin EDTA uygulanıp, inkübatörde 3-4 dakika bekletilerek tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreler yüzeyden ayrıldığı zaman Tripsin EDTA'nın aktivasyonunu inaktif hale getirmek için, kullanılmış Tripsin EDTA miktarına göre iki katı olacak şekilde %10 FBS içeren DMEM eklenmiştir. Falkonlara alınan hücreler, 5 dakika boyunca 1000 rpm'de santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Bu işlem sonrasında süpernatant ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Falkondaki pellet ise bölünmesi gereken her bir flask için %10 FBS içeren DMEM'in 2 ml'sinde çözülüp, içerisine öncesinden %10 FBS içerikli DMEM'den 13 ml eklenen 75 cm<sup>2</sup> 'lik flaslara alınarak etiketleme yapıldıktan sonra hücrelerin pasajlama işlemi tamamlanmıştır. Flasklar 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre kaldırılmıştır. Bu yöntemle PC-3, SW480 ve HUVEC hücre hatları, yaklaşık olarak 1 ya da 2 kez (haftada) pasajlama işlemi yapılarak, hücrelerin çoğaltılması sağlanmıştır.

#### **2.2.4.4 Hücrelerin Dondurulması**

Hücrelerin dondurulmasında yukarıda anlatılan 2.2.4.3 bölümdeki süpernatantın uzaklaştırılmasından sonra pellet, 1 ml ye %10 DMSO içeren FBS ile birlikte dikkatlice çözülerek, cryovial tüplere konulmuş, etiketlenip -80 °C' deki dondurucuya dik konumda uzun süreli muhafaza etmek için kaldırılmıştır.

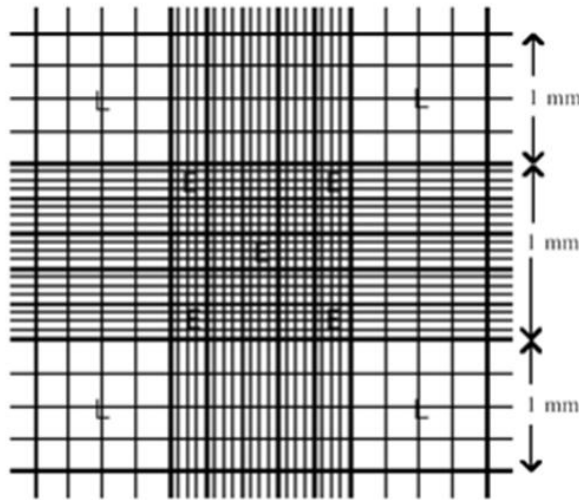
#### 2.2.4.5 Canlı Hücrelerin Sayılması ve Deney Tasarımı

Canlılığını koruyan hücrelerin tespiti ve hücreleri saymak için Tripan Blue (Tripan Mavis) adı verilen solüsyonun kullanıldığı boyama yöntemlerinden biri uygulanmıştır. Toplam hücre süspansiyonunun bir mililitresinde bulunan hücre sayısını tespit etmek için Thoma (hemositometre) Lamı kullanılmıştır. Thoma lamı, üzerinde 25 küçük kareye sahip, 1mm<sup>2</sup> alan bulunduran, 0,1 mm derinliğe sahip ve bu sayede hacmin tamamının belirlenebildiği, hücre sayımında kullanılması uygun olan bir malzemedir (Şekil 2.4). Flasklara tripsin EDTA uygulanıp, tripsinizasyon işlemiyle yüzeyden ayrılan hücreler 5 dakika süresince 1000 rpm'de santrifüjlenmiştir.

6 ml % 10 FBS içeriği olan DMEM'de çözülmüştür. Canlılığını koruyan ve cansız hücreleri belirlemek için 1: 1 dilüsyon oranında olacak şekilde hücre süspansiyonundan 10 µl ve Tripan mavisinden de 10 µl karıştırılıp oda sıcaklığında 3-5 dakika inkübe edilmiş ve sonrasında pipetaj ile homojenizasyon sağlanmıştır. Hazırlanan bu karışımdan 10 µl alınarak Thoma lamına konulmuş ve mikroskop altında Thoma lamının kesişim alanında görülen boyanmayan hücreler sayılmıştır. Ölü hücreler maviye boyanırken, canlı hücreler boyanmamıştır. Bu aşamada her hücre hattı için iki tekrarlı boyama yapılmış ve her bir boyamada 2 kez sayım yapıp 4 toplam sonucunun aritmetik ortalaması alınıp, aşağıdaki formülle mililitredeki hücre sayısı belirlenmiştir.

Süspansiyonun 1 mililitresinde bulunan toplam hücre sayısı:

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı / ml} = \text{Hemositometre sayım sonucu} \times 2 \times 10^4$$



Şekil 2.4: Hemositometre

#### 2.2.4.6 MTT

MTT metodu; sitotoksik analiz, hücre canlılığı ve proliferasyonu için tercih edilen, kantitatif kolorometrik yöntemlerden biridir. Bu metot apoptozun erken evresindeki veya canlı hücrelerin mitokondrileri vasıtasıyla gerçekleştirdiği reaksiyonda, MTT çözeltisindeki tetrazolium halkası hücre mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri tarafından parçalanıp, renkli formazan kristallerini meydana getirir. MTT metodu, sağlıklı hücrelerin mitokondrilerinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalaması yöntemi olarak bilinmektedir. Gerekli solüsyonlar Tablo 2.3' de gösterilmiştir.

Deneyden önceki gün hücre sayımı yapılarak, hücreler 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 5000-15000 (hücre hattına göre değişkenlik göstermektedir, HUVEC için 5000, PC3 için 10000, SW480 için 5000) hücre olacak şekilde paylaştırılmıştır. Farklı çözücülerle (saf su, hekzan, metanol, etanol, aseton) hazırlanan ekstratlar farklı dozlarda (Metanol, Etanol, Hekzan, Aseton için: 325 µg/µl - 187,5 µg/µl - 93,75 µg/µl - 46,875 µg/µl - 23,45 µg/µl ; Saf su için: 250 µg/µl - 125 µg/µl - 62,5 µg/µl - 31,25 µg/µl - 15,62 µg/µl ) hücrelere üç tekrarlı olarak uygulanmıştır. HUVEC hücre hattı kontrol grubu olarak kullanılarak PC-3 ve SW480 hücre hatları ile karşılaştırılmıştır. 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sürelerinden sonra, son konsantrasyonun 0.5 mg/mL şeklinde her bir kuyu için stok MTT çözeltisi eklenip, 37 °C'de 4 saat süreyle, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör cihazında bekletilmiştir. 4 saat sonunda medyum ortamı uzaklaştırılıp, 0.004 M HCl içeriği olan izopropanolle birlikte kristaller çözülerek, spektrofotometrede 550 nanometre(nm) dalga boyunda absorbans alınmıştır. Sonuçlar GraphPad Prism 8 programı kullanılıp grafiklendirilmiştir. Programda One Way Anova ile sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (p<0,05 \* anlamlı kabul edilmiştir).

**Tablo 2.3:** MTT yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

Çözeltinin Adı	Hazırlanışı
MTT çözeltisi	0,25 gram tartılan MTT, 50 mL steril PBS içerisinde (5 mg/mL konsantrasyonda) çözülüp hazırlanır. + 4 °C'de ışıksız ortamda saklanır.
0,004 M HCl içeren isopropanol	500 mL'lik 2- Propanol içerisine 210 µl HCl eklenerek, oda sıcaklığında saklanır.

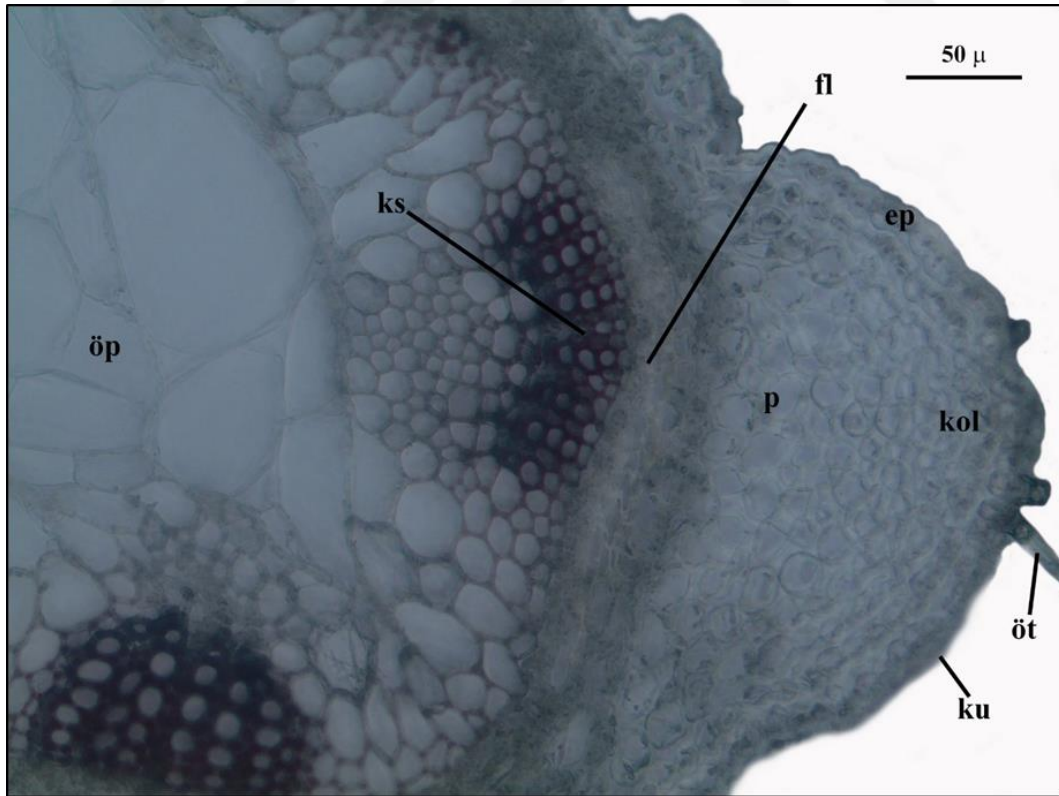
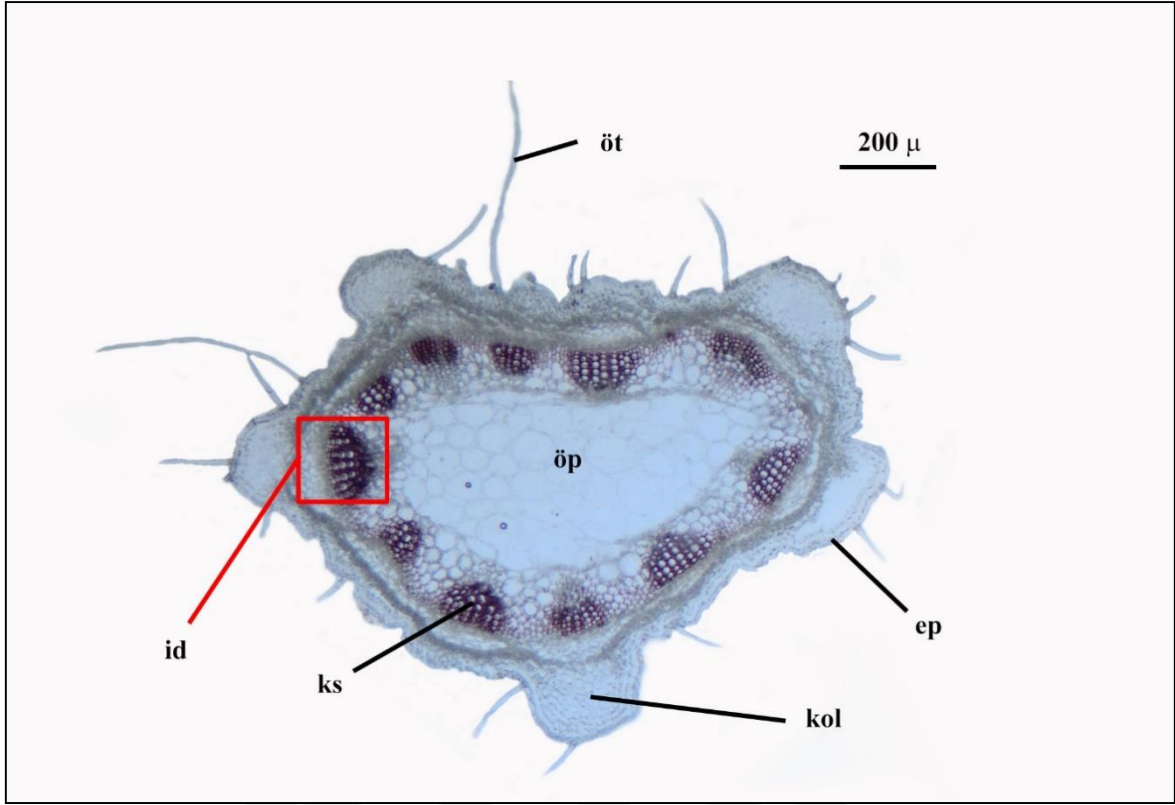
### 3. BULGULAR

#### 3.1 Anatomik Bulgular

##### 3.1.1 Gövde Anatomisi

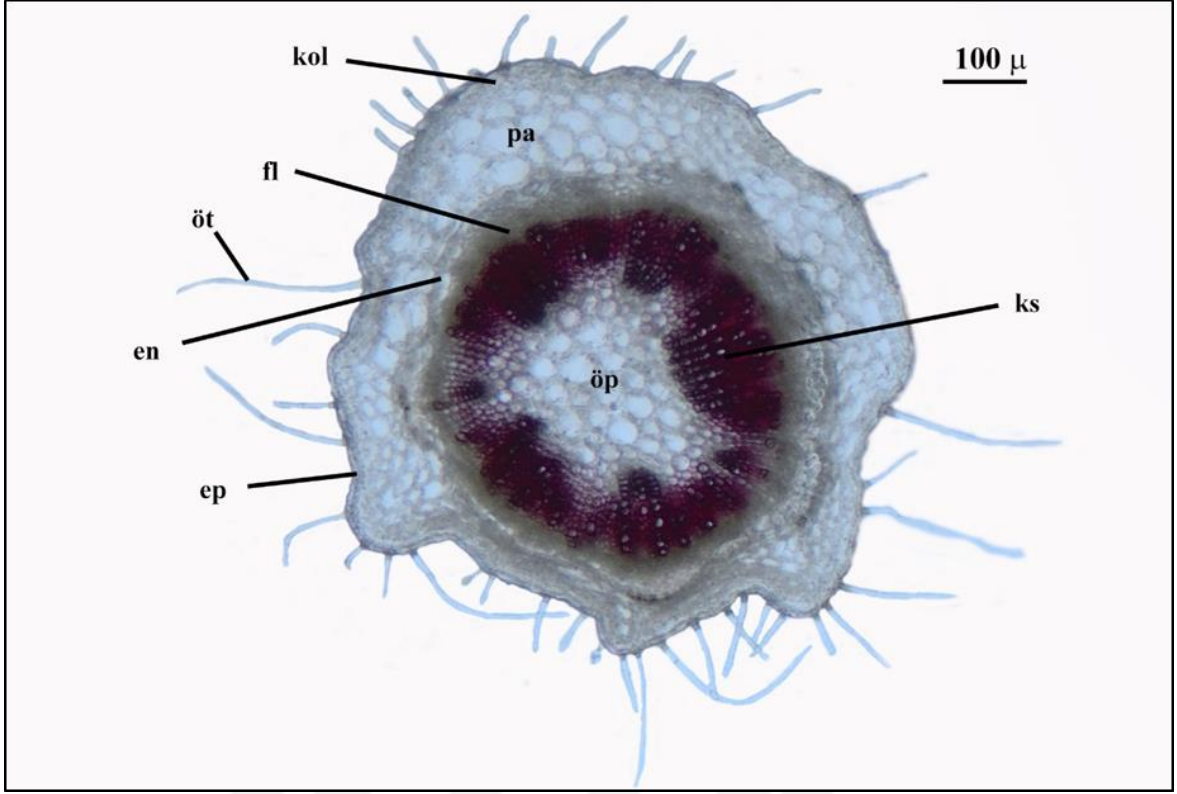
###### 3.1.1.1 *Trigonella coerulescens* subsp. *coerulescens*

Taksonun gövde enine kesiti incelendiğinde; en dışta tek sıralı epidermis hücreleri görülmektedir. Bu hücreler yuvarlak ya da kübik şekillerde olup genişlikleri 6,07-14,9 µm, uzunlukları 8,71-16,03 µm ölçülerindedir. Epiderminin üzerinde ince bir kütikula tabakası yer almaktadır (0,77 – 3,5 µm). Gövdenin epidermal yüzeyi yoğun olarak örtü ve seyrek olarak salgı tüyleriyle kaplıdır. Örtü tüyleri; tabanı genişlemiş, çok hücreli ve basit şekilli iken salgı tüyleri 1-2 hücreli bir sap ve yuvarlak bir baş kısmını içermektedir. Epiderminin hemen altında korteks tabakası gelmektedir. Bu tabaka; kollenkima, parankima ve endodermis hücrelerden oluşmaktadır. Kollenkima tabakası gövde köşelerinde çok tabakalı iken (3-8 sıralı) köşe aralarında az tabakalıdır (1-2 sıralı). Korteks parankima hücrelerinin genişlikleri 9,14-18,2 µm, uzunlukları 35,8-49,45 µm boyutlarında olup kollenkimanın hemen altında yer almaktadır. Bu tabakanın hücreleri yuvarlak ve ince çeperli gözlenmesine rağmen ara sıra hücreler arası boşluklar göze çarpmaktadır. Korteks tabakasının en iç kısmını oluşturan endodermis tabakası 1-2 sıralı parlak hücreli ve dikdörtgenimsi ya da yassılaştırmış hücrelerden oluşmaktadır. Endodermisin hemen altında iletim demetleri gelmektedir. İletim demetleri floem ve ksilemden oluşmuş olup açık kollateral demet tipi gözlenmektedir. İletim demetleri gövde üzerinde 9-13 adet halkasal bir diziliş sergilemektedir. Merkez öz bölgesinden oluşmaktadır. Öz hücreleri yuvarlak ya da çokgen şekilli ve ince çeperli parankimatik hücrelerden oluşmaktadır. Öz parankima hücrelerinin genişlikleri 6,85-67,24 µm arasındadır (Şekil 3.1-Şekil 3.2).

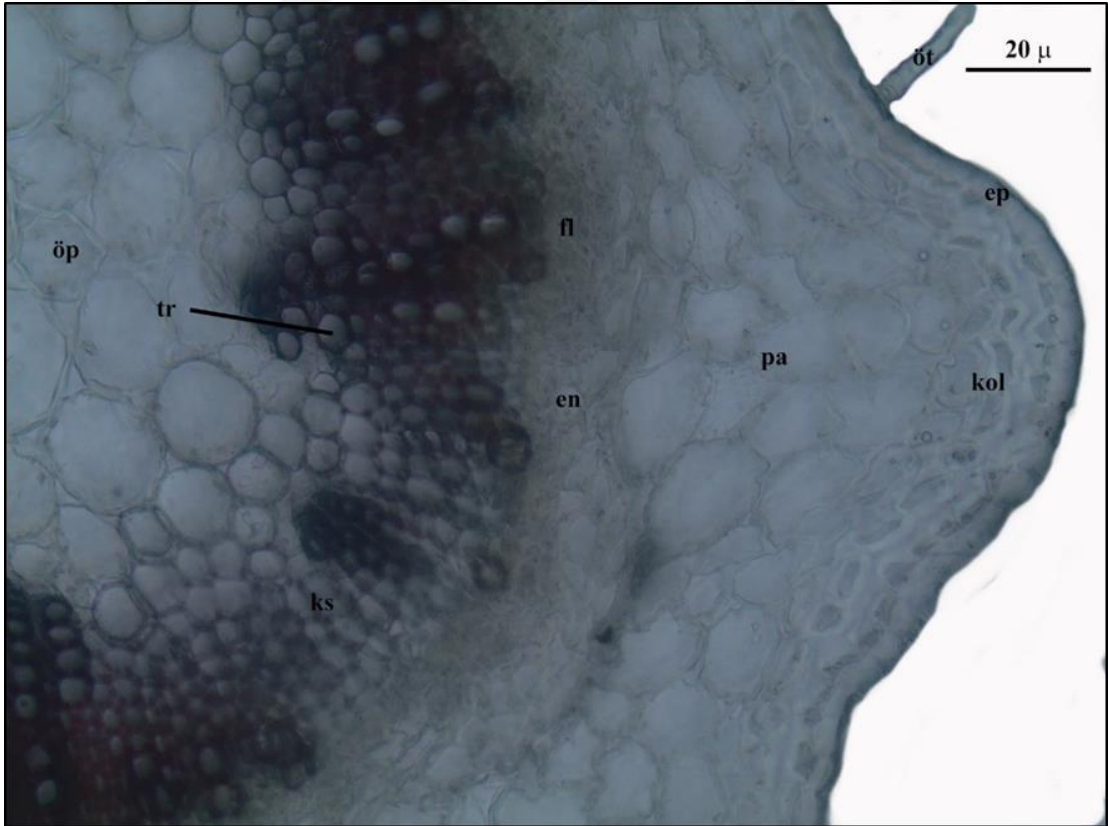


### 3.1.1.2 *Trigonella coerulescens* subsp. *kemerensis*

Taksonun gövde enine kesiti incelendiğinde; en dışta tek sıralı epidermis hücreleri görülmektedir. Bu hücreler yuvarlak ya da kübik şekillerde olup genişlikleri 5,84-10,76 µm, uzunlukları 5,61-11,92 µm ölçülerindedir. Epidermisin üzerinde ince bir kütikula tabakası yer almaktadır (1,09 – 2,85 µm). Gövdenin epidermal yüzeyi yoğun olarak örtü ve seyrek olarak salgı tüyleriyle kaplıdır. Örtü tüyleri; tabanı genişlemiş, çok hücreli ve basit şekilli iken salgı tüyleri 1-2 hücreli bir sap ve yuvarlak bir baş kısmını içermektedir. Epidermisin hemen altında korteks tabakası gelmektedir. Bu tabaka; kollenkima, parankima ve endodermis hücrelerden oluşmaktadır. Kollenkima tabakası gövde köşelerinde (2-3 sıralı) ve köşe aralarında az tabakalıdır (1-2 sıralı). Korteks parankima hücrelerinin genişlikleri 9,76-25,62 µm, uzunlukları 13,48-55,81 µm boyutlarında olup kollenkimanın hemen altında yer almaktadır. Bu tabakanın hücreleri yuvarlak ve ince çeperli gözlenmesine rağmen ara sıra hücreler arası boşluklar göze çarpmaktadır. Korteks tabakasının en iç kısmını oluşturan endodermis tabakası 1-2 sıralı parlak hücreli ve dikdörtgenimsi ya da yassılaştırmış hücrelerden oluşmaktadır. Endodermisin hemen altında iletim demetleri gelmektedir. İletim demetleri floem ve ksilemden oluşmuş olup açık kollateral demet tipi gözlenmektedir. İletim demetleri gövde üzerinde 13-17 adet halkasal bir diziliş sergilemektedir. Merkez öz bölgesinden oluşmaktadır. Öz hücreleri yuvarlak ya da çokgen şekilli ve ince çeperli parankimatik hücrelerden oluşmaktadır. Öz parankima hücrelerinin genişlikleri 12,65-44,65 µm arasındadır (Şekil 3.3- Şekil 3.4).



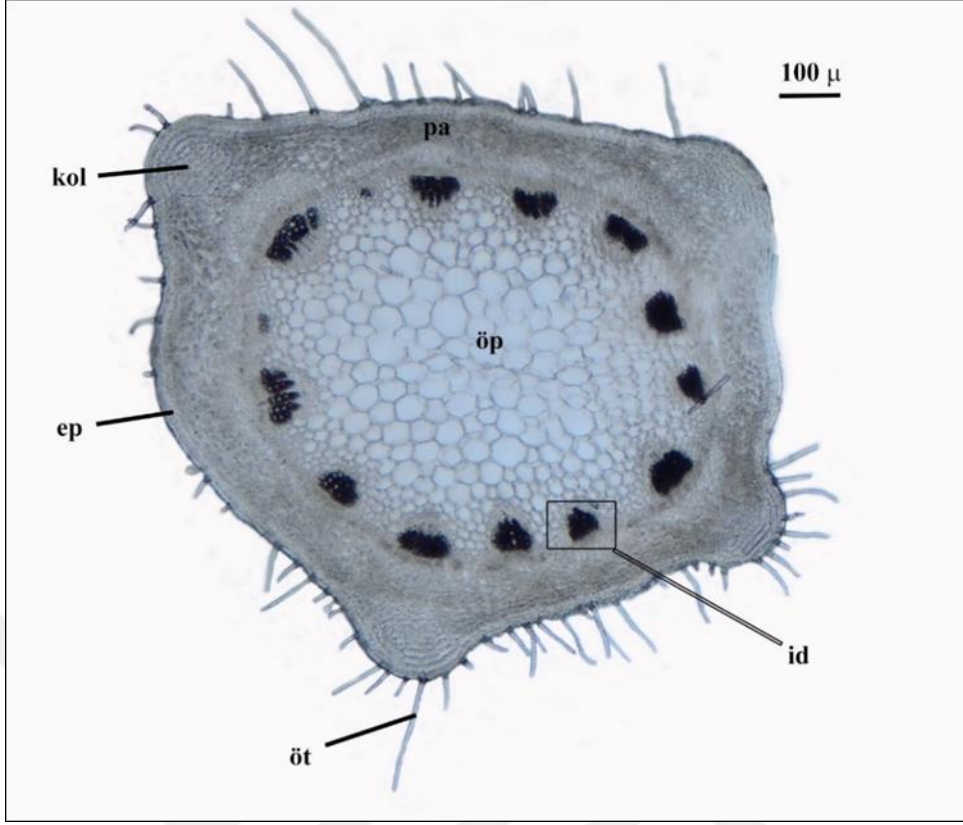
**Şekil 3.3:** Gövde gemel görünüşü. Ep: epidermis, öt: örtü tüyü, kol: kollenkima parankiması, pa: parankima, ks: ksilem, öp: öz parankiması, en: endodermis, fl: floem.



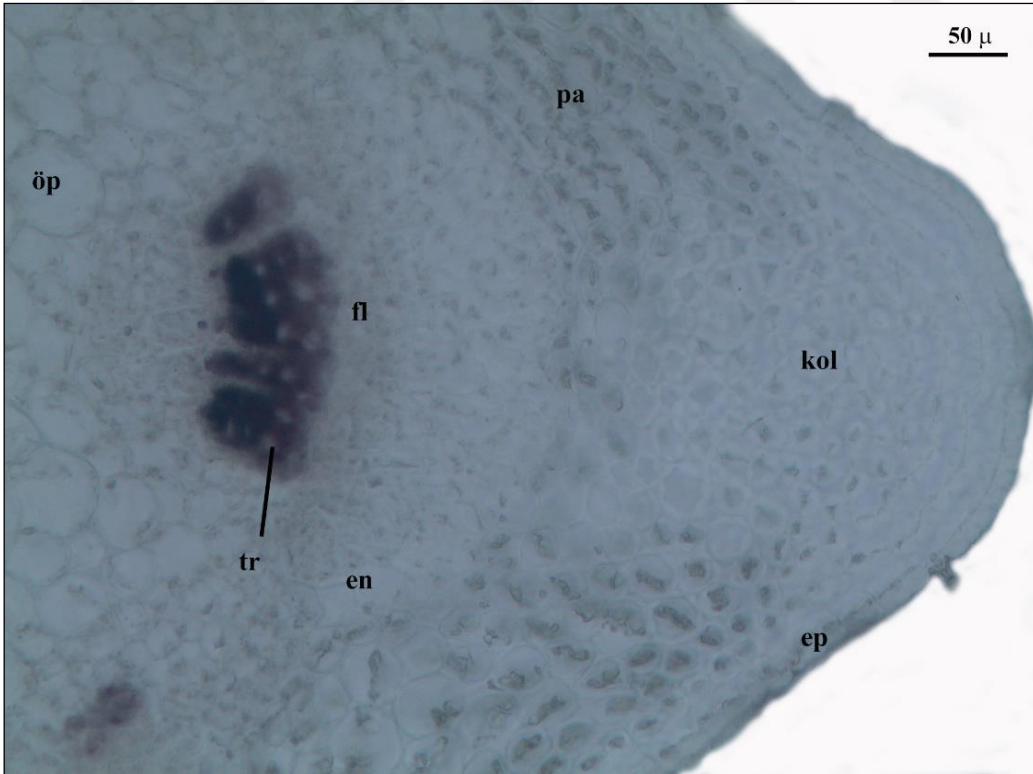
**Şekil 3.4:** Gövde köşe görünüşü. Ep: epidermis, pa: parankima, kol: kollenkima parankiması, ks: ksilem, öp: öz parankiması, fl: floem, tr: trake hücresi, en: endodermis.

### 3.1.1.3 *Trigonella coerulescens* subsp. *ayvalikensis*

Taksonun gövde enine kesiti incelendiğinde; en dışta tek sıralı epidermis hücreleri görülmektedir. Bu hücreler yuvarlak ya da kübik şekillerde olup genişlikleri 8,76-19,62  $\mu\text{m}$ , uzunlukları 9,89-24,62  $\mu\text{m}$  ölçülerindedir. Epidermisin üzerinde ince bir kütikula tabakası yer almaktadır (0,98– 2,15  $\mu\text{m}$ ). Gövdenin epidermal yüzeyi yoğun olarak örtü ve seyrek olarak salgı tüyleriyle kaplıdır. Örtü tüyleri; tabanı genişlemiş, çok hücreli ve basit şekilli iken salgı tüyleri 1-2 hücreli bir sap ve yuvarlak bir baş kısmını içermektedir. Epidermisin hemen altında korteks tabakası gelmektedir. Bu tabaka; kollenkima, parankima ve endodermis hücrelerden oluşmaktadır. Kollenkima tabakası gövde köşelerinde çok tabakalı iken (3-10 sıralı) köşe aralarında az tabakalıdır (1-2 sıralı). Korteks parankima hücrelerinin genişlikleri 23,43-49,22  $\mu\text{m}$ , uzunlukları 14,62-25,12  $\mu\text{m}$  boyutlarında olup kollenkimanın hemen altında yer almaktadır. Bu tabakanın hücreleri yuvarlak ve ince çeperli gözlenmesine rağmen ara sıra hücreler arası boşluklar göze çarpmaktadır. Korteks tabakasının en iç kısmını oluşturan endodermis tabakası 1-2 sıralı parlak hücreli ve dikdörtgenimsi ya da yassılaştırmış hücrelerden oluşmaktadır. Endodermisin hemen altında iletim demetleri gelmektedir. İletim demetleri floem ve ksilemden oluşmuş olup açık kollateral demet tipi gözlenmektedir. İletim demetleri gövde üzerinde 12-16 adet halkasal bir diziliş sergilemektedir. Merkez öz bölgesinden oluşmaktadır. Öz hücreleri yuvarlak ya da çokgen şekilli ve ince çeperli parankimatik hücrelerden oluşmaktadır. Öz parankima hücrelerinin genişlikleri 13,43-50,8  $\mu\text{m}$  arasındadır (Şekil 3.5- Şekil 3.6).



**Şekil 3.5:** Gövde genel görünüş. Ep: epidermis, öt: örtü tüyü, kol: kollenkima parankiması, id: iletim demeti, öp: öz parankiması, pa: parankima.

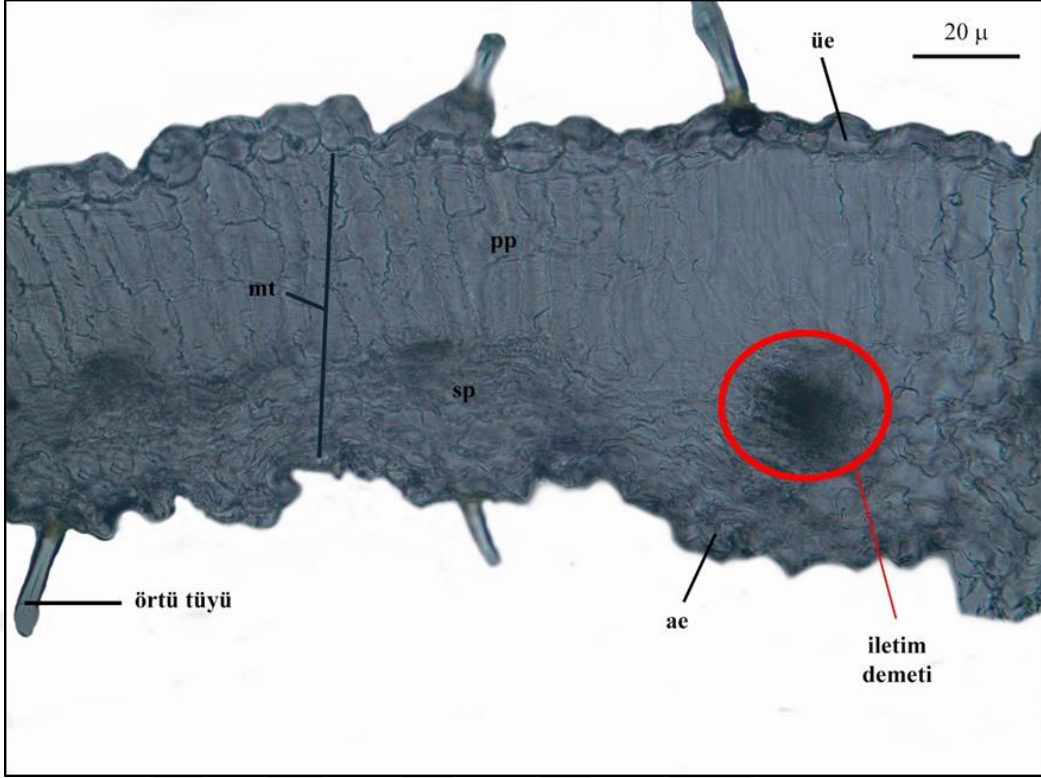


**Şekil 3.6:** Gövde köşe görünüşü. Ep: epidermis, en: endodermis, kol: kollenkima parankiması, ks: ksilem, öp: öz parankiması, tr: trake hücresi, fl: floem,

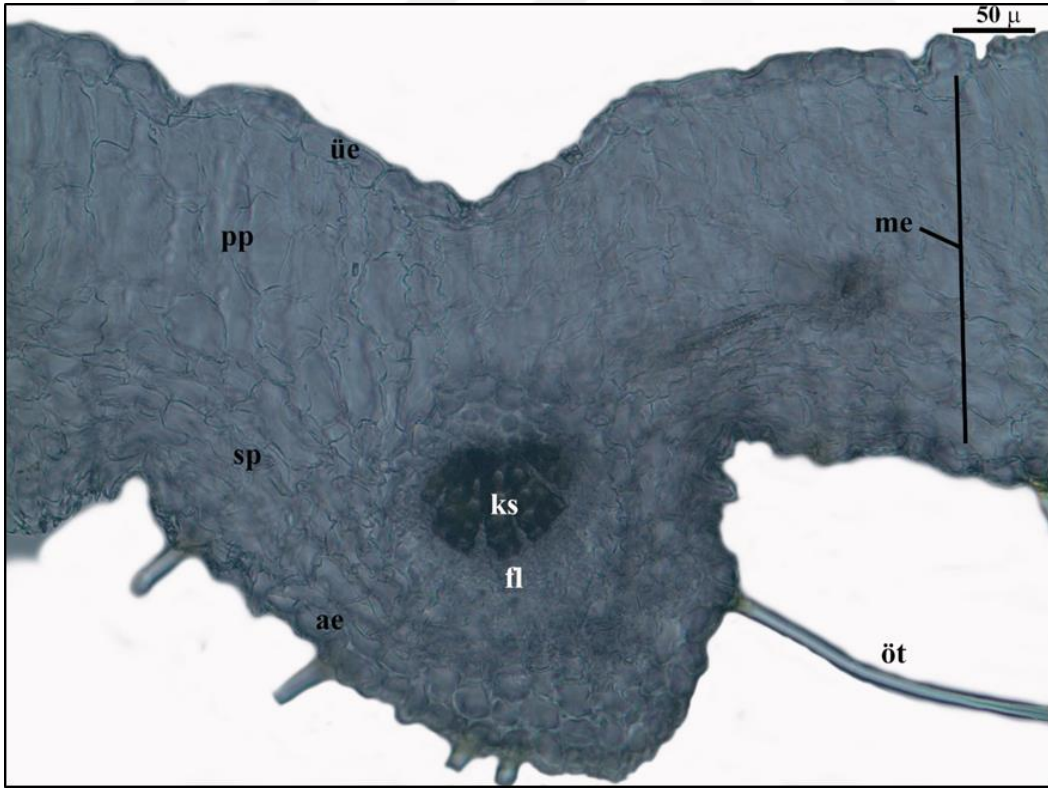
### 3.1.2 Yaprak Anatomisi (Lamina Anatomisi)

#### 3.1.2.1 *Trigonella coerulescens* subsp. *coerulescens*

Taksonun yaprak enine kesiti incelendiğinde; üst ve alt epidermis hücrelerinin üzerinde ince bir kütikula tabakasının olduğu gözlenmiştir. Üst epidermis hücreleri (genişlikleri: 30,04-51,64 µm, uzunlukları: 17,37-30,98 µm) alt epidermis hücrelerine (genişlikleri: 12,67-28,63 µm, uzunlukları: 11,26-17,37 µm) nazaran daha iri boyutlardadır. Epidermis hücreleri sıkı dizilmiş, üst ve alt çeperler yan çeperlere göre daha kalınlaşmış; yuvarlak, kübik ya da dikdörtgenimsi şekillerde görülmektedir. Epidermis hücrelerinin üzerinde örtü ve salgı tüyleri görülmektedir. Örtü tüyleri; tabanı genişlemiş, çok hücreli ve basit şekilli iken salgı tüyleri 1-2 hücreli bir sap ve yuvarlak bir baş kısmını içermektedir. Mezofil tabakası; palizat parankimasi, sünger parankimasi ve parankima hücreleri içine gömülmüş büyüklü küçüklü iletim demetlerinden oluşmakta olup 62,24-78,37 µm genişliğindedir. Üst epidermisin hemen altında yer alan palizat parankimasi 2 sıralı, silindirik şekilli, bol kloroplastlı ve sıkı dizilmiş hücrelerden oluşmaktadır. Hücreler 4,57-22,25 µm boy ve 3,84-9,14 µm genişliğindedir. Sünger parankimasi 3-5 sıralı, düzensiz şekilli, hücreler arası boşlukları görülen ve daha az kloroplast içeren hücrelerden oluşmaktadır. Mezofil tabakası içerisinde kollateral tipte demetler daha çok palizat ve sünger parankimaların aralarında yer almaktadır (Şekil 3.7-3.8). Yaprak üzerindeki stomalar incelendiğinde; stomaların epidermis hücreleriyle aynı seviyede olduğu (mezomorfik) ve her iki yüzeyde de bol bulunduğu (amfistomatik) görülmüştür. Yaprığın üst yüzeyinde 1 mm<sup>2</sup> de 102, alt yüzeyinde ise 214 stoma bulunmaktadır. Yaprığın üst yüzeyindeki epiderma hücre sayısı 371, alt yüzeyindeki epiderma hücre sayısı ise 660' dır. Üst yüzeyde stoma indeksi 21.6, alt yüzeyde 24.4 bulunmuştur. Stoma indeksin oranı ise 0.89 olarak ölçülmüştür. (Tablo 4.4).



**Şekil 3.7:** Lamina mezofil tabakası. Mt: mezofil tabakası, pp: palizat parankiması, sp: sünger parankiması, üe: üst epidermis, ae: alt epidermis.

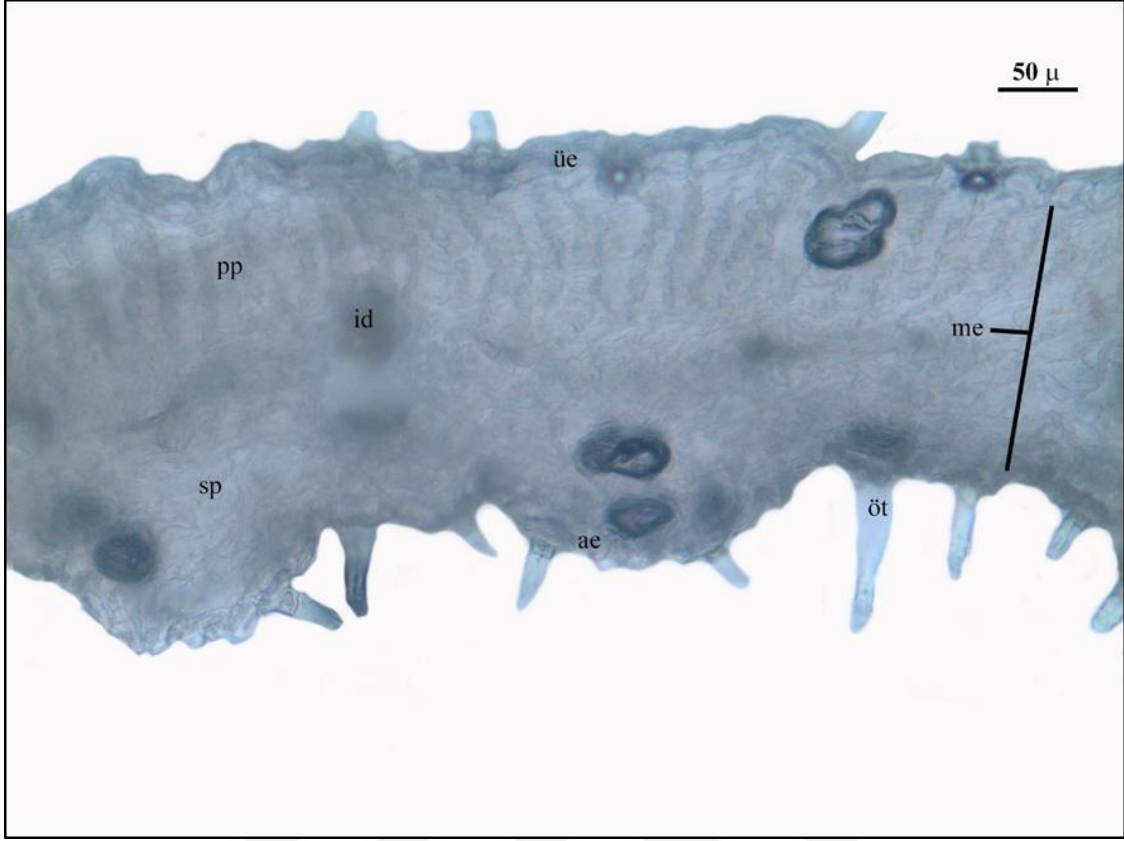


**Şekil 3.8:** Lamina orta damarı. Me: mezofil tabakası, pp: palizat parankiması, sp: sünger parankiması, üe: üst epidermis, ae: alt epidermis, öt: örtü tüyü, ks: ksilem, fl: floem.

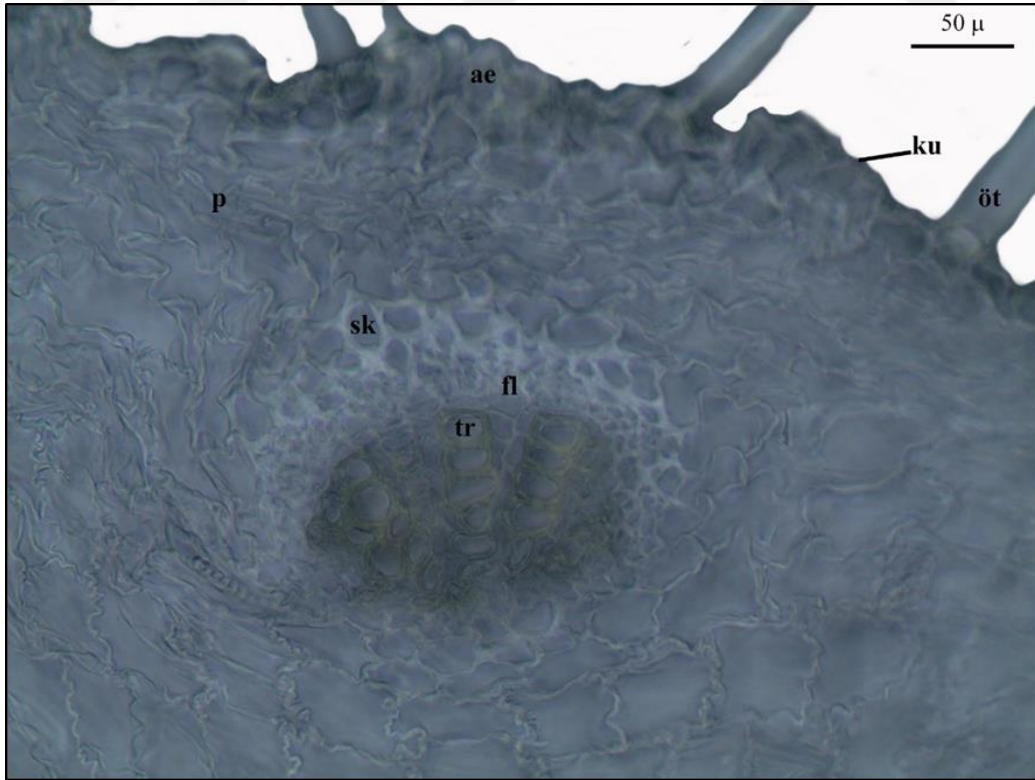
### 3.1.2.2 *Trigonella coerulescens* subsp. *kemerensis*

Taksonun yaprak enine kesiti incelendiğinde; üst ve alt epidermis hücrelerinin üzerinde ince bir kütikula tabakasının olduğu gözlenmiştir. Üst epidermis hücreleri (genişlikleri: 23,44-37,32  $\mu\text{m}$ , uzunlukları: 18,18-24,88  $\mu\text{m}$  ) alt epidermis hücrelerine (genişlikleri: 11,48-14,83  $\mu\text{m}$ , uzunlukları: 8,61-11,96  $\mu\text{m}$ ) nazaran daha iri boyutlardadır. Epidermis hücreleri sıkı dizilmiş, üst ve alt çeperler yan çeperlere göre daha kalınlaşmış; yuvarlak, kübik ya da dikdörtgenimsi şekillerde görülmektedir. Epidermis hücrelerinin üzerinde örtü ve salgı tüyleri görülmektedir. Örtü tüyleri; tabanı genişlemiş, çok hücreli ve basit şekilli iken salgı tüyleri 1-2 hücreli bir sap ve yuvarlak bir baş kısmını içermektedir. Mezofil tabakası; palizat parankiması, sünger parankiması ve parankima hücreleri içine gömülmüş büyüklü küçüklü iletim demetlerinden oluşmakta olup 216,4-336,5  $\mu\text{m}$  genişliğindedir. Üst epidermisin hemen altında yer alan palizat parankiması 2 sıralı, silindirik şekilli, bol kloroplastlı ve sıkı dizilmiş hücrelerden oluşmaktadır. Hücreler 18,19- 60  $\mu\text{m}$  boy ve 19,63-39,27  $\mu\text{m}$  genişliğindedir. Sünger parankiması 3-6 sıralı, düzensiz şekilli, hücreler arası boşlukları görülen ve daha az kloroplast içeren hücrelerden oluşmaktadır. Mezofil tabakası içerisinde kollateral tipte demetler daha çok palizat ve sünger parankimaların aralarında yer almaktadır (Şekil 3.9- Şekil 3.10).

Yaprak üzerindeki stomalar incelendiğinde; stomaların epidermis hücreleriyle aynı seviyede olduğu (mezomorfik) ve her iki yüzeyde de bol bulunduğu (amfistomatik) görülmüştür. Yaprığın üst yüzeyinde 1  $\text{mm}^2$  de 103, alt yüzeyinde ise 155 stoma bulunmaktadır. Yaprığın üst yüzeyindeki epiderma hücre sayısı 360, alt yüzeyindeki epiderma hücre sayısı ise 508' dir. Üst yüzeyde stoma indeksi 22.2, alt yüzeyde 23.3 olarak bulunmuştur. Stoma indeks oranı ise 0.95 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.4).



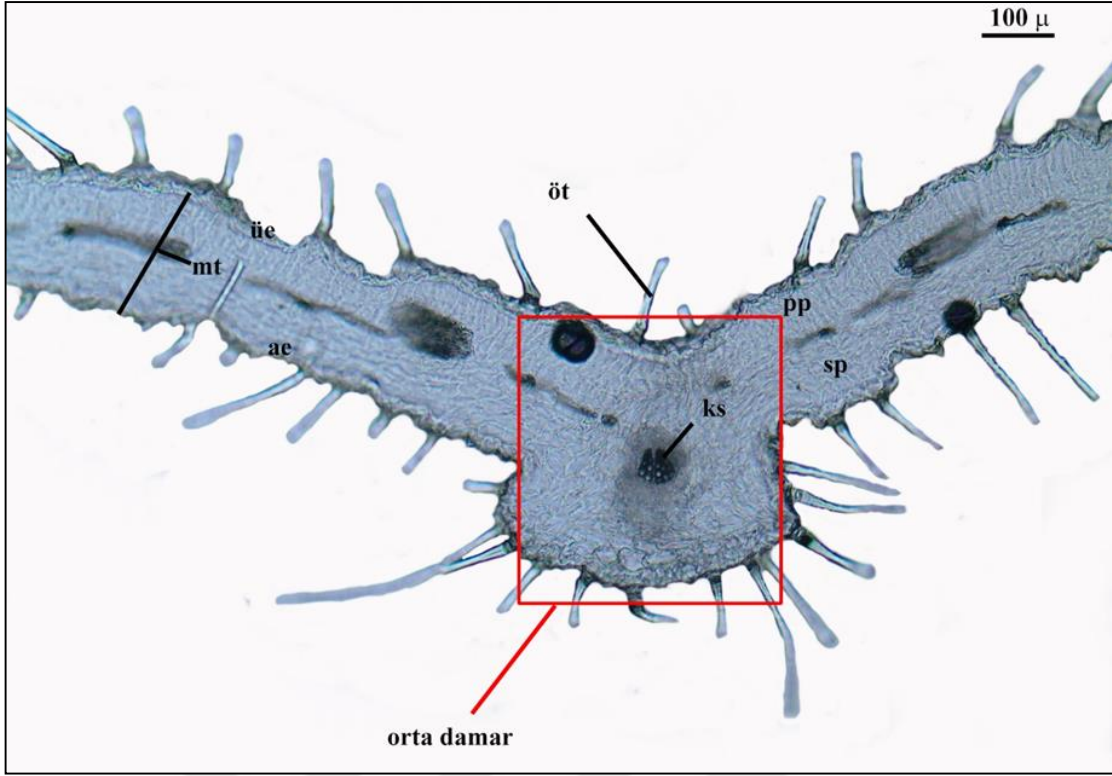
**Şekil 3.9:** Lamina mezofil tabakası. pp: palizat parankiması, me: mezofil tabakası, sp: sünger parankiması, ae: alt epidermis, üe: üst epidermis, id: iletim demeti, öt: örtü tüyü.



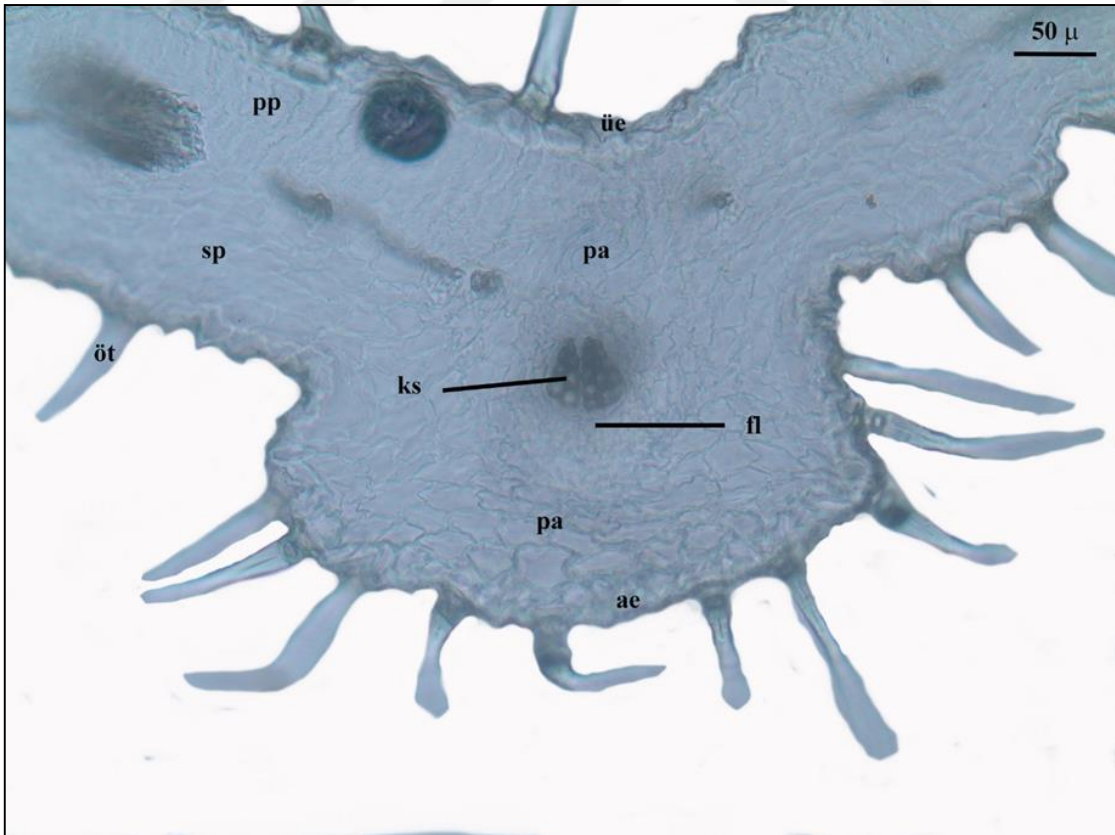
**Şekil 3.10:** Lamina orta damarı. Tr: trake hücresi, p: parankima, sk: sklerankima, ae: alt epidermis, öt: örtü tüyü, fl: floem, ku: kutikula.

### 3.1.2.3 *Trigonella coerulescens* subsp. *ayvalikensis*

Taksonun yaprak enine kesiti incelendiğinde; üst ve alt epidermis hücrelerinin üzerinde ince bir kütikula tabakasının olduğu gözlenmiştir. Üst epidermis hücreleri (genişlikleri: 23,47-36,61 µm, uzunlukları: 17,84-22,06 ) alt epidermis hücrelerine ( genişlikleri: 12,67-15,96 µm, uzunlukları: 10,32-15,49 µm) nazaran daha iri boyutlardadır. Epidermis hücreleri sıkı dizilmiş, üst ve alt çeperler yan çeperlere göre daha kalınlaşmış; yuvarlak, kübik ya da dikdörtgenimsi şekillerde görülmektedir. Epidermis hücrelerinin üzerinde örtü ve salgı tüyleri görülmektedir. Örtü tüyleri; tabanı genişlemiş, çok hücreli ve basit şekilli iken salgı tüyleri 1-2 hücreli bir sap ve yuvarlak bir baş kısmını içermektedir. Mezofil tabakası; palizat parankiması, sünger parankiması ve parankima hücreleri içine gömülmüş büyüklü küçüklü iletim demetlerinden oluşmakta olup 292-351,6 µm genişliğindedir. Üst epidermin hemen altında yer alan palizat parankiması 2 sıralı, silindirik şekilli, bol kloroplastlı ve sıkı dizilmiş hücrelerden oluşmaktadır. Hücreler 11,2-33,03 µm boy ve 5,13-14,24 µm genişliğindedir. Sünger parankiması 3-5 sıralı, düzensiz şekilli, hücreler arası boşlukları görülen ve daha az kloroplast içeren hücrelerden oluşmaktadır. Mezofil tabakası içerisinde kollateral tipte demetler daha çok palizat ve sünger parankimaların aralarında yer almaktadır (Şekil 3.11- Şekil 3.12). Yaprak üzerindeki stomalar incelendiğinde; stomaların epidermis hücreleriyle aynı seviyede olduğu (mezomorfik) ve her iki yüzeyde de bol bulunduğu (amfistomatik) görülmüştür. Yaprığın üst yüzeyinde 1 mm<sup>2</sup> de 122, alt yüzeyinde ise 227 stoma bulunmaktadır. Yaprığın üst yüzeyindeki epiderma hücre sayısı 409, alt yüzeyindeki epiderma hücre sayısı ise 723' dür. Üst yüzeyde stoma indeksi 22.9, alt yüzeyde 23.9 olarak bulunmuştur. Stoma indeks oranı ise 0.95 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.4).



**Şekil 3.11:** Lamina mezofil tabakası. Mt: mezofil tabakası, pp: palizat parankiması, sp: sünger parankiması, üe: üst epidermis, ae: alt epidermis, ks: ksilem, öt: örtü tüyü.

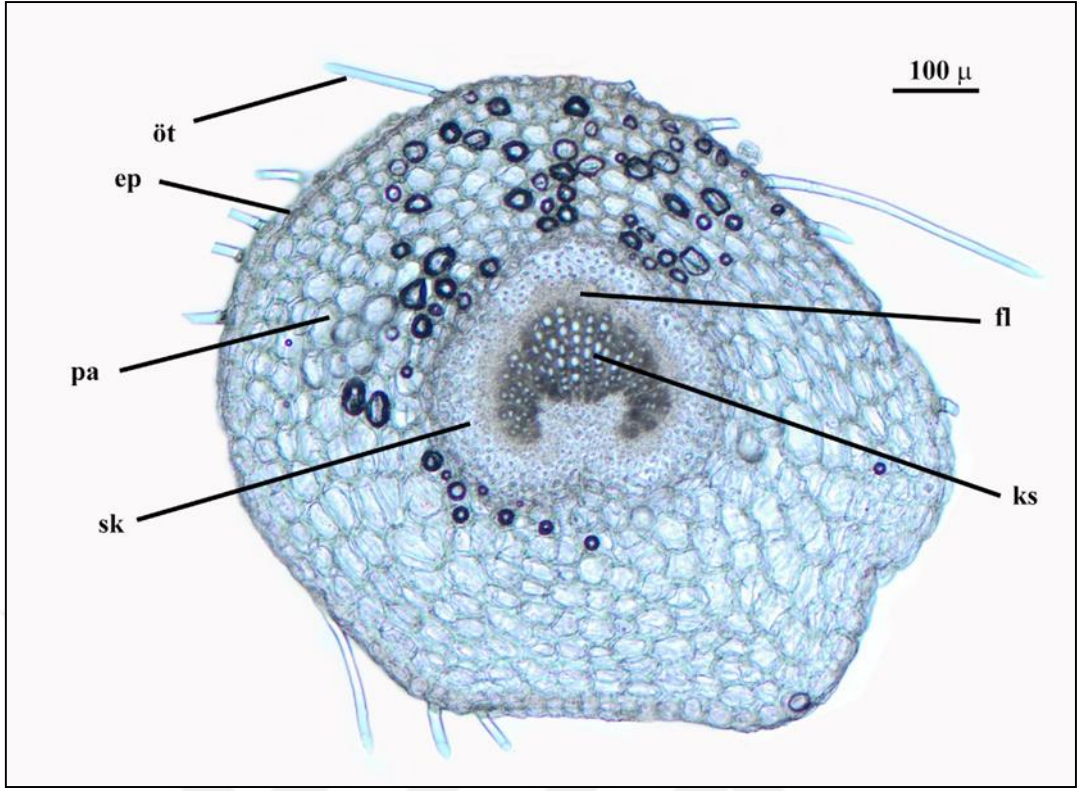


**Şekil 3.12:** Lamina orta damarı. Pp: palizat parankiması, sp: sünger parankiması, üe: üst epidermis, ae: alt epidermis, ks: ksilem, öt: örtü tüyü, fl: floem, pa: parankima.

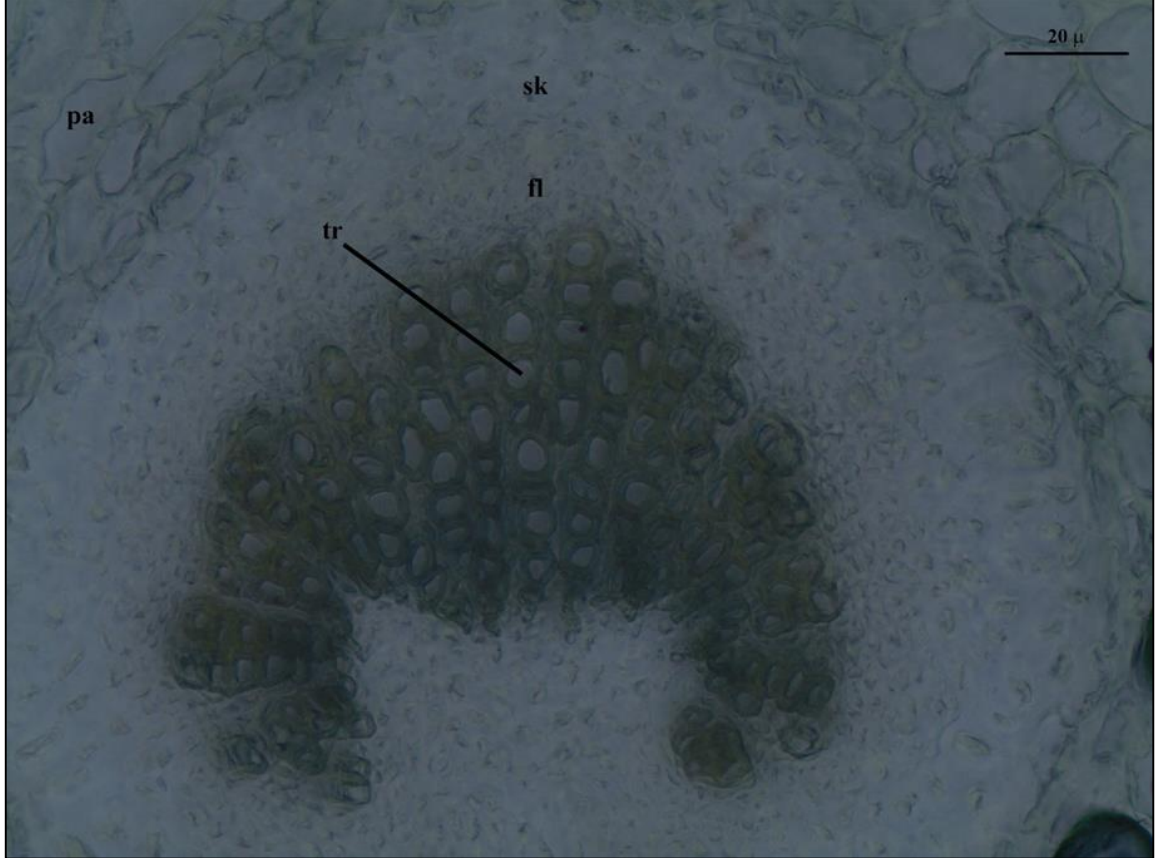
### 3.1.3 Yaprak Anatomisi (Petiyol Anatomisi)

#### 3.1.3.1 *Trigonella coerulescens* subsp. *coerulescens*

Petiyolden alınan enine kesitlerde aşağıdaki elementler gözlenmiştir. Epidermisin üzeri ince kütikula ile örtülüdür. Abaksiyal ve adaksiyal epidermis hücreleri yuvarlak, kübik ya da dikdörtgen şekillerde olup hemen hemen eşit boylardadır. Üst çeperler alt ve yan çeperlere kıyasla daha kalındır. Epidermisin üzerinde örtü ve salgı tüylerine rastlanmıştır. Epidermis hücrelerinin hemen altında çok tabakalı (genişlikleri: 17,17-31,7  $\mu\text{m}$ , uzunlukları: 13,17-30,23  $\mu\text{m}$ ) yuvarlak şekilli ve ince çeperli parankima hücreleri gelmektedir. İletim demetleri, parankimatik hücreler tarafından çevrilmiştir. Petiyolun ortasında büyük ve geniş bir iletim demeti görülürken; petiyol kanatlarında iletim demetleri görülmemiştir. İletim demetleri ksilem ve floem elemanlarını içermektedir. İletim demetleri halkasal olarak çok tabakalı (4-6 sıralı) sklerenkimatik bir kın ile çevrilmiştir. Ksilem petiyolun adaksiyal yüzünde; floem ise abaksiyal yüzünde yer almaktadır. Floem 3-5 sıralı yuvarlak ya da ezilmiş şekillidir. Ksilem, trake ve aralarında yer alan parankimatik hücrelerden oluşmuştur (Şekil 3.13-Şekil 3.14) .



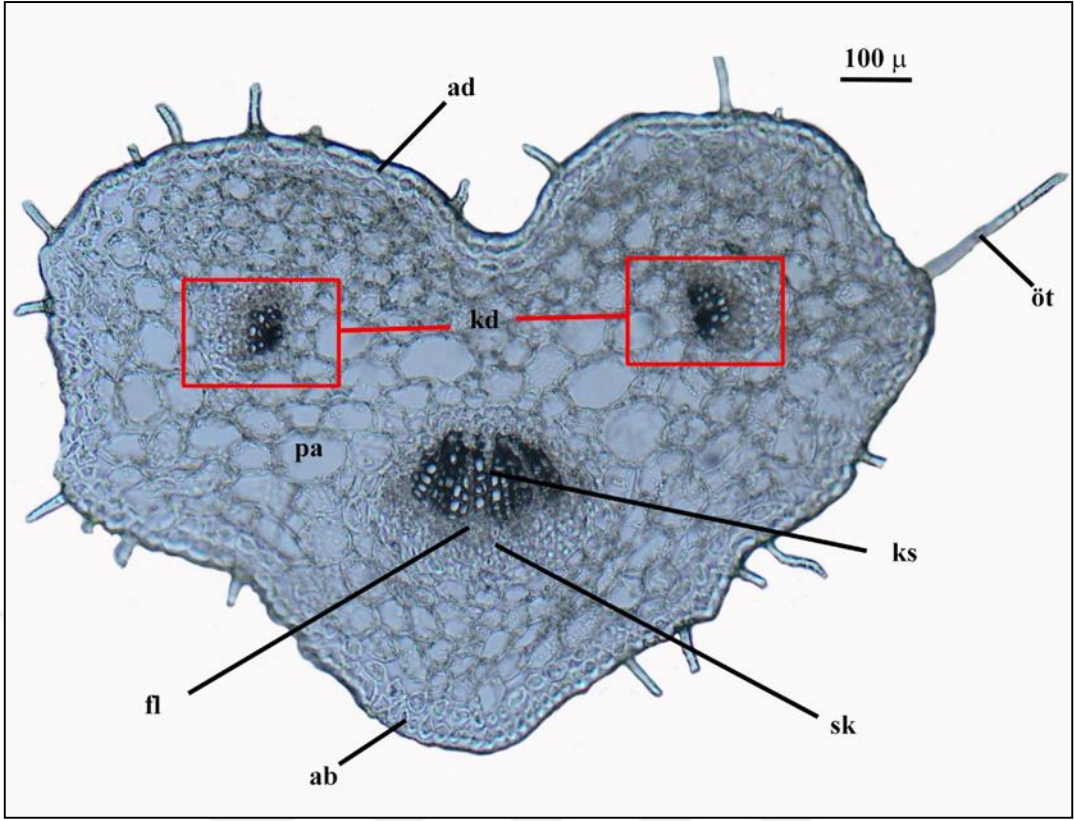
**Şekil 3.13:** Petiyol genel görünüşü. Öt: örtü tüyü, ep: epidermis, pa: parankima, sk: sklerenkima, ks: ksilem, fl: floem.



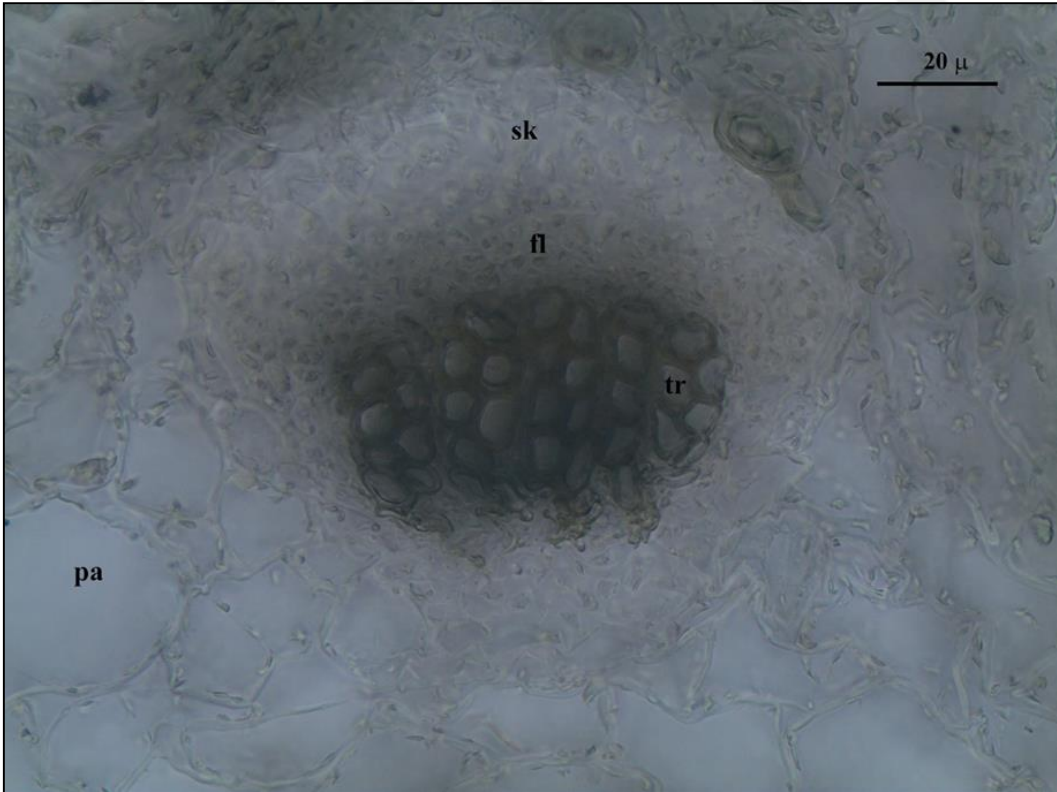
**Şekil 3.14:** Petiyol orta damarı. Pa: parankima, sk: sklerenkima, fl: floem, tr: trake hücresi.

### 3.1.3.2 *Trigonella coerulescens* subsp. *kemerensis*

Petiyolden alınan enine kesitlerde aşağıdaki elementler gözlenmiştir. Epidermisin üzeri ince kütikula ile örtülüdür. Abaksiyal ve adaksiyal epidermis hücreleri yuvarlak, kübik ya da dikdörtgen şekillerde olup hemen hemen eşit boylardadır. Üst çeperler alt ve yan çeperlere oranla daha kalındır. Epidermisin üzerinde örtü ve salgı tüylerine rastlanmıştır. Epidermis hücrelerinin hemen altında çok tabakalı (genişlikleri: 25,6-44,8 µm, uzunlukları: 28,95-45,12 µm) yuvarlak şekilli ve ince çeperli parankima hücreleri gelmektedir. İletim demetleri, parankimatik hücreler tarafından çevrilmiştir. Petiyolun ortasında büyük ve geniş bir iletim demeti görülürken; petiyol kanatlarında da küçük iletim demetleri (1+1) görülmüştür. İletim demetleri ksilem ve floem elemanlarını içermektedir. İletim demetleri halkasal olarak çok tabakalı (3-7 sıralı) sklerenkimatik bir kın ile çevrilmiştir. Ksilem petiyolun adaksiyal yüzünde; floem ise abaksiyal yüzünde yer almaktadır. Floem 3-8 sıralı yuvarlak ya da ezilmiş şekillidir. Ksilem, trake ve aralarında yer alan parankimatik hücrelerden oluşmuştur (Şekil 3.15-Şekil3.16).



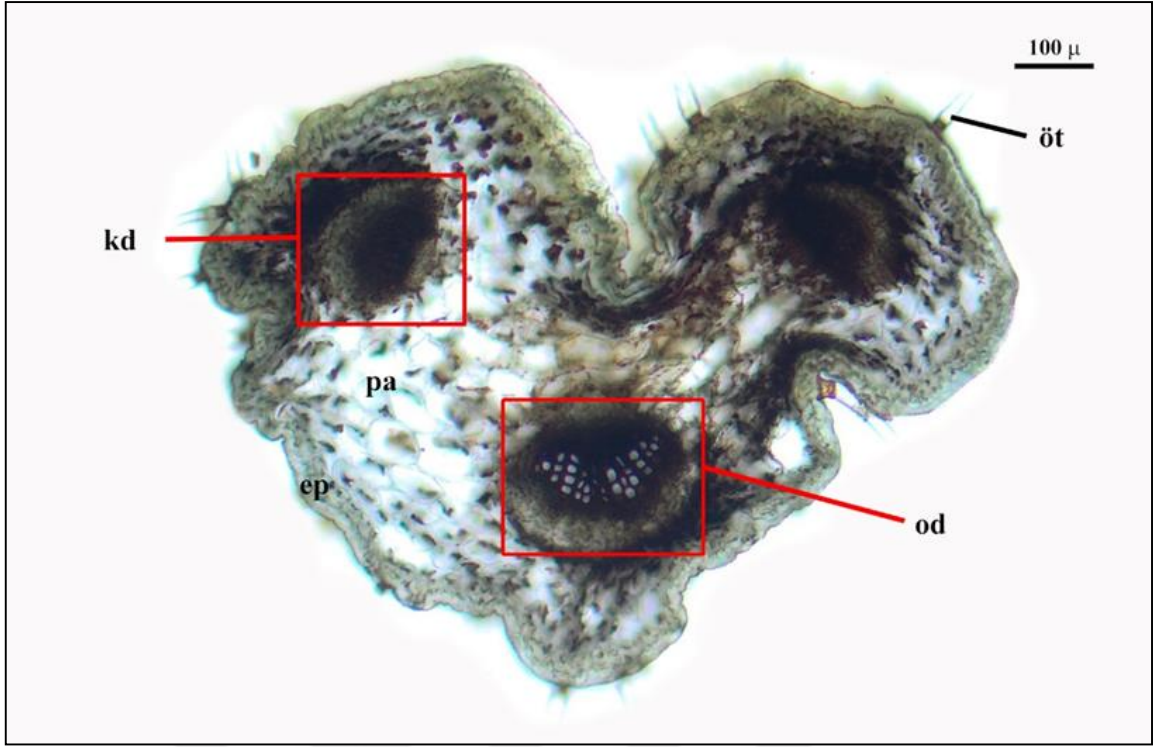
**Şekil 3.15:** Petiyol genel görünüşü. Pa: parankima, fl: floem, sk: sklerenkima, ötü: örtü tüyü, ks: ksilem, ad: adaksiyel, ab: abaksiyel, kd: ksilem demeti.



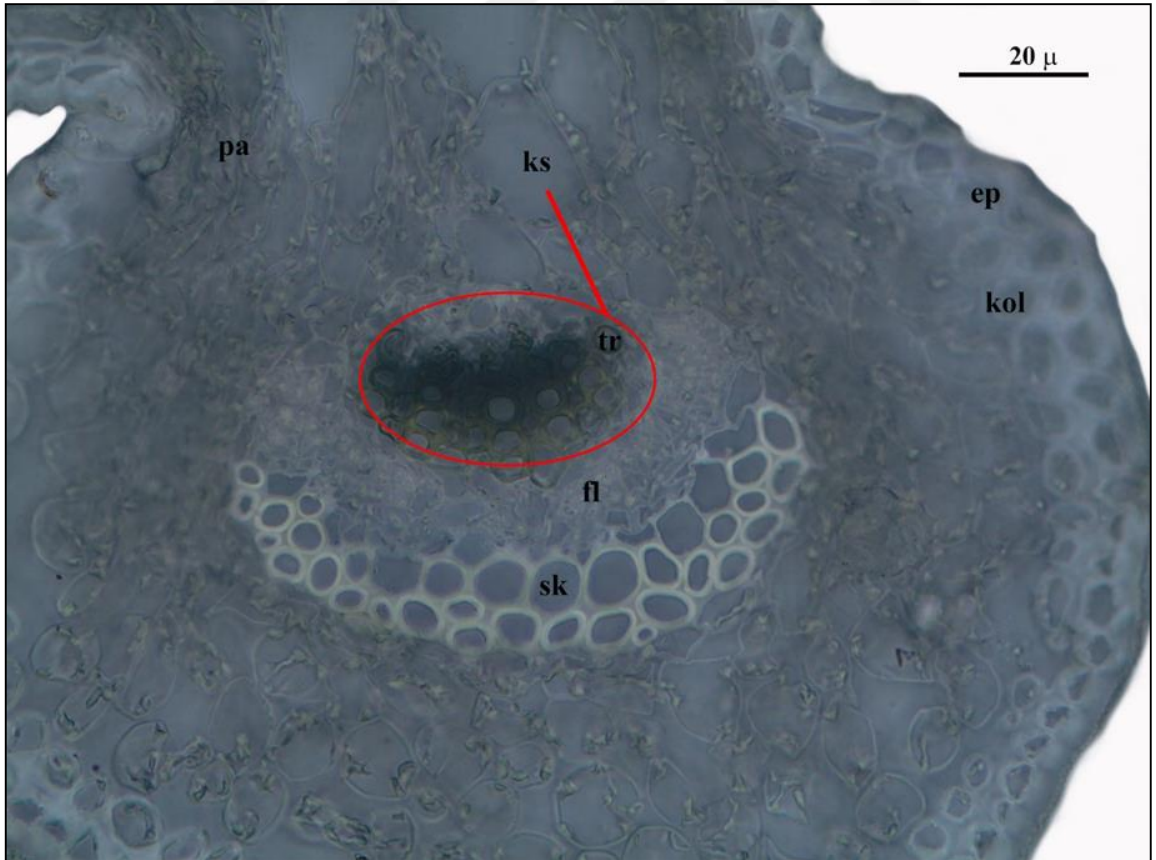
**Şekil 3.16:** Petiyol orta damarı. Pa: parankima, sk: sklerenkima, fl: floem, tr: trake hücresi.

### 3.1.3.3 *Trigonella coerulescens* subsp. *ayvalikensis*

Petiyolden alınan enine kesitlerde aşağıdaki elementler gözlenmiştir. Epidermisin üzeri ince kütikula ile örtülüdür. Abaksiyal ve adaksiyal epidermis hücreleri yuvarlak, kübik ya da dikdörtgen şekillerde olup hemen hemen eşit boylardadır. Üst çeperler, alt ve yan çeperlere kıyasla daha kalındır. Epidermisin üzerinde örtü ve salgı tüylerine rastlanmıştır. Epidermis hücrelerinin hemen altında çok tabakalı (genişlikleri: 19,54-33,55 µm, uzunlukları: 17,1-36,92 µm) yuvarlak şekilli ve ince çeperli parankima hücreleri gelmektedir. İletim demetleri, parankimatik hücreler tarafından çevrilmiştir. Petiyolun ortasında büyük ve geniş bir iletim demeti görülürken; petiyol kanatlarında da iletim demetleri görülmüştür. İletim demetleri ksilem ve floem elemanlarını içermektedir. İletim demetleri halkasal olarak çok tabakalı (2-3 sıralı) sklerenkimatik bir kın ile çevrilmiştir. Ksilem petiyolun adaksiyal yüzünde; floem ise abaksiyal yüzünde yer almaktadır. Floem 3-6 sıralı yuvarlak ya da ezilmiş şekillidir. Ksilem, trake ve aralarında yer alan parankimatik hücrelerden oluşmuştur (Şekil 3.17-Şekil 3.18) .



**Şekil 3.17:** Petiyol genel görünüşü. Öt: örtü tüyü, kd: ksilem demeti, od: orta damar, pa: parankima, ep: epidermis.

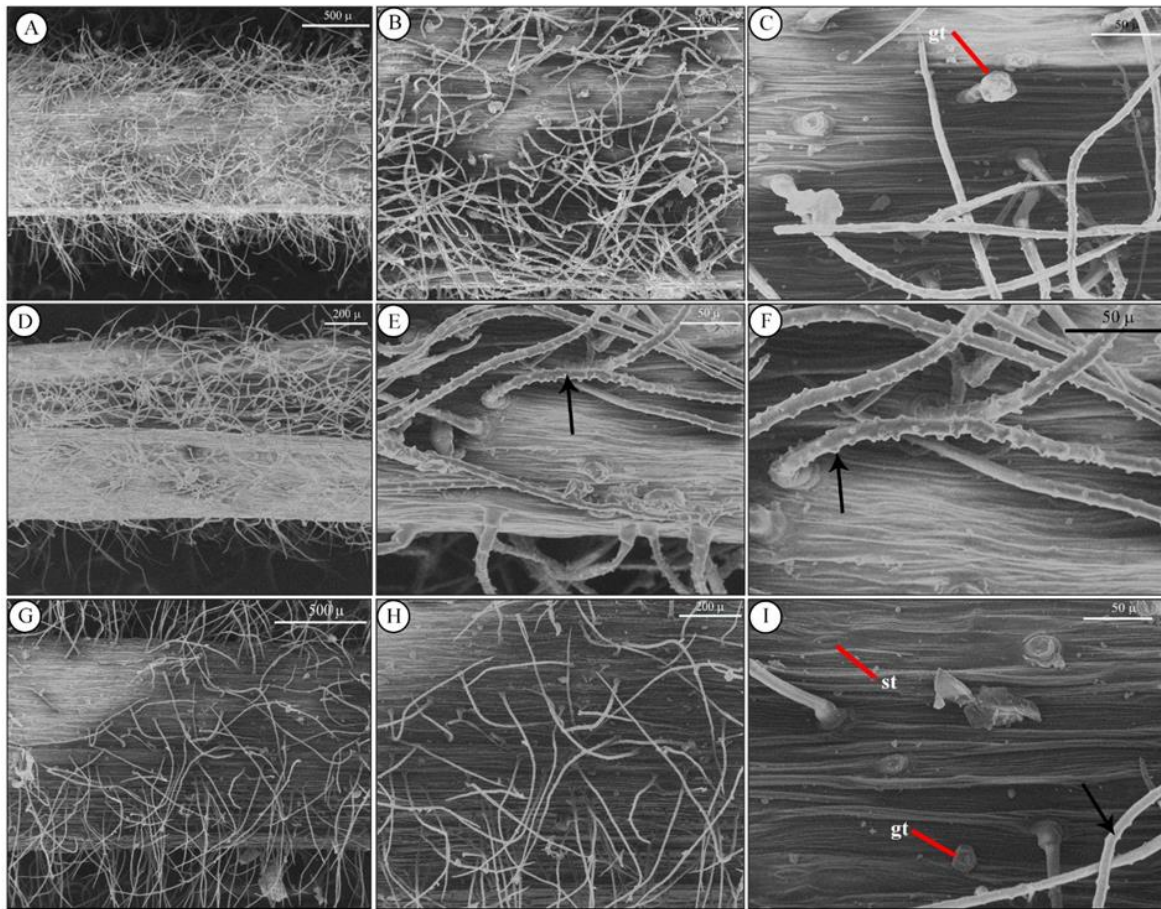


**Şekil 3.18:** Petiyol orta damarı. Pa: parankima, ks: ksilem, tr: trake hücresi, kol: kollenkima parankiması, fl: floem, ep: epidermis, sk: sklerenkima.

## 3.2 Mikromorfolojik Bulgular

### 3.2.1 Gövde ve Yaprak Mikromorfolojisi

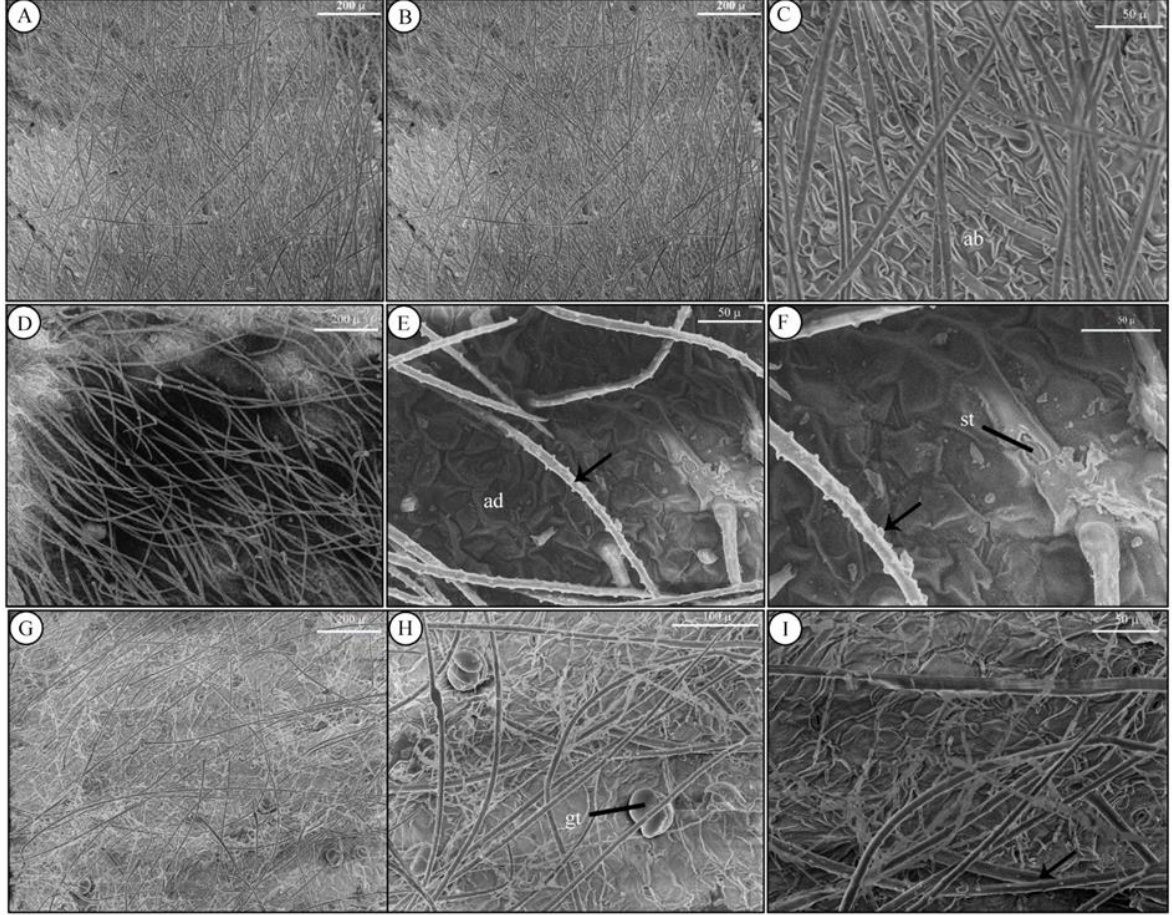
*T. coerulescens* taksonlarının gövde yaprak yüzeyi SEM’de incelenmiştir. Tüm alttürlerin gövde ve yapraklarının kadifemsi yoğun tüylerle kaplı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.19, 3.20). Yoğunluk olarak kıyaslandığında subsp. *coerulescens* taksonu diğer iki taksona göre daha yoğun tüyler içermektedir. Her üç taksonun gövde ve yaprak yüzeyinde örtü ve salgı tüyleri gözlenmiştir. Örtü tüyleri daha fazla yer kaplarken; salgı tüyleri daha seyrek ve nadir olarak gözlenmiştir. Gövde trikومların yapısı incelendiğinde; tek sıralı ve çok hücreli (3-6), dallanmamış, tabanı çoğunlukla genişlemiş, sivri uçlu, düz, kıvrılmış ya da yatık şekillerdedir.



**Şekil 3.19:** *Trigonella coerulescens* alttürlerinin karşılaştırmalı SEM Gövde mikromorfolojisi. *T. coerulescens* subsp. *coerulescens* (A-C); *T. coerulescens* subsp. *kemerensis* (D-F); *T. coerulescens* subsp. *ayvalikensis* (G-I). st: stoma, gt: salgı tüyü. (Mikropapiller okla gösterilmiştir).

Trikomların üzerinde kütikular mikropapiller gözlenmektedir. Özellikle subsp. *kemerensis* taksonunda bu mikropapiller çok bariz gözlenmiştir (Şekil 3.19-F). Salgı tüyleri kısa bir sap ve yuvarlak bir baş hücrelerinden oluşmaktadır. Sap kısmı 1-3 hücreli ve tek sıralı

dizilmiştir (Şekil 3.19C). Subsp. *ayvalikensis*' in gövde trikrom yapısı da diğer alttürlerle çok benzemektedir. Ancak diğer taksonlardan farklı olarak trikrom yapısının diğer taksonlara göre daha seyrek olduğu ve kütikular mikropapillerin daha zayıf oluşu söylenebilir (Şekil 3.19 G-I). Ayrıca tüm taksonların gövde epidermal yüzeylerinde stoma hücrelerine rastlanmıştır (Şekil 3.19.-I).



**Şekil 3.20:** *Trigonella coerulescens* alttürlerinin karşılaştırmalı SEM yaprak mikromorfolojisi. *T. coerulescens* subsp. *coerulescens* (A-C); *T. coerulescens* subsp. *kemerensis* (D-F); *T. coerulescens* subsp. *ayvalikensis* (G-I). ad: adaksiyal epiermis, st: stoma, gt: salgı tüyü. (Mikropapiller okla gösterilmiştir).

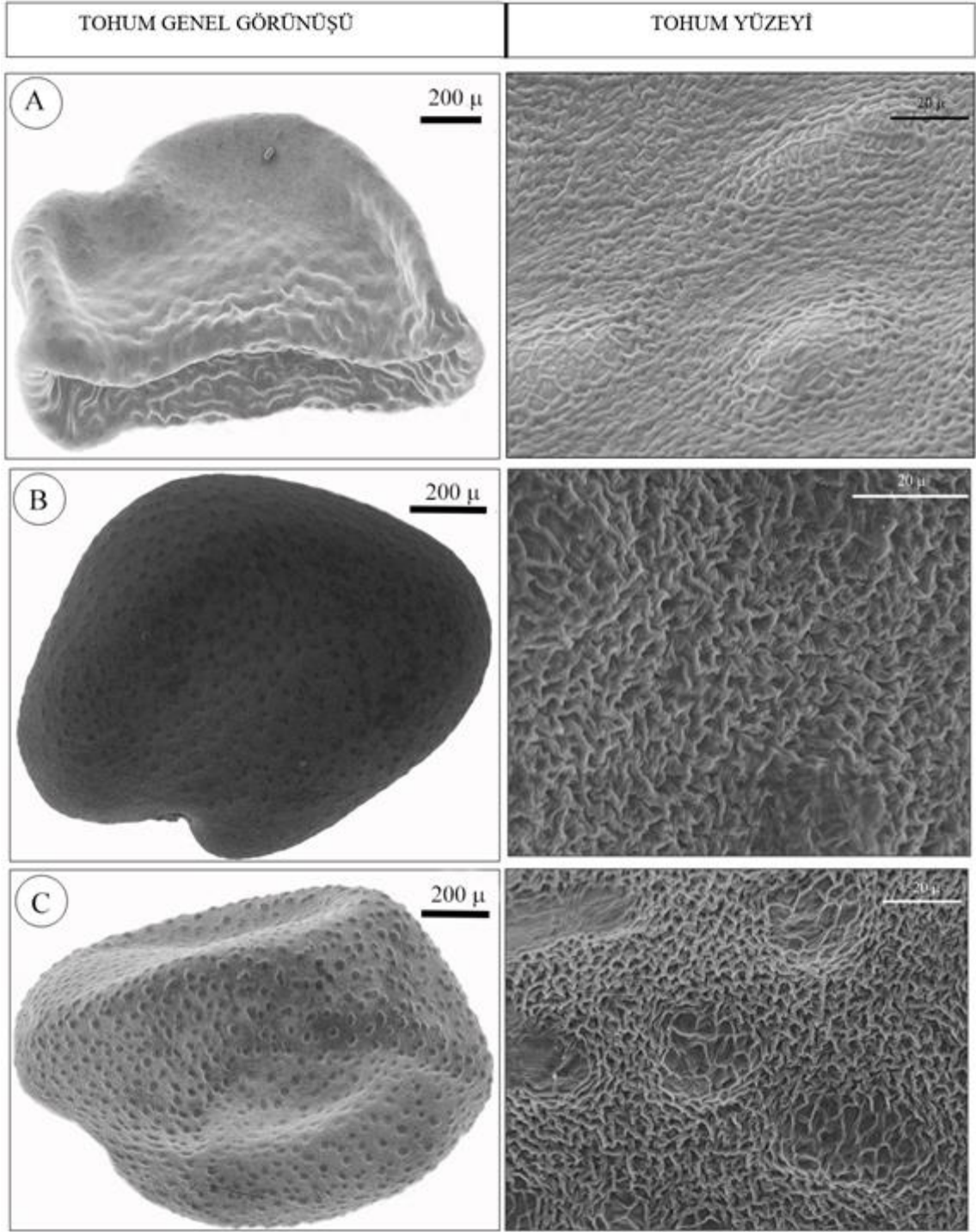
Taksonların yaprak yüzeyi incelendiğinde (Şekil 3.20); tüm taksonların yoğun bir örtü tüyüyle yaprak yüzeyini kapladığı ve salgı tüylerinin örtü tüyleriyle gizlendiği ve daha seyrek olduğu görülmektedir. Örtü tüyleri; gövde tüyleri gibi benzer morfolojik yapıya sahiptir. Çok hücreli, tek sıralı, dallanmamış, tabanı çoğunlukla genişlemiş, sivri uçlu, düz, kıvrılmış ya da yatık şekillerdedir. Trikromların üzerinde gövde trikromlarına benzer kütikular mikropapiller gözlenmektedir. Salgı tüyleri ise kısa bir sap ve yuvarlak bir baş hücresinden oluşmaktadır. Sap kısmı 1-3 hücreli ve tek sıralı dizilmiştir (Şekil 3.20 H).

### 3.2.2 Tohum Mikromorfolojisi

*T. coerulescens* alttürlerinin tohum mikromorfolojisi genellikle benzer olduğu gözlenmiştir. Subsp. *coerulescens* taksonlarının genel tohum morfolojisi incelendiğinde; tohumların ovat ya da ovat reniform şekillerde ve 1.4-2.2 x 1-1.6 mm ölçülerinde olduğu gözlenmiştir. Tohum renkleri açık kahverengiden koyu kahverengiye doğru değişen renklerde dir. Tohum yüzeyi ornamentasyonu; ruminat, akuleat ve verrukat şekillerde olduğu görülmektedir. Hilum; her üç taksonda da beyaz renkli, 0.10-0.14 mm ölçülerinde ve eliptik şekillerdedir (Tablo 3.1). *Trigonella coerulescens* alttürlerinin tohum morfolojik yapısı Şekil 3.21’de verilmiştir.

**Tablo 3.1:** *T. coerulescens* alttürlerinin karşılaştırmalı tohum karakterleri

Taksonlar	Tohum karakterleri								
	Uzunluk		Genişlik		Şekil	Renk	Ornamentasyon	Hilum (mm)	
	Min (mm)	Max (mm)	Min (mm)	Max (mm)				Şekil/renk	Boyut
subsp. <i>coerulescens</i>	1.4	2.2	1,0	1,5	Ovat	Açık kahverengi	Akuleat-verrukata	Eliptik/beyaz	0,10-0.14
subsp. <i>kemerensis</i>	1.5	2.1	1.3	1.4	Ovat-reniform	Kahverengi	Ruminat	Eliptik/beyaz	0.10-0.12
subsp. <i>ayvalikensis</i>	1.3	2.1	1.2	1.6	Ovat-reniform	Koyu kahverengi	Ruminat	Eliptik/beyaz	0.10-0.13



**Şekil 3.21:** *Trigonella coerulescens* alttürlerinin tohum morfolojik yapısı. A) subsp. *coerulescens*, B) subsp. *kemerensis*, C) subsp. *ayvalikensis*

### 3.2.3 Polen Mikromorfolojisi

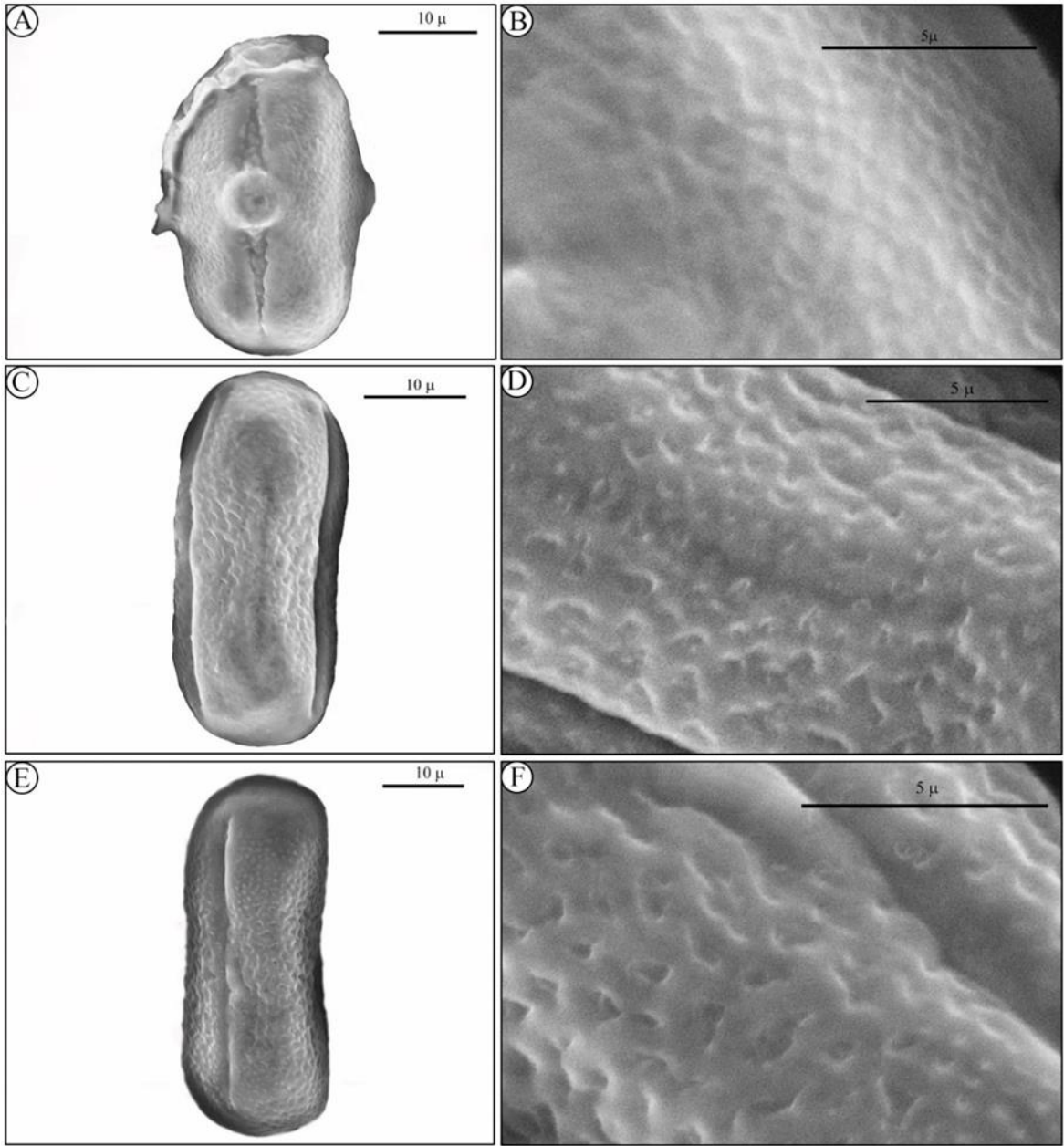
*T. coerulescens* alttürlerinin polen morfolojisinin genellikle birbirine benzer olduğu gözlenmiştir. Subsp. *coerulescens* taksonlarının genel polen morfolojisi incelendiğinde; polenlerin simetrik ve izopolar, ekvatorial görünüş oblong ve polar görünüş sirkular, polen taneleri prolat; polar eksenler 28.5–42.8 µm ve ekvatorial eksenler 17.9 –28.7 µm ölçülerinde görülmüştür (Tablo 3.2 ve Tablo 3.3).

**Tablo 3.2:** *T. coerulescens* taksonlarının karşılaştırmalı kantitatif polen özellikleri (değerler µm olarak verilmiştir.)

Taksonlar	Polar eksen (P)			Ekvatorial eksen (E)			Kolpus		Por	
	Min	Max	Ort.	Min	Max	Ort.	Gen.	Uz.	Gen.	Uz.
subsp. <i>coerulescens</i>	28.5	41.6	34.8	17.9	25.7	23,1	1.9	25.6	7.1	7.2
subsp. <i>kemerensis</i>	31.9	42.8	34.7	19.2	27.3	24.8	2.1	28.3	7.2	7.4
subsp. <i>ayvalikensis</i>	30.7	41.8	33.8	18.9	28.7	24.1	1.8	27.4	6.9	7.2

**Tablo 3.3:** *T. coerulescens* taksonlarının karşılaştırmalı kalitatif polen özellikleri

Taksonlar	P/E	Polen şekli	Apertür tipi	Ornamentasyon	
				Ekvatorial	Polar
subsp. <i>coerulescens</i>	1,5	Prolate	Trikolporat	Retipilat	Perforat
subsp. <i>kemerensis</i>	1.4	Prolate	Trikolporat	Mikroretikulat	Psilat-perforat
subsp. <i>ayvalikensis</i>	1.4	Prolate	Trikolporat	Mikroretikulat	Psilat-perforat



**Şekil 3.22:** *Trigonella coerulescens* alttürlerinin karşılaştırmalı SEM polen mikromorfolojisi. A,C,E: Polen ekvatorial görünüş; B,D,F: Polen yüzey ornamentasyonu. *T. coerulescens* subsp. *coerulescens* (A-B); *T. coerulescens* subsp. *kemerensis* (C-D); *T. coerulescens* subsp. *ayvalikensis* (E-F).

### 3.3 Hücre ve Dokuların Biyometrik Ölçümleri

*Trigonella coerulescens* taksonunun 3 alt türü üzerinde biyometrik ölçümler yapılmıştır. Taksonların hücre ve dokularında yapılan tüm ölçümler Tablo 3.4, Tablo 3.5 ve Tablo 3.6' da gösterilmiştir.

Biyometrik ölçümlerde taksonların; gövde, yaprak ve petiyollerindeki hücre ve dokuların genişlik ( $\mu\text{m}$ ) ve uzunlukları ( $\mu\text{m}$ ) alınarak standart sapmaları hesaplanmıştır. Her üç taksonun biyometrik ölçümleri birbirine benzer boyutlarda olduğu görülmüştür. Gövde enine kesitlerinde; kütikula, epidermis tabakası, korteks tabakası, kollenkima tabakası, parankima hücreleri, endodermis tabakası, floem tabakası, floem hücreleri, trake çapı, öz hücreleri üzerinde biyometrik ölçümler yapılmış ayrıca; gövde iletim demet sayısı da hesaplanmıştır (Tablo 3.4-3.6).

*T. coerulescens* sl. taksonunun gövde biyometrik ölçümlerine bakıldığında; kütikula tabakasının 0.77-2.85  $\mu\text{m}$  boyutlarında olduğu gözlenmiştir. Epidermis hücreleri 5.84-19.62  $\mu\text{m}$  genişlik ve 5.61–24.62  $\mu\text{m}$  uzunluklardadır. Korteks tabakası 32.45–76.13  $\mu\text{m}$  boyutlarında olup öz bölgesinden sonra gövdede en fazla yer kaplayan alan olduğu tespit edilmiştir. Korteks tabakasının en üstünü oluşturan ve epidermis tabakasının hemen altında bulunan kollenkima tabakası genişliği köşelerde (21.5-57.1  $\mu\text{m}$ ) ve köşe aralarında (7.61-19.87  $\mu\text{m}$ ) farklı tabaka ve genişliklerde olduğu görülmüştür. Parankimatik hücrelerden oluşan parankima tabakası 9.14-26.11  $\mu\text{m}$  ölçülerindedir. Ölçümlere göre köşe aralarında korteks tabakasını oluşturan dokuların en geniş kısmını oluşturmaktadır. Korteksin en iç kısmını oluşturan ve 1 sıralı (nadiren 2 sıralı) tespit edilen endodermis hücreleri ise 5.58-15.12  $\mu\text{m}$  ölçülerinde olduğu tespit edilmiştir. İletim demetlerinden floem tabakası 13.75-33.48  $\mu\text{m}$  boyutlarında iken floem hücrelerinin 2.09 – 9.33  $\mu\text{m}$  çaplarında olduğu tespit edilmiştir. Trake çapları 4.80 – 20.72  $\mu\text{m}$  ile çok değişik boyutlarda olduğu gözlenmiştir. En küçük trake çaplarına subsp. *ayvalikensis* (4.80  $\mu\text{m}$ )' de rastlanırken en büyük trake çapları ise (20.72  $\mu\text{m}$ ) subsp. *coerulescens*' te görülmüştür. Öz bölgesi her 3 taksonda da gövdenin en geniş yer kaplayan kısmını oluşturmaktadır. Bu bölgeyi oluşturan hücrelerin çapları da gövdedeki en büyük hücre çaplarını oluşturmaktadır. En küçük öz hücresi 6.85  $\mu\text{m}$  ile subsp. *coerulescens* taksonunda görülürken; en büyük öz hücre çapı da (67.24  $\mu\text{m}$ ) aynı taksonda gözlenmiştir. Gövdedeki iletim demet sayıları ise 9-17 arasında değişmektedir. En az iletim demet sayısı (9 demet) subsp. *coerulescens*'te iken en fazla demet sayısı (17 demet) subsp. *kemerensis*' te sayılmıştır.

Her 3 taksonun yaprak biyometrik ölçümleri; mezofil tabakası ve orta damarı oluşturan hücreler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Mezofil tabakasının genişliği en küçük subsp. *coerulescens* (162 µm) taksonunda en büyük ise subsp. *ayvalikensis* (306 µm) taksonunda görülmüştür. Kütikula tüm taksonlarda çok ince ve 0.16 – 1.67 µm ölçülerindedir. Yaprak üst ve alt epidermis hücrelerinin ölçümlerine göre üst epidermis hücrelerinin (23.44 – 51.64 µm) alt epidermis hücrelerine göre (11.48 – 28.63 µm) daha büyük boyutlarda olduğu ortaya konulmuştur. Palizat tabakasını oluşturan hücrelerin uzunluğu genişliğinin en az 5 katı boyutlarında olup uzun silindirik şeklinde görülmektedir. Palizat hücre genişlikleri 5.13 – 19.27 µm arasında iken; palizat hücre uzunlukları 27.9 – 56.5 µm aralıklarında değişkenlik göstermektedir. Sünger parankimasının hücreleri yuvarlak şekillerde ya da bazen parçalanmış görülmektedir. Hücrelerin genişlik (16.1 – 35.4 µm) ve uzunlukları (10.51 – 41.3 µm) hemen hemen benzer boyutlarda olduğu görülmüştür. Yaprak orta damarında parankima hücreleri ve iletim demetleri ölçülmüştür. Subsp. *coerulescens*' in (11.03 – 14.71 µm genişlik ve 5.51 – 11.26 µm uzunluk) parankima hücreleri subsp. *kemerensis* (25.68 – 46.3 µm genişlik ve 20.65 – 39.42 µm uzunluk) ve subsp. *ayvalikensis*' ten (18.8 – 44.4 µm genişlik ve 12.39 – 40.28 µm) oldukça küçük olduğu belirlenmiştir. Floem hücreleri ise en küçük subsp. *coerulescens* (1.95 µm)' te ölçülürken en büyük subsp. *kemerensis*'te (12.5 µm) ölçülmüştür. Taksonların trake çapları gövde trake çaplarına göre çok küçük olduğu tespit edilmiştir (4.02 – 14.92 µm).

Taksonların petiyol üzerindeki biyometrik ölçümleri; abaksiyal, adaksiyal epidermis hücreleri, parankima hücresi ve trake hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Abaksiyal hücreler (10.08 – 32.6 µm genişlik ve 9.21 – 33.72 µm uzunluk), adaksiyal hücrelere göre (14.68 – 34.5 µm genişlik ve 11.86 – 35.2 µm uzunluk) daha küçük ölçülerde olduğu tespit edilmiştir. Petiyol enine kesitlerinde en fazla alanı kaplayan kısmı teşkil eden parankima hücreleri yuvarlak şekillerde ve genellikle boyu enine eşit hücreler olarak gözlenmiştir (17.7 – 44.8 µm genişlik ve 13.17 – 45.12 µm uzunluk). Trake çapları tüm taksonlarda birbirine çok yakın ölçülerde olduğu gözlenmiştir. En küçük trake çapı subsp. *coerulescens* (3.24 µm) taksonunda ölçülürken en büyük trake çapı subsp. *ayvalikensis* (8.18 µm) taksonunda ölçülmüştür.

**Tablo 3.4:** *Trigonella coerulescens* subsp. *coerulescens* taksonu üzerinde biyometrik ölçümler

	Genişlik (µm)			Uzunluk (µm)			
	Min.	Max.	Ortalama ± SS	Min.	Max.	Ortalama ± SS	
<b>GÖVDE</b>							
Kütikula	0,77	3,5	2,05 ± 0,89	-	-	-	
Epidermis hücresi	6,07	14,94	9,59 ± 2,33	8,71	16,03	12,97 ± 2,21	
*Korteks tabakası	32,45	53,1	37,99 ± 9,65	-	-	-	
Kollenkima hücre çapı	8,46	18,38	13,89 ± 2,58	-	-	-	
*Kollenkima tabaka genişliği	9,02	16,18	11,43 ± 2,04	-	-	-	
**Kollenkima tabaka genişliği	25,82	36,9	31,84 ± 4,91	-	-	-	
Parankima hücresi	9,14	18,2	14,74 ± 2,44	35,8	49,45	39,5 ± 10,44	
Endodermis hücresi	6,22	14,59	8,89 ± 2,52	7,39	20,81	13,96 ± 3,50	
Floem tabakası	15,87	26,77	20,91 ± 2,92	-	-	-	
Floem hücresi çapı	2,62	9,33	5,58 ± 2,32	-	-	-	
Trake hücre çapı	6,85	20,72	13,56 ± 3,95	-	-	-	
Öz hücre çapı	6,85	67,24	29,41 ± 20,19	-	-	-	
İletim demet sayısı	9	13	11 ± 1,69	-	-	-	
<b>YAPRAK</b>							
Mezofil	Kütikula	0,16	0,48	0,32 ± 0,12	-	-	-
	Üst epidermis hücresi	30,04	51,64	42,54 ± 7,16	17,37	30,98	24,56 ± 5,25
	Alt epidermis hücresi	12,67	28,63	16,95 ± 5,10	11,26	17,37	14,55 ± 2,19
	Mesofil tabakası	162,24	278,37	194,68 ± 35,007	-	-	-
	Palizat parankiması	3,84	9,14	6,77 ± 1,85	4,57	22,25	14,59 ± 4,40
	Sünger parankiması	17,9	33,33	22,31 ± 9,31	10,51	41,31	18,56 ± 8,76
Orta Damar	Parankima hücresi	11,03	14,71	12,41 ± 1,48	5,51	11,26	8,19 ± 1,92
	Floem hücre çapı	1,95	3,79	2,54 ± 0,53	-	-	-
	Trake hücre çapı	4,02	6,89	5,45 ± 0,95	-	-	-
<b>PETİYOL</b>							
Abaksiyal hücre	15,12	32,6	22,6 ± 7,74	19,52	33,72	29,4 ± 2,67	
Adaksiyal hücre	19,6	34,5	29,03 ± 3,93	18,82	35,29	26,22 ± 5,79	
Parankima hücresi	17,17	31,7	24,72 ± 6,91	13,17	30,23	20,22 ± 8,64	
Trake hücre çapı	3,24	5,71	4,69 ± 0,71	-	-	-	

\*Köşe aralarındaki kollenkima tabakası ; \*\* Köşelerdeki kollenkima tabakası

**Tablo 3.5:** *Trigonella coerulescens* subsp. *kemeresis* taksonu üzerinde biyometrik ölçümler

	Genişlik (µm)			Uzunluk (µm)			
	Min.	Max.	Ortalama ± SS	Min.	Max.	Ortalama ± SS	
<b>GÖVDE</b>							
Kütikula	1,093	2,85	2,3 ± 0,45	-	-	-	
Epidermis hücresi	5,84	10,76	8,78 ± 2,83	5,61	11,92	9,15 ± 1,08	
*Korteks tabakası	39,67	67,93	48,38 ± 19,28	-	-	-	
Kollenkima hücre çapı	3,38	10,53	6,86 ± 2,07	-	-	-	
*Kollenkima tabaka genişliği	7,61	14,42	10,82 ± 2,51	-	-	-	
**Kollenkima tabaka genişliği	21,5	27,52	24,72 ± 3,93	-	-	-	
Parankima hücresi	9,76	25,62	18,83 ± 5,45	13,48	55,81	34,01 ± 12,2	
Endodermis hücresi	5,58	14,26	8,49 ± 2,63	13,33	27,16	17,79 ± 4,21	
Floem tabakası	16,26	33,48	25,13 ± 6,03	-	-	-	
Floem hücre çapı	2,09	7,44	4,22 ± 1,52	-	-	-	
Trake hücre çapı	5,97	11,78	8,31 ± 2,06	-	-	-	
Öz hücre çapı	12,65	44,65	26,09 ± 8,68	-	-	-	
İletim demeti sayısı	13	17	15 ± 1,69	-	-	-	
<b>YAPRAK</b>							
Mezofil	Kütikula	0,23	1,67	0,79 ± 0,53	-	-	-
	Üst epidermis hücresi	23,44	37,32	28,7 ± 4,6	18,18	24,88	22 ± 2,44
	Alt epidermis hücresi	11,48	14,83	12,91 ± 1,11	8,61	11,96	10,38 ± 1,05
	Mesofil tabakası	216,4	295,4	246,11 ± 33,36	-	-	-
	Palizat parankiması	9,63	19,27	15,61 ± 4,13	29,2	56,5	40,12 ± 13,87
	Sünger parankiması	19,15	35,44	30,24 ± 5,77	14,36	32,72	21,63 ± 9,35
Orta damar	Parankima hücresi	25,68	46,35	34,007 ± 9,32	20,65	39,42	30,82 ± 7,98
	Floem hücre çapı	6,25	12,51	9,35 ± 2,05	-	-	-
	Trake hücre çapı	11,55	14,92	13,92 ± 1,06	-	-	-
<b>PETİYOL</b>							
Abaksiyal hücre	12,19	22,85	16,23 ± 3,14	19,85	31,28	25,36 ± 5,13	
Adaksiyal hücre	21,33	31,23	27,61 ± 3,25	19,8	31,23	26,07 ± 3,38	
Parankima hücresi	25,6	44,8	69,06 ± 18,16	28,95	45,12	37,54 ± 8,51	
Trake hücre çapı	3,7	8,18	6,09 ± 1,45	-	-	-	

\*Köşe aralarındaki kollenkima tabakası ; \*\* Köşelerdeki kollenkima tabakası

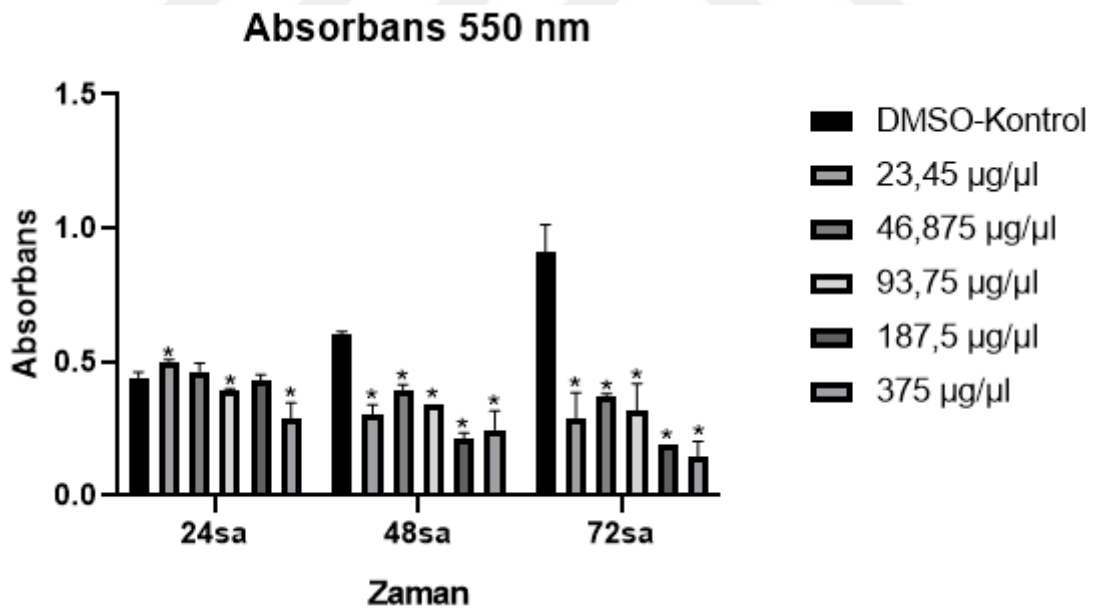
**Tablo 3.6:** *Trigonella coerulescens* subsp. *ayvalikensis* taksonu üzerinde biyometrik ölçümler

	Genişlik (µm)			Uzunluk (µm)			
	Min.	Max.	Ortalama ± SS	Min.	Max.	Ortalama ± SS	
<b>GÖVDE</b>							
Kütikula	1,99	4,79	3,35 ± 0,82	-	-	-	
Epidermis hücresi	14,6	25,99	19,88 ± 3,43	19,3	35,15	27,62 ± 4,05	
*Korteks tabakası	47,15	76,13	58 ± 10,04	-	-	-	
Parankima hücresi	23,43	49,22	34,88 ± 8,40	14,62	25,12	21,85 ± 3,43	
Endodermis hücresi	10,29	17,4	13,13 ± 2,31	4,51	7,51	6,50 ± 0,81	
Floem tabakası	13,75	20,64	17,84 ± 2,31	-	-	-	
Floem hücre çapı	2,78	6,88	4,41 ± 1,22	-	-	-	
Trake hücre çapı	2,80	12,36	7,77 ± 3,005	-	-	-	
Öz hücre çapı	13,43	50,8	37,51 ± 11,69	-	-	-	
Kollenkima hücre çapı	16,16	25,49	21,22 ± 2,90	-	-	-	
*Kollenkima tabaka genişliği	18,12	26,87	21,93 ± 2,93	-	-	-	
**Kollenkima tabaka genişliği	95,02	228,7	181,02 ± 41,13	-	-	-	
İletim demeti sayısı	12	16	14 ± 1,69	-	-	-	
<b>YAPRAK</b>							
Mezofil	Kütikula	0,15	0,65	0,37 ± 0,16	-	-	-
	Üst epidermis hücresi	23,47	36,61	29,008±4,9	17,84	22,06	19,79 ± 1,52
	Alt epidermis hücresi	12,67	15,96	14,75 ± 1,2	10,32	15,49	13,54 ± 1,88
	Mesofil tabakası	292	351,6	318,25 ± 21,22	-	-	-
	Palizat parankiması	5,13	14,24	8,40 ± 2,82	11,2	33,03	17,24 ± 5,32
	Sünger parankiması	16,12	35,32	28,66 ± 5,76	18,6	53,33	31,91 ± 9,39
Orta damar	Parankima hücresi	18,3	44,44	30,94 ± 7,66	9,39	29,28	17,58 ± 5,28
	Floem hücre çapı	3,26	6,53	5,22 ± 1,17	-	-	-
	Trake hücre çapı	4,71	9,66	7,36 ± 2,04	-	-	-
<b>PETİYOL</b>							
Abaksiyal hücre	10,08	20,61	13,71 ± 2,89	9,21	16,22	12,84 ± 1,89	
Adaksiyal hücre	14,68	25,42	18,71 ± 3,5	11,86	20,33	15,97 ± 2,74	
Parankima hücresi	41,44	83,55	61,65 ± 14,78	17,1	55,92	35,47 ± 10,6	
Trake hücre çapı	3,68	6,6	4,9 ± 1,04	-	-	-	

\*Köşe aralarındaki kollenkima tabakası ; \*\* Köşelerdeki kollenkima tabakası

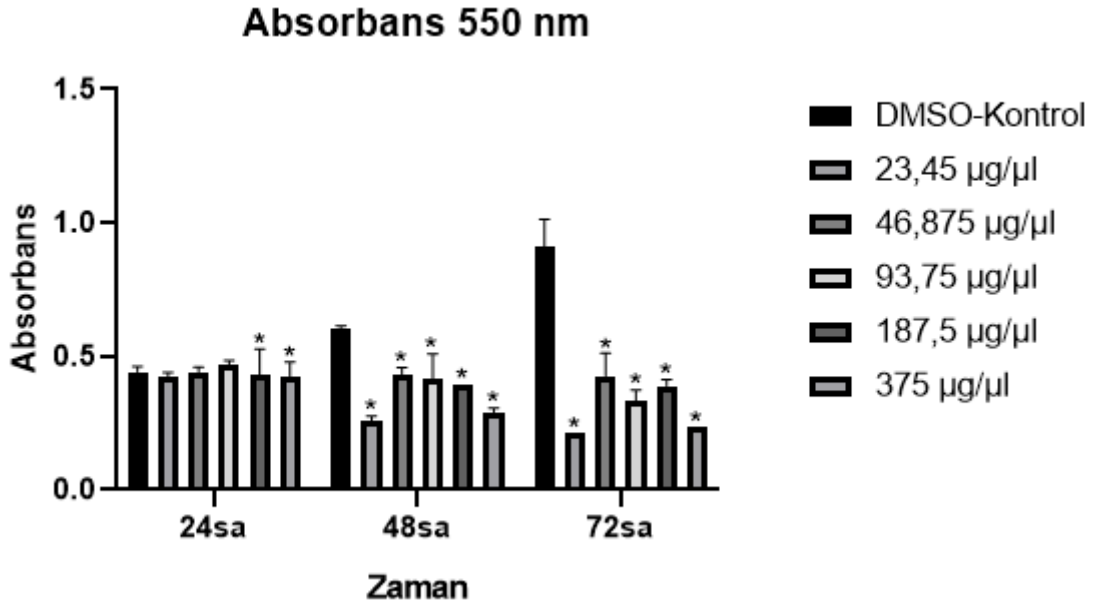
### 3.4 MTT Analizi

Hücreler, kültür ortamında bölüm 2.2.4.2 ve 2.2.4.3' de anlatıldığı gibi çoğaltılmıştır. Deney öncesi gün hücre sayımı yapıldıktan sonra bölüm 2.2.4.6'da anlatıldığı şekilde 96 kuyucuklu plakalara her kuyuda 5000-15000 (hücre hattına göre değişkenlik göstermektedir, HUVEC için 5000, PC3 için 10000, SW480 için 5000) hücre olacak şekilde paylaştırılmıştır. Farklı çözücülerle (saf su, hekzan, metanol, etanol, aseton) hazırlanan ekstratlar farklı dozlarda (Metanol, Etanol, Hekzan, Aseton için: 325 µg/µl - 187,5 µg/µl - 93,75 µg/µl - 46,875 µg/µl - 23,45 µg/µl ; Saf su için: 250 µg/µl - 125 µg/µl - 62,5 µg/µl - 31,25 µg/µl - 15,62 µg/µl ) hücrelere üç tekrarlı olarak uygulanmıştır. HUVEC hücre hattı kontrol grubu olarak kullanılarak, PC-3 ve SW480 hücre hatları ile karşılaştırılmıştır. 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sürelerinden sonra, son konsantrasyonun 0.5 mg/mL şeklinde her bir kuyuya stok MTT çözeltisi eklenip, 37 °C'de 4 saat süreyle, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör cihazında inkübasyon işlemine tabii tutulmuştur. 4 saat sonunda medyum ortamı uzaklaştırılıp, 0.004 M HCl içeriği olan izopropanolle birlikte kristaller çözülerek, spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda absorbans alınmıştır. Sonuçlar GraphPad Prism 8 programı kullanılıp grafiklendirilmiştir.



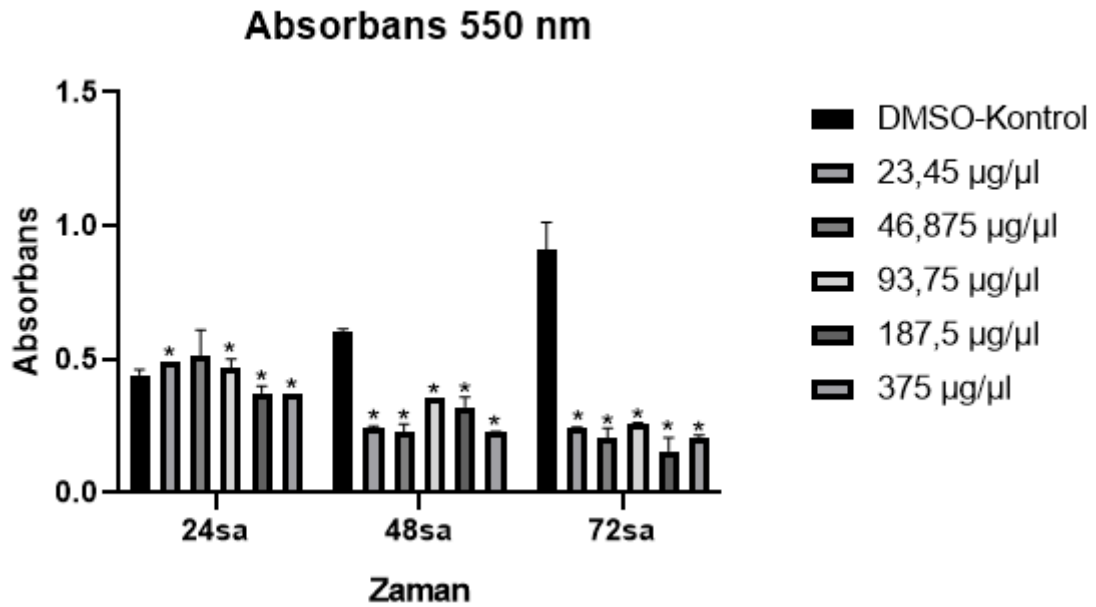
**Şekil 3.23:** Metanol ile hazırlanmış ekstraktın PC-3 hücre hattına ait sitotoksosite grafiği.

PC-3'de *Trigonella coerulea* subsp. *ayvalikensis* taksonunun metanol ekstraktında kontrol gruplarına kıyasla 24. saatte uygulanan 23,24 µg/µl dozunda arttırıcı etki gözlemlenirken, 24. Saatin artan dozlarında ayrıca 48. ve 72. saatlerde uygulanan tüm dozlarda azaltıcı bir etki gözlemlenmiştir (p<0,05 \* anlamlı kabul edilmiştir; Şekil 3.23).



**Şekil 3.24:** Etanol ile hazırlanmış ekstraktın PC-3 hücre hattına ait sitotoksosite grafiği.

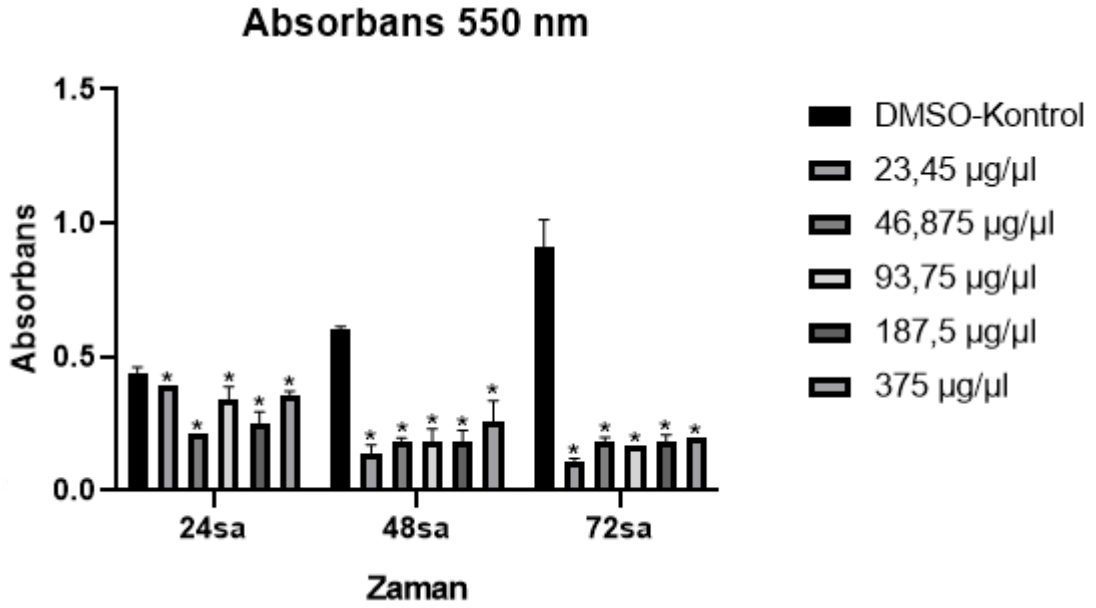
PC-3'de *T. coerulea* subsp. *ayvalikensis* taksonunun etanol ekstraktında 24. saatte uygulanan 187,5 µg/µl ve 375 µg/µl dozlarında; 48. ve 72. saatte uygulanan tüm dozlarda kontrol grubuna kıyasla azaltıcı etki gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$  \* anlamlı kabul edilmiştir; Şekil 3.24).



**Şekil 3.25:** Aseton ile hazırlanmış ekstraktın PC-3 hücre hattına ait sitotoksosite grafiği.

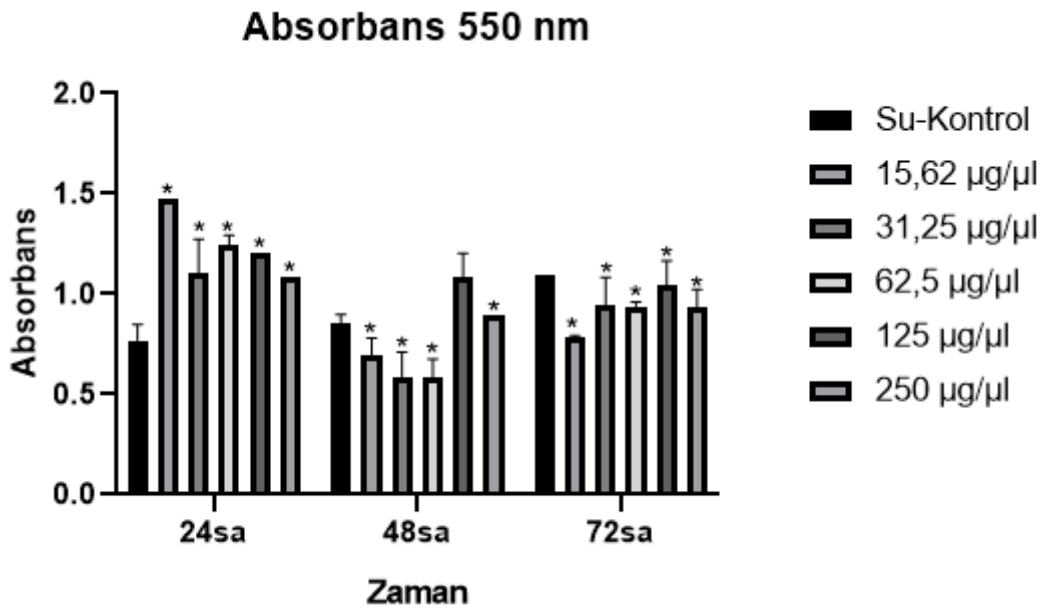
PC-3'de *T. coerulea* subsp. *ayvalikensis* taksonunun aseton ekstraktında 24. saatte uygulanan 23,45 µg/µl ve 93,75 µg/µl dozlarında kontrol grubuna kıyasla arttırıcı etki

gözlemlenirken, 48. ve 72. saatlerde uygulanan tüm dozlarda kontrol grubuna kıyasla azaltıcı bir etki gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$  \* anlamlı kabul edilmiştir; Şekil 3.25).



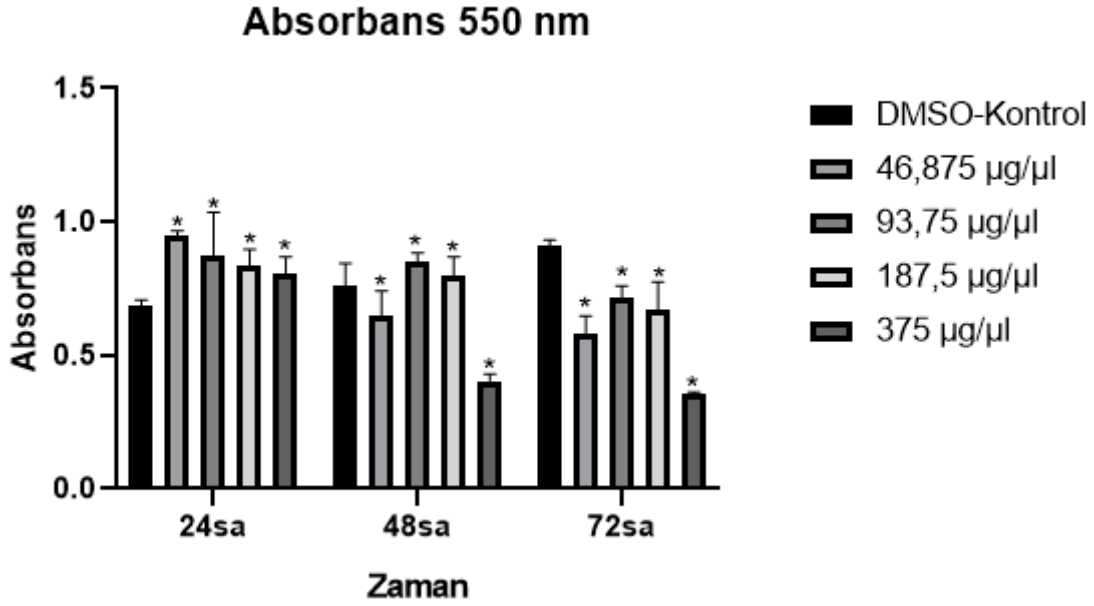
Şekil 3.26: Hekzan ile hazırlanmış ekstraktın PC-3 hücre hattına ait sitotoksosite grafiği.

PC-3’de *T. coerulea* subsp. *ayvalikensis* taksonunun hekzan ekstraktında uygulanan tüm dozlarda kontrol grubuna kıyasla azaltıcı bir etki gözlemlenmiştir. PC-3 hücre hattına uygulanan ekstraktlar arasında kontrol grubuna kıyasla en azaltıcı etkiyi gösteren hekzan ekstraktı olduğu gözlemlenmiştir. ( $p < 0,05$  \* anlamlı kabul edilmiştir; Şekil 3.26 ).



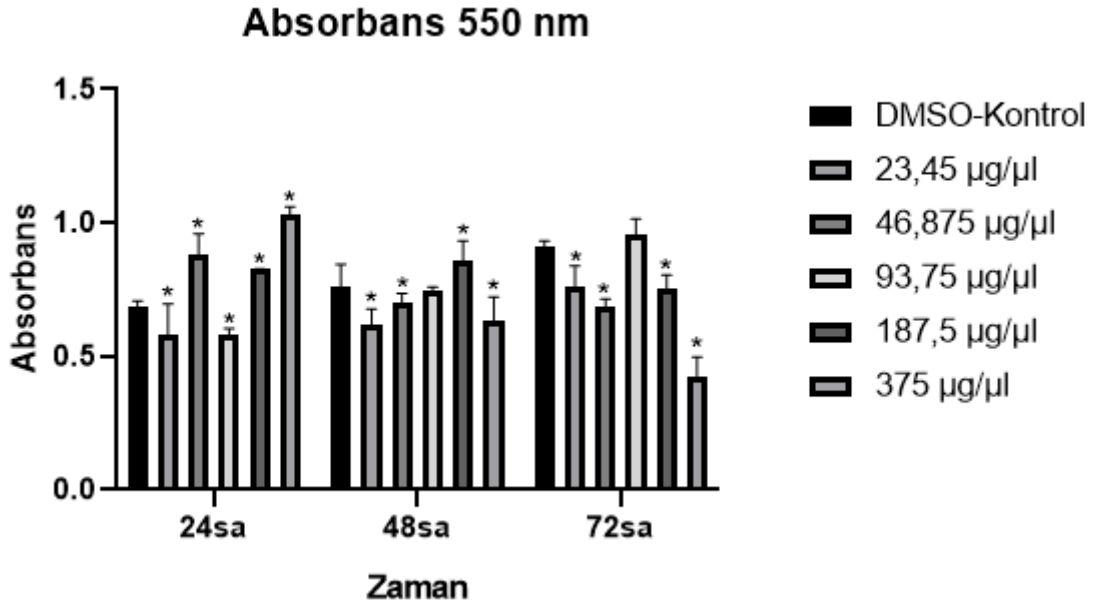
Şekil 3.27: Saf su ile hazırlanmış ekstraktın PC-3 hücre hattına ait sitotoksosite grafiği.

PC-3'de *T. coerulea* subsp. *ayvalikensis* taksonunun saf su ekstraktında 24. saatte uygulanan tüm dozlarında ve 48. saatte uygulanan 125 µg/µl ve 250 µg/µl dozlarında kontrol grubuna kıyasla artırıcı etki gözlemlenirken; uygulanan diğer dozlarda kontrol gruplarına kıyasla azaltıcı bir etki gözlemlenmiştir (p<0,05 \* anlamlı kabul edilmiştir; Şekil 3.27).

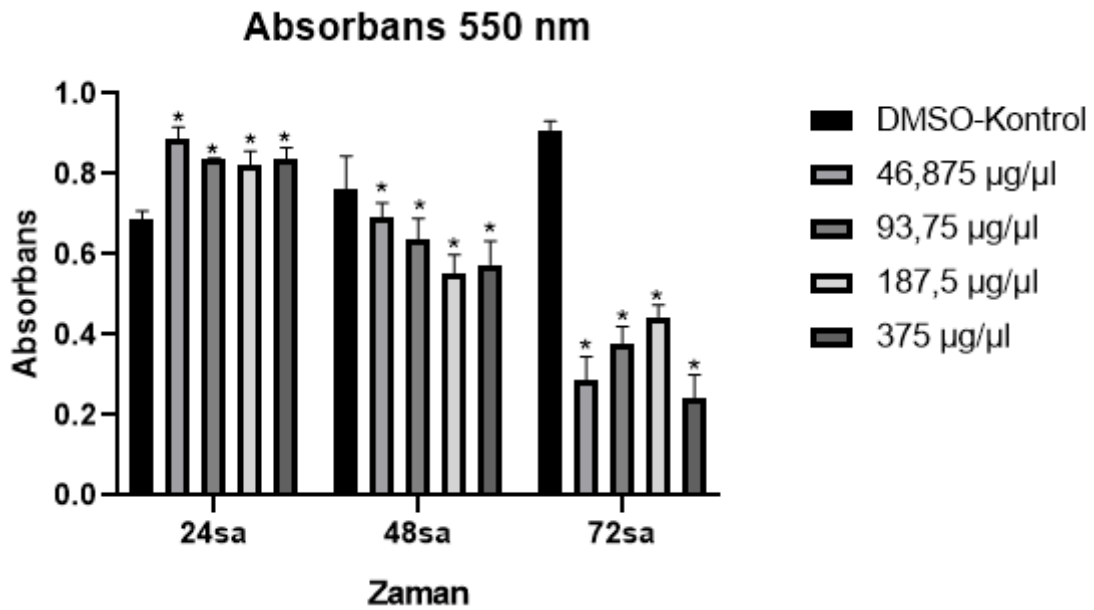


**Şekil 3.28:** Metanol ile hazırlanmış ekstraktın SW480 hücre hattına ait sitotoksosite grafiği.

SW480'de *T. coerulea* subsp. *ayvalikensis* taksonunun metanol ekstraktında 48. Saatte uygulanan 46,875 µg/µl ve 375 µg/µl dozlarında; 72. saatin tüm dozlarında kontrol grubuna kıyasla azaltıcı etki gözlemlenirken, diğer uygulanan dozlarda kontrol grubuna kıyasla artırıcı etki gözlemlenmiştir (p<0,05 \* anlamlı kabul edilmiştir; Şekil 3.28).

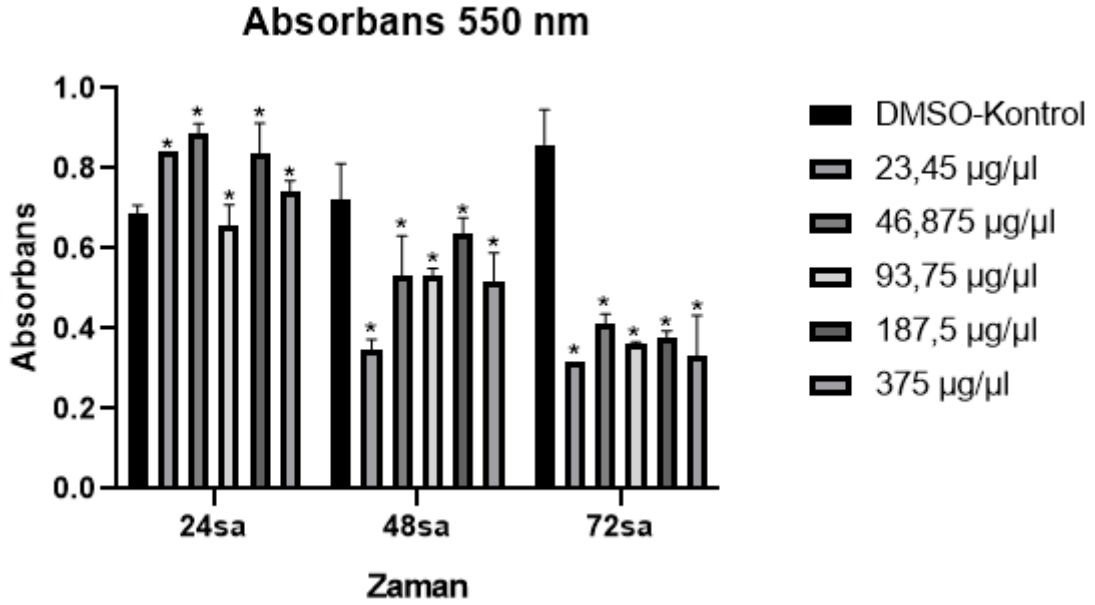


**Şekil 3.29:** Etanol ile hazırlanmış ekstraktın SW480 hücre hattına ait sitotoksisite grafiği SW480’de *T. coerulea* subsp. *ayvalikensis* taksonunun etanol ekstraktında 24. saatte uygulanan 46,875 µg/µl, 187,5 µg/µl ve 375 µg/µl, dozlarında; 48. saatte uygulanan 187,5 µg/µl dozunda kontrol grubuna kıyasla arttırıcı etki gözlemlenirken, 24. saatte uygulanan 23,45 µg/µl ve 93,75 µg/µl dozlarında; 48. saatte uygulanan 23,45 µg/µl, 46,875 µg/µl ve 375 µg/µl dozlarında; 72 saatte uygulanan 23,45 µg/µl, 46,875 µg/µl, 187,5 µg/µl ve 375 µg/µl dozlarında kontrol gruplarına kıyasla azaltıcı bir etki gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$  \* anlamlı kabul edilmiştir; Şekil 3.29).



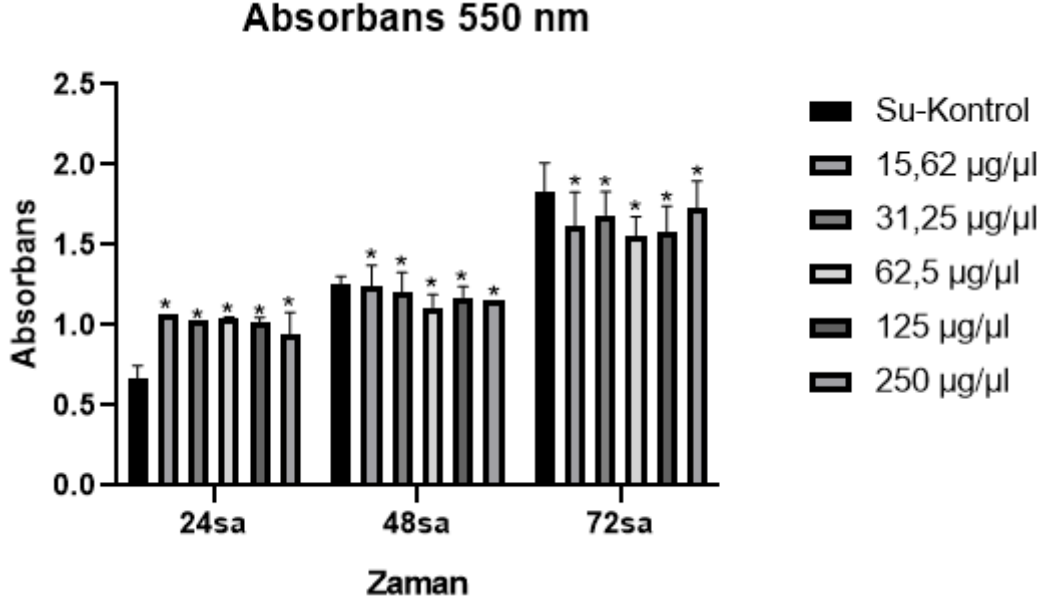
**Şekil 3.30:** Aseton ile hazırlanmış ekstraktın SW480 hücre hattına ait sitotoksisite grafiği.

SW480'de *T. coerulea* subsp. *ayvalikensis* taksonunun aseton ekstraktında 24. saatte uygulanan tüm dozlarında kontrol grubuna kıyasla arttırıcı etki gözlemlenirken, 48. ve 72. saatte uygulanan tüm dozlarda kontrol grubuna kıyasla azaltıcı bir etki gözlemlenmiştir ( $p<0,05$  \* anlamlı kabul edilmiştir; Şekil 3.30).



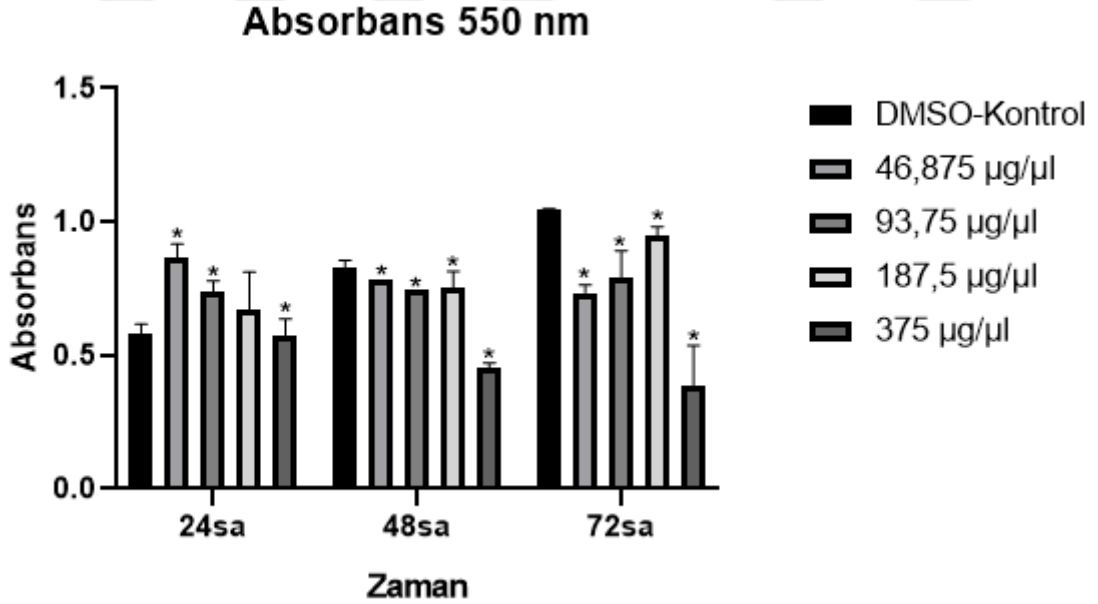
**Şekil 3.31:** Hekzan ile hazırlanmış ekstraktın SW480 hücre hattına ait sitotoksosite grafiği.

SW480'de *T. coerulea* subsp. *ayvalikensis* taksonunun hekzan ekstraktında 24. Saatte uygulanan 23,45 µg/µl, 46,875 µg/µl, 187,5 µg/µl ve 375 µg/µl dozlarında kontrol grubuna kıyasla arttırıcı etki gözlemlenirken, diğer tüm dozlarda kontrol gruplarına kıyasla azaltıcı bir etki gözlemlenmiştir. SW480 hücre hattına uygulanan ekstraktlar arasında kontrol grubuna kıyasla en azaltıcı etkiyi gösteren hekzan ekstraktı olduğu gözlemlenmiştir ( $p<0,05$  \* anlamlı kabul edilmiştir; Şekil 3.31).



**Şekil 3.32:** Saf su ile hazırlanmış ekstraktın SW480 hücre hattına ait sitotoksosite grafiği.

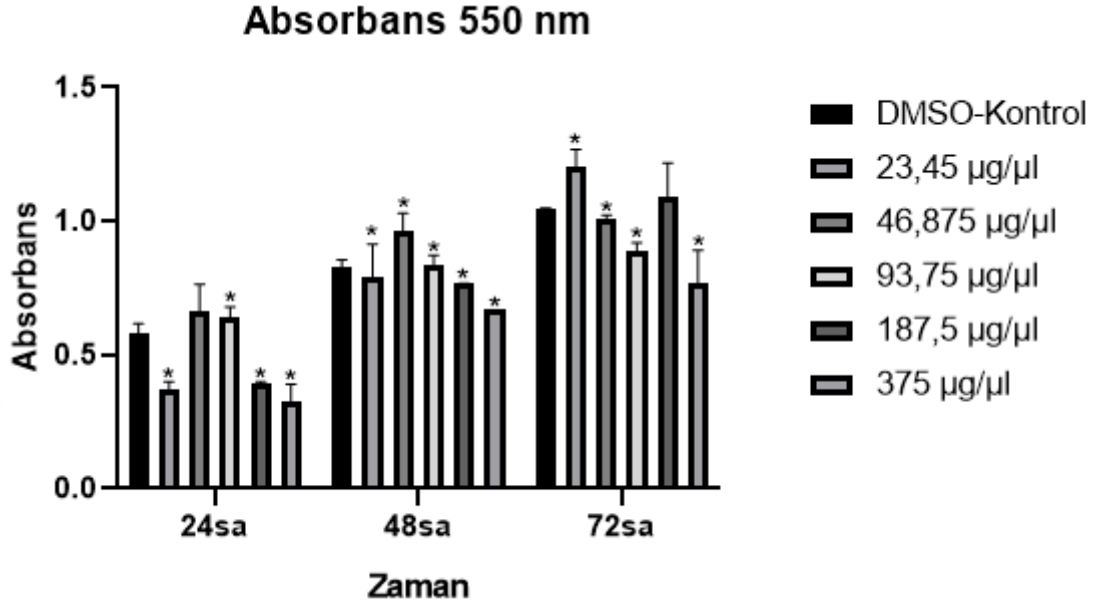
SW480’de *T. coerulea* subsp. *ayvalikensis* taksonunun saf su ekstraktında 24. Saatte uygulanan tüm dozlarda kontrol grubuna kıyasla arttırıcı etki gözlemlenirken, diğer uygulanan tüm dozlarda kontrol gruplarına kıyasla azaltıcı bir etki gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$  \* anlamlı kabul edilmiştir; Şekil 3.32).



**Şekil 3.33:** Metanol ile hazırlanmış ekstraktın HUVEC hücre hattına ait sitotoksosite grafiği.

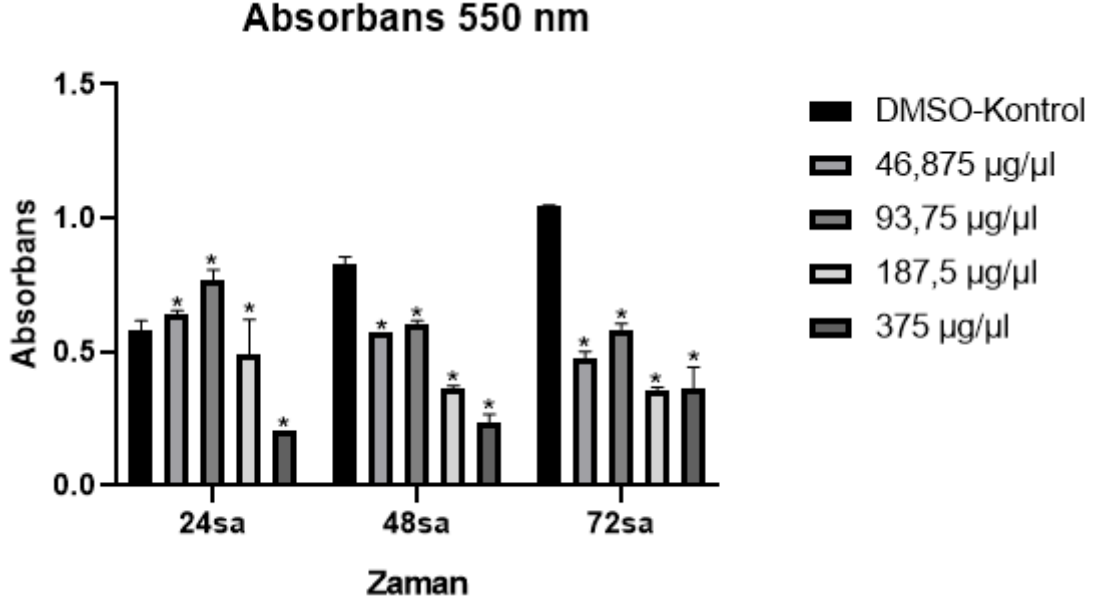
HUVEC’de *T. coerulea* subsp. *ayvalikensis* taksonunun metanol ekstraktında 24. saatte uygulanan 46,875 µg/µl ve 93,75 µg/µl dozlarında kontrol grubuna kıyasla arttırıcı etki

gözlemlenirken, 48. ve 72. saatte uygulanan tüm dozlarda kontrol gruplarına kıyasla azaltıcı bir etki gözlemlenmiştir (  $p < 0,05$  \* anlamlı kabul edilmiştir; Şekil 3.33).



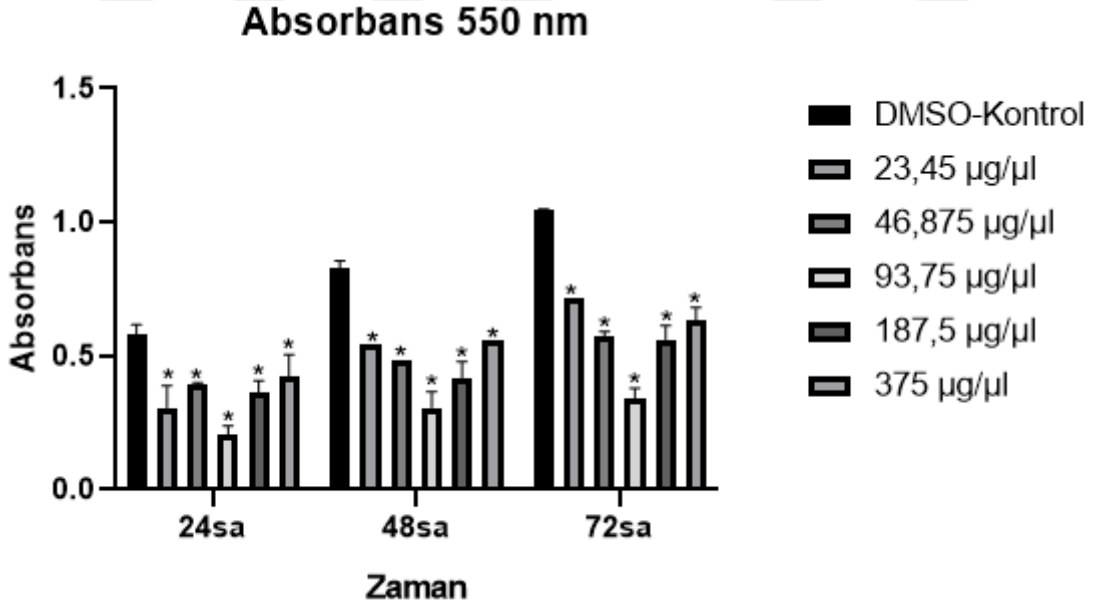
**Şekil 3.34:** Etanol ile hazırlanmış ekstraktın HUVEC hücre hattına ait sitotoksosite grafiği.

HUVEC’de *T. coerulea* subsp. *ayvalikensis* taksonunun etanol ekstraktında 24. saatte uygulanan 93,75 µg/µl dozunda; 48. saatte uygulanan 46,875 µg/µl dozunda; 72. saatte uygulanan 23,45 µg/µl dozunda kontrol gruplarına kıyasla arttırıcı bir etki gözlemlenirken, 24. saatte uygulanan 23,45 µg/µl, 187,5 µg/µl ve 375 µg/µl dozlarında; 48. saatte uygulanan 23,45 µg/µl, 93,75 µg/µl, 187,5 µg/µl ve 375 µg/µl dozlarında; 72 saatte uygulanan 46,875 µg/µl, 93,75 µg/µl ve 375 µg/µl dozlarında kontrol gruplarına kıyasla azaltıcı bir etki gözlemlenmiştir (  $p < 0,05$  \* anlamlı kabul edilmiştir; Şekil 3.34).



**Şekil 3.35:** Aseton ile hazırlanmış ekstraktın HUVEC hücre hattına ait sitotoksosite grafiği.

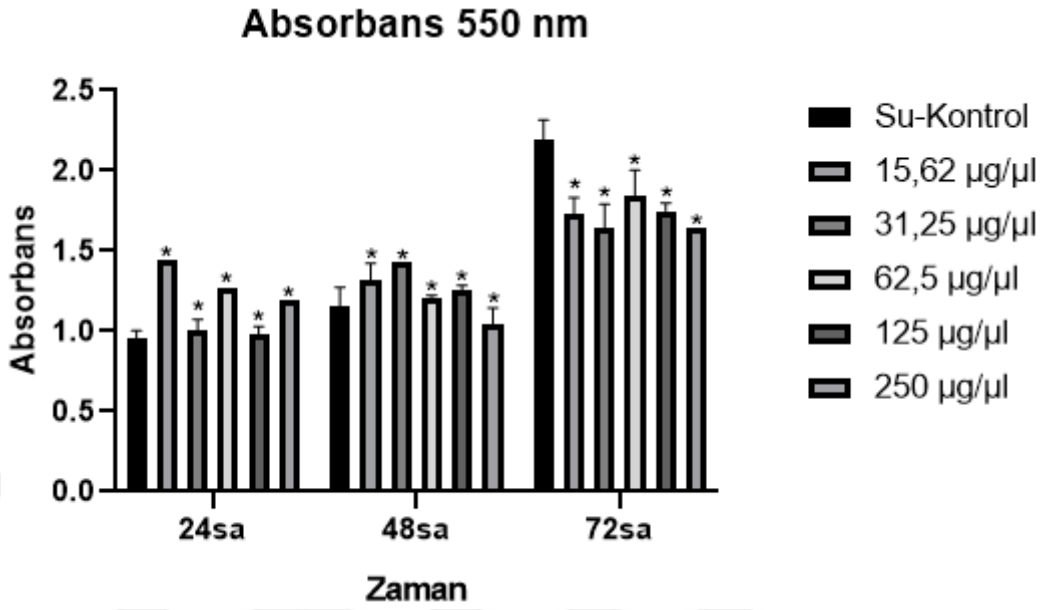
HUVEC’de *T. coerulea* subsp. *ayvalikensis* taksonunun aseton ekstraktında 24. saatte uygulanan 46,875 µg/µl ve 93,75 µg/µl dozlarında kontrol grubuna kıyasla azaltıcı bir etki gözlemlenirken, diğer tüm dozlarda kontrol gruplarına kıyasla azaltıcı bir etki gözlemlenmiştir (  $p < 0,05$  \* anlamlı kabul edilmiştir; Şekil 3.35).



**Şekil 3.36:** Hekzan ile hazırlanmış ekstraktın HUVEC hücre hattına ait sitotoksosite grafiği.

HUVEC’de *T. coerulea* subsp. *ayvalikensis* taksonunun hekzan ekstraktında uygulanan tüm dozlarda kontrol gruplarına kıyasla azaltıcı bir etki gözlemlenmiştir. HUVEC hücre

hattına uygulanan ekstraktlar arasında kontrol grubuna kıyasla en azaltıcı etkiyi gösteren hekzan ekstraktı olduğu gözlemlenmiştir (  $p<0,05$  \* anlamlı kabul edilmiştir; Şekil 3.36).



**Şekil 3.37:** Saf su ile hazırlanmış ekstraktın HUVEC hücre hattına ait sitotoksosite grafiği.

HUVEC’de *T. coerulea* subsp. *ayvalikensis* taksonunun su ekstraktında 72. Saatte uygulanan tüm dozlarda; 48. Saatte uygulanan 250 µg/µl dozunda kontrol gruplarına kıyasla azaltıcı bir etki gözlemlenirken, diğer tüm dozlarda kontrol gruplarına kıyasla arttırıcı bir etki gözlemlenmiştir (  $p<0,05$  \* anlamlı kabul edilmiştir; Şekil 3.37).

## 4. TARTIŞMA-SONUÇ

### 4.1 Mikromorfolojik ve Anatomik Tartışma

Bu tez çalışmasında, *T. coerulescens* subsp. *ayvalikensis*' in mikromorfolojik ve anatomik özellikleri ilk defa ortaya konulmuştur. Ayrıca; bu taksona morfolojik özellikleri bakımından çok benzer olan 2 alt tür de (*T. coerulescens* subsp. *coerulescens* ve *T. coerulescens* subsp. *kemerensis*) mikromorfolojik ve anatomik yönden incelenmiştir. Taksonlar arasındaki en önemli karakterlerin; polen ornamentasyonu, öz/ gövde oranı ile petiyol damar sayısı ve petiyol şeklinde olduğu görülmüştür.

Mikromorfolojik çalışmalarda; *T. coerulescens* subsp. *ayvalikensis*' in tohum morfolojisi incelendiğinde; tohumların 1.3- 2.1 x 1.2-1.6 µm boyutlarında ve k.rengiden koyu kahverengine doğru değişik renk tonlarında olduğu gözlenmiştir (Şekli 3.21). Tohum yüzey ornamentasyonu ruminat tiptedir. Hilum gizlenmiş, beyaz renkli ve eliptik şekillidir (Tablo 3.1). Subsp. *ayvalikensis* taksonu diğer alttürlerle göre kıyaslandığında subsp *kemerensis* taksonuna daha yakın olduğu görülmektedir. Özellikle her iki taksonun hem tohum ornamentasyonları hem de şekilleri birbirine benzerdir (Tablo 3.1). Şu ana kadar subsp. *ayvalikensis* üzerine yapılmış tohum çalışmasına rastlanmamıştır. Çeter ve ark. (2012); Türkiye'de yetişen 37 *Trigonella* taksonunun karşılaştırmalı tohum morfolojisini araştırmışlardır. Bu taksonlar içerisinde bulunan *T. coerulescens* subsp. *coerulescens* taksonunu da incelemişlerdir. Çalışmada; ilgili taksonun 1.5-2 x 1-1.5 mm boyutlarında, Ovoid şekillerde ve açık kahverenkli olduğu belirtilmiştir. Tohum ornamentasyonunun akuleat-verrukat tipte olduğu ve hilumun beyaz ve eliptik şekilli, 0.12 mm boyutlarında olduğu vurgulanmıştır. Çeter ve ark. (2012)' nin çalışmasından elde edilen morfolojik veriler ile bizim çalışmamızdaki aynı taksonla yapılmış morfolojik çalışmaların benzer veriler içerdiği tespit edilmiştir (Tablo 3.1). Turki ve Abozeid (2015), bazı *Trigonella* türlerinin tohum morfolojisini araştırmışlardır. Çalışmalarında *T. coerulescens* türünü de incelemişlerdir. Bu tür üzerinde elde edilen morfolojik karakterlerde tohumun 0.7-0.8 x 0.6-0.8 mm ölçülerinde, ovoid şekilli, sarı renkli olduğu, hilumun dairesel şekilli ve 0.55-0.61 mm boyutlarında olduğu ifade edilmiştir. Bizim aynı taksonla yapılmış çalışmalarımızda; tohum 1.4-2.2 x 1-1.5 mm boyutlarında, ovoid şekilli ve krenge renkli olduğu görülmüştür. Bu bakımdan boyutların ve tohum renginin farklı olduğu anlaşılmaktadır (Tablo 3.1).

*T. coerulescens* subsp. *ayvalikensis* taksonunun polen morfolojisi ilk defa araştırılmıştır. SEM incelemelerinde; polar eksen ortalama 33.8 µm; ekvatorial eksen ise ortalama 24.1

um olarak hesaplanmıştır. Bu verilere göre P/E oranı 1.4 (prolat) olarak belirlenmiştir. Taksonun apertür tipi trikolporattır. Polen ornamentasyonu ise ekvtoral görünüşte mikroretikulat; polar görünüşte ise psilat-perforat olarak belirlenmiştir (Tablo 3.2, Tablo 3.3). 3 taksonun kalitatif ve kantitatif polen morfolojik yapıları incelendiğinde; subsp. *kemerensis* ve subsp. *ayvalikensis* taksonlarının polen ornamentasyonundaki karakterlere göre birbirine daha yakın olduğu söylenebilmektedir. Subsp. *coerulescens*' in ornamentasyon tipi retipilat (ekvatorial) ve perforat (polar) iken diğer iki taksonun mikroretikulat (ekvatorial) ve psilat-perforat (polar) olduğu görülmüştür. Diğer kalitatif ve kantitatif polen verilerinde ise dikkate değer bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 3.2, Tablo 3.3).

Polen morfolojisi üzerine *Trigonella* taksonları ile ilgili yapılmış en kapsamlı çalışma Pinar ve ark (2004) tarafından yapılmış çalışmadır. Bu çalışmada *T. coerulescens* subsp. *coerulescens*' in polen morfolojisi ve ornamentasyonuna da yer verilmiştir. Bu taksonun polen şekli prolat, P/E oranı 1.45, apertür tipi trikolporat; ornamentasyon ekvatoryal ekseninde retipilate ve polar ekseninde ise perforat olarak verilmiştir. Bizim çalışmamızda yer alan subsp. *coerulescens*' in polen şekli prolat, P/E oranı 1.5, apertür tipi trikolporat; ornamentasyon retipilat (ekvatorial) ve perforat (polar) olarak bulunmuştur (Tablo 3.3). Sonuç olarak çalışmadaki verilerle çok yakın benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Gövde ile ilgili anatomik farklılıklar incelendiğinde türler arasında önemli farklılıklar görülmemiş sadece tabaka sayılarında (kollenkima, korteks, floem) değişiklikler tespit edilmiştir. Ancak, parankimatik öz bölgesinin tüm gövdeye kapladığı yüzdelik oranlarda belirgin ve dikkati çeken farklar tespit edilmiştir. Gövde ile ilgili anatomik karakterlerin karşılaştırılması Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1:** *T. coerulescens* alttürlerinin karşılaştırmalı gövde anatomik karakterleri

Taksonlar	Kollenkima tabakası		Korteks tabakası	Floem tabakası		İletim demet sayısı	Öz/Gövde oranı (%)
	Köşeler	Köşe araları		Köşeler	Köşe araları		
subsp. <i>coerulescens</i>	3-8	1-2	5-7	4-6	2-4	9-13	50-53
subsp. <i>kemerensis</i>	2-3	1-2	3-8	3-5	2-3	13-17	29-34
subsp. <i>ayvalikensis</i>	3-10	1-2	9-14	4-8	2-5	12-16	69-72

*T. coerulescens* subsp. *ayvalikensis*' in yaprak anatomik yapısı Fabaceae familyasının genel karakteristik özelliklerini göstermektedir (Metcalf ve Chalk, 1950). Yapraktan alınan

enine ve yüzeysel kesitlerde taksonlar arasındaki önemli farklılıklara daha çok orta damar bölgesinde rastlanmıştır. Tüm taksonlarda orta damarın adaksiyal yüzeyi düz ve hafif kıvrık (konkav); abaksiyal yüzeyinin ise dışa doğru bombeli ve çıkık (konveks) olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.8, Şekil 3.10, Şekil 3.12). *T. coerulescens* alttürlerinin karşılaştırmalı yaprak anatomik karakterleri Tablo 4.2’ de sunulmuştur. Tablo 4.2’ de görüldüğü gibi taksonlar arasında en önemli farkın sklerenkimatik tabakanın varlığıdır. Sklerenkima hücrelerinin bulunuşu anatomide, taksonlar arasındaki farklılığı ortaya koyan önemli anatomik karakterlerden biridir (Metcalf ve Chalk 1950; Esau, 1962). Bu çalışmada subsp. *kemerensis* taksnunda barizce skleenkimatik hücre ve tabakaya rastlanırken diğer iki taksonda bu yapılar gözlenmemiştir.

**Tablo 4.2:** *T. coerulescens* alttürlerinin karşılaştırmalı yaprak anatomik karakterleri.

Taksonlar	Mezofil Tabakası		Orta Damar Bölgesi			
	Palizat p.	Sünger p.	Kollekima sırası	Parankima	Floem sırası	Sklerenkimatik tabaka
subsp. <i>coerulescens</i>	2	3-5	4-6	2-4	3-5	Gözlenmedi
subsp. <i>kemerensis</i>	2	3-6	3-5	2-5	3-6	Gözlendi
subsp. <i>ayvalikensis</i>	2	3-5	3-5	2-4	2-5	Gözlenmedi

Petiyolden alınan enine ve yüzeysel kesitlerde taksonlar arasındaki önemli farklılıklara vasküler demet sayılarında rastlanmıştır. Tüm taksonların orta bölgesinde 1’ er adet büyük yapıli iletim demeti gözlenmiştir. Ancak kanatlarda iletim demetlerine subsp. *coerulescens* hariç diğer iki taksonda 2 demet ile rastlanmıştır. Bu demetler kanatlarda yer almakta ve orta damara gör oldukça küçük yapılidir (Şekil 3.15 ve Şekil 3.17). Tablo 4.3’te *T. coerulescens* alttürlerinin karşılaştırmalı petiyol anatomik karakterleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

**Tablo 4.3:** *T. coerulescens* alttürlerinin karşılaştırmalı petiyol anatomik karakterleri

Taksonlar	Vasküler demet sayısı		Tabaka sayısı		Sklerenkima tabakası
	Orta Bölge	Kanatlar	Kollenkima	Parankima	
subsp. <i>coerulescens</i>	1	-	1-2	5-9	3-6
subsp. <i>kemerensis</i>	1	1+1	1-2	5-8	2-4
subsp. <i>ayvalikensis</i>	1	1+1	1-2	5-8	2-4

*Trigonella coerulescens* alttürlerinin stomaları; yaprağın her iki yüzeyinde de görülmekte olup alt kısımda daha yoğun şekildedir. Enine kesitteki epiderma hücreleriyle aynı seviyede (mezomorfik stoma) nadiren daha yukarı seviyededirler (higromorfik stoma). Stomalar anomositik tipte düzenlenmiştir. Tablo 4.4'te 3 taksonun karşılaştırmalı bir şekilde stomalarının özellikleri gösterilmiştir. Tablodan da görüleceği gibi stomaların, yaprağın alt yüzeyinde daha yoğun olduğu gözlenmiştir. Üst ve alt epidermiste en fazla stomaya subsp. *ayvalikensis*' te (üst epidermis 122; alt epidermis 227) rastlanmıştır. Taksonların stoma indeks oranları (İO) 0.89-0.95 aralığında yer alıp birbirine oldukça yakın değerlerdedir.

**Tablo 4.4:** *T. coerulescens* alttürlerinin stoma özellikleri.

Taksonlar	Stoma tipi	Üst Epidermis				Alt epidermis				İO
		Sts	Ehs	Sti	Stö (μ)	Sts	Ehs	Sti	Stö (μ)	
subsp. <i>coerulescens</i>	Anomositik	102	371	21.6	22-23	214	660	24.4	21-23	0.89
subsp. <i>kemerensis</i>	Anomositik	103	360	22.2	20-22	155	508	23.3	19-21	0.95
subsp. <i>ayvalikensis</i>	Anomositik	122	409	22.9	20-22	227	723	23.9	19-22	0.95

Kısaltmalar: , Ehs: Epidermis hücre sayısı, Sts: Stoma sayısı, Sto: Stoma indeks oranı, Sti: Stoma indeksi, Stö: Stoma ölçümü, İO: İndeks oranı

## 4.2 Sitotoksik Tartışma

Vücudun herhangi bir yerinde (organ ya da doku) hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalıp büyümesiyle ortaya çıkan hastalıklara kanser denir. Daha sık görülen ve erken teşhis edilmediği zamanlarda ölümlerle sonuçlanan kanser türleri; akciğer, mide, kolon, karaciğer, mide ve meme kanseri şeklinde sıralanmaktadır (World Health Organization, 2021).

Kanser tedavisi ile ilgili birçok araştırmalar yapılmaktadır. Kanserle ilgili yapılan çalışmalardan biri de sitotoksikite deneyleridir. Sitotoksikite çalışmaları *in-vivo* ve *in-vitro* ortamlarda gerçekleştirilebilmektedir. *In-vitro* olarak hücre kültürü ortamlarında yapılmaktadır. Hücre kültürü, çok hücreli organizmalara ait hücrelerin, laboratuvarlarda özel olarak tasarlanmış ortamda, besin, ısı, nem gibi ortam şartlarının kontrol edilerek

kontaminasyondan arındırılarak yaşatılmasıdır. Sitotoksik, hücre ölümüne neden olan anlamında kullanılmaktadır. İncelenen maddenin dozuna ve etki süresine bağlı olarak hücrelere farklı derecelerde zarar veren olaya sitotoksisite denir. Hücreler sitotoksik madde ile etkileşim sonucunda otofaji, apoptoz ve nekroz gibi olaylardan dolayı ölebilir ya da sitostazis durumundan dolayı proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler. Sitotoksik maddeye maruz bırakılan hücrelerin, sonrasında canlılık oranlarının (canlı/ölu hücre miktarı) belirlenmesi yapılan bu sitotoksisite çalışmalarının amacını oluşturmaktadır (Tokur ve Aksoy, 2017).

Sitotoksisite çalışmalarında kullanılan yöntemlerden bir tanesi de MTT metodudur. MTT metodu; sitotoksik analiz, hücre canlılığı ve poliferasyonu için tercih edilen, kantitatif kolorometrik yöntemlerden biridir. Bu metot apoptozun erken evresindeki veya canlı hücrelerin mitokondrileri vasıtasıyla gerçekleştirdiği reaksiyonda, MTT çözeltisindeki tetrazolium halkası canlı hücre mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri tarafından parçalanıp, renkli formazan kristallerini meydana getirir (Tokur ve Aksoy, 2017).

Bu tez çalışmasında *T. coerulescens* subsp. *ayvalikensis*' in sitotoksisite çalışmalarıyla ilgili bilgiler ilk kez ortaya konulmuştur. Literatürde bu bitki ile ilgili sitotoksisite çalışmalarına rastlanmamıştır.

Genel olarak *Trigonella* cinsinin tohum içeriğinin fitokimyasal analizine bakıldığı zaman flavonoid (viteksin, orientin, izoorientin, vicenin-1, vicenin-2, vicenin-3), saponin (yamogenin, tigogenin, diosgenin) ve alkaloid (trigonellin) bileşiklerinin yüksek miktarda bulunduğu tespit edilmiştir (Stefanowicz-Hajduk vd., 2021; Krol-Kogus vd., 2021; Krol-Kogus vd., 2020).

Bu çalışmada *T. coerulescens* subsp. *ayvalikensis*' in tohumlarından farklı çözücülerle (saf su, hekzan, metanol, etanol, aseton) hazırlanan ekstratlar farklı dozlarda (Metanol, Etanol, Hekzan, Aseton için: 325 µg/µl - 187,5 µg/µl - 93,75 µg/µl - 46,875 µg/µl - 23,45 µg/µl ; Saf su için: 250 µg/µl - 125 µg/µl - 62,5 µg/µl - 31,25 µg/µl - 15,62 µg/µl ) hücrelere üç tekrarlı olarak uygulanmıştır. Sağlıklı durumun temsili için HUVEC (İnsan Sağlıklı Endotelial Hücre Hattı) hücre hattı, kanser hücre hatları olarak ise PC-3 (insan prostat kanser hücre hattı) ve SW480 (insan kolon kanser hücre hattı) kullanılmıştır. Uygulamalar 24 sa, 48 sa, 72 sa şeklinde çalışılarak daha sonra spektrofotometre cihazında 550 nm dalga boyunda absorbans alınmıştır. Daha sonra sonuçlar GraphPad Prism 8 programı kullanılıp

grafiklendirilmiştir. Programda One Way Anova ile sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir ( $p < 0,05$  \* anlamlı kabul edilmiştir).

Literatür taramaları sonucunda *Trigonella* L. cinsi ile yapılan sitotoksisite çalışmalarında PC3 ve SW480 hücre hatları ile ilgili herhangi bir çalışmanın yapılmamış olduğu tespit edilmiştir, bundan dolayı tez çalışmasında sitotoksisite deneyleri için bu iki hücre hattı seçilmiştir.

Literatürde *Trigonella* cinsinin tohumlarından elde edilen ekstraktlarla yapılan sitotoksisite çalışmalarında Stefanowicz-Hajduk vd. (2021), SKOV-3, HeLa ve MOLT-4 hücre hatlarında; Thakur ve Ahirwar (2019) A549 (akciğer kanseri) hücre hattında; Abas ve Naguib (2019), MCF-7 ve AsPC-1 hücre hatlarında; Goyal vd. (2018) A431 (deri kanseri) hücre hattında; Al-Dabbagh vd. (2018) HepG2 (insan hepatoselüler kanseri) hücre hattında kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gözlemlenmişlerdir.

Bu tez çalışmasındaki sitotoksisite çalışma sonuçlarına göre ise PC3 hücre hattında *T. coerulescens* subsp. *ayvalikensis* taksonunun saf su ile hazırlanmış ekstraktı hariç diğer dört çözücü ile hazırlanmış tüm ekstraktlarında (metanol, etanol, aseton, hekzan) anlamlı sitotoksik etki saptanmıştır. PC-3'de kontrol gruplarına kıyasla en azaltıcı etkiyi hekzan ekstraktının gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.26). SW480 hücre hattında ise *T. coerulescens* subsp. *ayvalikensis* taksonunun aseton ekstraktında 48. ve 72. saatlerde uygulanan tüm dozlarda kontrol gruplarına kıyasla azaltıcı bir etki gözlemlenmiştir (Şekil 3.30). SW480 hücre hattında kontrol gruplarına kıyasla en azaltıcı etkiyi ise hekzan ekstraktının 48. ve 72. saatte uygulanan dozlarda gösterdiği saptanmıştır (Şekil 3.31). HUVEC hücre hattında ise *T. coerulescens* subsp. *ayvalikensis* taksonunun aseton ekstraktında 48. ve 72. saatlerde uygulanan tüm dozlarda kontrol gruplarına kıyasla azaltıcı bir etki gözlemlenmiştir (Şekil 3.35). HUVEC hücre hattında kontrol gruplarına kıyasla en azaltıcı etkiyi ise hekzan ekstraktının gösterdiği saptanmıştır (Şekil 3.36).

Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler ileride, benzer cins ya da taksonlarla yapılacak sistematik çalışmalara ve kanser çalışmalarına önemli bir kaynak olacağı kanaatindeyiz.

## 5. KAYNAKLAR (APA)

- Abas, A.M. ve Naguib, D.M. (2019). Effect of germination on anticancer activity of *Trigonella foenum* seeds extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18: 101067, doi: 10.1016/j.bcab.2019.101067.
- Ahmed, S.I. , Hayat, M.Q. , Zahid, S. , Tahir, M. , Mansoor, Q. , Ismail, M. , Keck, K. ve Bates, R. (2017). Isolation and identification of flavonoids from anticancer and neuroprotective extracts of *Trigonella foenum graecum*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16 (6), 1391-1398, doi: 10.4314/tjpr.v16i6.25.
- Akan, H., Ekici, M. ve Aytay Z. (2020). The synopsis of the genus *Trigonella* L. (Fabaceae) in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 44, 670-693, doi:10.3906/bot-2004-63.
- Akkemik Ü.(Editör). (2014). *Türkiye'nin Doğal Egzotik Ağaç ve Çalıkları*. I. Orman Genel Müdürlüğü Yayınları. Ankara.
- Al-Dabbagh B. , Elhaty I.A. , Hrouf A.A. , Al Sakkaf R. , El-Awady R. , Ashraf S.S. ve Amin A. (2018). Antioxidant and anticancer activities of *Trigonella foenum-graecum*, *Cassia acutifolia* and *Rhazya stricta*. *BMC Complement Altern Medicine*, 18 (1), 240, doi: 10.1186/s12906-018-2285-7.
- Allaoui, A. , Gascon, S. , Benomar, S. , Quero, J. , Osada, J. , Nasri, M. , Rodriguez-Yoldi, M.J. ve Boualga, A. (2019). Protein Hydrolysates from Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) as Nutraceutical Molecules in Colon Cancer Treatment. *Nutrients*, 11 (4), 724, doi: 10.3390/nu11040724.
- Ashraf, S.A. , Khan, M.A. , Awadelkareem, A.M. , Tajuddin, S. , Ahmad, M.F. ve Hussain, T. (2019). GC-MS Analysis of Commercially Available *Allium sativum* and *Trigonella foenum-graecum* Essential Oils and their Antimicrobial Activities. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13 (4), 2545-2552, doi: 10.22207/JPAM.13.4.69.
- Avcı, M. (1993). Türkiye'nin flora bölgeleri ve Anadolu Diagonalı'ne coğrafi bir yaklaşım. *Türk Coğrafya Dergisi* 28, 225-248. Erişim Adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/tcd/issue/21259/228202> .

- Avcı, M. (2005). Çeşitlilik ve Endemizm Açısından Türkiye'nin Bitki Örtüsü. *Coğrafya Dergisi*, 13, 27-55. Erişim Adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/iucografya/issue/25062/264581>
- Aytaç, Z. ve Kaptaner İğci, B. (Eds.). (2012). *Bitki Sistemagi - Plants Systematics*. ISBN: 978-605-133-350-2. Yayın No: 448.
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S. ve Telci, İ. (Ocak, 2010). Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretimini Arttırılması Olanakları. *TMMOB, Ziraat Mühendisleri Odası 7. Teknik Kongresi*, Volume:1, Ankara.
- Bizimbitkiler (2013). Erişim adresi: <http://www.bizimbitkiler.org.tr> , Erişim Tarihi: 01 Mayıs 2021.
- Bojnansky, W.V. and Fargasova, A. (2007). *Atlas of seed and Fruit of central of East European Flora*. Springer, Germany.
- Brockwell, J., Bottomley, P.J., ve Thies, J.E. (1995). Manipulation of Rhizobia Microflora For Improving Legume Productivity and Soil Fertility: a Critical Assessment. *Plant and Soil*, 174, 143-180, doi:10.1007/bf00032245.
- Corner, E.J.H. (1976). *The Seeds of Dicotyledons*. Volume 2, Cambridge University Press, London, p 156.
- Çeter, T., Pınar, N.M., Akan, H., Ekici, M. and Aytaç, Z (2012). Comparative seed morphology of *Trigonella* L. species (Leguminosae) in Turkey. *African Journal of Agricultural Research*, 7 (3), 509-522, doi: 10.5897/AJAR11.1528.
- Davis, P.H. (1970). Sayfa 1. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Vol.3. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Demir, A. (2013). Sürdürülebilir Gelişmede Yükselen Değer; Biyolojik Çeşitlilik Açısından Türkiye Değerlendirmesi. *İstanbul Ticaret Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 12(24) , 67-74. Erişim Adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/ticaretfbdi/issue/21364/229166> .
- Dénarié, J., Debelle, F., ve Rosenberg, C. (1992). Signalling and Host Range Variation In Nodulation. *Annual Review of Microbiology*, 46, 497-531, doi: 10.1146/annurev.mi.46.100192.002433.

- Dickison, W.C. (2000). *Integrative plant anatomy*. Harcourt Academic, San Diego, p 533.
- Dinu, M., Ancuceanu, R., Radulesca, V., Ilies, D.C., Munteanu, C. ve Arama, C. (2013). A Comparative morphological and chemical study of the seeds from *Trigonella foenum graecum* (L.) and *T. caerulea* (L.) ser. species. *Farmacia*, 61 (6), 1069-1081. Erişim Adresi: [https://www.researchgate.net/publication/259647217\\_A\\_comparative\\_morphological\\_and\\_chemical\\_study\\_of\\_the\\_seeds\\_from\\_trigonella\\_foenum\\_graecum\\_L\\_and\\_t\\_caerulea\\_L\\_ser\\_species](https://www.researchgate.net/publication/259647217_A_comparative_morphological_and_chemical_study_of_the_seeds_from_trigonella_foenum_graecum_L_and_t_caerulea_L_ser_species) .
- Dişli, M. ve Yeşilada E. (2019). Türkiye’de Bitkisel Tıbbi rnler (Türkiye’de Bitkisel rnlerin Standardizasyonu, retimi ve Tağşiş). *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research, GETAT zel Sayı*, 13-21, doi.org/10.34084/bshr.545498.
- Erdoğan, E., Selvi ve S. Tmen G. (2017). *Trigonella coerulescens* subsp. *ayvalikensis* (Fabaceae), a new taxon from Balıkesir, western Anatolia. *Phytotaxa*, 319(2), 167–174, doi.org/10.11646/phytotaxa.319.2.5.
- Erdtman, G. (1969). *Handbook of Palynology*. Haffner Press., New-York.
- Esau, K. (1962). *Plant anatomy*. Fourth Ed. John Wiley and Sons, inc. NewYork, London.
- Faegri, K. and Iversen, J. (1975). *Textbook of Pollen Analysis*. Hafner Press., New-York.
- Fahn, A. (1990). *Plant Anatomy*. Fourty edition, Butterworth, Heinemann Pub. Ltd., Jarusalem, Israel.
- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M. S. (2011). Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik nemi. *Kastomonu University Journal of Forestry Faculty*, 11(1), 52-67. Erişim Adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/kastorman/issue/17236/180072> .
- Ghadri, S. Jafari, A. ve Hamdi, MM. (2014). Comparative morphological, anatomical and palynological studies on *Trigonella* (Fabaceae) In Khorassan Razavı Province (Ne Iran). *Bangladesh J. Bot.* 43 (2), 123-129, doi: 10.3329/bjb.v43i2.21660.
- Goyal, S. , Gupta, N. , Kumar, A. , Chatterjee, S. ve Nimesh, S. (2018). Antibacterial, anticancer and antioxidant potential of silver nanoparticles engineered using

- Trigonella foenum-graecum* seed extract. *IET Nanobiotechnology* , 12 (4), 526-533, doi: 10.1049/iet-nbt.2017.0089.
- Gözen, B. G. (2012). *İstanbul Çevresinin Burçak (Vicia L.) (Seksiyonlar : Ervum ve Cracca) Taksonları Üzerinde Karpolojik Ve Mikromorfolojik Araştırmalar*. (Yüksek Lisans Tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi veri tabanından erişildi (Tez No: 316455).
- Güner A. ve Ekim, T. (Eds). (2014). *Resimli Türkiye Florası, Cilt 1*. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, Türkiye İş Bankası Kültür Yayınları, İstanbul.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. ve Babaç, M. T. (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayınları, İstanbul.
- Habib-Martin, Z.A. , Hammad, H.M., Afifi, F.U. , Zihlif, M. , Al-Ameer, H.J. , Saleh, M.M. , Abaza, I.F. ve Nassar, Z.D. (2017). In vitro and in vivo evaluation of the antiangiogenic activities of *Trigonella foenum-graecum* extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7 (8), 732-738, doi: 10.1016/j.apjtb.2017.07.013.
- Iranmanesh, M., Mohebbati, R. , Forouzanfar, F. , Roshan, M.K. , Ghorbani, A. , Nik, M.J. ve Soukhtanloo, M. (2018). In vivo and In vitro effects of ethanolic extract of *Trigonella foenum-graecum* L. seeds on proliferation, angiogenesis and tube formation of endothelial cells. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13 (4), 343-352, doi: 10.4103/1735-5362.235161.
- Kapp, R.O. (1969). *Pollen and Spores*. W.M., C. Brown Company Publisher, USA.
- Ketenöglü O., Obalı, O., Kurt, L., Güney, K., Tuğ, G. N., Geven, F. vd. (2011). *Ekonomik Bitkiler*. Palme yayıncılık. ISBN: 978-605-4414-44-4.
- Khan, A.U. , Khan, M. ve Khan, M.M. (2019). Antifungal and Antibacterial Assay by Silver Nanoparticles Synthesized from Aqueous Leaf Extract of *Trigonella foenum-graecum*. *Bionanoscience*, 9 (3), 597-602.
- Kocabaş, Y.Z., (2014). *Türkiye'deki Dorycnium Miller (Fabaceae) cinsinin revizyonu*. (Doktora Tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi veri tabanından erişildi (Tez No. 360967).

- Koç, H. (2002). *Bitkilerle Sağlıklı Yaşama*. Kültür Eserleri Dizisi, ISBN: 975-17- 2925-4, Yayın No:2883.
- Krol-Kogus B, Glod D and Krauze-Baranowska M. (2020). Qualitative and quantitative HPLC-ELSD-ESI-MS analysis of steroidal saponins in fenugreek seed, *Acta Pharmaceutica*, 70 (1), 89–99, doi: 10.2478/acph-2020-0013.
- Krol-Kogus B, Hałas R, Głód D, Krauze-Baranowska M and Pobłocka-Olech L. (2021). 2D LC as a tool for standardization of Foenugraeci semen extracts containing compounds with anti-Helicobacter pylori activity, *Food Function*, 12 (6), 2686, doi:10.1039/D1FO00226K.
- Mahapatra, K. , Ghosh, A.K. , De, S. , Ghosh, N. , Sadhukhan, P. , Chatterjee, S. , Ghosh, R. , Sil, P.C. ve Roy, S. (2020). Assessment of cytotoxic and genotoxic potentials of a mononuclear Fe(II) Schiff base complex with photocatalytic activity in *Trigonella*. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1864 (3), 129503, doi: 10.1016/j.bbagen.2019.129503.
- Mauseth, J.D. (2008). *Plant Anatomy*. The Blackburn Press, USA.
- Meidner, H. and Mansifield, T.A. (1968). *Physiology of Stomata*. Mc. Graw Hill., London, pp: 67-68.
- Metcalf CR. and Chalk L. (1950). *Anatomy of The Dicotyledons (Leaves,stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses)*, Vol. 1, pp. 147-153. Oxford University Press, Amen House, London.
- Metcalf, C.R. and Chalk, L. (1950). *Anatomy of the Dicotyledons*. Oxford Univ. Press, London, Vol. 2, pp: 1041-1051.
- Metcalf, C.R. ve Chalk, L. (1971). *Anatomy of Monocotyledons*. Oxford University Press, Oxford.
- Muninjanov, H. ve Karagöz, A. (Eds.). (2019). *Türkiye'nin Biyoçeşitliliği: Genetik Kaynakların Sürdürülebilir Tarım ve Gıda Sistemlerine Katkısı*. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü. Ankara.
- Nateqi, M. ve Mirghazanfari, S.M. (2018). Determination of total phenolic content, antioxidant activity and antifungal effects of *Thymus vulgaris*, *Trachyspermum*

- ammi* and *Trigonella foenum-graecum* extracts on growth of *Fusarium solani*. *Cellular And Molecular Biology*, 64 (14), 39-46, doi: 10.14715/cmb/2018.64.14.7.
- Noohpishch, Z. , Amiri, H. , Farhadi, S. ve Mohammadi-gholami, A. (2020). Green synthesis of Ag-ZnO nanocomposites using *Trigonella foenum-graecum* leaf extract and their antibacterial, antifungal, antioxidant and photocatalytic properties. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 240, 118595, doi: 10.1016/j.saa.2020.118595.
- Omezzine, F. , Bouaziz, M., Daami-Remadi, M., Simmonds, M.S.J. ve Haouala, R. (2017). Chemical composition and antifungal activity of *Trigonella foenum-graecum* L. varied with plant ploidy level and developmental stage. *Arabian Journal of Chemistry*, 10: S3622-S3631, doi: 10.1016/j.arabjc.2014.03.013.
- ÖzdemirPharma - Agricultural Liquid Products. (2017). *Rhizobium Nedir?* Erişim Adresi: <http://www.ozdemirkimya.com/rhizobium-nedir/> . Erişim Tarihi: 10.06.2021.
- Özsoy Altunkaynak A. ve Ceyhan E. (2018). Fasulyede (*Phaseolus vulgaris* L.) Farklı Azot Dozlarının ve Bakteri Aşılmasının Tane Verimi ve Verim Özellikleri Üzerine Etkileri. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 32 (2), 91-98. doi: 10.15316/SJAFS.2018.70.
- Pınar, N. M, Akan, H., Ceter, T., Aytac, Z., Ekici, M., Acar, A. and Akdoğan, S (2014). Comparative pollen morphology of annual *Trigonella* L. (Fabaceae) in Turkey. *Plant Systematics and Evolution*, 300 (4), 689-708, doi: 10.1007/s00606-013-0913-8.
- Plants of the World online. (2021). Erişim Adresi: <http://plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30107635-2> . Erişim Tarihi: 3 Mayıs 2021.
- Punt, W., Hoen, P.P., Blackmore, S., Nilsson, S. and Thomas, A., Le. (2007). Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 143 (1-2), 1-81, doi: 10.1016/j.revpalbo.2006.06.008.
- Rahman, A. H. M. M. ve Ara Parvin, M. I. (2015). Taxonomic Studies on the Family Fabaceae (Weeds) at Rajshahi University Campus. *Plant*, 3(3), 29-25, doi: 10.11648/j.plant.20150303.11.

- Ranjbar, M, Hajmoradi, Z, Karamian, R. (2010). The taxonomic importance of leaf epidermis morphology and peduncle anatomy in *Trigonella disperma* Bornm. ex. Vassilcz. *Taxonomy and Bosistemics (TBJ)*, 1, 15-26. Erişim Adresi: [https://tbj.ui.ac.ir/article\\_17365.html](https://tbj.ui.ac.ir/article_17365.html) .
- Ranjbar, M. ve Hajmoradi, Z. (2015). A new species of *Trigonella* sect. *Ellipticae* (Leguminosae-Papilionoideae) from Iran, including cytogenetic and anatomical notes. *Phytotaxa*, 202 (1), 026–034, doi: 10.11646/phytotaxa.202.1.3.
- Ranjbar, M. ve Hajmoradi, Z. (2016). Comparative leaf epidermis and anatomical study in populations of *Trigonella spruneriana* (Fabaceae) from Iran. *Webbia*, 71(1), 107-115, doi:10.1080/00837792.2016.1138673.
- Ranjbar, M., Hajmoradi, Z. ve Karamian R. (2014). Novelty in *Trigonella* sect. *Ellipticae* (Fabaceae) from Iran. *BioOne- A Journal for Botanical Nomenclature*, 23 (2), 209-216, doi: 10.3417/2011024.
- Ranjbar, M., Karamian, R. ve Hajmoradi, Z. (2012). A new species and taxonomic stuides in *Trigonella* sect. *Ellipticae* (Fabaceae) in Iran. *Annales Botanici Fennici* 49 (4), 279-287, doi: 10.5735/085.049.0411.
- Rao, A. ve Grant, R. (2019). The effect of *Trigonella foenum-graecum* extract on prostate-specific antigen, and prostate function in otherwise healthy men with benign prostate hyperplasia. *Phytotherapy Research*, 34(3), 634-639, doi: 10.1002/ptr.6554.
- Stefanowicz-Hajduka, J., Krol-Kogus, B., Sparak-Stefanowskab, B., Kimelb, K., Ochockaa J. R. ve Krauze-Baranowska, M. (2021). Cytotoxic activity of standardized extracts, a fraction, and individual secondary metabolites from fenugreek seeds against SKOV-3, HeLa and MOLT-4 cell lines. *Pharmaceutical Biology*, 59 (1), 424–437, doi: 10.1080 / 13880209.2021.1903047.
- Subhapriya, S. ve Gomathipriya, P. (2018). Green synthesis of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles by *Trigonella foenum-graecum* extract and its antimicrobial properties. *Microbial Pathogenesis*, 116, 215-220, doi: 10.1016/j.micpath.2018.01.027.
- Şenkul, Ç. ve Kaya, S. (2017). Türkiye Endemik Bitkilerinin Coğrafi Dağılışı. *Türk Coğrafya Dergisi*, 69, 109-120, doi.org/10.17211/tcd.322515.

- Thakur, R.S. ve Ahirwar, B. (2019). A steroidal derivative from *Trigonella foenum graecum* L. that induces apoptosis in vitro and in vivo. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27 (1), 231-239, doi: 10.1016/j.jfda.2018.05.001.
- The Plant List. (2021). Erişim Adres: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Trigonella+L>. Erişim Tarihi: 3 May 2021.
- The Plant List. (2021). Erişim Adresi: <http://www.theplantlist.org/1.1/cite/Accessed> . Erişim Tarihi: 3 May 2021.
- Tokur, O. ve Aksoy, A. (2017). In vitro Sitotoksosite Testleri. *Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118. Erişim Adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/320938> .
- Turki, Z, El-Shayeb, F. ve Abozeid, A. (2013). Seed Morphology of Some *Trigonella* L. Species (Fabaceae) and its Taxonomic Significance. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 3 (12), 940. Erişim Adresi: [https://www.researchgate.net/publication/309378675\\_Seed\\_Morphology\\_of\\_Some\\_Trigonella\\_L\\_Species\\_Fabaceae\\_and\\_its\\_Taxonomic\\_Significance](https://www.researchgate.net/publication/309378675_Seed_Morphology_of_Some_Trigonella_L_Species_Fabaceae_and_its_Taxonomic_Significance) .
- Uyanık, M., Rezaeieh, K., Delen, Y. ve Gürbüz, B . (2011). Baklagillerde Bakteri Aşılması ve Azot Fiksasyonu. *Ziraat Mühendisliği*, (357) , 8-12. Erişim Adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/zm/issue/52109/680918> .
- Varghese, R. , Almalki, M.A. , Ilavenil, S. ,Rebecca, J. Ve Choi, K.C. (2019). Silver nanoparticles synthesized using the seed extract of *Trigonella foenum-graecum* L. and their antimicrobial mechanism and anticancer properties. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26 (1), 148-154, doi: 10.1016/j.sjbs.2017.07.001.
- Wagstaff, S. J. (1992). A phylogenetic interpretation of pollen morphology in tribe Mentheae (Labiatae). *Advances in Labiatae science*, 113-124, Royal Botanic Garden, Kew.
- World Health Organization, *Canser*. Erişim Adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> . Erişim Tarihi: 4 Mayıs 2021.
- Yakar Tan, N. (1982). Bitki Mikroskopisi Klavuz Kitabı. İstanbul Üniv. Fen Fak. Yay. No. 166, İstanbul.

Yaldız, G. ve Çamlıca, M. (2018). Türkiye’de Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin retimi ve Ticareti. *Bahçe* 47, 2, 224-229. Erişim Adresi:[https://www.researchgate.net/publication/329978933\\_TURKIYE'DE\\_TIBB\\_I\\_VE\\_AROMATIK\\_BITKILERIN\\_URETİMİ\\_VE\\_TICARETİ](https://www.researchgate.net/publication/329978933_TURKIYE'DE_TIBB_I_VE_AROMATIK_BITKILERIN_URETİMİ_VE_TICARETİ) .

Yavuz, A. ve Erdoğan, . (2019). Organik Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Türkiye’de retim Miktarı ve Değerlendirilmesi. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2 (1), 124-130. Erişim Adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/bufbd/issue/46478/512342> .

Yentür, S. (1973). *Bitki Anatomisi*. İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Yayınları No: 227, İstanbul.



