



TRAKYA UNIVERSITY



JOURNAL OF NATURAL SCIENCES

18 Cilt
Volume

2 Sayı
Number

Aralık
December

2017

TRAKYA
UNIVERSITY
JOURNAL OF
NATURAL
SCIENCES

TUJNS

Trakya Univ J Nat Sci

ISSN 2147-0294

e-ISSN 2528-9691

Trakya University Journal of Natural Sciences

Cilt: 18

Sayı: 2

Aralık

2017

Trakya University Journal of Natural Sciences

Volume: 18

Number: 2

December

2017

Trakya Univ J Nat Sci

<http://dergipark.gov.tr/trkjnat>

e-mail: tujns@trakya.edu.tr

ISSN 2147-0294
e-ISSN 2528-9691

Dergi Sahibi / Owner

Trakya Üniversitesi Rektörlüğü
Fen Bilimleri Enstitüsü Adına
On behalf of Trakya University Rectorship, Graduate
School of Natural and Applied Sciences
Prof. Dr. Murat YURTCAN

Editör / Editor

Doç. Dr. Kadri KIRAN

Başkan / Chairman

Prof. Dr. Murat YURTCAN

Dergi Yayın Kurulu / Editorial Board

Abdel Hameed A. AWAD	National Research Center, Dokki Giza	Egypt
Albena LAPEVA-GJANOVA	Sofia University, Sofia	Bulgaria
Ayşegül ÇERKEZKAYABEKİR	Trakya Üniversitesi	Edirne (Sayfa Editörü/Copyeditor)
Bálint MARKÓ	Babeş-Bolyai University	Romania
Beata ZIMOWSKA	University of Life Sciences, Lublin	Polonya
Burak ÖTERLER	Trakya Üniversitesi	Edirne (Dizgi/Design)
Celal KARAMAN	Trakya Üniversitesi	Edirne (Sayfa Editörü/Copyeditor)
Errol HASSAN	University of Queensland, Brisbane	Avustralya
Herdem ASLAN	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	Çanakkale
Ilgaz AKATA	Ankara Üniversitesi	Ankara
İnanç ÖZGEN	Fırat Üniversitesi	Elazığ
İskender KARALTI	Yeditepe Üniversitesi	İstanbul
Medine SİVRİ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	Eskişehir (Türkçe Dil Editörü/Turkish Language Editor)
Mustafa YAMAÇ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	Eskişehir
Naime ARSLAN	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	Eskişehir
Necmettin GÜLER	Trakya Üniversitesi	Edirne
Necdet SÜT	Trakya Üniversitesi	Edirne (Biyostatistik Editörü/Biostatistics Editor)
Necmi AKSOY	Düzce Üniversitesi	Düzce
Özkan DANIŞ	Marmara Üniversitesi	İstanbul
Saliha ÇORUH	Atatürk Üniversitesi	Erzurum
Vladimir ANTONIN	Moravian Museum, Brno	Çek Cumhuriyeti
Volkan AKSOY	Trakya Üniversitesi	Edirne (İngilizce Dil Editörü/English Language Editor)
Yeşim SAĞ	Hacettepe Üniversitesi	Ankara
Yıldız AYDIN	Marmara Üniversitesi	İstanbul

Yazışma Adresi / Correspondence Address

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Binası, Balkan Yerleşkesi – 22030 Edirne / TÜRKİYE
e-mail: tujns@trakya.edu.tr
Tel: +90 284 2358230
Fax: +90 284 2358237

Bu dergi hakemli bir dergidir, BIOSIS Previews, CAB Abstract, CiteFactor, DOAJ (Directory of Open Access Journal), DRJI (Directory of Research Journal Indexing), ESCI (Emerging Sources Citation Index), Google Akademik, ResearchBib, Science Library Index, SIS (Scientific Indexing Services), TUBITAK-ULAKBIM Yaşam Bilimleri Veri Tabanı (TR Dizin) ve Zoological Record tarafından dizinlenmektedir.

This Journal is a peer reviewed journal and is indexed by BIOSIS Previews, CAB Abstract, CiteFactor, DOAJ (Directory of Open Access Journal), DRJI (Directory of Research Journal Indexing), ESCI (Emerging Sources Citation Index), Google Scholar, ResearchBib, Science Library Index, SIS (Scientific Indexing Services), TUBITAK-ULAKBIM Life Sciences Database (Turkish Journal Index) and Zoological Record.

Baskı / Publisher

Trakya Üniversitesi Matbaa Tesisleri / Trakya University Publishing Centre

TRAKYA UNIVERSITY JOURNAL OF NATURAL SCIENCES

Cilt (Volume) 18

Sayı (No) 2

Aralık (December) 2017

İnceleme ve Değerlendirmeye Katkıda Bulunanlar

(Scientific Advisory Board)

A. Levent TUNA (Muğla)	Hatice ÇÖLGEÇEN (Zonguldak)
Abdullah MART (Osmaniye)	Hatice Nurhan BÜYÜKKARTAL (Ankara)
Ali ERGÜL (Ankara)	Hüseyin ERDUĞAN (Çanakkale)
Balint MARKO (Romanya)	İlhami KARATAŞ (Tokat)
Bertan Boran BAYRAK (İstanbul)	Kamil HALİLOĞLU (Erzurum)
Celal KARAMAN (Edirne)	Levent CAN (Almanya)
Duygu KADAİFÇİLER (İstanbul)	Mehtap ERŞAN (Sivas)
Ebru Gül ASLAN (Isparta)	Murat ÖZMEN (Malatya)
Ebru ÖZDEMİR NATH (İstanbul)	Nermin GOZUKIRMIZI (İstanbul)
Eda ÇELİK (Ankara)	Nesil ERTORUN (Eskişehir)
Emel SÖZEN (Eskişehir)	Neşe KEKLİKÇİOĞLU ÇAKMAK (Sivas)
Emine ORHAN (Erzurum)	Özge KARAKAŞ METİN (Kocaeli)
Figen ERASLAN İNAL (Isparta)	Özgür BAYTUT (Samsun)
Filiz VARDAR (İstanbul)	Sedef TUNCA GEDİK (Kocaeli)
Gülşah ÇOBANOĞLU (İstanbul)	Selda TEKİN-ÖZAN (Isparta)
Hakan TERZİ (Afyonkarahisar)	Serap GÜRBÜZDEMİR (İstanbul)
Halide AYDOĞDU (Edirne)	Ülker Aslı GÜLER (Sivas)
Hasan CİVELEK (Muğla)	

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Araştırma Makalesi/Research Article

1. *Yeliz OZUDOGRU, Melek MERDİVAN* **81-87**
Metilen Mavisinin Modifiye Edilmiş *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh Kullanılarak Biyosorpsiyonu
Biosorption of Methylene Blue by Modified *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh
2. *Serdar AKAR, Özlem ÇETİN ERDOĞAN* **89-96**
Contributions to Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) Fauna of Turkey with New Records
Türkiye Aphidiinae Faunasına (Hymenoptera: Braconidae) Yeni Kayıtlar ile Katkılar
3. *Elif YÜZBAŞIOĞLU, Eda DALYAN, İlgin AKPINAR* **97-104**
Changes in Photosynthetic Pigments, Anthocyanin Content and Antioxidant Enzyme Activities of Maize (*Zea mays* L.) Seedlings under High Temperature Stress Conditions
Mısır (*Zea mays* L.) Fidelerinde Yüksek Sıcaklık Stresi Koşullarında Fotosentetik Pigmentler, Antosiyanin İçeriği ve Antioksidan Enzim Aktivitelerindeki Değişiklikler
4. *Başak YÜCE-DURSUN* **105-113**
Çeşitli Bitki Çaylarının Monoamin Oksidaz İnhibisyonlarının ve Antioksidan Etkilerinin Belirlenmesi
Determination of Monoamine Oxidase Inhibition and Antioxidant Effects of Various Herbal Teas
5. *Yasemin AYDIN* **115-122**
Exposure to Sodium Fluoride via Drinking Water Cause Cytotoxicity and Oxidative Damage in Leydig Cells
Su Aracılığıyla Sodyum Florür Maruziyeti Leydig Hücrelerinde Sitotoksosite ve Oksidatif Hasara Neden Olur
6. *Sevil TÛTÛNCÛ KONYAR* **123-132**
An Overview of Pollen and Anther Wall Development in *Catalpa bignonioides* Walter (Bignoniaceae)
Catalpa bignonioides Walter (Bignoniaceae)'deki Polen ve Anter Çeperi Gelişimine Genel Bir Bakış
7. *İlker GENÇ, Şükran KÛLTÛR* **133-136**
***Euphorbia smirnovii* Geltman Türünün Morfolojik ve Karyolojik Özellikleri**
Morphological and Caryological Features of *Euphorbia smirnovii* Geltman

8. *İsmail POYRAZ, Merve SAĞLAM* 137-142
Partial Cloning and Identification of Terpene Synthase-6 Gene (Tps-6) in an Aromatic Plant *Origanum onites* L.
Bir Aromatik Bitki *Origanum onites* L.'de Terpen Sentaz-6 (TPS-6) Geninin Kısmi Klonlanması ve Tanımlanması
9. *Figen Esin KAYHAN, Güllü KAYMAK, Cansu AKBULUT, Nazan Deniz YÖN ERTUĞ* 143-148
2,4-D (Diklorofenoksiasetik Asit)'in Zebra Balığı (*Danio rerio* Hamilton, 1822) Solungaçlarında Antioksidan Enzimler ve Lipid Peroksidasyon Seviyesi Üzerine Akut Etkilerinin Belirlenmesi
Determination of Acute Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation Levels in Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822) Gills
10. *Şeyda FİKİRDEŞİCİ ERGEN* 149-153
Çinko Oksit Nanopartikülü İle Çinko Klorür'ün *Daphnia magna* (Straus) Üzerine Akut Toksik Etkileri
Acute Toxic Effects of Zinc Oxide Nanoparticle and Zinc Chloride on *Daphnia magna* (Straus)
11. *Seda Emel TEK, Zühal OKYAR* 155-161
Predatory Insect Species Associated with Some Rosaceous Plants in Edirne (Trakya University Arboretum), Turkey
Edirne Civarında (Trakya Üniversitesi Arboretumu) Bazı Rosaceae Bitkileri ile Birlikteliğe Sahip Predatör Böcek Türleri
12. *Miray ÜSTÜNTÜRK-ONAN* 163-166
Kontakt Lens Solüsyonlarının Klinik Örneklerden İzole Edilen Bakterilere Karşı Etkisi
Efficacy of Contact Lens Solutions Against Bacteria Isolated from Clinical Specimens
13. *Yakup ŞENYÜZ, Mustafa Cemal DARILMAZ, Kemal DİNDAR* 167-173
A Study on the Genus *Sphaeridium* Fabricus, 1775 (Coleoptera: Hydrophilidae) in Kütahya Province, Western Turkey
Türkiye'nin Batısında, Kütahya İlinde *Sphaeridium* Fabricus, 1775 (Coleoptera: Hydrophilidae) Cinsi Üzerine Bir Çalışma
14. *Nihal GÖREN SAĞLAM* 175-183
***Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Yapraklarında Gus ve Gfp Raportör Genleri Kullanılarak Senesens ile İlişkili Genlerin Analizi**
Analysis of Senescence-Related Genes Expressions Using Gus and Gfp Reporter Genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Leaves

Derleme/Review

15. *Seda BALKAN* 185-191
Eritrositlerde *in vitro* Oksidatif Strese Karşı Antioksidan Olarak Değerlendirilen Çeşitli Bitki Ekstraktları
Various Plant Extracts Evaluated as Antioxidant Against *in vitro* Oxidative Stress in Erythrocytes

METİLEN MAVİSİNİN MODİFİYE EDİLMİŞ *Cystoseira barbata* (STACKHOUSE) C. AGARDH KULLANILARAK BİYOSORPSİYONU

Yeliz OZUDOGRU^{1*}, Melek MERDİVAN²

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Çanakkale

²Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, İzmir

*Corresponding author: e-mail: yelizozudogru@hotmail.com

Alınış (Received): 24 Mart 2017, Kabul (Accepted): 26 Mayıs 2017, Erken Görünüm (Online First): 1 Haziran 2017, Basım (Published): 15 Aralık 2017

Özet: Bu çalışmada, sulu çözeltide bulunan metilen mavisi (MM) boyar maddesinin modifiye edilmiş (0,1M HNO₃ ve 1M HNO₃ ile) *Cystoseira barbata* kullanılarak giderilmesine çalışılmıştır. Adsorpsiyona, pH'm, temas süresinin, farklı derişimlerde bulunan MM çözeltisinin etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda, ilk 50dk. içerisinde sistemin dengeye geldiği ve adsorpsiyon kapasitesinin pH değişiminden pek etkilenmediği gözlemlenmiştir. Yapılan izoterm çalışmalarında ise, Freundlich izoterm modeline daha çok uyduğu belirlenmiş ve q_{max} değeri 0,1M HNO₃ grubunda daha yüksek (100,6mg/g) bulunmuştur. Yapılan SEM ve FTIR analizlerinde ise, MM boyar maddesinin alg yüzeyinde meydana getirdiği değişiklikler ve alg yüzeyinde hangi gruplara tutunduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Boyar madde, alg, biyosorpsiyon.

Biosorption of Methylene Blue by Modified *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh

Abstract: In this study, methylene blue (MB) dye in aqueous solution was tried to be removed by using modified *Cystoseira barbata* (with 0.1M HNO₃ and 1M HNO₃). The effects of pH, contact time and different MB concentrations on adsorption were investigated. The results showed that the system reached to equilibrium in the first 50min and pH had no significant effect on adsorption capacity. In the isotherm studies, the Freundlich isotherm model was found to be more suitable and the q_{max} value was higher in the 0,1M HNO₃ group (100.6mg/g). The changes in the algae surface caused by MB and the groups on the algae surface that the dye attached were determined in SEM and FTIR analysis.

Key words: Coloring agent, algae, biosorption.

Giriş

Artan teknolojik gelişimle birlikte çevre kirliliği de artmaktadır. Genellikle tekstil, deri, kozmetik, kâğıt ve plastik ürünler başta olmak üzere kullanılan boyar maddelerin çevreye deşarj edilmesi hem toksikolojik hem de estetik açıdan sorun teşkil etmektedir (Me'tivier-Pignon ve ark. 2003, Doğar ve ark. 2010). Su içerisinde bulunan çok az miktarlardaki (bazı boyar maddeler için 1 ppm'den daha az) boyar maddelerin arıtılmadan alıcı ortama verilmesi, atık sularda ışık geçişini azaltarak fotosentezi engellemekte ve besin zinciri transferi sonucunda insan sağlığını tehlikeye sokmaktadır (İmecik ve ark. 2014, Zazouli ve Moradi 2015).

Boyar maddelerin arıtımı için, son otuz yıldan beri çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik metotlar kullanılmaktadır. Bu yöntemler içerisinde adsorpsiyon yönteminin en iyi sonuç vermesi ve farklı boyar maddelere de uygulanabilirliğinin olması açısından kullanımı son yıllarda yaygınlaşmıştır (Padmesh ve ark. 2005, Rafatullah ve ark. 2010, Tsai ve ark. 2011, Dahri ve ark. 2015, Lim ve ark. 2015). Adsorpsiyon yönteminde kullanılan en yaygın maddelerden birisi de alglerdir.

Algere uygulanan modifikasyon işleminin alglerin adsorplama kapasitesine etki ettiği ve kullanılan kimyasallara göre de adsorplama kapasitesinin arttığı literatürde gözlenmiştir. Ortamın pH'ı, temas süresi, sıcaklık gibi özelliklerin de adsorpsiyon kapasitesine etki ettiği saptanmıştır (Rubin ve ark. 2010, Mikati ve ark. 2013).

Denemede kullanılan *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh esmer alglerden olup, algin hücre çeperinde bulunan karboksil, hidroksil, sülfat ve amino grupları biyosorpsiyon işleminden sorumludur (Lesmana ve ark. 2009, Abd-El-Kareem ve Taha 2013). Katyonik bir boyar madde olan MM ise; genellikle tekstil ürünlerinde kullanılmaktadır. İnsanların MM boyar maddesine maruz kalması sonucunda, kan yoluyla beyne gitmekte ve tahribata neden olmaktadır (Rubin ve ark. 2010, Daneshvar ve ark. 2017).

Bu çalışmanın amacı, atık sularda bulunan metilen mavisi boyar maddesinin modifiye edilmiş *C. barbata* kullanılarak giderilmesidir. Biyokütleyle uygulanan modifiye işleminin adsorplama kapasitesine etkisi

incelenmiştir. Denemeler süresince, biyokütle farklı derişimlerde bulunan HNO₃ ile modifiye edilerek, farklı pH, süre ve derişimlerde denemeler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara, Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri uygulanmıştır. Yapılan FTIR ve SEM analizleri ile ham *C. barbata*, modifiye edilmiş *C. barbata* ve MM adsorpsiyonu sonrası *C. barbata* arasındaki fark incelenmiştir.

Materyal ve Metot

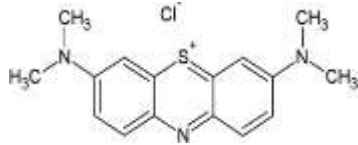
Biyokütle ve Biyokütlenin Modifikasyonu

Kahverengi alglerden olan *C. barbata* (Stackhouse) Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi'nin Dardanos Kampüsünden toplanmıştır. Biyokütle, temizlenmiş, yıkanmış ve 60°C'de etüvde kurutulmuştur. Biyokütlenin modifikasyonunda Mikati ve El Jamal (2013)'ün yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem göre; kurutulan biyokütlenin 5 gramına 50ml HNO₃ (0,1M) ilave edilerek karışım 4 saat çalkalanmıştır. Yıkayıp süzöldükten sonra 110°C'deki etüvde 4 saat kuruması beklenmiş, 500mL saf su ile yıkayıp filtre edilip 110°C'deki etüvde 16 saat tekrar kurumaya bırakılmıştır. Aynı işlem 1M HNO₃ için de tekrarlanmıştır.

Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Kullanılan tüm kimyasallar, analitik hassasiyette olup, Merck firmasından temin edilmiştir. Denemelerde kullanılan tüm çözeltiler saf su ile hazırlanmıştır. Biyosorpsiyon denemelerinde kullanılan metilen mavisinin (MM) özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. MM'nin özellikleri.

Kimyasal yapısı	
Kimyasal formülü	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ SCl
Moleküler ağırlığı	319,85
C.I. numarası	52015
Dalga boyu (nm)	665

Stok MM çözeltisinden (1000mg/L) saf su ile farklı derişimlerdeki çözeltiler (5-10-20-50-100-150-200-300-350-400-450 ve 500mg/L) hazırlanmıştır. Çözeltilerin pH ayarlanması için 0,1M HCl ve 0,1M NaOH kullanılmıştır. Biyosorpsiyon denemelerinde Wise Bath WSB-30 model sıcaklık ayarlamalı çalkalayıcı su banyosu kullanılmıştır. Biyosorpsiyon denemeleri sonucunda örnekler, Millipore Millex-HV hidrofilik PVDF 0,45µm şırınga filtre ile süzölmüş ve örneklerdeki MM miktarı Rayleigh Vis-7220 G marka spektrofotometre ile 665nm.'de ölçölmüştür. Örneklerin karakterizasyonunda, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) için, Perkin-Elmer FTIR Spektroskopi (Spectrum BX-II) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, Jeol JSM 7100F) cihazları kullanılmıştır.

Biyosorpsiyon Denemeleri

Biyosorpsiyon yöntemi olarak kesikli ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. 100mg *C. barbata* (0,1 MHNO₃ ve 1MHNO₃ grubu olmak üzere 2 grup) 50mL'lik falkon tüplerine konularak 10 mL'lik MM çözeltisi ilave edilmiştir. Hazırlanan örneklerin farklı pH'larda (2-3-5-7-9), farklı sürelerde (10-25-50-100-150-200 ve 300dk.) ve farklı derişimlerde (5-10-20-50-100-150-200-300-350-400-450 ve 500mg/L) denemeleri yapılmıştır. Tüm denemeler oda koşullarında, 250rpm hızındaki çalkalamalı su banyosunda ve üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

pH Denemeleri

100mg biyokütle (her iki grup için de) farklı pH'larda (2-3-5-7-9) bulunan 10mL'lik MM çözeltisi ilave edilmiştir. Hazırlanan örnekler, oda koşullarında 250rpm hızındaki çalkalamalı su banyosuna konmuştur. Örnekler şırınga filtre ile süzölüp spektrofotometrede ölçölmüştür.

Çözeltide bulunan MM miktarının % tutunma değeri Eşitlik 1 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% R = \frac{(C_o - C_e)}{C_o} \times 100 \quad (1)$$

Denklemdaki C_o değeri başlangıç MM derişimini (mg/L) ve C_e ise dengedeki MM derişimini (mg/L) vermektedir.

Süre Denemeleri

Kuru biyokütle (her iki grup için de, 100mg) falkon tüplerinde bulunan 10mL'lik MM çözeltisine ilave edilerek oda koşullarındaki çalkalamalı su banyosunda 250rpm hızında farklı sürelerde (10-25-50-100-150-200 ve 300dk) çalkalanmıştır. Örnekler şırınga filtre ile süzölüp spektrofotometrede ölçölmüştür.

MM miktarı q_t (mg/g), Eşitlik 2 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$q_t = \frac{(C_o - C_e)}{M} \times V \quad (2)$$

Denklemdaki C_o değeri başlangıç MM derişimini (mg/L), C_e ise dengedeki MM derişimini (mg/L), V ise MM çözeltisinin hacmini (L), M ise biyokütlenin kütlesini (g) vermektedir.

Adsorpsiyon İzotermeleri

Farklı derişimlerde (5-10-20-50-100-150-200-300-350-400-450 ve 500mg/L) bulunan MM çözeltileri 100 mg biyokütle (her iki grup için de) ilave edilerek oda koşullarında çalkalanmıştır. MM miktarı (mg/g) Eşitlik 2 kullanılarak hesaplanmıştır.

Adsorbent yüzeyinde oluşan adsorpsiyon olayı, Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri ile açıklanmıştır. Langmuir izoterm modeli Eşitlik (3)' de gösterilmiştir: (Langmuir 1918):

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m a_L} + \frac{C_e}{q_m} \quad (3)$$

Burada q_e , adsorplanan MM miktarını (mg/g), C_e dengedeki çözeltide adsorplanmadan kalan MM derişimini (mg/L), q_m maksimum adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) ve a_L de adsorpsiyon enerjisi ile ilgili Langmuir sabitini göstermektedir. Lineer regresyon analizine göre C_e/q_e değerinin C_e değerine karşı çizilen grafikteki doğrunun eğimi $1/q_m$ değerini, doğrunun kesim noktası ise $1/q_m a_L$ değerini vermektedir.

Çok tabakalı adsorpsiyon modelinden üretilerek heterojen yüzeyler için uygulanan Freundlich izoterm modeli Eşitlik (4)'de gösterilmiştir (Freundlich 1906).

$$q_e = K_f C_e^{1/n_f} \quad (4)$$

Burada, q_e denge anında biyokütle üzerine adsorplanan MM miktarını (mg/g), K_f adsorpsiyon kapasitesini (mg/g), n_f Freundlich izoterm sabitini, C_e denge halinde çözeltide kalan MM konsantrasyonunu (mg/L) ifade etmektedir.

Eşitlik (4)'de her iki tarafın logaritmasının alınması ile lineer hale gelen yeni denklem Eşitlik (5)'de gösterilmiştir.

$$\log q_e = \log K_f + 1/n_f \log C_e \quad (5)$$

Bu eşitlikte, $\log q_e$ değerlerine karşı çizilen $\log C_e$ değerlerinin oluşturduğu grafikteki doğrunun eğimi $1/n_f$ değerini ve doğrunun y eksenini kestiği nokta da $\log K_f$ değerini vermektedir. $1/n_f$ değeri sıfıra ne kadar yakınsa yüzey o kadar heterojen demektir.

Biyokütlenin Karakterizasyonu

FTIR analizi için, *C. barbata* 60°C'de ağırlığı sabit kalıncaya kadar kurutulmuş, 1mg biyokütle, 100mg KBr ile pelet haline getirilmiştir. Biyokütlenin karakterizasyonunda dalga sayısı aralığı olarak 400-4000cm⁻¹ kullanılmıştır.

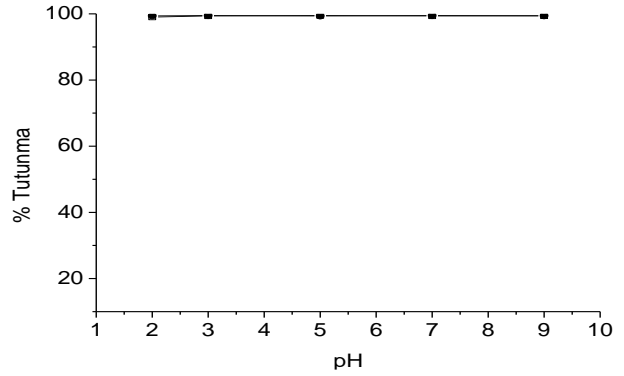
MM'nin adsorpsiyon öncesi ve sonrası alg yüzeyinde meydana gelen değişiklikleri gözlemleyebilmek için voltaj aralığı 5 ve 7kV ayarlanmış Taramalı Elektron Mikroskopu kullanılmıştır. Analiz öncesi, örnekler kurutulmuş altın ile kaplanmıştır.

Sonuçlar ve Tartışma

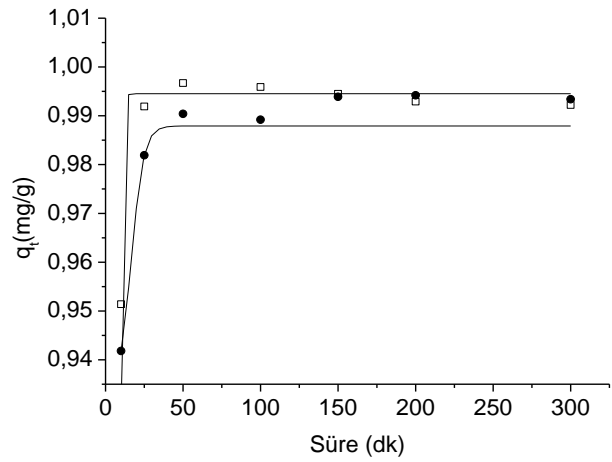
Biyosorpsiyona pH'in Etkisi

100mg biyokütle (her iki grup için de) pH3 ile pH9 arasındaki 10mg/L MM çözeltisi ilave edilerek % tutunma değerleri hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Şekil 1'de gösterilmiştir. Hem 0,1M HNO₃ ile hem de 1M HNO₃ ile modifiye edilmiş biyoküttele MM boyar maddesinin % tutunma değerinin %99 olduğu hesaplanmıştır. Biyoküttele her iki grubunun da pH değişiminden pek etkilenmediği ve tutunma miktarlarının benzer olduğu gözlenmiştir. Alglerin yüzeyi negatif yüklüdür. MM ise kationik bir boyar maddedir. Asidik durumlarda biyosorbent yüzeyi pozitif olur ve

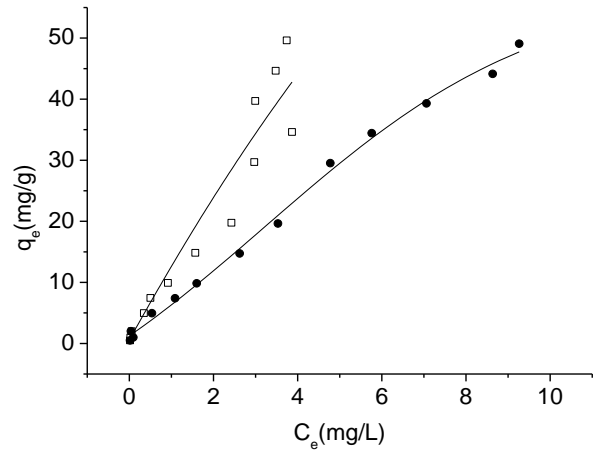
biyosorbent ile MM arasında elektrostatik çekim meydana gelir (Daneshvar ve ark. 2012, Vijayaraghavan ve ark. 2016). Biyosorpsiyon denemelerinin pH değişiminden pek etkilenmediği benzer çalışmalar da bulunmaktadır (El Sikaily ve ark. 2006, Ncibi ve ark. 2007, Ozudogru ve ark. 2017).



Şekil 1. *C. barbata* için farklı pH'larda bulunan MM'nin % tutunma değerleri, (□) 0,1M HNO₃ ve (●) 1M HNO₃ ile modifiye edilmiş.



Şekil 2. *C. barbata* için MM'nin süreye bağlı biyotutunma değerleri, (□) 0,1M HNO₃ ve (●) 1M HNO₃ ile modifiye edilmiş.



Şekil 3. MM'nin adsorpsiyon izotermi, 0,1M HNO₃ (□) ve 1M HNO₃ (●) ile modifiye edilmiş.

Biyosorpsiyona Sürenin Etkisi

Biyokütle, ne kadar hızlı ve yüksek derişimdeki boyar maddeyi adsorbe edebiliyorsa, o derece idealdir (Khataee ve ark. 2013). Biyokütlenin MM boyar maddesini süreye bağı adsorplama kapasitesi (q_t) Şekil 2'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, her iki grup için de, sistem ilk 50 dakika içerisinde dengeye ulaşmıştır. Elde edilen bulgular Ncibi ve ark. 2009, Kushwaha ve ark. 2014, ve Vijayaraghavan ve ark. 2015 ile benzerlik göstermektedir.

Derişim denemeleri

Alg yüzeyi ile MM arasındaki etkileşimi açıklayabilmek için uygulanan adsorpsiyon izotermi Şekil 3'de verilmiştir. Buna göre, başlangıçtaki MM derişimi arttıkça, adsorplanan MM derişiminin de arttığı gözlenmiştir. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi (q_m) 0,1M HNO₃'lu grupta 100,6mg/g ve 1M HNO₃'lu grupta ise 76,98mg/g'dır. Her iki grupta da Freundlich izoterm modelinin, Langmuir izoterm modeline göre daha uygun olduğu görülmüştür (Tablo 2). Farklı adsorbentler ile denemelerde kullanılan biyokütlenin maksimum MM adsorpsiyon kapasitelerinin karşılaştırılması Tablo 3'de verilmiştir.

Biyokütlenin Karakterizasyonu

FTIR

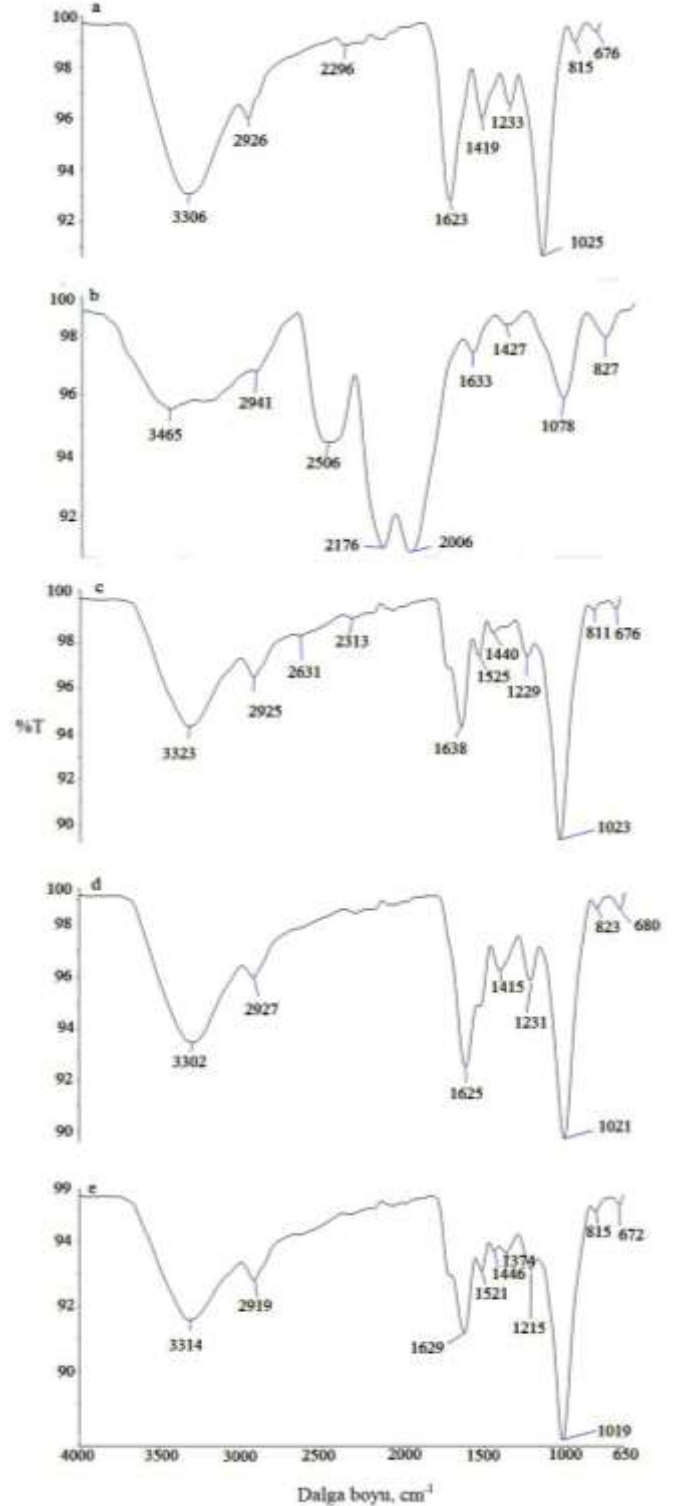
Biyokütlenin asitle modifiye işleminin ve MM boyar maddesi ile etkileşiminin açıklanması için FTIR analizi uygulanmış, elde edilen sonuçlar Şekil 4'de gösterilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, alg uygulanan modifikasyon işlemi, alg yüzeyinde bulunan –OH, –NH (3306cm⁻¹'deki pik) ve –CH (2926cm⁻¹'deki pik) gerilmelerine neden olmuştur. Benzer durum C=O (1623cm⁻¹'deki pik), C-O gerilme (1419cm⁻¹'deki pik), C-O karboksil (1233cm⁻¹'deki pik), S=O (1025cm⁻¹'deki pik) ve S-O gerilmeleri (815cm⁻¹'deki pik) için de geçerlidir.

Alg yüzeyinde bulunan –OH bağlarının pikleri (2296cm⁻¹'deki pik) MM biyosorpsiyonu sonrası kaybolmuştur. Biyokütleyle uygulanan modifikasyon işlemi, yeni piklerin oluşmasına neden olmuş, MM adsorpsiyonu ile de bu piklerin kaybolduğu görülmüştür. Genel anlamda bakıldığında, MM'nin, alg yüzeyinde bulunan hidroksil, amin, ve karboksil gruplarına bağlandığı görülmüştür. Benzer sonuçlar farklı kaynaklarda da bildirilmiştir (Marungrueng ve Pavasant 2007, El Jamal ve Ncibi 2012, Vijayaraghavan ve ark. 2016).

SEM

Ham – modifiye edilmiş biyokütlerde MM boyar maddesinin adsorpsiyon işlemi sonrasındaki morfolojik yapısının incelenmesi için SEM analizi uygulanmıştır (Şekil 5). Biyokütlenin asit derişimine bağı olarak yüzey yapısının da değiştiği görülmüştür. 1M HNO₃ ile modifiye edilmiş biyokütlenin MM biyosorpsiyon sonrası

yüzeyinin 0,1M HNO₃ ile modifiye edilmiş haline göre daha engebeli olduğu saptanmıştır.



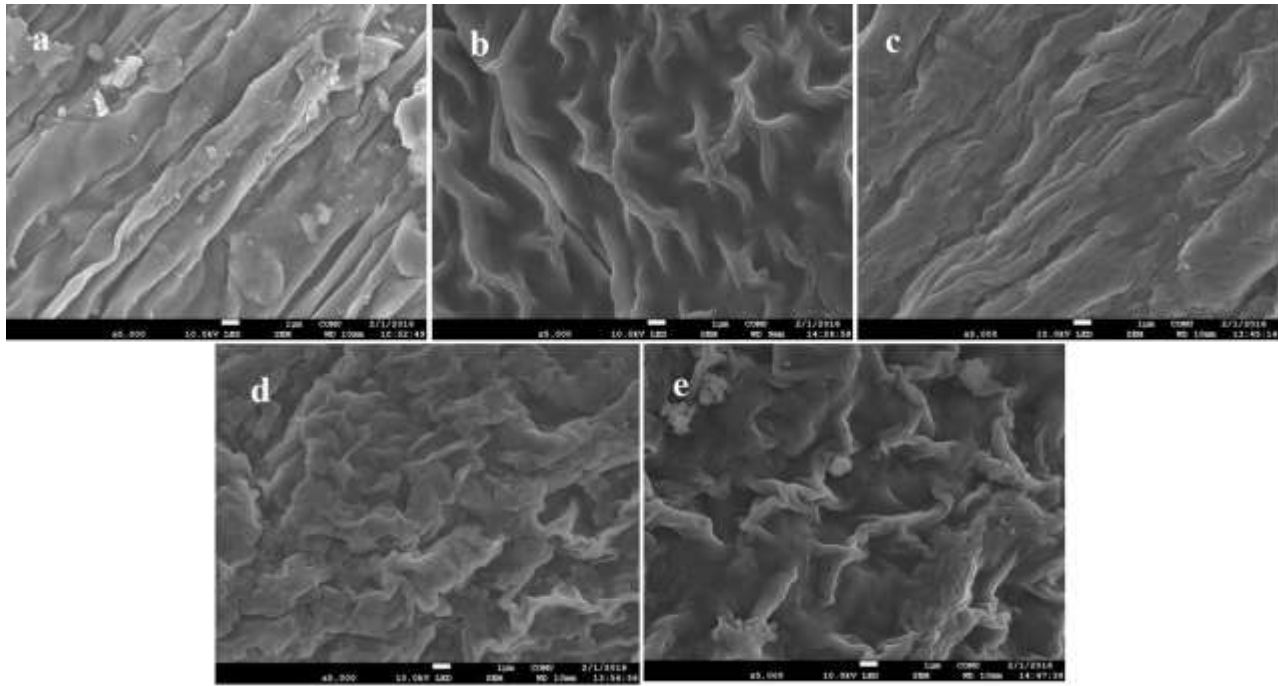
Şekil 4. Ham ve modifiye edilmiş biyokütlenin FTIR analizleri (a) ham (b) 0,1M HNO₃ ile modifiye edilmiş, (c) 1M HNO₃ ile modifiye edilmiş, (d) 0,1M HNO₃ ile modifiye edilmiş biyokütlenin MM biyosorpsiyon sonrası (e) 1M HNO₃ ile modifiye edilmiş biyokütlenin MM biyosorpsiyon sonrası.

Tablo 2. Farklı derişimlerdeki HNO₃ ile modifiye edilmiş biyokütlenin Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri.

Asit	Langmuir izoterm modeli			Freundlich izoterm modeli		
	q_m (mg/g)	a_L	R_L^2	n_f	K_f (mg/g)	R_F^2
0,1M HNO ₃	100,6	0,22	0,6793	1,21	15,76	0,9953
1 MHNO ₃	76,98	0,14	0,7448	1,45	8,83	0,9785

Tablo 3. Farklı adsorbentlerin maksimum MM adsorpsiyon kapasitesi

Adsorbent	q_m (mg/g)	Referans
<i>Sargassum muticum</i> (0,1M HCl)	279,2	Rubin ve ark. 2005
<i>Posidonia oceanica</i> (L.) fibres	5,56	Ncibi ve ark. 2007
<i>Ulothrix</i> sp.	86,10	Doğar ve ark. 2010
<i>Chaetophora elegans</i>	143	Mikati ve ark. 2013
<i>Chaetophora elegans</i> (1M HCl)	320	Mikati ve ark. 2013
<i>Chaetophora elegans</i> (1M sitrik asit)	20	Mikati ve ark. 2013
<i>Gracilaria corticata</i>	95,41	Vijayaraghavan ve ark. 2016
<i>Cystoseira barbata</i>	12,78	Ozudogru ve ark. 2017
<i>Cystoseira barbata</i> (0,1M HNO ₃)	100,6	Bu çalışma
<i>Cystoseira barbata</i> (1M HNO ₃)	76,98	Bu çalışma

**Şekil 5.** Ham ve modifiye edilmiş biyokütlenin SEM analizleri, (a) ham, (b) 0,1M HNO₃ ile modifiye edilmiş, (c) 1 MHNO₃ ile modifiye edilmiş, (d) 0,1M HNO₃ ile modifiye edilmiş biyokütlenin MM biyosorpsiyon sonrası, (e) 1M HNO₃ ile modifiye edilmiş MM biyosorpsiyon sonrası.

Sonuç

Bu çalışmada, sulu çözeltide bulunan metilen mavisi boyar maddesinin farklı derişimlerde bulunan HNO₃ ile modifiye edilmiş *C. barbata* kullanılarak giderilmesine çalışılmıştır. Adsorpsiyona, pH'nın, temas süresinin, farklı derişimlerde bulunan MM çözeltisinin etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular SEM ve FTIR analizleri ile desteklenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda, ortam pH'sının değişiminin adsorpsiyon kapasitesine pek etki etmediği görülmüştür. Adsorpsiyon

işleminin hem 0,1M HNO₃ grubunda, hem de 1M HNO₃ grubunda ilk 50dk içerisinde tamamlandığı belirlenmiştir. Yapılan derişim denemeleri sonucunda, 0,1M HNO₃ grupta q_{max} değeri 100,6mg/g, 1 M HNO₃ grupta ise, q_{max} değeri 76,98mg/g olarak bulunmuştur. Biyokütleye uygulanan modifiye işleminin algin adsorpsiyon kapasitesini arttırdığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, sulu çözeltilerde bulunan MM boyar maddesinin giderilmesinde, alternatif materyal olarak *C. barbata* alginin kullanılabilirliği saptanmıştır.

Kaynaklar

1. Abd-El-Kareem, M. & Taha, H. 2013. Decolorization of malachite green and methylene blue by two microalgal species. *International Journal of Chemical and Environmental Engineering*, 3(5): 297-302.
2. Dahri, M.K., Rahimi Kooh, M.R. & Lim, L.B.L. 2015. Application of *Casuarina equisetifolia* needle for the removal of methylene blue and malachite green dyes from aqueous solution. *Alexandria Engineering Journal*, 54(4): 1253-1263.
3. Daneshvar, E., Kousha, M., Salar Sohrabi, M., Khataee, A. & Converti, A. 2012. Biosorption of three acid dyes by the brown macroalga *Stoechospermum marginatum*: Isotherm, kinetic and thermodynamic studies. *Chemical Engineering Journal*, (195-196): 297-306.
4. Daneshvar, E., Vazirzadeh, A., Niazi, A., Sillanpää, M. & Bhatnagar, A. 2017. A comparative study of methylene blue biosorption using different modified brown, red and green macroalgae – Effect of pretreatment. *Chemical Engineering Journal*, 307(1): 435-446.
5. Doğar, Ç., Gürses, A., Açıkyıldız, M. & Özkan, E. 2010. Thermodynamics and kinetic studies of biosorption of a basic dye from aqueous solution using green algae *Ulothrix* sp. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 76: 279-285.
6. El Jamal, M.M. & Ncibi, M.C. 2012. Biosorption of methylene blue by *Chaetophora elegans* algae: kinetics, equilibrium and thermodynamic studies. *Acta Chimica Slovenica*, 59: 24-31.
7. El Sikaily, A., Khaled, A., El Nemr, A. & Abdelwahab, O. 2006. Removal of methylene blue from aqueous solution by marine alga *Ulva lactuca*. *Chemistry and Ecology*, 22(2): 149-157.
8. Freundlich H. 1906. Over the adsorption in solution. *The Journal of Physical Chemistry*, 57: 385.
9. İmecik, Z., Dığrak, M. & Halipçi, H.N. 2014. Metilen mavisinin sulu ortamdan *Platanus orientalis* L. biyoması kullanılarak giderimi. *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 4(2): 64-69.
10. Khataee, A.R., Vafaei, F. & Jannatkah, M. 2013. Biosorption of three textile dyes from contaminated water by filamentous green algal *Spirogyra* sp.: Kinetic, isotherm and thermodynamic studies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 83: 33-40.
11. Kushwaha, A.K., Gupta, N. & Chattopadhyaya, M.C. 2014. Removal of cationic methylene blue and malachite green dyes from aqueous solution by waste materials of *Daucus carota*. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18: 200-207.
12. Langmuir, I. 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of American Chemical Society*, 40: 1361-1403.
13. Lesmana, S.O., Febriana, N., Soetaredjo, F.E., Sunarso, J. & Ismadji, S. 2009. Studies on potential applications of biomass for the separation of heavy metals from water and wastewater, *Biochemical Engineering Journal*, 44(1): 19-41.
14. Lim, L.B.L., Priyantha, N., Ing, C.H., Dahri, M.K., Tennakoon, D.T.B., Zehra, T. & Sukleung, M. 2015. *Artocarpus odoratissimus* skin as potential low-cost biosorbent for the removal of methylene blue and methyl violet 2B. *Desalination and Water Treatment*, 53(4): 964-975.
15. Marungrueng, K. & Pavasant, P. 2007. High performance biosorbent (*Caulerpa lentillifera*) for basic dye removal. *Biorescience Technology*, 98: 1567-1572.
16. Me'tivier-Pignon, H., Faur-Brasquet, C. & Le Cloirec, P. 2003. Adsorption of dyes onto activated carbon cloths: approach of adsorption mechanisms and coupling of ACC with ultrafiltration to treat coloured wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 31: 3-11.
17. Mikati, F. & El Jamal, M. 2013. Biosorption of methylene blue on chemically modified *Chaetophora elegans* algae by carboxylic acids. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 72: 428-434.
18. Mikati, F.M., Saade, N.A., Slim, K.A. & El Jamal, M.M. 2013. Biosorption of methylene blue on chemically modified *Chaetophora elegans* alga by HCl and citric acid. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 48(1): 61-71.
19. Ncibi, M.C., Mahjoub, B. & Mongi, S. 2007. Kinetic and equilibrium studies of methylene blue biosorption by *Posidonia oceanica* (L.) fibres. *Journal of Hazardous Materials*, 139(2): 280-285.
20. Ncibi, M.C., Hamissa, A.M.B., Fathallah, A., Kortas, M. H., Baklouti, T., Mahjoub, B. & Seffen, M. 2009. Biosorptive uptake of methylene blue using Mediterranean green alga *Enteromorpha* spp. *Journal of Hazardous Materials*, 170(2-3): 1050-1055.
21. Ozudogru, Y., Merdivan, M. & Goksan, T. 2017. Removal of methylene blue from aqueous solutions by Brown alga *Cystoseira barbata*. *Desalination and Water Treatment*, 1-6.
22. Padmesh, T.V.N., Vijayaraghavan, K., Sekaran, G. & Velan, M. 2005. Batch and column studies on biosorption of acid dyes on fresh water macro alga *Azolla Filiculoides*. *Journal of Hazardous Materials B*, 125: 121-129.
23. Rafatullah, M., Sulaiman, O., Hashim, R. & Ahmad, A. 2010. Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 177: 70-80.
24. Rubin, E., Rodriguez, P., Herrero, R., Cremades, J., Barbara, J. & Sastre de Vicente, M.E. 2005. Removal of Methylene Blue from aqueous solutions using as biosorbent *Sargassum muticum*: an invasive macroalga in Europe. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80: 291-298.
25. Rubin, E., Rodriguez, P., Herrero, R. & Sastre de Vicente, M.E. 2010. Adsorption of Methylene Blue on Chemically Modified Algal Biomass: Equilibrium, Dynamic, and Surface Data. *Journal of Chemical Engineering Data*, 55: 5707-5714.
26. Tsai, W., Chen, H. & Kuo, K. 2011. Surface characterization of dead microalgae-based biomass using methylene blue adsorption. *Surface and Interface Analysis*, 43(6): 959-963.

27. Vijayaraghavan, J., Bhagavathi Pushpa, T., Sardhar Basha, S.J., Vijayaraghavan, K. & Jegan, J. 2015. Evaluation of red marine alga *Kappaphycus alvarezii* as biosorbents for methylene blue: isotherm, kinetic, and mechanism studies, *Separation Science and Technology*, 50: 1120-1126.
28. Vijayaraghavan, J., Bhagavathi Pushpa, T., Sardhar Basha, S.J & Jegan, J. 2016. Isotherm, kinetics and mechanistic studies of methylene blue biosorption onto red seaweed *Gracilaria corticata*. *Desalination and Water Treatment*, 57(29): 13540- 13548.
29. Zazouli, M.A. & Moradi, E. 2015. Adsorption acid red 18 dye using *Sargassum glaucescens* biomass from aqueous solutions, *Iranian Journal of Health Sciences*, 3(2): 7-13.

CONTRIBUTIONS TO APHIDIINAE (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) FAUNA OF TURKEY WITH NEW RECORDS

Serdar AKAR, Özlem ÇETİN ERDOĞAN*

Trakya University, Faculty of Science, Department of Biology, 22030, Edirne

*Corresponding author: e-mail: cetinozlem@hotmail.com

Received (Alınış): 30 December 2016, Accepted (Kabul): 15 May 2017, Online First (Erken Görünüm): 1 June 2017, Published (Basım): 15 December 2017

Abstract: Samples were collected from eight different habitats by using either a sweeping-net and Malesian trap in Edirne province of European Turkey in the Spring, Summer and Autumn of 2014. A total of six genera and 27 species have been identified. Of these, nine species (*Aphidius eadyi* Starý, Gonzales & Hall, 1980, *A. rosae* Haliday, 1834, *A. picipes* (Nees, 1811), *Binodoxys acalephae* (Haliday, 1833), *Ephedrus persicae* Frogatt, 1904, *Lysiphlebus confusus* Tremblay & Eady, 1978, *Praon abjectum* (Haliday, 1833), *P. pubescens* Starý, 1961, *P. yomenae* Takada, 1968) are new records for the Edirne Aphidiinae fauna and seven of them (*Aphidius smithii* Sharma & Subba Rao, 1959, *A. microlophii* Pennachio & Tremblay, 1987, *Lysiphlebus fritzmuelleri* Mackauer, 1960, *Praon athenaeum* Kavallieratos & Lykouressis, 2000, *P. flavinode* (Haliday, 1833), *P. nonveilleri* Tomanović & Kavallieratos, 2003, *P. uroleucon* Tomanović & Kavallieratos, 2003) are new records for Turkish Aphidiinae fauna.

Key words: Braconidae, Aphidiinae, fauna, Edirne, Turkey.

Türkiye Aphidiinae Faunasına (Hymenoptera: Braconidae) Yeni Kayıtlar ile Katkılar

Özet: Edirne ili Aphidiinae faunasını tespit etmeye yönelik 2014 yılı ilkbahar, yaz ve sonbahar mevsimleri içinde yapılan bu çalışmada örnekler atrap ve Malezya tuzakları kullanılarak sekiz farklı habitattan toplanmıştır. Aphidiinae altfamilyasına ait 6 cins ve 27 tür saptanmıştır. Tespit edilen türlerin 9'u (*Aphidius eadyi* Starý, Gonzales & Hall, 1980, *A. rosae* Haliday, 1834, *A. picipes* (Nees, 1811), *Binodoxys acalephae* (Haliday, 1833), *Ephedrus persicae* Frogatt, 1904, *Lysiphlebus confusus* Tremblay & Eady, 1978, *Praon abjectum* (Haliday, 1833), *P. pubescens* Starý, 1961, *P. yomenae* Takada, 1968) Edirne Aphidiinae faunası için, 7'si (*Aphidius smithii* Sharma & Subba Rao, 1959, *A. microlophii* Pennachio & Tremblay, 1987, *Lysiphlebus fritzmuelleri* Mackauer, 1960, *Praon athenaeum* Kavallieratos & Lykouressis, 2000, *P. flavinode* (Haliday, 1833), *P. nonveilleri* Tomanović & Kavallieratos, 2003, *P. uroleucon* Tomanović & Kavallieratos, 2003) Türkiye Aphidiinae faunası için yeni kayıttır.

Anahtar kelimeler: Braconidae, Aphidiinae, fauna, Edirne, Türkiye.

Introduction

Over 600 species of aphid parasitoids are described worldwide (Yu *et al.* 2012). All members of the subfamily Aphidiinae are solitary and koinobiont endoparasitoid of aphids, and can be considered as important biological control agents (Shaw & Huddleston 1991).

To date, a total of 252 species of Aphidiinae have been reported from the West Palearctic region and 241 species from Europe (Yu *et al.* 2012).

Although some studies have been conducted on the species of Aphidiinae occurring in Turkey, distribution data of this subfamily have been limited to tritrophic records (Düzgüneş *et al.* 1982, Erkin 1983, Karaat & Göven 1986, Avcı & Özbek 1991, Atakan & Özgür 1994, Elmalı & Toros 1994, Özder & Toros 1999, Ölmez & Ulusoy 2003, Aslan *et al.* 2004, El-Malı *et al.* 2004, Güz & Kılınçer 2005, Şahbaz & Uysal 2006).

The first detailed faunistic study of the Aphidiinae fauna of Turkey was carried out by Çetin Erdoğan *et al.* (2008) in the Marmara region of Turkey. They reported a total of 18 species for the region. There are also other studies regarding the Aphidiinae fauna of Turkey. For example, Tomonovic *et al.* (2008) determined eight Aphidiine species from Turkey, and Çetin Erdoğan *et al.* (2010) found 12 species from the Black sea region to date, 47 Aphidiinae species have been recorded from Turkey (Çetin Erdoğan *et al.* 2008, Tomonović *et al.* 2008, Çetin Erdoğan *et al.* 2010, Yu *et al.* 2012).

So far, only 14 species from Edirne and surrounding areas have been listed in the studies of Tomonović *et al.* 2008, Çetin Erdoğan *et al.* 2008 and 2010. The aim of the present study is to contribute to the knowledge of the

Aphidiinae fauna of the Edirne province by evaluating the materials collected from different localities.

Materials and Methods

The study area included 126 localities in Edirne between April and September 2014 (Fig. 1, Table 1). Adult wasps were collected mainly from herbaceous plants in a variety of different habitats such as open habitats, pine forest, oak forest, fruit gardens, clover fields, agricultural fields. Samples were collected by Malaise traps and a standard sweeping net. The specimens were identified using the keys by Starý (1976), Tobias (1995), Tomonović *et al.* (2003) and Kavallieratos *et al.* (2001, 2005). Adult Aphidiinae species from Serbia (provided by Dr Z. Tomonovic) were used as comparison material. Information on the general zoogeographic distribution of Aphidiinae follows Yu *et al.* (2012). All specimens are deposited in the collection of the Department of Entomology, Trakya University, Edirne, Turkey.

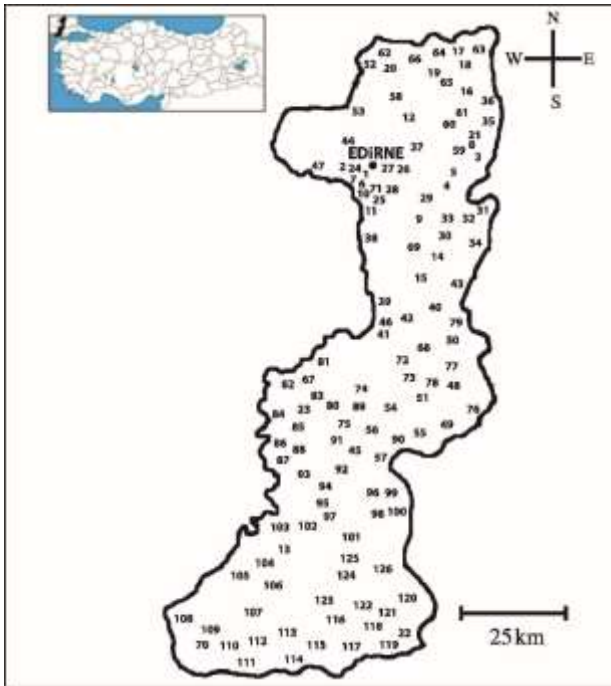


Fig. 1. Map reference for the collection sites (Numbers denote the names of the sites in the Table 1).

Results

Genus *Aphidius* Nees, 1819

Aphidius colemani Viereck, 1912

Material: **22:** 264m, 07.06.2014, ♂.

Aphidius eadyi Starý, Gonzales & Hall, 1980

Material: **6:** 46m, 26.07.2014, ♀.

Aphidius ervi Haliday, 1834

Material: **1:** 62m, 06.04.2014, ♂, 10.04.2014, ♂, 03.05.2014, ♂, 02.06.2014, 2♀♀, 02.07.2014, 2♀♀,

2♂♂, 24.07.2014 ♀, ♂; **3:** 153m, 20.05.2014, 6♀♀, 2♂♂, 21.05.2014, 2♀♀, 3♂♂, 23.05.2014, ♀, 2♂♂, 25.05.2014, ♀, ♂, 10.06.2014, 7♀♀, 7♂♂, 14.06.2014, 3♀♀, 2♂♂, 17.06.2014, ♂, (Light trap), 18.06.2014, 6♀♀, 6♂♂, 01.07.2014, 2♂♂, 08.07.2014, 4♀♀, ♂, 14.07.2014, ♀; **2:** 40m, 03.05.2014, ♂; **4:** 107m, 22.05.2014, 34♀♀, ♂; **5:** 116m, 22.05.2014, ♂; **6:** 46m, 10.06.2014, ♀, ♂; **7:** 47m, 28.05.2014, ♀; **8:** 204m, 28.05.2014, ♀, 31.05.2014, ♀; **10:** 34m, 29.05.2014, 34♀♀, 2♂♂; **11:** 42m, 29.05.2014, 48♀♀, 3♂♂; **12:** 144m, 01.06.2014, 86♀♀, 28♂♂; **13:** 97m, 01.06.2014, ♂; **14:** 68m, 03.06.2014, 9♀♀, 3♂♂; **16:** 260m, 04.06.2014, ♀; **17:** 403m, 04.06.2014, 2♀♀; **19:** 485m, 05.06.2014, 8♀♀, 2♂♂; **22:** 264m, 07.06.2014, 3♀♀; **23:** 23m, 08.06.2014, ♀, 30.07.2014, ♀; **26:** 105m, 10.06.2014, 2♀♀, 4♂♂; **27:** 76m, 10.06.2014, 43♀♀, 26♂♂; **28:** 78m, 10.06.2014, 64♀♀, 14♂♂; **29:** 129m, 10.06.2014, 3♀♀, ♂; **30:** 79 m, 11.06.2014, ♀, ♂; **31:** 109m, 11.06.2014, 45♀♀, 11♂♂; **32:** 68m, 11.06.2014, 2♀♀, ♂; **33:** 85m, 11.06.2014, 47♀♀, 10♂♂; **34:** 54m, 11.06.2014, 9♀♀, 2♂♂; **36:** 256m, 13.06.2014, ♀, ♂; **39:** 41m, 13.06.2014, 3♀♀, 5♂♂, 30.07.2014, ♂; **41:** 23m, 13.06.2014, 6♀♀, 2♂♂; **42:** 90m, 13.06.2014, ♂, **43:** 43m, 18.06.2014, 53♀♀, 17♂♂; ♀♀; **45:** 19m, 21.06.2014, ♀, 2♂♂; **46:** 39m, 21.06.2014, 2♀♀; **48:** 111m, 03.07.2014, ♀, 2♂♂; **49:** 103m, 03.07.2014, ♂; **50:** 22m, 03.07.2014, 2♀♀, 2♂♂; **51:** 64m, 03.07.2014, ♂, 13.07.2014, ♂; **52:** 196m, 05.07.2014, ♂; **53:** 60m, 05.07.2014, 3♀♀; **55:** 252m, 07.07.2014, ♂; **56:** 36m, 07.07.2014, 7♀♀, 2♂♂; **57:** 62m, 07.07.2014, 4♀♀; **58:** 149m, 09.07.2014, ♂; **59:** 134m, 08.07.2014, 4♀♀, 7♂♂, 13.07.2014, ♀; **60:** 166m, 15.07.2014, ♀.

Aphidius funebris Mackauer, 1961

Material: **1:** 62m, 24.07.2014, ♂; **70:** 10m, 22.08.2014, ♀.

Aphidius matricariae Haliday, 1834

Material: **1:** 62m, 02.07.2014, 2♀♀.

Aphidius microlophii Pennachio & Tremblay, 1987

Material: **1:** 62m, 02.07.2014, ♂; **3:** 153m, 20.05.2014, ♀, 25.05.2014, ♀; **10:** 34m, 29.05.2014, 6♀♀; **12:** 144m, 01.06.2014, ♀; **19:** 485m, 05.06.2014, 2♀♀; **23:** 23m, 30.07.2014, ♀; **31:** 109m, 11.06.2014, 5♀♀; **33:** 85m, 11.06.2014, 2♀♀; **38:** 89m, 13.06.2014, ♂; **57:** 62m, 07.07.2014, ♀, **39:** 41m, 13.06.2014, ♀; **43:** 43m, 18.06.2014, 7♀♀.

Aphidius picipes (Nees, 1811)

Material: **10:** 34m, 29.05.2014, ♀; **40:** 85m, 13.06.2014, ♀; **43:** 43m, 18.06.2014, 2♀♀.

Aphidius rosae Haliday, 1834

Material: **1:** 62m, 21.05.2014, 4♀♀, ♂, 25.05.2014, ♀, ♂, 30.05.2014, ♀, 12.06.2014, ♀; **2:** 40m, 03.05.2014, ♀, ♂; **3:** 153m, 05.05.2014, ♀, 20.05.2014, 5♀♀, 10.06.2014 ♀, 18.06.2014 ♂, 01.07.2014, ♂, 14.07.2014, ♀; **4:** 107m, 15♀♀, **7:** 47m, 27.05.2014, ♀; **8:** 204m, 28.05.2014, ♂; **10:** 34m, 29.05.2014, 5♀♀, ♂; **11:** 42m, 29.05.2014,

6♀♀, ♂; **12:** 144m, 01.06.2014, 21♀♀; **18:** 350m, 04.06.2014, ♀; **21:** 203m, 07.06.2014, ♂, 28.06.2014; **22:** 264m, 07.06.2014, ♂; **24:** 59m, 09.06.2014, ♀; **25:** 51m, 09.06.2014, ♂; **26:** 105m, 10.06.2014, 4♀♀; **27:** 76m, 2♀♀; **28:** 78m, 10.06.2014, 5♀♀, ♂; **31:** 109m, 11.06.2014, 2♀♀, 2♂♂; **32:** 68m, 11.06.2014, ♂; **33:** 85m, 11.06.2014, ♀; **35:** 239m 12.06.2014, ♂; **37:** 125m, 13.06.2014, 5♀♀, ♂; **41:** 23m, 13.06.2014 ♀; **43:** 43m, 18.06.2014, 8♀♀, ♂; **48:** 111m, 03.07.2014, 2♀♀; **50:** 22m, 5♀♀, ♂; **54:** 45m, 07.07.2014, ♀; **56:** 36m, 07.07.2014, 9♀♀, ♂; **57:** 62m, 07.07.2014, ♀; **59:** 134m, 08.07.2014, 2♀♀, ♂; **67:** 19m, 30.07.2014, ♀; **69:** 70m, 01.08.2014, ♀; **71:** 43m, 10.10.2014, ♂.

Aphidius smithi Sharma & Subba Rao, 1959

Material: **59:** 134m, 08.07.2014, ♂.

Aphidius urticae Haliday, 1834

Material: **2:** 40m, 23.05.2014, ♀; **37:** 125m, 27.07.2014, ♀.

Genus *Binodoxys* Mackauer, 1960

Binodoxys acalephae (Marshall, 1896)

Material: **68:** 16m, 30.07.2014, ♀.

Binodoxys angelicae (Haliday, 1833)

Material: **1:** 62m, 25.05.2014, 2♀♀; **17:** 403m, 30.09.2014, ♀

Genus *Diaeretiella* Starý, 1960

Diaeretiella rapae (M'Intosh, 1855)

Material: **1:** 62m, 06.04.2014, ♂, 10.04.2014, ♂, 20.04.2014, ♂, 21.05.2014, ♀, ♂; **3:** 153m, 20.05.2014, ♂; **39:** 41m, 13.06.2014, ♂; **59:** 134m, 13.07.2014, ♀.

Genus *Ephedrus* Haliday, 1833

Ephedrus persicae Frogatt 1904

Material: **3:** 153m, 20.05.2014, ♀; 23.05.2014, ♀, 25.05.2014, 3♀♀, ♂.

Ephedrus plagiator (Nees, 1811)

Material: **51:** 64m, 13.07.2014, ♀; **52:** 196 m, 05.07.2014, 2♂♂.

Genus *Lysiphlebus* Foerster, 1862

Lysiphlebus confusus Tremblay & Eady, 1978

Material: **1:** 62m, 24.07.2014, 16♂♂; **6:** 46m, 27.05.2014, ♀; **31:** 109m, 11.06.2014, 11♂♂; **37:** 125m, 13.06.2014, 10♂♂; **47:** 38m, 24.06.2014, ♂.

Lysiphlebus fabarum (Marshall, 1896)

Material: **3:** 153m, 11.07.2014, 2♀♀; **6:** 46m, 27.05.2014, 3♀♀; **20:** 354m, 06.06.2014, ♀; **22:** 264m, 07.06.2014, ♀; **26:** 105m, 10.06.2014, ♀; **1:** 62m, 24.07.2014, 2♀♀, 2♂♂; **31:** 109m, 11.06.2014, 3♀♀; **37:** 125m, 13.06.2014, 3♀♀; **44:** 41m, 20.06.2014, ♀.

Lysiphlebus fritzmulleri Mackauer, 1960

Material: **6:** 46m, 27.05.2014, 12♀♀, 17♂♂; **9:** 84m, 29.05.2014, 2♀♀, 2♂♂.

Genus *Praon* Haliday, 1833

Praon abjectum (Haliday, 1833)

Material: **64:** 411m, 15.07.2014, ♀.

Praon athenaeum Kavallieratos & Lykouressis, 2000

Material: **9:** 84m, 29.05.2014, 2♀♀; **3:** 153m, 27.05.2014, ♀, 14.06.2014, ♀; **43:** 43m, 18.06.2014, ♀.

Praon exsoletum (Nees, 1811)

Material: **1:** 62m, 02.06.2014, ♀; **3:** 153m, 25.05.2014, 3♀♀; **27:** 76m, 10.06.2014, ♀, **39:** 41m, 13.06.2014, ♀; **58:** 149m, 09.07.2014, ♀; **59:** 134m, 08.07.2014, ♂; **60:** 166m, 15.07.2014, ♀; **61:** 196m, 15.07.2014, ♀; **63:** 362m, 15.07.2014, 2♀♀; **64:** 411m, 15.07.2014, ♀; **65:** 317m, 15.07.2014, ♀.

Praon flavinode (Haliday, 1833)

Material: **62:** 452m, 15.07.2014, ♀.

Praon nonveilleri Tomanović & Kavallieratos, 2003

Material: **3:** 153m, 03.06.2014, 9 ♀♀.

Praon pubescens Starý, 1961

Material: **1:** 62m, 24.07.2014, ♀, 13.9.2014, ♀; **53:** 60m, 05.07.2014, ♀.

Praon uroleucon Tomonovic & Kavallieratos, 2003

Material: **1:** 62m, 06.06.2014, ♀; **3:** 153m, 20.05.2014, ♀; **15:** 51m, 03.06.2014, ♀; **66:** 358m, 15.07.2014, ♀.

Praon volucre (Haliday, 1833)

Material: **1:** 62m, 02.07.2014, 2 ♀♀, 24.07.2014, ♀; **3:** 153m, 20.05.2014, 2♀♀, 25.05.2014, 3♀♀, 02.06.2014, 11♀♀, 3♂♂, 02.06.2014, 18♀♀, 13♂♂, 05.06.2014 ♀; **17:** 403m, 04.06.2014, 2♀♀; **19:** 485m, 05.06.2014, ♀; **29:** 129m, 10.06.2014, 5♀♀; **34:** 54m, 11.06.2014, 2♀♀; **42:** 90m, 13.06.2014, ♀; **43:** 43m, 18.06.2014, ♀.

Praon yomenae Takada, 1968

Material: **3:** 153m, 20.05.2014, 2♀♀, 01.07.2017, ♀; **13:** 97m, 01.06.2014, ♀; **14:** 68m, 03.06.2014, ♀; **58:** 149m, 09.07.2014, ♀.

Discussion

In this study, the fauna of Aphidiinae within 126 localities and 8 different habitats in Edirne province between April-September 2014 have been investigated. As a result, 27 species of Aphidiinae belonging to 6 genera (*Aphidius*, *Binodoxys*, *Diaeretiella*, *Ephedrus*, *Lysiphlebus*, *Praon*) from 71 localities were determined. Our lack of records in 55 localities may be due to collecting period in this localities made in an appropriate season.

Table 1. Collection sites and geographic coordinates in Edirne (for map reference see Figure 1).

Locality No	Locality	Coordinate	Locality No	Locality	Coordinate
1	T.Ü. Balkan Yerleşkesi	41°38'41" N 26°37'20" E	64	Lalapaşa-Kalkansöğüt	41°58'30" N 26°48'29" E
2	Hadımağa	41°41'34" N 26°33'53" E	65	Lalapaşa-Sarıdanışment	41°52'20" N 26°50'19" E
3	Süloğlu-Büyük Gerdelli	41°44'21" N 26°56'47" E	66	Lalapaşa-Çallidere	41°56'26" N 26°43'15" E
4	Havsa-Musulca	41°40'13" N 26°52'15" E	67	Meriç-Hasırcıarnavut	41°16'47" N 26°27'04" E
5	Havsa-Arpaç	41°04'08" N 26°53'09" E	68	Uzunköprü-Yeniköy	41°16'19" N 26°41'05" E
6	Merkez	41°39'48" N 26°35'01" E	69	Havsa-Abalar	41°33'14" N 26°44'39" E
7	Kent orman	41°39'41" N 26°32'29" E	70	Enez-Sultaniçe	40°37'05" N 26°00'12" E
8	Süloğlu	41°46'16" N 26°52'52" E	71	Karaağaç	41°39'25" N 26°29'37" E
9	Havsa-Oğulpaşa	41°35'50" N 26°44'50" E	72	Uzunköprü-Değirmenci	41°18'38" N 26°41'55" E
10	Bosnaköy	41°37'16" N 26°34'01" E	73	Uzunköprü-Merkez	41°17'01" N 26°41'01" E
11	Üyükütatar	41°32'18" N 26°36'48" E	74	Uzunköprü-Çiftlikköy	41°14'46" N 26°36'20" E
12	Lalapaşa- Kavaklı	41°47'31" N 26°45'29" E	75	Uzunköprü-Balaban	41°04'59" N 26°32'13" E
13	İpsala-Korucuköy	40°53'44" N 26°29'20" E	76	Uzunköprü-Gazimehmet	41°12'15" N 26°56'04" E
14	Havsa- Kuzucu	41°30'01" N 26°48'59" E	77	Uzunköprü-Bayramlı	41°19'18" N 26°48'59" E
15	Havsa- Şerbettar	41°28'09" N 26°45'55" E	78	Uzunköprü-Başağıl	41°14'52" N 26°48'52" E
16	Süloğlu-Tatarlar	41°50'00" N 26°53'29" E	79	Uzunköprü-Sazlımalkoç	41°20'49" N 26°53'29" E
17	Lalapaşa-Vaysal	41°55'44" N 26°51'44" E	80	Uzunköprü-Karayayla	41°15'19" N 26°34'32" E
18	Lalapaşa-S.danişment	41°53'55" N 26°54'10" E	81	Meriç-Rahmanca	41°17'39" N 26°29'23" E
19	Lalapaşa- Hacıdanışment	41°54'44" N 26°49'47" E	82	Meriç-Karayusuflu	41°15'53" N 26°29'23" E
20	Lalapaşa-Doğanköy	41°55'36" N 26°42'00" E	83	Meriç-Olacak	41°13'00" N 26°28'42" E
21	Süloğlu-S.Barajı	41°47'35" N 26°54'44" E	84	Meriç-Kadıondurma	41°10'25" N 26°20'38" E
22	Keşan-Korudağ	40°41'26" N 26°43'25" E	85	Meriç-Subaşı	41°09'19" N 26°22'04" E
23	Meriç	41°11'13" N 26°25'05" E	86	Meriç-Küplü	41°06'09" N 26°20'37" E
24	Merkez-Binevler	41°39'54" N 26°36'17" E	87	Meriç-Adasarhanlı	41°04'58" N 26°21'55" E
25	Tayakadın	41°35'13" N 26°40'00" E	88	Meriç-Küçükaltıağaç	41°06'48" N 26°27'08" E
26	Demirhanlı	41°41'45" N 26°43'49" E	89	Uzunköprü-Çobanpınar	41°10'34" N 26°33'51" E
27	Hıdırağa	41°44'10" N 26°39'48" E	90	Uzunköprü-Kırköy	41°07'15" N 26°44'13" E
28	Köşenköy	41°39'38" N 26°41'20" E	91	Uzunköprü-Balaban	41°04'54" N 26°32'22" E
29	Havsa- Habiller	41°40'14" N 26°48'23" E	92	İpsala-Karaağaç	41°03'16" N 26°32'39" E
30	Havsa	41°33'34" N 26°49'56" E	93	İpsala-Balabancık	41°02'10" N 26°23'51" E
31	Havsa-Bostanlı	41°36'37" N 26°58'27" E	94	İpsala-Sultan	41°00'36" N 26°28'24" E

Table 1. Continued.

Locality No	Locality	Coordinate	Locality No	Locality	Coordinate
32	Havsa-Köseömer	41°35'13" N 26°56'00" E	95	İpsala-İbriktepe	41°01'52" N 26°30'30" E
33	Havsa-Osmanlı	41°35'15" N 26°50'20" E	96	İpsala-Kozköy	41°01'50" N 26°36'51" E
34	Havsa-Yolageldi	41°30'26" N 26°56'54" E	97	İpsala-Pazardere	41°58'12" N 26°34'45" E
35	Süloğlu-Keramettin	41°47'37" N 26°59'06" E	98	Keşan-Çobançeşmesi	40°57'36" N 26°39'52" E
36	Süloğlu-Çeşmeköy	41°52'08" N 26°58'36" E	99	Keşan-Altıntaş	41°00'00" N 26°42'48" E
37	Hacıumur	41°43'14" N 26°47'54" E	100	Keşan-Karasatı	40°58'27" N 26°41'23" E
38	Orhaniye	41°30'57" N 26°39'22" E	101	Keşan-Beğendik	40°55'53" N 26°33'25" E
39	Uzunköprü-Saçlımüsellim	41°25'16" N 26°38'01" E	102	İpsala-Turpçular	40°57'25" N 26°25'55" E
40	Uzunköprü-Kırcasalih	41°23'55" N 26°47'50" E	103	İpsala-Sarıcaali	40°58'34" N 26°22'42" E
41	Uzunköprü-Eskiköy	41°20'34" N 26°37'43" E	104	İpsala-Ahır	40°53'53" N 26°22'01" E
42	Uzunköprü-Meşeli	41°23'21" N 26°43'24" E	105	İpsala-Yenikarpuzlu	40°50'00" N 26°17'23" E
43	Havsa-Tahal	41°25'22" N 26°51'28" E	106	İpsala-Koyuntepe	40°46'15" N 26°18'45" E
44	Merkez-Büyükdöllük	41°45'16" N 26°34'54" E	107	Enez-Işıklı	40°42'32" N 26°17'33" E
45	Uzunköprü-Altınyazı	41°04'28" N 26°34'19" E	108	Enez	40°43'03" N 26°04'59" E
46	Uzunköprü-Çakmakköy	41°22'17" N 26°40'08" E	109	Enez-Yenice	40°41'45" N 26°09'02" E
47	Yenikadın	41°41'16" N 26°2'21" E	110	Enez-Küçükkevren	40°37'52" N 26°11'10" E
48	Uzunköprü-Sipahi	41°13'14" N 26°53'02" E	111	Enez-Abdurrahim	40°38'44" N 26°16'32" E
49	Uzunköprü-Yağmurca	41°10'08" N 26°51'37" E	112	Enez-Hasköy	40°39'59" N 26°19'34" E
50	Uzunköprü-Muhacırcadı	41°20'21" N 26°53'59" E	113	Keşan-Çelebi	40°41'14" N 26°21'12" E
51	Uzunköprü-Çöpköy	41°12'50" N 26°49'43" E	114	Keşan-Yaylaköy	40°37'59" N 26°24'07" E
52	Lalapaşa-Uzunbayır	41°55'28" N 26°35'16" E	115	Keşan-Koruklu	40°39'26" N 26°25'31" E
53	Suakacağı	41°50'40" N 26°35'05" E	116	Keşan-Suluca	40°41'29" N 26°27'33" E
54	Uzunköprü-Kavacık	41°10'45" N 26°40'36" E	117	Keşan-Mecidiye	40°37'29" N 26°34'47" E
55	Uzunköprü-Süleymaniye	41°07'29" N 26°49'46" E	118	Keşan-Çeltik	40°41'07" N 26°34'31" E
56	Uzunköprü-Karapınar	41°06'42" N 26°37'56" E	119	Keşan-Sazlıdere	40°39'52" N 26°42'00" E
57	Uzunköprü-Alıçköyü	41°04'41" N 26°04'41" E	120	Keşan-Bahçeköy	40°47'04" N 26°40'19" E
58	Lalapaşa-Çömlekakpınar	41°50'03" N 26°38'30" E	121	Keşan-Çamlıca	40°45'44" N 26°40'05" E
59	Süloğlu-Küküler	41°43'41" N 26°54'02" E	122	Keşan-Mercan	40°44'52" N 26°35'56" E
60	Süloğlu-Yağcılı	41°47'31" N 26°47'57" E	123	Keşan-Orhaniye	40°45'12" N 26°23'55" E
61	Süloğlu-Taşlısekban	41°47'46" N 26°52'42" E	124	Keşan-Karahisar	40°45'57" N 26°30'37" E
62	Lalapaşa-Hamzabeyli	41°57'54" N 26°39'34" E	125	Keşan-Boztepe	40°51'00" N 26°31'45" E
63	Lalapaşa-Ömeroba	41°56'30" N 26°43'14" E	126	Keşan-Yenimuhacı	40°51'37" N 26°41'20" E

Table 2. Aphidiinae of Edirne and their distributions within habitats. The species new to the Edirne fauna are marked with (*) and new to the Turkish fauna are marked with (**).

	Pine forest	Oak forest	Fruit garden	Clover field	Asteracea field	<i>Populus</i> sp. and <i>Salix</i> sp.	Herbaceous plants in agricultural area	Herbaceous plants of creek side	TOTAL
<i>Aphidius colemani</i>	•								1
<i>Aphidius eadyi</i> *			•						1
<i>Aphidius ervi</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	8
<i>Aphidius funebris</i>				•			•		2
<i>Aphidius matricariae</i>							•		1
<i>Aphidius microlophii</i> **		•	•	•	•		•		5
<i>Aphidius picipes</i> *							•		1
<i>Aphidius rosae</i> *	•	•	•	•		•	•		6
<i>Aphidius smithii</i> **		•							1
<i>Aphidius urticae</i>							•		1
<i>Binodoxys acalephae</i> *							•		1
<i>Binodoxys angelicae</i>							•		1
<i>Diaeretiella rapae</i>		•	•				•		3
<i>Ephedrus persicae</i> *			•						1
<i>Ephedrus plagiator</i>							•		1
<i>Lysiphlebus confusus</i> *			•	•			•		3
<i>Lysiphlebus fabarum</i>	•		•	•			•	•	5
<i>Lysiphlebus fritzmuelleri</i> **			•				•		2
<i>Praon abjectum</i> *							•		1
<i>Praon athenaeum</i> **			•				•		2
<i>Praon exsoletum</i>		•	•	•			•	•	5
<i>Praon flavinode</i> **								•	1
<i>Praon nonveilleri</i> **			•						1
<i>Praon pubescens</i> *							•		1
<i>Praon uroleucon</i> **			•				•	•	3
<i>Praon volucre</i>		•	•				•		3
<i>Praon yomenae</i> *			•				•	•	3
TOTAL	4	7	15	7	2	2	21	6	

Among these species, 7 of them (*Aphidius smithii*, *Aphidius microlophii*, *Lysiphlebus* (*Phlebus*) *fritzmuelleri*, *Praon athenaeum*, *P. flavinode*, *P. nonveilleri*, *P. uroleucon*) are new records for Turkish Aphidiinae fauna and 9 of them (*Aphidius eadyi*, *A. rosae*, *A. picipes*, *Binodoxys acalephae*, *Ephedrus persicae*, *Lysiphlebus* (*Phlebus*) *confusus*, *Praon abjectum*, *P. pubescens*, *P. yomenae*) are new records Edirne Aphidiinae fauna.

The number of species of each genus is represented by: *Aphidius*: 10, *Binodoxys*: 2, *Diaeretiella*: 1, *Ephedrus*: 2, *Lysiphlebus*: 3 and *Praon*: 9. These numbers of species

are relatively proper compared to the Palearctic regions. Species of *Aphidius* and *Praon* have a wide distribution in Palaearctic and they are represented by more species than the others.

Among the determined species, *Aphidius ervi* appeared to be the most abundant species in Edirne which is recorded from 45 different localities. Large number of *Aphidius ervi* can be explained due to it has a wide host range compared to other species.

In the eight different habitats, it could not be observed the same species but *Aphidius ervi*, *A. rosae* are

ecologically the most tolerant species. *A. microlophii*, *L. fabarum* and *P. exsoletum* are recorded from 5 habitats and also from almost equal localities. Fourteen species (*Aphidius colemani*, *A. eadyi*, *A. matricariae*, *A. picipes*, *A. smithii*, *A. urticae*, *Binodoxys acalephae*, *B. angelicae*, *Ephedrus persicae*, *E. plagiator*, *Praon abjectum*, *P. flavinode*, *P. nonveilleri*, and *P. pubescens*) were observed in only one habitat (Table 2).

The present study shows that nineteen species apparently prefer herbaceous plants in agricultural area and thirteen species prefer fruit garden. Other habitats represented by low number of species. The distributions

References

- Aslan, M.M., Uygun, N. & Starý, P. 2004. A survey of aphid parasitoids in Kahramanmaraş, Turkey (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae; and: Aphelinidae). *Phytoparasitica*, 32: 255-263.
- Atakan, E. & Özgür, A.F. 1994. Effect of natural enemies on the population development of cotton aphid (*Aphis gossypii* Glov.) (Homoptera: Aphididae). *Proceedings Third Turkish National Congress of Biological Control*, (İzmir, Turkey), pp. 459-470.
- Avcı, Ü. & Özbek, H. 1991. Investigations on the natural enemies of cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* L. (Homoptera: Aphididae) in Erzurum province. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 15: 37-41.
- Çetin Erdoğan, Ö., Tomanović, Ž. & Beyarslan, A. 2008. New aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in the region of Marmara. *Acta Entomologica Serbica*, 13: 85- 88.
- Çetin Erdoğan, Ö., Tomanović, Ž. & Beyarslan, A. 2010. New distributional records on the subfamily Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) in Black Sea Region, Turkey. *Linzer Biologische Beiträge*, 42: 613-616.
- Düzgüneş, Z., Toros, S., Kılınçer, N. & Kovancı, B. 1982. The parasites and the predators of Aphidoidea in Ankara. *Turkish Ministry of Agriculture*, Ankara, Turkey (Turkish, with English summary).
- Elmalı, M. & Toros, S. 1994. Investigations on the natural enemies of aphids damaging wheat plants in Konya province. *Proceedings Third Turkish National Congress of Biological Control* (İzmir, Turkey), pp. 13-29. (Turkish, with English abstract).
- El-Malı, M.U., Starý, P., Şahbaz, A. & Özsemerci, F. 2004. A review of aphid parasitoids (Hym., Braconidae, Aphidiinae) of Turkey. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 14: 355-370.
- Erkin, E. 1983. Investigations on the hosts distribution and efficiency of the natural enemies of the family Aphididae (Homoptera) harmful to pome and stone fruits trees in Izmir province of Aegean Region. *Turkish Journal of Plant Protection*, 7: 29-49.
- Güz, N. & Kılınçer, N. 2005. Aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) on weeds from Ankara, Turkey. *Phytoparasitica*, 33: 359-366.
- Karaat, S. & Göven, M.A. 1986. General status of natural enemies of green peach aphid (*Myzus persicae* Sulz.) in tobacco areas in southeastern Anatolia. *Proceedings First Turkish National Congress of Biological Control* (Adana, Turkey), pp. 162-172. (Turkish, with English abstract).
- Kavallieratos, N.G., Lykouressis, D.P., Sarlis, G.P., Stathas, G.J., Segovia, A.S. & Athanassiou, C.G. 2001. The Aphidiinae (Hymenoptera: Ichneumonoidea: Braconidae) of Greece. *Phytoparasitica*, 29: 306- 340.
- Kavallieratos, N.G., Tomanović, Z., Starý, P., Athanassiou, C.G., Fasseas, C., Petrović, O., Stanisavljević, Z.L. & Veroniki, M.A. 2005. *Praon* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) of Southeastern Europe: key, host range and phylogenetic relationships. *Zoologischer Anzeiger*, 243: 181-209.
- Ölmez, S. & Ulusoy, M.R. 2003. A survey of Aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in Diyarbakır, Turkey. *Phytoparasitica*, 31: 524-528.
- Özder, N. & Toros, S. 1999. Investigations on the natural enemies of aphid species damaging to wheat plants in Tekirdag province. *Proceedings of the Fourth Turkish National Congress of Biological Control* (Adana, Turkey), pp. 501-512.
- Shaw, M.R. & Huddleston, T. 1991. Classification and biology of braconid wasps (Hymenoptera: Braconidae). *Handbooks for the Identification of British Insects*, 7: 1-126.
- Starý, P. 1976. *Aphid parasites (Hymenoptera, Aphidiidae) of the Mediterranean area*. Transactions of the Czechoslovak Academy of Sciences, Series of Mathematical and Natural Sciences and Dr. W Junk, The Hague, 95 pp.
- Şahbaz, A. & Uysal, M. 2006. Konya ilinde kavaklarda beslenen yaprakbitlerinin (Homoptera: Aphididae) Predatör ve Parazitoitleri. *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20: 119-125. (In Turkish).
- Tomanović, Z., Kavallieratos, N.G., Starý, P., Athanassiou, C.G., Žikić, V., Petrović-Obradović, O. & Sarlis, G.P. 2003. *Aphidius* Nees Aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) in Serbia and Montenegro, tritrophic associations and key. *Acta Entomologica Serbica*, 8: 15-39.
- Tomanović, Z., Beyarslan, A., Çetin Erdoğan, Ö. & Žikić, V. 2008. New records of Aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) from Turkey. *Periodicum Biologorum*, 110: 335-338.

21. Tobias, V.I. 1995. *Keys to the Fauna of the USSR III, Hymenoptera V*. Lebanon, NH, USA: Science Publishers (translation from Russian).
22. Yu, D.S., Achterberg, C. & Horstmann, K. 2012. Interactive Catalogue of World Ichneumonoidea Taxonomy, biology, morphology and distribution, *Compact disc (Master version)*, Taxapad.

CHANGES IN PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS, ANTHOCYANIN CONTENT AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES OF MAIZE (*Zea mays* L.) SEEDLINGS UNDER HIGH TEMPERATURE STRESS CONDITIONS

Elif YÜZBAŞIOĞLU^{1*}, Eda DALYAN¹, Ilgın AKPINAR²

¹Department of Botany, Faculty of Science, Istanbul University, Süleymaniye, Istanbul

²Institute of Sciences, Istanbul University, Vezneciler, Istanbul

*Corresponding author: e-mail: aytamka@istanbul.edu.tr

Received (Alınış): 3 February 2017, Accepted (Kabul): 31 May 2017, Online First (Erken Görünüm): 26 July 2017, Published (Basım): 15 December 2017

Abstract: This study was performed in order to determine the effects of gradually increasing temperatures on maize, which belongs to the C₄ plant group. 20 day old seedlings were exposed to increasing heat stress (25/20, 30/25, 35/30, 40/35, 45/40°C at 16/8 photoperiods) for 5 days. The first temperature treatment (25/20°C) was used as control. Stress injury was measured in terms of malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H₂O₂), chlorophyll (*a* and *b*), carotenoid and anthocyanin contents and maximum quantum efficiency of photosystem II (Fv/Fm). MDA and H₂O₂ levels were found to significantly increase at high temperatures (35, 40, 45°C). Chlorophyll content was observed to be highest at 35°C and a decrease was determined at 40 and 45°C. Fv/Fm was found to decrease at 40 and 45°C. Carotenoid and anthocyanin contents dramatically increased under high temperature stress. In addition, significant increases were determined in the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) under high temperature (45°C), while peroxidase (POX) and glutathione S-transferase (GST) activities showed no change. Treatments above 35°C triggered high temperature stress in maize seedlings. The results of this study showed that temperatures above 35°C lead to stress effects on photosynthesis and induced enzymatic and non-enzymatic antioxidant activity in maize seedlings.

Key words: Anthocyanin, antioxidant enzymes, heat stress, maize.

Mısır (*Zea mays* L.) Fidelerinde Yüksek Sıcaklık Stresi Koşullarında Fotosentetik Pigmentler, Antosiyanin İçeriği ve Antioksidan Enzim Aktivitelerindeki Değişiklikler

Özet: Bu çalışmada, C₄ tipi fotosentez yapan mısır bitkisinde giderek artan sıcaklığın etkilerinin çalışılması amaçlanmıştır. 20 günlük fideler 5 gün boyunca giderek artan (25/20, 30/25, 35/30, 40/35, 45/40°C 16/8 fotoperiyot) sıcaklık stresine maruz bırakılmıştır. Uygulanan ilk sıcaklık (25/20°C) kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Stress hasarı, malondialdehit (MDA), hidrojen peroksit (H₂O₂), klorofil (*a* ve *b*), karotenoid ve antosiyanin içeriği ve fotosistem II'nin maksimum kuantum verimi (Fv/Fm) ile belirlenmiştir. MDA ve H₂O₂ seviyelerinin yüksek sıcaklıkta (35, 40, 45°C) önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Klorofil içeriğinin 35°C'de en yüksek olduğu gözlenmiştir ancak 35°C sıcaklık ile karşılaştırıldığında 40 ve 45°C uygulanan sıcaklıklarda klorofil içeriğinde azalma belirlenmiştir. Fv/Fm 40 ve 45°C sıcaklık uygulamasında düşüş göstermektedir. Karotenoid ve antosiyanin içeriği yüksek sıcaklık stresi altında önemli ölçüde artmaktadır. Ayrıca, yüksek sıcaklık da (45°C) superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidad (APX) ve glutatyon reduktaz (GR) enzim aktiviteleri belirgin bir şekilde artış gösterirken, peroksidad (POX) ve glutatyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitesinde değişiklik gözlenmemiştir. Mısır fidelerinde 35°C'nin üzerinde bir sıcaklık uygulanması yüksek sıcaklık stresine neden olmaktadır. Bu çalışmanın sonucunda, mısır fidelerinde 35°C'nin üzerindeki sıcaklıkların fotosentez üzerinde stress etkisine yol açtığı ve enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan aktiviteyi teşvik ettiği ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Antioksidan enzimler, antosiyanin, mısır, sıcaklık stresi.

Introduction

Heat waves or extreme temperatures are increasingly observed climate conditions and expected to become more intense and frequent in near future compared today (Hatfield & Prueger 2015). Intergovernmental Panel on Climatic Change (IPCC) (2014) reported that hot days and nights in global scale were often observed while number

of cold days and nights reduced. Extreme temperature conditions may last for short-term durations of a few days with temperature increases of over 5°C above the normal temperatures (Hatfield & Prueger 2015). Extreme temperatures observed during summer season were reported to have a negative impact on plant growth,

development and productivity (Bita & Gerats 2013). For instance, when higher plants are exposed temperature values at least 5°C above their optimal growth temperature values, their organelles and cytoskeleton and membrane stability are affected as a result of cellular and metabolic responses of the plants to survive in increased temperature conditions (see Bita & Gerats 2013). The photosynthetic apparatus in plants is heat sensitive and in particular, chlorophyll biosynthesis, net photosynthetic rate, Rubisco activity and PSII center are the primary targets of thermal damage in plants (Sinsawat *et al.* 2004). Due to the damage of the photosynthesis processes in plants caused by heat stress, photoinhibition occurs, leading to accumulation of reduced electron acceptors and thereby acceleration of the formation of reactive oxygen species (ROS), including hydrogen peroxide (H₂O₂), which is associated with oxidative damage (Cui *et al.* 2006). At the cellular level, high temperatures can result in excessive accumulation of ROS, which in turn can trigger lipid peroxidation and damage pigments, nucleic acid and proteins (Wang *et al.* 2014). Plants have developed mechanisms protecting them against the damage caused by ROS. These mechanisms consist of scavenging the ROS by non-enzymatic antioxidants, such as carotenoids, anthocyanins, and mobilization of an enzymatic antioxidant system, which includes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POX) and glutathione S-transferases (GSTs) (Almeselmani *et al.* 2006, W. Chen *et al.* 2012). Carotenoids protect photosystems and chlorophyll molecules by reacting with lipid peroxidation products and scavenging singlet oxygens (Wahid 2007). Anthocyanins are highly effective antioxidants for excessive accumulation of stress-induced ROS and the protection of osmotic balance (Wahid 2007, Bita & Gerats 2013). Metalloenzyme SOD (EC 1.15.1.1), the most effective intracellular enzymatic antioxidant, catalyzes the partitioning of the superoxide radicals to molecular oxygen and H₂O₂ (Gill & Tuteja 2010). Catalase (EC 1.11.1.6), a tetrameric heme-containing enzyme, has one of the fastest turnover rates for all enzymes, and catalytic rate for one catalase molecule is nearly 6 million molecules of H₂O₂ altered to water and oxygen per minute (Gill & Tuteja 2010, Choudhury *et al.* 2013). Ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) has showed high specificity for ascorbate as the electron donor and plays an essential role in sweeping hydrogen peroxide in chloroplast (Shigeoka *et al.* 2002). Glutathione reductase (EC 1.6.4.2) is a potential enzyme of the ascorbate-glutathione cycle and remove H₂O₂ by catalyzing the reduction of glutathione (Gill & Tuteja 2010). Peroxidase (EC 1.11.1.7) is another heme-containing enzyme that performs H₂O₂-detoxifying activities. GSTs (EC 2.5.1.18) are known to be responsible for detoxification of xenobiotics but can also play an important role as antioxidants by removing lipid peroxidation end products (Dalton *et al.* 2009).

Maize is a highly efficient plant in suitable environmental and growth conditions but is also very

susceptible to drought and heat. An average of 15- to 20% of the potential world maize production is lost every year due to temperature related climatic stresses (J. Chen *et al.* 2012). Although C₄ plants such as maize are more stable at higher temperatures, net photosynthesis is usually inhibited when the temperature of maize leaves exceed roughly 38°C (Crafts-Brandner & Salvucci 2002, Coşkun *et al.* 2011). Sinsawat *et al.* (2004) reported that when maize was subjected to an increase in temperature from 25°C to 35°C for 20 min in the dark, short-term inhibition occurred in the rate of photosynthesis, and permanent damage resulted at temperatures above 45°C. In the same study, when ΦPSII and photochemical quenching factor (qP) and the efficiency of open reaction centers (F^v/F^m) were slowly reduced between 35 and 45°C, the maximum quantum efficiency of PSII (F_v/F_m) in maize leaves clearly decreased at temperatures above 45°C (Sinsawat *et al.* 2004). In another study in which maize was exposed to long-term high temperature and combined high temperature and water deficit, plant biomass accumulation was reported to decrease under all treatments (Perdomo *et al.* 2015). High temperature (35°C) treatment was shown to positively affect vegetative plant growth in maize but decreased ear expansion and reduced cob extensibility (Suwa *et al.* 2010). Kumar *et al.* (2012) treated maize and rice genotypes to high temperature stress (35/30, 40/35, 45/40°C) for 11 days. The results of this study showed that inhibition of growth, decreased leaf water and chlorophyll content, increased electrolyte leakage, higher H₂O₂ levels, elevated MDA content and increased antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, APX, GR) were observed at temperatures above 35/40°C.

Although many studies reported data on the effect of long-term heat stress on maize photosynthesis efficiency and yields, little is known about the short-term extreme temperature effect on maize seedlings. In this study we focused on the effects of short-term gradually rising temperatures (increase of 5°C every day, from 25°C to 45°C) on maize seedlings. We also investigated the changes in photosynthetic pigment, chlorophyll fluorescence, anthocyanin content, lipid peroxidation, H₂O₂ content and antioxidant enzyme activity in response to the gradually rising temperature in maize leaves

Materials and Methods

Plant Material and Treatment

Maize (*Zea mays* L.) seeds were obtained from MayAgro Seed Corporation (71-May-69). The experiments were performed in a plant growth chamber (VB 0714, Bioline, Vötsch Industrietechnik, Germany; internal dimensions: 970x750x1400cm; lighting intensity: 450mmol m⁻²s⁻¹ @ 200mm). Seeds were imbibed in deionized water for 24 hours at room temperature. Three seeds were sown in plastic pots (120mm diameter and 110mm depth) each containing a perlite. The seedlings were grown for 20 days in the growth chamber at conditions of 16-8h photoperiod, 25/20 °C and 60% humidity. Maize seedlings were

irrigated every three days with 1/4 Hoagland solution (Hoagland & Arnon 1950). Heat stress treatments were performed using 20 pots and 4 pots were used for each temperature treatment. Heat stress was achieved by increasing the temperature everyday by 5°C from 25°C to 45°C. Plants were sampled 24h after being exposed to 25°C, 30°C, 35°C, 40°C and 45°C, just before temperature rose to next level. The photoperiod and the light intensity were kept constant during the experiments. During heat stress treatments, plants were irrigated twice daily to prevent drought effects. Fresh leaves were used for the analyses.

Determination of Photosynthetic Pigments

Leaves were homogenised in 100% acetone and the samples were centrifuged at 3000xg for 15 min at 4°C. Leaf extracts were measured spectrophotometrically at 661.6, 644.8, and 470nm. Chlorophyll a, b, total chlorophyll, and carotenoid contents of the extracts were determined in µg/ml by employing the method of Lichtenthaler (1987).

Chlorophyll Fluorescence Analysis

The maximum quantum efficiency of photosystem II (PSII) photochemistry (Fv/Fm) was used as chlorophyll fluorescence parameter. Fv/Fm was performed by using the LI-6400XT Portable Photosynthesis and Fluorescence System (Li-Cor Inc., Lincoln, USA). The Fv/Fm ratio was calculated as (Fm - Fo)/Fm. Fm and Fo are the maximum and basal fluorescence yields. Leaves were dark-adapted for 20 min prior to fluorescence measurements.

Determination of Anthocyanin

Anthocyanin content was determined by using the method of Mancinelli (1990). Plant samples (0.5g) were extracted in 3ml methanol-HCl (1% HCl, v/v) and the homogenates were kept at 3-5°C for 2 days with occasional shakings. The extracts were filtered, and anthocyanin and chlorophyll contents were measured at 530nm and 657nm, respectively. The anthocyanin content (µg/ml) was measured using the formula A530-A657 and subtracting chlorophyll absorption.

Determination of Malondialdehyde (MDA) Content

Fresh leaf samples (0.5g) were extracted in 10mL of 0.25% thiobarbituric acid (TBA) in 10% trichloroacetic acid (TCA). The extracts were heated at 95°C for 30min and quickly cooled on ice. The samples were centrifuged at 5000xg for 10min. The absorbance was measured at 532nm and 600nm using a spectrophotometer. The level of MDA was calculated as nmol g⁻¹ of fresh weight using the extinction coefficient of 155mM⁻¹cm (Jiang & Zhang 2001).

Determination of Hydrogen peroxide (H₂O₂) Content

Hydrogen peroxide was assayed by the method of Velikova *et al.* (2000). Fresh leaf tissue (0.5g) was finely homogenized with 0.1% (w/v) TCA. The homogenate was centrifuged at 12,000xg for 15min and 0.5ml phosphate buffer (pH 7.0) and 1ml potassium iodide were

added on the supernatant (0.5ml). Its absorbance was recorded at 390nm after using a Epoch 2 Microplate Reader. H₂O₂ content was estimated by using H₂O₂ standart curve.

Determination of Antioxidant enzymes

Leaf samples (0.5g) were homogenized in 3mL of 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) including %1PVPP and 1mM EDTA and centrifuged at 13,000×g for 40min 4°C. The supernatant was used for protein and enzyme activity determinations. All spectrophotometric analyses were conducted on Epoch 2 Microplate Reader. Bradford (1976) method was used in determination of protein concentration using bovine serum albumin as a standard. The activity of ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) was determined by monitoring the decrease in absorbance at 290nm, as ascorbate was oxidized (Nakano & Asada 1981). Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) was analyzed according to the method described by Bergmeyer (1970). Total superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity was assayed by inhibition of photochemical reduction of NBT at 560nm (Beuchamp & Fridovich, 1971). Glutathione reductase (EC 1.6.4.2) activity was measured according to Foyer & Halliwell (1976). Peroxidase (EC 1.11.1.7) activity was determined by method of Herzog & Fahimi (1973). GST activity was assayed with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) by a modified method of Carmagnol *et al.* (1981).

Statistical analysis

All experimental data were analyzed using the mean ± standart error values of at least five replicates. A one-way ANOVA followed post hoc analysis with the Tukey's Multiple Comparison test was applied to test the significance of differences between the mean values. All analyzes were performed on GraphPad Prism version 5.2 for windows (GraphPadSoftware, San Diego, CA).

Results and Discussion

Effect of Heat Stress on Photosynthetic Characteristics

Photosynthesis is one of the most sensitive mechanisms to high temperature stress in plants (Sinsawat *et al.* 2004). High temperature stress impacts the structural and functional construction of chloroplasts, and the damage on chloroplasts can cause temporary or permanent reduction of photosynthetic efficiency and chlorophyll accumulation (Cui *et al.* 2006). To examine the effects of high temperature on maize photosynthesis, we measured chlorophyll *a* and *b* content, chlorophyll *a/b* ratio, total chlorophyll/carotenoid ratio and maximum quantum efficiency of photosystem II (Fv/Fm). The results showed that chlorophyll *a* and *b* increased when the temperature reached 35°C but when the temperature reached 40 and 45°C, chlorophyll *a* was reduced in comparison to 35°C. Chlorophyll *b* was found to be more stable up to the highest temperature of 45°C. The chlorophyll *a/b* ratio decreased following the temperature increase from 25 to 45°C. Carotenoid content was found to increase with increasing temperature and the highest level was observed at 45°C. Total chlorophyll/carotenoid

ratio significantly decreased at temperatures above 35°C (Table 1). When maize leaves were exposed to increasing temperatures, chlorophyll *a* experienced faster degradation than chlorophyll *b*. Chlorophyll *b* is present only in the pigment antenna system, but Chlorophyll *a* is found in both the pigment antenna and the reaction centers of photosystems I and II. The chlorophyll *a/b* ratio is the most important finding for light adaptation of the photosynthetic apparatus and the functional pigment equipment (Lichtenthaler *et al.* 1981). When chlorophyll *a/b* ratio decreases, it may be explained as an enlargement of the antenna system of PS II. These chlorophyll results suggest that maize is resistant to short-term heat waves (Table 1). Other aspects of chlorophyll were also found to be indicators of heat tolerance of maize under heat stress treatments. Almeselmani *et al.* (2006) indicated that heat tolerant wheat cultivars maintained comparatively higher chlorophyll content under increasing temperature in late and very late plantings. Asensi-Fabado *et al.* (2013) reported that chlorophyll content in three labiatea species was stable when the plants were exposed to increasingly higher temperatures. Maximum quantum efficiency of photosystem II (Fv/Fm) in dark adapted leaves was more stable in maize seedlings that received high temperature stress treatment. However, the increasing temperature, particularly the 45°C treatment, resulted in reduction of Fv/Fm compared to the control (25°C). High temperature stress affected the Fv/Fm causing a structural and functional deficiency of the photosynthetic apparatus (Cui *et al.* 2006). The reduction in Fv/Fm under heat stress showed in particular that the PSII reaction center was injured and induced to photoinhibition (Cui *et al.* 2006, Efeoğlu & Terzioglu 2009). Crafts-Brandner & Salvucci (2002) reported that Fv/Fm was relatively insensitive to leaf temperatures up to 42.5°C. Many studies have indicated that PSII is the most heat-sensitive component of photosynthesis (Crafts-Brandner & Salvucci 2002, Sinsawat *et al.* 2004, Cui *et al.* 2006, Efeoğlu & Terzioglu 2009).

Effect of Heat Stress on Hydrogen Peroxide and Lipid Peroxidation

The highly toxic ROS production significantly increases and induces peroxidation of membrane lipid

under stress events and H₂O₂ and MDA concentrations have been widely used as criterion to determine heat injury in plants. Hydrogen peroxide content increased nearly 2-folds at 30, 35 and 40°C in comparison to control (25°C), and the highest H₂O₂ content was observed at 45°C. The results also showed that the MDA concentration in maize leaves increased after 35, 40 and 45°C treatments (Fig. 1), compared to the control (25°C), and the MDA level was more stable at 30°C treatment. The finding that H₂O₂ content started to increase even at 30°C showed that it was the most sensitive to temperature changes, but no change occurred in MDA level at 30°C. Both H₂O₂ and MDA contents were highest at 45°C (Fig. 1). All these findings suggest that short-term and gradually increasing temperature initially triggers H₂O₂ production in maize leaves. Heat stress induces generation and reactions of activated oxygen species (AOS) including singlet oxygen, superoxide radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical cause of cellular injury (Wahid *et al.* 2007). AOS generate the autocatalytic peroxidation of membrane lipids and pigments thereby causing the loss of membrane semi-permeability and functions (Asthir 2015). The resulting damage seen in plants after exposure to heat stress was described as the injury of photosynthesis and cell membrane fluidity (Choudhury *et al.* 2013). Heat stress mainly effects membrane fluidity, especially photosynthetic and mitochondrial membranes (Asthir 2015). Membrane damages are known as stress parameters used in determination of level of lipid destruction. It is known that lipid peroxidation products are formed from polyunsaturated precursors that include small hydrocarbon fragments such as MDA (W. Chen *et al.* 2012, Asthir 2015). Savicka & Škute (2010) reported that ROS production and MDA content increased in various development stages of wheat that underwent long-term high temperature treatment. Furthermore, the enhancement of lipid peroxidation and H₂O₂ in apple leaves was shown to occur in response to high temperature (Ma *et al.* 2008). In our study, no changes were observed in leaf water content during high temperature treatment, due to the fact that plants were irrigated twice daily to prevent drought effects.

Table 1. Changes in chlorophyll *a* and *b* content, chlorophyll *a/b* ratio, carotenoid content, total chlorophyll/carotenoid ratio and Fv/Fm (maximum quantum efficiency of photosystem II) after gradually increasing temperature values the maize leaves were exposed to. The means ±SE of five replicates were given. Different letters denote statistically significant differences by Tukey's Multiple Comparison test (P <0.05) among all treatments respectively.

Heat treatment	Chl a (µg ml ⁻¹)	Chl b (µg ml ⁻¹)	Chl a/b	Carotenoid (µg ml ⁻¹)	Total chl/car	Fv/Fm
25 °C	61.70±0.57d	13.57±0.24d	4.55±0.09a	14.64±0.15e	5.14±0.6b	0.79±0.007a
30 °C	77.98±1.90b	21.44±0.42c	3.64±0.12b	16.91±0.44d	5.88±0.07a	0.70±0.02b
35 °C	90.81±1.71a	26.05±0.70a	3.49±0.09b	21.06±0.66b	5.55±0.08c	0.73±0.009b
40 °C	76.82±0.60b	24.08±0.55b	3.19±0.07c	19.38±0.43c	5.21±0.15b	0.70±0.017b
45 °C	69.25±0.65c	25.57±1.19a	2.71±0.15d	23.20±0.69a	4.09±0.14d	0.63±0.08c

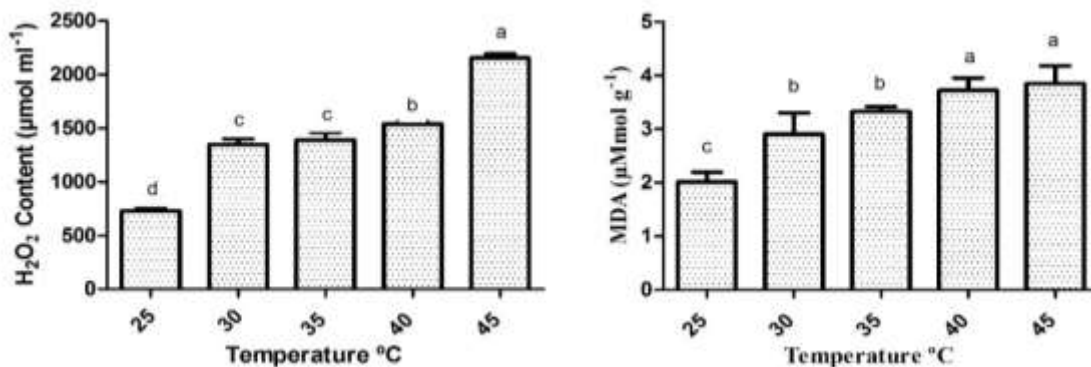


Fig. 1. Changes in hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA) contents in maize leaves at gradually increasing temperature treatment. Heat stresses were exposed to a steady temperature increase of 5°C every day from 25°C to 45. Data shown corresponds to means \pm SE of five replicates. Different letters denote statistically significant differences by Tukey's Multiple Comparison test ($P < 0.05$) among all treatments respectively.

Effect of Heat Stress on Anthocyanin Level

In this study, gradually increasing temperature caused accumulation of anthocyanin in maize. Although a minor increase occurred at 30 and 35°C, compared to the control, the increase at 40 and 45°C was approximately 3-folds compared to the control (Fig. 2). Anthocyanins are secondary metabolites that govern the colors of plant tissues and are generally produced in the cytoplasm before being transported into the vacuole. As a polyphenol, anthocyanin is an effective antioxidant and scavenger of ROS and therefore plays an important role in environmental stress (Shao *et al.* 2007). Some studies reported that anthocyanin is sensitive to light and heat alteration (Gould *et al.* 2002, Shao *et al.* 2007). Shao *et al.* (2007) determined that anthocyanins had a protective role in high temperature injury and triggered antioxidative capacity under high temperature stress in *Arabidopsis*. Mori *et al.* (2007) found that anthocyanin accumulation in red-wine grapes decreased under high temperatures.

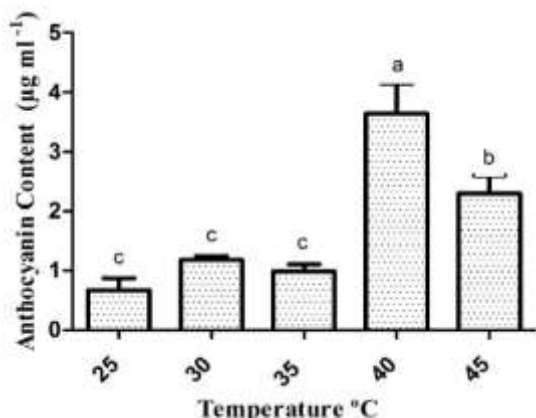


Fig. 2. Changes in anthocyanin content in maize leaves at gradually increasing temperatures. Data shown corresponds to means \pm SE of five replicates. Different letters denote statistically significant differences by Tukey's Multiple Comparison test ($P < 0.05$) among all treatments respectively.

Effect of Heat Stress on Antioxidant Enzyme Activity

Plants stimulate various enzymatic systems to alleviate the harmful effects of ROS under high

temperature stress. To better understand this process, we examined the activities of antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (GPX), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) (Fig. 3) in maize leaves under gradually rising temperature. SOD, the first defence mechanism of the antioxidant system, catalyses the dismutation of O₂⁻ to H₂O₂ and O₂. APX, GR and CAT and POD are able to scavenge H₂O₂ through different mechanisms (Gill & Tuteja 2010). Our results showed that antioxidant enzymes responded differently to gradually increasing temperature stress. To cope with the oxidative stress, SOD, POX, CAT and GR enzyme activities increased, and APX and GST stabilized when the temperature reached 30°C. All enzyme activities noticeably reached their lowest levels at 35°C, which was considered as heat acclimatization. When temperature was increased from 35 to 45°C, SOD, CAT, APX and GR activities were positively triggered, but no significant increase occurred in GST and POX activities. SOD, CAT, GR and APX activities were at highest levels when the temperature reached 45°C (Fig. 3). The antioxidant enzyme activities suggest that maize plants trigger an effective system for detoxifying active oxygen species when temperature increases from 25°C to 45°C. It was also found in our study that heat treatment enhanced activities of SOD, CAT, GR and APX in maize leaves. Various studies have been conducted on the changes in antioxidant enzyme activity in plants under high temperature stress (Gür *et al.* 2010, He & Huang 2012, Wang *et al.* 2014, Ergin *et al.* 2016). The activities of SOD, APX, CAT, GR, and POX were shown to increase significantly at all stages of growth in wheat cultivar C306 (heat-tolerant), while the PBW343 (heat-sensitive) genotype was shown to have a significantly reduced CAT, GR, and POX activities in response to high temperature stress (Almeselmani *et al.* 2006). Kumar *et al.* (2012) compared the responses of *Oryza sativa* and *Zea mays* to varying degrees of temperature stress (35/30, 40/35, 45/40°C) and found that CAT, APX and GR enzyme activities were higher in maize plants compared to rice but that no changes occurred in SOD at 45/40°C.

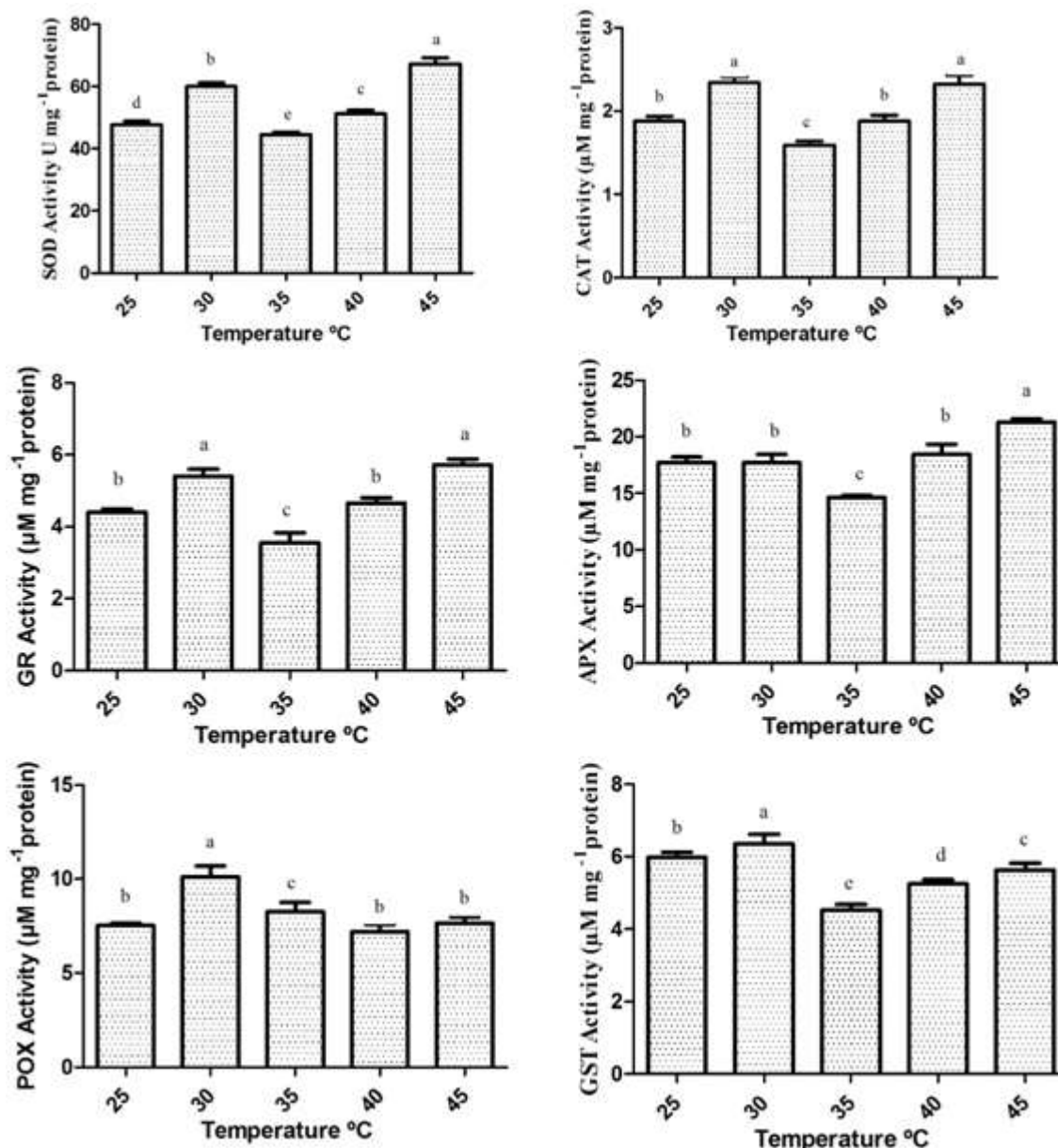


Fig. 3. Changes in antioxidant enzymes activities (SOD, CAT, GR, APX, POX and GST) at gradually increasing temperature. Data shown corresponds to means \pm SE of five replicates. Different letters denote statistically significant differences by Tukey's Multiple Comparison test ($P < 0.05$) among all treatments respectively.

Conclusion

The results of this study provide evidence that maize seedlings represent a high tolerance to gradually increasing temperatures (25-45°C). Improved thermo-tolerance may relate to high anthocyanin and carotenoid content besides antioxidant enzymes activity may improve thermo-tolerance. Data presented in this study

also contributes to better understanding of physiological process in maize exposed to increased temperatures.

Acknowledgement

This work was supported by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University (Project numbers: 41364, FBA-2016-3745).

References

- Almeselmani, M., Deshmukh, P.S., Sairam, R.K., Kushwaha, S.R. & Singh T.P. 2006. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Science*, 171: 382-388.
- Asensi-Fabado, M.A., Oliván, A. & Munné-Bosch, S. 2013. A comparative study of the hormonal response to high temperatures and stress reiteration in three Labiateae species. *Environmental and Experimental Botany*, 94: 57-65.
- Asthir, B. 2015. Protective mechanisms of heat tolerance in crop plants. *Journal of Plant Interaction*, 10(1): 202-210.
- Bergmeyer, N.1970. *Methoden der enzymatischen Analyse*. Akademie Verlag, Berlin, Vol. 1, 636-647.

5. Beuchamp, C. & Fridovich, I 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44: 276-287.
6. Bita, C.E. & Gerats, T. 2013. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamental and production of heatstress-tolerant crops. *Frontiers Plant Science*, 273(4): 1-18.
7. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
8. Carmagnol, F., Sinet, P.M., Rapin, J. & Jerome, H. 1981. Glutathione-S-transferase of human RBCs; assay, values in normal subjects and in two pathological circumstance. Hyperbilirubinaemia and impaired renal function. *International Journal of Clinical Chemistry*, 117: 209-217.
9. Chen, J., Xu, W., Velten, J., Xin, Z. & Stout, J. 2012. Characterization of maize inbred lines for drought and heat tolerance. *Journal of Soil and Water Conservation*, 67(5): 354-364.
10. Chen, W., Cen, W., Chen, L., Di, L., Li, Y. & Guo, W. 2012. Differential Sensitivity of Four Highbush Blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L.) Cultivars to Heat Stress. *Pakistan Journal of Botany*, 44(3): 853-860.
11. Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L. & Panda, S.K. 2013. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signalling & Behavior*, 8(4): e23681 DOI: 10.4161/psb.23681.
12. Crafts-Brandner, S.J. & Salvucci, M.E. 2002. Sensitivity of photosynthesis in a C4 plant, maize, to heat stress. *Plant Physiology*, 129: 1773-1780.
13. Cui, L., Li, J., Fan, Y., Xu, S. & Zhang, Z. 2006. High temperature effects on photosynthesis, PSII functionality and antioxidant activity of two *Festuca arundinacea* cultivars with different heat susceptibility. *Botanical Studies*, 47: 61-69.
14. Coşkun, Y., Coşkun, A., Demirel, U. & Özden, M. 2011. Physiological response of maize (*Zea mays* L.) to high temperature stress. *Australian Journal of Crop Science*, 5(8): 966-972.
15. Dalton, D.A., Boniface, C., Turner, Z., Lindahl, A., Kim, H.J., Jelinek, L., Govindarajulu, M., Finger, R.E. & Taylor, C.G. 2009. Physiological roles of glutathioneS-transferases in soybean root nodules. *Plant Physiology*, 150: 521-530.
16. Efeoglu, B. & Terzioglu, S. 2009. Photosynthetic responses of two wheat varieties to high temperature. *EurAsian Journal of BioSciences*, 3: 97-106.
17. Ergin, S., Gülen, H., Kesici, M., Turhan, E., İpek, A. & Köksal, N. 2016. Effects of high temperature stress on enzymatic and nonenzymatic antioxidants and proteins in strawberry plants. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40: 908-917.
18. Foyer, C.H. & Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133: 21-25.
19. Gill, S.S. & Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 909-930.
20. Gould, K.S., Mckelvie, J. & Markham, K.R. 2002. Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant, Cell & Environment*, 25: 1261-1269.
21. Gür, A., Demirel, U., Özden, M., Kahraman, A. & Çopur, O. 2010. Diurnal gradual heat stress affects antioxidant enzymes, proline accumulation and some physiological components in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 9: 1008-1015.
22. Hatfield, J.L. & Prueger, J.H. 2015. Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*, 10: 4-10.
23. He, Y. & Huang, B. 2012. Differential responses to heat stress in activities and isozymes of four antioxidant enzymes for two cultivars of *Kentucky bluegrass* contrasting in heat tolerance. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 135: 116-124.
24. Herzog, V. & Fahimi, H. 1973. Determination of the activity of peroxidase. *Analytical Biochemistry*, 55: 554-562.
25. Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*, 347: 32.
26. IPCC 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.
27. Jiang, M. & Zhang, J. 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 42: 1265-1273.
28. Kumar, S. Gupta, D. & Nayyar, H. 2012. Comparative response of maize and rice genotypes to heat stress: status of oxidative stress and antioxidants. *Acta Physiologia Plantarum*, 34: 75-86.
29. Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, in: L. Packer, R. Douce (Eds.), *Methods in Enzymology*. Plant Cell Membranes, Academic Press, New York, pp. 350-382.
30. Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., Döll, M., Fietz, H.J., Bach, T., Kozel, U., Meier, D. & Rahmsdorf, U. 1981. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis Research*, 2: 115-141.
31. Ma, Y.H., Ma, F.W., Zhang, J.K., Li, M.J., Wang, Y.H. & Liang, D. 2008. Effects of high temperature on activities and gene expression of enzymes involved in ascorbate-glutathione cycle in apple leaves. *Plant Science*, 175: 761-766.
32. Mancinelli, A.L. 1990. Interaction between light quality and light quantity in the photoregulation of anthocyanin production. *Plant Physiology*, 92: 1191-1195.
33. Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M. & Hashizume, K. 2007. Loss of anthocyanins in red-wine

- grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany*, 58 (8): 1935-1945.
34. Nakano, Y. & Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22: 867-880.
 35. Perdomo, J.A., Conesa, M.À., Medrano, H., Ribas-Carbó, M. & Galmés, J. 2015. Effects of long-term individual and combined water and temperature stress on the growth of rice, wheat and maize: relationship with morphological and physiological acclimation. *Physiologia Plantarum*, 155: 149-165.
 36. Savicka, M. & Škute, N. 2010. Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija*, 56: 26-33.
 37. Shao, L., Shu, Z., Sun, S-L., Peng, C-L., Wang, X-J. & Lin, Z-F. 2007. Antioxidation of anthocyanins in photosynthesis under high temperature stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(9): 1341-1351.
 38. Shigeoka, S, Ishikawa, T, Tamoi, M., Miyagawa, Y, Takeda, T, Yabuta, Y, Yoshimura, K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase Isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1305-1319.
 39. Sinsawat, V., Leipner, J., Stamp, P. & Frachebound, Y. 2004. Effect of heat stress on the photosynthetic apparatus in maize (*Zea mays* L.) grown at control or high temperature. *Environmental and Experimental Botany*, 52: 123-129.
 40. Suwa, R., Hakata, H., Hara, H., El-Shemy, H.A., Adu-Gyamfi, J.J., Nguyen, N.T., Kanai, S., Lightfoot, D.A., Mohapatra, P.K. & Fujita, K. 2010. High temperature effects on photosynthate partitioning and sugar metabolism during ear expansion in maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 124-130.
 41. Velikova, V., I. Yordanov A. & Edreva A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective roles of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151: 59-66.
 42. Wahid, A. 2007. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. *Journal of Plant Research*, 120: 219-228.
 43. Wahid A, Gelani S., Ashraf M. & Foolad MR. 2007. Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61: 199-223.
 44. Wang, C., Wen, D., Sun, A., Han, X., Zhang, J., Wang, Z. & Yin, Y. 2014. Differential activity and expression of antioxidant enzymes and alteration in osmolyte accumulation under high temperature stress in wheat seedlings. *Journal of Cereal Science*, 60: 653-659.

ÇEŞİTLİ BİTKİ ÇAYLARININ MONOAMİN OKSİDAZ İNHİBİSYONLARININ VE ANTIOKSİDAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Başak YÜCE-DURSUN

Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, İstanbul

*Corresponding author: e-mail: basak.yuce@marmara.edu.tr

Alınış (Received): 29 Mart 2017, Kabul (Accepted): 22 Mayıs 2017, Erken Görünüm (Online First): 29 Temmuz 2017, Basım (Published): 15 Aralık 2017

Özet: Meyve çaylarının terapötik özellikleri içerdikleri polifenolik flavonoidlerden kaynaklanmaktadır. Bir flavoenzim olan monoamin oksidazı (EC 1.4.3.4, MAO) inhibe eden bileşiklerin, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif rahatsızlıkların tedavisinde ve çeşitli nörolojik rahatsızlıklarda ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir. Antioksidan özelliğe sahip doğal bileşiklerin nörodejenerasyonda önemli bir rol oynayan oksidatif stresi azaltarak bu hastalıkları önlediğine dair çok sayıda çalışma vardır. Bu nedenle monoamin oksidaz enzimini inhibe edebilecek ve oksidatif stresi azaltabilecek çift etkili ürünlerin bulunması ayrı bir önem taşımaktadır. Bu çalışmada Türkiye'deki marketlerden satın alınan çeşitli meyve çaylarının; ferrik indirgeyici antioksidan güç, bakır indirgeyici antioksidan kapasite ve 1,1-difenil-1-pikrilhidrazil radikal süpürücü metotları ile antioksidan aktiviteleri saptanmıştır ve toplam fenolik madde miktarları belirlenmiştir. Bu çay infüzyonlarının, MAO enzim inhibisyonları florometrik olarak tayin edilmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar poşet yeşil çay ve siyah çay ile kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlarda, bitki çayı örneklerinin antioksidan ve MAO inhibisyon özelliklerinin içerdikleri toplam fenolik madde miktarı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Nar içeren çay infüzyonları daha yüksek antioksidan aktivite ve fenolik madde içeriğine sahip olup aynı zamanda da yüksek MAO inhibisyonu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, kuşburnu başta olmak üzere çeşitli çay infüzyonlarında 2-3,5 kat arasında değişen MAO-B seçiciliği bulunduğunu da göstermektedir. Fenolik maddelerin MAO inhibisyonuna sebep olduğu bilgisinden yola çıkılarak yapılan bu çalışmada, çay infüzyonlarının MAO inhibisyon yetenekleri de olduğu ilk kez ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Antioksidan aktivite, CUPRAC, çay infüzyonu, DPPH, FRAP, MAO inhibisyonu.

Determination of Monoamine Oxidase Inhibition and Antioxidant Effects of Various Herbal Teas

Abstract: The therapeutic properties of fruit teas are due to the polyphenolic flavonoids they contain. Compounds inhibiting the flavoenzyme monoamine oxidase (EC 1.4.3.4, MAO) are known to be used as medicines in treatment of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's diseases, and in various neurological disorders. There are many studies about natural compounds with antioxidant properties that prevent such diseases by reducing oxidative stress which plays an important role in neurodegeneration. It is therefore of particular importance to find double-acting products that can both inhibit monoamine oxidase and reduce oxidative stress. In this study, antioxidant activities of various fruit teas purchased from markets in Turkey were determined by ferric-reducing antioxidant power, cupric reducing antioxidant capacity and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl methods and their total phenolic contents were revealed. MAO enzyme inhibitions of these tea infusions was determined fluorometrically. The obtained results were compared with green and black tea bag infusions. The results showed that antioxidant and MAO inhibition properties of fruit tea samples were related to their total amount of phenolic substances they contained. Pomegranate containing tea infusions had higher antioxidant activity and phenolic content and exhibited high MAO inhibition. The results also showed that a MAO-B selectivity varying between 2 to 3,5-fold existed in various tea infusions with the highest value in rose hip tea. MAO inhibition abilities of tea infusions were demonstrated for the first time in this present study which was based on the fact that phenolic substances are responsible for MAO inhibition.

Keywords: Antioxidant activity, CUPRAC, tea infusion, DPPH, FRAP, MAO inhibition.

Giriş

Tıbbi ve aromatik bitkiler dünyada ve Türkiye'de önemli bir yere sahiptir. Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular ve yoğun reklam kampanyaları dünya genelinde çay tüketimini artırmış ve çayı, sıvı tüketiminde sudan sonra ikinci sıraya yerleştirmiştir (Piljac-Zegarac

ve ark. 2010). Son yıllarda ülkemizi de içine alan sağlıklı yaşam arayışı ve doğru beslenmeye artan ilgi nedeniyle bitkisel çayların (infüzyon) kullanımı da yaygınlaşmıştır (Naithani ve ark. 2006, Çağındı ve Ötleş 2008). Çay tüketiminin, kalp-damar hastalığı, kanser, karaciğer

hastalıkları, artrit, viral ve bakteriyel enfeksiyonlara yakalanma riskini düşürdüğüne dair çalışmalar bulunmaktadır (Von Gadow ve ark. 1997, Naithani ve ark. 2006). Yine çaylarda bulunan kuersetin gibi polifenollerin de UV koruyucu etki göstererek cilt hasarını önlediği bilinmektedir (Piljac-Žegarac ve ark. 2010).

Bitkisel çayların; A, B₆, C, E vitaminleri, koenzim Q10, karotenoidler, selenyum, çinko, polifenoller ve diğer serbest radikal süpürücüler açısından zengin olduğu çok sayıda çalışmada yer almaktadır (Atoui ve ark. 2005, Piljac-Žegarac ve ark. 2010). Flavonoidler, flavanoller, flavonoller, izoflavonlar, fenolik asitler, glikozidler, aglikonlar bilinen önemli polifenoller arasındadır. Daha düşük toksisiteye sahip olmaları ve bilinen sentetik antioksidanlardan daha yüksek antioksidatif etki göstermeleri nedeniyle, gıda ve ilaç endüstrilerinde geniş uygulama alanı bulmaktadırlar (Naithani ve ark. 2006, Xi ve ark. 2009).

Bu infüzyonlar içerisinde bulunan doğal antioksidanlar, vücudu serbest radikallerin zararlı etkisine karşı korurlar. Bu serbest radikaller endojen (solunum zinciri sırasında, oksidatif enzimler ya da fagositik hücreler yoluyla) ya da eksojen (hava kirliliği, sigara tüketimi ve çeşitli toksinler) olarak meydana gelebilirler (Naithani ve ark. 2006). Polifenollerin antioksidan aktiviteleri indirgeyici ajan, hidrojen vericisi ve singlet oksijeni yakalayıcısı gibi davranmalarını sağlayan redoks özelliklerinden ileri gelmektedir. Organizmada açığa çıkan reaktif oksijen türleri membran, nükleik asit, protein ve lipid yapılarına zarar vererek iskemi, katarakt, kanser, gut, yaşlanma, diyabet, demans, renal toksisite, kalp ve nörolojik hastalıklar gibi çok sayıda patolojik durumun oluşmasına sebep olurlar (Atoui ve ark. 2005, Lo ve Cheung 2005, Naithani ve ark. 2006). Antioksidanlar, özellikle lipidlerin ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunu önleyerek oksidatif stresi de azaltırlar. Tüm bu özelliklerinden dolayı antioksidanların, kalp ve damar hastalıklarını ve kanser risklerini azalttıkları, Alzheimer hastalığı gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların başlangıcını geciktirdikleri gösterilmiştir (Fang ve ark. 2002, Atoui ve ark. 2005, Moraes-de-Souza ve ark. 2008).

Monoamin oksidaz (MAO; EC 1.4.3.4), farklı hücrelerin mitokondri dış membranında bulunan, flavin adenzin dinükleotid içeren bir flavoenzimdir. Önemli nörotransmitterlerin oksidasyonunda ve hücre içi konsantrasyonunun düzenlenmesinde rol oynar (Abdelhafez ve ark. 2013). MAO'nun, anahtar konumundaki nörotransmitterlerin metabolizmasında yer alması, bu enzimi nörolojik bozuklukların tedavisinde farmakolojik müdahale için önemli bir hedef haline getirmiştir (Van den Berg ve ark. 2007). MAO, farklı üç boyutlu yapı, substrat ve inhibitör seçim özellikleri ile birbirinden ayrılan ve MAO-A ve -B olarak adlandırılan iki izoenzim halinde bulunur. Spesifik MAO enzim inhibitörleri, nörodejeneratif rahatsızlıkların tedavisinde ve çeşitli nörolojik rahatsızlıklarda ilaç olarak kullanılabilirler. Nörodejeneratif rahatsızlıklar gelişmiş

ülkelerdeki en önemli üçüncü sağlık sorunudur ve Alzheimer ve Parkinson hastalıkları en sık karşılaşılan nörodejeneratif rahatsızlıklardır. MAO-A inhibitörleri depresyon ve anksiyete tedavisinde kullanım alanı bulurken MAO-B inhibitörleri Parkinson ve Alzheimer hastalıklarının tedavisinde kullanılabilirler (Shi ve ark. 2010). Bu bilgiler ışığında, meyve çaylarının nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etkilerini anlamak için MAO enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri de araştırma konusu olarak seçilmiştir.

Meyve çaylarının, özellikle kırmızı meyve çaylarının popülerliği ülkemizde de gün geçtikçe artmaktadır. Bu çayların içeriğine bakıldığında; kurutulmuş meyveler, meyve kabukları, yapraklar gibi farklı bitki kısımlarını da içerdikleri görülür (Emekli-Alturfan ve ark. 2009). Hazırlanması kolay ve pratik olduğu için poşet çaylar, evlerde ve işyerlerinde demleme çaylara tercih edilmektedir. Birçok markanın meyve ve kırmızı meyve poşet çayları marketlerde ve aktarlarda çeşitli isimler altında, antioksidan özelliği vurgulanarak satılmaktadır. Meyvelerin toplam antioksidan aktiviteleri ve toplam fenolik madde (TFM) miktarları ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, poşet meyve çaylarının, özellikle de poşet kırmızı meyve çaylarının antioksidan aktiviteleri ile yapılan çalışmalar kısıtlıdır ve MAO inhibisyon etkileri ile ilgili literatürde çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, ticari olarak satılan çeşitli bitki infüzyonlarının oksidatif stres ve bu stresin nedenlerinden biri olan nörodejeneratif rahatsızlıkların gelişimine etkisinin olup olmadığının *in vitro* olarak incelenmesidir. Bu sebeple, en çok tüketilen kırmızı meyve ve diğer meyvelerin poşet çaylarının toplam antioksidan aktiviteleri, radikal süpürücü etkileri, TFM miktarları ve MAO enzim inhibisyonuna olan etkileri saptanmış, yeşil ve siyah poşet çaylar ile karşılaştırmaları yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Örnekler

Piyasada çeşitli üreticiler tarafından ticari olarak satılan poşet çaylar Türkiye'deki marketlerden temin edilmiştir ve içerikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Kimyasallar

Folin-Ciocalteu reaktifi, gallik asit, troloks, insan rekombinant MAO-A (hMAO-A) ve MAO-B (hMAO-B) enzimleri Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); 1,1-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany) ve Amplex Red MAO Tayin Kiti İnvitrogen (Waltham, MA, A.B.D.) firmalarından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır ve Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir.

Bitkisel İnfüzyonların Hazırlanması

Tablo 1'de isimleri ve kaynakları verilen çay poşetleri (2,5g) üretici firmaların tavsiye ettiği gibi 200mL kaynar su içine daldırılarak 5dk bekletildi ve süre sonunda

poşetler günlük kullanımda olduğu gibi sıkılarak kaptan çıkarıldı. Elde edilen infüzyonun oda sıcaklığına gelmesi beklendi. İnfüzyonlar distile su ile 1:10 seyreltildi ve antioksidan etkileri Fe^{3+} İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) ve Cu^{2+} İndirgeyici Toplam Antioksidan Kapasite (CUPRAC) yöntemleriyle tayin edildi. Radikal süpürücü etkileri 1,1-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi ile ve çay örneklerinin içerdiği TFM miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi ile saptandı. Çay örneklerinin MAO enzimini inhibe edici etkileri kit kullanım kılavuzuna uygun şekilde gerçekleştirildi.

Ekstraktlarda Bulunan TFM Miktarının Tayini

TFM miktarı tayini spektrofotometrik olarak Folin-Ciocalteu yöntemine göre (Ismail ve ark. 2004) yapıldı. 100µL seyreltilmiş çay ekstraktı, 750µL Folin-Ciocalteu (%10, h/h) reaktifi ve 750µL sodyum karbonat (%6, a/h) çözeltisi ile karıştırıldı. Elde edilen çözelti 90dk karanlıkta bekletildikten sonra oluşan mavi rengin absorbansı UV-Vis spektrofotometrede (Thermo Scientific, USA) 725nm'de, örnek içermeyen çözeltiye karşı okundu. Bu analiz için standart gallik asit çözeltisinin 8 farklı konsantrasyonu ile bir kalibrasyon eğrisi hazırlandı ($R^2=0,998$). Elde edilen eğri yardımıyla ekstraktların fenolik madde miktarı hesaplandı ve sonuçlar "mmol gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru madde" olarak verildi. Deney iki paralel olarak tekrarlandı.

DPPH Radikalini Giderme Etkisi

Çay örneklerinin radikal süpürücü etkisi, DPPH yöntemi modifiye edilerek belirlendi (Danis ve ark. 2014). Bu amaçla seyreltilmiş çay ekstraktından 250µL alınarak 1mL DPPH çözeltisi (0,1mM; metanolde) ile karıştırıldı. Kontrol olarak distile su kullanıldı. Reaksiyon karışımı vorteks karıştırıcıda karıştırılıp 30dk oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Süre sonunda karışımın absorbansı spektrofotometrede 517nm'de metanole karşı okundu. Antioksidan aktivite DPPH radikalinin % inhibisyonu cinsinden, aşağıdaki eşitlikten yararlanılarak hesaplandı. Deney iki paralel olarak tekrarlandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \left[\frac{Ak_{(0)} - A\ddot{o}_{(t)}}{Ak_{(0)}} \right] \times 100$$

$Ak_{(0)}$; kontrolün ilk andaki absorbansı, $A\ddot{o}_{(t)}$; örneğin t anındaki absorbansı.

FRAP Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Tayini

Çay infüzyonlarının Fe^{3+} indirgeme gücü tayini için 100µL çay infüzyonu 200µL fosfat tamponu (50µM, pH:6,6) ve 200µL potasyum ferrisiyanür (%1, a/h) ile karıştırıldı. Karışım 50°C'de su banyosunda 20dk inkübe edildikten sonra soğutuldu ve 200µL triklorasetik asit (%10, a/h) ile 10.000g'de 10dk santrifüj edildi. Üst tabakadan alınan 700µL üzerine, 150µL demir klorür (%0,1, a/h) çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve UV-Vis spektrofotometrede 700nm'de verdiği absorbans değerleri okundu (Danis ve ark. 2014). Deney iki paralel olarak tekrarlandı ve troloks pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her bir örneğin toplam antioksidan kapasitesi

troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAC) cinsinden ifade edilerek verildi.

CUPRAC Yöntemi ile Toplam Antioksidan Kapasite Tayini

Bakır indirgeyici antioksidan kapasite Apak ve arkadaşları (2004) tarafından belirlenen yöntemde ufak değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. 800µL seyreltilmiş çay infüzyonları üzerine 160µL $CuCl_2$ (10mM), 160µL NH_4Ac (pH:7) ve 160µL neokuproin (7,5mM) çözeltileri eklenerek 30dk bekletildi. Absorbans değerleri 450nm'de UV-Vis spektrofotometrede okundu. Pozitif kontrol olarak troloks kullanıldı. Her bir örneğin toplam antioksidan kapasitesi TEAC cinsinden ifade edilerek verildi. Deney iki paralel olarak tekrarlandı.

Tablo 1. Denemelerde kullanılan ve Türkiye'deki marketlerden temin edilen poşet çayların içerikleri.

Çay Türü	İçindekiler
Adaçayı	Adaçayı yaprağı
Böğürtlen	Bamya çiçeği, elma, kuşburnu, böğürtlen yaprağı, böğürtlen aroması, portakal kabuğu, mürver meyvesi, böğürtlen, stevya, tarçın
Frenk Eriği-Tarçın	Bamya çiçeği, elma, tarçın, böğürtlen, elma, badem aromaları, kuşburnu, mürver, portakal kabukları, erik, karanfil
Kırmızı Meyveler A	Kuşburnu, bamya çiçeği, portakal kabuğu, aromalar, stevya, çilek, yaban mersini, ahududu, nar kabuğu, elma
Kırmızı Meyveler B	Elma ve çilek parçacıkları, kuşburnu meyvesi, bamya çiçeği, üzüm çekirdekleri tohumu, nar ve portakal kabuğu, böğürtlen yaprakları, nar-böğürtlen ve çilek aroması
Kuşburnu	Kuşburnu, bamya çiçeği
Nar	Bamya çiçeği, kuşburnu, portakal kabukları, böğürtlen, mürver, nar meyve kabuğu, tarçın, alıç, yaban mersini, frenk üzümü, nar aroması, nar suyu
Nar-Çilek	Bamya çiçeği, elma, nar-portakal kabuğu, kuşburnu, çilek - tropik portakal aroması, böğürtlen yaprağı, çilek ve yaban mersini parçacıkları, mürver ve stevya
Siyah Çay	Kenya, Seylan, Endonezya ve Türk çaylarının karışımı
Üzüm Çekirdeği-Mürdüm Erikli	Bamya çiçeği, elma, kuşburnu, portakal kabuğu, böğürtlen yaprağı, erik aroması, erik parçacıkları, üzüm çekirdeği
Yaban mersini	Bamya çiçeği, kuşburnu, elma, böğürtlen yaprakları, yaban mersini aroması, portakal kabukları, yaban mersini parçacıkları
Yeşil Çay	Yeşil çay, böğürtlen yaprakları, ginkgo yaprakları ve yeşil çay aroması
Zencefil-Limon Kabuklu	Limon otu, zencefil, melisa, dut yaprağı, meyankökü, limon kabuğu, stevya, limon aroması

MAO Enzim İnhibisyonunun Belirlenmesi

MAO enzim aktivitesi Invitrogen Amplex Red MAO tayin kiti kullanım kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirildi. Çalışma süresince substrat (*p*-tiramin) ve reaksiyon tamponu karanlıkta ve oda sıcaklığında, enzimler ise buz üzerinde tutuldu. 2µL örnek (infüzyon çözeltilisinden 1/10 oranında seyreltilerek), 4,5µL hMAO–A veya hMAO–B ve 93,5µL reaksiyon tamponu, siyah düz tabanlı spektrofotometrik 96 kuyulu mikro plakalara konuldu. 15dk 37°C’de karıştırılarak inkübe edildi. Sürenin sonunda 100µL substrat çalışma çözeltilisi eklenerek reaksiyon başlatıldı. 37°C’de çoklu ölçümlü mikro plaka floresans okuyucuda (FLX800™, Bio-Tek® Instruments, Inc., Winooski, VT, USA; 545nm eksitasyon ve 590nm emisyon) 15dk boyunca her 30sn bir ölçüm alınarak enzimatik reaksiyonun ilerlemesi takip edildi. İnhibisyon yüzdesi, 15dk sonundaki gözlenen floresans şiddetinden başlangıç anındaki floresans şiddeti çıkarılarak aşağıdaki formüle göre belirlendi.

$$\% \text{inhibisyon} = \frac{F_{enz} - F_{inh}}{F_{enz}} \times 100$$

F_{enz} : inhibitörsüz enzim aktivitesi; F_{inh} : inhibitör varlığında enzim aktivitesi

İstatistiksel Analiz

Çalışmada kullanılan tüm istatistiksel analizler ve korelasyon ilişkisi GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) programı ile gerçekleştirildi. Temel bileşenler analizi için XLSTAT 19.01 programı (Addinsoft, Inc. Brooklyn, NY) kullanıldı.

Bulgular ve Tartışma

2000 yılı aşkın bir zamandır çaylar, tedavi edici ve keyif verici olarak dünyanın hemen her bölgesinde tüketilmektedir ve tüketimde sudan sonra ikinci sırayı almaktadır (Hodgson ve Croft 2010). Özellikle batı toplumlarında sağlıklı yaşama ilgi arttıkça meyve çaylarına da ilgi artmakta ve tüketimi yaygınlaşmaktadır. Yapılan bilimsel araştırmalarda bitki çaylarının genel halk sağlığını korumada ve bazı hastalıkları tedavide olumlu sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Çayların bu etkileri içerdikleri antioksidan bileşikler ile ilişkilendirilmektedir ve çalışmalar standart referans antioksidanlar ile karşılaştırılarak değerlendirilmektedir. Oksidasyon işlemlerinde başlatıcı olan serbest radikalleri nötralizasyon ile etkisiz hale getirebilme özellikleri nedeniyle fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerini tayin etmek oldukça önemlidir. Bitkilerin antioksidan aktivite kapasiteleri, uygulanan analitik yöntemlere göre değişkenlik gösterebilmektedir (Çağındı ve Ötleş 2008).

Bitki ve meyve çayları yaşam kalitesine katkılarının ve yararlarının yanı sıra farklı keyif verici tatlar denemek için de tercih edilmektedirler. Bu çaylar, bitkilerin yaprak, çiçek, kök ve meyve gibi kısımlarının kurutulması ile elde edilirler. Kullanımı pratik olduğu için poşet meyve çayları dökme çaylara tercih edilmektedir. Bu çayların üretici tarafından da tavsiye edilen tüketim şekli infüzyon olarak nitelendirilen su ile haşlayarak demlemedir. Tablo 1’de de

görüldüğü gibi çalışmamızda kullandığımız meyve çayları kurutulmuş meyvelerin yanı sıra diğer bazı bitkilerin çiçek, yaprak ve tohum gibi diğer kurutulmuş kısımlarını da içermektedir. Genellikle, renk ve koku verici olarak kurutulmuş bamya çiçeği de üretici tarafından bu karışımlara eklenmektedir. Poşet çayların üretici tarafından kaynar su ile demlenerek hazırlanması önerilmektedir. Farklı sıcaklıklarda yapılan çalışmalar da literatürde yer almaktadır ancak en yüksek antioksidan aktivite ve TFM içeriği 100°C sıcaklıkta demleme ile elde edilmektedir (Şahin 2013).

TFM Miktarının Belirlenmesi

Çalışmada, TFM miktarı modifiye edilmiş Folin-Ciocalteu yöntemine göre gerçekleştirildi. Yöntem, alkali ortamda fosfotungstik asidin indirgenerek, mavi renk oluşturmasına dayanır. Oluşan fosfotungstat mavisinin şiddeti, aromatik fenolik grupların sayısı ile orantılıdır (Horzic ve ark. 2009). Bu yöntem özellikle gıdaların TFM miktarlarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan güvenilir bir yöntemdir (Albayrak ve ark. 2010). Çalışmada denenen çay infüzyonları arasında en yüksek TFM içeriklerinin sırasıyla nar-çilek karışım, nar ve kuşburnu infüzyonlarında elde edildiği görülmüştür (sırasıyla, 0,424±0,172; 0,328±0,153; 0,291±0,185mmol GA/g KA). Siyah çay (0,535±0,208mmol GA/g KA) ve yeşil çay (0,564±0,215mmol GA/g KA) ile karşılaştırıldıklarında meyve çaylarının daha düşük TFM içerdikleri görülmektedir (Tablo 2). Zencefil-limon karışım infüzyonu ise incelenen infüzyonlar arasında en düşük fenolik madde içeriğine sahip olan çaydır (0,071±0,062mmol GA/g KA).

Böğürtlen yaprağı infüzyonu ile yapılan bir çalışmada 559±12mg GA/L (Gorjanović ve ark. 2012); böğürtlen ve çilek infüzyonu ile de 75,4±1,2 ve 62,4±1mg GA/g kuru madde (Buřičová ve ark. 2011) sonuç elde edilmiştir. Türkiye’deki farklı meyve poşet çaylar ile yapılan çalışmada ise nar infüzyonunun (6,91±0,47mg GA/g kuru madde) en yüksek TFM içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir (Şahin 2013). Çalışmamızda elde edilen en yüksek TFM değeri mg cinsinden 72mg GA/g KA’ya karşılık gelmektedir ve literatürdeki çalışmalar ile benzerlik sergilemektedir.

Antioksidan Denemeler

Antioksidan kapasiteyi belirleyebilmek için literatürde çeşitli yöntemler yer almaktadır. Bu çalışmada kullanılan DPPH, FRAP ve CUPRAC yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir.

DPPH azotlu bir serbest radikal bileşigidir ve örneklerin serbest radikal süpürme etkisini ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Moleküldeki serbest elektron yer değiştirerek önce koyu menekşe renk oluşturur, bileşik hidrojen verme yeteneğine sahip antioksidan ile karşılaştığında bu koyu menekşe renk kaybolarak açık sarı indirgenmiş form meydana gelir (Albayrak ve ark. 2010). Maddenin DPPH inhibisyonu ne kadar fazla ise o kadar fazla hidrojen verme yeteneğine dolayısı ile yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu

anlamına gelir (Şekil 1). Sonuçlar karşılaştırıldığında, yeşil çay en yüksek hidrojen verme kapasitesine sahip olan çaydır, sonrasında siyah çay gelmektedir. Meyve çayları arasında ise en yüksek aktiviteyi nar-çilek karışım infüzyonu, en düşük aktiviteyi ise zencefil-limon karışım infüzyonu göstermektedir. Nar-çilek karışım ve nar infüzyonlarının %50'nin üzerinde süpürme etkisi gösterdikleri görülmektedir. Diğer çay infüzyonlarında ise süpürücü etki daha azdır. Standart antioksidan bileşikler olan troloks ve askorbik asit ile karşılaştırma yapıldığında siyah ve yeşil çay infüzyonlarının standart bileşiklere oldukça yakın sonuçlar verdikleri ancak meyve çaylarının standartlar kadar yüksek etki göstermedikleri görülmektedir.

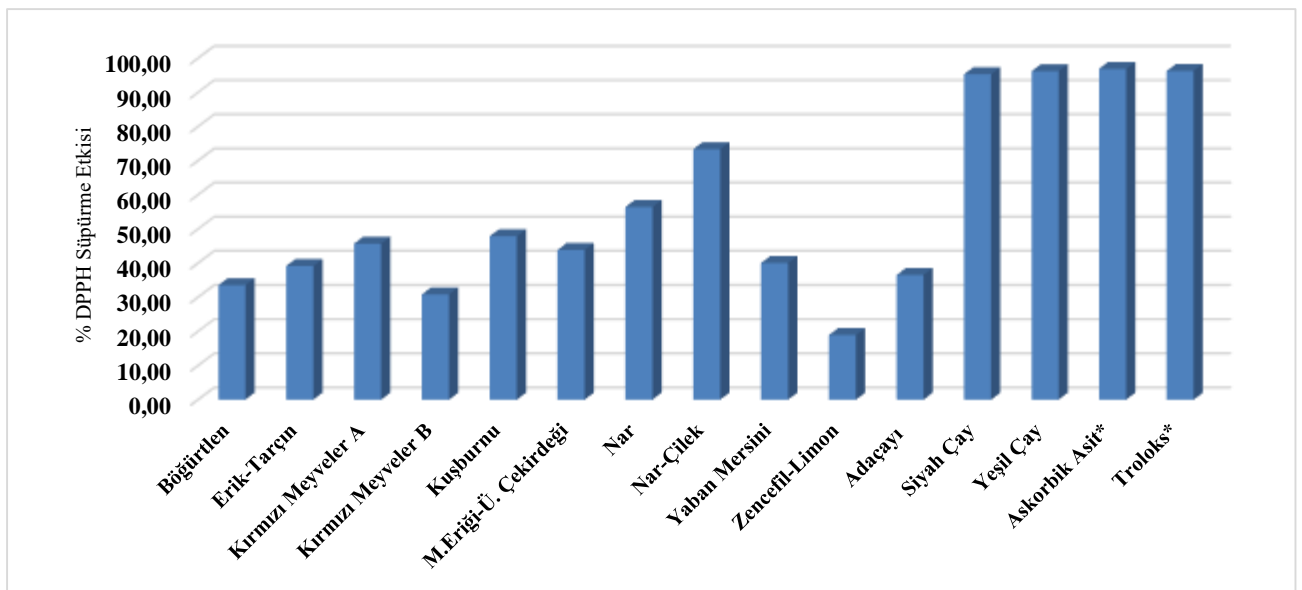
DPPH metodu çok sayıda bitkisel ekstrakta uygulanan standart yöntemlerden biridir. Meyvelerdeki yüksek antioksidan değerlerin antosiyanin ve flavonoidlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Faria ve ark. 2005). Böğürtlen yapraklarının toplanarak infüzyonlarının hazırlandığı bir çalışmada DPPH etkisi %81, mürver çiçeği infüzyonunda ise %37 olarak gösterilmiştir (Dawidowicz ve ark. 2006). Mürver çiçeği genellikle poşet çayların içeriğine eklenmektedir ancak çok yüksek etkiye sahip olmadığı görülmektedir. Yaban mersininin çeşitli ekstraktları ile yapılan bir çalışmada DPPH sonucu 5,37-6,40µmol troloks aralığında bulunmuştur. Böğürtlen yaprağı infüzyonu ile 2,37±0,23mM (Gorjanović ve ark. 2012) ve böğürtlen ve çilek infüzyonu ile de 125,2±2,9 ve 110,1±16,6mg askorbik asit/g kuru madde sonuç elde edilmiştir.

FRAP yöntemi, asidik ortamda Fe³⁺-2,4,6-tripiridil-S-triazin kompleksinin Fe²⁺'ya indirgenmesi esasına dayanır. Bu reaksiyonun şiddeti absorban değışikliği ile izlenir (Albayrak ve ark. 2010). Absorbanstaki artış indirgeme gücündeki artışı göstermektedir. FRAP metodu ile yapılan çalışmada en yüksek antioksidan aktiviteyi meyve çayları arasında nar-çilek karışım çayı

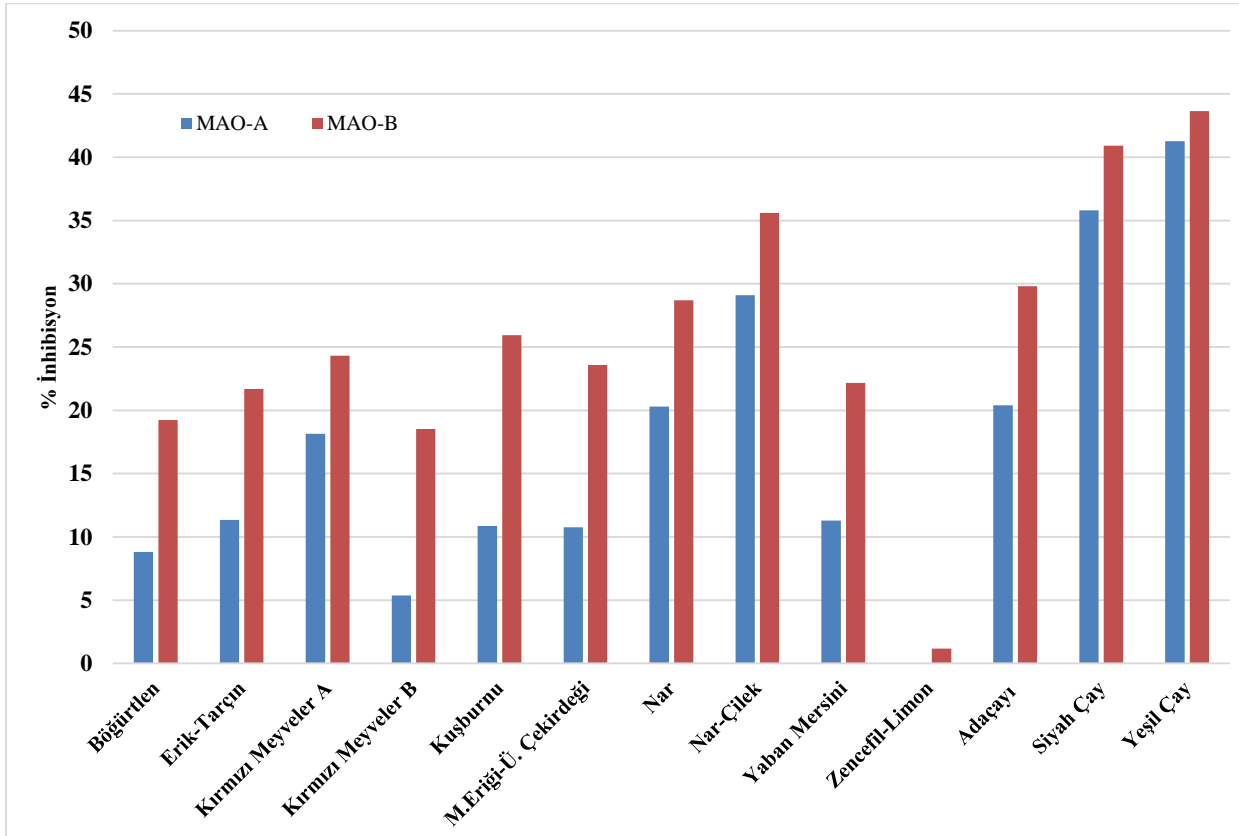
(0,793±0,087mmol troloks/g KA) göstermiştir. Nar, kuşburnu ve kırmızı meyveler-A karışım infüzyonları ise sırasıyla 0,650±0,098; 0,595±0,032 ve 0,561±0,035mmol troloks/g KA değerler ile yüksek aktivite gösteren diğer meyve çaylarıdır. Karşılaştırma için denenen siyah ve yeşil çay için sırasıyla 1,147±0,186 ve 1,090±0,172mmol troloks/g KA değerleri elde edilmiştir (Tablo 2). Böğürtlen yaprağı infüzyonu ile yapılan bir çalışmada 7,23±0,52mM (Gorjanović ve ark. 2012) ve böğürtlen ve çilek infüzyonu ile 36,7±11,1 ve 23,3±1,4mmol FeSO₄/L FRAP değeri elde edilmiştir (Buřičová ve ark. 2011).

CUPRAC yöntemi kromojenik ayıraç olarak neokuproin'in (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), Cu(I) ile 2:1 oranında kompleks oluşturmaya dayanır. İki değerlikli bakırın bir değerlikli bakıra indirgenmesini temel alan CUPRAC metodu ile yapılan çalışmada ise en yüksek antioksidan aktiviteyi meyve çayları arasında nar infüzyonu (1,525±0,204mmol troloks/g KA) göstermiştir. Nar çayının yüksek total fenolik madde içeriğı ve antioksidan kapasitesi bulunduğu farklı yöntemlerde de gösterilmiştir (Şahin 2013). Nar-çilek karışımı ve kuşburnu infüzyonları da yüksek etki gösteren diğer infüzyonlardır (Tablo 2). Siyah çay ve yeşil çay ile yapılan denemeden elde edilen aktivite sonuçları tüm çaylardan yüksek bulunmaktadır.

CUPRAC ve FRAP değerleri arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile incelenmiş ve Pearson korelasyon katsayısı hesaplanmıştır, $p < 0.0001$ ($r = 0,984$). Bu sonuçlara göre, yapılan denemelerden elde edilen sonuçların birbirleri ile korele oldukları görülmektedir. Yapılan antioksidan denemelerin sonucunda meyve çaylarından elde edilen değerler siyah ve yeşil çay infüzyonları kadar yüksek değildir. Ancak çay tüketimine alternatif olarak kullanılırken aynı zamanda sağlık açısından da fayda sağlayacak düzeyde antioksidatif madde içerdikleri elde edilen sonuçlardan görülmektedir.



Şekil 1. Çay infüzyonlarının DPPH yöntemi ile tayin edilmiş % cinsinden DPPH süpürme etkileri (*: standart olarak kullanılan antioksidan bileşikler; 0,5mM).



Şekil 2. Denenen çay infüzyonlarının (10µg kuru madde/mL) %MAO-A ve -B enzim inhibisyonları.

Tablo 2. Denenen çay infüzyonlarının Toplam Fenolik Madde miktarları ve FRAP/CUPRAC yöntemleri ile indirgeyici güçleri.

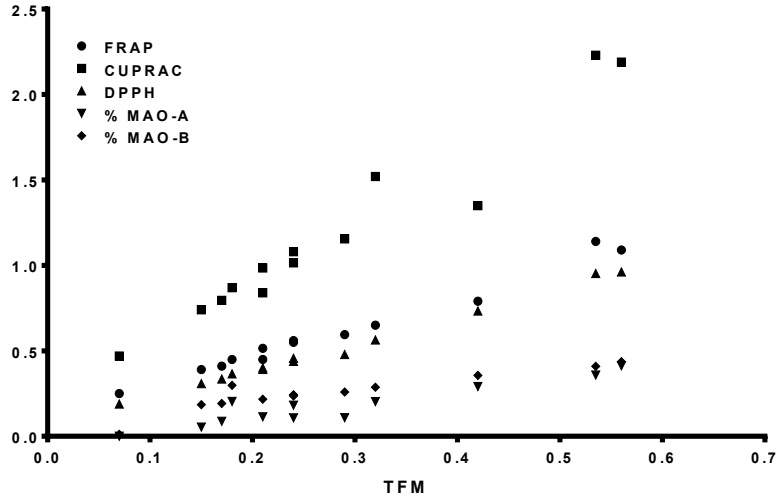
Çay infüzyonu	TFM ^a (mmol GA/g KA)	FRAP ^b (mmol troloks/g KA)	CUPRAC ^c (mmol troloks/g KA)
Böğürtlen	0,179±0,146	0,412±0,010	0,795±0,098
Erik-Tarçın	0,210±0,082	0,454±0,049	0,841±0,101
Kırmızı Meyveler A	0,244±0,033	0,561±0,035	1,087±0,102
Kırmızı Meyveler B	0,151±0,177	0,398±0,062	0,744±0,076
Kuşburnu	0,291±0,185	0,595±0,032	1,155±0,091
M.Eriği-Ü. Çekirdeği	0,242±0,182	0,551±0,011	1,015±0,087
Nar	0,328±0,153	0,650±0,098	1,525±0,204
Nar-Çilek	0,424±0,172	0,793±0,087	1,356±0,154
Yaban Mersini	0,218±0,018	0,515±0,045	0,985±0,106
Zencefil-Limon	0,071±0,062	0,254±0,012	0,473±0,058
Adaçayı	0,187±0,104	0,452±0,039	0,873±0,083
Siyah Çay	0,535±0,208	1,147±0,186	2,230±0,251
Yeşil Çay	0,564±0,215	1,090±0,172	2,199±0,219

TFM: Toplam Fenolik Madde, GA: Gallik Asit, KA: Kuru ağırlık, FRAP: Fe³⁺ İndirgeyici Antioksidan Güç, CUPRAC: Cu²⁺ İndirgeyici Toplam Antioksidan Kapasite, KA: Kuru Ağırlık

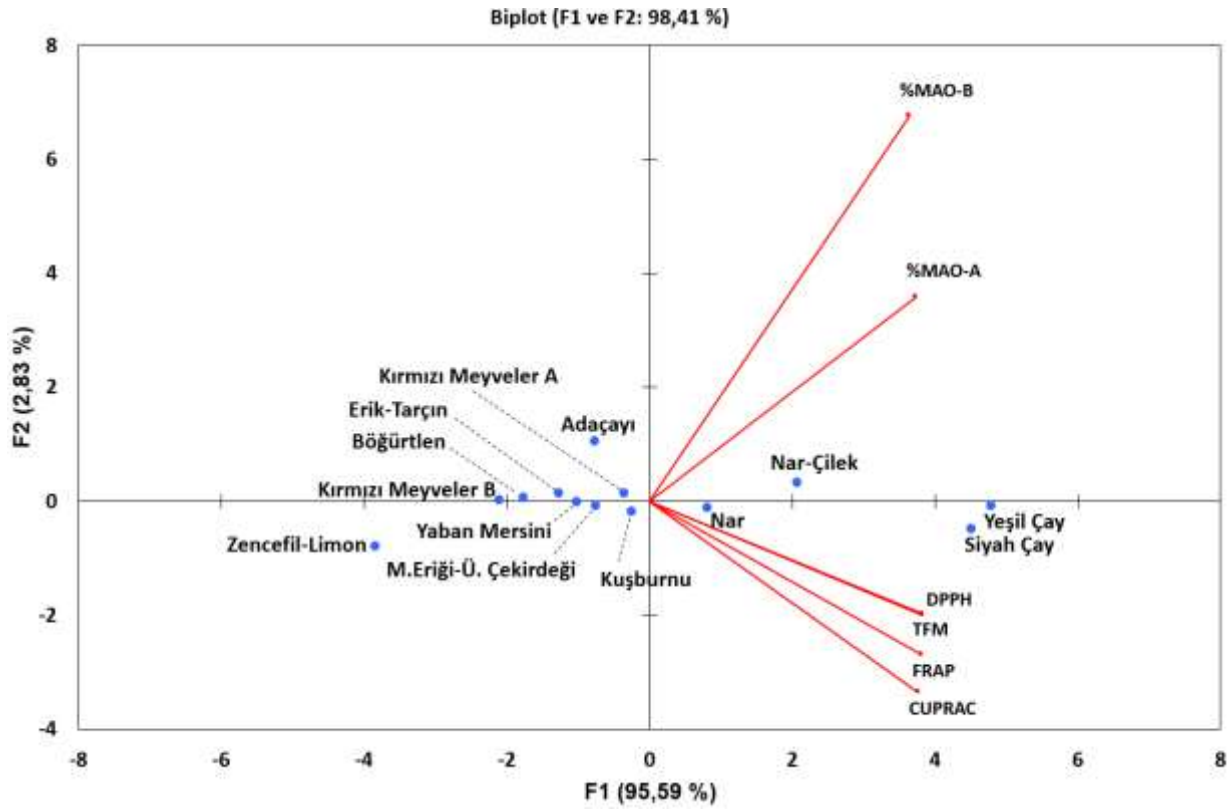
^a Total fenolik madde miktarı, mmol gallik asit eşdeğeri/g kuru ağırlık cinsinden verilmiştir.

^b Fe³⁺ indirgeyici antioksidan güç, troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesi, mmol troloks/g kuru ağırlık cinsinden verilmiştir.

^c Cu²⁺ indirgeyici toplam antioksidan kapasite, troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesi, mmol troloks/g kuru ağırlık cinsinden verilmiştir.



Şekil 3. TFM miktarı ile FRAP, CUPRAC, DPPH, MAO-A ve -B inhibisyon değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafik.



Şekil 4. TFM, FRAP, CUPRAC, DPPH, MAO-A ve -B inhibisyonu değerlerinin temel bileşenler analizi sonucu elde edilen biplot grafik.

MAO Enzim İnhibisyonu

Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda bitkisel fenolik bir bileşik olan paeonolün MAO-A inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Kong ve ark. 2004). Taze meyve kabukları ve yeşil çay yapraklarının (Ademosun ve Oboh 2014) MAO enzimi üzerine inhibisyon etkisinin bulunduğu dair çalışmalar olmakla birlikte çay infüzyonlarında yapılmış benzer bir çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız çalışmada 10µg kuru madde/mL

konsantrasyona karşılık gelen inhibisyon yüzdeleri, MAO-A ve -B enzimleri için ayrı ayrı çalışılmıştır (Şekil 2). En yüksek MAO-A inhibisyonu gösterenler, yeşil çay (%41,26) ve siyah çay (%35,8) infüzyonlarıdır. Diğer takip eden çay infüzyonları ise nar-çilek karışımı (%29,1), ada çayı (%20,4) ve nar (%20,3) infüzyonlarıdır. Zencefil-limon infüzyonu (%0,01) ise en düşük MAO-A enzim inhibisyonuna sahip olan çaydır. En yüksek MAO-B inhibisyonu gösterenler, yeşil çay (%43,64) ve siyah

çay (%40,92) infüzyonlarıdır. Diğer takip eden çay infüzyonları ise nar-çilek karışımı (%35,59), ada çayı (%29,81) ve nar (%28,7) infüzyonlarıdır. Zencefil-limon infüzyonu (%1,18) ise en düşük MAO-B enzim inhibisyonuna sahip olan çaydır. Tüm değerler karşılaştırıldığında diğer infüzyonlar kadar yüksek inhibisyon etkisi göstermemesine rağmen kırmızı meyve B çayının (MAO-A: %5,36; MAO-B: %18,53) 3,5 kat MAO-B seçiciliğine sahip olduğu görülmektedir. Kuşburnu infüzyonu 2,4 kat, mürdüm eriği-üzüm çekirdeği ile böğürtlen infüzyonları 2,2 kat, yaban mersini ile erik-tarçın infüzyonları ise 1,9 kat MAO-B seçici bulunmuştur. Çalışmada yüksek inhibisyon değeri gösteren yeşil çay ve siyah çayda herhangi bir seçicilik bulunmamaktadır.

TFM miktarları ile FRAP, CUPRAC, DPPH, MAO-A ve MAO-B inhibisyonu değerleri arasındaki ilişki Pearson analizi ile hesaplandı, $p < 0.0001$. Pearson korelasyon katsayıları sırasıyla $r = 0,990$; $0,972$; $0,997$; $0,938$ ve $0,912$ olarak elde edildi. Bu sonuçlara göre, yapılan denemelerden ortaya çıkan sonuçların TFM miktarı ile yüksek oranda ilişkili olduğu görülmektedir (Şekil 3).

Temel Bileşenler Analizi

Temel bileşenler analizi, çeşitli çay infüzyonlarının antioksidan etkilerini ve MAO inhibisyonlarını sınıflandırabilmek için tercih edilmiştir (Wang ve Hu 2014). Bu analiz yöntemi ile çok boyutlu farklı ve karmaşık verilerin yapısını grafik şeklinde incelemek mümkün olmaktadır. Çay infüzyonlarının TFM denemesi, 3 farklı antioksidan denemesi, MAO-A ve MAO-B inhibisyon denemelerinden elde edilen sonuçlar girilerek biplot grafik oluşturulmuştur (Şekil 4). Birinci ve ikinci temel bileşenlere göre en uyumlu sonuçlar olan %95,59 ve 2,83 data varyansları elde edilmiştir. Yöntemin yeterli

olabilmesi için varyans değerlerinin toplamının en az %90-95 olması gerekmektedir, elde ettiğimiz toplam varyans bu çalışma için %98,41'dir. Çalışmada elde edilen değerler, nar ve nar-çilek karışım çayının en yüksek etkiye sahip olan siyah çay ve yeşil çaya en yakın değerleri gösterdiğini ve aynı zamanda MAO enzim inhibisyonunu sağladığını ortaya koymaktadır.

Sonuç

Son yıllarda artan çalışmalar ile beslenme uzmanları ve bilim insanları, günlük tüketim sırasında besin yoluyla alınan antioksidanların sağlık açısından önemli bir ajan olduklarını kabul etmektedirler. Bunu sağlayan en önemli besin grubu, yüksek oranda antioksidan özelliklere sahip bileşikler ve çeşitli fitokimyasalları içeren meyve ve sebzelerden oluşmaktadır. Bu nedenle, her kültürde yerel olarak tüketilen pek çok ürünün antioksidan içeriği ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır.

Bu çalışmada Türkiye'de tüketilen çeşitli meyve çaylarının antioksidan etkileri ve MAO enzimini inhibe edici özellikleri araştırılmış, siyah çay ve yeşil çay ile karşılaştırılmıştır. Yüksek miktarda fenolik madde içeren çay infüzyonlarının yüksek antioksidan kapasiteye ve MAO inhibisyonuna sahip olduğu ortaya konulmuştur. Kuşburnu başta olmak üzere diğer bazı çay infüzyonlarının da MAO-B seçici inhibisyon sağladıkları görülmektedir. Oksidatif stresin nörodegeneratif hastalıkları tetiklediği ve antioksidan maddelerin oksidatif stresi önlediği bilgisinden yola çıkılarak yapılan bu çalışmada, yüksek antioksidan aktiviteye ve fenolik madde içeriğine sahip çay infüzyonlarının MAO enzimini inhibe edebildikleri ilk kez ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar özellikle kırmızı meyve çaylarının günlük siyah/yeşil çay tüketimine alternatif olarak kullanılmalarının insan sağlığına da pozitif katkısı olduğunu göstermektedir.

Kaynaklar

- Abdelhafez, O.M., Amin, K.M., Ali, H.I., Abdalla, M.M. & Batran, R.Z. 2013. Monoamine oxidase A and B inhibiting effect and molecular modeling of some synthesized coumarin derivatives. *Neurochemistry International*, 62: 198-209.
- Ademosun, A.O. & Oboh, G. 2014. Comparison of the inhibition of monoamine oxidase and butyrylcholinesterase activities by infusions from green tea and some citrus peels. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2014: 1-5.
- Albayrak, S., Sağdıç, O. & Aksoy, A. 2010. Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes University Journal of the Institute of Science and Technology*, 26: 401-409.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. & Karademir, S.E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7970-7981.
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G. & Kefalas, P. 2005. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89: 27-36.
- Buřičová, L., Andjelkovic, M., Čermáková, A., Reblova, Z., Jurcek, O., Kolehmainen, E., Verh , R. & Kvasnička, F. 2011. Antioxidant capacities and antioxidants of strawberry, blackberry and raspberry leaves. *Czech Journal of Food Sciences*, 29: 181-189.
- Çağrı, Ö. & Ötleş, S. 2008. Farklı demleme sürelerinde hazırlanan bitki çaylarının antioksidan aktiviteleri ile renkleri arasındaki korelasyonun belirlenmesi. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, 21-23 Mayıs, Erzurum, 109-112.
- Danis, O., Yuce-Dursun, B., Çimen, T., Demir, S., Salan, Ü., Yalçın, G. & Ogan, A. 2014. Evaluation of antioxidant, radical-scavenging and acetylcholinesterase inhibitory activities of various culinary herbs cultivated in southern Turkey. *Journal of Food Biochemistry*, 38: 602-611.
- Dawidowicz, A.L., Wianowska, D. & Baraniak B. 2006. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *LWT - Food Science and Technology*, 39: 309-315.

10. Emekli-Alturfan, E., Yarat, A. & Akyuz, S. 2009. Fluoride levels in various black tea, herbal and fruit infusions consumed in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 1495-1498.
11. Fang, N., Yu, S. & Prior, R.L. 2002. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3579-3585.
12. Faria, A., Oliveira, J., Neves, P., Gameiro, P., Santos-Buelga, C., De Freitas, V. & Mateus N. 2005. Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6896-6902.
13. Gorjanović, S., Komes, D., Pastor, F.T., Belščak-Cvitanović, A., Pezo, L., Hećimović, I. & Sužnjević, D. 2012. Antioxidant capacity of teas and herbal infusions: Polarographic assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 9573-9580.
14. Hodgson, J.M. & Croft, K.D. 2010. Tea flavonoids and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 31: 495-502.
15. Horžić, D., Komes, D., Belščak, A., Ganić, K.K., Iveković, D. & Karlović, D. 2009. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115: 441-448.
16. Ismail, A., Marjan, Z.M. & Foong, C.W. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, 87: 581-586.
17. Kong, L.D., Cheng, C.H.K. & Tan, R.X. 2004. Inhibition of MAO A and B by some plant-derived alkaloids, phenols and anthraquinones. *Journal of Ethnopharmacology*, 91: 351-355.
18. Lo, K.M. & Cheung, P.C.K. 2005. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chemistry*, 89: 533-539.
19. Moraes-de-Souza, R.A., Oldoni, T.L.C., Regitano-d'Arce, M.A.B. & Alencar, S.M. 2008. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 6: 41-47.
20. Naithani, V., Nair, S. & Kakkar, P. 2006. Decline in antioxidant capacity of Indian herbal teas during storage and its relation to phenolic content. *Food Research International*, 39: 176-181.
21. Piljac-Žegarac, J., Valek, L., Stipčević, T. & Martinez, S. 2010. Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions. *Food Chemistry*, 121: 820-825.
22. Shi, L., Yang, Y., Li, Z., Zhu, Z., Liu, C. & Zhu, H. 2010. Design of novel nicotinamides as potent and selective monoamine oxidase a inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18: 1659-1664.
23. Şahin, S. 2013. Evaluation of antioxidant properties and phenolic composition of fruit tea infusions. *Antioxidants*, 2: 206-215.
24. Van den Berg, D., Zoellner, K.R., Ogunrombi, M.O., Malan, S. F., Terre'Blanche, G., Castagnoli, N., Bergh, J.J. & Petzer, J.P. 2007. Inhibition of monoamine oxidase B by selected benzimidazole and caffeine analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15: 3692-3702.
25. Von Gadow, A., Joubert, E. & Hansmann, C.F. 1997. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry*, 60: 73-77.
26. Wang, R.J. & Hu, M.L. 2014. Antioxidant capacities of fruit extracts of five mulberry genotypes with different assays and principle components analysis. *International Journal of Food Properties*, 14: 1-8.
27. Xi, J., Shen, D., Zhao, S., Lu, B., Li, Y. & Zhang, R. 2009. Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction. *International Journal of Pharmaceutics*, 382: 139-143.

EXPOSURE TO SODIUM FLUORIDE VIA DRINKING WATER CAUSE CYTOTOXICITY AND OXIDATIVE DAMAGE IN LEYDIG CELLS

Yasemin AYDIN

Istanbul University, Faculty of Science, Department of Biology, 34134, Vezneciler, Istanbul, Turkey
e-mail: yastun@istanbul.edu.tr

Received (Alınış): 3 April 2017, Accepted (Kabul): 9 August 2017, Online First (Erken Görünüm): 22 September 2017, Published (Basım): 15 December 2017

Abstract: This study investigated the *in vitro* effects of sodium fluoride (NaF) on cytotoxicity and oxidative stress in TM3 Leydig cells. Cytotoxicity was determined with cell viability and proliferation rate, and lactate dehydrogenase leakage assay. Oxidative damage was measured by increasing lipid peroxidation product, reactive oxygen species (ROS) and decreasing cellular enzymatic and non-enzymatic antioxidants. Leydig cells were exposed to two different concentrations of NaF (2ppm and 16ppm) for 24h, 48h and 72h which are considered to be the lowest and highest fluoride concentrations based on daily intake of drinking water in Turkey. The present study showed that cell viability and proliferation decreased and oxidative stress increased in NaF-exposed Leydig cells in a concentration- and time-dependent manner. The findings suggest that fluoride-treatment can cause damage in Leydig cells, especially in antioxidant system of the cells. The results also proved that oxidative stress plays an important role in impairments on Leydig cell function.

Key words: Fluoride, cytotoxicity, lipid peroxidation, reactive oxygen species, antioxidant system, Leydig cell.

Su Aracılığıyla Sodyum Florür Maruziyeti Leydig Hücrelerinde Sitotoksiste ve Oksidatif Hasara Neden Olur

Özet: Bu çalışma sodyum florürün (NaF) TM3 Leydig hücrelerinde *in vitro*'da sitotoksiste ve oksidatif stres üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Sitotoksiste, hücre canlılık ve çoğalma hızı ve laktat dehidrogenaz testi ile belirlenmiştir. Oksidatif hasar, artan lipid peroksidasyon ürünü, reaktif oksijen türleri (ROS) ve azalan hücrel enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar yoluyla ölçülmüştür. Leydig hücreleri, Türkiye'de içme suyunun günlük alımına dayanan en düşük ve en yüksek florür konsantrasyonları olan iki farklı NaF (2ppm ve 16ppm) konsantrasyonuna 24 saat, 48 saat ve 72 saat maruz bırakılmıştır. Bu çalışma, NaF'ye maruz bırakılan Leydig hücrelerinde, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak, hücre canlılığı ve proliferasyonundaki azalmanın ve oksidatif stresin arttığını göstermiştir. Bu sonuçlar florür uygulanmasının Leydig hücrelerinde ve özellikle hücrelerin antioksidan sisteminde hasara neden olabileceğini önerir. Bu aynı zamanda oksidatif stresin Leydig hücresi fonksiyonu üzerinde bozulmalarda önemli bir rol oynadığını kanıtlamaktadır.

Anahtar kelimeler: Florür, sitotoksiste, lipid peroksidasyonu, reaktif oksijen türleri, antioksidan sistem, Leydig hücreleri.

Introduction

Fluorine is the lightest halogen and the most electronegative element among all other elements (Kaminsky *et al.* 1990). It is widely distributed in the environment accounting for 0.3g/kg of the earth's crust (Ayoob & Gupta 2006). It usually exists in the environment as inorganic fluorides such as sodium fluoride, calcium fluoride and hydrogen fluoride or organic fluoride compounds such as methyl fluoride, polytetrafluoroethylene and perfluorooctanesulfonic acid (Kaminsky *et al.* 1990). Fluoride is found in the environment in excessive amounts and normally enters human body through drinking water, food, industrial products, dental products, drugs, pesticides, fluoride-containing beverages, cosmetics, but the major source of daily intake is drinking water (Chinoy *et al.* 2004).

Fluoride has both beneficial and deleterious effects on human health (Lennon *et al.* 2004). Some studies suggested that fluoride in low concentrations is essential for mammals and humans, especially for their growth and dental and bone development (Chachra *et al.* 2010, Sun *et al.* 2016). Fluoride is also known to have disruptive effects on various tissues in the body. Studies showed that fluoride intake can cause hematological, hepatic, renal and neurological disorders (Mittal & Flora 2007, Chouhan & Flora 2010, Chouhan *et al.* 2010). Epidemiological studies showed that the relationship between excessive fluoride intake and cancer mortality is correlated in relation to concentration of fluoride in the water supply (Kaminsky *et al.* 1990). Although excessive exposure to fluorides on a daily basis might have a potential negative

impact on male fertility by affecting spermatogenesis, steroidogenesis and sperm fertilizing ability (Zakrzewska *et al.* 2002, Gupta *et al.* 2007, Long *et al.* 2009, Wang *et al.* 2009, Sun *et al.* 2010, Lu *et al.* 2014, Kim *et al.* 2015), its effects on reproductive organs are not fully understood. The present study, therefore, was performed in order to determine direct effects of sodium fluoride on Leydig cell viability, proliferation, cytotoxicity and oxidative damage *in vitro*.

Materials and Methods

Cell Culture and Treatment

Mouse Leydig cell, TM3, is a non-tumorigenic cell line derived from Leydig cells of 11–13d old mice and was purchased from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA). The cell was maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12 medium (DMEM/F12, Wisent Inc., Canada) supplemented with 2.5% Fetal Bovine Serum (FBS, Wisent Inc., Canada), 5% Horse Serum (HS, Wisent Inc., Canada) and with 100U/ml of penicillin and streptomycin as antibiotics in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air in a CO₂ incubator (Thermo Scientific, USA).

Sodium fluoride concentrations were determined by considering fluoride concentrations humans are exposed to by drinking water (Fawell & Bailey 2006, Oruc 2008, Baba & Tayfur 2011). Leydig cells were exposed to the lowest (2 ppm) and the highest (16 ppm) fluoride concentrations based on daily intake from drinking water for 24, 48 and 72 hours. Sodium fluoride concentrations were prepared in cell culture media containing 1% HS. The control Leydig cells were treated with cell culture media containing 1% HS as a vehicle. All solutions were sterilized with 0.2µm millipore filter.

Cytotoxicity

Cell Viability Assay

The MTT tetrazolium salt [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] colorimetric assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) was performed to measure the viability of cells (Mosmann 1983). Viability ratios of cells were compared to the cell viability of the controls which was treated as 100%.

Cell Proliferation BrdU Incorporation Assay

The Cell Proliferation ELISA kit, BrdU (5-bromo-2'-deoxy-uridine), used is a colorimetric immunoassay for quantification of cell proliferation based on the measurement of BrdU incorporation during DNA synthesis (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Lactate dehydrogenase (LDH) Leakage Assay

LDH was measured using the micro plate based Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The results were obtained by measuring the absorbance of the red formazan product at 492nm with an ELISA reader.

Biochemical Analysis

After sodium fluoride treatments, cells (1x10⁶) were harvested and transferred into ice-cold Tris-HCl buffer (pH:7.2) and were sonicated using an ultrasonicator. The resulting cell suspension was centrifuged at 1500g for 10min. at 4°C. Clear supernatants were collected for lipid peroxidation, reactive oxygen species, enzymatic and non-enzymatic antioxidants measurements as biochemical parameters.

Determination of Lipid Peroxidation

The level of lipid peroxidation was measured using the method described by Devasagayam & Tarachand (1987). The malondialdehyde (MDA) content of the samples were expressed as nanomoles of MDA formed per milligram of protein.

Determination of Reactive Oxygen Species

Hydroxyl radical production was evaluated following the method described by Puntarulo & Cederbaum (1988). The hydroxyl radical content of the samples was expressed as mmol/min per mg protein. Hydrogen peroxide (H₂O₂) production was quantified following the method described by Holland & Storey (1981). The H₂O₂ content of the samples was expressed as mol/min per mg protein.

Determination of Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidants

Superoxide dismutase activity (EC: 1.15.1.1, SOD) was measured as the inhibition of autoxidation of pyrogallol by using the method described by Marklund & Marklund (1974). Activity was monitored at 440nm for 180s. Data were expressed as U of SOD/mg protein. Catalase (EC 1.11.1.6, CAT) activity was determined by the method of Sinha (1972) by following the decomposition of H₂O₂ in absorbance at 570nm. The enzyme activity was calculated using an extinction coefficient of 1.88x10⁴ M⁻¹ cm⁻¹ and was expressed in international units (I.U.) i.e., in U of CAT/mg protein. Glutathione Peroxidase (EC 1.11.1.9, GPx) activity was measured following Hafeman *et al.* (1974) by using H₂O₂ as a substrate and as the rate constant of glutathione decomposition. Activity was monitored at 412nm. Data were expressed as µM of glutathione consumed per mg of protein. The method by Habig *et al.* (1974) was used to determine glutathione-S-transferase (EC 2.5.1.1.8, GST). GST activity was expressed as µmol GS-DNB min⁻¹ per mg protein using an extinction coefficient of 9.6mM cm⁻¹. Gamma-Glutamyl Transpeptidase (EC 2.3.2.2, γ-GT) activity was estimated by the method of Orłowski & Meister (1965). The level of reduced glutathione (GSH) was determined based on the reaction with Ellman's reagent (0.4% DTNB in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4) and reduced glutathione (Ellman 1959). The absorbance was recorded at 412nm using a spectrophotometer. The GSH content was expressed as mmol of reduced glutathione/mg protein.

Statistical analysis

All statistical analyses were carried out using the software program GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Experimental data grouped by one variable were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey posttest. The results were expressed as mean \pm standard error mean. Data distribution was tested for normality using the Shapiro-Wilk test and then data were evaluated with one-way ANOVA using Tukey's multiple comparisons tests; values of $p < 0.001$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

Results

Cytotoxicity Effects of Sodium Fluoride

Cytotoxic effects of sodium fluoride (NaF) on TM3 Leydig cells after 24h, 48h and 72h incubation was measured by MTT and BrdU assays and the data are shown in Figure 1. According to results of MTT reduction assay, both 2ppm and 16ppm NaF concentrations reduced cell viability rate at 24h, 48h and 72h (Fig. 1A). NaF inhibited cell proliferation in a dose and time-dependent manner (Fig. 1B). The addition of 2ppm and 16ppm NaF for 24h, 48h and 72h reduced cellular 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU)-uptake significantly to 73.5% (2ppm NaF,

$p < 0.001$), 65.6% (2ppm NaF, $p < 0.001$), and to 62.3% (2ppm NaF, $p < 0.001$) and 65.7% (16ppm NaF, $p < 0.001$), 54.3% (16ppm NaF, $p < 0.001$), 50.1% (16ppm NaF, $p < 0.001$) respectively, compared to non-treated control cultures (100%).

The cell membrane damage induced by NaF in TM3 Leydig cells was investigated by the release of LDH, a biomarker of membrane integrity. LDH release was significantly increased after treatment with 2ppm ($p < 0.01$) and 16ppm ($p < 0.001$) NaF as compared with an untreated control (Fig. 1C).

Effects of Sodium Fluoride on Lipid Peroxidation and ROS

Malondialdehyde (MDA) content as a marker of lipid peroxidation after exposure to NaF is presented in Figure 2A. The results indicated that MDA levels significantly increased in NaF treated groups in a dose and time-dependent manner compared with the control (Fig. 2A). To determine NaF-induced ROS generation, we measured hydroxyl radical and hydrogen peroxide in Leydig cells under different NaF concentrations. ROS generation in the NaF-treated cells resulted in a significant and concentration and time-dependent increase ($p < 0.05$, 0.01 or 0.001) (Fig. 2B and 2C).

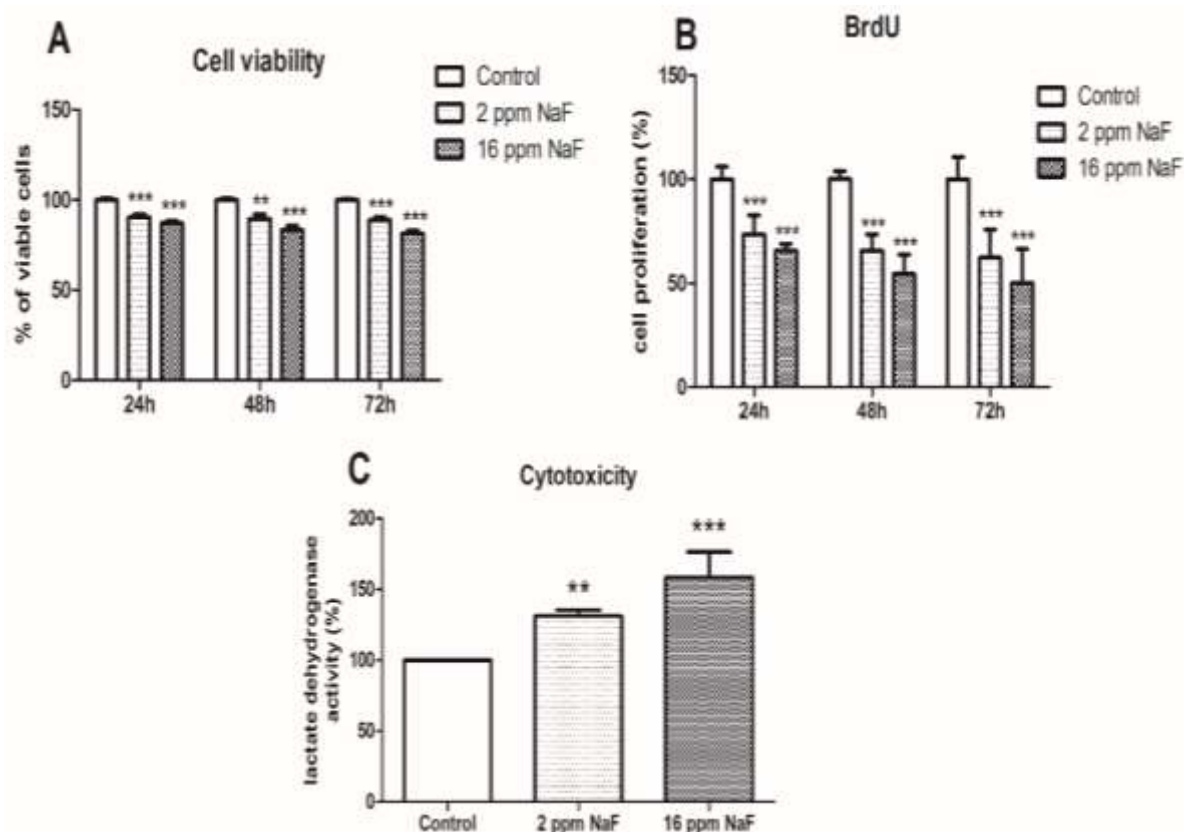


Fig. 1. Concentration- and time-dependent effects of NaF on Leydig cell viability (A), proliferation (B) and cytotoxicity (C). Data are expressed as mean \pm S.E.M from three repeated experiments. *indicates significantly different from control (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

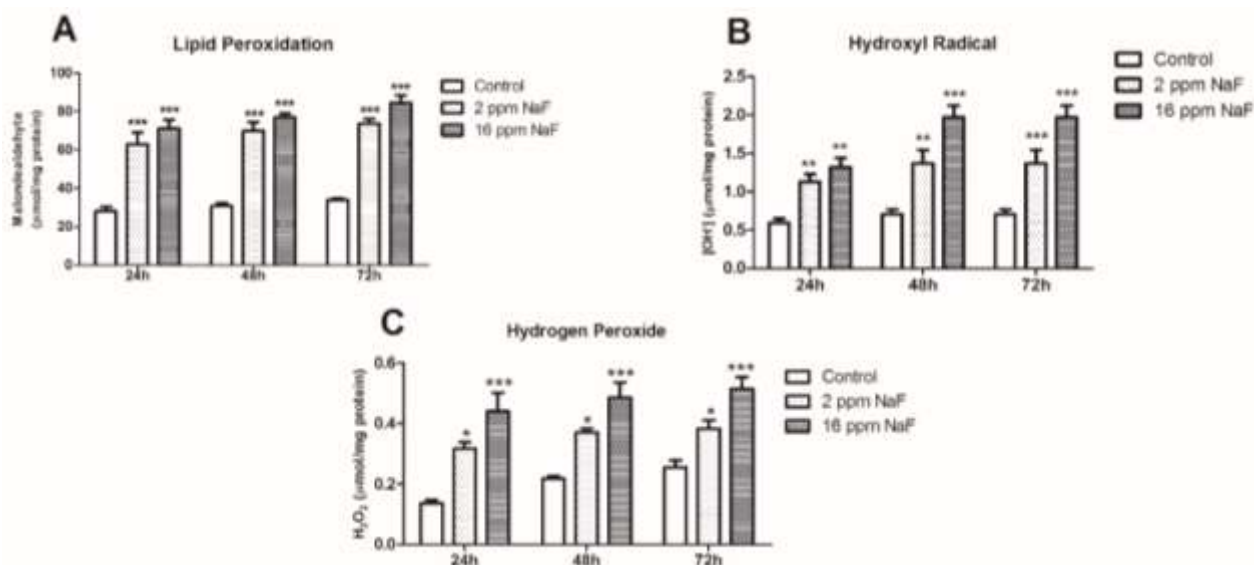


Fig. 2. Effects of NaF concentrations on MDA levels (A), hydroxyl radical (B) and H₂O₂ (C) in Leydig cells. Data are expressed as mean \pm S.E.M from three repeated experiments. * indicates significantly different from control (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Effects of Sodium Fluoride on Cellular Antioxidant System

Figures 3 and 4 provide data on cellular levels of antioxidant enzymes such as SOD, CAT, GPx, GST, γ -GT, and non-enzymatic antioxidant such as glutathione in control and NaF-exposed Leydig cells for 24, 48 and 72h. The activity of this group of enzymes was significantly diminished in a dose and time-dependent manner when compared with the respective control. SOD, CAT and GPx were significantly lower at 2ppm ($p < 0.05$, $p < 0.01$) and 16ppm ($p < 0.001$) concentrations for all time points

(Fig. 3A, B and C). Gamma-Glutamyl Transpeptidase (γ -GT) activity was significantly reduced except for 2ppm NaF-treated group for 24h (Fig. 3D). GST enzyme activity was significantly diminished for 2ppm ($p < 0.05$) and 16ppm ($p < 0.001$) NaF-treated group at 24 and 72h, however there is no significant difference for 2ppm NaF-treated group at 48h (Fig. 4A). Glutathione depletion was regarded as the marker of oxidative stress in cells, glutathione level in NaF-treated groups decreased significantly in 16ppm NaF group for 24 and 72h ($p < 0.05$) (Fig. 4B).

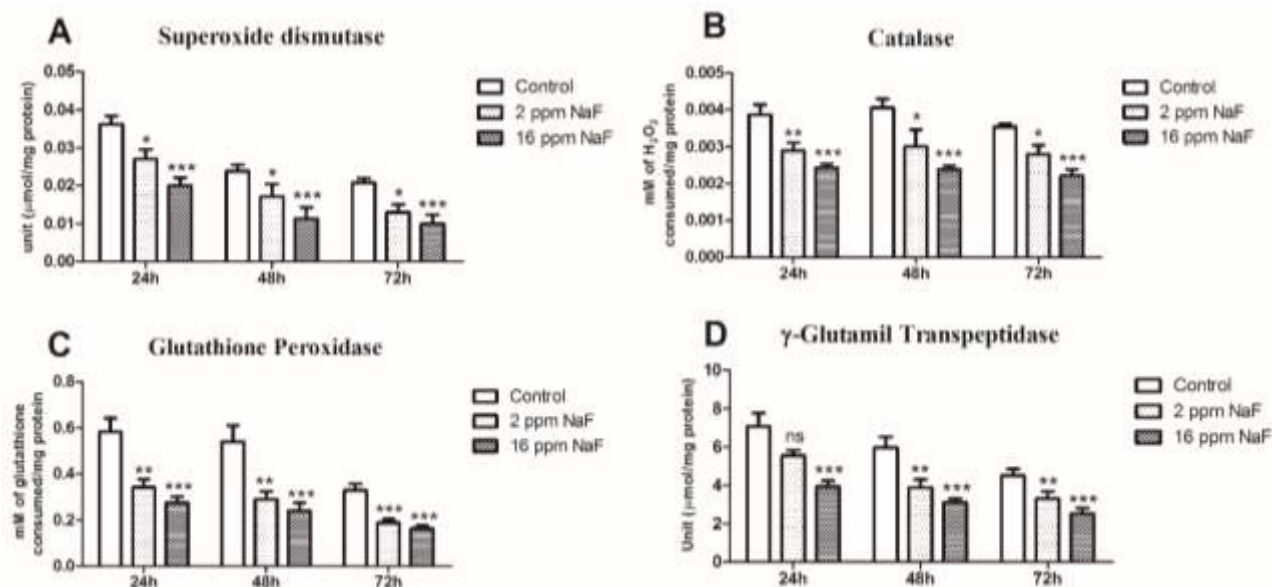


Fig. 3. Effects of NaF concentrations on SOD (A), catalase (B), GPx (C) and γ -GT (D) in Leydig cells. Data are expressed as mean \pm S.E.M from three repeated experiments. * indicates significantly different from control (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

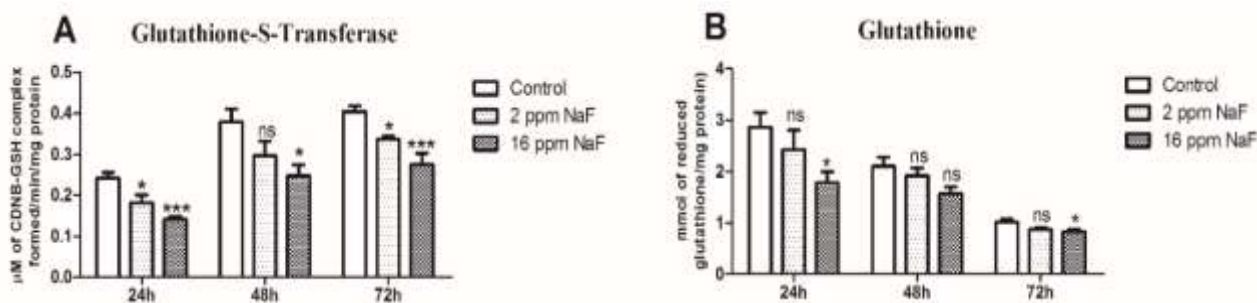


Fig. 4. Effects of NaF concentrations on GST (A), GSH (B) in Leydig cells. Data are expressed as mean \pm S.E.M from three repeated experiments. * indicates significantly different from control (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Discussion

Various environmental toxicants are capable of causing oxidative stress, developmental and reproductive abnormalities and infertility. Fluoride is known as an environmental contaminant that causes various hazard effects on organisms (Kaminsky *et al.* 1990, Ayoob & Gupta 2006, Long *et al.* 2009, Dey & Giri 2016). Fluoride is found in all natural waters. It can be extremely high in groundwater, depending on a number of factors, such as volcanic rocks and minerals. Drinking water is the largest fluoride source, adding to your exposure from dental products (Fawell *et al.* 2006). Previous studies demonstrated that fluoride has toxic effects on male reproductive system, including reproductive organ damage (Chinoy *et al.* 2004, Gupta *et al.* 2007), endocrine disruption of reproductive system (Long *et al.* 2009) and the expression of steroidogenesis genes (Dong *et al.* 2016).

Several studies suggested that fluoride exposure decrease cell viability in different cells including Sertoli (Yang *et al.* 2015, Yilmaz & Erkan 2015), Leydig (Song *et al.* 2014), human lung BEAS-2B (Ying *et al.* 2017), lung epithelial cells (A549) (Ameeramja *et al.* 2016), primary rat ameloblast (Wang *et al.* 2016) and primary hippocampal neurons (Zhang *et al.* 2007) dose- and time-dependent manner. In addition, some studies showed that germinal and interstitial cell count (Bataneh & Nusier 2006), epididymal sperm count and viability (Wan *et al.* 2006) were significantly reduced after NaF treatment. According to findings in this study, 2ppm NaF exposure decreased cell viability by 90% at 24h, 89% at 48h, 88% at 72 h and 16ppm NaF decreased cell viability by 86% at 24h, 83% at 48h, 81% at 72 h in Leydig cells meaning that NaF decrease cell viability in a dose- and time-dependent manner. It is well known that BrdU incorporation assay measures the amount of DNA synthesized by the dividing cells and can be a good measure of cell proliferation. Previous studies reported that NaF had a biphasic effect on cell proliferation depending on concentration in ameloblast lineage cells (Yan *et al.* 2007, Riksen *et al.* 2011). According to Yan *et al.* (2007), low fluoride concentrations increased cell proliferation, while high fluoride concentrations significantly decreased cell proliferation in ameloblast-derived cell lines. Besides, fluoride inhibited cell growth, proliferation,

mitochondrial activity and protein synthesis in cultured human pulp cells in a concentration-dependent manner (Chang & Chou 2001). Song *et al.* (2013) investigated cell cycle arrest, apoptosis and DNA damage of fluoride in TM3 Leydig cells *in vitro*. Fluoride reduced proliferating index in Leydig cells to 81% at 16.79ppm, 70% at 25.19ppm and 59% at 33.59ppm at 24h, however proliferating index did not alter at 8.39ppm concentrations. Nevertheless, fluoride did not significantly affect Sertoli cells proliferation in 4ppm and 20ppm concentrations (Yilmaz & Erkan 2015). In our present study, 2ppm concentration fluoride treatment significantly decreased cell proliferation in TM3 Leydig cells to 73.5% at 24h, 65.6% at 48h, 62.3% at 72h and 16ppm concentration to 65.7% at 24h, 54.3% at 48h, 50.1% at 72h. These results revealed that NaF decreased amount of DNA synthesized related to decrease in cell proliferation in Leydig cells as in other cell types (Chang & Chou 2001, Riksen *et al.* 2011, Song *et al.* 2013, Yan *et al.* 2007).

Lactate dehydrogenase (LDH) is a stable cytoplasmic enzyme stored in various cell types. It has been widely used to evaluate damage of plasma membrane and toxicity of cells (Weyermann *et al.* 2005). Earlier studies showed that increased LDH release of Sertoli cells (Yilmaz & Erkan 2015), primary human hepatocytes (Wang *et al.* 2004) and primary hippocampal neurons (Zhang *et al.* 2007) after treatment of NaF were notably enhanced, while fluoride had no major cytotoxic effect on the LS-8 ameloblast derived cell line (Riksen *et al.* 2011). In the present study, 2ppm (131.2%) and 16ppm (158.4%) NaF concentrations significantly increased LDH release in Leydig cells, meaning that fluoride has cytotoxic effects on TM3 Leydig cells.

Reactive oxygen species (ROS) are used for oxygen-derived free radicals (superoxide, hydroxyl radical, nitric oxide) and non-radical oxygen derivatives of high reactivity (singlet oxygen, hydrogen peroxide, peroxynitrite, hypochlorite), which can cause damage to biological targets such as lipid membranes, DNA and cellular proteins. In return, cells have their own defense system which are composed of antioxidant enzymes and other molecules (SOD, catalase, GPx, GST and GSH) (Kohen & Nyska 2002). Fluoride can disrupt this prooxidant/antioxidant balance with increasing ROS and

lipid peroxidation product and with decreasing cellular antioxidant enzymes such as SOD, catalase and GPx in various tissues and cells (Akdoğan *et al.* 2002, Zhang *et al.* 2007, Rao & Bhatt 2012, Yang *et al.* 2013, Orta & Erkan 2014, Feng *et al.* 2015). Various *in vivo* studies showed that NaF in high doses can induce membrane lipid peroxidation in liver, kidney (Mittal & Flora 2006, Mittal & Flora 2007), testis (Rao & Bhatt 2012, Zhang *et al.* 2013) and spermatozoa (Izquierdo-Vega *et al.* 2008). In addition, several *in vitro* studies demonstrated that the effect of NaF on lipid peroxidation depends on dose and time dependent manner. Lipid peroxidation increased significantly in Sertoli cells after 4ppm and 20ppm NaF treatment for both 24h and 48h (Yilmaz & Erkan 2015), however there was no significant change in lipid peroxidation level in primary Sertoli cells after 6ppm NaF treatment (Yang *et al.* 2015). Moreover, lipid peroxidation product significantly increased in 80ppm NaF dose for 24h in human hepatocyte (Wang *et al.* 2004) and in 20ppm, 40ppm and 80ppm doses for 24h in primary hippocampal neurons (Zhang *et al.* 2007). Our present study showed that both 2ppm and 16ppm NaF treatment increased lipid peroxidation in Leydig cells. Several recent studies demonstrated that NaF increased ROS levels in Sertoli cells (Yang *et al.* 2015, Yilmaz & Erkan 2015), primary hippocampal neurons (Zhang *et al.* 2007), liver, kidney and brain tissues (Chouhan & Flora 2008). Our present results revealed that NaF increased hydrogen peroxide and hydroxyl radical both at 2ppm and 16ppm exposures for 24h, 48h and 72h, suggesting that free radicals and non-radical oxygen derivatives were involved in oxidative damage.

The potential harmful effects of ROS are controlled by cellular antioxidant defense system. Cellular antioxidant defense system is classified into two major groups, enzymatic antioxidants such as SOD and non-enzymatic antioxidants such as glutathione (Bhattacharya 2015). SOD is an antioxidant enzyme known to eliminate superoxide radical. On the other hand, catalase and glutathione peroxidase (GPx) remove hydrogen peroxides by converting them into water and oxygen. Glutathione-S-transferase (GST) catalyzes intracellular detoxification reactions, including inactivation of many toxic substances by catalyzing their conjugation with glutathione. Another antioxidant enzyme is γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) that is functional in glutathione metabolism (Kohen & Nyska 2002). Some previous *in vitro* studies showed that SOD activity decreased in a concentration-dependent manner in primary hippocampal neurons, primary Sertoli cells, TM4 Sertoli cells and TM3 Leydig cells (Zhang *et al.* 2007, Yang *et al.* 2013, Orta & Erkan 2014, Yang *et al.* 2015). The result of present study demonstrated that both 2ppm and 16ppm concentrations for all exposure durations decreased SOD activity in TM3 Leydig cells when compare to control. Recent studies indicated that exposure to NaF decreased catalase and GPx activity in a concentration and time-dependent manner in Sertoli and Leydig cells (Yang *et al.* 2013, Orta & Erkan 2014).

Another study revealed that 20, 40 and 80ppm NaF treatment declined GPx activity in primary hippocampal neurons (Zhang *et al.* 2007). The results in this study showed that catalase and GPx enzyme activities reduced significantly after NaF treatment in TM3 Leydig cells. Several studies indicated that GST activity was decreased after NaF treatment in testis and TM4 Sertoli cells (Rao & Bhatt 2012, Orta & Erkan 2014). The activity of γ -GT also decreased significantly after exposure to NaF in kidney, semen and Sertoli cells (Akdoğan *et al.* 2002, Zakrzewska *et al.* 2002, Orta & Erkan 2014). According to the result of the present study, 2ppm and 16ppm NaF treatment decreased γ -GT activity at 48h and 72h, while only 16ppm NaF decreased γ -GT activity at 24h in Leydig cells.

Glutathione (GSH) acts as a cofactor for enzyme peroxidase, thus serving as an indirect antioxidant for hydrogen peroxide (Kohen & Nyska 2002). Previous *in vitro* studies demonstrated that fluoride affects GSH level in Sertoli cells (Orta & Erkan 2014), primary hippocampal neurons (Zhang *et al.* 2007) and primary human hepatocytes. According to findings of a recent study, GSH level decreased only after a treatment with 20ppm concentration for 24 and 48h in Sertoli cells (Orta & Erkan 2014). Moreover, GSH levels significantly decreased after 20, 40 and 80ppm treatments in primary hippocampal neurons and 80ppm treatment in primary human hepatocyte (Wang *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2007). The current study showed that there was no significant difference in GSH levels after 2ppm NaF treatment at 24, 48 and 72h, however there was a significant decline in 16ppm concentration at 24 and 72h. These findings suggest that low doses of NaF do not affect GSH levels.

Conclusion

To maintain the function of Leydig cells, which are responsible for testosterone biosynthesis and are an important cell type in the male reproductive system, are the key factor for improvement of male infertility. When daily intake of minimum and maximum fluoride amount from drinking water supply is taken into consideration, it is very important to determine possible effects of fluoride on Leydig cells. The results of our present study revealed that fluoride has toxic effects on Leydig cells even with low doses. Fluoride builds up these effects by increasing the lipid peroxidation, level of ROS and cell membrane damage and by decreasing the level of cell viability, cell proliferation and antioxidant level. Although these results provide information about the cytotoxicity of fluoride on Leydig cells, further studies are necessary to investigate molecular interaction of oxidative stress markers and cell dynamics.

Acknowledgement

This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects (Project Number: 3884).

References

- Akdoğan, M., Bilgili, A., Karaöz, E., Gökçimen, A., Eraslan, G. & Üstüner, E. 2002. The structural and biochemical changes of kidney tissue on fluorosis in rabbits. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26: 71-77.
- Ameeramja, J., Panneerselvam, L., Govindarajan, V., Jeyachandran, S., Baskaralingam, V. & Perumal, E. 2016. Tamarind seed coat ameliorates fluoride induced cytotoxicity, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis in A549 cells. *Journal of Hazardous Materials*, 301: 554-565.
- Ayoob, S. & Gupta, A.K. 2006. Fluoride in drinking water: a review on the status and stress effects. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36: 433-487.
- Baba, A. & Tayfur, G. 2011. Groundwater contamination and its effect on health in Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 183: 77-94.
- Bataineh, H.N. & Nusier, M.K. 2006. Impact of 12-week ingestion of sodium fluoride on aggression, sexual behavior, and fertility in adult male rats. *Fluoride*, 39: 293-301.
- Bhattacharya, S. 2015. Reactive oxygen species and cellular defense system. Pp. 17-29. In: Rani, V. & Singh Yadav, U.C. (eds) *Free Radicals in Human Health and Disease*. Springer, New Delhi, 427 pp.
- Chachra, D., Limeback, H., Willett, T.L. & Grynepas, M.D. 2010. The long-term effects of water fluoridation on the human skeleton. *Journal of Dental Research*, 89: 1219-1223.
- Chang, Y.-C. & Chou, M.-Y. 2001. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 91: 230-234.
- Chinoy, N., Tewari, K. & Jhala, D. 2004. Fluoride and/or arsenic toxicity in mice testis with formation of giant cells and subsequent recovery by some antidotes. *Fluoride*, 37: 172-184.
- Chouhan, S. & Flora, S.J. 2010. Arsenic and fluoride: two major ground water pollutants. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48: 666-678.
- Chouhan, S. & Flora, S.J.S. 2008. Effects of fluoride on the tissue oxidative stress and apoptosis in rats: Biochemical assays supported by IR spectroscopy data. *Toxicology*, 254: 61-67.
- Chouhan, S., Lomash, V. & Flora, S.J. 2010. Fluoride-induced changes in haem biosynthesis pathway, neurological variables and tissue histopathology of rats. *Journal of Applied Toxicology*, 30: 63-73.
- Devasagayam, T.P. & Tarachand, U. 1987. Decreased lipid peroxidation in the rat kidney during gestation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 145: 134-138.
- Dey, S. & Giri, B. 2016. Fluoride Fact on Human Health and Health Problems: A Review. *Medical & Clinical Reviews* 2(1-2): 1-6.
- Dong, C., Cao, J., Cao, C., Han, Y., Wu, S., Wang, S. & Wang, J. 2016. Effects of fluoride and aluminum on expressions of StAR and P450scc of related steroidogenesis in guinea pigs' testis. *Chemosphere*, 147: 345-351.
- Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82: 70-77.
- Fawell, J.K. Bailey, K., Chilton, J., Dahi, E., Fewtrell, L., & Magara, Y., 2006. Fluoride in drinking-water. World Health Organization.
- Feng, D.M., Huang, H., Yang, Y., Yan, T., Jin, Y.F., Cheng, X.M. & Cui, L.X. 2015. Ameliorative effects of N-acetylcysteine on fluoride-induced oxidative stress and DNA damage in male rats' testis. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 792: 35-45.
- Gupta, R., Khan, T., Agrawal, D. & Kachhawa, J. 2007. The toxic effects of sodium fluoride on the reproductive system of male rats. *Toxicology and Industrial Health*, 23: 507-513.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249: 7130-7139.
- Hafeman, D.G., Sunde, R.A. & Hoekstra, W.G. 1974. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *Journal of Nutrition*, 104: 580-587.
- Holland, M.K. & Storey, B.T. 1981. Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa. Generation of hydrogen peroxide by rabbit epididymal spermatozoa. *Biochemical Journal*, 198: 273-280.
- Izquierdo-Vega, J.A., Sanchez-Gutierrez, M. & Del Razo, L.M. 2008. Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230: 352-357.
- Kaminsky, L.S., Mahoney, M.C., Leach, J., Melius, J. & Miller, M.J. 1990. Fluoride: benefits and risks of exposure. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1: 261-281.
- Kim, J., Kwon, W.S., Rahman, M.S., Lee, J.S., Yoon, S.J., Park, Y.J., You, Y.A. & Pang, M.G. 2015. Effect of sodium fluoride on male mouse fertility. *Andrology*, 3: 544-551.
- Kohen, R. & Nyska, A. 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30: 620-650.
- Lennon, M., Whelton, H., O'Mullane, D. & Ekstrand, J. 2004. Rolling Revision of the WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. World Health Organization.
- Long, H., Jin, Y., Lin, M., Sun, Y., Zhang, L. & Clinch, C. 2009. Fluoride toxicity in the male reproductive system. *Fluoride*, 42: 260-276.
- Lu, Z., Wang, S., Sun, Z., Niu, R. & Wang, J. 2014. In vivo influence of sodium fluoride on sperm chemotaxis in male mice. *Archives of Toxicology*, 88: 533-539.

30. Marklund, S. & Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47: 469-474.
31. Mittal, M. & Flora, S.J. 2007. Vitamin E supplementation protects oxidative stress during arsenic and fluoride antagonism in male mice. *Drug and Chemical Toxicology*, 30: 263-281.
32. Mittal, M. & Flora, S.M. 2006. Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice. *Chemico-Biological Interactions*, 162: 128-139.
33. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63.
34. Orłowski, M. & Meister, A. 1965. Isolation of Gamma-Glutamyl Transpeptidase from Hog Kidney. *Journal of Biological Chemistry*, 240: 338-347.
35. Orta, B. & Erkan, M. 2014. Effects of Vitamin C on Antioxidant Systems and Steroidogenic Enzymes in Sodium Fluoride-Exposed Tm4 Sertoli Cells. *Fluoride*, 47: 139-151.
36. Oruc, N. 2008. Occurrence and problems of high fluoride waters in Turkey: an overview. *Environmental Geochemistry and Health*, 30: 315-323.
37. Puntarulo, S. & Cederbaum, A.I. 1988. Effect of oxygen concentration on microsomal oxidation of ethanol and generation of oxygen radicals. *Biochemical Journal*, 251: 787-794.
38. Rao, M.V. & Bhatt, R.N. 2012. Protective Effect of Melatonin on Fluoride-Induced Oxidative Stress and Testicular Dysfunction in Rats. *Fluoride*, 45: 116-124.
39. Riksen, E.A., Kalvik, A., Brookes, S., Hynne, A., Snead, M.L., Lyngstadaas, S.P. & Reseland, J.E. 2011. Fluoride reduces the expression of enamel proteins and cytokines in an ameloblast-derived cell line. *Archives of Oral Biology*, 56: 324-330.
40. Sinha, A. K. 1972. Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry*, 47: 389-394.
41. Song, C., Cao, X., Yang, Z., Guo, S. & Shang, Z. 2013. Fluoride-induced cell cycle arrest, apoptosis, and DNA damage in TM3 mouse Leydig cells. *Fluoride*, 46: 218-223.
42. Song, G., Wang, R.L., Chen, Z.Y., Zhang, B., Wang, H.L., Liu, M.L., Gao, J.P. & Yan, X.Y. 2014. Toxic effects of sodium fluoride on cell proliferation and apoptosis of Leydig cells from young mice. *Journal Physiology and Biochemistry*, 70: 761-768.
43. Sun, W., Zhang, G., Tan, L., Yang, K. & Ai, H. 2016. The fluoride coated AZ31B magnesium alloy improves corrosion resistance and stimulates bone formation in rabbit model. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, 63: 506-511.
44. Sun, Z., Niu, R., Su, K., Wang, B., Wang, J., Zhang, J. & Wang, J. 2010. Effects of sodium fluoride on hyperactivation and Ca²⁺ signaling pathway in sperm from mice: an in vivo study. *Archives of Toxicology*, 84: 353-361.
45. Wan, S.X., Zhang, J.H. & Wang, J.D. 2006. Effects of high fluoride on sperm quality and testicular histology in male rats. *Fluoride*, 39: 17-21.
46. Wang, A.G., Xia, T., Ru, R., Yuan, J., Chen, X.M., Yang, K.D. & Yang, K.D. 2004. Antagonistic effect of selenium on oxidative stress, DNA damage, and apoptosis induced by fluoride in human hepatocytes. *Fluoride*, 37: 107-116.
47. Wang, J., Zhang, Y., Zhang, H., Zhang, K., Zhang, Z. & Li, J. 2009. Toxic effects of fluoride on reproductive ability in male rats: sperm motility, oxidative stress, cell cycle, and testicular apoptosis. *Fluoride*, 42: 174.
48. Wang, L., Zhu, Y. & Wang, D. 2016. High-Dose Fluoride Induces Apoptosis and Inhibits Ameloblastin Secretion in Primary Rat Ameloblast. *Biological Trace Element Research*, 174: 402-409.
49. Weyermann, J., Lochmann, D. & Zimmer, A. 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, 288: 369-376.
50. Yan, Q., Zhang, Y., Li, W. & Denbesten, P. 2007. Micromolar fluoride alters ameloblast lineage cells in vitro. *Journal of Dental Research*, 86: 336-340.
51. Yang, Y., Huang, H., Ba, Y., Cheng, X.M. & Cui, L.X. 2015. Effect of oxidative stress on fluoride-induced apoptosis in primary cultured Sertoli cells of rats. *International Journal of Environmental Health Research*, 25: 1-9.
52. Yang, Z.J., Song, C., Cao, X.D., Zhang, F.F., Zhao, H.X., & Du, B.Q. 2013. Fluoride-Induced Oxidative Damage and DNA-Protein Crosslinks in Tm3 Mouse Leydig Cells. *Fluoride*, 46: 212-217.
53. Yilmaz, B. O. & Erkan, M. 2015. Effects of Vitamin C on Sodium Fluoride-Induced Oxidative Damage in Sertoli Cells. *Fluoride*, 48: 241-251.
54. Ying, J., Xu, J., Shen, L., Mao, Z., Liang, J., Lin, S., Yu, X., Pan, R., Yan, C. & Li, S. 2017. The Effect of Sodium Fluoride on Cell Apoptosis and the Mechanism of Human Lung BEAS-2B Cells In Vitro. *Biological Trace Element Research*, doi:10.1007/s12011-017-0937-y, 1-11.
55. Zakrzewska, H., Udala, J. & Blaszczyk, B. 2002. In vitro influence of sodium fluoride on ram semen quality and enzyme activities. *Fluoride*, 35: 153-160.
56. Zhang, M., Wang, A., He, W., He, P., Xu, B., Xia, T., Chen, X. & Yang, K. 2007. Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons. *Toxicology*, 236: 208-216.
57. Zhang, S., Jiang, C.Y., Liu, H.L., Guan, Z.Z., Zeng, Q., Zhang, C., Lei, R.R., Xia, T., Gao, H., Yang, L., Chen, Y.H., Wu, X., Zhang, X.F., Cui, Y.S., Yu, L.Y., Wang, Z.L. & Wang, A.G. 2013. Fluoride-elicited developmental testicular toxicity in rats: Roles of endoplasmic reticulum stress and inflammatory response. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 271: 206-215.

AN OVERVIEW OF POLLEN AND ANTHWER WALL DEVELOPMENT IN *Catalpa bignonioides* Walter (BIGNONIACEAE)

Sevil TÖTÜNCÜ KONYAR

Trakya University, Faculty of Science, Department of Biology, 22030, Edirne, Turkey.
e-mail: seviltutuncu@gmail.com

Received (Alınış): 29 Apr 2017, Accepted (Kabul): 17 Sep 2017, Online First (Erken Görünüm): 27 Sep 2017, Published (Basım): 15 Dec 2017

Abstract: Anther development in *Catalpa bignonioides* Walter was investigated from the sporogenous cell to the mature pollen grain stages to determine whether the pollen and anther wall development follows the basic scheme in angiosperms. In order to follow pollen ontogeny through successive stages of pollen development, anthers at different developmental stages were embedded in epon according to the usual method, and semi-thin sections, taken from the epon embedded anthers, were stained with toluidine blue for general histological observations under light microscopy. The young anther wall of *C. bignonioides* consists of four layers; from the exterior, the epidermis, endothecium, middle layer, and a secretory tapetum. The tapetum is dual in origin and dimorphic. Ubisch bodies were observed on the inner tangential walls of the tapetal cells. The number of the anther wall layers changes depending on the developmental stage and region of the anther. In contrast to the other anther wall layers, epidermis and endothecium layers remain intact until anthesis. Endothecial cells enlarge and develop thickenings at maturity. During microspore development, meiocytes undergo meiosis and simultaneous cytokinesis leading to the formation of permanent tetrahedral, isobilateral and rarely linear tetrads. Pollen tetrads are shed from the anther as compound pollen grains. Results of the study revealed that pollen and anther wall development in *C. bignonioides* follows the basic scheme in angiosperms.

Key words: Anther wall, Microspore development, Medicinal plants, Tetrad pollens.

Catalpa bignonioides Walter (Bignoniaceae)'deki Polen ve Anter Çeperi Gelişimine Genel Bir Bakış

Özet: *Catalpa bignonioides* Walter'deki anter çeperi ve polen gelişiminin diğer angiospermlerdeki temel aşamaları takip edip etmediğini anlayabilmek için, bu bitkideki anter gelişimi sporogen evre aşamasından olgun polen aşamasına kadar ışık mikroskopu kullanılarak araştırıldı. Anterdeki polen ontogenezini sırasıyla takip edebilmek için farklı gelişim aşamalarındaki anterler epona gömüldü ve bu anterlerden ultramikrotom ile alınan 1 mikronluk kesitler genel histokimyasal gözlemler için toluidin mavisiyle boyandı. *Catalpa bignonioides*'in genç anter çeperi dıştan içe doğru sırasıyla epidermis, endotesyum, ara tabaka ve salgı tapetumu olmak üzere 4 farklı tabakadan oluşmaktadır. Tapetum hücreleri iki farklı kökenden gelir ve yapısal olarak dimorfiktir. Tapetum hücrelerinin dış çeperlerinde, Ubisch cisimcikleri gözlenmiştir. Anter çeperindeki tabaka sayısı anterin gelişim aşamalarına ve değişik bölgelerine göre farklılık göstermektedir. Epidermis ve endotesyum tabakaları, anter çeperinin diğer tabakalarından farklı olarak, anter açılmasına kadar bütünlüğünü korumaktadır. Endotesyum hücreleri olgun polen aşamasında genişler ve çeper kalınlıklarını gösterir. Mikrospor gelişimi sırasında mayoz bölünme geçiren hücreler simultane tip sitokinez ile tetrahedral, izobilateral ve nadir olarak da linear tipte kalıcı tetrafları oluşturur. Polenler anterden tetrafl halinde dışarı atılır. Bu çalışmanın bulguları *C. bignonioides*'teki anter çeperi ve polen gelişiminin diğer angiospermlerle uyumlu olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Anter çeperi, Mikrospor gelişimi, Tıbbi bitkiler, Tetrafl polenler.

Introduction

Bignoniaceae family, whose members are mostly trees and shrubs and more rarely lianas and herbaceous plants, comprises some 82 genera with approximately 827 species (Olmstead *et al.* 2009) distributed primarily in tropical (greatest diversity in Brazil) and sub-tropical regions of America, Asia, and Africa. However, some species are also used worldwide as ornamentals (Castillo & Rossini 2010). *Catalpa* Scop. is a small genus in Bignoniaceae comprising eight natural species and two hybrid species of perennial trees frequently used in

horticulture as garden and street trees (Olsen & Kirkbride 2017). It is the only genus in Bignoniaceae that is common to both the Old and the New Worlds, its members are distributed mostly in the tropics and subtropics with the center of diversity in South America (Deka *et al.* 2013). In Turkey, the genus *Catalpa* is represented by only one species, *Catalpa bignonioides* Walter, which is planted as street and garden tree.

Bignoniaceae has long attracted the attention of scientists as a source of pharmacologically valuable active compounds. Therefore, numerous studies regarding phytochemicals have been carried on this family. These phytochemical studies have revealed that the extracts from Bignoniaceae species contain secondary metabolites such as tannins, flavonoids, quinones, alkaloids, triterpenes, steroids, and iridoids (de Abreu *et al.* 2014, Choudhury *et al.* 2011, Cragg & Newman 2005) which have anti-inflammatory, antidiuretic, anti-arthritis, antimicrobial, antioxidant, anti-dysenteric, anti-diarrheal and anti-tumor activity (Choudhury *et al.* 2011). The genus *Catalpa* is also an important source of the medically valuable secondary metabolites. The fruits, flowers, bark, and leaves of the *Catalpa* plants are rich in many kinds of pharmacologically active compounds such as naphthoquinones (Inouye *et al.* 1975), flavonoids (Harborne 1967, Okuda *et al.* 1975) and phenolic acids (Nakaoki & Morita 1955). Therefore, numerous species of *Catalpa* including *C. bignonioides*; *C. ovata*, *C. bungei* and *C. speciosa* are often used medicinally. For instance, *C. bignonioides* used in preparations with other herbs for the treatment of respiratory diseases such as whooping cough, asthma, and spasmodic coughs in children because of its sedative effect and mild narcotic action (Felter & Lloyd 1989). *C. bignonioides* has also been described for the treatment of irritable ulcers (Munoz-Mingarro *et al.* 2003). Moreover, it has an antioxidant activity (Dvorská *et al.* 2007).

The Bignoniaceae family has also long attracted the attention of scientists concerning its taxonomic problems. The circumscription of Bignoniaceae and Scrophulariaceae has long been a taxonomic problem. Several genera have been variously placed in one or the other family (Armstrong 1985). Recently, the delimitation of Bignoniaceae genera and tribes has undergone major changes following an increased understanding of phylogenetic relationships within the family (Pace *et al.* 2015). However, to propose an ideal classification for Bignoniaceae, taxonomists need the data of the studies regarding the biochemistry, pollen analysis, micromorphology, anatomy, cytology, molecular phylogeny, embryology, and anther wall and pollen development.

In Bignoniaceae, studies concerning the ontogenic or histochemical development of pollen grains or anther wall are rare and include *Campsis radicans* (L.) Seem. (Tütüncü Konyar & Dane 2013a, 2013b, Tütüncü Konyar *et al.* 2013, Tütüncü Konyar 2014), *Catalpa bungei* C.A. Mey. (Fan *et al.* 2011), *Catalpa ovata* G. Don (Ruwen 1981), *Catalpa speciosa* (Warder ex Barney) Warder ex Engelm. (Chen *et al.* 2014, Hai-Yan *et al.* 2013), *Dolichandra unguis-cati* (L.) L.G. Lohmann (*Bignonia unguis-cati*) (Shivaramiah 1981), *Dolichandrone falcata* (Wall. ex DC.) Seem., *Jacaranda mimosifolia* D. Don (Galati & Strittmatter 1999), *Markhamia lutea* (Benth.) K. Schum (*Dolichandrone platycalyx*), (Shivaramiah 1981), *Millingtonia hortensis* L.f. (Mehra & Kulkarni 1986),

Kigelia africana (Lam.) Benth (*Kigelia pinnata*) (Shivaramiah 1981), *Oroxylum indicum* (L.) Kurz (Ghatak 1956), *Parmentiera aculeata* (Kunth) L.O. Williams (*Parmentiera edulis*) (Shivaramiah 1981), *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl.) Miers (*Pyrostegia ignea*) (Gupta & Nanda 1978), *Spathodea campanulata* Beauv. (Raghavan & Venkatasubban 1940, Rudramuniyappa & Mahajan 1991), *Tecoma x smithii* Hort. (Shivaramiah 1981), *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth (Nanda & Gupta 1978), *Tabebuia ochracea* A.H. Gentry, (Bittencourt Jr. 1996), *Tabebuia pallida* (Lindl.) Miers (Shivaramiah 1981), *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bittencourt Jr. & Mariath 1997), *Tabebuia rosea* (Bertol.) Bertero ex A. DC. (Mehra & Kulkarni 1986). These earlier studies on anther ontogeny in Bignoniaceae have revealed that anther development in this family varies from species to species. Anther wall development is the dicotyledonous or basic type. The anthers are mostly tetrasporangiate and rarely bisporangiate. The endothecium is usually single layered but two to three layered endothecium are also found in some plants. The endothecium may or may not exhibit thickenings. The tapetum is either of the secretory or amoeboid type and usually single layered. Tapetal cells are usually binucleate or multinucleate, and rarely uninucleate as in *K. pinnata* (Shivaramiah 1981).

The studies of anther ontogeny in Bignoniaceae are inadequate in number as a source of comprehensive data on the distribution of taxonomic characters in different genera of this family. Therefore, Bignoniaceae family needs more embryological data on the taxonomically important characters concerning the anther wall and pollen development such as the number of anther wall layers, tapetum and tetrad type.

The primary aim of this study was (1) to determine whether the anther development in *C. bignonioides* follows the basic scheme in angiosperms, (2) to provide embryological data that will contribute to the understanding of the reproductive biology of *C. bignonioides* and (3) to provide taxonomically important data for Bignoniaceae which would contribute to the taxonomic and phylogenetic studies.

Materials and Methods

Fresh flower buds of different sizes and at different developmental stages were collected from *C. bignonioides* plant which was planted as an ornamental in parks and on the roadsides of Edirne A1 (E) in European Turkey (The development stages of anthers had been determined before by examining squash preparation stained with acetic carmine under a light microscope). Following dissection from the buds, 10 anthers at various developmental stages were prefixed immediately in 3% glutaraldehyde in Sorensen's buffer (pH 7.4) for 24h at 4°C and rinsed in Sorensen's buffer three times for 15min each. After postfixation with 1% osmium tetroxide in the same buffer (pH 7.4) for 2h at room temperature, the anthers were dehydrated in a series of increasing concentration of ethanol in water and embedded in Epon according to the usual method (Craig *et al.* 1962). 1-µm

transverse sections were cut from the Epon embedded anthers with Leica Em UC6 ultramicrotome and stained with toluidine blue for general histological observations.

Toluidine blue staining

Semi-thin sections of the Epon- embedded anthers were stained with toluidine blue to highlight cell components for general histological observations under light microscopy. For this purpose, semi-thin sections were stained with 1% toluidine blue at 60°C for 50min and rinsed in distilled water for 2min. Toluidine blue stains nucleic acids (acidic polyanionic groups) blue and polysaccharides purple.

Results

Anther wall

Androecium of *C. bignonioides* is composed of five stamens two of which are fertile and the other three are staminode. The development of the anther wall is the dicotyledonous type. The fertile anthers of *C.*

bignonioides are tetrasporangiate, and their wall comprises four different layers; from the exterior, the epidermis, endothecium, middle layer, and the secretory (glandular) tapetum. The number of anther wall layers ranges from three to six depending on the development stage and the region of the anther (Fig. 1A-H). The outermost layer of the anther wall, epidermis, remained intact until the end of the anther development, and cuticle layer was observed on the outer tangential wall of the epidermal cells (Fig. 1F-H). At the stomium regions, radially elongated epidermal cells were detected (Fig. 1F). Like epidermis, the endothecium also remained intact until the end of the anther development. The number of endothecium layers varied from 1 to 3 depending on the developmental stage and region of the anther. At the vacuolated and mature pollen grain stages, endothelial cells enlarged and developed U-shaped thickenings on their inner tangential and radial walls (Fig. 1E-I).

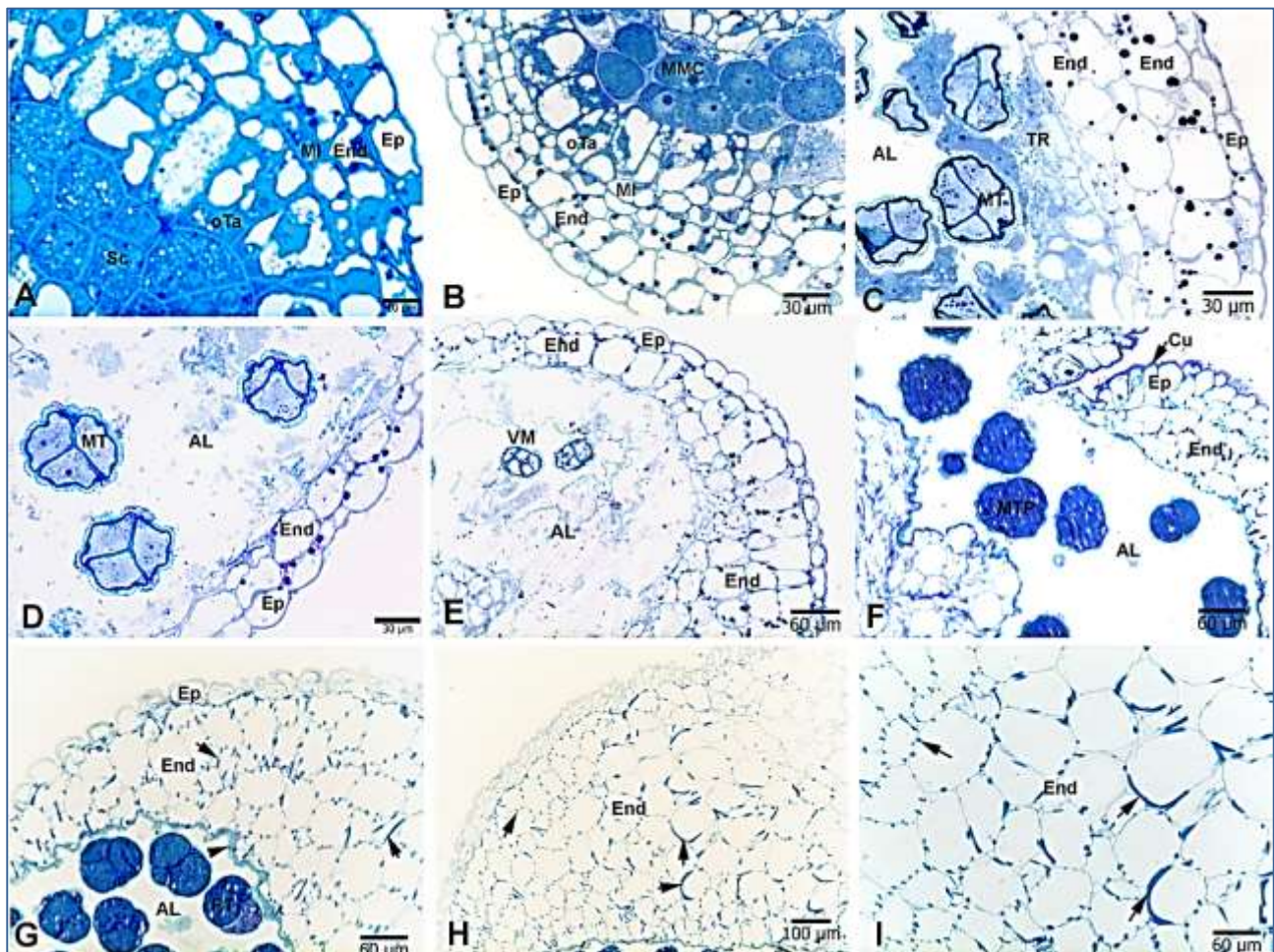


Fig. 1: Development of anther wall in *C. bignonioides* anthers during various phases of pollen ontogeny (Semi-thin sections stained with Toluidine blue). A- Sporogenous cell stage. B- Microspore mother cell stage. C, D- Free microspore tetrad stage. E- Vacuolated microspore tetrad stage. F, G- Mature pollen tetrad stage. Note the endothelial thickenings (arrows), and tapetal membrane studded with Ubisch bodies (arrowhead) in figure G, H, I- U-shaped endothelial thickenings (arrows) in the anther wall at anthesis stage. (AL- anther locule, Cu- cuticle layer, End- endothecium, Ep- epidermis, MI- middle layer, MT- microspore tetrad, MMC- microspore mother cell, PT- pollen tetrad, Sc- sporogenous cell, oTa- outer tapetum, TR- remnants of the tapetum, VM- vacuolated microspore).

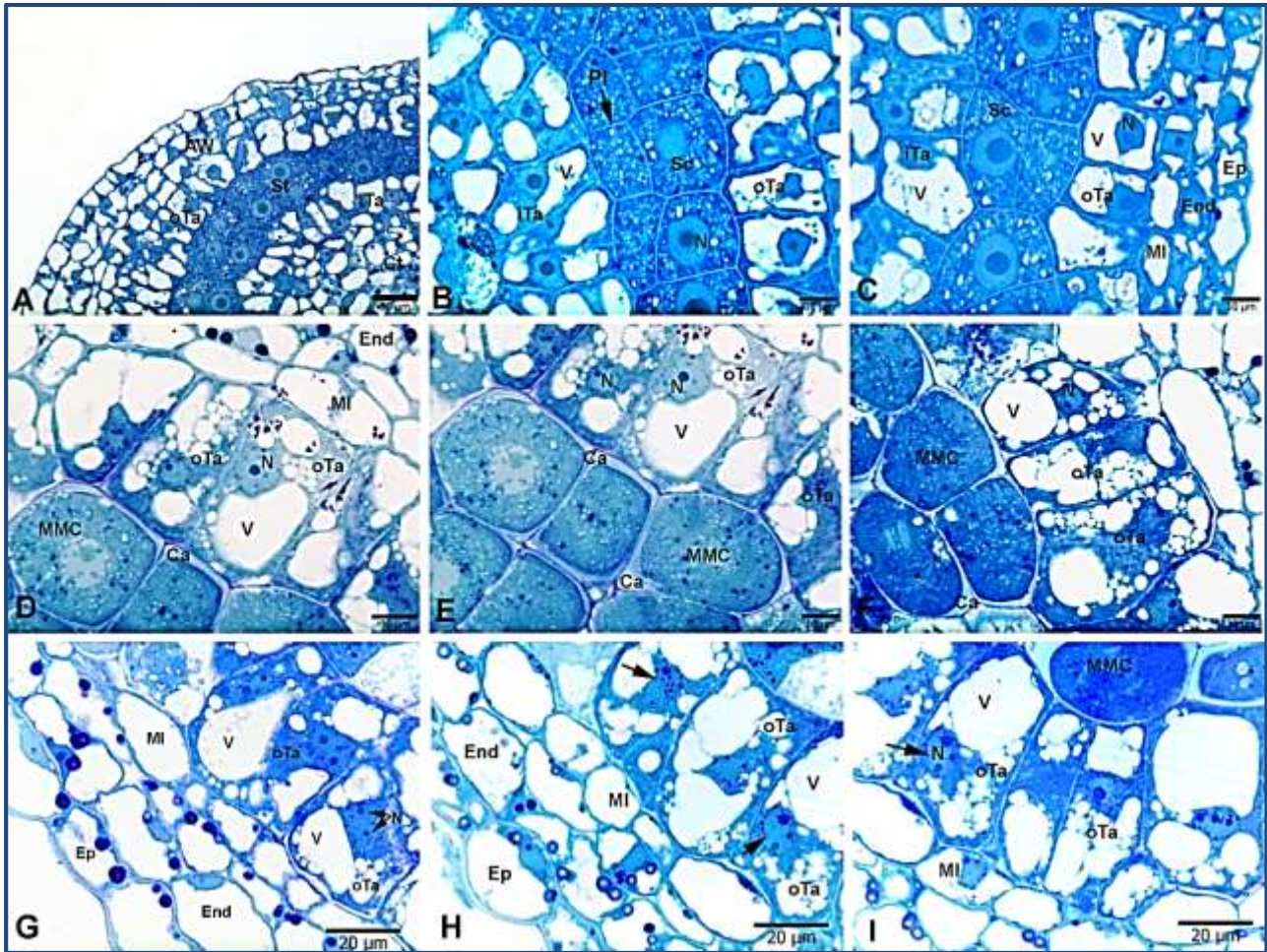


Fig. 2: Light micrographs of transverse semi-thin sections of anthers showing tapetal development at various stages of microsporogenesis. A-C- Tapetum development at sporogenous cell stage. D-F- Tapetum development just before the meiotic stage. G- Binucleate tapetal cells at the onset of meiotic division. H, I- Nuclear fusions at tapetal cells (arrows). (AW- anther wall, Ca- callose, Ct- connective tissue, End- endothecium, Ep- epidermis, MI- middle layer, MMC- microspore mother cell, N- nucleus, Sc- sporogenous cell, St- sporogenous tissue, iTa- inner tapetum, oTa- outer tapetum, Pl- plasmodesmata, V- vacuole).

The tapetum of *C. bignonioides* anthers has a dual origin and dimorphic. The tapetum layer which differentiates from the inner secondary parietal layer and forms the innermost layer of the anther wall is called the outer tapetum, whereas that originates from the parenchymatous cells on the connective side adjacent to the sporogenous tissue is called the inner tapetum (Fig. 1A, B; 2A-C; 3A-C). Both the inner and outer tapetum contains single layered cells. Tapetal cells were uninucleate before the meiotic division of the microsporocytes (Fig. 2A-F), however, at the onset of the meiotic division, they began to be binucleate as a result of the nuclear divisions (Fig. 2G). Secondary nuclear divisions and nuclear fusions were also observed in tapetal cells (Fig. 2H, I).

At the early free tetrad microspore stage, Ubisch bodies were observed on the inner tangential surface of the tapetal cells. The inner tapetum started to degenerate at this stage, whereas, outer tapetum began to degenerate at the late free microspore tetrad stage (Fig. 3A-F). However, tapetal remains disappeared completely at the

mature pollen grain stage. After the degeneration of tapetal cell walls, the tapetum formed a distinct tapetal membrane and Ubisch bodies attached to this membrane (Fig. 1F, G).

Pollen development

At the early sporogenous cell stage the anther wall had not yet completed its differentiation, however, as the development proceeded, it completed its differentiation, and finally, one layer of outer tapetum cells having large vacuoles was observed below the middle layer around sporogenous cells (Fig. 2A-I).

At the sporogenous cell stage, usually, two longitudinal rows of tightly packed, slightly polygonal sporogenous cells were observed in the crescent shaped anther locule of *C. bignonioides* (Fig. 2A-C). Sporogenous cells which had large centrally located nuclei were surrounded by thin cell walls and connected to each other by plasmodesmata (Fig. 2B). At the late sporogenous cell stage, the sporogenous cells gradually increased in volume and changed into microspore mother

cells. Just before the prophase of the first meiotic division, callose accumulation began between the cell wall and the cell membrane of the microspore mother cells starting from the corners (Fig. 2D-F). After callose deposition completed, meiocytes separated from each other and underwent first and second meiotic division and simultaneous cytokinesis forming mostly tetrahedral and rarely isobilateral and linear tetrads. Following tetrad formation, callose envelope that surrounds the tetrads

disappeared but microspores remained within the pollen mother cells cellulosic wall and failed to separate each other. As a result of this, the exine layer of the sporoderm was deposited on the group of four microspores (tetrads) instead of individual microspores and was released into anther locules as microspore tetrads (Fig. 3A-F). Herein the term microspore tetrad has been used to distinguish them from the normal tetrads.

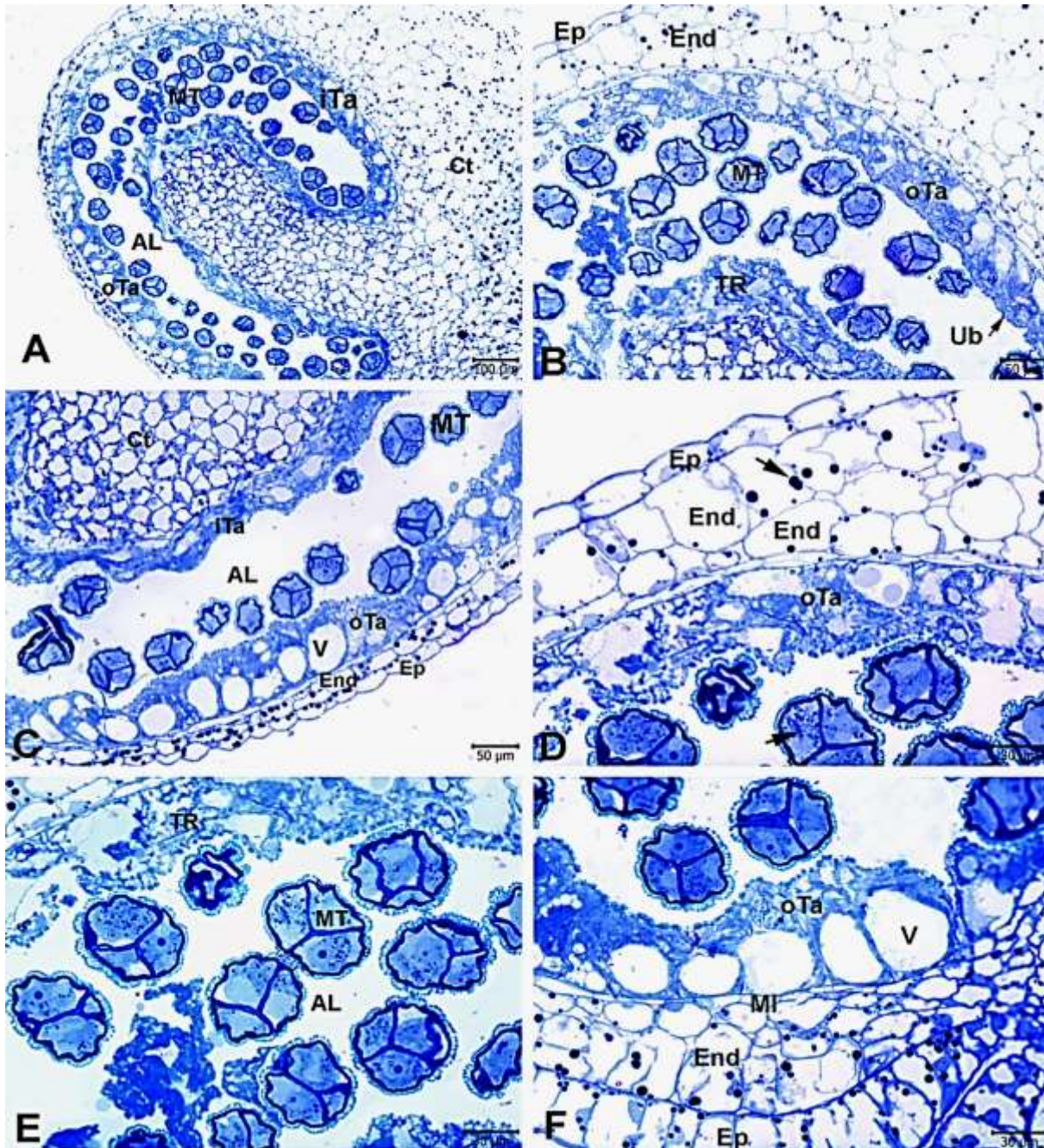


Fig. 3. Light micrographs of transverse semi-thin sections through a single anther locule showing anther wall and microspore development at the free microspore tetrad stage. A- General view of an anther locule, anther wall, and the connective tissue. Note the crescent shape (horseshoe shaped) anther locule. B-F- Images of the same anther locule at different magnifications showing details of microspores and anther wall. Note the reserve materials (arrows in figure D) in the anther wall and microspores. (AL- anther locule, Ct- connective tissue, End- endothecium, Ep- epidermis, MI- middle layer, MT- microspore tetrad, iTa- inner tapetum, oTa- outer tapetum, TR- remnants of the tapetum, Ub- Ubisch bodies, V- vacuole).

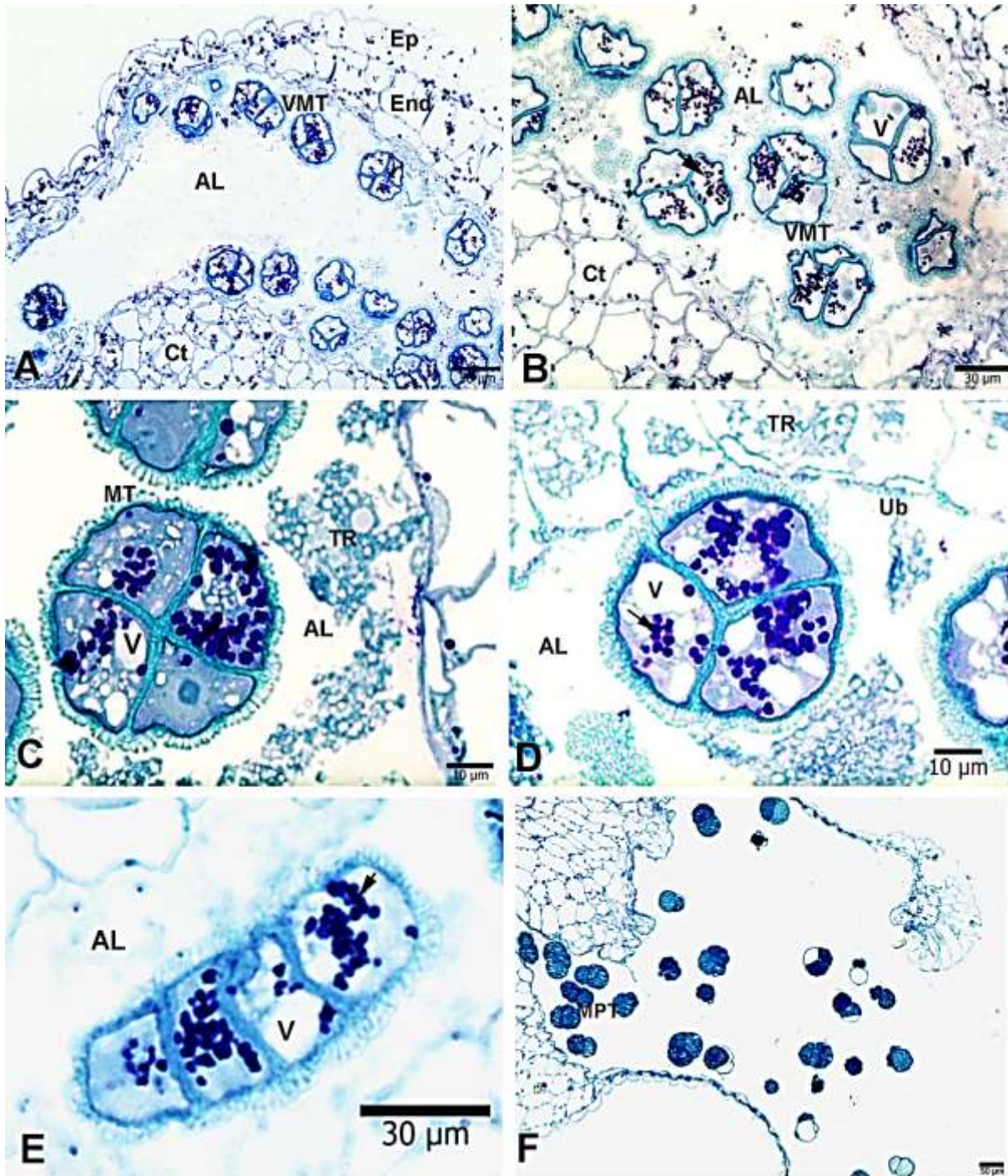


Fig. 4. Light micrographs of transverse semi-thin sections of anthers stained with toluidine blue. A- General view of an anther locule, anther wall and the connective tissue at the vacuolated microspore stage. B- General view of vacuolated microspore tetrads. C- Details of isobilateral microspore tetrad. D- Details of tetrahedral microspore tetrad. E- Details of linear microspore tetrad. F- General view of mature pollen tetrads at anthesis stage. (AL- anther locule, Ct- connective tissue, End- endothecium, Ep- epidermis, MT- microspore tetrad, MPT- mature pollen tetrads, TR- remnants of the tapetum, Ub- Ubisch bodies, V- vacuole, VMT- vacuolated microspore tetrad, Arrows show the reserve materials in vacuolated microspores.

At the free microspore tetrad stage, centrally located large nucleus and a moderate amount of small reserve materials were observed in the cytoplasm of each microspore (Fig. 3A-F). As the development progressed, vacuolization began in the cytoplasm and large reserve materials, presumably starch granules, appeared in the

cytoplasm of the vacuolated microspores (Fig. 4A-E). The pollen wall (sporoderm) construction that has begun at the tetrad stage continued throughout the free microspore tetrad and vacuolated microspore tetrad stages by the addition of sporopollenin precursors originating from tapetum to the exine layer of the sporoderm.

Similar to the vacuolated microspore tetrads, reserve materials were also present in the anther wall at the vacuolated microspore stage. However, concurrent to the formation of endothelial thickenings, the reserve materials in the anther wall started to decrease (Fig. 4A), and at the mature pollen grain stage, they disappeared completely (Fig. 4F) suggesting that reserve materials presumably consumed to provide energy for endothelial wall thickenings and cell enlargement. Furthermore, the decrease in the size and the numbers of reserve materials in the staminal envelope coincided with the increase in the number of reserve materials in the vacuolated microspores.

Following the first pollen mitosis, young bicellular pollen tetrads were produced and maturation period started. The mature pollen tetrads (compound pollen grains) of *C. bignonioides* are inaperturate and “clypeate” type, that is exine shields have been separated by grooves (Fig. 5A-D). The sculpturing of the respective exine shields is reticulate (Fig. 5A-C). The compound pollen grains of *C. bignonioides* are shed from the anther as tetrads (Fig. 4F).

Discussion

Anther Wall

The anthers of *Catalpa bignonioides* are tetrasporangiate as reported earlier for *Catalpa bungei* (Fan *et al.* 2011), *Catalpa speciosa* (Chen *et al.* 2014), and many other members of Bignoniaceae including *Campsis radicans* (Tütüncü Konyar & Dane 2013b), *Dolichandra unguis-cati* (*Bignonia unguis-cati*), *Kigelia africana* (*Kigelia pinnata*), *Markhamia lutea* (*Dolichandrone platycalyx*), *Millingtonia hortensis*, *Parmentiera aculeata* (*Parmentiera edulis*) (Shivaramiah 1981), *Pyrostagia venusta* (*Pyrostagia ignea*) (Gupta & Nanda 1978), *Tecoma stans* (Nanda & Gupta 1978), *T. smithii*, *Tabebuia ochracea* (Bittencourt Jr. 1996), *T. pallida*, (Shivaramiah 1981). However, bisporangiate anthers have also been reported in some members of Bignoniaceae comprising *Jacaranda mimosifolia* (Galati & Strittmatter 1999a).

The development of the anther wall of *C. bignonioides* conforms to the usual development in dicotyledons and other members of the Bignoniaceae such as *C. radicans* (Tütüncü Konyar & Dane 2013b), *P. venusta* (Gupta & Nanda 1978) and *T. stans* (Nanda & Gupta 1978). The young anther wall consists of an epidermis, endothecium, middle layer, and the tapetum. However, at maturity, it consists of only epidermis and endothecium. The epidermal cells in the anther wall of *C. bignonioides* enlarge, become papillate and accumulate a thick layer of cuticle on their outer tangential walls as was also observed in *C. radicans* (Tütüncü Konyar *et al.* 2013), *J. mimosifolia* (Galati & Strittmatter 1999a), *T. ochracea* (Bittencourt Jr. 1996) and *T. pulcherrima* (Bittencourt Jr. & Mariath 1997). Davis (1966) had also described the radially enlarged epidermal cells with cutinized outer surface in Bignoniaceae. According to Garcia *et al.* (2002)

enlarged epidermal cells in stomium region may enhance the anther dehiscence. Since radially enlarged epidermal cells were more prominent in the stomium region of *C. bignonioides* anthers, we also think that they play a role during anther dehiscence.

The number of endothecium layers in the anther wall of *C. bignonioides* ranges from 1 to 3 and, at maturity the endothelial cells develop U-shaped thickenings on their inner tangential and radial walls. The presence of multi-layered endothecium and endothelial thickenings are not peculiar to *C. bignonioides* anthers, as in various angiosperms, they have also been reported in the other members of Bignoniaceae including *M. lutea*, *M. hortensis*, *P. aculeata* (Shivaramiah 1981), *P. venusta* (Gupta & Nanda 1978), *T. pallida*, *T. smithii* (Shivaramiah 1981), *T. stans* (Nanda & Gupta 1978). However, the types, formation time and location of thickenings on the endothelial wall show variations within the family. As an example in *J. mimosifolia* (Galati & Strittmatter 1999a), endothecium develops fibrous thickenings only along the inner tangential walls, whereas in the present study U-shaped (crescent-shaped) thickenings were observed as reported earlier for *K. africana* (Shivaramiah 1981).

Generally, the tapetal development in *C. Bignonioides* is similar to other descriptions of the secretory tapetum in dicotyledons and in the other members of the Bignoniaceae. The tapetum in *C. bignonioides* anthers is of the secretory type and shows a distinct dual origin as in many other members of Bignoniaceae including *C. bungei* (Fan *et al.* 2011), *C. speciosa* (Li *et al.* 2013, Chen *et al.* 2014), *C. radicans* (Tütüncü Konyar & Dane 2013b), *J. mimosifolia* (Galati & Strittmatter 1999a), *M. hortensis* (Shivaramiah 1981), *P. venusta* (Gupta & Nanda 1978), *T. stans* (Nanda & Gupta 1978), *T. smithii* (Shivaramiah 1981), *T. ochracea* (Bittencourt Jr. 1996), *T. pulcherrima* (Bittencourt Jr. & Mariath 1997). On the other hand, amoeboid tapetum has also been reported in the other members of this family such as *D. unguis-cati*, *K. africana* and *T. pallida* (Shivaramiah 1981). The tapetum is usually single layered in Bignoniaceae. However, the number of tapetal nuclei shows variations between different species. The tapetal cells are ordinarily binucleate or multinucleate, and rarely uninucleate as was reported for *K. africana* (Shivaramiah, 1981). Binucleate tapetal cells have been described in *P. venusta* (Gupta & Nanda 1978), *P. aculeata*, *T. smithii* (Shivaramiah 1981), *T. stans* (Nanda & Gupta 1978), whereas multinucleated tapetal cells have been reported in *M. lutea*, *M. hortensis*, *T. pallida* (Shivaramiah 1981) and *Oroxylum indicum* (Ghatak 1956). In our previous study concerning the anther development in *C. radicans* (Tütüncü Konyar & Dane 2013b), it was observed that the tapetal cells were multinucleated after secondary nuclear divisions but later they became binucleate as a result of nuclear fusions. However, multinucleate tapetal cells could be observed only in squashed preparations.

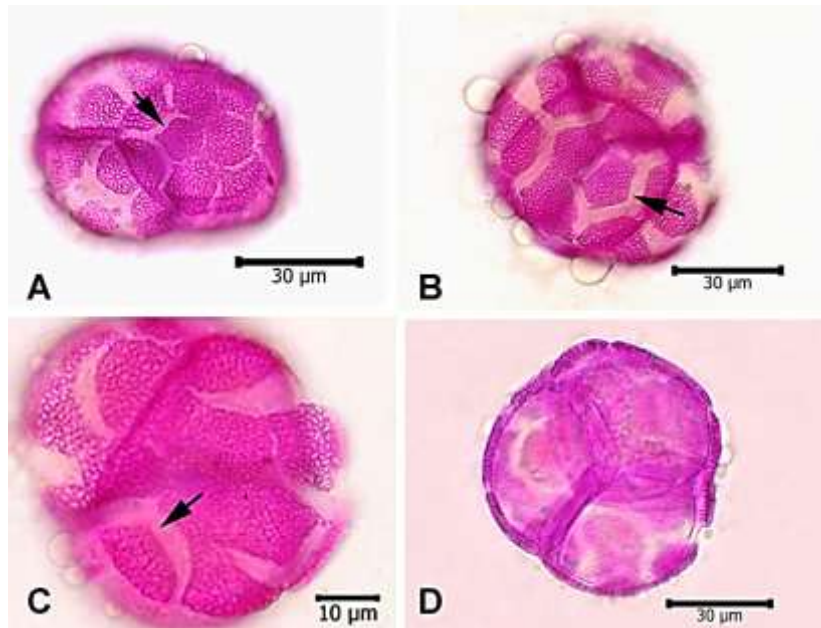


Fig. 5. Light micrographs of tetrad pollens (compound pollens) of *C. bignonioides* stained with basic fuchsin. **A-C** Show the details of “clypeate” pollens on which polygonal exine shields were separated by large grooves (arrows). Note the reticulate ornamentation of exine shields. **D** Pollen tetrad having a tetrahedral arrangement.

In transverse paraffin and semi- thin sections, we could observe only binucleate tapetal cells at the onset of the meiotic division (Tütüncü Konyar & Dane 2013b). Therefore, it is obvious that to determine the presence or absence of the secondary nuclear divisions, nuclear fusions, and the number of nuclei in the tapetal cells evidently, very detailed investigation of the tapetal cells including numerous anthers at the different stages of the tapetal development, from premeiotic to tetrad stages, are necessary. The formation of the polyploid nucleus in multinucleate tapetal cells by nuclear fusions have also been reported in *M. lutea*, *M. hortensis*, *T. pallida* (Shivaramiah 1981) and *O. indicum* (Ghatak 1956).

Usually, nuclear divisions in the tapetal cells occur just before the meiotic division as was observed in *C. radicans* (Tütüncü Konyar & Dane 2013b) or at the onset of the meiotic division. In the present study, we observed uninucleate tapetal cells in the anthers of *C. bignonioides* before the meiotic division. As the development of the anther proceeded, binucleate and trinucleate tapetal cells were observed indicating the presence of primary and secondary nuclear divisions in these cells. Furthermore, nuclear fusions were also observed in the tapetal cells.

At the free microspore stage, Ubisch bodies were observed on the inner tangential surface of the tapetal cells of *C. bignonioides* bordering the locules as reported earlier for *C. radicans* (Tütüncü Konyar & Dane 2013b, Tütüncü Konyar 2014), *J. mimosifolia* (Galati & Strittmatter 1999a, 1999b) *P. venusta* (Gupta & Nanda 1978), *T. stans* (Nanda & Gupta 1978), *T. smithii* (Shivaramiah 1981); *T. ochracea* (Bittencourt Jr. 1996), *T. pulcherrima* (Bittencourt Jr. & Mariath 1997) and in many other species of Bignoniaceae studied by Mehra &

Kulkarni (1986). However, in *C. bignonioides*, concurrent with the degeneration of the inner tangential walls of the tapetal cells, a new tapetal membrane was formed and Ubisch bodies attached to the inner surface of this tapetal membrane. Observations regarding the formation of tapetal membrane are consistent with the results of the previous studies including *C. radicans* (Tütüncü Konyar & Dane 2013b, Tütüncü Konyar 2014), *J. mimosifolia* (Galati & Strittmatter 1999a, 1999b), *P. venusta* (Gupta & Nanda 1978), *T. stans* (Nanda & Gupta 1978) and *T. ochracea* (Bittencourt Jr. 1996).

Pollen Development

At the sporogenous cell stage, usually two longitudinal rows of tightly packed, sporogenous cells were observed in the crescent shaped anther locule of *C. bignonioides* as was observed in *C. radicans* (Tütüncü Konyar & Dane 2013b). Although the crescent shaped anther locule has been observed in all species of the Bignoniaceae investigated so far, the number of longitudinal rows of sporogenous cells vary in different species. As an example, single layered sporogenous tissue has been reported in *J. mimosifolia* (Galati & Strittmatter 1999a).

Microspore and pollen development in *C. bignonioides* follows the basic scheme in angiosperms. As usual in angiosperms, microspore mother cells secrete callose wall before meiotic division. Meicytes undergo meiosis and simultaneous cytokinesis resulting in the formation of tetrads mostly with a tetrahedral arrangement, and rarely isobilateral and linear arrangement. However, as observed rarely in angiosperms, following tetrad formation, callose envelope that surrounds the tetrads disappeared but

microspores remained within the pollen mother cells cellulosic wall and failed to separate each other leading to the formation of compound pollen grains. The simultaneous cytokinesis and the formation of the tetrahedral and isobilateral tetrads, and compound pollen grains have also been reported in other species of the genus *Catalpa* including *C. bungei* (Fan *et al.* 2011), *C. speciosa* (Chen *et al.* 2014) and *C. ovata* (Ruwen 1981, Song *et al.* 2012).

Although the simultaneous cytokinesis and the tetrahedral tetrads have also been observed in other members of Bignoniaceae including *C. radicans* (Tütüncü

Konyar 2014), *J. mimosifolia* (Galati & Strittmatter 1999a), *T. ochracea* (Bittencourt Jr. 1996) and *T. pulcherrima* (Bittencourt Jr. & Mariath 1997), in all of these species, microspores separate each other at the end of the tetrad period and develop into single pollen grain.

The study of the anther wall and pollen development in *C. bignonioides* showed that the anther wall and pollen development follows the basic scheme in angiosperms and it coincides with the description of the process in the other species of the genus *Catalpa*. Therefore, we conclude that anther development in *C. bignonioides* can substantially be considered as normal.

References

1. Armstrong, J.E. 1985. The Delimitation of Bignoniaceae and Scrophulariaceae Based on Floral Anatomy, and the Placement of Problem Genera. *American Journal of Botany*, 72: 755-766.
2. Bittencourt JR, N.S. 1996. Microsporogenesis and the early male gametophyte development of *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae). *Acta Botanica Brasílica*, 10(1): 9-23.
3. Bittencourt JR, N.S. & Mariath, J.E.A. 1997. Ontogeny of the anther parietal layers of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae). *Acta Botanica Brasílica*, 11(1): 9-30.
4. Castillo, L. & Rossini, C. 2010. Bignoniaceae metabolites as semiochemicals. *Molecules*, 15(10): 7090-7105.
5. Chen, X.H., Ding, R., Jiang, S., Xu, Y.F., Qu, B. & Zhang, L.J. 2014. Megasporogenesis, Microsporogenesis and Formation of Female and Male Gametophyte of *Catalpa speciosa*. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 4: 408-412.
6. Choudhury, S., Datta, S., Talukdar, A.D. & Choudhury, M.D. 2011. Phytochemistry of the family Bignoniaceae – a review. *Assam University Journal of Science and Technology*, 7: 145-150.
7. Craig, E.L., Frojola, W.J. & Greider, M.H. 1962. An embedding technique for electron microscopy using Epon 812. *The Journal of Cell Biology*, 12(1):190-194.
8. Cragg, G.M. & Newman D.J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1): 72-79.
9. Davis, G.L. 1966. *Systematic embryology of the angiosperms*. John Wiley & Sons, New York, 279pp.
10. Deka, D.C., Kumari V., Prasad, C., Kumar, K., Gogoi, B.J., Singh, L. & Srivastava, R.B. 2013. *Oroxylum indicum*—a medicinal plant of North East India: An overview of its nutritional, remedial, and prophylactic properties. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3: 104-112.
11. De Abreu, M.B., Temraz, A., Vassallo, A., Braca, A. & De Tommasi, N. 2014. Phenolic glycosides from *Tabebuia argentea* and *Catalpa bignonioides*. *Phytochemistry Letters*, 7: 85-88.
12. Dvorská, M., Žemlička, M., Muselík, J., Karafiátová, J. & Suchý, V. 2007. Antioxidant activity of *Catalpa bignonioides*. *Fitoterapia*, 78: 437-439.
13. Fan, L.L., Peng, F.R., Zhou, Q., Hao, M.Z & Tan, P.P. 2011. Sporogenesis and Gametogenesis of *Catalpa bungei* (Bignoniaceae). *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 3: 002.
14. Felter, H.W. & Lloyd, J.U. 1989. *Catalpa-Cigar Tree*, King's American Dispensatory. (<http://www.henriettesherbal.com/eclectic/kings/catalpa.html>) [Date accessed: April 2017].
15. Galati, B.G. & Strittmatter, L.I. 1999a. Microsporogenesis and microgametogenesis in *Jacaranda mimosifolia* (Bignoniaceae). *Phytomorphology*, 49: 147-155.
16. Galati, B.G. & Strittmatter, L.I. 1999b. Correlation between pollen development and Ubisch bodies ontogeny in *Jacaranda mimosifolia* (Bignoniaceae). *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 71: 249-260.
17. García, M. A., Galati, B.G. & Anton, A.M. 2002. Microsporogenesis, microgametogenesis and pollen morphology of *Passiflora* spp. (Passifloraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 139(4): 383-394.
18. Ghatak, J. 1956. A contribution to the life history of *Oroxylum indicum* Vent. *Proceedings of the Indian Academy of Plant Sciences*, 43(1): 72-87.
19. Gupta, S.C. & Nanda, K. 1978. Studies in the Bignoniaceae. I. Ontogeny of Dimorphic Anter Tapetum in *Pyrostagia*. *American Journal of Botany*, 65: 395-399.
20. Hai-Yan, L.L.P.L. & Chen, F.J. 2013. Observation on Megasporogenesis, Microsporogenesis and Development of Female and Male Gametophytes of *Catalpa speciosa* Warder. *Bulletin of Botanical Research*, 2: 004.
21. Harborne, J.B. 1967. Comparative biochemistry of the flavonoids. VI. Flavonoid patterns in the Bignoniaceae and the Gesneriaceae. *Phytochemistry*, 6: 1643-1651.
22. Inouye, H., Okuda, T. & Hayashi, T. 1975. Quinones and related compounds in higher plants. II. Naphthoquinones and related compounds from *Catalpa* wood. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 23(2): 384-391.
23. Li, L.P., Liu, H.Y. & Chen, F.J. 2013. Observation on Megasporogenesis, Microsporogenesis and Development of Female and Male Gametophytes of *Catalpa speciosa* Warder. *Bulletin of Botanical Research*, 33(2): 145-148.
24. Mehra, K.R. & Kulkarni, A.R. 1986. Embryological studies in Bignoniaceae. *Phytomorphology*, 35: 239-251.

25. Munoz-Mingarro, D., Acero, N., Llinares, F., Pozuelo, J.M., de Mera, A.G., Vicenten J.A. & Perez, C. 2003. Biological activity of extracts from *Catalpa bignonioides* Walt. (Bignoniaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87: 163-167.
26. Nanda, K. & Gupta, S.C. 1978. Studies in the Bignoniaceae. II. Ontogeny of dimorphic anther tapetum in *Tecoma*. *American Journal of Botany*, 65: 400-405.
27. Nakaoki, T. & Morita, N. 1955. Organic acids in the leaves of *Catalpa ovata* and *Catalpa bignonioides*. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 75: 171-172.
28. Olsen, R.T. & Kirkbride, J.H. 2017. Taxonomic revision of the genus *Catalpa* (Bignoniaceae). *Brittonia*, 1-35.
29. Okuda, T., Yoshida, T. & Ono, I. 1975. Two new flavone glycosides from *Catalpa ovata*. *Phytochemistry*, 14: 1654-1656.
30. Olmstead, R.G., Zjhra, M.L., Lohmann, L.G., Grose, S.O. & Eckert, A.J. 2009. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. *American Journal of Botany*, 96: 1731-1743.
31. Pace, M.R., Lohmann, L.G., Olmstead, R.G. & Angyalossy, V. 2015. Wood anatomy of major Bignoniaceae clades. *Plant Systematics and Evolution*, 301(3): 967-995.
32. Raghavan, T.S. & Venkatasubban, K.R. 1940. Studies in Bignoniaceae. I. Chromosome number and epidermal hydrotodes in *Spathodea campanulata*. *Journal of Indian Botanical Society*, 19: 293-298.
33. Rudramuniyappa, C.K. & Mahajan, P.B. 1991. Histochemical and fluorescence microscopic study of anther development in *Spathodea campanulata* Beauv. *Phytomorphology*, 41: 175-188.
34. Ruwen, F. 1981. A study on the embryological development of *Catalpa ovata*. *Journal of Nanjing Forestry University*, 4: 64-74.
35. Shivaramiah, G. 1981. *Embryological, palynological and histochemical studies in Bignoniaceae*: Joseph's College Master's thesis, Bangalore, 36-44.
36. Song, X.Y., Yao, Y.F. & Yang, W.D. 2012. Pollen analysis of natural honeys from the central region of Shanxi, North China. *PLoS one*, 7: e49545.
37. Tütüncü Konyar, S. & Dane, F. 2013a. Cytochemistry of pollen development in *Campsis radicans* (L.) Seem. (Bignoniaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 299(1): 87-95.
38. Tütüncü Konyar, S. & Dane, F. 2013b. Anther ontogeny in *Campsis radicans* (L.) Seem. (Bignoniaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 299(3): 567-583.
39. Tütüncü Konyar, S., Dane, F. & Tütüncü, S. 2013. Distribution of insoluble polysaccharides, neutral lipids and proteins in the developing anthers of *Campsis radicans* (L.) Seem. (Bignoniaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 299(4): 743-760.
40. Tütüncü Konyar, S. 2014. Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Campsis radicans* (L.) Seem. *Plant Systematics and Evolution*, 300(2): 303-320.

Euphorbia smirnovii Geltman TÜRÜNÜN MORFOLOJİK VE KARYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

İlker GENÇ^{1*}, Şükran KÜLTÜR¹

¹İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı.

*Corresponding author: e-mail: ilkgenc@istanbul.edu.tr

Alınış (Received): 26 Mayıs 2017, Kabul (Accepted): 18 Eylül 2017, Erken Görünüm (Online First): 13 Ekim 2017; Basım (Published): 15 Aralık 2017

Özet: Bu çalışmada, ülkemizde Doğu Karadeniz ve Doğu Anadolu bölgelerinde doğal yayılış gösteren *Euphorbia smirnovii* Geltman türünün morfolojik ve karyolojik özellikleri incelenmiştir. Türün morfolojik betimi ayrıntılı olarak verilmiş ve fotoğraflarla desteklenmiştir. Ayrıca yaprak, kapsula ve tohum yüzey mikromorfolojileri SEM cihazı ile incelenmiştir. Bununla birlikte, Feulgen boyama tekniğiyle boyanan kök uçları, ezme preparat yöntemiyle preparat haline getirilerek karyolojik inceleme yapılmıştır. Böylece türün kromozom sayısı, karyotip formülü, ideogramı, kromozom ölçüm değerleri ilk kez bu çalışma ile tespit edilmiştir. Endemizm durumu şüpheli gösterilen türün Ermenistan'da da yayılış gösterdiği saptanmış ve türün endemik olmadığı netleşmiştir. *Euphorbia smirnovii* türünün yaprak alt ve üst yüzeyi ile kapsula yüzeyinin papiller ile kaplı olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre türün tetraploid olduğu ve kromozom sayısı $2n=4x=36$ olarak saptanmıştır. Türün karyotip formülü $32m+4sm$ şeklindedir. En küçük kromozom boyu $0,79\mu m$, en büyük kromozom boyu $1,52\mu m$ uzunluğundadır. Haploid toplam kromozom uzunluğu $10,30\mu m$ ve ortalama kromozom uzunluğu $1,14\mu m$ 'dir.

Anahtar kelimeler: Euphorbiaceae, sect. *Pithyusa*, kromozom, mikromorfoloji.

Morphological and Caryological Features of *Euphorbia smirnovii* Geltman

Abstract: In this study, the morphological and karyological characteristics of *Euphorbia smirnovii* Geltman, which is naturally distributed in Eastern Black Sea and Eastern Anatolia Regions, have been examined. The morphological description of the species is given in detail and supported by photographs. In addition, leaf, capsula and seed surface micromorphology have been investigated with SEM. Karyological investigation carried out by the standard Feulgen technique and squashes were prepared. The chromosome number, karyotype formula, ideogram, chromosome measurement values were reported for the first time in this study. It has been found that the species is also spreading in Armenia and it is clear that the species is not endemic. *Euphorbia smirnovii*, capsules, lower and upper surface of the leaf are covered with papilla. According to the results, the species was tetraploid with $2n=4x=36$ chromosomes. The karyotype formula is $32m+4sm$. The smallest chromosome length is $0.79\mu m$ and the largest chromosome length is $1.52\mu m$. Haploid total chromosome length is $10.30\mu m$ and mean chromosome length is $1.14\mu m$.

Key words: Euphorbiaceae, sect. *Pithyusa*, chromosome, micromorphology.

Giriş

Euphorbia L. (Euphorbiaceae) cinsi dünya genelinde yaklaşık 1800 türü ile Angiospermler içinde en geniş 5 cinsten birisidir (Radcliffe-Smith 2001). Cins dünya genelinde kozmopolit bir yayılışa sahiptir. Başlıca yayılış alanları Güney Afrika, Doğu ve Kuzeydoğu Afrika, Kuzey ve Orta Meksika'nın yanı sıra Batı Asya'dır. (Govaerts ve ark. 2000). Cinsin yaşam formları tek yıllık bitkilerden, çalı ve ağaçlara kadar geniş bir yelpazeye sahiptir. Birçok türü ise kuru habitatlara uyum sağlamış sukkulent yapıdadırlar (Zimmermann ve ark. 2010). Euphorbiaceae familyası türleri birçok ülkede yerli halk tarafından kanser, şeker hastalığı, ishal, kalp rahatsızlıkları, hepatit, sıtma romatizma gibi çok çeşitli hastalıklarda halk ilacı olarak kullanılmaktadır (Kumar ve Chaturvedi 2010). *Euphorbia* cinsinin kendi içindeki

taksonomik sınıflandırması tür sayısının çok fazla olmasından dolayı oldukça zordur. Son yıllarda yapılan çalışmalar doğrultusunda cins 4 alt cinse ayrılmıştır. Bunlar altcins *Rhizanthium*; altcins *Esula* Pers.; altcins *Euphorbia*; altcins *Chamaesyce* Raf.'dir (Steinmann ve Porter 2002, Bruyans ve ark. 2006, Park ve Jansen 2007, Zimmermann ve ark. 2010).

Ağırlıklı olarak kuzey yarımkürenin ılıman bölgelerinde yayılış gösteren otsu ve çalimsı türler altcins *Esula* altında toplanmıştır. Bu altcins yaklaşık 400 türe sahiptir (Barres ve ark. 2011).

Türkiye'de *Euphorbia* cinsine ait 120 takson yayılış göstermektedir (Öztekin 2012, Yıldırım 2012, Genç ve Kültür 2016).

Bu çalışmada, ülkemizde Doğu Karadeniz ve Doğu Anadolu bölgelerinde dar bir alanda doğal yayılış gösteren *Euphorbia smirnovii* Geltman türünün morfolojik ve karyolojik özellikleri incelenmiştir. Çalışmaya konu olan tür altcins *Esula* altında yer alan sect. *Pithyusa* (Raf.) Lázaro taksonomik gurubuna dâhildir. Türün morfolojik betimi ayrıntılı olarak verilmiş ve fotoğraflarla desteklenmiştir. Aynı zamanda kromozom sayısı, karyotip formülü, ideogramı, kromozom ölçüm değerleri ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Materyal ve Metot

Tür ile ilgili gerekli literatür ve herbaryum çalışmaları yapıldıktan sonra çalışma materyalleri doğal yayılış alanlarından olgun meyveli döneminde toplanmıştır. Toplanan örnekler ve diğer herbaryum materyalleri ve türe ait literatürler dikkate alınarak türün deskripsiyonu yazılmıştır. Karyolojik çalışmalar için toplanan örneklerden olgun tohumlar ayrılmıştır. Daha sonra bu tohumlar petri kaplarında oda sıcaklığında çimlendirilmiştir. Oluşan kök uçları yaklaşık 1 cm uzunluğa ulaştığında ilk olarak +4°C de 24 saat 8-Hydroxyquinoline içinde bekletilmiştir. İkinci aşamada en az iki saat süreyle Carnoy çözeltisi (3:1; etanol: GAA) içinde tutulan kök uçları 1N HCl içinde 60°C de 12 dakika hidroliz edilmiştir. Hidroliz aşamasından sonra kök uçları Feulgen boyama tekniğiyle boyanmıştır. Boyanan kök uçları, ezme preparat yöntemiyle preparat haline getirilmiştir. Hazırlanan preparatlar mikroskop ve KAMERAM karyotip görüntüleme ve analiz sistemi yardımıyla incelenmiş, saptanan iyi dağılmış metafaz hücreleri fotoğraflanmıştır. Analiz için 5 adet iyi dağılmış metafaz evresi seçilmiştir. Son olarak 5 analiz için ortalaması alınarak türün ideogramı oluşturulmuştur. SEM analizi için geçmiş yıllarda yapılmış SEM çalışmaları incelenmiş ve bu çalışmaların ışığında gövde yaprağı, kapsula ve tohum üzerinde inceleme yapmaya karar verilmiştir. Çalışmada olgun bireylerin ilgili

kısımları kullanılmıştır. Alınan bu materyaller ayrı ayrı stereo mikroskop altında incelenerek uygun olanlar iki tarafı yapıştırıcı özelliğe sahip karbon bandın bir yüzüne yapışması sağlanmış ardından diğer yüzü de metal taşıyıcı olan tablaya yapıştırılarak altın kaplama işlemine alınmıştır. Kaplama işleminin ardından materyaller FEI Quanta 450 FEG-EDS taramalı elektron mikroskopunda incelemeye alınarak fotoğrafları çekilmiştir. Taramalı elektron mikroskobu çalışması İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği laboratuvarında yapılmıştır.

Sonuçlar

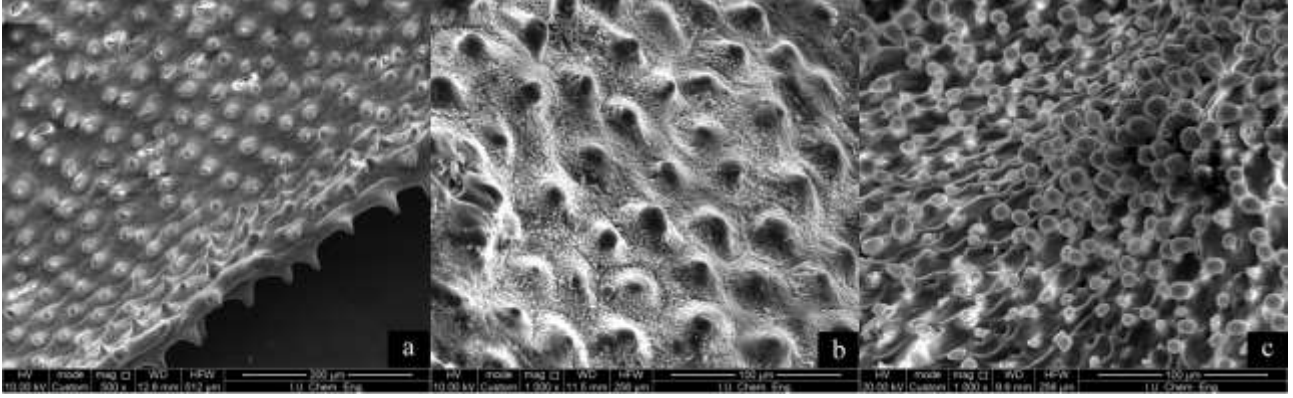
Euphorbia smirnovii Geltman (Sin.: *E. petrophila* var. *armena* Boiss.)

Çok yıllık, taban kısmı odunsu olan otsu bitkilerdir. Gövde, toprak seviyesinden itibaren çok sayıda, en fazla 20 cm'ye kadar uzar. (Şekil 1a). Gövde yaprakları çok küçük papiller ile kaplı, şeritsi-oblanseolat, 0,5-2(-2,5)x(0,1-)0,3-0,6cm, ucu küt kenarları düz. Işın yaprakları yumurtamsı–hemen hemen yuvarlak. Işın yaprakları hemen hemen küremsi–yumurtamsı baklavamsı, 4-7 x 6-11mm, tepesi küt, mukrolu. Işınlar 3-5 adet, 2cm ye kadar, en fazla bir kez dallanır veya dallanmaz. Yan ışınlar 0-3 adet. Glandlar böbreksi veya çok kısa boynuzlu (Şekil 1b). Kapsula yumurtamsı, 2,5-3mm çapında, yüzeyi minik papilli. Tohum basık genişçe dikdörtgensi, 2,3-2,8mm boyunda, 1,6-1,9mm eninde, düzensiz hafif çukurlu, gri–açık kahve renkli. Karunkula tepede, konik şekilli tohumun yaklaşık 1/3 boyunda, sarı renkli (Şekil 1c).

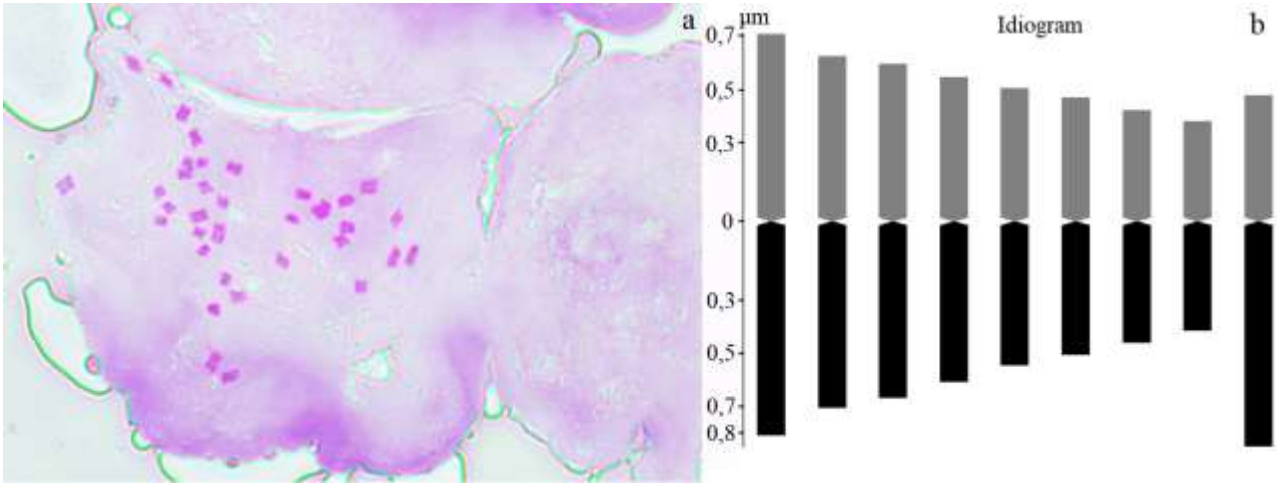
Çiçeklenme dönemi Mayıs-Ağustos ayları arasında olmaktadır. Kalkerli, taşlı açık yamaçlarda yayılış gösterir. Ülkemizde Gümüşhane ve Erzincan'da doğal yayılış gösteren takson Erivan (Ermenistan)'dan da kaydı bulunduğu için endemik statüsünü kaybetmiştir (Geltman 1996).



Şekil 1. *E. smirnovii* a. genel görünüş, b. kapsula ve gland c. tohum.



Şekil 2. *E. smirnovii* a. yaprak yüzeyi, b. kapsula yüzeyi, c. tohum yüzeyi.



Şekil 3. *E. smirnovii* a. metafaz kromozomları b. ideogram.

İncelenen Örnekler: Bayburt, in Rupibus pr. Baibout (Bayburt) Armeniae, 20.06.1862, Bourgeau 242 (isotype) (K, foto !). Erzincan, Üzümlünün üstleri, taşlık yamaçlar, 25.07.2015, İ. Genç 2468, A. Kandemir.

Yapılan SEM analizleri sonucunda türün yaprak alt ve üst yüzeyi ile kapsula yüzeyinin papiller ile kaplı olduğu görülmüştür (Şekil 2a ve b). Tohum yüzeyinin ayrıntılı incelenmesi sonucunda da testa hücrelerinin dairesel-uzamış (rounded-elongate) şekilli, hücre duvarlarının yüzeye göre genelde yüksek olduğu, hücre yüzeylerinin de düzensiz çukurlu olduğu görülmüştür. (Şekil 2c).

Euphorbia smirnovii türünün karyolojik incelemeleri sonucunda türün tetraploid kromozom sayısına sahip olduğu saptanmıştır. Buna göre kromozom sayısı $2n=4x=36$ olarak sayılmıştır (Şekil 3a). Türün karyotip formülü $32m+4sm$ şeklindedir. En küçük kromozom boyu $0,79\mu m$, en büyük kromozom boyu $1,52\mu m$ uzunluğundadır. Haploid toplam kromozom uzunluğu $10,30\mu m$ ve ortalama kromozom uzunluğu $1,14\mu m$ 'dir (Şekil 3b).

Tartışma

Bu çalışmada, ülkemizde Doğu Karadeniz ve Doğu Anadolu bölgelerinde doğal yayılış gösteren *Euphorbia*

smirnovii Gelman türünün morfolojik ve karyolojik özellikleri incelenmiştir. Yapılan literatür incelemeleri sonucunda Türkiye Bitkileri Listesi adlı eserde Öztekin (2012) tarafından endemizm durumu şüpheli gösterilen türün Ermenistan'da da yayılış gösterdiği saptanmış ve türün endemik olmadığı netleşmiştir.

Euphorbia smirnovii türünün yaprak alt ve üst yüzeyi ile kapsula yüzeyinin papiller ile kaplı olduğu görülmüştür. Bu morfolojik özellik Salmaki ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada yer alan sect. *Pithyusa* (subsect. *Coniocarpae* Porkh.) türlerinin çoğunda görülmektedir.

Euphorbia smirnovii türünün, kromozom sayısı, karyotip formülü, ideogramı, kromozom ölçüm değerleri ilk kez bu çalışma ile tespit edilmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 114Z125 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Bu çalışmanın özeti poster bildiri olarak, XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısında (31 Ağustos-5 Eylül 2016, Trabzon) (özet kitabı sayfa 129) sunulmuştur.

Kaynaklar

1. Barres, L., Vilatersana, R., Molero, J., Susanna, A. & Galbany-Casals, M. 2011. Molecular phylogeny of *Euphorbia* subg. *Esula* sect. *Aphyllis* (Euphorbiaceae) inferred from nrDNA and cpDNA markers with biogeographic insights. *Taxon*, 60: 705–720.
2. Bruyns, P.V., Mapaya, R.J. & Hedderson, T. 2006. A new subgeneric classification for *Euphorbia* (Euphorbiaceae) in southern Africa based on ITS and *psbA-trnH* sequence data. *Taxon*, 55: 397–420.
3. Geltman, D. 1996. New data on distribution of *Euphorbia* (Euphorbiaceae) species in the Caucasus. *Botanicheski Zhurnal*, 81(11): 100–103.
4. Genç, İ. & Kültür, Ş. 2016. *Euphorbia akmanii* (Euphorbiaceae), a new species from Turkey. *Phytotaxa*, 265(2): 112–120.
5. Govaerts, R., Frodin., D. & Radcliffe-Smith, A. 2000. *World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae* (with Pandaceae) 2. Kew, Royal Botanic Gardens.
6. Kumar, G.P. & Chaturvedi A. 2010. Ethnobotanical observations of Euphorbiaceae species from Vidarbha region, Maharashtra, India. *Ethnobotanical Leaflets*, 2010(6): 4.
7. Öztekin, M. 2012. *Euphorbia*, 414-424 s. In: (Editörler). Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. & Babaç, M.T. *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul, xx1 + 1290 s.
8. Park, K.R. & Jansen, R.K. 2007. A phylogeny of Euphorbieae subtribe Euphorbiinae (Euphorbiaceae) based on molecular data. *Journal of Plant Biology*, 50: 644–649.
9. Radcliffe-Smith, A. 2001. *Genera Euphorbiacearum*. RBG, Kew, UK. X + 455 pp.
10. Salmaki, Y., Zarre, S., Esser, H.J. & Heubl, G. 2011. Seed and gland morphology in *Euphorbia* (Euphorbiaceae) with focus on their systematic and phylogenetic importance, a case study in Iranian highlands. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206(11): 957–973.
11. Steinmann, V.W. & Porter, J.M. 2002. Phylogenetic relationships in Euphorbieae (Euphorbiaceae) based on ITS and *ndhF* sequence data. *Annals of Missouri Botanical Garden*, 89: 453–490.
12. Yıldırım, Ş. 2012. The heaven of gypsophilous phytodiversity of Turkey: Kopen, Sivrihisar, Eskişehir, Turkey, 13 taxa as new. *OT Sistematik Botanik Dergisi*, 19(2): 1–51.
13. Zimmermann, N.F.A., Ritz, C.M. & Hellwig, F.H. 2010. Further support for the phylogenetic relationships within *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae) from nrITS and *trnL-trnF* IGS sequence data. *Plant Systematics and Evolution*, 286: 39–58.

PARTIAL CLONING AND IDENTIFICATION OF TERPENE SYNTHASE-6 GENE (*TPS-6*) IN AN AROMATIC PLANT *Origanum onites* L.

İsmail POYRAZ*, Merve SAĞLAM

Molecular Biology and Genetics Department, Bilecik Seyh Edebali University, 11210, Bilecik.

*Corresponding author: e-mail: ismail.poyraz@bilecik.edu.tr

Received (Alınış): 13 Feb 2017, Accepted (Kabul): 13 Oct 2017, Online First (Erken Görünüm): 20 Oct 2017, Published (Basım): 15 Dec 2017

Abstract: *Origanum onites* L. (oregano) is an aromatic plant used in medicine, cosmetics and different industrial fields. It includes essential oil and is extensively cultivated as aromatic plant in the world. Therefore, it is also preferred as a spice in foods. Terpene synthase-6 (*TPS-6*) is an enzyme responsible for synthesis of sesqui-terpenes in aromatic plants. The investigation of gene sequence information and expression characteristics of this enzyme in *O. onites* may contribute to increase of synthesis of terpenes as raw materials in medicine and cosmetic etc. industry. In this study, partial cloning and sequencing of the *TPS-6* gene in the *O. onites* was aimed. Total RNA isolation from *O. onites* was performed with TRI Reagent solution. The mRNAs were transformed to cDNAs by Revers Transcription Method. The middle region of *TPS-6* gene was amplified by PCR method using degenerative primers designed for *TPS-6*. Amplified DNA fragments were obtained at 481bp. size and ligated to PGEM T Easy plasmid vector with T4 DNA ligase. The recombinant plasmid vector was transferred to the XLI-Blue host cells (*E. coli*) and the cloned DNA was sequenced. The partial *TPS-6* DNA sequence was confirmed in NCBI GenBank database and registered with an accession number (MF983853). The obtained DNA sequence was analyzed with InterProScan and Clustal Omega software in EBI database. The analysis results showed that this DNA sequence has a specific motif (DXXD) for *TPS-6* catalyzing cyclization reactions. The phylogenetic dendrogram was drawn for comparison with other plant *TPS-6* genes. *O. onites* *TPS-6* sequence was determined to be very close to *O. vulgare* *TPS-6* on the dendrogram than other plant *TPS-6s*. The obtained gene sequence information will guide biotechnological researches in the productivity increase of this gene using expression analysis.

Key words: *Origanum onites*, *TPS-6*, Gene cloning, DNA sequencing.

Bir Aromatik Bitki *Origanum onites* L.'de Terpen Sentaz-6 (*TPS-6*) Geninin Kısmi Klonlanması ve Tanımlanması

Özet: *Origanum onites* L. (kekik), tıp, kozmetik ve farklı endüstri alanlarında kullanılan aromatik bir bitkidir. Uçucu yağ içerir ve dünyada aromatik bir bitki olarak yaygın kültüre edilir. Bu yüzden yiyeceklerde bir baharat olarak da tercih edilir. Terpen sentaz-6 (*TPS-6*), aromatik bitkilerde sesqui-terpenlerin sentezinden sorumlu bir enzimdir. *O. onites*'de bu enzimin gen dizi bilgisi ve ifade karakteristiğinin incelenmesi, tıp, kozmetik vb. endüstrilerde ham madde olarak terpenlerin sentezinin artırılmasına katkı sağlayabilir. Bu çalışmada, *O. onites*'de *TPS-6* geninin kısmi olarak klonlanması ve dizilenmesi amaçlandı. *O. onites*'den toplam RNA izolasyonu TRI Reagent solüsyonu ile gerçekleştirildi. *O. onites* mRNA'ları Ters Transkripsiyon Yöntemi ile cDNA'lara dönüştürüldü. *TPS-6* geninin orta bölgesi, *TPS-6* genine özel dizayn edilmiş dejeneratif primerler kullanarak PCR yöntemiyle çoğaltıldı. 481bp büyüklüğünde çoğaltılmış DNA parçaları elde edildi ve PGEM T Easy plazmit vektörüne T4 DNA ligaz enzimiyle eklendi. Rekombinant plazmit vektör XLI-Blue konakçı hücresine (*E. coli*) transfer edildi ve klonlanmış DNA dizilendi. Kısmi *TPS-6* DNA dizisi NCBI gen bankası veri tabanında *TPS-6* geni için doğrulandı ve bir kayıt numarası ile (MF983853) ile kaydedildi. Elde edilen DNA dizisi, EBI veri tabanındaki InterProScan ve Clustal Omega programları ile analiz edildi. Analiz sonuçları, bu dizi bilgisinin *TPS-6*'ya özgü siklizasyon reaksiyonlarını katalizleyen spesifik bir motife (DXXDD) sahip olduğunu gösterdi. Diğer bitki *TPS-6* genler ile karşılaştırmak için filogenetik dendrogram çizildi. *O. onites* *TPS-6* dizisinin, *O. vulgare* *TPS-6*'ya diğer bitki *TPS-6*'larına göre daha yakın olduğu tespit edildi. Elde edilen gen dizi bilgisi, ifade analizleri kullanılarak bu genin verimliliğinin artırılmasında biyoteknolojik araştırmalara rehberlik edecektir.

Anahtar kelimeler: *Origanum onites*, *TPS-6*, Gen klonlama, DNA dizileme.

Introduction

Oregano, *Origanum onites* L. (Linnaeus), is a member of *Lamiaceae* family (Davis et al. 1988, Başer 1993, Sarihan et al. 2006) and a Mediterranean plant whose Turkey distributional range coincides to western Anatolian. *O. onites*, containing 2-3% volatile (essential

oil (Baytop 1999) and is one of the major export products of Turkey. Turkey has a dominant position in worldwide trade of oregano and keeneeps control of 70% of world trade in annual production of oregano (Fakıllı 2010). The oil content of the species includes some phenolic

derivatives such as carvacrol, thymol, linalool etc. (Baytop 1999, Kaloustian et al. 2003, Baydar 2005) and therefore used as antioxidant, antibiotic, antibacterial, muscle relaxant, expectorant, diaphoretic, body tonic, analgesic, nerve strengthening, high-grade lubricants, biofuels and a component of agricultural chemicals (Aliğianis et al. 2001, Lambert et al. 2001, Poyraz 2015, Tokul 2015, Jiang et al. 2016, Lopez et al. 2016). Terpenes and terpenoids are the primary constituents of essential oils of many plants and flowers (Huber et al. 2005, Tholl 2006, Degenhardt et al. 2009, Yang et al. 2013) and the global industry recovers about 3 million tones terpenes (Mewalal et al. 2016). The terpene synthases have an important role in volatile oils synthesis (Tholl 2006, Zhang et al. 2016). The class I terpene synthases (*TPSs*) are classified as mono-, sesqui- and di-terpene synthases according to their catalytically preferred substrates geranyl diphosphate, farnesyl diphosphate and geranylgeranyl diphosphate, respectively. Terpene synthase-6 (*TPS-6*) is a kind of sesqui terpenes (Lange 2015). Characterization and genetically identification of various terpene synthases from different aromatic plants in future will provide important advantages in increasing of terpene production in industry. In this study, we described the partial cloning from and estimation of putative terpene synthase-6 gene in *O. onites*.

Materials and Methods

Plant material

O. onites seeds were provided by Prof. Dr. Hasan Baydar from Süleyman Demirel University (Isparta, Turkey). Seeds were germinated and grown on potting mixture containing peat, perlite and vermiculite (3:1:1) at 25°C under a 16h photo-period of cool white fluorescent illumination in a growth chamber (Sanyo, Japan). The germinated plant leaves were collected and used in RNA isolation.

RNA isolation and reverse transcription

RNA isolation was performed using a modified guanidine isothiocyanate method (Poyraz et al. 2010). *O. onites* leaves were ground to fine powder and transferred to 2ml tubes. The obtained total RNA was extracted with a TRI Reagent® at room temperature and recovered by isopropanol precipitation method. The quantity and purity of the RNA samples were determined following spectrophotometric measurements (Nano-drop UV spectrophotometer, Shimadzu, Japan) and integrity of total RNA sample was confirmed by denaturing agarose gel electrophoresis. Reverse transcription was performed according to the commercial kit (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) and the harvested cDNA (complementary DNA) was stored at -20°C until use.

Cloning of the middle region of cDNA

We used conservative regions obtained from alignment data of other plant *TPS-6* sequences in *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) for primer

designing. The alignment analysis was performed using CLUSTAL Omega 1.2.4 software. A pair of degenerative primers was designed as Forward: 5'-SGMTTTCGMCTMCTTCGACAACA-3' and Reverse: 5'-TAGCAYTCCACMASTCTATCCCK-3'. The design primers were used for amplification in polymerase chain reaction (PCR). The 25µl PCR reaction mixture contained 10x PCR buffer 2.5µl, 25mM MgCl₂ 3µl, 2.5mM deoxyribonucleotide triphosphates 2µl, 2.5µM P1 and P2 2.5µl, respectively, cDNA 5µl, ddH₂O 7.3µl, and 1U Taq polymerase (Promega, WI, USA). The conditions for PCR were as follows: pre-denaturalization at 94°C for 2min, denaturalization at 94°C for 40sec, annealing at 56.5°C for 50sec, extension at 72°C for 50sec, 35 cycles and the final extension at 72°C for 7min. The amplified *TPS-6* cDNA was purified by QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The harvested *TPS-6* gene fragment was cloned into pGEM-T Easy vector system (Promega, WI, USA) using T/A cloning system (without restriction enzymes). The recombinant vector was transferred into *Escherichia coli* XL1B strain. The bacteria culture was incubated at 37°C over-night. *E. coli* colonies containing positive clones were selected after growing on LB medium supplemented with ampicillin (50mg/ml), X-Gal (0.008%). The positive colonies including recombinant plasmid vectors were selected on transformation plate and transferred to master plate for confirmation. The recombinant plasmids in *E. coli* cultures were isolated using Qiagen Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany), and subsequently used to sequence the middle region of cDNA. DNA sequencing of the partial *TPS-6* was carried out two times by commercial sequencing service (Macrogene, Korea) using vector specific forward and reverse primers.

Bioinformatics analyses

The obtained DNA sequence data was verified for *TPS-6* genes in NCBI database using The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). DNA sequences of other plant species for *TPS-6* gene were obtained from NCBI database (www.ncbi.nlm.nih.gov). The confirmed partial *TPS-6* gene sequence was registered to NCBI GenBank and the accession number was obtained. The DNA sequence was translated to protein sequence and the multiple protein sequence alignments were carried out with ClustalW program (www.ebi.ac.uk/clustalw) and Gene Tool™ (Biotools Inc., USA). The domain and motif analysis of the partial *TPS-6* protein sequence were performed using Inter-ProScan Analysis Program in EBI (European Bioinformatics Institute) database. The phylogenetic dendrogram for comparison with other plant *TPS-6* genes was drawn according to Maximum Likelihood Analysis Method using MEGA 6.06 software.

Results and Discussion

Terpenes and terpenoids are the primary constituents of essential oils of many plants and flowers. Essence oils including terpenes are used as natural flavor additives for food, in perfumery, aromatherapy and in traditional and alternative medicine (Poyraz 2007). *O. onites* is an

important aromatic plant and is the most common commercially cultivated plant in Turkey (Poyraz 2007). In this study, we cloned a partial of *O. onites* terpene synthase-6 (*TPS-6*) gene and performed DNA sequence analyses. We obtained a ~481bp band represented partial *TPS-6* using PCR method (Fig. 1). The DNA fragment obtained by PCR method was ligated to PGEM-Teasy vector and transformed to XL1-B *E. coli* strain. The ligated DNA fragment in recombinant plasmid was confirmed by colony PCR methods and the same DNA fragment size (~481bp) was observed. The DNA sequence of partial *TPS-6* gene was obtained using a commercial DNA sequencing service. DNA sequence was translated to amino acid (160 AA) sequence using GeneTool™ software and confirmed in NCBI database (Fig. 2). The partial *O. onites TPS-6* gene sequence was submitted to NCBI GenBank and registered (GenBank Accession number: MF983853).

The huge variation of secondary metabolites produced by plants is considered as attractive and amazing by scientists (Köllner et al. 2004, Jiang et al. 2016). Oregano terpenes were reported to have a protective role in suppression of inflammation (Lopez et al. 2016). Terpene synthase genes in aromatic plants encode attendant enzymes in the synthesis of plant essential oils (Bayrak 2006). Terpenes comprise a very large class of secondary metabolites in aromatic plants and are formed by different functions in basic and specialized metabolism (Chen et al. 2004).

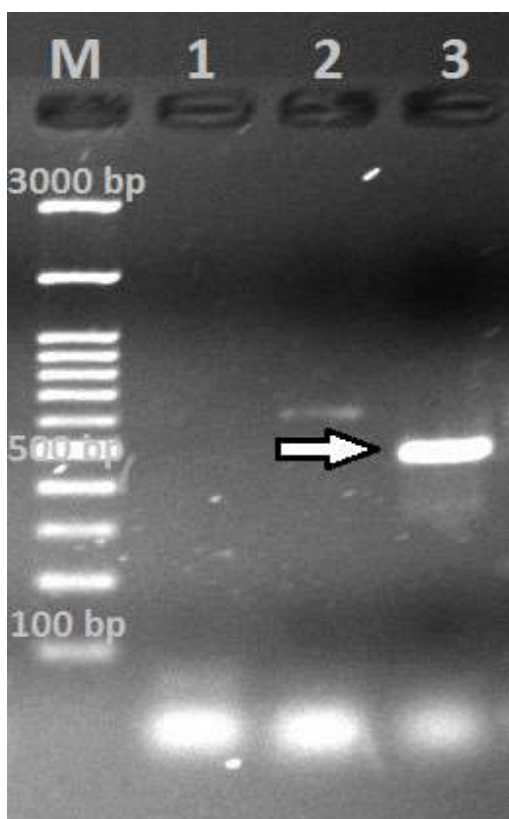


Fig. 1. PCR result for partial terpene synthase 6 (*TPS-6*) from *O. onites*. 1-2: the negative results (off the record data), 3: ~481bp PCR bands, M: 100bp plus DNA ladder.

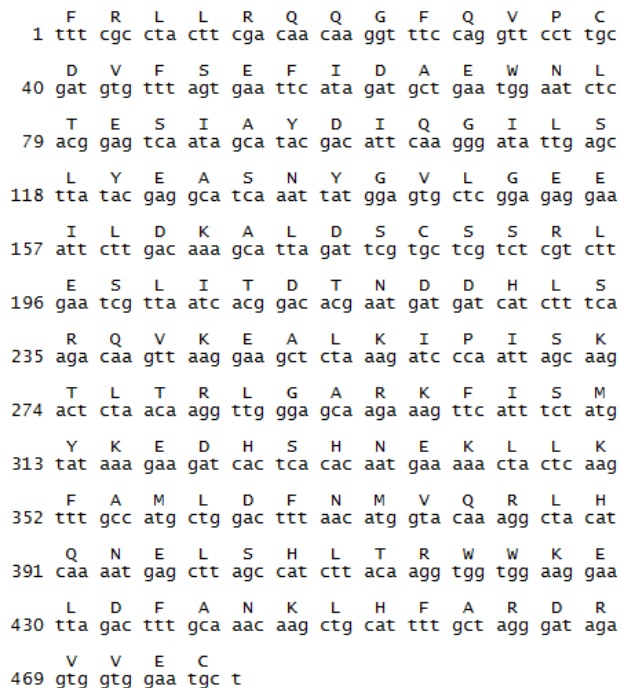


Fig. 2. DNA sequence and the translated amino acid sequence of partial *TPS-6* gene. Translated nucleotide number 480 (160 AA). The predict position for the complete *O. onites TPS-6* mRNA: 367-847.

Terpenes are a large class of hydrocarbon compound constructed from five-carbon isoprene units (Pichersky 2006). The diversity and variability of terpenes are due to the terpene synthases variation. Terpene synthase enzyme family unlike the majority of the enzymes involved in the biosynthesis of secondary metabolites, are renowned for being able to convert a single substrate into many different products (Keszei et al. 2010). The obtained DNA sequence data in our study is similar with the other aromatic plants, but not completely same (Fig. 3). Therefore, this specific data represents *O. onites TPS-6* gene. This DNA sequence may be used on transcription analysis studies without all gene sequence. The molecular and biochemical studies about terpene synthases provide opportunities for detailed functional evaluations of terpene metabolites in plants (Tholl 2006).

For comparison with the other plant *TPS-6* AA sequences, the multiple protein sequence alignment was performed using Clustal W program (Fig. 3). The domain and motif analysis of the partial *TPS-6* gene were performed using InterProScan Analysis Program (Fig. 4). We determined that the obtained DNA sequence had a terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily domain sequence (alpha-alpha toroid), terpene synthase N terminal domain sequence and terpene synthase magnesium ion (metal) binding domain sequence. Analysis results confirmed that the amino acid sequence translating from the cloned partial DNA includes specific motifs and domains of a *TPS-6* enzyme family (Fig. 4). In addition, there is a specific motif (DXXDD) in the partial *TPS-6* gene (Fig. 3) and catalyzes cyclization reactions (Bolhman et al. 1998).

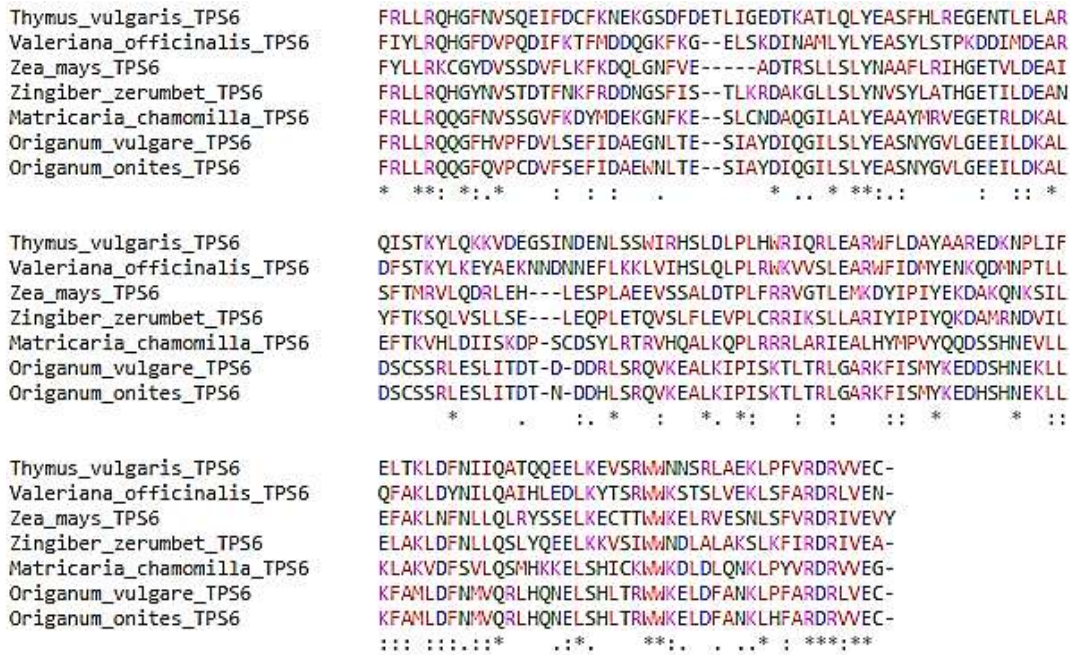
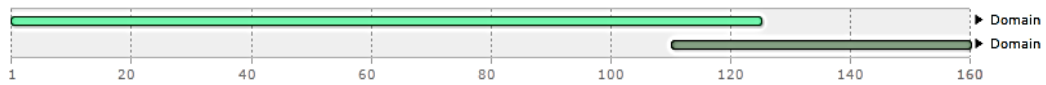


Fig. 3. The multiple protein sequence alignment for partial *O. onites* TPS-6 gene with other plant TPS-6s. The species and corresponding accession number are as follows: *T. vulgaris* TPS-6 (JX946357), *V. officinalis* TPS-6 (JX494704), *Z. mays* TPS-6 (NM_001112204), *Z. zerumbet* TPS-6 (AB247335), *M. chamomilla* TPS-6 (KJ020283), *O. vulgare* TPS-6 (GU385969). 71-75 AA positions have DXXDD motif.

Domains and repeats



Detailed signature matches

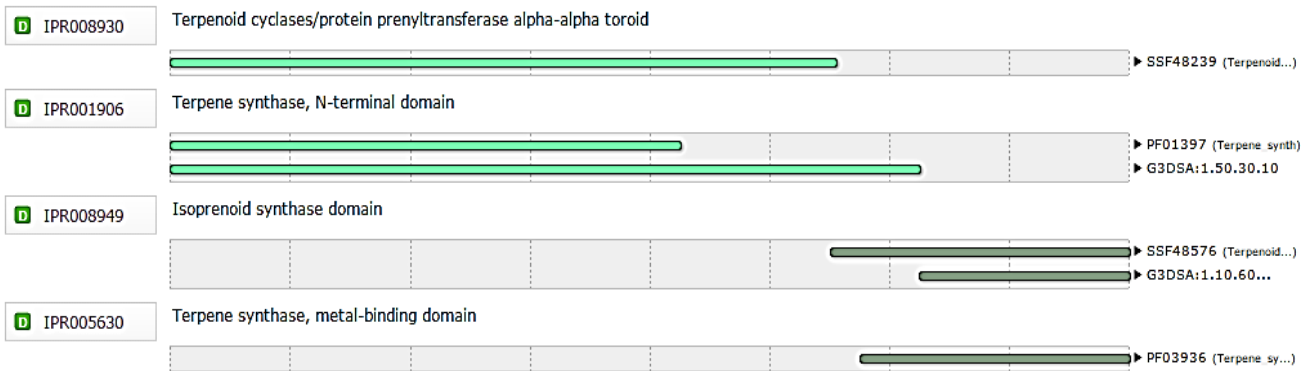


Fig. 4. InterProScan Analysis of the partial TPS-6 gene. SSF48239: Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily member (alpha-alpha toroid), PF01397: Terpene synthase N terminal domain, PF03936: Terpene synthase magnesium ion (metal) binding domain.

The phylogenetic analysis of *O. onites* partial TPS-6 gene was drawn for comparison with the similar overlapping sequences of other plant TPS-6s (Fig. 5). We observed that the *O. onites* TPS-6 gene sequence is very close to *O. vulgare* TPS-6 gene than other plant TPS-6s. Interestingly, although *Thymus* sp. is close to *Origanum* sp., *O. onites* and *O. vulgare* TPS-6 sequences are located far to *Thymus vulgaris* TPS-6 on the dendrogram (Fig. 5). This result shows that

TPS-6 enzymes may include the high gene polymorphism among species and genus.

The sequence data of the middle region of TPS-6 gene is the first reported data for *O. onites*. This cloned region includes the characteristic motif for TPS-6 gene and it is specific for *O. onites*. This data may provide an important advantage in the transcriptome analyses without all gene sequence for TPS-6. It may be used in determination of enzyme activity analysis in different stress conditions.

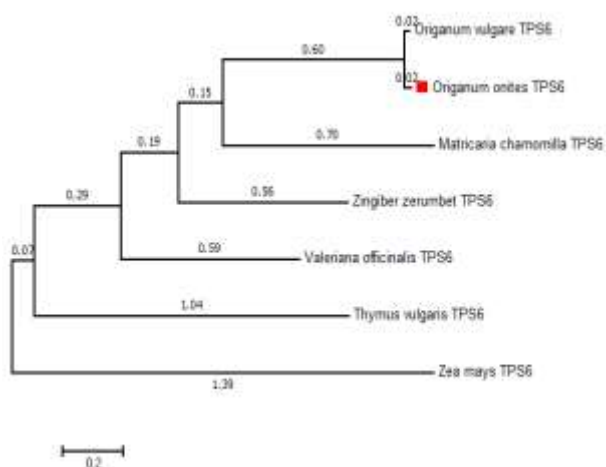


Fig. 5. The phylogenetic dendrogram of partial *TPS-6* genes of *O. onites* and other plants using Maximum Likelihood Analysis Method (MEGA 6.06). The highest identity rate of *O. onites TPS-6* is 96% with *O. vulgare TPS-6* and the distance value is 0.02. The species and corresponding accession number were given in Fig. 3.

Terpene synthase genes in aromatic plants encode attendant enzymes in synthesis of plant essential oils (Bayrak 2006). The characterization of terpene synthase genes was achieved using a method based on the homology within these

enzymes (Wallaart et al. 2001, Huber et al. 2005). The identification and characterization of terpene synthases in *Daucus carota* roots were performed in 2015.

The role of recombinant *TPS* genes in carrot aroma biosynthesis was investigated (Yahyaa et al. 2015). The partial *TPS-6* gene sequence may be used as a probe in Real Time PCR method and has an important potential for the development of high yield plants. The *TPS-6* gene efficiency in *O. onites* may be increased and can be used in development of a genetically modified aromatic plant. Terpenoids have been implicated in plant defenses, but their direct role in resistance against microbial pathogens is not clearly defined (Attaran et al. 2008). Attaran et al. (2008) examined a possible role of terpenoid metabolism in the induced defense of *A. thaliana* plants against leaf infection with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. They studied effects of mutant *TPS-4* genes on jasmonic acid (JA)-dependent signaling (Attaran et al. 2008). The DNA sequence data of terpene synthase genes are going to be used for gene expression analyses. Finally, the studies about genetical identification of different terpene synthases from various aromatic plants will conduce to global science, biotechnology and agricultural industry. Furthermore, efforts to increase terpene production will contribute to medicine and cosmetics industry.

References

1. Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S. & Chinou, B.I. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4168-4170.
2. Attaran, E., Rostás, M. & Zeier, J. 2008. *Pseudomonas syringae* Elicits Emission of the Terpenoid (E,E)-4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-Tridecatetraene in *Arabidopsis* Leaves Via Jasmonate Signaling and Expression of the Terpene Synthase TPS4. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21/11: 1482-1497.
3. Başer, K.H.C., Özek, T., Tümen, G. & Sezik, E. 1993. Composition of the essential oils of Turkish *Origanum* species with commercial importance. *Journal of Essential Oil Research*, 5: 619-623.
4. Baydar, H. 2005. The effects of different harvest dates on essential oil content and essential oil composition in *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. P.H. Davis. *Akdeniz University Journal of the Faculty of Agriculture*, 18: 175-178.
5. Baytop, T. 1999. *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün*, ilaveli 2. baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
6. Bayrak, A., 2006. *Gıda aromaları*, Gıda Teknolojisi Derneği, Yayın no: 32, Ankara
7. Bolhman, J., Gilbert, M.G. & Rodney, C., 1998. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 4126-4133.
8. Chen, F., Dae-Kyun, R., Petri, J., Gershenzon, J., Bohlmann, J., Pichersky, E. & Tholl, D. 2004. Characterization of a root-specific *Arabidopsis* terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole1. *Plant Physiology*, 135: 1956-1966.
9. Degenhardt, J., Köllner, T.G. & Gershenzon, J. 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70(15-16): 1621-1637.
10. Davis, P.H., Mill, R.R. & Tan, K. 1988. *Flora of Turkey and the Aegean Islands*, Edinburgh Univ. Press, 10, 209, Edinburgh.
11. Fakıllı, O. 2010. *Türkiye'de Kekik Adı ile Anılan Bitkiler Konusunda Yapılan Çalışmaların Envanteri*. Master Thesis, Graduate School of Sciences, Çukurova University.
12. Huber, D.P. Philippe, R.R., Godard, K.A., Sturrock, R.N. & Bohlmann, J. 2005. Characterization of four terpene synthase cDNAs from methyl jasmonate-induced Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii*. *Phytochemistry*, 66: 1427-1439.
13. Jiang, Z., Kempinski, C. & Chappel, J. 2016. Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. *Current Protocols in Plant Biology*, Doi:10.1002/cppb.20024.
14. Keszei, A., Brubaker, C.L., Carter, R., Köllner, T., Degenhardt, J. & Foley, W.J. 2010. Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian *Myrtaceae*. *Phytochemistry*, 71: 844-852.
15. Kaloustian, J., El-Moselhy, T.F. & Portugal, H. 2003. Chemical and thermal analysis of the biopolymers in thyme (*Thymus vulgaris*). *Thermochimica Acta*, 401/2 77-86.

16. Köllner, T.G., Schnee, C., Gershenzon, J. & Degenhardt, J. 2004. The variability of sesquiterpenes emitted from two *Zea mays* cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes. *The Plant Cell*, 16: 1115-1131.
17. Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J. & Nychas, G.J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 453-462.
18. Lange, B.M. 2015. The evolution of plant secretory structures and emergence of terpenoid chemical diversity. *Annual Review of Plant Biology*, 66: 139-159.
19. López, N L, Nair V., Bang W.Y., Zevallos L.C. & Heredia, J.B. 2016. Protective role of terpenes and polyphenols from three species of Oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 187: 302-312.
20. Mewalal, R., Rai, D.K., Kainer, D.K., Chen, F., Külheim, C., Peter, G.F. & Tuskan, G.A. 2016. Plant-Derived Terpenes: A Feedstock for Specialty Biofuels. *Trends in Biotechnology*, Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.003>.
21. Pichersky, E. 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311(5762): 808-811.
22. Poyraz, I., Sozen, E. & Arslanyolu, M. 2010. Isolation of quality total RNA from the aromatic plant *Origanum onites*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65: 266-270.
23. Poyraz, I. 2007. *Origanum onites*'de Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinaz Kinaz (MAPKK) Enzim Ailesi Üyelerinden Birinin Klonlanması ve Enzimatik Olarak Tanımlanması. PhD. Thesis, Graduate School of Science, Anadolu University.
24. Poyraz, I. 2015. Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase kinase (OoMAPKK1) in *Origanum onites* L. (Lamiaceae). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 24(1): 75- 83.
25. Sarıhan, E.O., İpek, A., Arslan, N. & Gürbüz, B. 2006. Farklı sıra arası ve sıra üzeri mesafelerinin kekik (*Origanum vulgare* var. *hirtum*)'de verim ve verim öğeleri üzerine etkisi. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 12(3): 246-251.
26. Tholl, D. 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 297-304.
27. Tokul, H.E. 2015. İzmir kekiği (*Origanum onites* L.)'nde farklı su ve azot uygulamalarının verim ve kalite üzerine etkileri ile bunların fizyolojik denetimi. PhD. Thesis, Graduate School of Science, Ege University.
28. Wallaart, T.E., Bouwmeester, H.J., Hille, J., Poppinga, L. & Maijers, N.C.A. 2001. Amorpha-4,11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta*, 212/3: 460-465.
29. Yahyaa, M., Tholl, D., Cormier, G., Jensen, R., Simon, P.W. & Ibdah, M., 2015. Identification and Characterization of Terpene Synthases Potentially Involved in the Formation of Volatile Terpenes in Carrot (*Daucus carota* L.). Roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 4870-4878.
30. Yang, C.Q., Wu, X.M., Ruan, J.X., Hu, W.L., Mao, Y.B., Chen, X.Y. & Wang, L.J. 2013. Isolation and characterization of terpene synthases in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Phytochemistry*, 96: 46-56.
31. Zhang, P., Fuentes, S., Siebert, T., Krstic, M., Herderich, M., Barlow, E.W.R. & Howell, K. 2016. Terpene evolution during the development of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grapes. *Food Chemistry*, 204: 463-474.

2,4-D (DİKLOROFENOKSİASETİK ASİT)'İN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio* Hamilton, 1822) SOLUNGAÇLARINDA ANTIOKSİDAN ENZİMLER VE LİPİD PEROKSİDASYON SEVİYESİ ÜZERİNE AKUT ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Figen Esin KAYHAN^{1*}, Güllü KAYMAK², Cansu AKBULUT², Nazan Deniz YÖN ERTUĞ²

¹Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Göztepe, 34722, İstanbul.

²Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Serdivan, 54187, Sakarya.

*Corresponding author: e-mail: figenesink@gmail.com

Alınış (Received): 23 Şubat 2017, Kabul (Accepted): 05 Ekim 2017, Erken Görünüm (Online First): 20 Ekim 2017, Basım (Published): 15 Aralık 2017

Özet: Bu çalışmanın amacı; 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit) herbisitinin, zebra balığı (*Danio rerio* Hamilton, 1822) solungaçlarında akut oksidatif strese neden olma potansiyellerinin spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmesidir. Kontrol grubu (Grup-K) dışındaki balıklar, 96 saat süreyle 2,4-D herbisitinin subletal dozlarının (0,1ppm, 0,5ppm ve 1ppm) etkisine bırakılmıştır. Solungaç dokusunda lipid peroksidasyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla malondialdehit (MDA), antioksidan sistemlere etkisini belirlemek amacıyla da indirgenmiş glutatyon (GSH), katalaz enzim aktivitesi (CAT) ve total protein (TP) seviyeleri belirlenmiştir. Bu çalışmada 2,4-D'nin subletal dozlarına maruz bırakılan zebra balıklarının solungaçlarında total protein seviyelerinin kontrol grubuna oranla azaldığı gözlenmiştir. MDA seviyeleri kontrol grubuna oranla önemli ölçüde artmıştır. GSH seviyeleri 2,4-D herbisitinin en yüksek dozunda artarken diğer gruplarda azalmıştır. CAT aktivitesinde ise kontrol grubuna oranla önemli bir fark gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: 2,4-Diklorofenoksiasetik asit, antioksidan enzimler, solungaç, zebra balığı.

Determination of Acute Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation Levels in Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822) Gills

Abstract: The aim of this study is to determine the potential of 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) herbicide in causing acute oxidative stress in the gills of zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822) using spectrophotometric methods. Test animals except the control group (Group-K) were exposed to sublethal doses (0.1ppm, 0.5ppm and 1ppm) of 2,4-D herbicide for 96 hours. Malondialdehyde (MDA) was used to determine lipid peroxidation levels, and reduced glutathione (GSH), catalase enzyme activity (CAT) and total protein (TP) levels were determined to determine their effects on antioxidant systems in gill tissues. In this study, total protein levels in gills of zebrafish exposed to sublethal doses of 2,4-D were observed to be reduced compared to the control group. MDA levels significantly increased compared to the control group. GSH levels increased in the highest dose of 2,4-D herbicide but decreased in other doses. No significant difference was found in CAT activity compared to the control group.

Key words: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, Antioxidant enzymes, gill, zebrafish.

Giriş

Son yıllarda sucul ortamlarına karışan çevresel kirleticilerin sucul organizmalarda oluşturduğu biyolojik hasarların belirlenmesi ve bu kirleticilerin biyolojik mekanizmalarının hücresel, biyokimyasal ve moleküler düzeyde aydınlatılması pek çok araştırmaya konu olmuştur (Adeyemi ve ark. 2015, Husak ve ark. 2016, Oliveira ve ark. 2017). Pestisitler tarımsal alanlarda zararlıların ve yabancı otların yok edilmesinde ve üretimin artırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), klorlu fenoksi asit grubuna ait bir herbisittir ve yaklaşık elli yıldır dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır (WHO 2016). Bu tip

yaygın kullanım sonucunda yağmur suları tarafından sucul ortamlara taşınan tarımsal kimyasallar hedef olmayan bazı sucul organizmalarca bünyelerine alınmaktadır. Tarım ilaçlarından etkilenen balıklar düşmanları tarafından daha kolay avlanırlar çünkü hastalıklara karşı dirençleri düşer. Aynı zamanda diğer balıklarla rekabet yetenekleri, yumurtlama, üreme ve geçici açlık gibi zor şartlara toleransları azalmaktadır. Ayrıca yavru balıklarda canlı kalma minimal şartlara bağlı olduğundan pestisitlerin ortamdaki varlığı, canlı kalma süresinin düşmesine neden olmaktadır (Chinalia ve ark. 2007). 2,4-D asit formu, suda oldukça kalıcı

olduğundan canlı dokularda kolayca birikir. Bunun sonucu olarak özellikle besin zinciri yolu ile 2,4-D'nin biyoakümülyasyonu sucul türlerde üreme, yaşama oranı ve büyüme standartlarında düşüşlere ve bazen de tamamen durmasına sebep olabilir (Oliveira ve ark. 2017). Herbisitler sucul ortamlarda besin zinciri içerisinde sırasıyla planktonlar, algler, omurgasızlar, bitkiler ve balıklar tarafından biriktirilir. Bunun sonucu olarak besin zincirinde herhangi bir herbisitinin derişimi zamanla artma eğilimindedir (WHO 2016, FAO 2016).

Oksidatif stres, reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu ve antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizlik sonucu oluşan metabolik süreçteki aksamalarıdır (Ling ve ark. 2017, Persch ve ark. 2017). Hücrelerde meydana gelen tüm metabolik aktivitelerde oluşabilen reaktif oksijen ürünleri oldukça reaktif olup, çevrelerindeki atom ve moleküllere saldırırlar. Çok kısa ömürlü olmalarına rağmen, radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girip ve bir dizi reaksiyon başlatıp onları da radikal moleküllere dönüştürüp oldukça zararlı durumlar oluşturabilirler (Sarıkaya ve Yılmaz 2003, Vigario ve Saboia-Morais 2014). Reaktif oksijen ürünleri, metabolizmada oksidasyon ve redüksiyon sırasında veya çevresel kaynaklı olarak (toksikantlar, ağır metal ve pestisitlerin kalıntıları, iyonize veya ultraviyole radyasyon vs.) sürekli oluşabilirler. Tüm canlılarda olduğu gibi balıklarda da reaktif oksijen ürünleri doku ve organlarda çeşitli fonksiyonel aksaklıklara neden olmakta ve bazı durumlarda ölümler meydana getirmektedir (Özmen ve ark. 2004, Piancini ve ark. 2015). Reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir. Bu moleküller, serbest oksijen radikallerine bir hidrojen iyonu vererek, bu radikalleri kendilerine bağlayarak ya da onları daha zayıf bir moleküle çevirerek radikal hasarını önlerler. En önemli antioksidanlar; süperoksit anyonunu H_2O_2 'ye dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve H_2O_2 'yi suya indirgeyen katalaz (CAT) ve indirgenmiş glutatyonudur. Çevresel kirlenmeler aynı zamanda reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunu arttırarak ya da hücrenin peroksidasyon reaksiyonlarına karşı savunma kapasitesini azaltarak lipid peroksidasyonunu da arttırabilir (Ge ve ark. 2017). Bu çalışmanın amacı; 2,4-D herbisitinin, zebra balığı (*Danio rerio* Hamilton, 1822) solungaçlarında oksidatif strese neden olma potansiyellerini spektrofotometrik yöntemlerle incelemektir.

Materyal ve Metot

Zebra balığı, ekotoksikolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir model organizmadır (Simonetti ve ark. 2015, Ling ve ark. 2017). Araştırmamızda kullanılan 2,4-D herbisiti (MERCK-KGaA, Almanya) ticari firmalardan elde edilmiştir. Herbisitler hücre bölünmesi, hücre uzaması, protein sentezi gibi bitki metabolizmasını düzenleyen hormonal dengeyi bozarak bitki gelişimini engeller (Özdaş ve ark. 2006). 2,4-D'nin balıklara uygulanacak subletal dozları 2,4 Diklorofenoksi asetik

asit dimetil tuzu emülsiyonu kullanılarak hazırlanmıştır. Deney materyali olarak seçilen zebra balıkları 2-3 yaş aralığında olup, genetik yapılarının uygunluğu açısından insan sağlığı araştırmalarında da dünyada yaygın olarak kullanılan bir "omurgalı model organizma" olması nedeniyle tercih edilmiştir. Zebra balıkları ticari akvaryumculardan satın alınmış ve 10 litrelik cam akvaryumlarda uygun sıcaklık aralığında (24-28°C), uygun havalandırma ve aydınlık/karanlık (14:10) şartlarında tutulmuştur. Akvaryumlar her biri 10 balık içeren 4 gruba ayrılmıştır. Biri kontrol grubu (Grup-K) olmak üzere diğerleri 0,1ppm (Grup-I), 0,5ppm (Grup-II) ve 1ppm'lik (Grup-III) deney grupları oluşturulmuştur. 96 saat süren farklı dozlarda pestisit uygulaması için ayrı ayrı akvaryumlar kullanılmıştır. Uygulama sonucunda balıklar -20°C'de soğuk şokuyla bayıltılarak, pens ve bistüri yardımıyla solungaç dokuları disekte edildikten sonra analizlerin yapılacağı zamana kadar derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edilmiştir. Deney sonrası ölü balıklar Kadıköy Belediyesine ait tıbbi atık ekipleri tarafından alınarak uygun koşullarda imha edilmişlerdir. Daha sonra solungaç doku örneklerinden %10 gramlık doku homojenatı, serum fizyolojik (%0,9 NaCl) ile hazırlanmıştır.

Malondialdehit (MDA) Tayini

MDA tayini, Ledwozyw (1986) yöntemine göre belirlenmiştir. 250µL doku homojenatı, 1,250µL Triklor asetik asit (TCAA) çözeltisi (1,22M, 0,6M HCl'deki) ile karıştırılmıştır. 15 dakika sonra 750µL Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi (0,047M) ile 30 dakika kaynar su banyosunda inkübe edilmiştir. Daha sonra 2,000µL ticari n-Butanol ilave edilen karışım 10 dakika 1,560g'de santrifüj edilmiştir. Butanol fazı alınarak 532nm'de absorbanlar kaydedilmiş ve nmolMDA/gprotein olarak hesaplanmıştır (Ledwozyw ve ark. 1986).

İndirgenmiş Glutatyon (GSH) Tayini

GSH tayini için Beutler (1975) yöntemi kullanılmıştır. 0,2mL homojenat üzerine 0,3mL metafosforik asit, NaCl ve EDTA-Na içeren proteinsizleştirme çözeltisinden ilave edilmiştir. 2,028g'de 10 dakika santrifüj edilen homojenattan 0,2mL süpernatant alınmış ve 0,8mL Na_2HPO_4 çözeltisi (0,3M) ve 0,1mL % 40mg DTNB (5-5' ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit) ile karıştırılmıştır. DTNB ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürünün 412nm'deki ışık absorpsiyonu spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve nmolGSH/gprotein cinsinden değerlendirilmiştir (Beutler 1975).

Katalaz Aktivitesi (CAT) Tayini

CAT tayini Aebi (1974) yöntemi ile yapılmıştır. Katalaz enzimi; H_2O_2 'nin, H_2O 'ya dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Bu dönüşüm 240nm'de absorbanın azalması ile takip edilebilir. Deney sırasında 0,4mL doku homojenatı üzerine her bir numune için 0,2mL H_2O_2 çözeltisi (30mM) + fosfat tamponu eklenmiş ve U/mg protein cinsinden hesaplanmıştır (Aebi 1974).

Total Protein (TP) Miktarı Tayini

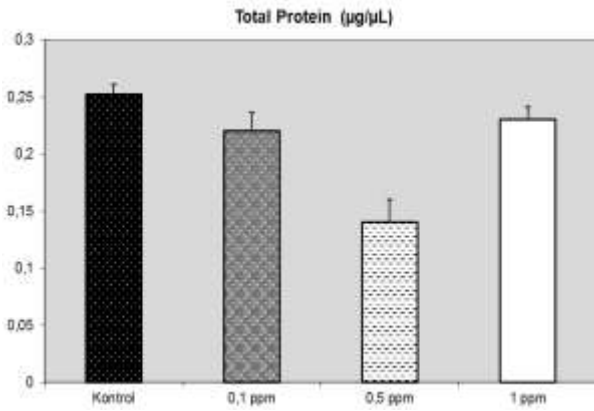
Solungaç dokusunda protein miktarı Bradford (1976) yöntemi ile ölçülmüştür. Stok albümin çözeltisi ile standart eğri grafiği oluşturulmuştur. 25µL doku homojenatı 775µL distile su ve 200µL ticari Bradford reaktifi ile karıştırıldıktan 15 dakika sonra 595nm'de köre karşı absorbansları kaydedilmiştir. Protein miktarları µg/µl cinsinden ifade edilmiştir (Bradford 1976).

İstatistiksel Analizler

Biyokimyasal analiz sonuçları SPSS 16.0 paket programında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve student t-testi ile değerlendirilmiş ve gruplar arası farkların istatistiki önemliliği $p<0,05$ önem derecesinde belirlenmiştir.

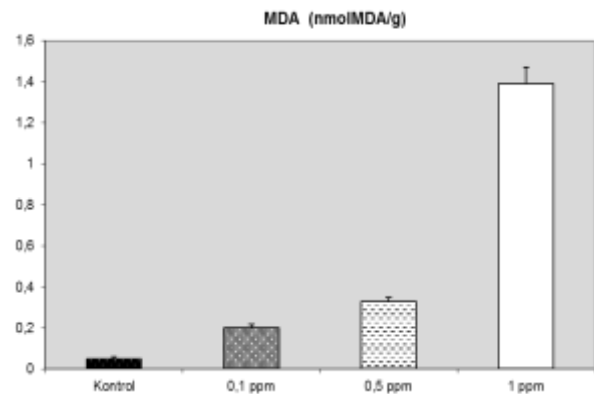
Sonuçlar ve Tartışma

Bu çalışmada, 2,4-D'nin subletal dozlarına 96 saat süreyle maruz bırakılan zebra balığı solungaçlarında total protein miktarlarının, kontrol grubuna oranla azaldığı gözlenmiştir. Özellikle Grup-II'de (0,5ppm) önemli oranda azalma olduğu gözlenmiştir (Şekil 1).



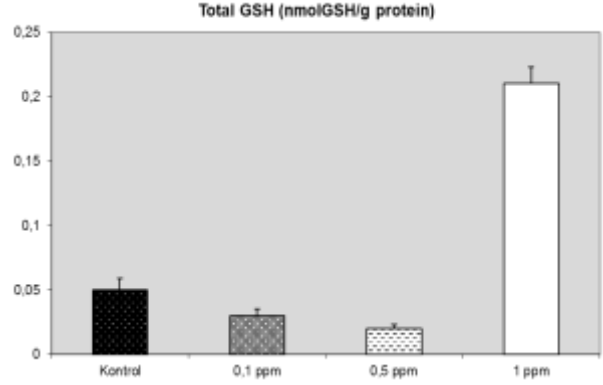
Şekil 1. 2,4-D'nin farklı subletal dozlarının etkisinde zebra balığı solungaçlarında total protein miktarları.

Bu çalışmada zebra balığı solungaçlarında MDA miktarlarının, kontrol grubuna oranla arttığı gözlenmiştir. Özellikle Grup-III'de (1ppm) artışın yüksek oranlarda olduğu ($p<0,01$) belirlenmiştir (Şekil 2).



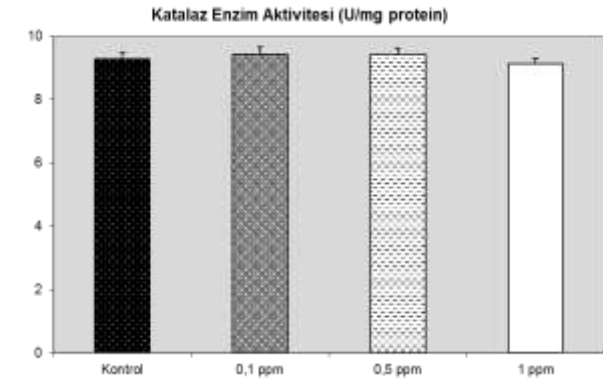
Şekil 2. 2,4-D'nin farklı subletal dozlarının etkisinde zebra balığı solungaç dokusunda MDA miktarları.

Glutasyon (GSH), oksijen radikali yakalayıcısı olarak antioksidant savunmada önemlidir. GSH düzeyindeki değişim, canlının detoksifikasyon yeteneğinin önemli bir indikatörüdür. Bu çalışmada, Grup III'te GSH seviyelerinde önemli derecede artış ($p<0,001$) gözlenirken diğer gruplarda kontrole oranla azalma ($p<0,05$) gözlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. 2,4-D'nin farklı subletal dozlarının etkisinde zebra balığı solungaçlarında GSH seviyesi.

Bu çalışmada, 2,4-D'nin subletal dozlarının zebra balığı solungaç dokularında 96 saatlik maruziyet sonucunda katalaz aktivitesini fazla etkilemediği, hemen hemen tüm gruplarda aynı seviyede kaldığı gözlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. 2,4-D'nin farklı subletal dozlarının etkisinde zebra balığı solungaçlarında katalaz enzim aktivitesi.

Balıklarda solungaçlar çevre kirliliğinden ilk etkilenen organlardır. Solungaçların geniş yüzey alanları toksik maddelerin geçişini kolaylaştırmaktadır. Sucul ortamdaki herbisit kalıntılarının hücre membranında birikmesi sonucu lipid yapısı bozulur. Protein ve lipid arasındaki hidrofobik etkileşimin bozulmasına bağlı olarak enzim aktiviteleri değişebilir (Fernandes ve ark. 2013). Pestisitlerin, balıklarda ve memelilerde antioksidant enzimleri ve lipid peroksidasyonunu olumsuz etkileyerek oksidatif strese neden oldukları bilinmektedir (Piancini ve ark. 2015, Golombieski ve ark. 2016).

Husak ve arkadaşları (2016) *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) türü balıklarla yaptıkları çalışmalarında,

96 saat süreyle Sencor herbisitinin (Metribuzin 4-amino-6-(1,1-dimethylethyl)-3-(methylthio) farklı konsantrasyonlarını uygulayarak solungaç dokusundaki bazı enzim aktivitelerini araştırmışlardır. Deneysel sonuçunda solungaç dokuda SOD ve GSH aktivitelerinde artış gözlemlenmiştir (Husak ve ark. 2016). Bizim çalışmamızda 2,4-D'nin farklı dozları Grup-I (0,1ppm) ve Grup-II (0,5ppm) ve Grup-III (1ppm) olacak şekilde sıralanmıştır. Grup II'de solungaç dokularının protein seviyelerinde önemli ölçüde azalma gözlenmiştir. Grup-I ve Grup-III'de protein miktarında gözlenen azalmanın istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir. Genel olarak sucul canlılarda izlenen adaptasyon süreçlerinde, canlıların çevresel kirleticilere verdikleri fizyolojik yanıtlar biyokimyasal yollarla izlenebilir (Tabassum ve ark. 2016, Golombieski ve ark. 2016). Buna göre, Grup-I balıklarında düşük protein tespit edilmesi henüz kirleticiye karşı bir tepkinin oluşmadığı şeklinde yorumlanabilir. Grup-II balıklarının protein seviyelerinde görülen azalmanın ise balığın adaptasyon süreci içerisinde olduğunu düşündürmektedir. Grup-III balıklarında düşük protein seviyesinin tespit edilmesi ise balıkların kirleticiye karşı adaptasyon sürecine girdiğini göstermektedir.

Persch ve arkadaşları (2017) kimyasal stres altında antioksidan sistemlerin indüklenmesinin adaptasyon olarak değerlendirilebileceğini, adaptasyonun olmaması halinde ise organizmanın toksik maddeye duyarlı olacağını ve toksisitenin başlayacağını belirtmişlerdir (Persch ve ark. 2017). *Channa punctata* (Bloch, 1793) türü balıklarla yapılan bir araştırmada araştırmacılar 96 saat süreyle balıklara Pendimethalin herbisitinin 0,5 ve 0,8ppb dozlarını uygulamışlardır. Pendimethalin uygulamasının lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyon sürecini tüm dokularda arttırdığını rapor etmişlerdir. Ayrıca, doza bağlı olarak GSH ve CAT enzim aktivitelerini indirgediği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda aksine MDA ve GSH seviyeleri 1ppm doz uygulanan grupta, kontrol grubuna oranla önemli miktarda artmıştır. Gluszczak ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada, *Rhamdia quelen* (Quoy ve Gaimard, 1824) türü balıkların Glifosat'ın 0,2 ve 0,4ppm dozlarına 96 saat süreyle maruz bırakılması sonucunda, balıkların karaciğer dokularında protein seviyelerinin arttığı, kas dokularında ise azaldığı bildirilmiştir (Gluszczak ve ark. 2007). Genellikle GDO'lu soya ve mısır üretiminde kullanılan ve Roundup ticari adıyla satılan glifosat, havada, suda ve yiyeceklerin yanı sıra ilaca maruz kalan tarım işçilerinin kan ve idrarlarında da tespit edildiği rapor edilmiştir (WHO 2016). Araştırmacılar, protein seviyelerindeki bu artışın oksidatif strese karşı biyokimyasal adaptasyon geliştirmesi sonucu olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ise, protein seviyelerinde görülen azalmanın nedeni, serbest radikallerin proteinlerin tiyol gruplarına bağlanması ve protein yapısında farklı konfigürasyonlar geliştirmesi olabilir. Yapılan bir çalışmada bir herbisit olan Paraquat'ın 1ppm'lik dozuna 24 saat maruz bırakılan *C. punctata* (Yeşil Yılanbaşı balığı) türü balıkların tüm

dokularında protein seviyelerinde bizim bulgularımızın tersine artış belirlenmiştir (Parvez ve Raisuddin 2006). Bizim çalışmamızda total protein miktarının genellikle kontrol grubundan daha düşük olduğu gözlenmiştir. Özellikle Grup-2'de (0,5ppm) daha da düşük olduğu görülmektedir (Şekil 1).

Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biridir ve oksidatif hasarın belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir parametredir. Yani MDA miktarının yüksek bulunması, lipid peroksidasyonuna işaret etmektedir. Bizim çalışmamızda tüm gruplarda MDA miktarları kontrol grubuna oranla yüksek bulunmuştur (Şekil 2). Lipid peroksidasyonu hücresel membranlarda pestisitlerin neden olduğu hasarının ilk göstergesidir (Koç ve Akbulut 2012). Artan lipid peroksidasyonu koruyucu antioksidan enzimlerin aktivitelerini etkiler. Lipid peroksidasyonunun düşük düzeylerde olması veya hiç oluşmaması oksidatif enzimlerin koruyucu etkilerinin var olduğunun göstergesidir. Persch ve ark. (2017) bir herbisit olan Clomazo'nun, *R. quelen* (Gümüş Yayınbalığı) türü balıkların karaciğer, beyin ve kas dokularında oksidatif stres şartlarında MDA seviyelerini arttırdığını belirtmişlerdir (Persch ve ark. 2017). Xing ve ark. (2012) atrazin ve klorprifos pestisitlerinin ayrı ayrı ve birlikte *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) karaciğer ve solungaç dokuları üzerine akut etkilerini inceledikleri araştırmalarında, reaktif oksijen ürünlerinin hücre zarı lipidlerinde hasara ve MDA seviyelerinde artışa neden olduğunu ileri sürmüşlerdir (Xing ve ark. 2012).

GSH seviyesi, hücresel işlevlerin korunmasında önemlidir. GSH seviyesi detoksifikasyon ve oksidatif stres durumlarında azalabilmektedir. Ancak devam eden stres durumunda GSH/GSSG oranı adaptif mekanizmaların etkisi ile oksidatif strese karşı koyabilmek üzere artışa geçebilir. Bu nedenle de GSH çevresel kirliliğin etkilerinin belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir (Zhang ve ark. 2005, Husak ve ark. 2016). Bu çalışmada, Grup-III'de GSH seviyelerinde önemli derecede artış gözlenirken diğer gruplarda kontrol grubuna oranla azalma belirlenmiştir (Şekil 3). Sucul türlerle yapılan bazı çalışmalarda pestisitlere maruziyet sonucu dokularda GSH seviyelerinde genellikle azalma gözlenmiştir (Li ve ark. 2003, Monteiro ve ark. 2006, Piancini ve ark. 2015, Tabassum ve ark. 2016). Bunun sebebi, GSH'nin devam eden stres durumunda ya da pestisite maruziyetin yüksek dozlarda olması durumunda, adaptif mekanizmaların devreye girmesi şeklinde açıklanabilir. Çünkü GSH seviyeleri oksidatif stres durumunda önce azalmakta, daha sonra artabilmektedir. Stara ve arkadaşları *C. carpio*'da bir herbisit olan Simazin'in (2-chloro-4,6-bis-(ethylamino)-s-triazine) kronik maruziyette tüm dokularda indirgenmiş glutatyon miktarını 14. ve 28. günlerde artırdığını ancak, 60. günde azalttığını rapor etmişlerdir (Stara ve ark. 2012).

Antioksidan enzimler hücre içi dengelerin düzenlenmesinde yaşamsal bir öneme sahiptirler ve indüksiyonları pestisitler gibi kirleticilere karşı verilen

tepkinin bir sonucudur. CAT, savunma mekanizmasında yer alan önemli hücre içi antioksidan enzimlerdendir ve oluşan H_2O_2 'i substrat olarak kullanarak oksijen ve suya parçalamak suretiyle H_2O_2 'nin detoksifikasyonunu sağlayan peroksidazlardır (Karasu Benli ve ark. 2012, Adeyemi ve ark. 2015, Tabassum ve ark. 2016). Aşırı oksijen radikali üretimi CAT aktivitesini inhibe edebilme özelliğine sahiptir (Persch ve ark. 2017). Oruç ve arkadaşları (2004), Azinfosmetil, 2,4-D ve bu iki pestisit kombinasyonlarının *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Tilapya balığı) ve *C. carpio*'nun (Sazan balığı) solungaç, böbrek ve beyin dokularında antioksidan sistemleri incelemiştir. Araştırmacılar, *O. niloticus*'un beyin dokusunda CAT aktivitesinin değişmediğini, *C. carpio*'da ise bu pestisitlerin tek başına ve kombine uygulamalarında, böbrekte CAT aktivitesinin yükseldiğini belirtmişlerdir (Oruç ve ark. 2004). Katalaz seviyelerindeki artışların gösterildiği bazı çalışmaların tersine pestisitlerin toksik etkisi üzerine yapılan birçok çalışmada CAT aktivitesinin azaldığı da bildirilmiştir (Zhang 2005, Vasylykiv ve ark. 2011, Xing ve ark. 2012, Husak ve ark. 2016). Bizim çalışmamızda CAT aktivitesindeki değişikliğin istatistiksel olarak önemli olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4). CAT, SOD ve GST gibi, balıkların antioksidan sistemlerinde de görülen temel enzim gruplarının serbest radikalleri yok edici etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu enzim grupları sucul ortamlarda bulunan çeşitli pestisitlerin neden olduğu zararlı etkilere

karşı, balıkların solungaç hücrelerini korumakla görevlidirler.

Parçalanma süreleri uzun olan herbisitlerin yaygın ve kontrolsüz kullanımının sucul canlılar için önemli problemler yaratacağı öngörülmektedir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular, genel veriler ile paralellik göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler tarım alanlarında kullanılan kimyasalların sucul canlılara zarar verdiğini veya zarar verme potansiyellerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Toksik maddeler gıda zincirinin bütün basamaklarındaki canlı gruplarını etkilemektedir. Bu nedenle, sucul kirlilik değerlendirme araştırmaları farklı sucul canlı grupları üzerinde periyodik olarak izlenmelidir. Çevre sağlığı açısından herbisitlerin yoğun olarak kullanıldığı tarımsal alanlarda toksik araştırmalar yapılmasının yanı sıra sucul alanlarda da kirlenici maddelerin derişimleri sürekli izlenmelidir. Pestisit kullanımını yasaklamak veya tamamen piyasadan kaldırmak bugünkü şartlar altında mümkün değildir. Ancak bazı tedbirler almak suretiyle pestisitlerin toprak ve su kirliliği ile çevre sağlığı açısından yarattığı sorunları en aza indirmek mümkündür. Sonuç olarak, bu çalışma, 2,4-D herbisitinin, balıkların solungaç dokuları üzerine zararlı akut etkileri olduğunu göstermiştir. Balıklardaki söz konusu biyokimyasal parametrelerin, çevresel kirlilik çalışmaları ve ekotoksikolojik risk belirlemelerinde uygun ve güvenli indikatörler olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Adeyemi, J.A., Martins-Junior, A.C. & Barbosa, J.F. 2015. Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 7(12): 172-173.
2. Aebi, H. 1974. Catalase invitro. In: Methods of enzymatic analysis, Ed: Bergmeyer HU, 2nd ed, FL pp:121-126.
3. Beutler, E. 1975. *Glutathione in red cell metabolism: A manual of biochemical methods*. pp: 112-114, 2nd ed., Grune and Stratton, New York.
4. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
5. Chinalia, F.A., Regali-Seleguin, M.H. & Correa, E.M. 2007. 2,4-D Toxicity: Cause, Effect and Control. Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology. Invited Review. *Global Science Books*. p: 24-33.
6. Fernandes, M.N., Paulino, M.G., Sakuragui, M.M., Ramos, C.A. & Pereira, C.D. 2013. Organochlorines and metals induce changes in the mitochondria-rich cells of fish gills: An integrative field study involving chemical, biochemical and morphological analyses. *Aquatic Toxicology*, 126: 180-190.
7. Food and Agriculture Organization (FAO), 2016. <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/jmpr-rep/en/> (Erişim: Mart 2017).
8. Ge, T., Han, J., Qi, Y., Gu, X., Ma, L., Zhang, C., Naeem, S. & Huang, D. 2017. The toxic effects of chlorophenols and associated mechanisms in fish. *Aquatic Toxicology*, 184: 78-93.
9. Gluszcak, L., Dos Santos Miron, D., Moraes, B.S., Simoes, R.R. & Schetinger, M.R. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146: 519-524.
10. Golombieski, J.I., Sutilli, F.J., Salbego, J., Seben, D., Gressler, L.T., Arruda da Cunha, J., Gressler, L.T., Zanella, R., Vaucher, R.A., Marchesan, E. & Baldisserotto, B. 2016. Imazapyr+imazapic herbicide determines acute toxicity in silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128: 91-99.
11. Husak, V.V., Mosiichuk, N.M., Maksymiv, I.V., Storey, J.M., Storey, K.B. & Lushchak, V.I. 2016. Oxidative stress responses in gills of goldfish, *Carassius auratus*, exposed to the metribuzin-containing herbicide Sencor. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 45: 163-169.
12. Karasu Benli, A.C., Şahin, D., Koçak Memmi, B. & Sepici Dinçel, A. 2012. Karbaril'e maruz kalan tatlı su istakozlarında (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823) antioksidan enzim düzeyleri. *Türk Biyokimya Dergisi*, 37(2): 162-166.
13. Koç, N.D. & Akbulut, C. 2012. Histological analysis of acute toxicity of 2,4-diclorophenoxyacetic acid in ovary of zebrafish, *Animal Cells and Systems*, 16: 400-407.

14. Ledwozyw, A., Michalak, D., Stepień, A. & Kadziolka, A. 1986. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 155(3): 275-283.
15. Li, W., Yin, D., Zhou, Y. & Wang, L. 2003. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of Crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 251-255.
16. Ling, L., Chia-W.L., Yung C., Lai, P.L. & Hsu T. 2017. Oxidative stress intensity-related effects of cadmium and paraquat (PQ) on UV-damaged-DNA binding and excision repair activities in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere*, 167: 10-18.
17. Monteiro, D.A., De Almeida, J.A., Rantin, F.T. & Kalinin, A.L. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish *Brycon cephalus* exposed to organophosphorus insecticide folisuper 600 (Methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143: 141-149.
18. Oliveira, J.M.M., Galhano, V., Henriques, I., Soares, A.M.V.M. & Loureiro, S. 2017. Basagran® induces developmental malformations and changes the bacterial community of zebrafish embryos. *Environmental Pollution*, 221: 52-63.
19. Oruç, E.Ö., Sevgiler, Y. & Üner, N. 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137: 43-51.
20. Özdaş, E., Ateş, U., Uyanıkgil, Y., Baka, M., Yavaşoğlu, A., Biçer, S., Ergen, G. 2006. Bir herbisit olan 2,4-D'nin sığanlarda testis dokusu üzerine etkisi. *Ege Tıp Dergisi*, 45(3): 169-174.
21. Özmen, I.A.M., Cengiz, M., Sirkecioğlu, N. & Atamanalp, M. 2004. Effect of water reduce system on antioxidant enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792). *Veterinarni Medicina Czech*, 49(10): 373-378.
22. Parvez, S. & Raisuddin, S. 2006. Effects of paraquat on the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch): Non-enzymatic antioxidants as biomarkers of exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50: 392-397.
23. Persch, T.S.P., Weimer, R.N., Freitas, B.S. & Oliveira, G.T. 2017. Metabolic parameters and oxidative balance in juvenile *Rhamdia quelen* exposed to rice paddy herbicides: Roundup®, Primoleo®, and Facet®. *Chemosphere*, 174: 98-109.
24. Piancini, L.D.S., Guiloski, I.C., Silva de Assis, H.C. & Cestari, M.M. 2015. Mesotrione herbicide promotes biochemical changes and DNA damage in two fish species. *Toxicology Reports*, 2: 1157-1163.
25. Sarıkaya, R. & Yılmaz, M. 2003. Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D herbicide on the behaviour of the common carp (*C. carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). *Chemosphere*, 52: 195-201.
26. Simonetti, R.B., Marques, L.S., Streit, D.P. & Oberst, E.R. 2015. Zebrafish (*Danio rerio*): The future of animal model in biomedical research. *Journal of Fisheries Sciences*. 9(3): 039-045.
27. Stara, A., Machova, J. & Velisek, J. 2012. Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 33: 334-343.
28. Tabassum, H., Ashafaq, M., Khan, J., Shah, Z., Raisuddin, S. & Parvez, S. 2016. Short term exposure of pendimethalin induces biochemical and histological perturbations in liver, kidney and gill of freshwater fish. *Ecological Indicators*, 63: 29-36.
29. Vasylykiv, O.Y., Kubrak, O.I., Storey, K.B. & Lushchak, V.I. 2011. Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101: 1-5.
30. Vigario, A.F., & Saboia-Morais, S.M.T. 2014. Effects of the 2,4-D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivipara*. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 34(6): 523-528.
31. World Health Organization (WHO). 2016. http://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/jmpr/en/ (Erişim: Mart 2017).
32. Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S. & Wang, X. 2012. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103: 74-80.
33. Zhang, J.F., Liu, H., Sun, Y.Y., Wang, X.R., Wu, J.C. & Xue, Y.Q. 2005. Responses of the antioxidant defenses of the goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-Dichlorophenol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19: 185-190.

ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLÜ İLE ÇİNKO KLORÜR'ÜN *Daphnia magna* (Straus) ÜZERİNE AKUT TOKSİK ETKİLERİ

Şeyda FİKİRDEŞİCİ ERGEN

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 06100, Ankara.
e-mail: seydafikirdesici@gmail.com

Alınış (Received): 4 Ağustos 2017 Kabul (Accepted): 1 Kasım 2017, Erken Görünüm (Online First): 16 Kasım 2017, Basım (Published): 15 Aralık 2017

Özet: Bu çalışmada çinko oksit nanopartikülünün (ZnO NP), çinko klorürün (ZnCl₂) ve karışımlarının, farklı konsantrasyonlarda (0,75, 1,5, 3, 6 ve 12ppm) *Daphnia magna* (Straus, 1820) üzerine akut toksik etkileri 24., 48. ve 72. saatlerde statik akut toksisite testi kullanılarak araştırılmıştır. Veriler probit analiz metodu kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (SPSS 21.0v). En yüksek toksisite karışımın (ZnO NP+ZnCl₂) 72. saatinde, en düşük toksisitenin ise ZnCl₂'nin 24. saatinde olduğu tespit edilmiştir. Akut toksisite sonuçları göz önüne alındığında, *D. magna* üzerine ZnO NP'nin ZnCl₂'ye göre, karışımlarının ise bu iki kirleticiye göre daha toksik olduğu tespit edilmiştir. Zamana bağlı akut toksisite sonucu değerlendirildiğinde her üç deney grubu (ZnO NP, ZnCl₂ ve ZnO NP+ ZnCl₂) için zaman arttıkça toksisitenin de arttığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: ZnO NP, ZnCl₂, *Daphnia magna*, korelasyon.

Acute Toxic Effects of Zinc Oxide Nanoparticle and Zinc Chloride on *Daphnia magna* (Straus)

Abstract: The acute toxicities of zinc oxide nanoparticle (ZnO NP), zinc chloride (ZnCl₂) and their mixtures of different concentrations (0.75, 1.5, 3, 6 and 12ppm) on *Daphnia magna* (Straus, 1820) were investigated at 24, 48 and 72 hours by employing the static acute toxicity test. The data obtained were statistically evaluated by probit analysis method (SPSS 21.0v). The highest toxicity was found at 72 hours of the mixture (ZnO NP+ZnCl₂) and the lowest toxicity was found at 24 hours of ZnCl₂. When the overall acute toxicity results were considered, ZnO NP was determined to be more toxic than ZnCl₂ and mixtures were determined to be more toxic than these two pollutants alone. When the results of time-dependent acute toxicity were evaluated, toxicity was found to increase with increasing time for all three experimental groups (ZnO NP, ZnCl₂ and ZnO NP+ZnCl₂).

Key words: ZnO NP, ZnCl₂, *Daphnia magna*, correlation.

Giriş

Doğada, sahradan gelen mineral tozlar, orman yangınları ve volkanik patlamalar gibi doğal kaynaklarda bulunan nanopartiküllerin, mühendislik yöntemleri ile de üretimi mümkündür (Baker ve ark. 2014). Son yıllarda nanoteknoloji alanında yaşanan büyük gelişmeler, nanoteknolojik ürünlerin üretiminde ve kullanımında artışa yol açmıştır. Kullanım alanlarının ve uygulamalarının artması, nanopartiküllerin çevre ile olan etkileşiminin de artmasına neden olmuştur. Yüzey-hacim oranının yüksekliği, ara yüzey aktivitesi ve elektronik yapıları gibi farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olan nanopartiküllerin farklı çevresel etkilere neden olacağı düşünülmektedir (Ma ve Wang 2010).

Eser element olsun ya da olmasın biyolojik sistemdeki birikimleri belli bir eşik değerden sonra toksik olan metallerin (Anton ve ark. 2000) ekosistemdeki varlığı ve konsantrasyonu pek çok araştırmacı tarafından araştırılmış olsa da giderek artan nanopartikül ile etkileşimi ve toksik

etkileri günümüzde önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Önemli bir ağır metal olan çinko (Zn), tüm organizmalar için gerekli bir besin kaynağıdır ve enzimatik faaliyetlerde önemli fonksiyonları bulunan bir geçiş metalidir (Palmgren ve ark. 2008). Zn galvanizlemede ve otomotiv sanayinde döküm kalıpları yapımında kullanılan bir metaldir. Çinko klorür metali (ZnCl₂) lastik sanayisinde aktivatör olarak, pil gövdelerinin yapımında, tekstil sanayisinde ve dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Çinko oksit nanopartikülü (ZnO NP) ise gübrede, boyada, güneş kremlerinde, sensör uygulamalarında, diş macunu, gıdalarda ve gıda ambalaj paketlerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Baker ve ark. 2014, Shetty ve ark. 2015, Zhang ve ark. 2015, Kuang ve ark. 2016).

Kullanım alanları çok yaygın olan ağır metal ve nanopartiküller doğada karışım halindedir. Dolayısıyla karışım halindeki kirleticilerin ekosistem ve canlı hayatı

üzerine etkilerinin olası olumsuz yönlerinin araştırılması önemli hale gelmiştir. Ekosistemdeki kirleticilerin araştırılmasında önemli bir model organizma olan *Daphnia magna* (Straus) ağır metal ve nanopartikül çalışmaları için de çok önemli bir türdür (Loureiro ve ark. 2011, Shashkova ve Grigor'ev 2013) ve pek çok metal toksisite çalışmalarında yer almıştır (Tan ve Wang 2011, Fikirdeşici ve ark. 2012, Que ve ark. 2013).

Bu çalışmada üretimi artan nanoteknolojik ürünlerin kullanımında sıkça rastladığımız nanopartiküllerden ZnO NP ile yine önemli metallere olan ZnCl₂'nin laboratuvar ortamında *D. magna* üzerine tek tek ve karışım halindeki akut toksik etkileri araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Daphnia magna Kültürü

Test organizması *D. magna* laboratuvarında 30L akvaryumlara ISO-6341 (Anonim, 1999) prosedürüne uygun olarak alıştırılmıştır. Millipore Milli-Q ultra saf (Milli-Di, France) su sistemi kullanılarak canlılar için saf su ortamı yaratılmıştır. Akvaryumlar 12 saat karanlık 12 saat aydınlık olacak şekilde ışıklandırılmış, sıcaklık 24±1,3°C'de, çözülmüş oksijen 6ppm'de ve elektriksel iletkenlik ise 250µScm⁻¹'de sabit tutulmuştur.

Çinko Oksit Nanopartikül Sentezi

ZnO nanopartiküller yaklaşık 30-40nm boyutunda basit solüsyon faz yaklaşımı ile sentezlenmiştir. Rahman ve ark. (2013)'nin çalışması temel alınmış olup, bazı değişiklikler yapılmıştır. Sentez aşağıda kısaca anlatılmıştır:

Mikro küreler uygun ortalama partikül boyutu ve gözenekliliğe sahip olacak şekilde üretilmiştir. Yaklaşık 0,5-1M çinko asetat ve oksalik asit solüsyonları manyetik karıştırıcıda 250rpm de karıştırılarak ayrı ayrı oda sıcaklığında hazırlanmıştır. Hazırlanan oksalik asit solüsyonu, çinko asetat solüsyonuna damlatma yolu ile ilave edilerek, bu işlem sırasında karıştırmaya 250rpm de devam edilmiştir. Oksalik asit solüsyonu, çinko asetat çözeltisine ilave edildikten sonra karışım bir şişeye alınıp, ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra 70°C ve 12 saat boyunca 120rpm de beyaz renkli bir çözelti elde edilinceye kadar çalkalanmış ve ardından metanol ve damıtık su ile yıkanmıştır. Daha sonra 80°C sıcaklıkta vakum ortamında kurutulmuştur.

Toksisite Çalışması

Biyodenedeyde, toksik madde olarak çinko oksit nanopartikülü (ZnO NP) ve çinkoklorür (ZnCl₂) metalleri teker teker ve karışımları (v/v) *D. magna* üzerinde çalışılmıştır. Her deney grubu için yaşı 24 saatten küçük 10 adet *D. magna* kullanılmıştır.

Nanoparçacıkların *D. magna* tarafından alınması için iki yol bulunmaktadır. Birinci yol, nanoparçacıkların vücut yüzeyi tarafından emilmesi şeklindedir. Alınma derecesi, nanopartiküller ve vücudun yüzey potansiyelleri tarafından yönetilir. Bununla birlikte, bu yol, toksik etkiye katkıda bulunmayabilir çünkü nanoparçacıklar, düzenli aralıklarla kabuk değişimi yapan *D. magna* tarafından

kolayca atılabilir. Dolayısıyla diğer alım yollarına kıyasla önemsizdir. Diğer yol ise nanoparçacıkların ağızdan yani gastrointestinal yol ile alımıdır (Wang ve ark. 2011). Nanopartikülün suda çözelti halinde bulunması da *D. magna* üzerine toksisiteyi artırıcı bir diğer etkidir. Dolayısıyla deneyde kullanılan nanopartikül *D. magna*'ya suda çözelti halinde verilmiştir.

Tüm deneyler kimyaca inert 100mL'lik beherlerde gerçekleştirilmiştir. Biyodenedeyde 0,75, 1,5, 3, 6 ve 12ppm olmak üzere 5 konsantrasyon ile birlikte kontrol grubu da kurulmuştur. 24, 48 ve 72. saatlerde akut toksisite değerleri (LC₅₀) probit analizi ile, ZnCl₂, ZnO NP ve karışımlarının korelasyon ilişkisi de korelasyon testi ile hesaplanmıştır (SPSS 21.0v (IBM, Portsmouth, UK)).

Karışımındaki metallere birbiri üzerindeki etkilerini anlamada toksik birim (TU_i) (Dener ve Sinnige 1988) ve ilave indeks (AI) (Marking 1977) hesaplamaları kullanılmıştır.

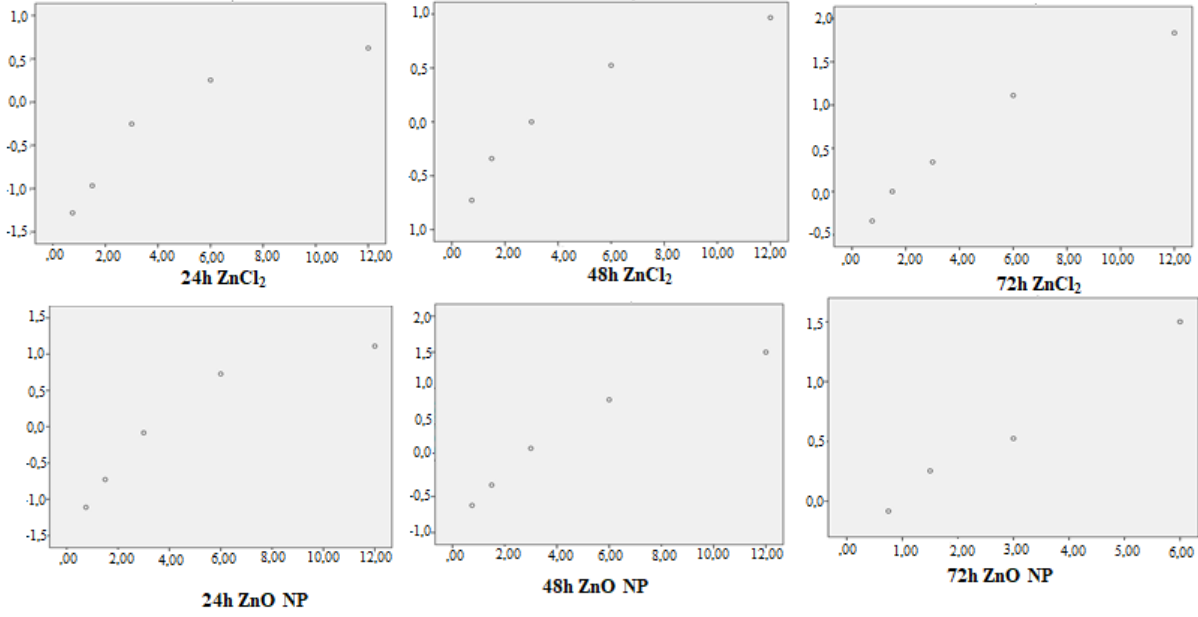
Bulgular ve Tartışma

Yapılan çalışma sonucunda *D. magna* üzerine en yüksek toksisiteyi ZnCl₂+ZnO NP karışımının 72. saati, en düşük toksisiteyi ise ZnCl₂'nin 24. saati göstermiştir. Toksisite sıralaması yapıldığında; C72h> A72h> B72h> C48h> A48h> B48h> C24h> A24h> B24h şeklinde bir sıralama olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1). Heinlaan ve ark. (2008) ZnO NP'nin *D. magna* üzerine 48 saat LC₅₀ değerini 3,2ppm; Blinova ve ark. (2010) ise 48 saat EC₅₀ değerini 2,6ppm olarak bulmuşlardır. Bu çalışma sonuçları, mevcut çalışma sonuçları ile paralellik göstermiştir.

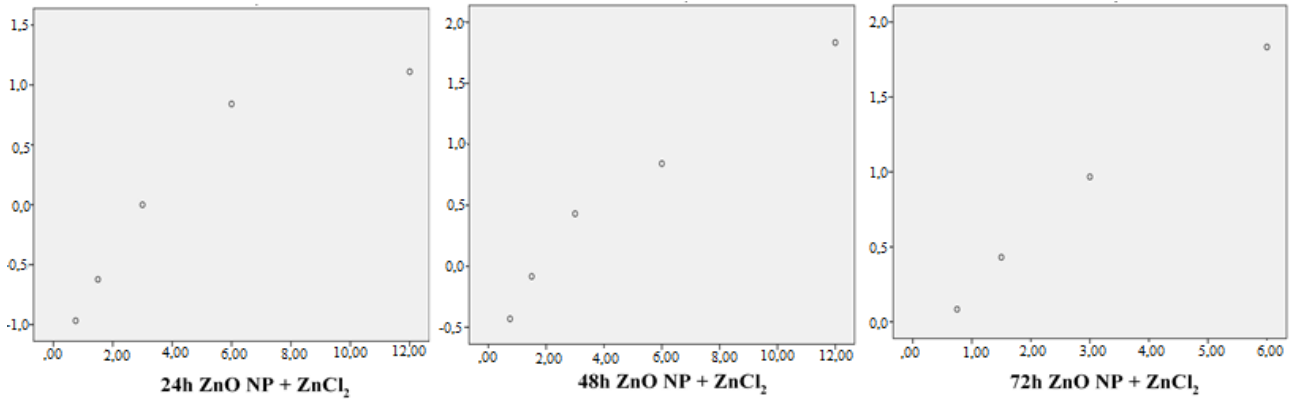
Deneyde ZnCl₂ ve ZnO NP kullanarak toksisiteye, çözülmüş Zn⁺² iyonu mu yoksa metal oksit nanopartiküllerinin mi sebep olduğu araştırılmıştır. Literatürde bazı çalışmalar ZnO nanopartikülünün oluşturduğu toksik etkinin çözülmüş Zn⁺² iyonundan kaynaklandığını belirtirken, bazı çalışmalar ise metal oksit nanopartiküllerden kaynaklandığını ortaya koymuştur (Mwaanga ve ark. 2014, Bacchetta ve ark. 2016). Bu çalışma ile metal oksit nanopartiküllerinin toksisiteyi artırıcı etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1, Şekil 1 ve 2). Bu sonucu destekler nitelikte ZnO NP gibi metal oksit nanopartiküllerinin sucul canlılar için toksik olduğunu gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (Mwaanga ve ark. 2014, Adam ve ark. 2015, Haulik ve ark. 2015).

Tablo 1. ZnCl₂ ve ZnO NP ve karışımlarının *D. magna* üzerine 24, 48 ve 72. saatlerdeki akut toksik etki (LC₅₀) değerleri.

	ZnO NP(A)	ZnCl ₂ (B)	ZnCl ₂ +ZnO NP(C)
24h	4,486ppm (0,169-10,706)	6,460ppm (2,576-19,676)	4,062ppm (-2,189-11,129)
48h	2,924ppm (1,624-4,066)	3,946ppm (2,286-5,525)	1,945ppm (0,380-3,062)
72h	0,933ppm (-0,745-1,810)	1,656ppm (0,035-2,751)	0,345ppm (-1,735-1,215)



Şekil 1. Farklı saatlerde (24, 48 ve 72) ZnCl₂ ve ZnO NP'ye maruz kalan *D. magna* 'nın doz-ölüm eğrisi (probit analizi).



Şekil 2. Farklı saatlerde (24, 48 ve 72) ZnCl₂ ve ZnO NP karışımına maruz kalan *D. magna* 'nın doz-ölüm eğrisi (probit analizi).

Ayrıca karışımdaki metallerin birbiri üzerine etkilerini anlamada toksik birim (TU_i) (Dener ve Sinnige 1988) ve ilave indeks (AI) (Marking 1977) hesaplamaları kullanılmıştır.

Toksik birim (TU_i) değeri, karışımdaki bir kirleticinin LC₅₀ değerinin, o kirleticinin LC₅₀ değerine bölünmesi ile hesaplanmaktadır (Dener ve Sinnige 1988).

$$TU_i = LC_{50\text{karışım},i} / LC_{50i}$$

TU_i, karışımdaki i bileşeninin toksik birimidir. LC_{50karışım,i}, karışımdaki i bileşeninin LC₅₀ değeridir. LC_{50i} ise i bileşeninin LC₅₀ değeridir.

$$M = TU_s = \sum TU_i$$

Birbirleri üzerine sinerjistik etki gösteren kirleticilerin toksisite değerleri arasındaki ilişki korelasyon testi ile değerlendirildiğinde, karışımın toksisitesi ile kontaminantların teker teker toksisitesi arasında çok yüksek korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla karışımdaki her kontaminantın birbiri üzerinde sinerjistik

bir etkisi olduğu sonucunu desteklemektedir (p<0,001) (Tablo 3). Wang ve ark. (2011), *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) üzerine As(V) ve TiO₂ nanopartiküllerinin toksik etkilerini araştırmışlar ve As(V) ve TiO₂ nanopartikülleri arasında benzer şekilde sinerjistik etkinin olduğunu raporlamışlardır.

Tablo 2. Karışımdaki metallerin *D. magna* üzerindeki toksisitesi.

	A	B	TU _s (M)	TU _i	AI
LC ₅₀ (C 24h)	0,182	0,26	0,08	0,04	11,5
LC ₅₀ (C 48h)	0,057	0,077	0,04	0,02	24
LC ₅₀ (C 72h)	0,0032	0,006	0,007	0,0035	141,8

Tablo 3. ZnCl₂, ZnO NP ve karışımlarının korelasyon ilişkisi.

	ZnCl ₂	ZnO NP	ZnCl ₂ +ZnO NP
ZnCl ₂	1,000		
ZnO NP	0,992**	1,000	
ZnCl ₂ +ZnO NP	0,987**	0,987**	1,000

Sonuç

Doğal ortamlarda konsantrasyonları hızla artan metal ve nanopartikül gibi kirleticilerin ekosistem ve canlılar için yararları olduğu kadar önemli zararları olabileceğinin bilinirliği günümüzde yapılan çalışmalarla artmıştır. Bu çalışmada ZnO nanopartiküllerinin ZnCl₂'ye oranla daha toksik olduğu gözlenmiştir.

Doğadaki kirleticilerin karışım halinde bulunması, araştırmacıları kirleticilerin karışım halindeki etkilerini anlamaya yönlendirmiştir. ZnO NP ile ZnCl₂ birbiri üzerine sinerjistik etki göstererek doğada karışım halinde bulunması, teker teker bulunurluklarına oranla, doğal ortam ve canlılar için daha tehlikeli bir hal alabileceği

Kaynaklar

- Adam, N., Schmitt, C., De Bruyn, L., Knäpen, D. & Blust, R. 2015. Aquatic acute species sensitivity distributions of ZnO and CuO nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 526: 233-242.
- Anonim, Water quality ISO-6341, 1999. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea): Acute toxicity test.
- Anton, A., Serrano, T., Angulo, E., Ferrero, G. & Rallo, A. 2000. The use of two species of crayfish as environmental quality sentinels: the relationship between heavy metal content, cell and tissue biomarkers and physico-chemical characteristics of the environment. *Science of the Total Environment*, 247(2-3): 239-251.
- Azevedo, S.L., Ribeiro, F., Jurkschat, K., Soares, A.M.V.M. & Loureiro, S. 2016. Co-exposure of ZnO nanoparticles and UV radiation to *Daphnia magna* and *Danio rerio*: Combined effects rather than protection. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(2): 458-467.
- Bacchetta, R., Maran, B., Marelli, M., Santo, N. & Tremolada, P. 2016. Role of soluble zinc in ZnO nanoparticle cytotoxicity in *Daphnia magna*: A morphological approach. *Environmental Research*, 148: 376-385.
- Baker, T.J., Tyler, C.R. & Galloway, T.S. 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution*, 186: 257-271.
- Blinova, I., Ivask, A., Heinlaan, M., Mortimer, M. & Kahru, A. 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environmental Pollution*, 158(1): 41-47.
- Dener, J.W. & Sinnige, T.L. 1988. The joint acute toxicity to *Daphnia magna* of industrial organic chemicals at low concentrations. *Aquatic Toxicology*, 12: 33-38.
- Fikirdeşici, S., Altındağ, A. & Özdemir, E. 2012. Investigation of acute toxicity of cadmium-arsenic mixtures to *Daphnia magna* with toxic units approach. *Turkish Journal of Zoology*, 36(4): 543-550.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.C. & Kahru, A. 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71 (7): 1308-1316.
- Hai-zhou, Z., Guang-hua, L., Jun, X. & Shao-ge, J. 2012. Toxicity of Nanoscale CuO and ZnO to *Daphnia magna*. *Chemical Research in Chinese Universities*, 28(2): 209-213.
- Haulik, B., Balla, S., Pálfi, O., Szekeres, L., Juríková, T., Sály, P. & Bakonyi, G. 2015. Comparative ecotoxicity of the nano Ag, TiO₂ and ZnO to aquatic species assemblages. *Applied Ecology and Environmental Research*, 13(2): 325-338.
- Kuang, H., Yang, P., Yang, L., Aguilar, Z.P. & Xu, H. 2016. Size dependent effect of ZnO nanoparticles on endoplasmic reticulum stress signaling pathway in murine liver. *Journal of Hazardous Materials*, 317: 119-126.
- Loureiro, C., Castro, B.B., Pereira, J.L. & Gonçalves, F. 2011. Performance of standard media in toxicological assessments with *Daphnia magna*: Chelators and ionic composition versus metal toxicity. *Ecotoxicology*, 20(1): 139-148.
- Ma, X. & Wang, C. 2010. Fullerene Nanoparticles Affect the Fate and Uptake of Trichloroethylene in Phytoremediation Systems. *Environmental Engineering Science*, 27(11): p. 989-992.
- Marking, L.L. 1977. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. Pp. 99-108. In: Mayer, F.L. & Hamelink, J.L. (eds.) *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials.
- Mwaanga, P., Carraway, E.R., & van den Hurk, P. 2014. The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles. *Aquatic Toxicology*, 150: 201-209.
- Palmgren, M.G., Clemens, S., Williams, L.E., Krämer, U., Borg, S., Schjørring, J.K. & Sanders, D. 2008. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends in Plant Science*, 13(9): 464-473.
- Que, R.J., Wang, X.H., Feng, M.B., Li, Y., Liu, H.X., Wang, L.S. & Wang, Z.Y. 2013. The toxicity of cadmium to three aquatic organisms (*Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna* and *Carassius auratus*) under different pH levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95: 83-90.
- Rahman, Q.I., Ahmad, M., Misra, S.K. & Lohani, M. 2013. Effective photocatalytic degradation of rhodamine B dye by ZnO nanoparticles. *Materials Letters*, 91: 170-174.

21. Shashkova, T.L. & Grigor'ev, Y.S. 2013. Impact of heavy metals on the trophic activity of daphnia depending on feeding conditions and age of crustaceans. *Contemporary Problems of Ecology*, 6(6): 662-666.
22. Shetty, P.K., Venuvanka, V., Jagani, H.V., Chethan, G.H., Ligade, V.S., Musmade, P.B., Nayak, U.Y., Reddy, M.S., Kalthur, G., Udupa, N., Rao, C.M. & Mutalik, S. 2015. Development and evaluation of sunscreen creams containing morin-encapsulated nanoparticles for enhanced UV radiation protection and antioxidant activity. *International Journal of Nanomedicine*, 10: 6477-6491.
23. Spehar, R.L. & Fiandt, J.T. 1986. Acute and chronic effects of water quality criteria-based metal mixtures on three aquatic species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5: 917-931.
24. Sprague, J.B. & Ramsay, B.A. 1965. Lethal levels of mixed copperzinc solution for juvenile salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 22: 425-432.
25. Tan, Q.G. & Wang, W.X. 2011. Acute toxicity of cadmium in *Daphnia magna* under different calcium and pH conditions: Importance of influx rate. *Environmental Science and Technology*, 45(5): 1970-1976.
26. Wang, D., Hu, J., Irons, D.R. & Wang, J. 2011. Synergistic toxic effect of nano-TiO₂ and As(V) on *Ceriodaphnia dubia*. *Science of the Total Environment*, 409: 1351-1356.
27. Zhang, D., Hua, T., Xiao, F., Chen, C., Gersberg, R.M., Liu, Y., Stuckey, D., Ng, W.J. & Tan, S.K. 2015. Phytotoxicity and bioaccumulation of ZnO nanoparticles in *Schoenoplectus tabernaemontani*. *Chemosphere*, 120: 211-219.

PREDATORY INSECT SPECIES ASSOCIATED WITH SOME ROSACEOUS PLANTS IN EDİRNE (TRAKYA UNIVERSITY ARBORETUM), TURKEY

Seda Emel TEK*, Zuhâl OKYAR

Trakya University, Faculty of Science, Department of Biology, 22030, Edirne.

*Corresponding author: e-mail: sedaemelte@gmail.com

Received (Alınış): 26 Sep 2016, Accepted (Kabul): 13 Nov 2017, Online First (Erken Görünüm): 24 Nov 2017, Published (Basım): 15 Dec 2017

Abstract: This study was performed to determine the predatory insects associated with Rosaceae species. Field surveys were carried out in March-June 2013 in Edirne province (Trakya University Arboretum) of European Turkey. Predatory insects were observed and collected in different stages of their life cycles, and larval-pupal samples were reared in laboratory conditions. As a result of this study, predatory insect species which are inhabitants of the Rosaceae species to provide their preys were recorded and 11 predatory insects belonging to 6 families (Chrysopidae, Coccinellidae, Formicidae, Geocoridae, Pentatomidae, Syrphidae) were determined on 5 Rosaceae species. The observations and short information about the recorded species were also presented.

Key words: Trophic interaction, biocontrol, Rosaceae, Turkish Thrace.

Edirne Civarında (Trakya Üniversitesi Arboretumu) Bazı Rosaceae Bitkileri ile Birlikteliğe Sahip Predatör Böcek Türleri

Özet: Rosaceae türleri ile etkileşime sahip predatör böcek türlerini belirlemek amacıyla, 2013 yılı Mart-Haziran periyodunda, Trakya Bölgesi sınırları içinde yer alan Edirne ilinde (Trakya Üniversitesi Arboretumu) arazi çalışması ve toplanan örneklerle ilgili olarak laboratuvar çalışması yapılmıştır. Arazi çalışması sırasında predatör böcekler çeşitli yaşam evrelerinde gözlemlenmiş ve toplanmıştır. Toplanan örneklerden larva/pupa aşamasında olanlar laboratuvar şartlarında yetiştirilmiştir. Çalışma sonucunda alanda bulunan Rosaceae türleri üzerinde konaklayan ve besinini sağlayan predatör böcekler tanımlanarak belirlenmiş ve 5 bitki türü üzerinde, 6 familyaya ait 11 predatör böcek türü (Chrysopidae, Coccinellidae, Formicidae, Geocoridae, Pentatomidae, Syrphidae) kaydedilmiştir. Tespit edilen türler hakkında yapılan gözlemler ve kısa literatür bilgileri de belirtilmiştir.

Anahtar kelimeler: Trofik etkileşim, biyokontrol, Rosaceae, Türkiye Trakyası.

Introduction

Most of the members of the Rosaceae family are crucial to human beings' way of life since the family includes trees, shrubs and herbaceous plants which are used for landscaping and timber making as well as other related species which are used for production of medicine and food (Flora of China 2004, Hummer and Janick 2009).

Predatory insects are among the natural enemies of several major economically depreciating pest species. Plants affect both insect herbivores and predators by their phenology, chemistry, morphology, and alternative food which they provide to these insects. Plants provide food and shelter for herbivorous insects but on the other hand they can defense themselves directly or indirectly against herbivory by using their traits. One example can be given in terms of plant allelochemicals. A type of allelochemical called "pine tree terpenoids" can behave as allomones, kairomones and synomones against the organisms around it. This substance released by a plant species can deter

herbivores by acting as an allomone, attract bark beetles by acting as a kairomone and attract bark beetle predators by acting as a synomone. Hence, pine tree terpenoids produced by the host tree is beneficial to both the plant and the predator. Another typical example is the aphid-plant-predator relationship. Studying the tritrophic associations between an aphid, its plant food and its predator can show the affects each offers to the others. These tritrophic studies reveal a lot about the overall beneficial effects that plants have to offer and the outcomes of these studies contribute to the importance of plant protection (Kılınçer 1983, Barbosa and Letourneau 1988, Schmitz *et al.* 2000, Vanhaelen *et al.* 2002, Schoonhoven *et al.* 2005). In the special case of Rosaceae family, it is also important to reveal the predatory insects and their associations or interactions with herbivorous insects and plant species they feed on. Thus, any kind of knowledge about plant-predatory insects is important both for agriculture and biodiversity. Although there are a

number of studies reporting biological observations on predatory insect species found on several Rosaceae species like apple, peach, cherry and other fruit trees in different regions of Turkey (Kılıç and Aykaç 1989, Çam 1993, Çınar *et al.* 2004, Başar and Yaşar 2011, Demirözler and Karaca 2014) no study about the predators on rosaceous plants was performed so far in our present study area. The aim of this study is to contribute to the knowledge of predatory species associated with some rosaceous plants in Turkey.

Materials and Methods

Predatory insects were investigated following the emergence of herbivores in parallel with the blooming season of Rosaceae plants (in March) in Trakya University Balkan Arboretum in Edirne province of European Turkey (Fig. 1). The study area (200 hectares) was an uncultivated field without pesticide treatment. Field surveys were carried out from March to June 2013 but the total time period of the study covered 1 year to include the steps in laboratory. Predatory insects were collected individually in the field at their larval, pupal and adult stages. The collections were performed on *Crataegus monogyna* Jacquin, *Prunus x domestica* Linnaeus, *P. spinosa* Linnaeus, *Pyrus communis* Linnaeus and *Rubus sanctus* Schreber. The field studies were performed from March to June as 2 days/week due to the seasonal conditions of the region and the biological features of the species. Insect diversity showed a parallel increase with the plant development reaching its peak within this time period. In the field, the flowers, leaves, and stems of the plants were observed carefully and individual insects or their nests seen on each plant were collected gently. Larval and adult stages of insects were captured (after their observation) directly from the plant or from a cloth beneath the plant after shaking it using a forceps or by hand-picking. Pupal stages and nests were

collected by removing the plant leaves. Larval and pupal samples were placed in 10×10 cm gauze-covered plastic rearing boxes and were reared in laboratory conditions (temperature 27°C; relative humidity 52%) by feeding the larvae with aphids. Adult samples were directly put into small jars containing 70% ethanol and then brought to laboratory. All rearing boxes and ethanol filled jars were labeled including number of the sample, related plant species, study area, and date of the collection. All adult insects were appropriately prepared and then identified by experts.

Results

A total of 11 predatory insects from 6 families were sampled either as larval, pupal or adult stages on 5 Rosaceae species (Table 1).

Coccinella bipunctata Linnaeus, *C. septempunctata* Linnaeus, *Exochomus quadripustulatus* Linnaeus, *Harmonia axyridis* Pallas (Col.: Coccinellidae) and *Eupeodes corollae* (Fabricius) (Dip.: Syrphidae) were collected from their associated plants (Table 1) only in their larval stages. The larvae were observed around aphid colonies on the sampled plants and were reared into adults in laboratory by feeding them with aphids. *Episyrphus balteatus* (De Geer) was collected both in larval and pupal stages and was reared into adult in laboratory. Cannibalism was observed between the last instar larvae of *C. septempunctata* and those of *H. axyridis*.

Chrysopa viridana Schneider and *C. pallens* Rambur (Neur.: Chrysopidae) were collected in their pupal stages from their associated plants (Table 1) and developed to adults in laboratory rearings. Pupae of *C. pallens* were determined in their nests built on hawthorn and blackthorn. The nests looked like a tent made from old leaves, with only a small pupa in a nest.

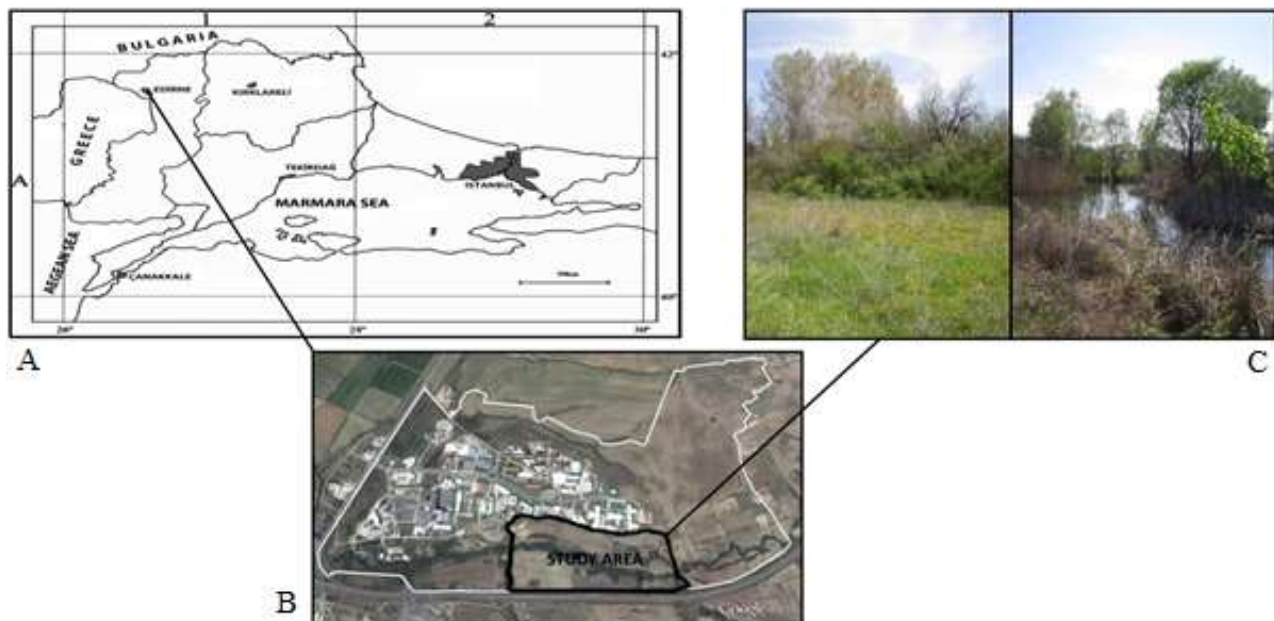


Fig. 1. (A) Map of European Turkey. (B) The study area, Trakya University Balkan Campus (white-lined area) and the arboretum (black-lined area) (Google Earth 2015). (C) The general view of the study area.

Table 1. Predatory insects and their associated Rosaceae plants recorded during the study. ⁽¹⁾: individuals collected from the field in larval stage; ⁽²⁾: collected in pupal stage; ⁽³⁾: collected in adult stage; ⁽⁴⁾: non-herbivorous at all life stages.

Rosaceae Plant	Predatory Insect
<i>Crataegus monogyna</i> Jacquin (hawthorn)	<i>Chrysopa pallens</i> Rambur ⁽²⁾ (Neuroptera: Chrysopidae)
<i>Prunus x domestica</i> Linnaeus (plum)	<i>Coccinella bipunctata</i> Linnaeus ⁽¹⁾ (Coleoptera: Coccinellidae)
	<i>Coccinella septempunctata</i> Linnaeus ⁽¹⁾ (Coleoptera: Coccinellidae)
	<i>Harmonia axyridis</i> Pallas ⁽¹⁾ (Coleoptera: Coccinellidae)
	<i>Episyrphus balteatus</i> (De Geer) ^{(1),(2)} (Diptera: Syrphidae)
	<i>Eupeodes corollae</i> (Fabricius) ⁽¹⁾ (Diptera: Syrphidae)
<i>Prunus spinosa</i> Linnaeus (blackthorn)	<i>Chrysopa viridana</i> Schneider ⁽²⁾ (Neuroptera: Chrysopidae)
	<i>Coccinella septempunctata</i> Linnaeus ⁽¹⁾ (Coleoptera: Coccinellidae)
	<i>Geocoris erythrocephalus</i> (Lepelletier & Serville) ⁽³⁾ (Hemiptera: Geocoridae)
	<i>Perillus bioculatus</i> (Fabricius) ⁽³⁾ (Hemiptera: Pentatomidae)
<i>Pyrus communis</i> Linnaeus (pear)	<i>Chrysopa pallens</i> Rambur ⁽²⁾ (Neuroptera: Chrysopidae)
	<i>Exochomus quadripustulatus</i> Linnaeus ⁽¹⁾ (Coleoptera: Coccinellidae)
<i>Rubus sanctus</i> Schreber (wild blackberry)	<i>Coccinella septempunctata</i> Linnaeus ⁽¹⁾ (Coleoptera: Coccinellidae)
	<i>Perillus bioculatus</i> (Fabricius) ⁽³⁾ (Hemiptera: Pentatomidae)
	<i>Crematogaster ionia</i> Forel ^{(3),(4)} (Hymenoptera: Formicidae)

Geocoris erythrocephalus (Lepelletier & Serville) (Hem.: Geocoridae) was collected as adults from blackthorn by shaking the plant or observed between the leaves.

Perillus bioculatus (Fabricius) (Hem.: Pentatomidae) were observed gregariously in their first or second nymphal stages on blackthorn and wild blackberry stems.

Crematogaster ionia Forel (Hym.: Formicidae) adults (workers) were observed between wild blackberry bush leaves. 5-6 individual ants were continuously moving in and out of a nest looked like a leafrollers' nest, as if they were feeding and storing; it probably was a Tortricidae pupa.

Discussion

Chrysopa viridana and *C. pallens* (Chrysopidae) are generalist predators but they also feed on pollen rich in proteins, carbohydrates, fats, and vitamins (Bozsik 1992, Lundgren 2009). Chrysophid species are important biological control agents of aphids, mites and coccids. *C. pallens*, one of most well-studied chrysophid, is used in biocontrol of aphids, lepidoptera larvae, mites, and thrips which are major economically depreciating arthropods (Lundgren 2009, Pappas *et al.* 2011). The adult or larval individuals of *C. viridana* and *C. pallens* were documented on rosaceous plants in previous studies. Aldini (2012) recorded adults of these chrysopid species on plum trees and Paulan *et al.* (2001) and Bozsik (2006) documented them on *Crataegus monogyna* and *Prunus spinosa*. Tritrophic view includes that plant volatiles have an impact on herbivores and on predators and parasitoids as their natural enemies. Herbivore-induced plant chemicals affect natural enemies and attract them to the plants to find the herbivores (McEwen *et al.* 2001). For instance, it was reported that the silver vine *Actinidia polygama* Siebold & Zuccarini attracted *Chrysopa pallens* by releasing two dihydronepetalactols (Hyeon *et al.* 1968,

van Emden and Harrington 2007). Boo *et al.* (1998) proved that *C. pallens* adults responded to aphid-induced sex pheromones as kairomones. In the present study, *C. pallens* and *C. viridana* were found on blackthorn, hawthorn, and plum in their pupal stages. Therefore, the possible effects of rosaceous plant allelochemicals on these chrysophid species could be considered for a possible bio-control of aphids on the plants.

Coccinella septempunctata and *C. bipunctata* (Coccinellidae) are among the most common aphidophagous species in Turkey (Demirsoy 1990, İperti 1999, Yurtsever 2001). *Harmonia axyridis* is a polyphagous coccinellid species that feeds mostly on aphids but it also preys on other pests (lepidopteran eggs, coccids, psyllids, tetranychids, and thrips) of agricultural and ornamental plants. From this point of view, the polyphagous habit of *H. axyridis* might contribute to the survival of rosaceous plants like *Crataegus* sp. and *Prunus* sp. in presence of pest insect species (Adriaens *et al.* 2008, Helyer *et al.* 2014). However, there are reported cases that *H. axyridis* might sometimes attack non-pest insect species (Helyer *et al.* 2014). *C. bipunctata* and *H. axyridis* are used as biological control agents against Aphididae throughout the world. *Exochomus quadripustulatus*, another coccinellid species we observed in the present study, is also an important predator feeding both on aphids and coccids (Farooq-Ahmad 2012). Rosaceous plants reported to be associated with *C. septempunctata* are *Amygdalus communis*, *Prunus armeniaca* Linnaeus, *P. avium* Linnaeus, *P. cerasifera* Ehrh., *Rubus caesius* Linnaeus; with *C. bipunctata* are *Malus communis* Linnaeus, *Persica vulgaris* Mill., *Prunus armeniaca*, *P. avium*, *Rosa* sp.; and with *E. quadripustulatus* are *Malus communis*, *Prunus amygdalus* Batsch, *P. avium*, *P. domestica*, *P. persica* Linnaeus, and *Pyrus communis* (Soydanbay (Tunçyürek) 1978, İperti 1999, Erler 2004, Aslan and Uygün 2005, Başar and Yaşar 2011). *C. septempunctata* and *H.*

axyridis are known to feed sometimes with pollen (Lundgren 2009) but this habit of these two species was not observed in the present study. Intraspecific cannibalism was determined to occur among *C. septempunctata* and *H. axyridis* larvae reared in laboratory conditions (Iperti 1999). Cannibalism is common among larvae and adults during laboratory rearing (Iperti 1999) and is biologically advantageous for the cannibal coccinellid (Hawkes 1920). In this study, we observed that the last instars of *C. septempunctata* larvae preyed on their conspecifics despite the presence of aphids. *C. septempunctata* was reported to show cannibalism towards its eggs also in the presence of aphids (Khan *et al.* 2003). According to Toft and Wise (1999) and Khan *et al.* (2003), a mixed diet based on aphids and cannibalism on conspecifics has a positive contribution to their larval survival and their developmental period. On the other hand, when the available food (e.g. aphids) in their environment is limited, the individuals show usually cannibalistic behavior to survive. The food deficiency-caused cannibalism was observed in laboratory conditions among last instars of *H. axyridis* larvae. According to the studies on *H. axyridis* and *C. bipunctata*, cannibalism may have both positive and negative effects on the cannibal individual (Table 2).

Table 2. Positive and negative effects of cannibalism on the cannibal individual (Wagner *et al.* 1999, Dixon 2000, Snyder *et al.* 2000, Koch 2003, Ware *et al.* 2009).

Negative aspects of cannibalism	Positive aspects of cannibalism
If prey-predator sizes are nearly the same, the cannibal can be in a prey position during its predation attempt or it can take damage.	Cannibalism provides the energy requirement of dominant predator immediately and decreases competition for food.
The dominant predator may be negatively affected from any parasite or viruse of its prey.	If cannibals feed on a predator which has resistance to parasites, cannibalism gives an advantage for possible diseases to it.
If the predator feeds on its genetically close relatives its inclusive fitness may be lost.	A mixed diet, composed of aphid and cannibalism, leads a faster growth and development and higher survival of cannibals due to high quality of its food.

Episyrphus balteatus and *Eupeodes corollae* are generalist predators with their larvae feeding mostly on aphids and adults on nectar and pollen (Cowgill *et al.* 1993, Lindsey 2015). Because of the effective predatory feature of their larvae, these species are important in biocontrol of aphids (Zeki and Kılınçer 1990, Cowgill *et al.* 1993, Putra and Yasuda 2006). Rosaceous plants on which *E. balteatus* larvae find their prey are *Malus domestica* and *Prunus domestica* (Pehlivan and Atakan 2014). Bolu and Hayat (2008) quoted Rosaceae plant

associates of *E. corollae* as *Amygdalus communis*, *Malus communis*, *M. floribunda* Siebould ex Van Houtte, *Prunus armeniaca*, *P. avium*, *P. domestica*, *P. mahaleb* Linnaeus, *P. persica*, *Pyrus communis*, *Rosa* sp., and *Rubus fruticosus* Linnaeus. Plants have important indirect effects on predators like *E. balteatus* as they can affect the development of larvae and pupae of the predators through their aphid preys (Dyer 1995, Amiri-Jami *et al.* 2015). According to a study carried out by Vanhaelen *et al.* (2002), specialist aphids feed on their preferred plant if it is rich in its specific metabolites. In addition, when syrphids feed on these specialist aphids, their development, survival rate, fecundity, and reproduction may be negatively affected because high content of plant allelochemicals can be toxic and transferred to the predator through the aphid prey.

The geocorid bug, *Geocoris erythrocephalus*, feeds on small insects in several different habitats all with rosaceous plants. The associated plant species belonging to this family are *Crateagus* sp., *Prunus armeniaca*, *Pyrus angustifolia* Aiton, *P. malus*, *Rosa* sp., and *Rubus* sp. (Lodos *et al.* 1999, Torma 2009, Matocq *et al.* 2014). The members of Geocorinae subfamily are mostly predators feeding on soft-bodied insects. They generally prey upon mites and insects which are pests of many ornamental and crop plants (Çakır and Önder 1990, Ulubilir and Yabaş 1995, Öztemiz 2012, Mead 2001). In this study, *G. erythrocephalus* individuals were recorded from *Prunus spinosa* and visited the plant probably in search of prey items.

The two-spotted stink bug *Perillus bioculatus* nymphs show a high gregariousness during their first instars. Other stink bugs change their behavior from gregarious to solitary in late instars but *P. bioculatus* nymphs may still show gregarious behaviors to some extent until their last instars (Schaefer and Panizzi 2000). *P. bioculatus* were observed in their first or second instars and they showed a high gregarious behavior. These instars do not feed during these developmental stages and just provide their humidity needs from the plant sap. They start to feed on insect preys after the second instar. There are many reported cases that predatory insects like *P. bioculatus* can detect the plant originating volatiles as a result of herbivorous feeding (Dickens 1999, Weissbecker *et al.* 1999, Schaefer and Panizzi 2000).

Crematogaster ionia foragers were observed in a lepidopteran nest of rolled leaves. When they were first noticed, foragers had already fed on some part of the lepidopteran pupa. Considering the fact that the lepidopteran pupa remains were already dried up when the ants attacked, it is most likely to conclude that foragers were feeding on an already dead lepidopteran body. Although not certain, the remains of the partly consumed pupa looked like to be a pupa of a tortricid. *Crematogaster* foragers were reported to feed mainly on honeydew during their visits on plants, but eggs and larval and pupal stages of several aphid species are also preyed on. The predatory behavior of the genus has formerly been well

documented (Du Merle and Mazet 1983, Richard *et al.* 2001). Radeghieri (2004) recorded *C. scutellaris* preying upon larvae and pupae of a lepidopteran species (Gracillariidae). *C. ionia* feeds on honeydew of members of Coccoidea (Coccidae and Marchalinidae) (Ülgentürk 2001, Ülgentürk *et al.* 2012). *C. ionia* has also a facultative mutualistic association with Lepidoptera (Lycaenidae) larvae in which foragers feed on larval secretions (Fiedler, 2010). However, the ant species for this record of Fiedler (2010)'s study is not precise, stated as "*Crematogaster cf. ionia*". Although Karaman (2010) reported that there is not much data about *C. ionia* ecology, workers of this species are generalized omnivores.

In conclusion, predatory insects associated with some Rosaceae species were investigated in this study. A total of 11 predatory insects belonging to 6 families were

determined on 5 Rosaceae species. Some relevant information about behavioral patterns of these insects was given under the tritrophic concept. To understand the complete mechanism underneath, it is important to study several topics, i.e. associations, interactions, allelochemicals, and genetic relationships, regarding the predators and the plants on which the predators find their preys.

Acknowledgement

The authors would like to thank to Meral Fent (Hemiptera), Nihat Aktaç (Formicidae), and Rüstem Hayat (Syrphidae) for identification of the species. The findings used in this article is a part of the master's thesis of the first author and has been presented as a poster on 23rd National Biology Congress held in Gaziantep, Turkey on 5-9 September 2016.

References

1. Adriaens, T., San Martin, G. & Maes, D. 2008. Invasion history, habitat preferences and phenology of the invasive ladybird *Harmonia axyridis* in Belgium. Pp. 69-88. In: Roy, H.E. & Wajnberg E. (eds) *Biological Control to Invasion: The Ladybird Harmonia axyridis as a Model Species*. Springer Science & Business Media, Netherlands, 290 pp.
2. Aldini, R.N. 2012. Lacewings (Neuroptera) as beneficial insects in orchards: findings for plum and cherry trees in Lombardy (northern Italy). Proceedings of the Joint Meeting of the sub-Groups Pome Fruit Arthropods and Stone Fruits: Workshop on Sustainable Protection of Fruit Crops in the Mediterranean Area, 12-17 September, Italy, 203-208.
3. Amiri-Jami, A.R., Sadeghi-Namaghi, H., Gilbert, F., Moravvej, G. & Asoodeh, A. 2015. On the role of sinigrin (mustard oil) in a tritrophic context: plant-aphid-aphidophagous hoverfly. *Ecological Entomology*, 41(2): 138-146.
4. Aslan, M.M. & Uygun, N. 2005. The aphidophagus coccinellid (Coleoptera: Coccinellidae) species in Kahramanmaraş, Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 29(1): 1-8.
5. Barbosa, P. & Letourneau, D.K. 1988. *Novel Aspects of Insect-Plant Interactions*. Wiley, New York, 362 pp.
6. Başar, M.K. & Yaşar, B. 2011. Determination of Ladybird species (Coleoptera: Coccinellidae) on fruit trees in Isparta, Turkey. *Turkish Journal of Entomology*, 35(3): 519-534.
7. Bolu, H. & Hayat, R. 2008. A new host [*Parthenolecanium persicae* (Homoptera: Coccidae)] record for *Eupeodes corollae* (Fabricius) (Diptera: Syrphidae) from Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 32(1): 79-84.
8. Boo, K.S., Chung, I.B., Han, K.S., Pickett, J.A. & Wadhams, L.J. 1998. Response of the lacewing *Chrysopa cognata* to pheromones of its aphid prey. *Journal of Chemical Ecology*, 24(4): 631-643.
9. Bozsik, A. 1992. Natural adult food of some important *Chrysopa* species (Planipennia: Chrysopidae). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 27(1-4): 141-146.
10. Bozsik, A. 2006. Lacewings' occurrence in some Hungarian hedgerows and field edges. Proceedings of the 4th International Plant Protection Symposium at Debrecen University, 18-19 October, Hungary, 141-150.
11. Cowgill, S.E., Wratten, S.D. & Sotherton, N.W. 1993. The selective use of floral resources by the hoverfly *Episyrphus balteatus* (Diptera: Syrphidae) on farmland. *Annals of Applied Biology*, 122(2): 223-231.
12. Çakır, S. & Önder, F. 1990. Some systematic and faunistic studies on Geocorinae (Het.: Lygaeidae) from Turkey. *Turkish Journal of Entomology*, 14 (1): 37-52.
13. Çam, H. 1993. Some studies on the heteropterous species collected on mahaleb, sweet and sour cherries trees in Tokat and surrounding area, *Gaziosmanpaşa University Journal of Agricultural Faculty*. 10(1): 32-42.
14. Çınar, M., Çimen, İ. & Bolu, H. 2004. The cherry pests, their natural enemies and observations on some important species in Elazığ and Mardin provinces of Turkey. *Turkish Journal of Entomology*, 28(3): 213-220.
15. Demirözer, O. & Karaca, İ. 2014. Predator and parasitoid species associated with oil-bearing rose (*Rosa damascena* Miller) production areas in Isparta province with distributional remarks. *Turkish Bulletin of Entomology*, 4(3): 171-184.
16. Demirsoy, A. 1990. *Yaşamın Temel Kuralları. II. Omurgasızlar/Böcekler*. Volume II, Meteksan Publishing, Ankara, 941 pp.
17. Dickens, J.C. 1999. Predator-prey interactions: olfactory adaptations of generalist and specialist predators. *Agricultural and Forest Entomology*, 1(1): 47-54.
18. Dixon, A.F.G. 2000. *Insect Predator-Prey Dynamics: Ladybird Beetles and Biological Control*. Cambridge University Press, Cambridge, 257 pp.
19. Du Merle, P. & Mazet, R. 1983. Mortality factors of the eggs of *Tortrix viridana* L. (Lep., Tortricidae). I. The predator complex (Hym., Formicidae; Derm., Forficulidae; Orth., Phaneropteridae; Neur., Chrysopidae). *Agronomie*, 3(3): 239-246.

20. Dyer, L.A. 1995. Tasty generalists and nasty specialists? Antipredator mechanisms in tropical lepidopteran larvae. *Ecology*, 76(5): 1483-1496.
21. Erler, F. 2004. Natural enemies of the pear psylla *Cacopsylla pyri* in treated vs untreated pear orchards in Antalya, Turkey. *Phytoparasitica*, 32(3): 295-304.
22. Farooq-Ahmad, K. 2012. Development and growth of *Exochomus quadripustulatus* (Coleoptera: Coccinellidae): a predator of mussel scale *Lepidosaphes ulmi* (Homoptera: Diaspididae) on apple. *Pakistan Journal of Zoology*, 44(4): 1021-1028.
23. Fiedler, K. 2006. Ant-associates of Palaearctic lycaenid butterfly larvae (Hymenoptera: Formicidae; Lepidoptera: Lycaenidae) - a review. *Myrmecologische Nachrichten*, 9: 77-87.
24. Flora of China, 2004. Vol. 9, p. 46. Online Floras Database. http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=10776 (Data accessed: September 2016).
25. Google Earth, 2015. <http://www.earth.google.com> (Data accessed: March 2015).
26. Hawkes, O.A.M. 1920. Observations on the life-history, biology and genetics of the lady-bird beetle, *Adalia bipunctata* (Mulsant). *Proceedings of the Zoological Society of London*, 78: 475-490.
27. Helyer, N., Cattlin, N.D. & Brown, K.C. 2014. *Biological control in plant protection: a colour handbook*. 2nd edition, CRC Press, Boca Raton, 276 pp.
28. Hummer, K.E. & Janick, J. 2009. Rosaceae: taxonomy, economic importance, genomics. Pp. 1-17. In: Foltá, K.M. & Gardiner, S.E. (eds) *Genetics and Genomics of Rosaceae*. Springer, New York, 636 pp.
29. Hyeon, S.B., Isoe, S. & Sakan, T. 1968. The structure of neomatatobiol, the potent attractant for *Chrysopa* from *Actinidia polygama*. *Tetrahedron Letters*, 51: 5325-5326.
30. Ipertí, G. 1999. Biodiversity of predaceous Coccinellidae in relation to bioindication and economic importance. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 74(1-3): 323-342.
31. Karaman, M.G. 2010. New data of the genus *Crematogaster* Lund, 1831 (Hymenoptera: Formicidae) in Crna Gora (Montenegro), Part I: *Crematogaster scutellaris* group of species. *Turkish Journal of Entomology*, 34(4): 419-434.
32. Khan, M.R., Khan, M.R. & Hussein, M.Y. 2003. Cannibalism and interspecific predation in ladybird beetle *Coccinella septempunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae) in laboratory. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6(24): 2013-2016.
33. Kılıç, M. & Aykaç, M.K. 1989. Investigations on the pest management in peach orchards in the black sea region of Turkey. *Plant Protection Bulletin*, 29(3-4): 211-241.
34. Kılınçer, N. 1983. Ankara'da gül gal arıları (*Rhodites* spp.)'nin (Hym.: Cynipidae) üzerinde araştırmalar. *Plant Protection Bulletin*, 23(1): 1-11.
35. Koch, R.L. 2003. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science*, 3(32): 1-16.
36. Lindsey, J. 2005. Ecology of Commanster. Ecological Relationships Among More Than 6400 Species. <http://www.commanster.eu/commanster/Insects/Flies/SpFlies/Eupeodes.corollae.html> (Data accessed: September 2016).
37. Lodos, N., Önder, F., Pehlivan, E., Atalay, R., Erkin, E., Karsavuran, Y., Tezcan, S. & Aksoy, S. 1999. *Faunistic studies on Lygaeidae (Heteroptera) of Western Black Sea, Central Anatolia and Mediterranean Regions of Turkey*. Ege University, İzmir, 58 pp.
38. Lundgren, J.G. 2009. The Pollen Feeders. Relationships of Natural Enemies and Non-Prey Foods. Pp. 87-116. In: Lundgren J.G. (ed) *Relationships of natural enemies and non-prey foods*. Springer, The Netherlands, 453 pp.
39. Matocq, A., Pluot-Sigwalt, D. & Özgen, İ. 2014. Terrestrial Hemiptera (Heteroptera) collected in South-East Anatolia (Diyarbakır, Mardin and Elazığ Provinces) (Turkey): second list. *Munis Entomology & Zoology*, 9(2): 884-930.
40. McEwen, P., New, T.R. & Whittington, A.E. 2001. *Lacewings in the Crop Environment*. Cambridge University Press, Cambridge, 546 pp.
41. Mead, F.W. 2001. Big-eyed bugs (of Florida) - *Geocoris* spp. (Insecta: Hemiptera: Lygaeidae), University of Florida. http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures/beneficial/bigeyed_bugs.htm (Data accessed: September 2016).
42. Öztemiz, S. 2012. Mısırdá Biyolojik Mücadele. Pp. 155-188. In: Birişik, N. (ed). *Teoriden Pratiğe Biyolojik Mücadele*. Ministry of Food Agriculture and Livestock, General Directorate of Food and Control, Ankara, Turkey, 226 pp.
43. Pappas, M.L., Broufas, G.D. & Koveos, D.S. 2011. Chrysopid predators and their role in biological control. *Journal of Entomology*, 8(3): 301-326.
44. Paulian, M., Canard, M., Thierry, D. & Ciubuc, C. 2001. Survey of green lacewings in southern Transylvania, Romania, with some ecological notes (Neuroptera: Chrysopidae). *Journal of Neuropterology*, 3: 25-31.
45. Pehlivan, S. & Atakan, E. 2014. Syrphidae (Diptera) species of the Balcalı location in Adana province, Turkey. *Turkish Journal of Biological Control*, 5(1): 53-66.
46. Putra, N.S. & Yasuda, H. 2006. Effects of prey species and its density on larval performance of two species of hoverfly larvae, *Episyrphus balteatus* de Geer and *Eupeodes corollae* Fabricius (Diptera: Syrphidae). *Applied Entomology and Zoology*, 41(3): 389-397.
47. Radeghieri, P. 2004. *Cameraria ohridella* (Lepidoptera Gracillariidae) predation by *Crematogaster scutellaris* (Hymenoptera Formicidae) in Northern Italy (Preliminary note). *Bulletin of Insectology*, 57(1): 63-64.
48. Richard, F.J., Fabre, A & Dejean, A. 2001. Predatory behaviour in dominant arboreal ant species: the case of *Crematogaster* sp. (Hymenoptera Formicidae). *Journal of Insect Behavior*, 14(2): 271-282.
49. Schaefer, C.W. & Panizzi, A.R. 2000. *Heteroptera of Economic Importance*. CRC Press, Boca Raton, FL, 856 pp.

50. Schmitz, O., Hamback, P. & Beckerman, A. 2000. Trophic cascades in terrestrial systems: a review of the effects of carnivore removals on plants. *The American Naturalist*, 155(2): 141-153.
51. Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J. & Dicke, M. 2005. *Insect-Plant Biology*. 2nd edition, Oxford University Press, Oxford, 440 pp.
52. Snyder, W.E., Joseph, S.B., Preziosi, R.F., Moore, A.J. 2000. Nutritional benefits of cannibalism for the lady beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) when prey quality is poor. *Environmental Entomology*, 29(6): 1173-1179.
53. Soydanbay (Tunçyürek), M. 1978. The list of natural enemies agricultural crop pests in Turkey. Part II. *Plant Protection Bulletin*, 16 (1): 32-45.
54. Toft, S. & Wise, D.H. 1999. Growth, development, and survival of a generalist predator fed single-and mixed-species diets of different quality. *Oecologia*, 119(2): 191-197.
55. Torma, A. 2009. Data to the terrestrial Heteroptera fauna of Moldova. *Acta Scientiarum Transylvanica*, 17(1): 105-118.
56. Ulubilir, A. & Yabaş, C. 1995. Population fluctuations, natural enemies and chemical control possibilities of cotton white fly (*Bemisia tabaci* Genn.) on vegetables in Çukurova. *Plant Protection Bulletin*, 35(3-4): 191-210.
57. Ülgentürk, S. 2001. Ants (Hymenoptera: Formicidae) associated with soft scale insects in Turkey: a preliminary list. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 36(3-4): 405-409.
58. Ülgentürk, S., Kıran, K., Ayhan, B., Civelek, H.S. & Eskin, A. 2012. Ant species (Hymenoptera: Formicidae) associated with *Marchalina hellenica* Gennadius (Hemiptera: Marchalinidae) in Turkey. *Turkish Bulletin of Entomology*, 2(4): 263-270.
59. van Emden, H.F. & Harrington, R. 2007. *Aphids as Crop Pests*. CABI, Cambridge, 800 pp.
60. Vanhaelen, N., Gaspar, C. & Francis, F. 2002. Influence of prey host plant on a generalist aphidophagous predator: *Episyrphus balteatus* (Diptera: Syrphidae). *European Journal of Entomology*, 99(4): 561-564.
61. Wagner, J.D., Glover, M.D., Mosely, J.B. & Moore, A.J. 1999. Heritability and fitness consequences of cannibalism in *Harmonia axyridis*. *Evolutionary Ecology Research*, 1: 375-388.
62. Ware, R.L., Yguel, B. & Majerus, M.E.N. 2009. Effects of competition, cannibalism and intra-guild predation on larval development of the European coccinellid *Adalia bipunctata* and the invasive species *Harmonia axyridis*. *Ecological Entomology*, 34(1): 12-19.
63. Weissbecker, B., Van Loon, J.J.A & Dicke, M. 1999. Electroantennogram responses of a predator, *Perillus bioculatus*, and its prey, *Leptinotarsa decemlineata*, to plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 25(10): 2313-2325.
64. Yurtsever, S. 2001. A preliminary study on the ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae) of Edirne in north-western Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 25: 71-75.
65. Zeki, C. & Kılınçer, N. 1990. Investigations on the development of *Episyrphus balteatus* (De Geer) (Diptera, Syrphidae) on different aphid species. Proceeding of the Second Turkish National Congress of Biological Control, 26-29 September, Ankara-Turkey, 137-145.

KONTAKT LENS SOLÜSYONLARININ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERE KARŞI ETKİSİ

Miray ÜSTÜNTÜRK-ONAN

İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
e-mail: ustunrk@istanbul.edu.tr

Alınış (Received): 07 Haziran 2017, Kabul (Accepted): 22 Kasım 2017, Erken Görünüm (Online First): 27 Kasım 2017, Basım (Published): 15 Aralık 2017

Özet: Bu çalışmada, son yıllarda piyasada satışa sunulan iki adet çok amaçlı kontakt lens dezenfektan solüsyonunun klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* Rosenbach ve *Pseudomonas aeruginosa* Gessard bakterilerine karşı etkinliği araştırılmıştır. Çok amaçlı kontakt lens dezenfektan solüsyonlarının antibakteriyal etkinlikleri ISO 14729'da belirtilen kültüre dayalı mikrobiyolojik yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Üretici tarafından önerilen minimum dezenfeksiyon sürelerine ek olarak belirlenen örnekleme saatlerindeki bakteri sayıları tespit edilmiş ve ortalama log düşüşleri hesaplanmıştır. Çalışmada antibakteriyal etkinlikleri test edilen bu kontakt lens dezenfektan solüsyonlarının 3 farklı lotu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, her iki kontakt lens dezenfektan solüsyonunun üretici tarafından önerilen minimum dezenfeksiyon süresi sonunda denenen bakterilerin sayılarında en az 3 log düşüş sağladığını göstermiştir. Kontakt lens solüsyon endüstrisinde gelişen teknolojiler ve yapılan bilimsel çalışmalar ile yeni formülasyonlar geliştirilmektedir. Piyasada satışa sunulan bu yeni ürünlerin antibakteriyal aktivitelerinin tam olarak anlaşılabilmesi için farklı kaynaklardan izole edilen suşların kullanılacağı ileriki çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Dezenfeksiyon, kontakt lens solüsyonları, bakteri, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Efficacy of Contact Lens Solutions Against Bacteria Isolated from Clinical Specimens

Abstract: In this study, the efficacy of two recently marketed multipurpose contact lens disinfecting solutions against *Staphylococcus aureus* Rosenbach and *Pseudomonas aeruginosa* Gessard bacteria isolated from clinical specimens were investigated. The antibacterial activities of multipurpose contact lens disinfecting solutions were determined by microbiological culture method described in ISO 14729 guidelines. Bacterial counts were obtained for sampling intervals determined in addition to the manufacturer's minimum recommended disinfection time and mean log reductions were calculated for each interval. Three different lots of each contact lens disinfecting solutions were used. The results showed that both contact lens disinfecting solutions provided at least 3 log reductions for all bacteria tested at the end of the manufacturer's minimum recommended disinfection time. New formulations are being developed in contact lens disinfecting solution industry by new technologies and scientific researches. Further studies on strains isolated from different sources are needed in order to a complete understanding of these newly marketed contact lens solutions.

Key words: Disinfection, contact lens solutions, bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Giriş

Günümüzde, kontakt lenslerin yaygın olarak kullanılmaya başlanması ile birlikte çeşitli göz enfeksiyonlarının sayısında da artış meydana gelmiştir. Kontakt lens kullanımına bağlı meydana gelen enfeksiyonlara sebep olan mikroorganizmaların başında *Staphylococcus aureus* Rosenbach ve *Pseudomonas aeruginosa* Gessard gibi fırsatçı patojen bakteriler gelmektedir. Piyasada satılan ve kontakt lens kullanıcılarına sunulan dezenfektan solüsyonların, kontakt lensleri hijyenik bir ortamda tutarak kişileri bu enfeksiyonlara karşı korumaları gerekmektedir (Kuzman ve ark. 2008). Bu nedenle bu solüsyonlar kontakt lens yüzeyinde ve lens saklama kaplarında potansiyel patojen mikroorganizmaların üremelerini engellemelidirler (Kilvington 2000). Ancak geçmişte yapılan pek çok

çalışmada, kontakt lens kullanan kişilerin dezenfektan solüsyonlar kullanmalarına rağmen bu kişilere ait lens kaplarında mikrobiyal kontaminasyonun varlığı gösterilmiştir (Larkin ve ark. 1990, Devonshire ve ark. 1993, Gray ve ark. 1995, Yung ve ark. 2007, Üstüntürk ve Zeybek 2012).

Etkili olmayan kontakt lens solüsyonlarının kullanımı kontakt lens kullanımına bağlı enfeksiyonların risk faktörleri arasında sayılmaktadır. Uluslararası Standartlar Teşkilâtı (ISO) tarafından yayınlanan ISO 14729 standardında kontakt lens solüsyonlarının antibakteriyal ve antifungal aktivitelerinin test edilmesi için gerekli mikrobiyolojik test yöntemleri detaylı olarak anlatılmaktadır (ISO 14729 2001). Standart ve çevresel

mikroorganizmaların dezenfektanlara karşı duyarlılıkları farklılık gösterebildiğinden, bu solüsyonların etkinliklerinin sadece referans mikroorganizmalar kullanılarak değil aynı zamanda çevresel ve klinik suşlar da kullanılarak test edilmesi son derece önemlidir.

Bu bağlamda bu çalışmada, ülkemizde son yıllarda satışa sunulan iki adet çok amaçlı kontakt lens dezenfektan solüsyonunun (KLDS) hasta numunelerinden izole edilen *S. aureus* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı antibakteriyal aktiviteleri ISO 14729 standardında belirtilen “bağımsız test” prosedürüne göre araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Test solüsyonları

Bu çalışmada, piyasada son yıllarda satışa sunulan KLDS A (Alcon Laboratories Inc., Fort Worth, TX, ABD) ve KLDS B (Bausch&Lomb, Greenville, SC, ABD) çok amaçlı kontakt lens solüsyonlarının antibakteriyal etkinlikleri test edilmiştir. Bu solüsyonların üretici tarafından önerilen minimum dezenfeksiyon süreleri KLDS A için 6 saat, KLDS B için 4 saat olarak belirtilmiştir. Çalışmada bu kontakt lens solüsyonlarının 3 farklı lotu kullanılmıştır.

KLDS A özel olarak tasarlanmış bir nemlendirici ajan içermektedir. HydraGlyde™ Moisture Matrix olarak adlandırılan bu ajan (polioksietilen-polioksibutilen), silikon hidrojel lensleri nemlendirmeye ve kayganlaştırmaya yönelik geliştirilmiş tescilli çok işlevli blok kopolimerdir. KLDS A %0,001 POLYQUAD® (polikuaterniyum-1) ve %0,0006 ALDOX® (miristamidopropil dimetilamin) olmak üzere çift yönlü bir dezenfeksiyon sistemi içermektedir (Corbin ve ark. 2012).

Piyasaya yeni çıkan diğer bir ürün olan KLDS B gözde doğal olarak bulunan ve kayganlaştırıcı bir madde olan hiyaluranın tuz formu olan sodyum hiyaluronat içermektedir. Sürfaktan olarak “sulfobetain” içermektedir. Solüsyonun içerik dengesi lizozim gibi gözyaşı proteinlerinin doğal antimikrobiyal fonksiyonunu korumasına yardımcı olmak için tasarlanmıştır. KLDS B %0,0001 polikuaterniyum ve %0,00013 poliaminopropil biguanid olmak üzere çift yönlü bir dezenfeksiyon sistemi içermektedir (Reindel ve ark. 2010).

Kullanılan bakteriler

Deneylerde kullanılan ve hasta numunelerinden (abse ve balgam) izole edilen *S. aureus* (1 adet) ve *P. aeruginosa* (2 adet) suşları İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi’nden temin edilmiştir. Gliserinli tampon çözelti içerisinde -86°C’de saklanmakta olan bu bakteriler önce oda sıcaklığına getirilmiş, daha sonra tripton soy agar (TSA) besiyerine ekilerek 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda Dulbecco’nun fosfat tampon solüsyonu (DPBS) kullanılarak hücre sayıları McFarland 0,5 standart bulanıklık tüpüne göre 1×10^8 hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Aynı süspansiyondaki bakterilerin sayıları spektrofotometrik olarak 660nm dalga boyunda optik densite 0,1 olacak şekilde ayarlanarak kontrol edilmiştir (ISO 14729 2001,

Manuj ve ark. 2006, Zhu ve ark. 2007). Deneylerde kullanılan bakterilerin 5 kereden fazla pasajları yapılmamıştır.

Prosedür

Kontakt lens solüsyonlarının antibakteriyal etkisini araştırmak amacıyla ISO 14729’da belirtilen “bağımsız test” prosedürü kullanılmıştır (ISO 14729 2001). Kısaca, DPBS içerisinde hazırlanan her bir bakteri süspansiyonundan (1×10^8 hücre/ml) 0,1ml alınarak içerisinde 9,9ml kontakt lens solüsyonu bulunan tüplere aktarılmıştır. Tüpler, her kontakt lens solüsyonu için üreticinin önerdiği minimum dezenfeksiyon sürelerinin %0, %25, %50, %75 ve %100’ü boyunca oda sıcaklığında dezenfeksiyona bırakılmıştır (KLDS A için 0, 1,5, 3, 4,5 ve 6 saat; KLDS B için 0, 1, 2, 3 ve 4 saat).

Her bir örnekleme süresinin sonunda tüpler vortekslenmiş ve içlerinden 1ml alınarak içerisinde 9ml Dey-Engley Neutralizing broth (DE) bulunan tüplere aktarılmıştır (1:10). Tüpler kontakt lens solüsyonunun nötralizasyonu için 15dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra içerisinde 9ml DE bulunan tüpler kullanılarak seri sulandırılmalar yapılmıştır (1:100, 1:1000). Daha sonra her sulandırılma tüpünden 100µl alınarak TSA besiyerlerine 3 tekrarlı olmak üzere yayma yöntemiyle ekimler yapılmıştır. Ekim yapılan petri kutuları 37°C’de inkübe edilmiş, üreyen bakterilerin sayıları 24. ve 48. saatlerde kaydedilmiş ve daha sonra ortalama logaritmik düşüşleri hesaplanmıştır. Çalışmada her iki kontakt lens solüsyonunun 3 farklı lotu aynı anda çalışılmıştır. Negatif kontrol olarak DPBS kullanılmıştır.

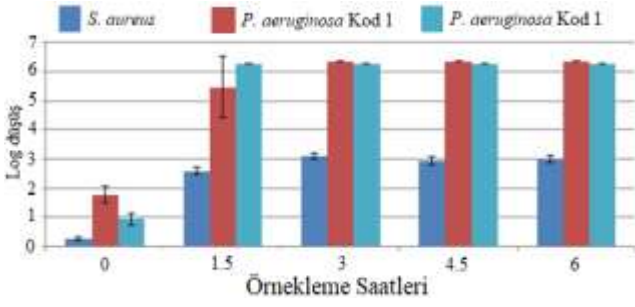
İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) programı ile eşleştirilmiş örneklerde t testi kullanılmıştır. P değerinin 0,05’in altında olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

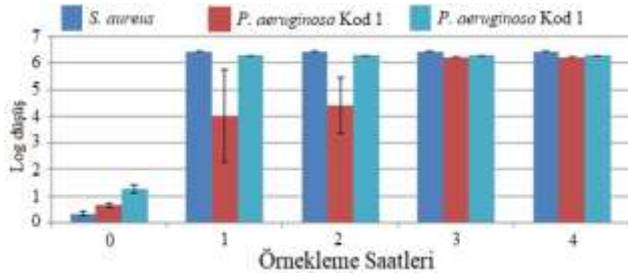
Bulgular

KLDS A’nın 6 saatlik temas süresi boyunca denenen bakteri suşlarının sayılarında meydana getirdiği log düşüşler Şekil 1’de gösterilmiştir. Bu solüsyonun 6 saat sonunda, *S. aureus* sayısında 3 log, *P. aeruginosa* kod 1 sayısında 6,36 log ve *P. aeruginosa* kod 2 sayısında 6,28 log düşüş sağladığı tespit edilmiştir. Üretici tarafından önerilen minimum dezenfeksiyon süresi sonunda KLDS A’ya maruz kalan denenen tüm bakterilerin sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu tespit edilmiştir (p<0,01).

KLDS B’nin 4 saatlik temas süresi boyunca denenen bakteri suşlarının sayılarında meydana getirdiği log düşüşler Şekil 2’de gösterilmiştir. Bu solüsyonun 4 saat sonunda, *S. aureus* sayısında 6,43 log, *P. aeruginosa* kod 1 sayısında 6,21 log ve *P. aeruginosa* kod 2 sayısında 6,29 log düşüş sağladığı tespit edilmiştir. Üretici tarafından önerilen minimum dezenfeksiyon süresi sonunda KLDS B’ye maruz kalan denenen tüm bakterilerin sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu tespit edilmiştir (p<0,01).



Şekil 1. KLDS A'nın klinik bakteriler üzerine etkisi



Şekil 2. KLDS B'nin klinik bakteriler üzerine etkisi

Sonuçlar ve Tartışma

Çok amaçlı dezenfektan solüsyonlar kontakt lenslerin ve kontakt lens saklama kaplarının hijyeninden sorumludurlar. Kontakt lens teknolojisindeki gelişmeler ışığında üretici firmalar, etkinliği artırılmış yeni kontakt lens bakım ürünleri geliştirmişlerdir. Bunlardan en yenileri bu çalışmada kullanılan Alcon'nun ürettiği KLDS A ve Bausch&Lomb'un ürettiği KLDS B adlı çok amaçlı dezenfektan solüsyonlardır. Bu iki üründe de aktif bileşenlerin konsantrasyonları artırılmış, ayrıca farklı aktif bileşenler, örneğin POLYQUAD® bir diğer aktif bileşen olan biguanid veya amidoamin ile bir arada kullanılarak solüsyonların dezenfeksiyon kapasitesinin artırılması hedeflenmiştir.

Çok amaçlı dezenfektan solüsyonlarının antibakteriyal aktivitelerinin araştırıldığı bu çalışmada, en yeni çok amaçlı dezenfektan solüsyonlardan olan KLDS A, 1,5 saatlik temas süresi sonunda *P. aeruginosa* kod 2, 3 saatlik temas süresi sonunda *P. aeruginosa* kod 1 suşlarını tamamen öldürmüştür. Bu solüsyon *S. aureus* suşunun sayısında ise maksimum azalmayı (3,09 log) 3 saatlik temas süresi sonunda göstermiştir (Şekil 1). Elde edilen bu verilere göre KLDS A'nın, ISO 14729'da belirtilen birincil kriteri sağladığı tespit edilmiştir. Bu solüsyonun etkinliği standart ve çevresel *S. aureus* ve *P. aeruginosa* suşları üzerine de denenmiş ve bu bakterilerin sayılarında da en az 3 log düşüşe neden olduğu saptanmıştır (Üstüntürk 2014, Üstüntürk ve Zeybek, 2014). Kern ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada da, KLDS A'nın standart ve klinik *S. aureus* ve *P. aeruginosa* suşlarının sayılarında üretici tarafından önerilen minimum dezenfeksiyon süresi sonunda en az 4 log düşüş sağladığı rapor edilmiştir. Bu çalışmaya benzer

sonuçların elde edildiği diğer bir çalışma ise Abjani ve ark. (2017) tarafından gerçekleştirilmiş ve KLDS A'nın üretici tarafından önerilen minimum dezenfeksiyon süresi sonunda klinik *S. aureus* ve *P. aeruginosa* suşlarını tamamen öldürdüğü rapor edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan diğer en yeni çok amaçlı dezenfektan solüsyonlardan olan KLDS B, 1 saatlik temas süresi sonunda *S. aureus* ve *P. aeruginosa* kod 2, 3 saatlik temas süresi sonunda ise *P. aeruginosa* kod 1 suşlarını tamamen öldürmüştür (Şekil 2). Elde edilen bu verilere göre KLDS B'nin, denenen bakterilerin sayılarını üretici tarafından önerilen minimum dezenfeksiyon süresinden de önce (4 saat) en az 3 log düşürerek ISO 14729'da belirtilen birincil kriteri sağladığı tespit edilmiştir. Bu solüsyonun etkinliği standart ve çevresel *S. aureus* ve *P. aeruginosa* suşları üzerine de denenmiş ve *S. aureus* ATCC 6538 (1,38 log düşüş) hariç diğer bakterilerin sayılarında da en az 3 log düşüş sağladığı saptanmıştır (Üstüntürk 2014, Üstüntürk ve Zeybek, 2014). Lapple (2011) tarafından, KLDS B'nin *S. aureus* ve *P. aeruginosa* suşlarının sayılarında üretici tarafından önerilen minimum dezenfeksiyon süresi (4 saat) sonunda en az 4 log düşüş sağladığı rapor edilmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda antibakteriyal aktivitesi test edilen her iki KLDS'inde denenen bakterilere karşı antibakteriyal aktivitelerinin oldukça etkili olmasının sebebinin bu solüsyonların aktif bileşenlerinin konsantrasyonlarının artırılmış olması ve piyasada bulunan diğer KLDS'lerden farklı olarak birden fazla aktif bileşen içermeleri olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte bu çalışma ve yapılan diğer sınırlı sayıda çalışmaları göstermektedir ki KLDS A ve KLDS B'nin antibakteriyal aktiviteleri standart, çevresel ve klinik kökenli bakterilere karşı değişkenlik göstermektedir. Özellikle bu çalışmada KLDS A'nın *S. aureus* suşuna karşı ISO 14729'da belirtilen en az 3 log düşüş kriterini sağlamış olmasına rağmen (bağımsız test birincil kriter), bu azalma 3 log sınırında kaldığından ötürü dikkat çekici bulunmuştur.

Kontakt lens dezenfektan solüsyon endüstrisinde yeni formülasyonlar, gelişen teknolojiler ve yapılan bilimsel çalışmalar ile paralel olarak geliştirildiği için ve piyasaya çıkan yeni ürünlerle ilgili sınırlı sayıda bilimsel çalışma bulunduğundan, böyle ürünlerin antibakteriyal aktivitelerinin tam olarak anlaşılabilmesi için farklı kaynaklardan izole edilen daha fazla sayıda suşların kullanılacağı ileriki çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen veriler, ISO standardının güncelleştirilmesine ve en etkili dezenfektan formülünün ortaya çıkartılmasına katkı sağlayacağı kanaatindeyim.

Teşekkür

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: FHZ-2016-22131.

Kaynaklar

1. Abjani, F., Khan, N.A., Jung, S.Y. & Siddiqui, R. 2017. Status of the effectiveness of contact lens disinfectants in Malaysia against keratitis-causing pathogens. *Experimental Parasitology*. doi: 10.1016/j.exppara.2017.09.007.
2. Corbin, G.S., Kading, D.L., Powell, S.M., Rosenblatt, B.D., Secor, G.B., Maissa, C.A. & Garofalo, R.J. 2012. Clinical evaluation of a new multi-purpose disinfecting solution in symptomatic wearers of silicone hydrogel contact lenses. *Clinical Optometry*, 4: 13-24.
3. Devonshire, P., Munro, F.A., Abernethy, C. & Clark, B.J. 1993. Microbial contamination of contact lens cases in the west of Scotland. *British Journal of Ophthalmology*, 77: 41-45.
4. Gray, T.B., Cursons, R.T.M, Sherwan, J.F. & Rose, P.R. 1995. *Acanthamoeba*, bacterial, and fungal contamination of contact lens storage cases. *British Journal of Ophthalmology*, 79: 601-605.
5. International Organization for Standardization ISO/14729. 2001. Ophthalmic optics-Contact lens care products-Microbiological requirements and test methods for products and regimens for hygienic management of contact lenses.
6. Kern, J.R., Kappell, G., Callan, M., McNamee, L., McAnally, C., Walters, R. & Borazjani, R.N. 2011. Antimicrobial properties of a novel contact lens disinfecting solution, OPTI-FREE EverMoist. *Contact Lens and Anterior Eye*, 34: S30.
7. Kilvington, S. 2000. Through a glass darkly: contact lenses and personal hygiene. *Microbiology Today*, 27: 66-69.
8. Kuzman, T., Pokupec, R., Kalauz, M., Juri, J., Bujger, Z. & Presecki, A. 2008. A comparative study of antibacterial and antifungal efficacy of soft contact lens disinfecting solutions. *Acta Clinica Croatica*, 47: 43-48.
9. Lapple, W.J. 2011. The multi-purpose disinfecting solution (MPDS) with unsurpassed disinfection – an easy recommendation for all soft lenses. <http://solution.biotrue.com/Portals/64/PDF/Lapple.pdf> (Erişim tarihi: Şubat 2013).
10. Larkin, D.F.P., Kilvington, S. & Easty, D.L. 1990. Contamination of contact lens storage cases by *Acanthamoeba* and bacteria. *British Journal of Ophthalmology*, 74: 133-135.
11. Manuj, K., Gunderson, C., Troupe, J. & Huber, M.E. 2006. Efficacy of contact lens disinfecting solutions against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Eye and Contact Lens*, 32: 216-218.
12. Reindel, W., Cairns, G. & Merchea, M. 2010. Assessment of patient and practitioner satisfaction with Biotrue™ multi-purpose solution for contact lenses. *Contact Lens and Anterior Eye*, 33S:12-17.
13. Üstüntürk, M. 2014. Kontakt Lens Dezenfektan Solüsyonlarının Antimikrobiyal Etkinliklerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Doktora Tezi.
14. Üstüntürk, M. & Zeybek, Z. 2012. Microbial contamination of contact lens storage cases and domestic tap water of contact lens wearers. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 124: 17-22.
15. Üstüntürk M. & Zeybek Z. 2014. Çeşitli kontakt lens dezenfektan solüsyonlarının standart ve çevresel bakteriler üzerine etkileri. 22.Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran, Eskişehir, 1502.
16. Yung, M.S., Boost, M., Cho, P. & Yap, M. 2007. Microbial contamination of contact lenses and lens care accessories of soft contact lens wearers (university students) in Hong Kong. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 27: 11-21.
17. Zhu, H., Ding, A., Bandara, M., Willcox, M.D.P. & Stapleton, F. 2007. Broad spectrum of antibacterial activity of a new multipurpose disinfectant solution. *Eye and Contact Lens*, 33: 278-283.

A STUDY ON THE GENUS *Sphaeridium* FABRICUS, 1775 (COLEOPTERA: HYDROPHILIDAE) IN KÜTAHYA PROVINCE, WESTERN TURKEY

Yakup ŞENYÜZ^{1*}, Mustafa Cemal DARILMAZ², Kemal DİNDAR¹

¹ Dumlupınar University, Faculty of Art and Science, Department of Biology, Kütahya.

² Aksaray University, Faculty of Arts and Science, Department of Biology, Aksaray.

*Corresponding author: e-mail: yakupsenyuz@gmail.com

Received (Alınış): 19 Sept 2017, Accepted (Kabul): 27 Nov 2017, Online First (Erken Görünüm): 29 Nov 2017, Published (Basım): 15 Dec 2017

Abstract: Coprophilous Hydrophilidae were sampled from June 2010 to May 2011 using baited pitfall traps in 14 localities at different altitudes (469m-1810m) in Kütahya, western Turkey. As a result of the study, a total of 668 samples belonging to 5 species were identified. The identified specimens are *Sphaeridium bipustulatum* Fabricius, 1781, *S. lunatum* Fabricius, 1792, *S. marginatum* Fabricius, 1787, *S. scarabaeoides* (Linnaeus, 1758) and *S. substriatum* Faldermann, 1838, among which *S. lunatum* is recorded from Turkey for the first time. *S. bipustulatum* and *S. marginatum*, which made up 80.69% of all collected beetles determined as eudominant. The highest number of specimens was obtained from December to April meaning that the *Sphaeridium* community in the study area reached its highest number in winter and spring.

Key words: Coleoptera, Hydrophilidae, *Sphaeridium*, coprophilous, new records, seasonal dynamics.

Türkiye'nin Batısında, Kütahya İlinde *Sphaeridium* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Hydrophilidae) Cinsi Üzerine Bir Çalışma

Özet: Türkiye batısında Kütahya'da, Haziran 2010'dan Mayıs 2011'e kadar, 14 lokalitede ve farklı yüksekliklerde (469m-1810m) yemli çukur tuzaklar kullanılarak koprofil Hydrophilidae örnekleri toplanmıştır. Çalışma sonucunda toplam 5 türe ait 668 örnek tespit edilmiştir. Toplanan örneklerin *Sphaeridium bipustulatum* Fabricius, 1781, *S. lunatum* Fabricius, 1792, *S. marginatum* Fabricius, 1787, *S. scarabaeoides* (Linnaeus, 1758) ve *S. substriatum* Faldermann, 1838 türlerine ait oldukları belirlenmiştir. *S. lunatum* Türkiye'den ilk kez kayıt edilmiştir. Toplanan böceklerin %80,69'unu oluşturan *S. bipustulatum* ve *S. marginatum* en baskın türler olarak belirlenmiştir. Aralık ayından Nisan ayına kadar yoğun örnek elde edilmiş olması, çalışma alanı içerisindeki *Sphaeridium* popülasyonlarının kış ve ilkbahar döneminde en yüksek birey sayılarına ulaştığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Coleoptera, Hydrophilidae, *Sphaeridium*, koprofil, yeni kayıtlar, mevsimsel aktivite.

Introduction

Members of the family Hydrophilidae are mostly represented with an aquatic lifestyle but a third of all known species of the family are terrestrial scavengers. The colonization of terrestrial habitats occurred secondarily multiple times and terrestrial taxa are therefore found in five of six existing subfamilies although the vast majority of terrestrial taxa belong to a single subfamily Sphaeridiinae (Short & Fikáček 2013) which currently contains nearly 1,000 described species (Hansen 1999, Short & Hebauer 2006, Short & Fikáček 2011). Sphaeridiinae members are terrestrial organisms living in various kinds of decaying organic matter. In northern temperate zones, most of the species within this subfamily are coprophagous and colonize animal droppings in early stages of decomposition (Fikáček 2010). Unlike most aquatic hydrophilids whose life cycles are known, several terrestrial species apparently have two generations per year (Hansen 1987).

The community structures and seasonal dynamics of coprophagous hydrophilid beetles have been reported so far for beetles from various regions of the world (Hanski 1980a, Koskela & Hanski 1977, Przewoźny & Bajerlein 2010, Ślachta *et al.* 2010, Ślachta 2013, Mroczyński & Radoslav 2014, Wassmer 2014) but studies in Turkey on the same subject was performed only in western parts of the country (Anlaş *et al.* 2008, Anlaş 2011).

The known members of terrestrial Hydrophilidae in Turkey belong to 19 species classified within four genera: *Cercyon* Leach (13 spp.), *Cryptopleurum* Mulsant (1 sp.), *Megasternum* Mulsant (1 sp.) and *Sphaeridium* Fabricius (4 spp.) (Darılmaz & İncekara 2011). Terrestrial species were generally not included in studies concerning Turkish Hydrophilidae since most of them focused mainly on aquatic hydrophilid beetles. The main purpose of this study is to analyse community structure and seasonal

dynamics of coprophagous hydrophilid beetles in Kütahya province.

Materials and Methods

Study Area

Kütahya province is situated between 38°70'-39°80'N and 29°00'-30°30'E in the interior western Anatolian part of Aegean Region of Turkey. The geographical layout of the study area and the sampled localities are given in Fig.1.

Locality 1: The sampled area is located along a river, thus shows characteristics of a riparian habitat. The traps in this locality were set up in a plantation of *Pinus brutia* Ten, *Fraxinus* sp., *Onopordum* sp., *Verbascum* sp., *Mentha* sp., *Juncus* sp. and *Epilobium* sp.

Locality 2: *Alcea* sp., *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe, *Paliurus spina-christi* P. Mill. and *Rubus* sp. The locality is characterized by a mix forest with a neighboring open area.

Locality 3: *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe, *Rubus* sp. and *Salix* sp. Near the forest.

Locality 4: *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe and *Quercus* sp. Mix forest.

Locality 5: *Quercus* sp., Open area and grassland.

Locality 6, 7, 8, 9: *Juniperus* sp., *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe, *Quercus* sp. Mix forest.

Locality 10: *Juniperus* sp., *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe. Mix forest.

Locality 11: *Cedrus libani* A. Rich., *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe, *Quercus* sp., *Verbascum* sp. and *Rosa* sp. Mix forest.

Locality 12: *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe, *Verbascum* sp., *Juniperus* sp. and *Astragalus* sp. Open area near a mix forest. Grassland.

Locality 13: *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe, *Verbascum* sp., and *Populus* sp. Open area near a mix forest.

Locality 14: Near the military radar of Kütahya. *Acantholimon* sp., *Verbascum* sp., *Astragalus* sp. Grassland.

Sampling Method

Samplings were performed from June 2010 to May 2011 in 14 different localities within the study area with altitudes ranging from 469m to 1810m. Altitudes and geographic coordinates of the sampling localities are given in Table 1. A single sampling station was chosen for each locality and samplings were performed in a manner to keep an average of 100m altitude increase from one to another locality (Table 1). All specimens were collected by using baited pitfall traps with 1,000gr of fresh cow dung. The trap consisted of a plastic bucket (20cm in height and 25cm in diameter) buried in the soil with its rim at ground level. The upper part of the trap was filled with fresh dung placed on a wire mesh. Water, liquid detergent and 4% formaldehyde was used as the preserving fluid. Traps were placed in the field for 3 days (72 hours) each month from June 2010 to May 2011.



Fig. 1. The sampled localities in study area. Each number represents a single locality.

Table 1. Coordinates and altitudes of the localities.

Loc. No	Localities	Latitude	Longitude	Altitude (m)
1		39°29.572'	29°11.088'	469
2	Kütahya-Tavşanlı-Balıköy	39°29.353'	29°13.939'	560
3		39°30.472'	29°18.765'	666
4		39°31.055'	29°20.836'	790
5		Kütahya-Tavşanlı-Kayı Village	39°31.794'	29°35.168'
6		39°23.032'	30°02.547'	988
7	Kütahya-Siner Village	39°21.974'	30°02.164'	1090
8		39°21.831'	30°01.308'	1190
9		39°21.624'	30°00.567'	1290
10		39°24.946'	29°55.268'	1391
11		39°24.838'	29°54.722'	1478
12	Kütahya-Aydoğdu Village	39°24.592'	29°53.987'	1582
13		39°24.334'	29°53.040'	1688
14		39°24.348'	29°52.506'	1810

Hansen (1987) was used to identify the species. The taxonomic characters including size of the beetle, posterior margin of pronotum, apical elytral spots, subhumeral spots, colour of the pronotum and meso- and metafemora were used to identify the species. Aedeagus were dissected out under a stereo microscope (Zeiss Stemi 2000) and kept in 10% KOH solution for 1-2h. Voucher specimens are deposited in entomology museum of the Biology Department at Dumlupınar University.

The following equation (1) was used as a measure of dominance (D) which, according to Tischler (1977), describes the relative abundance of a species within a community.

$$D = \frac{b}{a \cdot 100} \quad (1)$$

where “b” represents number of individuals of a particular species and “a” represents number of total individuals.

The Dominance scale (given below) according to Engelmann (1978) was used.

6 (eudominant)	> 32.0 ≤ 100%
5 (dominant)	> 10.0 ≤ 32.0%
4 (subdominant)	> 3.2 ≤ 10.0%
3 (recedent)	> 1.0 ≤ 3.2%
2 (subrecedent)	> 0.32 ≤ 1.0%
1 (sporadic)	≤ 0.32%
0 (missing)	= 0%

Results

The evaluation of the collected material showed that a total of 668 specimens belonging to five species were sampled. The species were identified as *Sphaeridium bipustulatum*, *S. lunatum*, *S. marginatum*, *S. scarabaeoides* and *S. substriatum*. Among them which *S. lunatum* (Fig. 2) is recorded from Turkey for the first time.

The details of the material collected were given below. Each species determined during the study was given with

the sampled localities and sampling numbers. The distributional ranges of each species in the Palaearctic Region were also given in addition to their Turkey distributions.

Family HYDROPHILIDAE Latreille

Subfamily Sphaeridiinae Latreille

Tribus Sphaeridiini Latreille

Genus *Sphaeridium* Fabricus

Sphaeridium bipustulatum Fabricius, 1781

Material examined: **1:** 15-18.VI.2010, 4 exs.; 15-18.VII.2010, 12 exs.; 15-18.VIII.2010, 27 exs.; 15-18.IX.2010, 9 exs.; 16-19.X.2010, 1 ex.; 18-21.V.2011, 10 exs.; **2:** 15-18.VI.2010, 13 exs.; 15-18.VII.2010, 5 exs.; 15-18.IX.2010, 6 exs.; 18-21.V.2011, 18 exs.; **3:** 15-18.VIII.2010, 1 ex.; 15-18.IX.2010, 30 exs.; 16-19.X.2010, 1 ex.; 15-18.XI.2010, 1 ex.; 18-21.V.2011, 9 exs.; **4:** 15-18.VI.2010, 2 exs.; 15-18.VII.2010, 1 ex.; 15-18.VIII.2010, 29 exs.; 15-18.IX.2010, 6 exs.; 16-19.X.2010, 6 exs.; 15-18.XI.2010, 6 exs.; 18-21.V.2011, 9 exs.; **5:** 15-18.VII.2010, 6 exs.; 15-18.VIII.2010, 2 exs.; 15-18.IX.2010, 5 exs.; 16-19.X.2010, 1 ex.; 18-21.V.2011, 4 exs.; **6:** 15-18.VIII.2010, 1 ex.; 15-18.IX.2010, 2 exs.; 18-21.V.2011, 3 exs.; **7:** 15-18.VII.2010, 2 exs.; 15-18.IX.2010, 1 ex.; 18-21.V.2011, 1 ex.; **8:** 15-18.IX.2010, 1 ex.; **9:** 15-18.VII.2010, 3 exs.; 15-18.VIII.2010, 2 exs.; 15-18.IX.2010, 1 ex.; 18-21.V.2011, 1 ex.; **10:** 15-18.VII.2010, 7 exs.; 15-18.VIII.2010, 4 exs.; 15-18.IX.2010, 1 ex.; **11:** 15-18.VI.2010, 1 ex.; 15-18.VIII.2010, 1 ex.; **13:** 15-18.VIII.2010, 2 exs.; 18-21.V.2011, 3 exs.; **14:** 15-18.VIII.2010, 4 exs.; 18-21.V.2011, 1 ex.; leg. and det. Şenyüz Y.

Records in Turkey: Afyon, İçel and İzmir (Darılmaz & İncekara 2011).

Distribution in World: Europe: Armenia, Austria, Azores, Belgium, Bosnia Herzegovina, Bulgaria, Belarus,

Croatia, Russia, *Central European Territory*, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France (incl. Corsica, Monaco), Great Britain (incl. Channel Islands), Germany, Hungary, Italy (incl. Sardinia, Sicily, San Marino), Latvia, Lithuania, Macedonia, Moldavia, The Netherlands, Norway, Russia, *North European Territory*, Poland, Portugal, Slovakia, Slovenia, Spain (incl. Gibraltar), Russia, *South European Territory*, Sweden, Switzerland, Ukraine, Serbia and Montenegro, **North Africa:** Algeria, Canary Islands, Egypt, Tunisia, **Asia:** Afghanistan, Russia: East Siberia, Israel, Kazakhstan, Mongolia, Tajikistan, Turkey, Russia: West Siberia, **America:** North of Mexico (Fikáček et al. 2015).



Fig. 2. Dorsal habitus of *S. lunatum*.

Sphaeridium lunatum Fabricius, 1792

Material examined: **1:** 15-18.VI.2010, 1 ex.; 15-18.VII.2010, 1 ex.; 18-21.V.2011, 3 exs.; **2:** 15-18.VI.2010, 1 ex.; 18-21.V.2011, 3 exs.; **3:** 18-21.V.2011, 1 ex.; **4:** 15-18.VIII.2010, 2 exs.; 18-21.V.2011, 2 exs.; **9:** 15-18.VII.2010, 1 ex.; **10:** 15-18.VI.2010, 1 ex.; **11:** 15-18.VII.2010, 4 exs.; 15-18.IX.2010, 2 exs.; 18-21.V.2011, 1 ex.; **12:** 15-18.VI.2010, 1 ex.; leg. and det. Şenyüz Y.

Records in Turkey: This species was recorded for the first time for Turkish fauna.

Distributuon in World: Europe: Armenia, Austria, Belgium, Bulgaria, Belarus, Croatia, Russia, *Central European Territory*, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France (incl. Corsica, Monaco), Great Britain

(incl. Channel Islands), Germany, Ireland, Italy (incl. Sardinia, Sicily, San Marino), Latvia, Lithuania, Norway, Russia, *North European Territory*, Poland, Slovakia, Slovenia, Spain (incl. Gibraltar), Sweden, Switzerland, Ukraine, Serbia and Montenegro, **North Africa:** Algeria, **Asia:** Russia: Far East, Israel, Jordan, Kazakhstan, Mongolia, China: Northwest Territory, Syria, Tajikistan, Russia: West Siberia, **America:** North of Mexico (Fikáček et al. 2015).

Sphaeridium marginatum Fabricius, 1787

Material examined: **1:** 15-18.VI.2010, 1 ex.; 15-18.VII.2010, 3 exs.; 15-18.IX.2010, 2 exs.; 18-21.V.2011, 2 exs.; **2:** 15-18.VI.2010, 7 exs.; 15-18.VII.2010, 1 ex.; 15-18.IX.2010, 3 exs.; 15-18.XI.2010, 2 exs.; 16-19.II.2011, 1 ex.; 16-19.III.2011, 1 ex.; 15-18.IV.2011, 1 ex.; 18-21.V.2011, 6 exs.; **3:** 15-18.VI.2010, 1 ex.; 15-18.VII.2010, 2 exs.; 15-18.IX.2010, 24 exs.; 16-19.X.2010, 8 exs.; 15-18.XI.2010, 12 exs.; 16-19.II.2011, 1 ex.; 16-19.III.2011, 1 ex.; **4:** 15-18.VI.2010, 1 ex.; 15-18.VII.2010, 3 exs.; 15-18.VII.2010, 28 exs.; 15-18.IX.2010, 8 exs.; 16-19.X.2010, 30 exs.; 16-19.III.2011, 1 ex.; 18-21.V.2011, 4 exs.; **5:** 15-18.VII.2010, 33 exs.; 15-18.VIII.2010, 5 exs.; c.; 16-19.X.2010, 15 exs.; 15-18.XI.2010, 1 ex.; 15-18.IV.2011, 2 exs.; 18-21.V.2011, 1 ex.; **6:** 15-18.VIII.2010, 1 ex.; 16-19.X.2010, 3 exs.; 18-21.V.2011, 6 exs.; **7:** 15-18.VII.2010, 2 exs.; 15-18.IX.2010, 1 ex.; 16-19.X.2010, 1 ex.; **8:** 15-18.VII.2010, 5 exs.; **10:** 15-18.VII.2010, 14 exs.; 15-18.VIII.2010, 2 exs.; **11:** 15-18.VI.2010, 1 ex.; 15-18.VII.2010, 2 exs.; 15-18.IX.2010, 2 exs.; 18-21.V.2011, 1 ex.; **12:** 15-18.VI.2010, 1 ex.; 15-18.IX.2010, 1 ex.; 16-19.X.2010, 1 ex.; **13:** 15-18.VI.2010, 1 ex.; 15-18.IX.2010, 2 exs.; 18-21.V.2011, 1 ex.; leg. and det. Şenyüz Y.

Records in Turkey: Manisa (Darılmaz & İncekara 2011).

Distribution in World: Europe: Bosnia Herzegovina, Bulgaria, Belarus, Croatia, Russia, *Central European Territory*, Czech Republic, Denmark, Finland, France (incl. Corsica, Monaco), Great Britain (incl. Channel Islands), Germany, Hungary, Ireland, Italy (incl. Sardinia, Sicily, San Marino), Macedonia, Poland, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain (incl. Gibraltar), Russia, *South European Territory*, Switzerland, Turkey, Ukraine, **North Africa:** Algeria, Tunisia, **Asia:** Cyprus, Tajikistan, Turkey, Uzbekistan, Russia: West Siberia, Middle East, Near East, **America:** North of Mexico (Fikáček et al. 2015).

Sphaeridium scarabaeoides (Linnaeus, 1758)

Material examined: **2:** 15-18.VIII.2010, 1 ex.; 16-19.III.2011, 1 ex.; **3:** 15-18.VII.2010, 1 ex.; 16-19.X.2010, 1 ex.; 18-21.V.2011, 2 exs.; **4:** 16-19.X.2010, 1 ex.; 18-21.V.2011, 2 exs.; **7:** 15-18.VII.2010, 1 ex.; **10:** 15-18.VI.2010, 1 ex.; 15-18.VII.2010, 5 exs.; **11:** 15-18.VI.2010, 2 exs.; 18-21.V.2011, 2 exs.; **13:** 15-

18.VI.2010, 2 exs.; 15-18.VII.2010, 1 ex.; 18-21.V.2011, 1 ex.; **14**: 15-18.VII.2010, 3 exs.; leg. and det. Şenyüz Y.

Records in Turkey: Adıyaman, Bilecik, Bolu, Isparta, İçel, İzmir, Manisa and Sakarya (Darılmaz & İncekara 2011, Yılmaz & Aslan 2014).

Distribution in World: Europe: Austria, Belgium, Bosnia Herzegovina, Bulgaria, Belarus, Croatia, Russia, *Central European Territory*, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France (incl. Corsica, Monaco), Great Britain (incl. Channel Islands), Germany, Georgia, Hungary, Ireland, Italy (incl. Sardinia, Sicily, San Marino), Latvia, Lithuania, Macedonia, The Netherlands, Norway, Russia, *North European Territory*, Poland, Portugal, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain (incl. Gibraltar), Sweden, Switzerland, **North Africa:** Tunisia, **Asia:** Azerbaijan, Armenia, Israel, Japan, Kyrgyzstan, Kazakhstan, Nei Mongol (Inner Mongolia), Russia: East Siberia, West Siberia Far East, Heilongjiang (Heilungkiang), Tajikistan, Turkey, Uzbekistan, **Afrotropical:** South of the North African states included in the Palaearctic Region, **Australia:** South of The Lydekker Line, **America;** North of Mexico (Fikáček *et al.* 2015).

Sphaeridium substriatum Faldermann, 1838

Material examined: **1**: 15-18.VI.2010, 1 ex.; 16-19.III.2011, 1 ex.; 18-21.V.2011, 6 exs.; **2**: 15-18.VII.2010, 1 ex.; 18-21.V.2011, 4 exs.; **3**: 15-18.VI.2010, 3 exs.; 15-18.IX.2010, 1 ex.; 16-19.X.2010, 2 exs.; 18-21.V.2011, 3 exs.; **4**: 18-21.V.2011, 10 exs.; **5**: 15-18.VII.2010, 2 exs.; 16-19.X.2010, 1 ex.; 18-21.V.2011, 3 exs.; **6**: 15-18.VI.2010, 1 ex.; **9**: 15-18.VII.2010, 1 ex.; **10**: 15-18.VI.2010, 1 ex.; 15-18.IX.2010, 1 ex.; **11**: 15-18.VI.2010, 2 exs.; 15-

18.IX.2010, 1 ex.; 18-21.V.2011, 9 exs.; **12**: 15-18.VI.2010, 1 ex.; **13**: 15-18.VI.2010, 2 exs.; 15-18.VII.2010, 7 exs.; 15-18.VI.2010, 1 ex.; **14**: 15-18.VI.2010, 1 ex.; 18-21.V.2011, 2 exs. leg. and det. Şenyüz Y.

Records in Turkey: Düzce, İzmir and Manisa (Darılmaz & İncekara 2011).

Distribution in World: Europe: Austria, Azores, Bosnia Herzegovina, Bulgaria, Croatia, Czech Republic, Denmark, France (incl. Corsica, Monaco), Germany, Greece (incl. Crete), Hungary, Italy (incl. Sardinia, Sicily, San Marino), Lithuania, Macedonia, Montenegro, Poland, Slovakia, Russia, *South European Territory*, Ukraine, **North Africa:** Algeria, Egypt, Tunisia, **Asia:** Azerbaijan, Armenia, Israel, India: Kashmir, Kazakhstan, Liaoning, Mongolia, China: Northeast Territory, Nei Mongol (Inner Mongolia), Shanxi (Shansi), Russia: Far East, East and West Siberia, Tajikistan, Turkmenistan, Turkey (Fikáček *et al.* 2015).

Table 2. The number of specimens (N) for each species sampled and their dominance status (D).

Species	N	D (%)	Dominance Status
<i>S. bipustulatum</i>	271	40,5688623	Eudominant
<i>S. marginatum</i>	268	40,1197605	Eudominant
<i>S. substriatum</i>	76	11,3772455	Dominant
<i>S. scarabaeoides</i>	27	4,04191617	Subdominant
<i>S. lunatum</i>	26	3,89221557	Subdominant
Total	668		

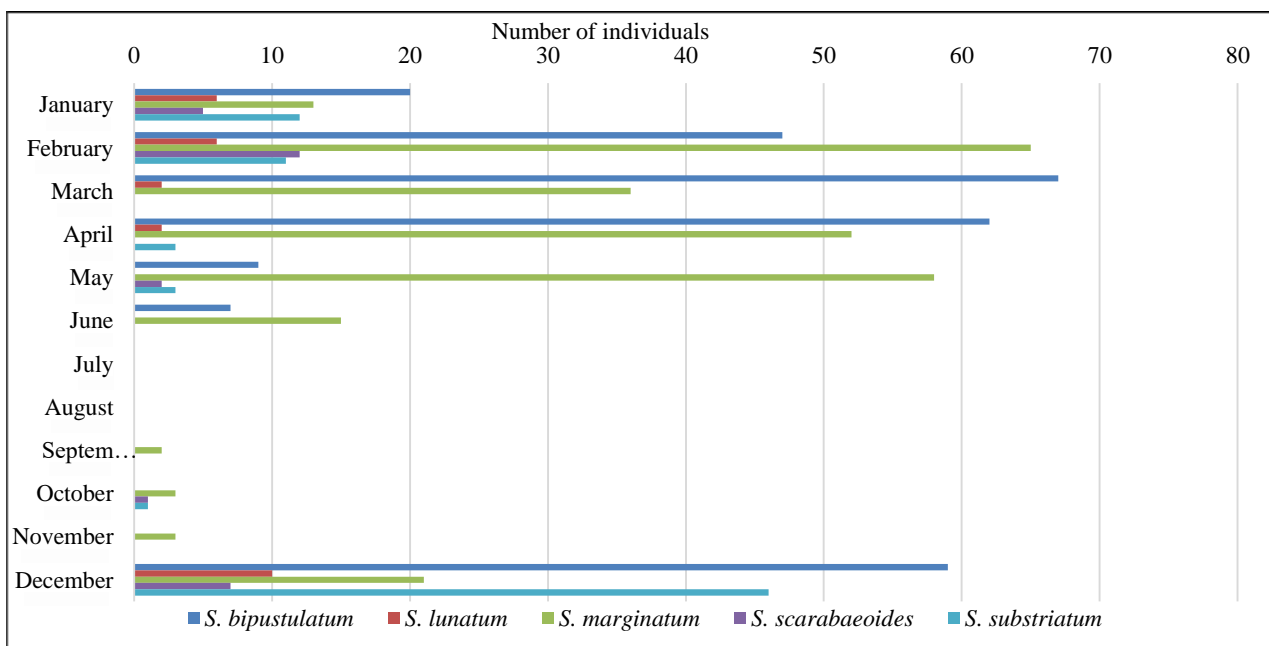


Fig. 3. Seasonal dynamics and number of specimens collected in each month during the study.

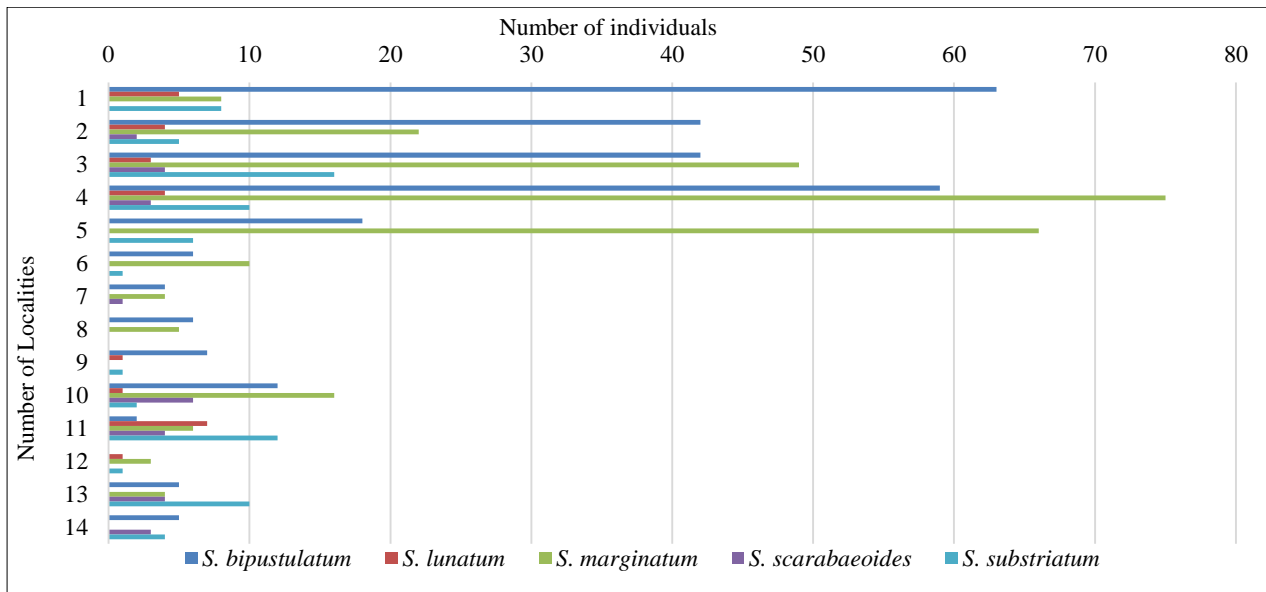


Fig. 4. Total number of specimens for each species collected in localities during the study.

Discussion

The field investigation on *Sphaeridium* in Kütahya province was conducted for the first time and five species were recorded in the study area. All species are new records for fauna of Kütahya and *S. lunatum* is new record for Turkish fauna. Dominance status of each species was described on the basis of relative abundance following Engelmann's (1978) dominance scale (Table 2). According to the analysis, two species were referred as subdominant (*S. scarabaeoides*, *S. lunatum*), one species as dominant (*S. substriatum*) and two species as eudominant (*S. bipustulatum*, *S. marginatum*) status.

In Europe, while *S. bipustulatum* is the rarest species, *S. lunatum* and *S. scarabaeoides* are dominant species (Hanski 1980b). In this study, it was determined that *S. bipustulatum* species was eudominant (Table 2). In contrast to their status in Europe our results showed that *S. lunatum* and *S. scarabaeoides* species were found to be subdominant. According to Hanski (1980b), the spatial patterns shown by *S. lunatum* and *S. scarabaeoides* were the same. The researchers determined that the numbers of both species were positively correlated both between fields within a single locality and between different ages of the same dropping. Our results also showed the same positive correlation between these two species. Similarly, *S. bipustulatum* was eudominant in Spain according to Romero-Alkaraz et al. 1997, followed by *S. marginatum* and *S. scarabaeoides*. The order of dominance of these species is in a harmony with our study.

References

- Anlaş, S. 2011. Studies on the dung-inhabiting beetles (Insecta: Coleoptera) community of western Anatolia, Turkey. *Ecologia Balcanica*, 3: 9-14.
- Anlaş, S., Fikáček, M. & Tezcan, S. 2008. Notes on the seasonal dynamics of the coprophagous Hydrophilidae (Coleoptera) in western Turkey, with first record of

Seasonal changes in the community compositions were given by the differences in phenology of the species. The numbers of sampled beetles increased from the beginning of December until the end of April. The highest numbers of beetles were observed during winter and spring and a drastic decline was determined by July (Fig. 3). Hanski (1980b) determined that *S. scarabaeoides* was not trapped in June and August. When the recorded species were considered according to their highest sampling numbers with respect to sampling months, *S. bipustulatum* showed its peak in March, *S. marginatum* and *S. scarabaeoides* in February, *S. substriatum* and *S. lunatum* in December (Fig. 3). So, there is no activity in July and August. Alkaraz et al. 1997 determined that *S. scarabaeoides* did not show any activity from July to November, *S. bipustulatum* from November to May and *S. marginatum* in January in Spain. In the present study, localities numbered from 1 to 5 (up to about 900 meters) had the higher number of individuals in total (Fig. 4). Rahbek (1995) indicated that species richness declines at high altitudes because of temperature and productivity decrease along with increasing elevation.

Acknowledgement

We are thankful to Dr. Martin Fikáček (Czech Republic) for verification of some selected species and for his suggestions.

Megasternum concinnum for Turkish fauna. *Linzer Biologische Beiträge*, 40: 409-417.

- Darilmaz, M.C. & İncekara, Ü. 2011. Checklist of Hydrophiloidea of Turkey (Coleoptera: Polyphaga). *Journal of Natural History*, 45: 685-735.

4. Engelmann, H.D. 1978. Zur dominanzklassifizierung von bodenarthropoden. *Pedobiologia* 18: 378-380.
5. Fikáček, M. 2010. Hydrophilidae: Sphaeridiinae (Coleoptera). in: Jäch M. A. & Balke M. (eds.): *Water beetles of New Caledonia, Volume 1*. Monographs of Coleoptera, 3: 323-364.
6. Fikáček, M., Angus, R.B., Gentili, E., Jia, F.L., Minoshima, Y.N., Prokin, A., Przewozny, M. & Ryndevich, S.K. 2015. Helophoridae, Georissidae, Hydrochidae, Epimetopidae, Spercheidae, Hydrophilidae. Pp. 1, 25-76 In: Löbl I. & Löbl D. (eds.) *Catalogue of Palaearctic Coleoptera, volume 2. Revised and updated version. Hydrophiloidea – Staphylinoidea*. Brill, Leiden-Boston, 1702 pp.
7. Hansen, M. 1987. The Hydrophiloidea (Coleoptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica*, 18: 1-254.
8. Hansen, M. 1999. Hydrophiloidea (Coleoptera) In: Hansen, M. (ed.): *World catalogue of insects. Vol. 2*. Stenstrup: Apollo Books, 416 pp.
9. Hanski, I. 1980a. The community of coprophagous beetles (Coleoptera, Scarabaeidae and Hydrophilidae) in northern Europe. *Annales Entomologici Fennici*, 46: 57-73.
10. Hanski, I. 1980b. The three coexisting species of *Sphaeridium* (Coleoptera, Hydrophilidae). *Annales Entomologici Fennici*, 46: 39-48.
11. Koskela, H. & Hanski, I. 1977. Structure and succession in a beetle community inhabiting cow dung. *Annales Zoologici Fennici*, 14(4): 204-223.
12. Mroczyński, R. & Radoslav, K. 2014. Differences between beetle communities colonizing cattle and horse dung. *European Journal of Entomology*, 111(3): 349-355.
13. Przewoźny, M. & Bajerlein, D. 2010. The community of coprophagous hydrophilid beetles (Coleoptera: Hydrophilidae) in a pasture near Poznań (West Wielkopolska, Poland). *Polish Journal of Entomology*, 79: 253-260.
14. Rahbek, C. 1995. The elevational gradient of species richness: A uniform pattern? *Ecography*, 18: 200-205.
15. Romero-Alcaraz, E., Sánchez-Piñero, F. & Ávila, J.M. 1997. Los Sphaeridiinae (Coleoptera: Hydrophilidae) en una zona del suroeste ibérico. I: Composición faunística y fenología. *Boletín de la Asociación Española de Entomología*, 21(3-4): 221-235.
16. Short, A.E.Z. & Fikáček, M. 2011. World catalogue of the Hydrophiloidea (Coleoptera): additions and corrections II (2006-2010). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, 51: 83-122.
17. Short, A.E.Z. & Fikáček, M. 2013. Molecular phylogeny, evolution and classification of the Hydrophilidae (Coleoptera). *Systematic Entomology*, 38: 723-752.
18. Short, A.E.Z. & Hebauer, F. 2006. World Catalogue of Hydrophiloidea additions and corrections, 1 (1999–2005) (Coleoptera). *Koleopterologische Rundschau*, 76: 315-359.
19. Šlachta, M. 2013. Coprophagous beetle community (Coleoptera: Scarabaeidae, Geotrupidae, Hydrophilidae) in two cattle pastures in South Bohemia. *Journal of Agrobiology*, 30(1): 21-31.
20. Šlachta, M., Frelich, J. & Tonka T. 2010. Function of coprophagous beetles (Coleoptera: Scarabaeidae, Geotrupidae, Hydrophilidae) in cattle pastures inferred from pitfall trapping data. *Journal of Agrobiology*, 27(2): 85-91.
21. Tischler, W. 1977. *Einführung in die Ökologie*. Fischer, Stuttgart, 528 pp.
22. Yılmaz, A. & Aslan, E.G. 2014. Faunistical and Ecological Investigations on Water Scavenger Beetles (Coleoptera: Hydrophilidae) of Isparta Province, Turkey. *Pakistan Journal of Zoology*, 46(6): 1663-1671.
23. Wassmer, T. 2014. Seasonal occurrence (Phenology) of coprophilous beetles (Coleoptera: Scarabaeidae and Hydrophilidae) from cattle and sheep farms in Southeastern Michigan, USA. *The Coleopterists Bulletin*, 68(3): 603-618.

***Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. YAPRAKLARINDA GUS VE GFP RAPORTÖR GENLERİ KULLANILARAK SENESENS İLE İLİŞKİLİ GENLERİN ANALİZİ**

Nihal GÖREN SAĞLAM

İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı, 34134, İstanbul.
e-mail: gorenn@istanbul.edu.tr

Alınış (Received): 5 Haziran 2017, Kabul (Accepted): 28 Kasım 2017, Erken Görünüm (Online First): 1 Aralık 2017, Basım (Published): 15 Aralık 2017

Özet: Yaprak senesensinin düzenlenme ve işleyiş yapısı birçok biyokimyasal ve düzenleyici yolağın aktivasyonunu içeren kompleks bir olaydır. Daha önce yapılan çalışmalar sonucunda, yaprak senesensinin moleküler mekanizmasını anlamak için senesens ile ilişkili bazı genler (SAGs=Senescence Associated Genes) belirlenmiştir. Bu çalışma ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1) ve MYB2 genlerinin senesens ile ilişkili olabileme potansiyelini araştırmak için planlanmıştır. Bu amaçla GUS (β -glukuronidaz) ve GFP (Yeşil Fluoresans Protein) işaretleyicileri ile ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1) ve MYB2 promotör genlerini içeren *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (ekotip Columbia) bitkisi kullanılmıştır. GUS ve GFP analizinde promotörün ne zaman ve hangi hücre ya da hücre tiplerinde aktif olduğuna bakılmıştır. Karanlığın teşvik ettiği senesens modeli oluşturulmuş ve GUS boyama ve konfokal mikroskopi ile genlerin aktif olduğu zaman ve hücre tipleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1) ve MYB2 genlerinin senesens sırasında, epidermis, epidermal hücrelerin nükleusları, mezofil ve stoma hücrelerinde aktif oldukları belirlenerek bu genlerin yaprak senesensinde rol oynadıkları ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: *Arabidopsis thaliana*, GUS, GFP, senesens.

Analysis of Senescence-Related Genes Expressions Using Gus and Gfp Reporter Genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Leaves

Özet: The regulation and functional steps of leaf senescence is a complex phenomenon involving the activation of many biochemical and regulatory pathways. As a result of previous studies, some genes related to senescence (SAGs = Senescence Associated Genes) have been identified to understand the molecular mechanism of leaf senescence. This study was designed to investigate the association potential of ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1) and MYB2 genes with senescence. For this purpose, GUS (β -glucuronidase) and GFP (Green Fluorescent Protein) markers and *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (ecotype Columbia) plants containing ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1), MYB2 promoter genes were used. GUS and GFP analyses were used to determine when the promoter is active in which cells or cell types. Dark-induced senescence model was designed and the time and the cell types where the genes were active were determined by using GUS staining and confocal microscopy. The results showed that ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1) and MYB2 genes were active in epidermis, nucleus of epidermal cells, mesophyll and stomata cells during senescence and these genes were found to play a role in leaf senescence.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, GUS, GFP, senescence.

Giriş

Senesens bitkilerde görülen, yaprak gelişiminin son safhası olan önemli bir gelişimsel süreçtir (Woo ve ark. 2010). Senesens temel olarak bitki yaşı tarafından kontrol edilen son derece kompleks ancak düzenli bir olaydır. Normal şartlarda bir yaprak hücresi belli bir gelişimsel yaşa ulaştığı zaman senesense maruz kalır. Ancak, yaprak senesensini içsel (bitki büyüme düzenleyicileri, üreme durumu, hücresel farklılaşma vb.) ve biyotik/abiyotik (karanlık, kuraklık, yüksek ısı, tuzluluk) stresler gibi dışsal faktörlerden etkilenebilir (Lim ve ark. 2007, Woo ve ark. 2010, Zhang ve Zhou 2013). Gelişimsel senesensde olduğu gibi stresin teşvik ettiği yaprak

senesensinde de ilk süreç kloroplastların yıkımı ile başlamaktadır (Sobieszczyk-Nowicka ve ark. 2015). Yaprak senesensini, kloroplastların bozulması ve makromoleküllerin hidrolizi ve taşınması ile başlayıp, mitokondri ve nükleusun dejenerasyonu ile devam ederek düzenli bir şekilde meydana gelir (Lim ve ark. 2007, Zhang ve ark. 2015).

Gen anlatımının transkripsiyonel düzenlenmesi çevresel uyarılara karşı oluşan bitki cevaplarında ve bitki gelişiminde kilit rol oynamaktadır (Neguyen ve ark., 2016). Yaprak senesensinin moleküler mekanizmasını

anlamak için senesens ile ilişkili genler (SAGs=Senescence Associated Genes) belirlenmiştir (Martins ve ark. 2016). SAG'ların senesens sırasında anlatımlarının arttığı ve nukleazlar, proteazlar ve hücre duvarı hidrolazlarını içeren kodladıkları proteinlerin hücrel yapıların yıkımında rol oynadıkları bulunmuştur (Lim ve ark. 2007). Bu genler sıklıkla senesens işaretleyici (marker) genler olarak kullanılırlar ve gen anlatımları senesensin başlamasıyla birlikte hızla artmaktadır (Sakuraba ve ark. 2014, Rauf ve ark. 2013, Li ve ark. 2013). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ATH1 genom dizilimi kullanılarak yapılan transkriptom çalışmaları doğal ve karanlığın teşvik ettiği senesens sürecinde anlatımı artan ve azalan binlerce geni meydana çıkarmıştır (Buchanan-Wollaston ve ark. 2005, Van der Graff ve ark. 2006). Ayrıca, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin senesensin düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları bulunmuştur (Zhang ve ark. 2015). Bunların arasında, 96 transkripsiyon faktörü geninin transkript seviyelerinin gelişimsel senesens sırasında en az 3 kat arttığı, karanlığın teşvik ettiği senesens sırasında ise 303 transkripsiyon faktör geninin transkript seviyesinin arttığı 81 transkripsiyon faktör geninin transkript seviyesinin ise azaldığı rapor edilmiştir (Lin ve Wu 2004, Buchanan-Wollaston ve ark. 2005). *Arabidopsis*'te senesensi düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin büyük bölümünü NAC, WRKY ve MYB ailesi transkripsiyon faktörlerinin oluşturduğu rapor edilmiştir (Balazadeh ve ark. 2008, Huang ve ark. 2015, Zhao ve ark. 2016). Bu nedenle, yaprak senesensinin düzenlenme ve işleyiş yapısı birçok biyokimyasal ve düzenleyici yolağın aktivasyonunu içeren kompleks bir süreçtir.

NAC proteinler *Arabidopsis* genomunda 100 den fazla üyesi ile bitki-spesifik transkripsiyon faktörü süperalesinin en büyük grubu içindedirler (Puranik ve ark. 2012). NAC orijinal olarak benzer bir DNA-binding proteini içeren üç protein isminden oluşmaktadır, NAM (No Apical Meristem=Apikal meristemi olmayan), ATAF1-2, ve CUC2 (cup-shaped cotyledon=Küp-şekilli kotiledon) (Aida ve ark. 1997). NAC transkripsiyon faktörleri bitki yaşam döngüsünün pek çok safhasında oynadıkları çeşitli roller ile çok fonksiyonlu proteinlerdir (Nuruzzaman ve ark. 2010). Geniş çaplı transkriptom profiline bakıldığında, *Arabidopsis*'te 30 dan fazla NAC geninin anlatımının yaprak senesensi sırasında arttığı görülmektedir (Breeze ve ark. 2011). Yapılan çalışmalarda 3 NAC geninin, ANAC019, ANAC055 ve ANAC072, kuraklık, tuzluluk ve düşük sıcaklık ile teşvik olduğu *Arabidopsis thaliana*'da Yeast-one-hybrid (Y1H) yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Tran ve ark. 2004, Hickman ve ark. 2013).

MYB proteinler bitkilerde savunma cevaplarında ve gelişimsel süreçlerde rol oynayan, bir süperail (super family) transkripsiyon faktörleridirler (Yanhui ve ark. 2006). MYB süperalesi, *Arabidopsis* gen ailesi içerisinde en geniş sayıda üyeye sahiptir (Riechmann ve Ratcliffe 2000). MYB ve MYB-benzeri transkripsiyon faktörleri toplamda 212 gen tarafından kodlanmaktadır ve

bunların 12 tanesi senesens sırasında tespit edilmişlerdir. MYB2 geninin fazla ekspresyonu ABA tepkisini artırır ve kuraklık toleransının artmasına neden olur (Ding ve ark. 2009). MYB75 ve MYB90 genleri, senesens esnasında oksidatif strese karşı koruma sağlayan antosiyanin biyosentezine katılırlar (Jung ve ark. 2010). Genel olarak, senesens sırasındaki MYB transkripsiyon faktörlerinin rolü şu ana kadar ikincil metabolizmalar ve ABA sinyali ile ilişkili görünmektedir (Huang ve ark. 2015). MYB transkripsiyon faktörlerinin yaprak senesensinin düzenlenmesine karıştığını gösteren yalnızca birkaç çalışma bulunmaktadır (Guo ve Gan 2011, Zhang ve ark. 2011, Jaradat ve ark. 2013).

Bir raportör gen ilgilendiğimiz bir genin transkripsiyonel aktivitesinin rapor edilmesinde kullanılan ve aktivitesi kolaylıkla analiz edilebilen bir enzimi kodlar. Raportör genler, gen ürünü bilinmeyen ya da kolaylıkla tanımlanamayan bir genin anlatımının çalışılmasına izin vermektedir (Karcher 2002). Raportör olarak kullanılan genler arasında en yaygın olanı *E. coli* ye ait GUS (β -glukuronidaz) geni olup, β -glukuronidaz enzimini kodlamaktadır. Son yıllarda GUS geni füzyon sistemi bitkilerde ve tarımsal moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bunun nedeni bitkiler arasında yaygın endojen aktiviteye sahip olmayışı ve gen ifadesi sonucu oluşan ürünlerin spektrofotometrik, histokimyasal ve florimetrik olarak kolaylıkla saptanabilmesidir. Jefferson ve ark. (1987) tarafından rapor edilmesinden bu yana GUS (β -glukuronidaz) geni füzyon sistemi bitkilerde ve tarımsal moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Jefferson 1987, 1989, Gallagher 1992, Cote ve Rutledge 2003). GUS'ın yanısıra GFP (Green Fluorescent Protein = Yeşil floresans protein) de bitkilerde gen anlatımının gözlemlenmesinde genetik işaretleyici olarak kullanılmaktadır. Denizanasından izole edilmiş bir protein olan GFP 395nm dalga boyunda en üst emilme oranına sahiptir. Diğer raportör genlerden farklı olarak GFP geninin transferinin gerçekleşip gerçekleşmediği canlı doku veya hücrelerde yeşil renk vermesiyle anlaşılabilmekte ve dokuların canlılığı korunmaktadır.

Yapılan transkriptomik çalışmalar bazı NAC ve MYB genlerinin senesens sırasında anlatımının arttığını göstermekte ancak lokalizasyonu hakkında bilgi vermemektedir. Bu çalışmada GUS ve GFP analizi ile ANAC018, ANAC019, PAP1 (MYB75), MYB2 genlerinin ne zaman (senesens başlamadan önce ya da senesens sırasında) ve hangi hücre ya da hücre tiplerinde aktif olduğuna bakılmıştır. Bu amaçla karanlığın-teşvik ettiği senesens modeli oluşturulmuş ve GUS boyama ve konfokal mikroskopi incelemesi ile genlerin aktif olduğu zaman ve hücre tipleri belirlenmiştir.

Materyal ve Metot

Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Karanlığın-teşvik Ettiği Senesensin Oluşturulması

Bu çalışmada GUS ve GFP işaretleyicileri ile ANAC018, ANAC019, PAP1 (MYB75), MYB2

promotör genlerini içeren, Warwick HRI (İngiltere)'dan temin edilen *Arabidopsis thaliana* bitkisinin tohumları kullanılmıştır. Seçilen promotör genler ile ilgili bilgiler aşağıya çıkarılmıştır (<http://www.arabidopsis.org>).

ANAC018 (At1g52880): Bir NAC domain transkripsiyon faktörüdür.

ANAC019 (At1g52890): NAC transkripsiyon faktörünü kodlar. Anlatımını kuraklık, tuzluluk ve ABA teşvik eder.

PAP1/MYB75 (At1g56650): MYB domain içeren bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Antosiyanin metabolizmasına karışır.

MYB2 (At2g47190): Bir MYB transkripsiyon faktörünü kodlar. Tuz ve dehidratasyon cevapları ile ilgili genlerin anlatımını düzenlediği bilinmektedir.

GUS ve GFP raportör genleri ile birlikte yukarıda belirtilen promotör genleri içeren *Arabidopsis thaliana* tohumları %0,1 lik agaroz içeren tüplerde iki gece 4°C de tohum dormansisinin kırılması için bekletildikten sonra *A. thaliana* toprak karışımı içeren (6 kısım Levingtons F2: 1 kısım kurutulmuş silika kumu: 1 kısım vermikülit) saksılara ekildi. Bitkiler 22°C de 16/8 saat ışık/karanlık periyodunda %70 nem ve 250µmol m⁻²s⁻¹ ışık altında yetiştirildi. 50 günlük bitkiler içerisinde 3 ml distile su ve Whatman filtre kağıdı bulunan petrilere transfer edildi. Petrilere karanlığın-teşvik ettiği senesensi oluşturmak için karanlığa konuldu. Bitkiler 5. günde GUS ve GFP analizi için deneye alındı.

GUS boyama

Karanlığın-teşvik ettiği senesensi belirlemek için karanlığa konulan bitkilerin 5. günde fotoğraf stüdyosunda dijital kamera (Nikon Coolpix) ile fotoğrafları çekildi. Daha sonra bitkilerin yaprakları derin kuyucuklu plakalardaki 100mM Sodyum fosfat tamponu (pH 7,2), 10mM EDTA, Triton X-100 (%0,1), 25mM potasyum ferrosiyaniid, 25mM potasyum ferrisiyaniid ve 1mg/ml X-Gluc içeren GUS boya solüsyonuna konuldu ve 2 defa 10'ar dakika vakum uygulaması ile boyanın dokulara girmesi sağlandı. Daha sonra dokular bir gece 37°C de inkübe edildi ve 80°C ye ısıtılmış %80 etanol ile klorofil uzaklaşmıca kadar yıkandı. Yıkama işleminden

sonra her yaprağın fotoğrafları çekildi. GUS aktivitesi yapraklarda mavi renk oluşumu ile tespit edildi.

GFP analizi

5 günlük karanlık uygulamasından sonra dijital kamera (Nikon Coolpix) ile bitkilerin fotoğrafları çekildi. Farklı senesens aşamalarındaki 3 rozet yapraktaki GFP floresans Konfokal mikroskop (Zeiss LSM 710) ve ZEN 2009 yazılımı kullanılarak gözlemlendi. Aynı zamanda kullanılan promotör genleri içeren bitkilere ait yeşil yapraklar da (kontrol grubu) GFP varlığını belirlemek için konfokal mikroskop altında incelendi.

Bulgular

GUS Analizi

Bu çalışmada da promotör genlerin yaprağın hangi kısımlarında ve ne zaman aktif olduğunu görebilmek için histokimyasal inceleme yapılmış ve elde edilen GUS boyama görüntüleri Şekil 1 ve Şekil 2 de verilmiştir. Şekil 1 de senesens teşvik edilmemiş (kontrol grubu) *A. thaliana* bitkilerinin yapraklarında GUS boyama sonucunun negatif olduğu görülmektedir.

ANAC018, ANAC019, PAP1 (MYB75), MYB2 genlerinin yaprağın senesense uğramış olan kısımlarında anlatımlarının olduğu, GUS boyama sonucunda mavi renk oluşumu ile saptanmıştır (Şekil 2).

GFP Analizi

Yaptığımız çalışmada ANAC018, ANAC019, PAP1 (MYB75) ve MYB2 genlerinin nerede ve ne zaman (senesens başlamadan önce ya da senesens sırasında) anlatımının olduğu konfokal mikroskop altında GFP'nin varlığının gösterilmesi ile saptanmıştır. ANAC018, ANAC019, PAP1 (MYB75) ve MYB2 genleri ile ilgili kontrol ve karanlığın-teşvik ettiği senesense uğramış bitkilerin konfokal görüntüleme verileri Şekil 3, 4, 5 ve 6 de sırasıyla verilmiştir.

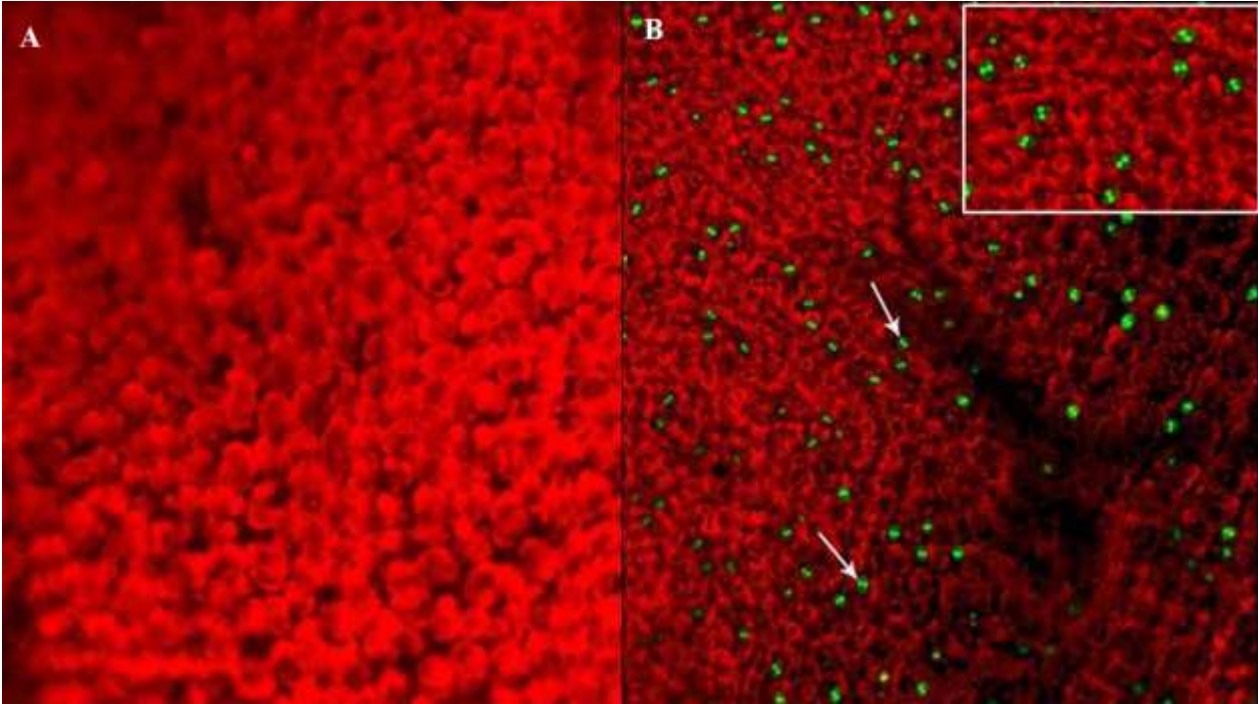
ANAC018 geninin *A. thaliana* bitkisinin yeşil yapraklarında anlatımı olmazken, senesense uğramış yaprağın stoma bekçi hücrelerinde anlatımının olduğu GFP varlığı ile görülmektedir (Şekil 3B). Bu durum ANAC018 geninin anlatımının senesens sırasında arttığını göstermektedir.



Şekil 1. Kontrol bitkilerinin yapraklarındaki GUS boyama sonucunun görüntüsü.



Şekil 2. Kullanılan transgenik hatlarda promotör genlerin aktif olduğu bölgeleri gösteren GUS boyama görüntüleri. Yapraklarda oluşan mavi renk GUS aktivitesinin olduğu kısımları göstermektedir. A-B. ANAC018 geni: A. boyama öncesi, B. boyama sonrası yaprak görüntüleri; C-D. ANAC019 geni: C. boyama öncesi, D. boyama sonrası yaprak görüntüleri; E-F. PAP1 (MYB75) geni: E. boyama öncesi, F. boyama sonrası yaprak görüntüleri; G-H. MYB2 geni: G. boyama öncesi, H. boyama sonrası yaprak görüntüleri.



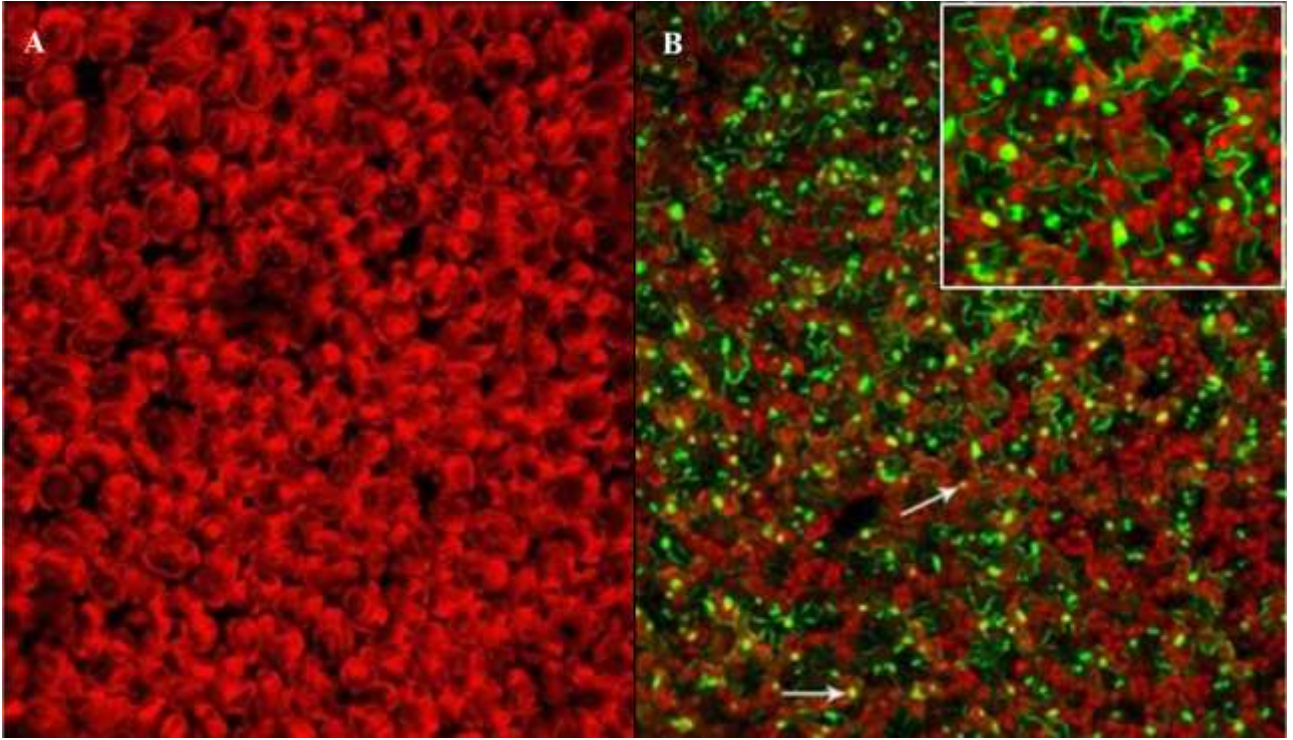
Şekil 3. ANAC018 genini taşıyan *A. thaliana* bitkisi: A. yeşil (kontrol grubu), B. senesense uğramış (karanlığın-teşvik ettiği senesens) yaprakların görüntüsü. Oklar stomaların bekçi hücrelerini göstermektedir. Küçük resim bekçi hücrelerinin büyütülmüş halini göstermektedir.

Şekil 4 de görüldüğü gibi ANAC019 genini taşıyan *A. thaliana* bitkilerinde gen anlatımı senesense uğramış yaprakta artmış ve bu genin anlatımının epidermal hücrelerin nükleusunda ve stomaların bekçi hücrelerinde olduğu GFP varlığı ile tayin edilmiştir (Şekil 4B).

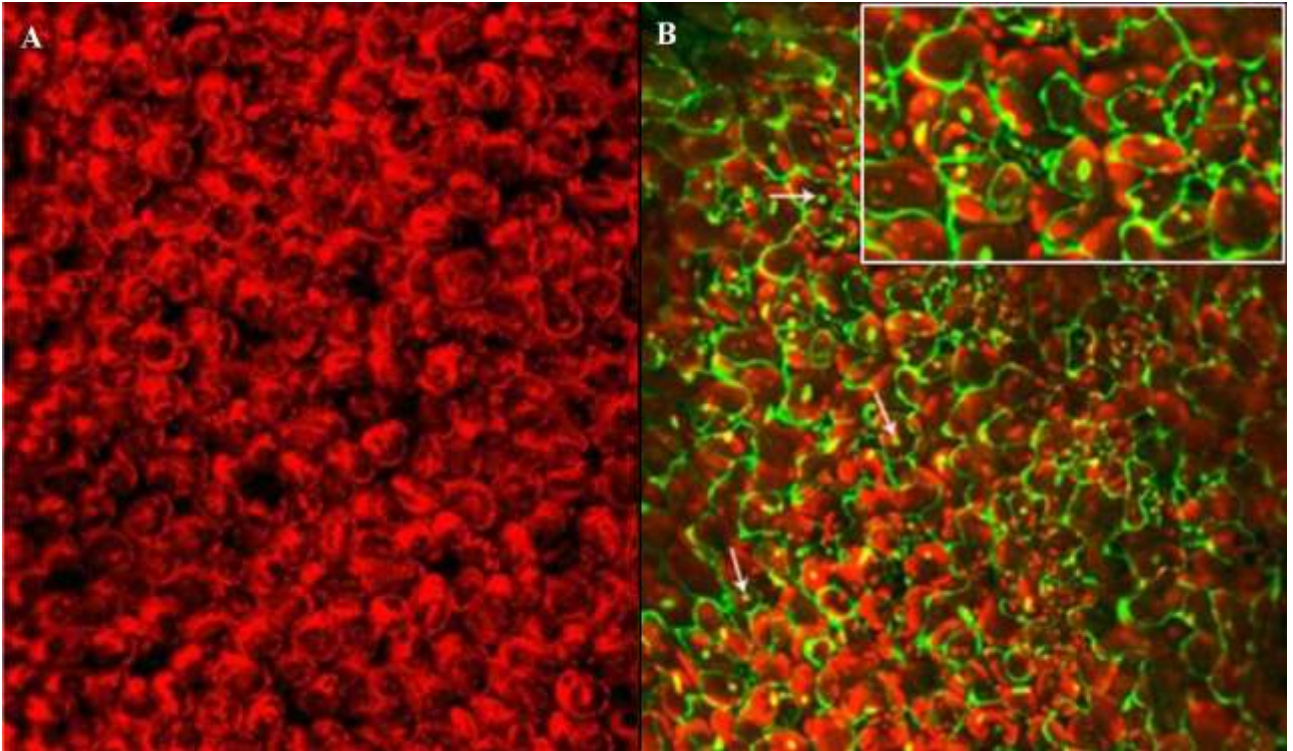
PAP1 (MYB75) genini taşıyan *A. thaliana* bitkisinin yeşil ve senesense uğramış yaprakları incelendiğinde yeşil yapraklarda gen anlatımının gözlenmediği, senesense

uğramış yapraklarda ise epidermiste ve epidermal hücrelerin nükleusunda gen anlatımının olduğu GFP varlığı ile görülmektedir (Şekil 5).

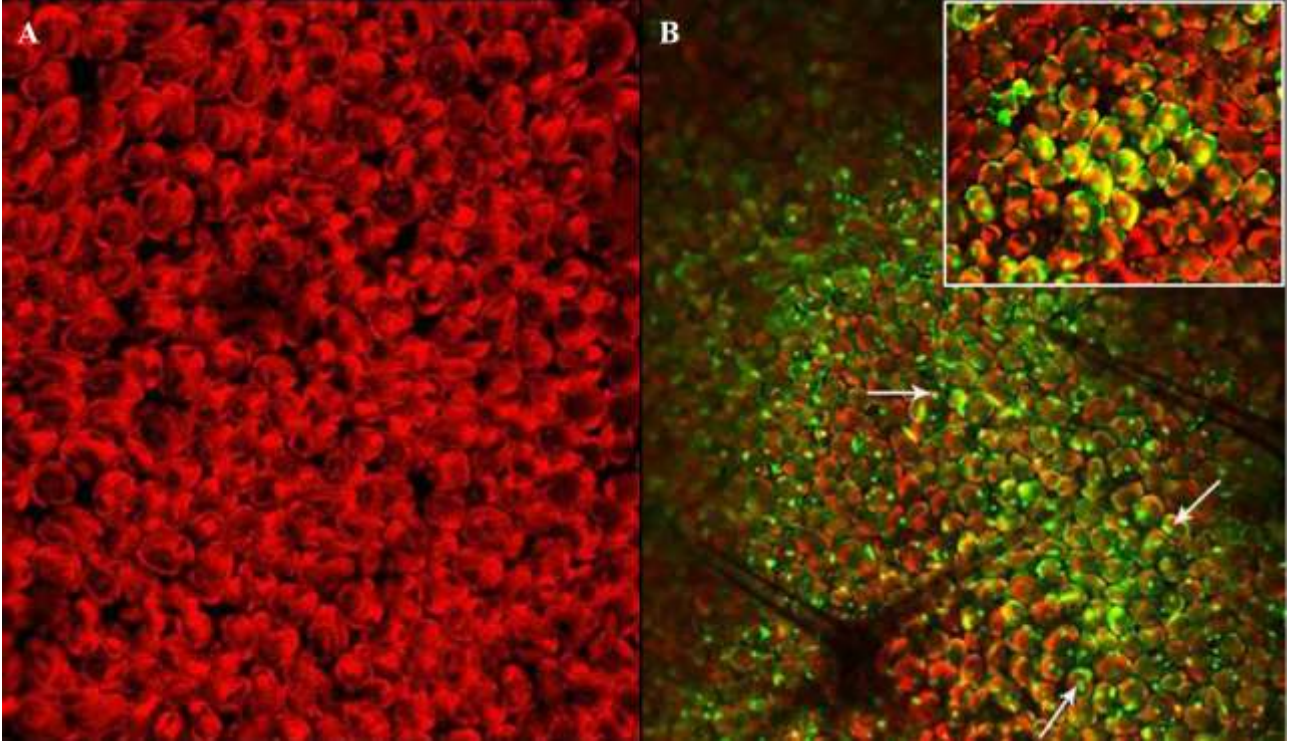
Şekil 6'da MYB2 geni aktarılmış *A. thaliana*'nın yeşil yapraklarında anlatım olmazken senesense uğramış yaprakta mezofil, epidermis hücreleri ve epidermal hücrelerin nükleuslarında gen anlatımının olduğu görülmektedir.



Şekil 4. ANAC019 genini taşıyan *A. thaliana* bitkisi: A. yeşil (kontrol grubu), B. senesense uğramış (karanlığın-teşvik ettiği senesens) yaprakların görüntüsü. Oklar nükleusları göstermektedir. Küçük resim nükleusların ve epidermislerin büyütülmüş halini göstermektedir.



Şekil 5. PAPI (MYB75) genini taşıyan *A. thaliana* bitkisi: A. yeşil (kontrol grubu), B. senesense uğramış (karanlığın-teşvik ettiği senesens) yaprakların görüntüsü. Oklar nükleusları göstermektedir. Küçük resim nükleusların ve epidermislerin büyütülmüş halini göstermektedir.



Şekil 6. MYB2 genini taşıyan *A. thaliana* bitkisi: A. yeşil (kontrol grubu), B. senesense uğramış (karanlığın-teşvik ettiği senesens) yaprakların görüntüsü. Oklar nükleusları göstermektedir. Küçük resim mezofil hücreleri ve nükleusların büyütülmüş halini göstermektedir.

Tartışma

Senesens doku, organ ve tüm bitkinin ölümü ile sonuçlanan bitki gelişiminin son safhasıdır. Yaprak senesensi optimal büyüme koşulları altında normal organ ontogenezinin bir parçası olmasının yanı sıra biyotik ve abiyotik stresler tarafından da teşvik edilebilmektedir (Kucharewicz ve ark. 2017). Senesens sendromunu kontrol eden iç faktörler; yaş, bitki hormonlarındaki değişimler ve reproduktif büyümeyi içermektedir (Guo ve Gan 2012). Yaprak senesensinin oluşumunun anlaşılmasında, transkripsiyon faktörlerini kodlayan ve senesens sırasında anlatımı artan genler ilgi çekmektedir. NAC, MYB ve WRKY transkripsiyon faktörlerinin, senesens sırasındaki transkripsiyonel değişiklikleri ayarlayan temel unsurlar olduğu rapor edilmiştir (Kim ve ark. 2016).

ANAC018 (At1g52880) bir NAC alanı transkripsiyon faktörüdür. Sürgün gelişimi için gerekli olan petunya geni NAM (No Apical Meristem) ile homologdur. ANAC018 geninin senesens sırasında anlatımının olduğu rapor edilmiştir (<http://www.arabidopsis.org>). Ancak bu konu ile ilgili detaylı bir çalışma bulunmamaktadır. Elde ettiğimiz GUS boyama sonuçları ANAC018 geninin yaprağın senesense uğrayan kısımlarında anlatımının olduğunu göstermektedir (Şekil 2B). Konfokal mikroskop sonuçları da GUS sonuçlarını teyit eder niteliktedir. ANAC018 geninin yeşil yaprakta anlatımı olmazken senesense uğramış yaprakta stomaların bekçi hücrelerinde anlatımı olduğu GFP varlığı ile görülmektedir (Şekil 3B). Bu durum ANAC018 geninin anlatımının senesens sırasında arttığını göstermektedir.

ANAC019 (At1g52890) kuraklık, yüksek tuz ve ABA tarafından anlatımı artan, bir NAC transkripsiyon faktörüdür (<http://www.arabidopsis.org>). ABA ile ilişkili stres sinyallerinin pozitif düzenleyicisidir ve kuraklık toleransında aşırı anlatımı olduğu bildirilmiştir (Hickman ve ark. 2013). ANAC019/055/072'nin klorofil yıkım genlerinin (Chlorophyll Catabolic Genes=CCGs) anlatımlarını düzenledikleri bildirilmiştir (Bu ve ark. 2008, Zheng ve ark. 2012, Zhu ve ark. 2015). ANAC019'dan literatürde stres ile ilişkili ya da senesens ile ilişkili NAC lardan biri olarak söz edilmektedir (Hickman ve ark. 2013, Lindemose ve ark. 2014, Kim ve ark. 2016). GUS boyama sonuçlarına bakıldığında zaman, yaptığımız çalışmada ANAC019'un yaprağın senesense uğrayan kısımlarında anlatımının arttığı GUS raportör geninin verdiği mavi renkli reaksiyon ile görülmektedir (Şekil 2D). GFP raportör geninin anlatımının olup olmadığını gösteren konfokal mikroskop verileri de yeşil yaprakta anlatımının olmadığını, senesense uğramış yaprakta ise epidermal hücrelerin nükleuslarında ve stomaların bekçi hücrelerinde gen anlatımının olduğunu göstermektedir (Şekil 4). Elde ettiğimiz sonuçlar ANAC019 geninin epidermis hücrelerinde anlatımı olduğunu göstermekte ve senesens ile ilişkili olduğunu teyit etmektedir.

MYB75 (PAP1=Production of Anthocyanin Pigment1) bir MYB transkripsiyon faktörünü kodlar ve *Arabidopsis*, tütün, domates ve kanolada etkili bir şekilde antosiyanin birikimini indüklediği gösterilmiştir (Qiu ve ark. 2014). MYB75 (PAP1), bu genin aşırı anlatımının olduğu fiderlerde antosiyaninlerin kuvvetli birikimine

dayanarak, *Arabidopsis*'te antosiyanin biyosentezinin pozitif bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. MYB75 (PAP1)'in aşırı anlatımının antosiyanin üretimi üzerindeki bu etkisine ilaveten, bu genin aktivitesinin *A. thaliana*'da lignin birikimi, sükröz sinyali ve senesens üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (Bhargava ve ark. 2010). Araştırmacılar iki MYB transkripsiyon faktörünü, PAP1 ve PAP2, glukoz tarafından indüklenen-senesens ile ilişkili genler olarak tanımlamışlardır (Pourtau ve ark. 2006). Elde ettiğimiz GUS boyama sonuçları MYB75 geninin yaprağın senesense uğrayan kısımlarında anlatımının olduğunu göstermektedir (Şekil 2F). Konfokal mikroskop sonuçları da GUS sonuçlarını teyit eder niteliktedir. MYB75 geninin yeşil yaprakta anlatımı olmazken senesense uğramış yaprakta epidermis hücrelerinde ve epidermal hücrelerin nükleuslarında anlatımı olduğu GFP varlığı ile görülmektedir (Şekil 5B). Bu durum MYB75 geninin anlatımının senesens sırasında arttığını göstermektedir.

MYB2 proteini hücre farklılaşmasının kontrolü, hormon ve çevresel streslere cevaplar gibi süreçlerin düzenlenmesinden sorumludurlar. Bir MYB transkripsiyon faktörünü kodlarlar ve bitkilerde gen anlatımında düzenleyici bir rol oynarlar (Yu ve ark. 2012). MYB2 aynı zamanda oksin sinyali ve apikal dominansi mekanizması arasındaki karşılıklı etkileşime de karışarak sitokinin biyosentezini düzenlemektedir (Baek ve ark. 2013). Yapılan çalışmalar MYB2 proteininin kuraklık ve tuz stresi altında ABA (absisik asid) tarafından düzenlenen gen anlatımında transkripsiyon faktörü olarak önemli bir rol oynadığını, ayrıca kuraklık ve ABA uygulaması ile aktive olduğunu

Kaynaklar

1. Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15(1): 63-78.
2. Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. & Tasaka, M. 1997. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cupshaped cotyledon mutant. *The Plant Cell*, 9: 841-857.
3. Baek, D., Park, H.C., Kim, M.C. & Yun, D.J. 2013. The role of *Arabidopsis* MYB2 in miR399f-mediated phosphate-starvation response. *Plant Signaling & Behavior*, 8(3): 362-73.
4. Balazadeh, S., Riaño-Pachón, D.M. & Mueller-Roeber, B. 2008. Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology (Stuttgart)*, 10 (S1): 63-75.
5. Bhargava, A., Mansfield, S.D., Hall, H.C., Douglas, C.J. & Ellis, B.E. 2010. MYB75 functions in regulation of secondary cell wall formation in the *Arabidopsis* inflorescence stem. *Plant Physiology*, 154(3): 1428-1438.
6. Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Kiddle, S., Kim, Y., Penfold, C., Jenkins, D., Zhang, C., Morris, K., Jenner, C., Jackson, S.,

göstermiştir (Abe ve ark. 2003, Zheng ve ark. 2002). Yapılan çalışmalarda bu genin *Arabidopsis* senesens cDNA kütüphanesinde yüksek oranda temsil edildiği bulunmuş, RNA jel-blotlama ve RT-PCR analizleride MYB2 geninin yaprak senesensi sırasında anlatımının yüksek olduğu gösterilmiştir (Guo ve ark. 2004, Guo ve Gan 2011). Şekil 2'de de görüldüğü gibi GUS boyama sonuçlarında senesense uğrayan yaprak kısımlarında mavi renk oluşumunun yoğun olduğu yani MYB2 geninin aktivitesinin yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 2H). Konfokal mikroskopi sonuçları da GUS boyama sonuçları ile paralellik göstermekte ve MYB2 geninin senesense uğrayan kısımlardaki mezofil ve epidermis hücrelerinde anlatımı olduğu görülmektedir (Şekil 6B).

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada GUS ve GFP işaretleyicileri ile ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1), MYB2 promotör genlerini içeren *A. thaliana* bitkisinde GUS ve GFP analizi ile promotör genlerin hangi gelişim dönemi ve hangi hücre ya da hücre tiplerinde aktif olduğuna bakılmıştır. Bu amaçla karanlığın teşvik ettiği senesens modeli oluşturulmuş ve GUS boyama ve konfokal mikroskopi ile ANAC018, ANAC019, MYB75 (PAP1), MYB2 senesens sırasında, epidermis, epidermal hücrelerin nükleusları, mezofil hücreleri ve stomaların bekçi hücrelerinde aktif oldukları belirlenerek bu genlerin senesens sırasında rol oynadıkları ortaya konulmuştur.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK 2219-Yurt Dışı Doktora Sonrası Araştırma Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

- Thomas, B., Tabrett, A., Legaie, R., Moore, J.D., Wild, D.L., Ott, S., Rand, D., Beynon, J., Denby, K., Mead, A. & Buchanan-Wollaston, V. 2011. High resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *The Plant Cell*, 23: 873-894.
7. Bu, Q., Jiang, H., Li, C.B., Zhai, Q., Zhang, J., Wu, X., Sun, J., Xie, Q. & Li, C. 2008. Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Research*, 18: 756-767.
8. Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P.O., Nam, H.G., Lin, J.F., Wu, S.H., Swidzinski, J. & Ishizaki, K. 2005. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 42: 567-585.
9. Cote, C. & Rutledge, R.G. 2003. An improved MUG fluorescent assay for the determination of GUS activity within transgenic tissue of woody plants. *Plant Cell Reports*, 21: 619-624.
10. Ding, Z., Li, S. & An, X. 2009. Transgenic expression of Myb15 confers enhanced sensitivity to abscisic acid and

- improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Genetics and Genomics*, 36: 17-29.
11. Gallagher, S.R. 1992. *GUS Protocols: Using The GUS Gene As A Reporter Of Gene Expression*. Academic Press, San Diego, 215 s.
 12. Guo, Y. & Gan, S.S. 2012. Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments. *Plant, Cell and Environment*, 35: 644-655.
 13. Guo, Y., Cai, Z. & Gan, S. 2004. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant, Cell and Environment*, 27: 521-549.
 14. Guo, Y. & Gan, S. 2011. AtMYB2 regulates whole plant senescence by inhibiting cytokinin-mediated branching at late stages of development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 156(3): 1612-1619.
 15. Hickman, R., Hill, C., Penfold, C.A., Breeze, E., Bowden, L., Moore, J.D. & Mead, A. 2013. A local regulatory network around three NAC transcription factors in stress responses and senescence in *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal*, 75(1): 26-39.
 16. <http://www.arabidopsis.org> (Erişim tarihi: Nisan 2017).
 17. Huang, C.K., Lo, P.C., Huang, L.F., Wu, S.J., Yeh, C.H. & Lu, C.A. 2015. A single-repeat MYB transcription repressor, MYBH, participates in regulation of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 88(3): 269-286.
 18. Jaradat, M.R., Feurtado, J.A., Huang, D., Lu, Y. & Cutler, A.J. 2013. Multiple roles of the transcription factor AtMYBR1/AtMYB44 in ABA signaling, stress responses, and leaf senescence. *BMC Plant Biology*, 13: 192.
 19. Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reports*, 5: 387-405.
 20. Jefferson, R.A. 1989. The GUS reporter gene system. *Nature*, 342: 837-838.
 21. Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. & Bevan, M.W. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, 6: 3901-3907.
 22. Jung, C., Shim, J.S. & Seo, J.S. 2010. Non-specific phytohormonal induction of atMYB44 and suppression of jasmonate-responsive gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Molecules and Cells*, 29:71-76.
 23. Karcher, S.J. 2002. Blue plants: Transgenic plants with the GUS reporter gene. Pages 29-42. In: Tested studies for laboratory teaching, Volume 23 (M. A. O'Donnell, Editor). Proceedings of the 23rd Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 392 s.
 24. Kim, H.J., Nam, H.G. & Lim, P.O. 2016. Regulatory network of NAC transcription factors in leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology*, 33: 48-56.
 25. Kucharewicz, W., Distelfeld, A., Bilger, W., Müller, M., Munné-Bosch, S., Hensel, G. & Krupinska, K. 2017. Acceleration of leaf senescence is slowed down in transgenic barley plants deficient in the DNA/RNA-binding protein WHIRLY1. *Journal of Experimental Botany*, 68(5): 983-996.
 26. Li, Z., Peng, J., Wen, X. & Guo, H. 2013. Ethylene-insensitive3 is a senescence-associated gene that accelerates age-dependent leaf senescence by directly repressing *miR164* transcription in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25: 3311-3328.
 27. Lim, P.O., Kim, H.J. & Nam, H.G. 2007. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 58: 115-136.
 28. Lin, J.F. & Wu, S.H. 2004. Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal*, 39: 612-628.
 29. Lindemose, S., Jensen, M.K., de Velde, J.V., O'Shea, C., Heyndrickx, K.S., Workman, C.T., Vandepoele, K., Skriver, K. & Masi, F.D. 2014. A DNA-binding-site landscape and regulatory network analysis for NAC transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 42: 7681-7693.
 30. Martins, M.T.B., de Souza, W.R., Cunha, B.A.D.B., Basso, M.F., Oliveira, N.G., Vinecky, F. & Buckeridge, M.S. 2016. Characterization of sugarcane (*Saccharum* spp.) leaf senescence: implications for biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1): 153-157.
 31. Nguyen H.T.K., Kim S.Y., Cho K-M., Hong J.V., Shin J.S. & Kim H.J. 2016. A Transcription Factor γ MYB1 Binds to the P1BS cis -Element and Activates PLA 2 - γ Expression with its Co-Activator γ MYB2. *Plant Cell Physiology*, 57(4): 784-797.
 32. Nuruzzaman, M., Manimekalai, R., Sharoni, A.M., Satoh, K., Kondoh, H., Ooka, H. & Kikuchi, S. 2010. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene*, 465(1): 30-44.
 33. Pourtau, N., Jennings, R., Pelzer, E., Pallas, J. & Wingler, A. 2006. Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta*, 224(3): 556-568.
 34. Puranik, S., Sahu, P.P., Srivastava, P.S. & Prasad, M. 2012. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends Plant Science*, 17: 369-381.
 35. Qiu, J., Sun, S., Luo, S., Zhang, J., Xiao, X., Zhang, L., Wang, F. & Liu, S. 2014. *Arabidopsis* AtPAP1 transcription factor induces anthocyanin production in transgenic *Taraxacum brevicorniculatum*. *Plant Cell Reports*, 33(4): 669-680.
 36. Rauf M., Arif M., Dortay H., Matallana-Ramirez L.P., Waters M.T., Gil Nam H., Lim P.O., Mueller-Roeber, M. & Balazadeh, S. 2013. ORE1 balances leaf senescence against maintenance by antagonizing G2-like-mediated transcription. *EMBO Reports*, 14: 382-388.
 37. Riechmann, J.L. & Ratcliffe, O.J. 2000. A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(5): 423-434.
 38. Sakuraba, Y., Jeong, J., Kang, M.Y., Kim, J., Paek, N.C. & Choi, G. 2014. Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 5: 4636.
 39. Sobieszczuk-Nowicka, E., Zmienko, A., Samelak-Czajka, A., Luczak, M., Pietrowska-Borek, M., Iorio, R., Del Duca,

- S., Figlerowicz, M. & Legocka, J. 2015. Dark-induced senescence of barley leaves involves activation of plastid transglutaminases. *Aminoacids*, 47: 825-838.
40. Tran, L.S.P., Nakashima, K. & Sakuma, Y. 2004. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell*, 16: 2481-2498.
41. Van der Graff, E., Schwake, R., Schneider, A., Desimone, M., Flugge, U.I. & Kunze, R. 2006. Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiology*, 141: 776-792.
42. Woo, H.R., Kim, J.H. & Kim, J. 2010. The RAV1 transcription factor positively regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 61: 3947-3957.
43. Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G. & Yunping, S. 2006. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Molecular Biology*, 60(1): 107-124.
44. Yu, L., Chen, H., Guan, Q., Ma, X., Zheng, X., Zou, C. & Li, Q. 2012. AtMYB2 transcription factor can interact with the CMO promoter and regulate its downstream gene expression. *Biotechnological Letter*, 34 (9): 1749-1755.
45. Zhang, H. & Zhou, C. 2013. Signal transduction in leaf senescence. *Plant Molecular Biology*, 82: 539-545.
46. Zhang, X., Ju, H.W., Chung, M.S., Huang, P., Ahn, S.J. & Kim, C.S. 2011. The R-R-type MYB-like transcription factor, AtMYBL, is involved in promoting leaf senescence and modulates an abiotic stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 52: 138-148
47. Zhang Y., Liu Z., Chen Y., He J-X. & Bi Y. 2015. Phytochrome-Interacting Factor 5 (PIF5) positively regulates dark-induced senescence and chlorophyll degradation in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 237: 57-68.
48. Zhao, Y., Chan, Z., Gao, J., Xing, L., Cao, M., Yu, C. & Gong, Y. 2016. ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(7): 1949-1954.
49. Zheng, X.-Y., Spivey, N.W., Zeng, W., Liu, P.-P., Fu, Z.Q., Klessig, D.F., He, S.Y. & Dong, X. 2012. Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe*, 11: 587-596.
50. Zheng, Z.L., Nafisi, M., Tam, A., Li, H., Crowell, D.N., Chary, S.N. & Yang, Z. 2002. Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14(11): 2787-2797.
51. Zhu, X., Chen, J., Xie, Z., Gao, J., Ren, G., Gao, S. & Kuai, B. 2015. Jasmonic acid promotes degreening via MYC2/3/4-and ANAC019/055/072-mediated regulation of major chlorophyll catabolic genes. *The Plant Journal*, 84(3): 597-610.

ERİTROSİTLERDE *in vitro* OKSİDATİF STRESE KARŞI ANTİOKSİDAN OLARAK DEĞERLENDİRİLEN ÇEŞİTLİ BİTKİ EKSTRAKTARI

Seda BALKAN

Kırklareli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 39100, Kırklareli
Corresponding author: e-mail: balkan.seda@hotmail.com

Alınış (Received): 14 Mart 2017, Kabul (Accepted): 25 Haziran 2017, Erken Görünüm (Online First): 02 Ağustos 2017, Basım (Published): 15 Aralık 2017

Özet: Son yıllarda pek çok hastalığın patogenezinde oksidatif stresin etken olması araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Eritrositler tüm vücut dokuları ve organları ile iletişim halinde olan, oksidatif strese karşı en hassas hücre gruplarından biridir. Bu nedenle oksidatif stresin olumsuz etkilerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda eritrosit hücreleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte oksidatif stresin olumsuz etkilerinin azaltılabilmesi veya yok edilebilmesi için doğal kaynaklı antioksidan maddelerin arayışı ile ilgili çalışma sayısı her geçen gün artmaktadır. Bu doğal kaynaklı antioksidan maddelerin tespiti için yapılan çalışmalarda çoğunlukla bitki ekstraktlarından yararlanılmakta ve bu ekstraktların antioksidan kapasiteleri araştırılmaktadır. Bu çalışmada, eritrositlerde oksidatif stresin meydana getirilme yolları ve oksidatif strese karşı kullanılan bitki ekstraktları ile ilgili bilgilere yer verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bitki ekstraktı, oksidatif stres, eritrosit, *in vitro*.

Various Plant Extracts Evaluated as Antioxidant Against *in vitro* Oxidative Stress in Erythrocytes

Abstract: The role of oxidative stress in pathogenesis of many diseases has interested researchers in recent years. Erythrocytes are in contact with all organs and tissues and are one of the most vulnerable cell types against oxidative stress. Therefore, erythrocyte cells are commonly used in studies performed to reveal negative effects of oxidative stress. On the other hand, the number of studies carried out with the aim of finding natural antioxidants to reduce or neutralize negative effects of oxidative stress is increasing day by day. Plant extracts are mostly used in these studies and antioxidant effects of these extracts are investigated. In the present study, current data on the means of producing oxidative stress in erythrocytes and the plant extracts used against oxidative stress were reviewed.

Key words: Plant extract, oxidative stress, erythrocyte, *in vitro*.

Giriş

Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada, oksidatif stresin pek çok hastalığın patogenezinde rol aldığı gösterilmektedir. Oksidatif stres ile ilişkili hastalıkların başında; kardiyolojik hastalıklar (Griendling ve Fitz 2003), nörolojik hastalıklar (Ameer 2016), diyabet (Salgueiro ve ark. 2013, Viskupicova ve ark. 2015), romatolojik hastalıklar, kanser (Mehta ve ark. 2016) ve yaşlanma (Lucas ve ark. 2016, Tarry-Adkins ve ark. 2016) gelmektedir. Oksidatif stresin bu kadar çok hastalığın patogenezinde yer alışı araştırmacıların büyük ilgisini çekmektedir. Çeşitli yollar ile bu olumsuz etkilerin azaltılması veya yok edilmesi için yapılan araştırma sayısı her geçen gün artmaktadır (Suboh ve ark. 2004, Ajila ve Prasada Rao 2008, Yang ve ark. 2012, Sompong ve ark. 2015, Ameer 2016).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Eğer ROS/antioksidan savunma sistemi dengede ise birey sağlıklıdır (Memişoğulları 2005).

Normal metabolizma sonucu hidroksil radikali (HO \cdot), süperoksit radikali (O $_2^{\cdot-}$), nitrik oksit (NO \cdot), peroksil radikali (ROO \cdot) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$) ve singlet oksijen (1 O $_2$) gibi ROS'lar sürekli olarak üretilir. Ancak bu üretim gerçekleştirilirken hızlı bir şekilde antioksidan savunma sistemi tarafından bu radikaller temizlenerek bir denge sağlanmaktadır (Arbos ve ark. 2008). Antioksidan savunma sisteminde yer alan antioksidanlar temelde eksojen ve endojen kaynaklı olarak sınıflandırılır. Eksojen kaynaklı antioksidanlar; karoten, C, A ve E vitamini olarak sıralanabilir. Endojen kaynaklı antioksidanlar arasında; melatonin, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), magnezyum (Mg), selenyum (Se), E vitamini, urat, miyogloblin, hemogloblin, ferritin, glutatyon (GSH), bilirubin sayılabilir (Yılmaz 2010). Oksidatif stres ile ilgili yapılan çalışmalarda ROS/antioksidan savunma sistemindeki dengenin bozulup bozulmadığını tespit etmek için çoğunlukla

endojen kaynaklı antioksidan enzimlerin aktivite değerleri ölçülmektedir.

Eritrositler tüm vücut dokuları ve organları ile iletişim halinde olduğundan hassastır. Eritrositlerdeki kantitatif veya kalitatif değişimler hemostasinin değişimi için oldukça önemlidir (Mikashinovich ve Belousova 2016). Bir taraftan protein sentez mekanizmasından yoksun olmaları, nükleus, mitokondri ve ribozomlarının olmaması ve diğer pek çok hücreye nazaran daha az organel ve hücre içi fonksiyona sahip olmaları nedeni ile basit bir hücre modeline sahip olduğu kabul edilir. Diğer taraftan membranları ile aktif ve pasif taşıma, oksijen taşıma proteinini olan hemoglobin ile dokular ve akciğer arasında O₂ ve CO₂ taşınımı ve enerji üretiminden sorumlu enzimler içermesi ile enerji metabolizmasında yer alması gibi önemli fonksiyonları gerçekleştirebildikleri için de büyük öneme sahiptirler (Arbos ve ark. 2008).

Eritrositler, ROS'lardan etkilenen ilk hücreler arasında olduğu için oksidatif stres çalışmalarında oldukça geniş çapta kullanılmaktadır (Carl ve ark. 2016). Çünkü eritrositlerin membranlarında oldukça yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) ve yapısında oksidasyonu katalizleyen hemoglobindeki ferro demiri (Fe²⁺) bulunmaktadır. Bunlar da ROS'ların saldırısı için eritrositlerin hassas olmasına yol açmaktadır (Khalili ve ark. 2014). Oksidanlar, eritrosit membranlarında önemli değişikliklere neden olurlar. Eritrositlerin şekillerinde anormallığe yol açacak yüksek molekül ağırlığına sahip proteinler üretebilir ve iskelet protein içeriğini azaltarak etki gösterebilir (Suwalsky ve ark. 2007). Tüm bu etkiler sonucunda lipid peroksidasyonu (LPO) meydana gelmektedir. LPO'nun meydana gelişini en iyi karakterize eden bileşik malondialdehid (MDA)'dir. MDA, eritrositlerin membranlarındaki fosfolipid ve proteinler arasındaki çapraz bağlara bağlanarak hemolize neden olur. Bu da eritrositlerin yaşam süresini normalden daha kısa hale getirir veya normal olan eritrosit hücrelerinin senesensine neden olur (Yang ve ark. 2006, Okoko ve Ere 2012). Bu nedenle MDA ve % hemoliz değerlerinin ölçümü oksidatif stres hakkında bilgi sahibi olmanın en etkili yollarından biridir.

Bu derlemede öncelikle, yapılan çalışmalarda eritrositlerde oksidatif stresin hangi yollar ile meydana getirildiği incelenmiştir. Aynı zamanda, eritrositlerde önemli anormalliklere neden olan oksidatif strese karşı hangi bitki ekstraktlarının kullanıldığı ve bunların hangi antioksidan parametreler üzerinde etkili olduğuna dair literatür taraması yapılarak bu konulardaki bazı çalışmalardan örnekler sunulmuştur.

Eritrositlerde Oksidatif Stres ve Hiperglisemi

Eritrositlerde oksidatif stresin oluşurulma yollarından biri hiperglisemi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle eritrositlerde hipergliseminin neden olduğu oksidatif stresle ilgili çalışmaların pek çoğunda, ya *in vitro* olarak eritrositlere glukoz (Jain ve ark. 1999, Nandhini ve Anuradha 2003, Marar 2011, Salgueiro ve ark. 2013,

Sompong ve ark. 2015, Viskupicova ve ark. 2015), ya da streptozotosin (STZ) uygulanmıştır (Taleb-Senouci ve ark. 2009, Aydın ve Çelik 2012, Demir ve Yılmaz 2014). Hipergliseminin antioksidan savunma sisteminin kapasitesini azalttığı ve bu sayede ROS'ların üretiminde artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Demir ve Yılmaz 2014). ROS'ların artışı oksidatif hasara, DNA, protein, membran lipidlerinin yapısında ve fonksiyonunda değişikliğe yol açtığı ve hücre içi GSH düzeyini azalttığı yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır (Sompong ve ark. 2015). Bu güne kadar yapılan çalışmalarda eritrositlere sıklıkla uygulanan glukoz düzeyleri; 5mM, 6mM, 30mM, 40mM, 45mM ve 50mM olarak tespit edilmiştir. 5mM ve 6mM glukoz düzeyleri kontrol gruplarında kullanılan konsantrasyonlar; 30mM, 35mM, 45mM ve 50mM glukoz düzeyleri ılımlı glukoz konsantrasyonları; 100mM, 250mM ve 500mM glukoz düzeyleri yüksek glukoz konsantrasyonları olarak (Jain 1989, Jain ve ark. 1999, Jain ve Lim 2001, Nandhini ve Anuradha 2003, Marar 2011, Salgueiro ve ark. 2013, Sompong ve ark. 2015, Viskupicova ve ark. 2015) eritrositlere *in vitro* olarak uygulanmıştır. Özellikle yüksek glukoz düzeyleri ile kontrol glukoz düzeyleri uygulanan grupların karşılaştırıldığı çalışmalarda, yüksek glukoz düzeylerinin LPO ürünü olan MDA'nın artışına neden olduğu açıkça gözlemlenmiştir (Salgueiro ve ark. 2013). STZ uygulanması sonucu hiperglisemi oluşturulan çalışmalarda ise genellikle 45mg/kg, 60mg/kg veya 65mg/kg arasındaki dozların uygulandığı görülmüştür. Eritrositlerde, uygulanan bu dozlarda MDA değerlerinde artış, GSH, CAT, GSH-Px ve SOD aktivite değerlerinde ise azalış tespit edilmiş ve bu değişimlerin oksidatif hasarın göstergesi olabileceği belirtilmiştir (Taleb-Senouci ve ark. 2009, Aydın ve Çelik 2012, Demir ve Yılmaz 2014). Bazı çalışmalarda ise *in vitro* hiperglisemi oluşturulmak yerine Tip 2 diyabet tanısı konmuş bireylerden alınan kan örnekleri kullanılmıştır (Halifeoğlu ve ark. 2005, De Bona ve ark. 2011). Bu çalışmalarda yine oksidatif hasarın tespit edilebilmesi için sağlıklı bireylerden alınan kan örnekleri ile karşılaştırma yapılarak adenoazin deaminaz (ADA), asetilkolin esteraz (AChE), SOD, CAT ve tiyobarbitürik asit- reaktif madde (TBARS) değerleri ölçülmüş ve oksidatif hasar bulguları elde edilmiştir (De Bona ve ark. 2011). Tüm yapılan bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar hipergliseminin eritrositlerde MDA artışına ve antioksidan savunma enzimlerinin (CAT, GSH-Px, SOD ve ADA) aktivite değerlerinde azalışa neden olduğu açıkça görülmektedir. Çalışmalarda eritrositlerde elde edilen bu değişimler hipergliseminin oksidatif stresi meydana getiren en önemli göstergeleri olarak kabul edilebilirler.

Eritrositlerde Oksidatif Stres ve Hidrojen Peroksit

Eritrositlerde *in vitro* olarak oksidatif stresin oluşturulma yollarından bir diğeri ise hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulanmasıdır. H₂O₂ eritrosit membranlarından geçebilen, hızlıca hemoglobin ile reaksiyona girebilen ve hidrosil radikali gibi çok reaktif olan ROS'ları üretebilen bir bileşik olarak bilinmektedir (Van der Berg ve ark. 1992). H₂O₂ ile muamele edilen eritrositlerde LPO,

protein degradasyonu ve konsantrasyonlarında deformasyon kaybı gerçekleşmektedir (Srouf ve ark. 2000). Tüm bu etkiler oksidatif hasarın göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu güne kadar yapılan eritrosit çalışmalarında oksidatif hasar meydana getirebilmek için en çok uygulanan H_2O_2 dozları; $100\mu M$ (Ajila ve Prasada Rao 2008, Okoko ve Ere 2012, Rajesh ve ark. 2013), $20mM$ (Suboh ve ark. 2004) ve $1,3M$ (Nuchanart ve ark. 2012)'dur. Rocha ve ark. (2015) ise diğer araştırmacılar farklı olarak H_2O_2 'nin farklı dozlarının (0, 5, 10, 20, 40 ve $80\mu M$) etkilerini eritrositler üzerinde test etmişlerdir. $100\mu M H_2O_2$ uygulanan eritrositlerin şekillerinde önemli ölçüde değişimler olduğu ışık ve elektron mikroskobu incelemelerinde gözlemlenmiştir. Eritrositlerin gerçek şekillerini kaybederek çoğunlukla ekinosit (Burr cell) şekline dönüştüğü ifade edilmiştir (Ajila ve Prasada Rao 2008, Rajesh ve ark. 2013). Snyder ve ark. (1985) eritrositlerde bu şekil değişikliğinin H_2O_2 'nin eritrosit membranındaki spektrin ve hemoglobine bağlanarak, hemolize neden olarak, membrandaki fosfolipid organizasyonunda, yüzey basıncında ve hücre yüzey bileşenlerinde değişime yol açarak gerçekleştirdiği belirtmişlerdir. H_2O_2 uygulanan eritrositlerde oksidatif stresin yol açtığı hasarların tespiti için CAT, GSH-Px, MDA ve hemoliz düzeyleri incelenmiş H_2O_2 'nin bu parametreler için önemli ölçüde eritrositlerde oksidatif hasara neden olduğu rapor edilmiştir (Suboh ve ark. 2004, Nuchanart ve ark. 2012, Rocha ve ark. 2015). Suboh ve ark. (2004) ile Rocha ve ark. (2015) eritrosit MDA değerlerinde; Nuchanart ve ark. (2012) ise eritrosit hemoliz değerlerinde H_2O_2 uygulanması sonucunda artış olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı zamanda Rocha ve ark. (2015) CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinde azalış olduğunu belirterek H_2O_2 'nin eritrositlerdeki oksidatif hasarını kanıtlamışlardır.

Eritrositlerde Oksidatif Stres ve Pestisitler

Pestisitler istenmeyen zararlı bitki, hayvan ve mantarları öldürmek amacıyla kullanılan fiziksel, kimyasal veya biyolojik sentetik ajanlardır. Bu sentetik ajanların, biyolojik sistemler üzerindeki toksik etkilerinden en önemlisi oksidatif strese neden olabilmeleridir. Hücrelerde ROS seviyesini arttırabilirler, hücre metabolizmasında GSH gibi indirgeyicilerin rezervlerini tüketebilirler ve antioksidan potansiyelini azaltabilirler. Sonuçta tüm bu etkiler göz önüne alındığında oksidatif stresin oluşumunu tetikleyebilirler (Kaymak ve ark. 2014). Örneğin Singh ve ark. (2010) atrazini, Kumar ve ark (2015) ise sipermetrini eritrositlerde oksidatif stresi tetiklemek için test etmişlerdir. Her iki çalışmada da eritrositlerin GSH içeriği, SOD, CAT, GSH-Px, glutatyon-s-transferaz (GST) ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) aktivitelerine MDA değerleri ölçülmüştür. Singh ve ark. (2010) sıçanlara oral yolla $300mg/kg$ v.a. gün atrazini 7, 14 ve 21 gün boyunca uyguladıkları çalışmalarında; SOD, CAT, GSH-Px ve GST antioksidan enzim aktivitelerinde artış, G6PD enzim aktivitesinde ve GSH değerinde azalış olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte Kumar ve ark. (2015) sıçanlara oral yolla 28 gün boyunca $50mg/kg$

sipermetrin uygulamışlar ve Singh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçlarına benzer olarak CAT, GSH-Px ve GST antioksidan enzim aktivitelerinde artış, GSH değerinde azalış ve MDA değerinde artış tespit etmişlerdir. Her iki çalışma sonuçlarında da bu değişimlerin pestisitlerin yol açtığı oksidatif stresten kaynaklandığı dile getirilmiştir.

Eritrositlerde Oksidatif Stres ve Ekzojen Kaynaklı Radikaller

Oksidatif stres oluşturmak için kullanılan kaynakların bir diğeri ise hücrelere uygulan ekzojen kaynaklı radikallerdir. Bu radikaller hücrelerde proteinlerin -SH gruplarında, lisin residülerinde, kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon, membranlarda deformasyon ve lizis gibi çeşitli yollarla oksidatif hasara neden olurlar (Suwalsky ve ark. 2007). Bu radikallerin uygun kaynaklardan seçilmesi önemlidir. Özellikle eritrosit çalışmalarında kullanılan radikallerden biri 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorit (AAPH) tir (Gabrielska ve ark. 2007, Bonarska-Kujawa ve ark. 2014). AAPH, suda azo bileşiklerine çözünebilen bir maddedir. Azo bileşikleri oksidasyon reaksiyonlarının başlatıcısı olarak kabul edilir ve bu nedenle özellikle eritrositlerde LPO çalışmalarında ve antioksidan etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda sıklıkla kullanılırlar (He ve ark. 2013). Eritrositlerde oksidatif stres çalışmalarında kullanılan diğer radikaller ise tert butil-hidroperoksit (t-BuOOH/t-BHP), difenil-2-pikrilhidrazil hidrat (DPPH·) ve hipokloröz asit (HClO) tir (Suwalsky ve ark. 2007, Arbos ve ark. 2008, Maurya ve Rizvi 2009, Olchowik ve ark. 2012). Ekzojen kaynaklı radikaller ile yapılan bu çalışmalarda oksidatif hasar belirleyicisi olarak ölçülen parametrelerden MDA ve hemoliz değerlerinde artış, GSH değerlerinde ise azalış ortak olarak belirlenen parametrelerdendir. Bu sonuçlar göz önüne alınarak, bu ekzojen kaynaklı radikallerin oksidatif stresin oluşumunu tetiklediği söylenebilir.

Eritrositlerde Oksidatif Strese Neden Olan Diğer Maddeler

Pek çok çalışmada Dünya'da yaygın bir şekilde tatlandırıcı olarak kullanılan aspartamın karaciğer, böbrek ve pankreas üzerinde toksik etkilere sahip olduğu vurgulanmıştır (Nguyeni ve ark. 1998, Leme ve Azoubel 2006, Abhilash ve ark. 2011). 2015 yılında Abhilash ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise aspartamın $50, 500$ ve $1000mg/kg$ v.a dozlarının eritrositlerde GSH-Px, GR enzim aktiviteleri ile GSH düzeylerinde değişime neden olduğu belirtilmiştir. Bu bulgular aspartamın eritrositler üzerinde yol açtığı oksidatif stresin bir sonucu oluşan toksik etkisini kanıtlamıştır.

Verma ve ark. tarafından sodyum florür'ün (NaF) (2006) ve aflatoksinin (2001) eritrositlerde meydana getirdiği hemoliz etkisi araştırılmıştır. Farklı dozlarda uygulanan NaF'nin ($50-500\mu g/ml$) özellikle yüksek dozlarının, aflatoksinin ise $1,95\mu M$ dozunun hemoliz etkisi arttırdığı rapor edilmiştir. Eritrositlerde hemoliz, LPO sonucu açığa çıkan MDA'nın membranlarda

fosfolipid ve proteinlere çapraz bağlanması sonucu meydana gelen hücre ölümüdür (Okokove Ere 2012). Yüksek dozda uygulanan NaF ve aflatoksinin oluşturduğu hemolizin oksidatif hasarın sonucu meydana geldiği söylenebilir.

Eritrositlerde Çeşitli Yollarla Meydana Getirilmiş Oksidatif Strese Karşı Antioksidan Olarak Kullanılan Bitki Ekstraktları

Birçok hastalığın etkeni olan oksidatif stresin olumsuz etkilerinin önlenmesi için doğal kaynaklara duyulan ihtiyaç her geçen gün artmakta ve sentetik maddelerin alınımı yerine bitkisel kaynaklarca zengin olan doğal diyetler tercih edilmektedir (Okoko ve Ere 2012). Sentetik maddelerin ciddi olumsuz yan etkiler oluşturması nedeniyle doğal kaynaklı bitkilerin medikal alanda kullanılması gerektiği pek çok çalışmada vurgulanmıştır (Rajesh ve ark. 2013). Bitkilerin içerdikleri flavonoid ve fenolik asitler gibi çeşitli bileşikler onlara antioksidan ve farmakolojik özellik kazandırmaktadır (Ajila ve Prasada Rao 2008). Bu nedenle son yıllarda bilim dünyası doğal kaynaklı bitkilerin biyolojik, farmakolojik ve medikal özelliklerini geniş çapta ve sürekli olarak araştırmaktadır (Krishnaiah ve ark. 2011).

Suboh ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada eritrositlerde H_2O_2 'nin neden olduğu oksidatif strese karşı uygulanmış *Artemis herba-alba* Asso., *Ferula hermonis* Boiss., *Hibiscus sabdariffa* L., *Nigella sativa* L., *Teucrium polium* L., *Trigonella foenum-graecum* L. ve *Allium sativum* L. bitkilerinin koruyucu etkileri araştırılmıştır. H_2O_2 uygulaması ile artan MDA değerlerinin *A. sativum* ve *N. sativa* bitki ekstraktlarının yüksek konsantrasyonlarında düşüş gösterdiği rapor edilmiştir. Bu sonuç test edilen bu bitkilerin H_2O_2 'nin meydana getirdiği oksidatif stres hasarına karşı eritrositlerde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Verma ve ark. (2006) NaF'nin (500µg/ml) eritrositlerde indüklediği hemolizin iyileştirilmesi için farklı dozlarda (2,5-100µg/ml) uygulanan siyah çay ekstraktlarını test etmişlerdir. Test edilen tüm dozlarda % hemoliz ve % hemoliz inhibisyon değerlerinde iyileşme meydana geldiğini belirtmişlerdir. Özellikle 40µg/ml dozda en düşük % hemoliz ve en yüksek % hemoliz inhibisyon değerlerini bularak siyah çay ekstraktlarının NaF'ın eritrositlerde meydana getirdiği oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi olabileceğini belirtmişlerdir.

AAPH ile oksidatif hasar oluşturulmuş eritrositlere *Bidens pilosa* L. bitkisinin farklı dozlarının (50, 100 ve 150µg/ml) etanol ekstraktları uygulandığında % hemoliz ve MDA değerlerinde azalış, GSH ve SOD aktivite değerlerinde artış bulunmuştur (Yang ve ark. 2006). Bu bulgular *B. pilosa* ekstraktlarının eritrositler üzerinde antioksidan koruyucu etkiye sahip olduğunu belirtmektedir.

Suwalsky ve ark. (2007) tarafından *Ugni molinae* Turcz bitkisinin, HClO ile muamele edilen eritrositlerdeki koruyucu etkisi % hemoliz değerleri ve SEM görüntüleri

ile değerlendirilmiştir. *U. molinae* ekstraktlarının % hemoliz değerlerini düşürdüğü ve SEM analizinde ise ekinosit oluşumunun azaldığı belirtilerek eritrositler üzerindeki koruyucu etkisi ispatlanmıştır.

Ajila ve Prasada'nın (2008) yaptığı çalışmada eritrositlerde H_2O_2 'nin neden olduğu oksidatif strese karşı mango (*Mangifera indica* L.) bitkisinin Raspuri ve Badami varyetelerinin kabuk ekstraktlarının koruyucu etkisi incelenmiştir. Bu iki varyetenin de olgunlaşmış ve olgunlaşmamış durumlarında elde edilen kabuklarından ayrı ayrı ekstraktlar hazırlanmış ve eritrositlere uygulanmıştır. Bu çalışma kapsamında yapılan hemoliz ve LPO inhibisyon ölçümleri ile birlikte SEM görüntüleri değerlendirilmiştir. Hemoliz ve LPO inhibisyonunda artışın bulunması ayrıca SEM incelemelerinde ise ekinosit sayısında azalışın gözlenmesi mango kabuk ekstraktlarının eritrositlerde oksidatif stresin neden olduğu hasarların önleyebilmesi için kullanılabilirliğini belirtmektedir.

Brassica oleracea L. subv. cymosa (brokoli), *Brassica oleracea* L. var. acephala (karalahana) ve *Raphanus sativus* L. var. radicular (turp) bitki ekstraktları DPPH uygulaması ile eritrositlerde meydana getirilen oksidatif hasara karşı koruyucu etki açısından analiz edilmiştir. Analiz edilen bitki ekstraktlarının özellikle brokolinin eritrositlerdeki methemoglobin oluşumunu azaltarak yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Arbos ve ark. 2008).

Genç, orta ve yaşlı bireylerden elde edilen eritrositlere, t-BHP uygulanarak meydana getirilen oksidatif strese karşı Dünya'da en yaygın olarak kullanılan çay (*Camellia sinensis* L. Kuntze) bitkisinin ekstraktları uygulanmış ve çayın koruyucu etkisini belirleyebilmek için MDA ve GSH değerleri ölçülmüştür. MDA değerlerinde azalışın, GSH değerlerinde ise artışın belirlenmesi çayın önemli ölçüde oksidatif stresi geriletmediği ve iyi bir antioksidan olarak koruyucu etkiye sahip olduğu hatta yaşlanmayı yavaşlattığı çalışma sonuçlarında vurgulanmıştır (Maurya ve Rizvi 2009).

Streptozotosin (60mg/kg v.a) uygulaması ile diyabetik yapılan sıçanlara %0,5 *Ajuga iva* (L.) Schreber.'nin sulu ekstraktları uygulanmış ve eritrositlerde SOD, GSH-Px ve GR enzim aktivite düzeyleri incelenmiştir. Bitki ekstraktlarının uygulandığı grup ile bitki ekstraktı uygulanmayan grup karşılaştırıldığında tüm enzim aktivitelerinde artış olduğu ve bu artışın *A.iva*'nın antioksidan etkisine bağlı olabileceği bildirilmiştir (Taleb-Senouci ve ark. 2009). Bu sonuçlar göz önüne alınarak hipergliseminin eritrositlerde yol açtığı oksidatif hasara karşı *A. iva*'nın koruyucu bir etkisinin olabileceğini söyleyebiliriz.

Tip 2 diyabete sahip olan kişilerden elde edilen eritrositlere uygulanan *Syzygium cumini* L. ekstraktlarının etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise 200µg/ml dozunun MDA düzeyini önemli ölçüde azalttığı ve bu nedenden dolayı bir antioksidan olarak kullanılabilirliği vurgulanmıştır (De Bona ve ark. 2011).

Imaga ve ark. (2011) orak hücreli eritrositlerde, Okoko ve Ere (2012) H₂O₂ uygulanan eritrositlerde *Carica papaya* L. bitkisinin antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Her iki çalışmada yapılan ölçümler sonucu *C. papaya*'nın yüksek dozlarının oksidatif hasarı azaltabildiği gözlenmiştir. % hemoliz ve % LPO değerlerinde azalış tespit etmişlerdir. Bu bulgular *C. papaya*'nın antioksidan olarak kullanılabileceğini açıkça göstermektedir.

Brassicaceae familyasına ait mor lahanaya ve brüksel lahanasının polifenol ekstraktlarının farklı dozları (0, 5, 10, 20µmol/l) hiperkolesterolemik ve normal eritrositlerde özellikle yüksek dozların LPO'yu azalttığı belirtilmiştir (Duchnowicz ve ark. 2012). Oksidatif stres sonucu meydana gelen LPO'nun azaltılabilmesi bu bitki ekstraktının oksidatif strese karşı kullanılabilirlik antioksidanlardan biri olabileceği söylenebilir.

Olchowik ve ark. (2012) tarafından t-BOOH radikali ile eritrositlerde oluşturulan oksidatif hasara karşı *Rhus typhina* L. Staghorn sumac'ın (sumak) farklı dozlarının (0-30µg/ml) % GSH ve % TBARS inhibisyon değerlerinin arttığını bularak *R. typhina*'nın yüksek ve etkili antioksidan kapasiteye sahip olabileceğini rapor etmişlerdir.

Brezilya'da çay olarak tüketilen *Bauhinia forficata* Link.'in yüksek glukoz uygulanan eritrositlere etkileri Salgueiro ve ark. (2013) tarafından araştırılmıştır. Yüksek glukoz uygulandığında artan MDA değerleri, *B. forficata*'nın 0,1, 1 ve 10µg/ml dozları uygulandığında düşüş göstermesi nedeniyle bu bitkinin iyi bir antioksidan olabileceği savunulmuştur.

Lonicera caerulea L. var. *kamtschatica* Sevast. (mavi hanımeli) bitkisinin yaprakları ve meyvesinden hazırlanan ekstraktlar, AAPH ile oksidatif hasar oluşturulmuş eritrositlere karşı SEM görüntüleri değerlendirildiğinde koruyucu etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Bonarska-Kujawa ve ark. 2014).

Orbanche orientalis G. Beck, *Cucumis melo* L., *Albizia julibrissin* Durazz, *Galium verum* L., *Scutellaria tournefortii* Benth., *Crocus caspius* Fisher & Meyer, *Sambucus ebulus* L., *Danae racemosa* L., *Rubus fruticosus* L. ve *Artemisia absinthium* L. bitkileri ile yapılan farklı bir çalışmada ise, bu bitkilerden elde edilen ekstraktların 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 ve 4,0mg/ml dozları eritrositlere uygulanmıştır. % Hemoliz değerleri ölçüldüğünde en düşük % hemoliz değerleri *G. verum* ve *S. tournefortii* ekstraktlarında tespit edilmiştir. Bu nedenle bu iki bitkinin farmakoloji endüstrisinde doğal bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir (Khalili ve ark. 2014).

Kaynaklar

1. Abhilash, M., Paul, M.V., Varghese, M.V. & Nair, H.R. 2011. Effect of long-term intake of aspartame on antioxidant defence status in liver. *Food Chemical Toxicology*, 49: 1203-1207.
2. Abhilash, M., Varghese, M.V., Paul, M.V., Manju, A. & Nair, H.R. 2015. Effect of long-term intake of aspartame on serum biochemical parameters and erythrocyte oxidative

stress biomarkers in rats. *Comparative Clinical Pathology*, 24: 927-933.

Cezayir'in farklı bölgelerinden toplanan *Morettia canescens* Boiss., *Tamarix aphylla* L. Korst., *Calotropis procera* Ait., *Paronychia chlorothyrsa* Murb., *Paronychia argentea* Lam., *Thymelaea hirsuta* L., *Haloxylon scoparium* Pomel., *Arthropodium schmittianum* Pomel. ve *Daphnia gnidium* L. bitkilerinin ekstraktları eritrositlerdeki hemolitik aktiviteyi belirlemek için kullanılmıştır. *D. gnidium*, *M. canescens* ve *T. aphylla* bitki ekstraktlarının % hemoliz inhibisyon değerleri yüksek oranlarda olduğu için farmakolojik olarak kullanılabilirliği vurgulanmıştır (Zohra ve Fawzia 2014).

Tupe ve ark. (2015) tarafından *Azadirachta indica* A. Juss., *Emblica officinalis* Gaertn., *Syzygium cumini* L. Skeels. ve *Terminalia bellirica* Roxb. bitkilerinin ekstraktları (1mg/ml) eritrositlerde glikolizasyon ile indüklenmiş oksidatif strese karşı koruyucu etki açısından araştırılmıştır. *T. bellirica* ve *E. officinalis* % LPO ve % hemoliz inhibisyon değerleri diğer bitkilere göre daha yüksek olduğu için oksidatif strese karşı koruyucu etkilerinin daha fazla olduğu bildirilmiştir.

Sonuç

Bu derlemede, bu güne kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde; eritrositlerde oksidatif stresin, glukoz, hidrojen peroksit, pestisit ve çeşitli ekzojen kaynaklı radikaller ile *in vitro* olarak meydana getirilebildiği tespit edilmiştir. Meydana getirilen bu oksidatif stresin olumsuz etkilerinin önlenmesi için doğal kaynaklı bitkilerin antioksidan ve koruyuculuk özellikleri değerlendirilmiştir. Bu konu ile ilgili yapılan eritrosit çalışmalarının pek çoğunda, oksidatif hasarın ve bu hasara karşı koruyucu etkilerin tespiti için değerlendirilen parametreler; % hemoliz, % LPO, MDA, GSH, antioksidan enzim aktivite (SOD, CAT, GSH-Px, GST) değerleri ve SEM görüntüleridir. Eritrositlerde oksidatif hasar sonucu % hemoliz, % hemoliz inhibisyonu, % LPO ve MDA değerlerinde artış, antioksidan enzim değerlerinde genellikle azalış ve SEM görüntülerinde de ekinosit sayısında artış olduğu yapılan çalışmalarda açıkça görülmektedir. Bununla birlikte bitki ekstraktlarının koruyucu etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda ise antioksidan aktiviteye sahip bitkilerin ekstraktlarının % hemoliz, % LPO ve MDA değerlerinde azalış, % hemoliz inhibisyonu ve antioksidan enzim değerlerinde genellikle artış ve SEM görüntülerinde ise ekinosit sayısında azalış olduğu gözlenmiştir. Bundan sonra bu konuda çalışma yapacak araştırmacılara, derlememizde verilen bilgilerin ışık tutabileceği düşünülmektedir.

3. Ajila, C.M.& Prasada Rao, U.J.S. 2008. Protection against hydrogen peroxide induced oxidative damage in rat erythrocytes by *Mangifera indica* L. peel extract. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 303-309.

4. Ameer, K. 2016. Avocado as a Major Dietary Source of Antioxidants and Its Preventive Role in Neurodegenerative Diseases. *Advances Neurobiology*, 12: 337-354.
5. Arbos, K.A., Claro, L.M., Borges, L., Santos, C.A.M. & Weffort-Santos, A.M. 2008. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research*, 28: 457-463.
6. Aydın, M. & Çelik, S. 2012. Effects of lycopene on plasma glucose, insulin levels, oxidative stress, and body weights of streptozotocin-induced diabetic rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 42(2): 1406-1413.
7. Bonarska-Kujawa, D., Pruchnik, H., Cyboran, S., Zylka, R., Oszmianski, J. & Kleszczynska, H. 2014. Biophysical mechanism of the protective effect of blue honeysuckle polyphenols extracts against lipid peroxidation of erythrocyte and lipid membrane. *Journal Membrane Biology*, 247: 611-625.
8. Carl, H., Soumya, R., Srinivas, P. & Vani, R. 2016. Oxidative stress in erythrocytes of banked ABO blood. *Hematology*, 21(10): 630-634.
9. De Bona, K.S., Belle, L.P., Bittencourt, P.E.R., Bonfanti, G., Cargnelluti, L.O., Pimentel, V.C., Ruviano, A.R., Schetinger, M.R.C., Emanuelli, T. & Moretto M.B., 2011. Erythrocytic enzymes and antioxidant status in people with type 2 diabetes: Beneficial effect of *Syzygium cumini* leaf extract in vitro. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 94: 84-90.
10. Demir, E. & Yılmaz, Ö. 2014. Streptozotocin ile Tip-1 diyabet oluşturulan sıçanlarda acı badem yağının serum ve eritrositlerdeki bazı biyokimyasal parametrelere etkisi. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 18: 13-21.
11. Duchnowicz, P., Bors, M., Podsedek, A., Koter-Michalak, M. & Broncel, M. 2012. Effect of polyphenol extracts from *Brassica* vegetables on erythrocytes membrane (in vitro study). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34: 783-790.
12. Gabrielska, J., Korzeniowska, M. & Wojdyto, A. 2007. Antioxidative effect of plant extracts and flavones on liposome and erythrocyte membranes. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57(4): 145-150.
13. Griendling, K.K. & Fitz, G.A. 2003. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation*, 108: 2034-2040.
14. Halifeoğlu, İ., Karataş, F., Çolak, R., Canatan, H. & Telo, S. 2005. Tip 2 diyabetik hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası oksidan ve antioksidan durum. *Fırat Tıp Dergisi*, 10(3): 117-122.
15. He, R.R., Yan, L., Li, X.D., Yi, R.N., Wang, X.Y., Tsoi, B., Lee, K.H.H., Abe, K., Yang, X. & Kurihara H. 2013. A New Oxidative Stress Model, 2,2-Azobis (2-Amidinopropane) Dihydrochloride Induces Cardiovascular Damages in Chicken Embryo. *Plos One*, 8(3): 1-11.
16. Imaga, O.A., Esther, A., Samson, O. & Akindele, S.K. 2011. In vitro biochemical investigations of the effects of *Carica papaya* and *Fagara zanthoxyloides* on antioxidant status and sickle erythrocytes. *African Journal of Biochemistry Research*, 5(8): 226-236.
17. Jain, S.K. 1989. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cell. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(35): 21340-21345.
18. Jain, K.J., Palmer, M. & Chen, Y. 1999. Effect of vitamin E and *N*-acetylcysteine on phosphatidylserine externalization and induction of coagulation by high-glucose-treated human erythrocytes. *Metabolism*, 48(8): 957-959.
19. Jain, S.K. & Lim G., 2001. Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na⁺ + K⁺) ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocyte. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(3): 232-238.
20. Kaymak, G., Akbulut, C., Esmer, H.E., Kayhan, F.E. & Yön, N.D. 2014. Sucul organizmalarda çevresel şartlara karşı geliştirilen oksidatif stres mekanizmaları ve adaptif yanıtlar. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 4: 137-151.
21. Khalili, M., Ebrahimzadeh, M.A. & Safdari, Y. 2014. Antihaemolytic activity of thirty herbal extracts in mouse red blood cell. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 65: 399-406.
22. Krishnaiah, D., Sarbatly, R. & Rajesh, N. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioprocess Technology*, 89: 217-233.
23. Kumar, A., Rahal, A., Zoheb S.M., Prakash, A. & Mandil, R. 2015. Antioxidant role of ascorbic acid on oxidative stress induced by sub-acute exposure of lead and cypermethrin in erythrocytes of Wistar rats. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 96(8): 1248-1259.
24. Leme, F.A.G.L. & Azoubel, R. 2006. Effects of aspartame on the exocrine pancreas of rat fetuses. *International Journal of Morphology*, 24(4): 679-684.
25. Lucas, M.L., Carraro, C.C., Belló-Klein, A., Kalil, A.N. & Aerts, N. 2016. Oxidative stress in carotid arteries of patients submitted to carotid endarterectomy. The role of aging process. *Acta Cirurgica Brasileria*, 31(8): 564-568.
26. Marar, T. 2011. Amelioration of glucose induced hemolysis of human erythrocytes by vitamin E. *Chemico-Biological Interactions*, 193: 149-153.
27. Maurya, P.K. & Rizvi, S.I. 2009. Protective role of tea catechins on erythrocytes subjected to oxidative stress during human aging. *Natural Product Research*, 23(12): 1072-1079.
28. Mehta, M., Basalingappa, K., Griffith, J.N., Andrade, D., Babu, A., Amreddy, N., Muralidharan, R., Gorospe, M., Herman, T., Ding, W.Q., Ramesh, R. & Munshi, A. 2016. HuR silencing elicits oxidative stress and DNA damage and sensitizes human triple-negative breast cancer cells to radiotherapy. *Oncotarget*, doi: 10.18632/oncotarget.11706.
29. Memişoğulları, R. 2005. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3: 30-39.
30. Mikashinovich, Z.I. & Belousova, E.S. 2016. Biochemical changes in erythrocytes as a molecular marker of cell damage during long-term simvastatin treatment. *Cell Technologies in Biology and Medicine*, 2: 600-603.
31. Nandhini, T.A. & Anuradha, C.V. 2003. Inhibition of lipid peroxidation, protein glycation and elevation of membrane

- ion pump activity bytaurine in RBC exposed to high glucose. *Clinical Chimica Acta*, 336: 129-135.
32. Nguyen, U.N., Dumoulin, G., Henriot, M.T. & Regnard, J. 1998. Aspartame ingestion increases urinary calcium, but not oxalate excretion, in healthy subjects. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*, 83: 165-168.
 33. Nuchanart, S., Panadda, R., Rattana, T., Jirada, S. & Intira, T. 2012. The comparative study of the protective effect on human oxidative hemolysis of polyphenol extracts from tea seed oil and olive oil. *Health and The Environment Journal*, 3(3): 11-16.
 34. Okoko, T. & Ere, D. 2012. Reduction of hydrogen peroxide-induced erythrocyte damage by *Carica papaya* leaf extract. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine*, 2(6): 449-453.
 35. Olchownik, E., Sciepek, A., Mavlyanov, S. & Abdullajanova, N. 2012. Antioxidant capacities of polyphenols from Sumac (*Rhus typhina* L.) leaves in protection of erythrocytes against oxidative damage. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2: 99-105
 36. Rajesh, K.P., Manjunatha, H., Krishna, V. & Kumara Swamy, B.E. 2013. Potential *in vitro* antioxidant and protective effects of *Mesua ferra* Linn. Bark extracts on induced oxidative damage. *Industrial Crops and Products*, 47: 186-198.
 37. Rocha, S., Gomes, M., Lime, E., Bronze-da-Rocha, E. & Santos-Silva, A. 2015. Peroxiredoxin 2, glutathione peroxidase, and catalase in the cytosol and membrane of erythrocytes under H₂O₂- induced oxidative stress. *Free Radical Research*, 49(8): 990-1003.
 38. Salgueiro, A.C., Leal, C.Q., Bianchini, M.C., Prado, I.O., Mendez, A.S., Puntel, R.L., Folmer, V., Soares, F.A., Avila, D.S. & Puntel, G.O. 2013. The influence of *Bauhinia forficata* Link subsp. pruinosa tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations. *Journal Ethnopharmacology*, 148(1): 81-87.
 39. Singh, M., Sandhir, R. & Kiran, R. 2010. Oxidative stress induced by atrazine in rat erythrocytes: Mitigating effect of vitamin E. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20(3): 119-126.
 40. Snyder, L.M., Fortier, N.L. & Trainer, J. 1985. Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics and spectrin-hemoglobin cross-linking. *Journal Clinical Investigation*, 76: 1971-1977.
 41. Sompong, W., Cheng, H. & Adisakwattana, S. 2015. Protective effects of ferulic acid on high glucose-induced protein glycation, lipid peroxidation, and membrane ion pump activity in human erythrocytes. *Plos one*, DOI: 10.1371/journal.pone.0129495.
 42. Srour, T., Bilto, Y.Y., Juma, M. & Irhimeh, M.R. 2000. Exposure of human erythrocytes to oxygen radicals causes loss of deformability, increases osmotic fragility, lipid peroxidation and protein degradation. *Clinic Hemorheology and Microcirculation*, 23: 13-21.
 43. Suboh, S.M., Bilto, Y.Y. & Aburjai, T.A. 2004. Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytotherapy Research*, 18: 280-284.
 44. Suwalsky, M., Orellana, P., Avello, M. & Villena, F. 2007. Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 130-135.
 45. Taleb-Senouci, D., Ghomari, H., Krouf, D., Bouderbala, S., Prost, J. & Lacaille-Dubois, M.A. 2009. Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 16: 623-631.
 46. Tarry-Adkins, J.L., Fernandez-Twinn, D.S., Chen, J.H., Hargreaves, I.P., Neergheen, V., Aiken, C.E. & Ozanne, S.E. 2016. Poor maternal nutrition and accelerated postnatal growth induces an accelerated aging phenotype antioxidative stress in skeletal muscle of male rats. *Advance Publications*, 9(10): 1221-1229.
 47. Tupe, R.S., Sankle, N.M., Shaikh, S.A., Phatak D.V., Parikh, J.U., Khaire, A.A. & Kemse, N.G. 2015. Aqueous extract of some indigenous medicinal plants inhibits glycation at multiple stages and protects erythrocytes from oxidative damage-an *in vitro* study. *Journal Food SciencesTechnology*, 52(4): 1911-1923.
 48. Van der Berg, J.J., Op den Kamp, J.A., Lubin, B.H., Roelofsen, B. & Kuypers, F.A. 1992. Kinetics and site specificity of hydroperoxide-induced oxidative damage in red blood cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 12(6): 487-498.
 49. Verma, R.J., Shukla, R.S. & Mehta, D.N. 2001. Amelioration of cytotoxic effects of aflatoxin by vitamin A: an *in vitro* study on erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, 15: 39-41.
 50. Verma, R.J., Trivedi, M.H. & Ahmedabad, C.N.J. 2006. Amelioration by black tea extract of sodium fluoride induced hemolysis of human red blood cell corpuscles. *Research Report Fluoride*, 39(4): 261-265.
 51. Viskupicova, J., Blaskovic, D., Galiniak S., Soszyński, M., Bartosz, G., Horakova, A. & Sadowska-Bartos, I.L. 2015. Effect of high glucose concentration on human erythrocytes *in vitro*. *Redox Biology*, 5: 381-387.
 52. Yang, H.L., Chen, S.C., Chang, N.W., Chang, J.M., Lee, M.L., Tsai, P.C., Fu, H.H., Kao, W.W., Chiang, H.C., Wang, H.H. & Hseu, Y.C., 2006. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1513-1521.
 53. Yang, W., Fu, J., Yu, M., Huang Q., Wang, D., Xu, J., Deng, Q., Yao, P., Huang, F. & Liu, L. 2012. Effects of flaxseed oil on anti-oxidative system and membrane deformation of human peripheral blood erythrocytes in high glucose level. *Lipids in Health and Disease*, 11: 88-97.
 54. Yılmaz, İ. 2010. Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(2): 143-153.
 55. Zohra, M. & Fawzia, A. 2014. Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 5(8): 495-500.

Trakya University Journal of Natural Sciences

Telif Hakları Devretme Formu

Eserin Adı :

Eserin Cinsi :

Yukarıda belirtilen, baskı ve yayın hakkını Trakya Üniversitesi'ne devrettiğim ve basım işlerinin Üniversiteler Yayın Yönetmeliği ve Trakya Üniversitesi Yayın Uygulama Yönergesi hükümleri gereğince yapılmasını kabul ettiğim eserimin telif hakkından feraget ettiğimi, buna ilişkin mali haklarımı Trakya Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

Adı, Soyadı :

Ünvanı :

İmza :

Tarih :

Trakya University Journal of Natural Sciences

Copyright Release Form

Title of the Article :

Type of the Article :

Please read the notes, fill complete, sign and send this form to the Journal Editor. We transferred copyright of below article to the Trakya University (Edirne - Turkey). The material presented in the article has not been published or submitted elsewhere. I am aware of manuscript submission in its present form. Additionally, data collection has been done under all legal requirements. We accepted the conditions of publication below the article. I (we) agree that the above conditions of publication form.

Name and the surname of the author(s) :

Title of the author(s) :

Address of the author(s) :

Signature :

Date :

Yazım Kuralları

Trakya University Journal of Natural Sciences

(Trakya Univ J Nat Sci)

Trakya University Journal of Natural Sciences, her yıl Haziran ve Aralık aylarında olmak üzere yılda iki sayı olarak çıkar ve **Biyoloji, Biyoteknoloji, Çevre Bilimleri, Biyokimya, Biyofizik, Su Ürünleri, Ziraat, Veterinerlik, Ormancılık, Hayvancılık, Genetik, Gıda, Temel Tıp Bilimleri** alanlarındaki teorik ve deneysel yazıları yayınlar. Dergide yazılar İngilizce olarak yayınlanır. Ancak, yazıda Türkçe özet olmalıdır. Yabancı yazarlar için Türkçe özet desteği verilecektir. Özet kısmında kısaca giriş, materyal ve metot, sonuçlar ve tartışma başlıkları yer almalıdır. Dergide orijinal çalışma, araştırma notu, derleme, teknik not, editöre mektup, kitap tanıtımı yayınlanabilir. Değerlendirilmek üzere dergiye gönderilen yazıların yazımında ulusal ve uluslararası geçerli etik kurallara [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#) uyularak araştırma ve yayın etiğine dikkat edilmesi gerekmektedir. Yazılara konu olarak seçilen deney hayvanları için etik kurul onayı alınmış olmalı ve yazının sunumu esnasında dergi sistemine ek dosya olarak eklenerek belgelendirilmelidir. Basılacak yazıların daha önce hiçbir yerde yayınlanmamış ve yayın haklarının verilmemiş olması gerekir. Dergide yayınlanacak yazıların her türlü sorumluluğu yazar(lar)ına aittir.

Yazıların sunulması

Yazılar <http://dergipark.gov.tr/trkinat> web adresi üzerinden gönderilmelidir. Dergiye yazı gönderimi mutlaka online olarak yapılmalıdır.

Yazı gönderiminde daha önce Dergi Park sistemine giriş yapmış olan kullanıcılar, üye girişinden kullanıcı adı ve şifreleri ile giriş yapabilirler.

Yazı gönderiminde sisteme ilk kez giriş yapacak ve yazı gönderecek yazarlar **"GİRİŞ"** bölümünden **"KAYDOL"** butonunu kullanacaklardır.

Yazarlar dergipark sistemine kaydolduktan sonra **"YAZAR"** bölümünden girecek ve yazıyı sisteme, yüknelere uygun olarak yükleyeceklerdir.

Yazı hazırlama ilkeleri

Yazılar, Yayın Komisyonu'na **MS Word** kelime işlemcisiyle **12 punto** büyüklüğündeki **Times New Roman** tipi yazı karakteriyle ve 1,5 aralıklı yazılmış olarak gönderilmelidir. İletişim bilgileri yazının ilk sayfasında tek başına yazılmalı, daha sonraki sayfada yazar isimleri ve iletişim bilgileri bulunmamalıdır. Tüm yazı her sayfası kendi arasında **satır numaraları** içerecek şekilde numaralandırılmalıdır. Yazar adları yazılırken herhangi bir akademik unvan belirtilmemelidir. Çalışma herhangi bir kurumun desteği ile yapılmış ise, teşekkür kısmında kurumun; kişilerin desteğini almış ise kişilerin bu çalışmayı desteklediği yazılmalıdır.

Yazı aşağıdaki sıraya göre düzenlenmelidir:

Yazarlar: Yazının ilk sayfasında sadece yazar isimleri ve adresleri bulunmalıdır. Adlar kısaltmasız, soyadlar büyük harfle ve ortalanarak yazılmalıdır. Adres(ler) tam yazılmalı, kısaltma kullanılmamalıdır. Birden fazla yazarlı çalışmalarda, yazışmaların hangi yazarla yapılacağı yazar ismi altı çizilerek belirtilmeli (sorumlu yazar) ve **yazışma yapılacak yazarın adres ve e-posta adresi yazar isimlerinin hemen altına yazılmalıdır. Bu sayfaya yazı ile ilgili başka bir bilgi yazılmamalıdır. Yazı, takip eden sayfada bulunmalı ve yazar-iletişim bilgisi içermemelidir.**

Başlık: İngilizce olarak Kısa ve açıklayıcı olmalı, büyük harfle ve ortalanarak yazılmalıdır.

Özet ve Anahtar kelimeler: Türkçe ve İngilizce özet 250 kelimeyi geçmemelidir. Özeti altına küçük harflerle anahtar kelimeler ibaresi yazılmalı ve yanına anahtar kelimeler virgül konularak sıralanmalıdır. Anahtar kelimeler, zorunlu olmadıkça başlıktakilerin tekrarı olmamalıdır. İngilizce özet koyu harflerle "Abstract" sözcüğü ile başlamalı ve başlık, İngilizce özeti üstüne büyük harflerle ortalanarak yazılmalıdır. Yazıdaki ana başlıklar ve varsa alt başlıklara **numara verilmemelidir.**

Giriş: Çalışmanın amacı ve geçmişte yapılan çalışmalar bu kısımda belirtilmelidir. Yazıda SI (Système International) birimleri ve kısaltmaları kullanılmalıdır. Diğer kısaltmalar kullanıldığında, metinde ilk geçtiği yerde 1 kez açıklanmalıdır. Kısaltma yapılmış birimler ile rakamlar arasında boşluk bulunmamalı ve kısaltma sonuna nokta konmamalıdır (45m mesafe tespit edilmiştir). Kısaltma cümle sonunda ise nokta konmalıdır (... tespit edilen mesafe 45m. Dolayısıyla...).

Materyal ve Metod: Eğer çalışma deneysel ise kullanılan deneysel yöntemler detaylı ve açıklayıcı bir biçimde verilmelidir. Yazıda kullanılan metod/metodlar, başkaları tarafından tekrarlanabilecek şekilde açıklayıcı olmalıdır. Fakat kullanılan deneysel yöntem herkes tarafından bilinen bir yöntem ise ayrıntılı açıklamaya gerek olmayıp sadece yöntemin adı verilmeli veya yöntemin ilk kullanıldığı çalışmaya atıf yapılmalıdır.

Sonuçlar: Bu bölümde elde edilen sonuçlar verilmeli, yorum yapılmamalıdır. Sonuçlar gerekirse tablo, şekil ve grafiklerle de desteklenerek açıklanabilir.

Tartışma: Sonuçlar mutlaka tartışılmalı fakat gereksiz tekrarlardan kaçınılmalıdır. Bu kısımda, literatür bilgileri vermekten çok, çalışmanın sonuçlarına yoğunlaşmalı, sonuçların daha önce yapılmış araştırmalarla benzerlik ve farklılıkları verilmeli, bunların muhtemel nedenleri tartışılmalıdır. Bu bölümde, elde edilen sonuçların bilime katkısı ve önemine de mümkün olduğu kadar yer verilmelidir.

Teşekkür: Mümkün olduğunca kısa olmalıdır. Teşekkür, genellikle çalışmaya maddi destek sağlayan kurumlara, kişilere veya yazı yayına gönderilmeden önce inceleyip önerilerde bulunan uzmanlara yapılır. Teşekkür bölümü kaynaklardan önce ve ayrı bir başlık altında yapılır.

Kaynaklar: Yayınlanmamış bilgiler kaynak olarak verilmemelidir (*Yayınlanmamış kaynaklara örnekler: Hazırlanmakta olan veya yayına gönderilen yazılar, yayınlanmamış bilgiler veya gözlemler, kişilerle görüşülerek elde edilen bilgiler, raporlar, ders notları, seminerler gibi*). Ancak, tamamlanmış ve jüriden geçmiş tezler ve DOI numarası olan yazılar kaynak olarak verilebilir. Kaynaklar, yazı sonunda alfabetik sırada (yazarların soyadlarına göre) sıra numarası ile belirtilerek verilmelidir.

Yazıların ve kitapların referans olarak verilmiş şekilleri aşağıdaki gibidir:

Makale: Yazarın soyadı, adının baş harfi, basıldığı yıl. Makalenin başlığı, *derginin adı*, cilt numarası, sayı, sayfa numarası. Dergi adı italik yazılır.

Örnek:

Tek yazarlı Makale için

Soyadı, A. Yıl. Makalenin adı. (Sözcüklerin ilk harfi küçük). *Yayınlandığı derginin açık ve tam adı*, Cilt(Sayı): Sayfa aralığı.

Kıvan, M. 1998. *Eurygaster integriceps* Put. (Heteroptera: Scutelleridae)'nin yumurta parazitoiti *Trissolcus semistriatus* Nees (Hymenoptera: Scelionidae)'un biyolojisi üzerinde araştırmalar. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 22(4): 243-257.

İki ya da daha çok yazarlı makale için

Soyadı1, A1. & Soyadı2, A2. Yıl. Makalenin adı. (Sözcüklerin ilk harfi küçük). *Yayınlandığı derginin tam adı*, Cilt(Sayı): Sayfa aralığı.

Lodos, N. & Önder, F. 1979. Contribution to the study on the Turkish Pentatomoidea (Heteroptera) IV. Family: Acanthasomatidae Stal 1864. *Türkiye Bitki Koruma Dergisi*, 3(3): 139-160.

Soyadı1, A1., Soyadı2, A2. & Soyadı3, A3. Yıl. Makalenin adı. (Sözcüklerin ilk harfi küçük). *Yayınlandığı derginin tam adı*, Cilt (Sayı): Sayfa aralığı.

Önder, F., Ünal, A. & Ünal, E. 1981. Heteroptera fauna collected by light traps in some districts of Northwestern part of Anatolia. *Türkiye Bitki Koruma Dergisi*, 5(3): 151-169.

Kitap: Yazarın soyadı, adının baş harfi, basıldığı yıl. Kitabın adı (varsa derleyen veya çeviren ya da editör), cilt numarası, baskı numarası, basımevi, basıldığı şehir, toplam sayfa sayısı.

Örnek:

Soyadı, A., Yıl. *Kitabın adı*. (Sözcüklerin ilk harfi büyük, italik). Basımevi, basıldığı şehir, toplam sayfa sayısı s./pp.

Önder F., Karsavuran, Y., Tezcan, S. & Fent, M. 2006. *Türkiye Heteroptera (Insecta) Kataloğu*. Meta Basım Matbaacılık, İzmir, 164 s.

Lodos, N., Önder, F., Pehlivan, E., Atalay, R., Erkin, E., Karsavuran, Y., Tezcan, S. & Aksoy, S. 1999. *Faunistic Studies on Lygaeidae (Heteroptera) of Western Black Sea, Central Anatolia and Mediterranean Regions of Turkey*. Ege University, İzmir, ix + 58 pp.

Kitapta Bölüm: Yazarın soyadı, adının baş harfi basıldığı yıl. Bölüm adı, sayfa numaraları. Parantez içinde: Kitabın editörü/editörleri, *kitabın adı*, yayınlayan şirket veya kurum, yayınlandığı yer, toplam sayfa sayısı.

Örnek:

Soyadı, A., Yıl. Bölüm adı, sayfa aralığı. In: (editör/editörler). *Kitabın adı*. (Sözcüklerin ilk harfi büyük, italik). Basımevi, basıldığı şehir, toplam sayfa sayısı s./pp.

Jansson, A. 1995. Family Corixidae Leach, 1815—The water boatmen. Pp. 26–56. In: Aukema, B. & Rieger, Ch. (eds) Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region. Vol. 1. Enicocephalomorpha, Dipsocoromorpha, Nepomorpha, Gerromorpha and Leptopodomorpha. The Netherlands Entomological Society, Amsterdam, xxvi + 222 pp.

Kongre, Sempozyum: Yazarlar, Yıl. "Bildirinin adı (Sözcüklerin ilk harfi küçük), sayfa aralığı". Kongre/Sempozyum Adı (Tarihi (gün aralığı ve ay), Toplantı Yeri) Bildirileri, (varsa) Yayınlayan Kurum, toplam sayfa sayısı s./pp.

Örnek:

Önder, F., Karsavuran, Y., Pehlivan, E. & Turanlı, F. 1995. Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) uygulama alanında saptanan Pentatomoidea (Heteroptera) türleriyle ilgili bir değerlendirme. GAP Bölgesi Bitki Koruma Sorunları ve Çözüm Önerileri Sempozyumu, 27-29 Nisan, Şanlıurfa, 120-130.

Internet: Eğer bir bilgi herhangi bir internet sayfasından alınmış ise (*internetten alınan ve dergilerde yayınlanan yazılar hariç*), kaynaklar bölümüne internet sitesinin ismi tam olarak yazılmalı, siteye erişim tarihi verilmelidir.

Soyadı, A., Yıl. Çalışmanın adı. (Sözcüklerin ilk harfi küçük). (web sayfası) <http://www.....>, (Erişim tarihi: Mayıs 2009).

Hatch, S., 2001. Studentsperception of online education. Multimedia CBT Systems. <http://www.scu.edu.au/schools/sawd/moconf/papers2001/hatch.pdf> (Erişim: May 2009).

Kaynaklara metin içinde numara verilmemeli ve aşağıdaki örneklerde olduğu gibi belirtilmelidir.

Örnekler:

... x maddesi atmosferde kirliliğe neden olmaktadır (Landen 2002). Landen (2002) x maddesinin atmosferde kirliliğe neden olduğunu belirtmiştir. İki yazarlı bir çalışma kaynak olarak verilecekse, (Landen ve Bruce 2002) veya Landen ve Bruce (2002)'ye göre. ... şeklinde olmuştur; diye verilmelidir. Üç veya daha fazla yazar söz konusu ise, (Landen ve ark. 2002) veya Landen ve ark. (2002)'ye göre olduğu gösterilmiştir; diye yazılmalıdır.

Şekil ve Tablolar: Tablo dışında kalan fotoğraf, resim, çizim ve grafik gibi göstermeler "Şekil" olarak verilmelidir. Resim, şekil ve grafikler, net ve ofset baskı tekniğine uygun olmalıdır. Her tablo ve şeklin metin içindeki yerlerine konmalıdır. Tüm tablo ve şekiller yazı boyunca sırayla numaralandırılmalı (Tablo 1., Şekil. 1), başlık ve açıklamalar içermelidir. Şekillerin sıra numaraları ve başlıkları, alta, tabloların ki ise üstlerine yazılır.

Şekiller (tablo dışında kalan fotoğraf, resim, çizim ve grafik gibi) tek tek dosyalar halinde en az **300 dpi** çözünürlükte ve **tif** dosyası olarak şekil numaraları dosya isminde belirtilmiş şekilde ayrıca sisteme ek dosya olarak yüklenmelidir.

Sunulan yazılar, öncelikle Dergi Yayın Kurulu tarafından ön incelemeye tabii tutulur. **Dergi Yayın Kurulu, yayınlanabilecek nitelikte bulmadığı veya yazım kurallarına uygun hazırlanmayan yazıları hakemlere göndermeden red kararı verme hakkına sahiptir.** Değerlendirmeye alınabilecek olan yazılar, incelenmek üzere iki ayrı hakeme gönderilir. Dergi Yayın Kurulu, hakem raporlarını dikkate alarak yazıların yayınlanmak üzere kabul edilip edilmemesine karar verir.

Editör : Doç. Dr. Kadri KIRAN

Trakya Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Balkan Yerleşkesi
22030 - EDİRNE

Tel : 0284 235 82 30
Fax : 0284 235 82 37
e-mail : tujns@trakya.edu.tr

Author Guidelines

Trakya University Journal of Natural Sciences (Trakya Univ J Nat Sci)

Trakya University Journal of Natural Sciences, is published twice a year in June and in December and includes theoretical and experimental articles in the fields of **Biology, Biotechnology, Environmental Sciences, Biochemistry, Biophysics, Fisheries Sciences, Agriculture, Veterinary and Animal Sciences, Forestry, Genetics, Food Sciences** and **Basic Medicine Sciences**. Original studies, research notes, reviews, technical notes, letters to the Editor and book reviews can be published in the journal. The publishing language for all articles in the journal is **English**. On the other hand, authors are required to provide a Turkish abstract also. The Turkish version of the abstract will be supply by the journal for foreign authors. Abstracts should include introduction, material and methods, results and discussion sections in summary. The authors should pay attention to research and publication ethics [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#) in preparation of their manuscripts before submission by considering national and international valid ethics. An approval of Ethics and Animal Welfare Committee is mandatory for submissions based on experimental animals and this approval should be provided during submission of the manuscripts. Articles which have not been published elsewhere previously and whose copyright has not been given to anywhere else should be submitted. All responsibilities related to published articles in Trakya University Journal of Natural Sciences belong to the authors.

Submitting articles

Articles should be submitted on the web through <http://dergipark.gov.tr/trkinat> and all submissions should be performed online.

Authors, who are already a member of the DergiPark system, can enter in the login section using their "user name" and "password" to submit their articles.

Authors entering the DergiPark system for the first time to submit an article will enter in the "**REGISTER**" section to submit their articles.

Article preparation rules

Articles should be submitted to the Journal using **MS Word** preparing **12 points Times New Roman** font and 1.5 raw spacing. Author names and contact info must be in first page, article must continue in second page without author names and contact info. Whole article should have numbered with **line number** restarting each page. The author's name must not be specified any academic titles. If studies supported by a foundation, this support should have been written in the acknowledgement section.

Articles should be arranged as below:

Authors: The name(s) of the author(s) should not be abbreviated and must be written under the title one by one, with surnames in capital letters. Address(es) should be written in full. Corresponding authors in multiple authored submissions should be indicated, and the address and e-mail of the corresponding author should be written just under the author(s) list. **No other information about the manuscript should be included in this page. The main manuscript text should start with the following new page and should not include any author-contact information.**

Title: Should be short and explanatory and written in capital letters and centered.

Abstract and keywords: Turkish and English abstracts should not exceed 250 words. "Keywords" should be written under the abstract in small letters and all keywords should be written using a comma after all. Keywords should not be replica of the title words, if it is not obligatory. Abstract should begin "Abstract" word from the left side of the page. The main and sub headers (if present) should not be numbered.

Introduction: The aim of the submitted and history of the previous studies should be indicated in this section. SI (Systeme International) system and abbreviation should be used in the article. Other abbreviations- should be explained once in their first appearance in the text. No space should be left between the abbreviations and the preceding numerical values and no "." sign should be used after abbreviations except those used at the end of a sentence (...the determined distance is 45m. Therefore, ...).

Material and Method: If the submitted study is experimental, methods of the experiments should be given in detail. The method(s) used in the article should be descriptive for others to repeat. If a widely known experimental method is used, the method does not need to be explained in detail. In this situation, indicating only the name of the experimental method or citing the study who used the method for the first time will be enough.

Results: Obtained results should be given in this section without any comment. Results can be explained with tables, figures or graphics, if necessary.

Discussion: Results must be discussed, but unnecessary duplications should be avoided. In this section, rather than giving literature data, authors should focus on their results considering similarities and differences with and between previously conducted researches, and should discuss possible reasons of similarities and differences. The contribution to science and importance of the obtained results should also be mentioned as much as possible in this section.

Acknowledgements: Should be as short as possible. Thanks are usually made to institutions or individuals who support the study or to experts who reviewed the article before submitting to the journal. Acknowledgement section should be given before the references section in a separate header.

References: Unpublished information should not be given as a reference (examples of unpublished references: articles in preparation or submitted somewhere, unpublished data or observations, data obtained based on interviews with individuals, reports, lecture notes, seminars, etc.). However, theses completed and signed by a jury and articles with DOI numbers given can be used as reference. References should be given at the end of the text, sorted alphabetically by author's surname and should be given with numbering.

Articles and books as a reference forms are as follows:

Articles: Surname of author, first letter of author's first name, publication year, article title, the *name of the journal*, volume, issue, page numbers. Journal name is written in italics.

Example:

Articles with single author

Surname, N. Year. Article title (First letter of all words small). *Whole name of journal*, Volume (Issue): page range.

Aybeke, M. 2016. The detection of appropriate organic fertilizer and mycorrhizal method enhancing salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) under field conditions. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 17(1): 17-27.

Articles with two or more authors

Surname1, N1. & Surname2, N2. Year. Article title (First letter of all words small). *Whole name of journal*, Volume (Issue): page range.

Dursun, A. & Fent, M. 2016. Contributions to The Cicadomorpha and Fulgoromorpha (Hemiptera) fauna of Turkish Thrace region. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 17(2): 123-128.

Surname1, N1., Surname2, N2. & Surname3, N. Year. Article title (First letter of words small). *Whole name of journal*, Volume (Issue): page range.

Becenen, N., Uluçam, G. & Altun, Ö. 2017. Synthesis and antimicrobial activity of iron cyclohexanedicarboxylic acid and examination of pH effect on extraction in water and organic phases. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 18(1): 1-7.

Book: Surname of author, first letter of author's first name, Year. *Book title* (name of translator or book editor if present), volume, edition number, press, city, page number.

Example:

Surname, N. Year. *Book Title* (First letter of words small and italic), volume, edition number, press, city, page number.

Czechowski, W., Radchenko, A., Czechowska, W. & Vepsäläinen, K. 2012. *The ants of Poland with reference to the myrmecofauna of Europe*. Museum and Institute of Zoology PAS, Warsaw, 496 pp.

Book Section: Surname of author, first letter of the author's first name, Year. Section name, page range. In: (Editor of Book, *Book title*, press, city, page number).

Example:

Surname, N. Year. Section name, page range. In: (Editor of Book, *Book title* (First letter of words small and italic), press, city, page number)

Jansson, A. 1995. Family Corixidae Leach, 1815—The water boatmen. Pp. 26–56. In: Aukema, B. & Rieger, Ch. (eds) *Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region*. Vol. 1. Enicocephalomorpha,

Dipsocoromorpha, Nepomorpha, Gerromorpha and Leptopodomorpha. The Netherlands Entomological Society, Amsterdam, xxvi + 222 pp.

Congress, Symposium: Surname, N. Year. "Presentation title (first letters of all words small), page range". Name of Congress/Symposium (Date -day range and month, place), page number.

Example:

Bracko, G., Kiran, K., & Karaman, C. 2015. The ant fauna of Greek Thrace. 6th Central European Workshop of Myrmecology, 24-27 July, Debrecen-Hungary, 33-34.

Internet: If any information is taken from an internet source (articles published in journals and taken from internet excluded), internet address should be written in full in references section and access date should be indicated.

Surname, N. Year. Name of study (First letter of words small). (Web page: <http://www.....>), (Date accessed: May 2009).

Hatch, S. 2001. Student perception of online education. Multimedia CBT Systems. <http://www.scu.edu.au/schools/sawd/moconf/papers2001/hatch.pdf> (Date accessed: May 2009).

References within the text should not be numbered and indicated as in the following examples.

Examples:

... atmospheric pollution is causing by x matter (Landen 2002). If an article has two authors, it should be indicated in the text as (Landen and Bruce 2002) or ... according to Landen and Bruce (2002) If there are three or more authors, references should be indicated as (Landen et al. 2002) or according to Landen et al. 2002 ...

Graphics and tables: All photos, pictures, drawings and graphics except tables should be indicated as Figures. Pictures, figures and graphics should be clear and ready to print with offset technique. The places of all tables and figures should be indicated in the text. All tables and figures should be numbered within the text respectively (Table 1, Fig. 1). Figure numbers and legends are written below the figures, table numbers and legends are written above the tables.

All figures (all pictures, drawings and graphics except table) should also be uploaded to the system separately with 300dpi resolution at least as .tif file using the figure numbers in the files name.

Submitted articles are subjected to prior review by the Editorial Board. Editorial Board has the right to reject the articles which are considered of low quality for publish or those which are insufficiently prepared according to the author guidelines. The articles accepted for consideration for evaluation will be sent to two different referees. Editorial Board decides to accept or reject the submissions for publication by taking into account the reports of referees.

Editor : Dr. Kadri KIRAN

Trakya Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Balkan Yerleşkesi
22030 - EDİRNE-TURKEY

Phone : +90 284 235 82 30
Fax : +90 284 235 82 37
e-mail : tujns@trakya.edu.tr

