

ISSN 1308-5301 Print
ISSN 1308-8084 Online

Biological Diversity and Conservation

CİLT / VOLUME 11

SAYI / NUMBER 2

AĞUSTOS / AUGUST 2018

Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma Üzerine Yayın Yapan Hakemli Uluslararası Bir Dergidir
An International Journal is About Biological Diversity and Conservation With Refree



BioDiCon
Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma
Biological Diversity and Conservation

Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma Üzerine Yayın Yapan Hakemli Uluslararası Bir Dergidir
An International Journal is About Biological Diversity and Conservation With Refree
Cilt / Volume **11**, Sayı / Number **2**, Ağustos / August 2018

(ONUNCU YIL/TENTH YEAR)

Editör / *Editor-in-Chief*: Ersin YÜCEL

ISSN 1308-5301 Print; ISSN 1308-8084 Online

Açıklama

“Biological Diversity and Conservation”, biyolojik çeşitlilik, koruma, biyoteknoloji, çevre düzenleme, tehlike altındaki türler, tehlike altındaki habitatlar, sistematik, vejetasyon, ekoloji, biyocoğrafya, genetik, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar arasındaki ilişkileri konu alan orijinal makaleleri yayımlar. Tanımlayıcı yada deneysel ve sonuçları net olarak belirlenmiş deneysel çalışmalar kabul edilir. Makale yazım dili Türkçe veya İngilizce’dir. Yayımlanmak üzere gönderilen yazı orijinal, daha önce hiçbir yerde yayımlanmamış olmalı veya işlem görüyor olmamalıdır. Yayımlanma yeri Türkiye’dir. Bu dergi yılda üç sayı yayımlanır.

Description

“Biological Diversity and Conservation” publishes original articles on biological diversity, conservation, biotechnology, environmental management, threatened of species, threatened of habitats, systematics, vegetation science, the ecology, biogeography, genetics and interactions among plants and animals or microorganisms. Descriptive or experimental studies presenting clear research questions are accepted. The submitted paper must be original and unpublished or under consideration for publication. Manuscripts in English or in Turkish languages are welcome. Printed in Turkey. This journal is published triannullay.

Dergiyi tarayan veri tabanları / Abstracted-Indexed in

EBSCO; Genamics JournalSeek Database; InfoBaseIndex; International Institute of Organized Research, I2OR; OhioLINK Databases-OPC4-Online-Katalog der Bibliothek der Fachhochschule Anhalt; Online-Katalog der UB Clausthal; Turkey Citation Index; Ulakbim; Thomson Reuters; Zoological Record.

Kütüphaneler / Libraries

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

Thomson Reuters Impact Factor, 5.00

“Türkiye Atıf Dizini”ne kayıtlıdır. (*This journal is registered to “Turkey Citation Index”*)

Makale yazım kuralları ve dergi ile ilgili diğer ayrıntılar için ” [http:// www.biodicon.com](http://www.biodicon.com)“ adresini ziyaret ediniz / *Please visit ” [http:// www.biodicon.com](http://www.biodicon.com)“ for instructions about articles and all of the details about journal*

Yazışma Adresi / Correspondance Adres: Prof. Ersin YÜCEL, P.K. 86, PTT Merkez, 26010 Eskişehir / Turkey

E-posta / E-mail : biodicon@gmail.com ;

Web Address: <http://www.biodicon.com>

Alan editörleri/Subject specialist editors

Amed A. Azmani, Tangier (Morocco)
 Ahmet Aksoy, Antalya (Turkey)
 Ali Dönmez, Ankara (Turkey)
 Atilla Ocak, Eskişehir (Turkey)
 Alper Yargıç, Eskişehir (Turkey)
 Angeles Alonso Vargas, Alicante (Spain)
 Cemil Ata, İstanbul (Turkey)
 Hayri Duman, Ankara (Turkey)
 İbrahim Turna, Trabzon (Turkey)
 Ignacy Kitowski, Lublin (Poland)
 Ilgaz Akata, Ankara (Turkey)
 İqrar Ahmad Khan, Faisalabad (Pakistan)
 Ian C. Hedge, Edinburgh, (Scotland, Uk)
 Lyutsiya Aubakirova, Astana (Kazakhstan)
 İlkin Yücel Şengün, İzmir (Turkey)
 M. Hakkı Alma, Maraş (Turkey)
 Masoud Hedayatifard, Ghaemshahr (Iran)
 M.N.V. Prasad, Hyderabad (India)
 Mecit Vural, Ankara, (Turkey)
 Mirza Barjees Baig, Riyadh(Saudi Arabia)
 Muhammad Ashraf, Faisalabad (Pakistan)
 Münir Öztürk, İzmir (Turkey)
 Naime Arslan, Eskişehir (Turkey)
 Sezgin Ayan, Kastamonu (Turkey)

Ergin Hamzaoğlu, Ankara (Turkey)
 Ernaz Altundağ, Düzce (Turkey)
 Ersen Aydın Yağmur, Manisa (Turkey)
 Esat Çetin, Sakarya (Turkey)
 Esra Martin, Konya (Turkey)
 Evren Cabi, Tekirdağ (Turkey)
 Eylem Akman Gündüz, Samsun (Turkey)
 Faik A. Karavelioğlu, Hakkari (Turkey)
 Faruk Selçuk, Kırşehir (Turkey)
 Fatih Satıl, Balıkesir (Turkey)
 Fazıl Özen, Kocaeli (Turkey)
 Fazle Subhan, Peshawar, (Pakistan)
 Ferhat Celep, Nevşehir (Turkey)
 Figen Çalışkan, Eskişehir (Turkey)
 Filiz Savaroğlu, Eskişehir (Turkey)
 Gencyay Akgül, Nevşehir, (Turkey)
 Gökhan Abay, Çankırı (Turkey)
 Gülçin Işık, Esakişehir (Turkey)
 Gülriş Bayçu, İstanbul (Turkey)
 Haider Abbas, Karachi (Pakistan)
 Halil Koç, Sinop (Turkey)
 Hamdi Aydın, Kocaeli (Turkey)
 Hasan Akgül, Gaziantep (Turkey)
 Hasan Özçelik, Isparta (Turkey)
 Hatice Çölgeçen, Zonguldak (Turkey)
 Hatice Kiremit Özenoğlu, Aydın (Turkey)
 Hatice Tunca, Sakarya (Turkey)
 Hayat Badshah, Peshawar (Pakistan)
 Hüseyin Dural, Konya (Turkey)
 Hüseyin Mısırdalı, Tunceli (Turkey)
 İhsan A. Al-Shehbaz, Missouri (USA)
 İltaf Ullah , Nowshera (Pakistan)
 İbrahim İlker Özyiğit, İstanbul (Turkey)
 İbrahim Türkekul, Tokat (Turkey)
 İsmet Uysal, Çanakkale (Turkey)
 İsmühan Potoğlu, Eskişehir (Turkey)
 Işıl Gazioğlu, İstanbul (Turkey)
 Kadriye Uruç Parlak, Ağrı (Turkey)
 Khalid M. Khawar, Ankara (Turkey)
 Kuddisi Ertuğrul, Konya (Turkey)
 Kürşat Özkan, Isparta (Turkey)
 Malik Faisal, İslamabad (Pakistan)
 Manzoor Ahmad, İslamabad (Pakistan)
 Marjan Komnenov, Skopje (Macedonia)
 Maryam Keshavarzi, Tehran (Iran)
 Matem Tunçdemir, İstanbul (Turkey)
 Mehmet Candan, Eskişehir (Turkey)
 Mehmet Tekin Sivas (Turkey)
 Menderes Çenet, Osmaniye (Turkey)
 Meral Avcı, İstanbul (Turkey)
 Meral Yılmaz Cankılıç, Eskişehir
 Mohammed Merzouki, Fez (Morocco)
 Muammer Bahşi, Elazığ (Turkey)
 Muhammad Iqbal, Nwfp (Pakistan)
 Muhammad Sarwar, Jam (Pakistan)
 Muhammad Yasin Ashraf, (Pakistan)
 Muhammet Ören, Zonguldak (Turkey)
 Murad Aydın Şanda, Konya (Turkey)
 Murat Olgun, Eskişehir (Turkey)
 Murat Barlas, Muğla (Turkey)
 Murat Dinçer Çekin, İstanbul (Turkey)
 Mustafa Korkmaz, Erzincan (Turkey)
 Mustafa Yamaç, Eskişehir (Turkey)

Müge Sayitoğlu, İstanbul (Turkey)
 Nesil Ertoran, Eskişehir (Turkey)
 Nevzat Batan, Maçka/Trabzon (Turkey)
 Nur Münevver Pınar, Ankara (Turkey)
 Nurhayat Dalkıran, Bursa (Turkey)
 Nurcan Yiğit, Kastamonu (Turkey)
 Oğuzhan Kaygusuz, Denizli (Turkey)
 Onur Koyuncu, Eskişehir (Turkey)
 Ömer F. Çolak Isparta (Turkey)
 Özdemir Şentürk, Burdur (Turkey)
 Özgür Emiroğlu, Eskişehir (Turkey)
 Perihan Kendirci, İzmir (Turkey)
 R. Süleyman Göktürk, Antalya (Turkey)
 Rasime Demirel, Eskişehir (Turkey)
 Robert Angus, London (England)
 Rıdvan Polat, Giresun (Turkey)
 Rıza Binzet, Mersin (Turkey)
 Rüştü Hatipoğlu, Adana (Turkey)
 Saleem Ahmad, İslamabad (Pakistan)
 Saye Nihan Çabuk, Eskişehir (Turkey)
 Seher Karaman Erkul, Aksaray (Turkey)
 Selami Selvi, Balıkesir (Turkey)
 Selima Khatun, West Bengal (India)
 Semra Soydam Aydın, Ankara (Turkey)
 Serdar Aslan, Düzce (Turkey)
 Serdar Makbul, Rize (Turkey)
 Serkan Gülsoy, Isparta (Turkey)
 Sevda Kırbağ, Elazığ (Turkey)
 Seyhan Oran, Bursa (Turkey)
 Seyit Ahmet Sargin, Alanya (Turkey)
 Sezgin Çelik, İstanbul (Turkey)
 Shyam Singh Yadav, Lae (New Guinea)
 Sıdıka Ekren, İzmir (Turkey)
 Snejana Doncheva, Sofia (Bulgaria)
 Sumaira Sahren, İslamabad (Pakistan)
 Sunil Kumarkhan, Magra, Hooghly (India)
 Şahane F. Arslanoğlu, Samsun (Turkey)
 Şengül Aksan, Akseki-Antalya (Turkey)
 Şeniz Karabiyikli, Tokat (Turkey)
 Tahir Atıcı, Ankara (Turkey)
 Tamer Keçeli, Çankırı (Turkey)
 Taner Özcan, Balıkesir (Turkey)
 Tarık Danişman, Kırıkkale (Turkey)
 Temel Özek, Eskişehir (Turkey)
 Tuğba Bayrak Özbucak, Ordu (Turkey)
 Tuna Uysal, Konya (Turkey)
 Tuncay Dirmenci, Balıkesir, (Turkey)
 Turan ARABACI, Malatya (Turkey)
 Turan Özdemir, Trabzon (Turkey)
 Tülay Ezer, Niğde (Turkey)
 Uğur Çakılıoğlu, Elazığ (Turkey)
 Ümit Subaşı, İzmir (Turkey)
 Ünal Özemas, Eskişehir (Turkey)
 Yavuz Bülent Köse, Eskişehir (Turkey)
 Yeşim Kara, Denizli (Turkey)
 Yunus Serin, Kayseri (Turkey)
 Yusuf Menemen, Kırıkkale (Turkey)
 Yusuf Uzun, Van (Turkey) (Turkey)
 Zafer Cemal Özkan, Trabzon (Turkey)
 Zeki Ayaç, Ankara (Turkey) (Turkey)
 Zia Ullah, Beijing (China)

Hakemler/ Reviewer

Abdeslam Annabili, Mezraoua (Morocco)
 Abdullah Kaya, Karaman (Turkey)
 Adife Şeyda Yargıç, Bilecik (Turkey)
 Ahmed Bakrim, Kbouribga (Morocco)
 Amed Aarab Azmani, Tangier (Morocco)
 Anath Bandhu Das Ankara (Turkey)
 Arzu Cansaran, Amasya (Turkey)
 Aykut Güvensen, İzmir (Turkey)
 Ayla Kaya, Eskişehir (Turkey)
 Aysel Bekleyen, Diyarbakır (Turkey)
 Ayşe Ak, Erzincan (Turkey)
 Ayşen Türk, Eskişehir (Turkey)
 Aziz Türkoğlu, Muğla (Turkey)
 Barış Bani, Kastamonu (Turkey)
 Bilal Kutrup Trabzon (Turkey)
 Burhan Şen, Trakya (Turkey)
 Cahit Doğan, Ankara (Turkey)
 Celal Yarıç, İstanbul (Turkey)
 C. Cem Ergül, Bursa (Turkey)
 Cem Dalyan, İstanbul (Turkey)
 Cem Vural, Kayseri (Turkey)
 Cengiz ACAR, Trabzon (Turkey)
 Cihan Darcan, Bilecik (Turkey)
 Coşkun Güçlü, Eskişehir (Turkey)
 Çiğdem Gül, Çanakkale (Turkey)
 Çiler Meriç, Trakya (Turkey)
 Dalila Bousta, Taountate (Morocco)
 Deniz Ergüden, İskenderun (Turkey)
 Derya Yıldırım, Isparta
 Ece Sevgi, İstanbul (Turkey)
 Ekrem Akçiçek, Balıkesir (Turkey)
 Elif Yamaç, Eskişehir (Turkey)
 Emel Uslu, Bolu (Turkey)
 Emel Sözen, Eskişehir (Turkey)
 Emre Sevindik, Aydın (Turkey)

Genel Yayın Yönetmeni/Executive Editor: Yasemin YÜCEL

Editörlük Ofisi/Editorial Office: Yasemin YÜCEL, Umut KILINÇ,

Kapak Resmî/ Cover Image:: Ersin YÜCEL

Baskı/Printing Press: Cetemenler, Eskişehir/Turkey;

Kapak Düzeni/ Cover Layout: Dilge YÜCEL

Dizgi/Compositor: Umut KILINÇ, Dilge YÜCEL, Bilge KILINÇ

Web Consultant; Alper YARGIÇ



Age determination of *Heremites vittatus* (Bridled Skink) (Olivier, 1804) using skeletochronology in Sivas population, Turkey

Tuğba ERGÜL KALAYCI¹, Abdullah ALTUNIŞIK¹, İbrahim UYSAL², Murat TOSUNOĞLU², Nurhayat ÖZDEMİR*¹

¹ Recep Tayyip Erdoğan University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Rize, Turkey

² Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Çanakkale, Turkey

Abstract

The knowledge of age structure, age of sexual maturity and lifetime in reptiles helps to understand their ecological and evolutionary aspects of life story traits. In this study, the age structure of the female individuals belonging to *Heremites vittatus* (Bridled Skink) from Sivas (Turkey) was revealed for the first time. Accordingly, the maximum life span was determined to be 5 years for this species. A significant relationship was found between age and body size in individuals whose head length, head width and body length were determined. In addition to this, there is a significant relationship between body length, head length and head width.

Key words: skeletochronology, *Heremites vittatus*, Sivas, age determination

----- * -----

Sivas *Heremites vittatus* (Şeritli Kertenkele) (Olivier, 1804) örnekleri üzerinde İskelet kronolojisi yöntemi ile yaş tayini

Özet

Sürüngenlerde yaş yapısının, eşeyssel olgunluk yaşının ve ömür uzunluğunun bilinmesi onların yaşam öyküsü özelliklerinin ekolojik ve evrimsel yönleri ile anlaşılmasında yardımcı olmaktadır. Bu çalışmada, Sivas (Türkiye)'tan *Heremites vittatus* (Şeritli Kertenkele) türüne ait dişi bireylerin yaş yapısı ilk defa ortaya konulmuştur. Buna göre en uzun yaşam uzunluğu bu türün dişi bireyleri için 5 yıl olarak tespit edilmiştir. Baş uzunluğu, baş genişliği ve vücut uzunluğu belirlenen bireylerde, yaş ve vücut boyu arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Bununla birlikte, vücut uzunluğu, baş uzunluğu ve baş genişliği arasında da anlamlı bir ilişki mevcuttur.

Anahtar kelimeler: iskelet kronolojisi, *Heremites vittatus*, Sivas, yaş tayini

1. Giriş

Bireyin yaşının doğru olarak belirlenmesi; büyüme, eşeyssel olgunluk yaşı tayini, doğal popülasyondaki yaş yapısının ortaya çıkarılmasına katkı sağlar ve popülasyonlara ait koruma planı oluşturma çalışmalarında gereklidir (Kaynak). Bununla birlikte hayvanın yaşının bilinmesi, canlının yakalanması, işaretlenmesi ve izlenmesini içeren uzun süreli çalışmaları gerektirir (Sutherland, 1997). Markalama-bırakma-yeniden yakalama çalışmaları hayvanın fizyolojisini, davranışlarını etkileyebilen ve parazit olmasına yol açabilen çalışmalardır, bu yüzden bu çalışmaların sonuçları dikkatli düşünülmelidir (Fair vd., 2010).

İskelet kronolojisi ise amfibi/reptillerin kemiklerindeki büyüme halkalarının (LAG; Lines of Arrested Growth) durgunluğunu esas alan, onların öldürülmesine gerek duyulmadığı için güvenilir olan bir yaş tayini metodu olarak bilinmektedir (Comas vd., 2016). Daha önce yapılmış çalışmalar, "LAG" adı verilen bu büyüme halkalarındaki biçimlenmenin mevsimlere göre iklimsel değişimlere bağlı olduğunu göstermiştir (Hemelaar ve van Gelder, 1979; Gibbons ve McCarthy, 1983; Driscoll, 1999).

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +904642236126; Fax.: +90462223401; E-mail: nurhayat.ozdemir@erdogan.edu.tr

© 2008 All rights reserved / Tüm hakları saklıdır

Scincidae familyası 85'den fazla cinsle gruplandırılmış 1300'den fazla türe sahiptir (Anderson, 1999). Scincidae familyası üyelerinden *Mabuya* cinsinin taksonomisi uzun yıllardan beri sorgulanmaktadır. Orta Doğu'daki "*Mabuya*" cinsi üyeleri ilk önce *Trachylepis* cinsi altında değerlendirilmiştir. Karin vd. (2016) Orta Doğu'da dağılım gösteren *Trachylepis* cinsi üyelerinin genetik olarak farklı olduğunu ve farklı bir cins grubu altında tanımlanması gerektiğini bildirmiştir. Bu çalışma ile Orta Doğu'daki *Mabuya* cinsi grubu üyeleri "*Heremites*" cinsi adı altında toplanmıştır. Son moleküler filogenetik çalışmalara göre ise bu cinsin ülkemizde *Heremites auratus* ve *H. vittatus* olarak iki temsilcisi bulunmaktadır (Bahmani vd., 2017). *H. vittatus* türü Kıbrıs, Mısır, İsrail, Filistin, Lübnan, Suriye, Tunus, Cezayir ve Türkiye'de dağılım göstermektedir (Anderson, 1999). Daha önceleri *M. vittata* olarak bilinen Şeritli kertenkele *H. vittatus*, kumlu tepelerden taş çukurlara kadar, küçük çimlerden yoğun bitki örtüsüne kadar değişen çok farklı habitatlarda yaşayan bir kertenkele türüdür. Mısır'da sulak alanlarda, Tunus ve Ürdün'de vahalarda bulunan *H. vittatus*, bu bölgelerde nemli toprakları ve suya yakın yerleri tercih eder. Lübnan ve Türkiye'de ise dağlık alanlarda da gözlenmiştir (Hraoui-Bloquet vd., 2002).

Bugüne kadar *H. vittatus* türü ile ilgili (eski adı ile, *Trachylepis vittata*) literatürde farklı konulara dayalı (moleküler genetik, yeni lokalite tanımlanması, morfolojik vb.) (Fattahi vd., 2013; Nassar vd., 2013; Güçlü vd., 2014; Fattahi vd., 2014; Kumlutaş vd., 2015; Rastegar-Pouyani ve Fattahi, 2015) çalışmalar mevcut olsa da ülkemizde yaşayan bu türün bireylerine ait yaş yapısı ve ömür uzunluğu hakkında bir çalışma yoktur.

Mevcut çalışmamız, bugüne kadar demografik parametreleri açığa çıkarılmamış *H. vittatus* türüne ait ülkemizde yayılım gösteren bireylerin yaş yapısı, eşeysel olgunluk yaşı ve ömür uzunluğu hakkında bilgi sunmaktır. Ayrıca, yaş çalışmalarında en çok kullanılan yöntem olan iskelet kronolojisi yöntemi bu tür üzerinde ilk defa uygulanmıştır.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Çalışma alanı, yaş tayini ve morfolojik ölçümler

Bu çalışma Akdere (Sivas)'de (1732 m., 38°36'K, 36°52'D) yaşayan *Heremites vittatus* türüne ait (Şekil 1) 18 bireyden (1 ♂♂, 17 ♀♀) elde edilen parmak örnekleri ile yürütülmüştür. Nisan ayında yürütülen arazi çalışmasında örnekler az vejetasyonlu kum ve taşlık açık arazilerden toplanmıştır (İ. Uysal ve M. Tosunoğlu) (Şekil 2). Toplanan örnekler daha sonra Çanakkale Üniversitesi Zooloji müzesinde kayıt altına alınmıştır (Katalog numarası:37/2014). Sivas ilinde yıllık, ortalama sıcaklık 8 °C (-3.5-20.1 °C) ve aylık ortalama yağış miktarı ortalaması 429.2 kg/m²'dir.



Şekil 1. Sivas lokalitesinden *Heremites vittatus* türüne ait birey
Figure 1. Individual belonging to *Heremites vittatus* from Sivas locality

Bireyler arasında cinsiyet ayırımı hemipenis varlığı (erkek)/yokluğuna (dişi) göre değerlendirilmiştir. Temin edilen örneklerde erkek birey sayısı tek olduğu için analizler sadece dişi bireyler üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bireylere ait baş uzunluğu, baş genişliği ve burun ucu-kloak arası mesafe (SVL) 0.01 mm hassasiyetli dijital kumpas ile

ölçülmüştür. Ölçümleri alınan bireylerin sağ arka ayak en uzun parmakları sadece 1. ve 2. falanjı kapsayacak şekilde kesilmiştir. Alınan örnekler %70'lik alkolde histolojik kesitlerin hazırlanması için saklanmıştır. Histolojik kesitlerden Castanet ve Smirina (1990) tarafından literatüre tanıtılan iskelet kronolojisi yöntemi ile yaş tayini yapılmıştır. Falanj örnekleri ilk önce alkolden arınmaları için akan suyun altında bekletilmiş ve daha sonra %5'lik nitrik asitte 2 saat boyunca dekalsifiye edilip, tekrar akan su altında bekletilmiştir. Her bir falanjın diyafiz kısmından 17 µm'lik kesitler dondurmalı mikrotom kullanılarak alınmıştır. Hematoksilen ile boyanan kesitlerde LAG'ların sayımı ışık mikroskobu altında gerçekleştirilmiş ve kesitlerin fotoğrafları çekilmiştir.



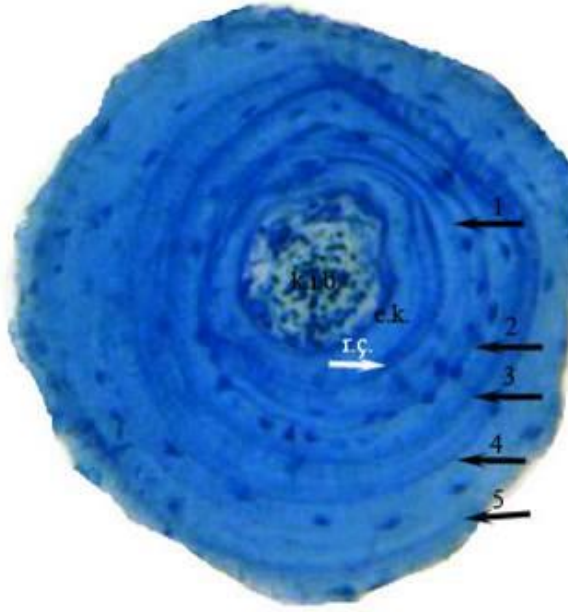
Şekil 2. *Heremites vittatus* bireylerinin toplandığı (Nisan/2014) Akdere lokalitesi
Figure 2. Locality of *Heremites vittatus* specimens

2.2. İstatistiksel Analiz (Statistical Analysis)

Örneklere ait morfolojik ölçümlerin ve yaşların tanımlayıcı istatistiksel verileri elde edilmiştir. Yaş ile vücut boyu arasındaki ilişki korelasyon ve regresyon analizi ile test edilmiştir. Ayrıca vücut boyu ile baş uzunluğu ve baş genişliği arasındaki ilişki de korelasyon analizlerine dahil edilmiştir. Verilerin analiz işlemi SPSS 21 programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

3. Bulgular

Yapılan iskelet kronolojisi analizine göre elde edilen dişi bireylerin yaşları 2-5 yıl arasında değişmektedir (Şekil 3). Eşeyssel olgunluğa ulaşma yaşı 2 ve 3 yıl olarak belirlenmiştir. Dişi bireylere ait tanımlayıcı istatistiksel bilgiler Tablo 1'de verilmiştir. Buna göre; ortalama yaş $3,53 \pm 0,87$ yıl olarak bulunurken, ortalama vücut boyu $71,25 \pm 7,20$ mm (62,79-84,51 mm), ortalama baş uzunluğu $14,01 \pm 0,93$ mm (12,79-15,06 mm) ve ortalama baş genişliği $9,29 \pm 0,93$ mm (7,59-10,71 mm) olarak tespit edilmiştir. Korelasyon analizleri sonucu yaş ve vücut boyu (Şekil 4) ($p < 0,01$, $r = 0,802$) ile baş uzunluğu ($p < 0,01$, $r = 0,595$) arasında anlamlı pozitif bir ilişki tespit edilmiştir. Ayrıca vücut boyu ile baş uzunluğu ($p < 0,01$, $r = 0,822$) ve baş genişliği ($p < 0,01$, $r = 0,709$) arasında da anlamlı pozitif bir ilişki gözlenmiştir.



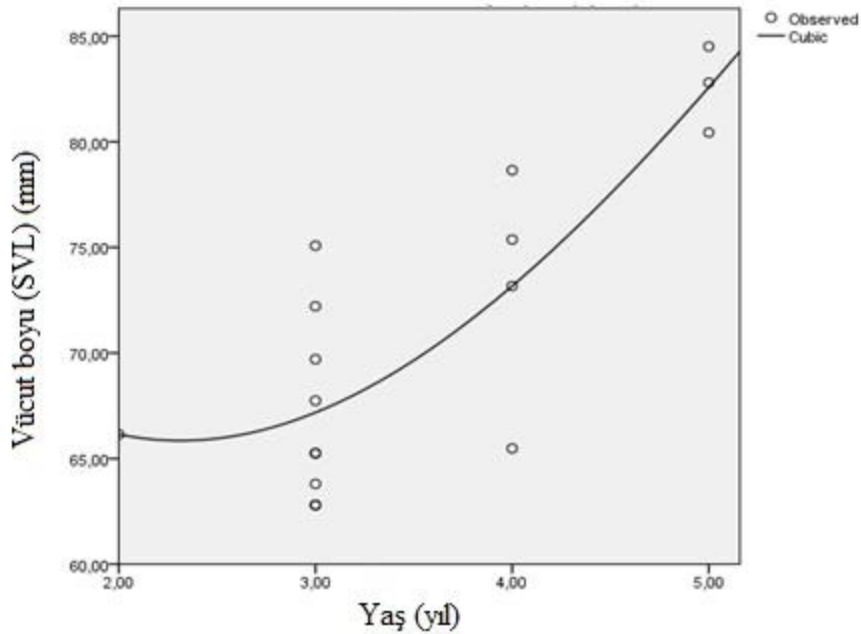
Şekil 3. 5 yaşında dişi *H. vittatus* bireyine ait kemik enine kesiti. Okların her biri bir LAG'a denk gelmektedir. e.k.:endosteal kemik, k.i.b.: kemik iliği boşluğu, r.ç.: rezorpsiyon çizgisi

Figure 3. Cross-section of a female *H. vittatus* individual at the age of 5. Each of the black arrows corresponds to a LAG. e.k.: endosteal bone, k.i.b.: marrow cavity; r.ç.: resorption line

Tablo 1. *Heremites vittatus* dişi bireylerine ait tanımlayıcı istatistikler

Table 1. Descriptive statistics of female individuals of *Heremites vittatus*

Parametre	Ortalama (\pm S.S.)
Yaş (yıl)	3,53 \pm 0,87
Vücut boyu (mm)	71,25 \pm 7,20
Baş uzunluğu (mm)	14,01 \pm 0,93
Baş genişliği	9,29 \pm 0,93



Şekil 4. Dişi bireylerde vücut boyu (SVL) ve yaş arasındaki ilişki ($y=85,057-17,969x+4,766x^2-0,254x^3$)

Figure 4. Correlation between body size and age in female individual

4. Sonuçlar ve tartışma

Mevcut çalışmamız ile *H. vittatus* türünün yaş yapısı ilk defa ortaya çıkarılmıştır. Bu tür ile alakalı literatürde yaş yapısını, eşeyssel olgunluk yaşını ve ömür uzunluğunu belirten bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Scincidae familyasına ait türler üzerinde yapılmış iskelet kronolojisi methoduna dayalı yaş çalışmaları literatürde az sayıda mevcuttur (Dunham vd., 1988). Literatürdeki mevcut çalışmalara bakıldığında, Scincidae familyası üyeleri arasında geniş aralıklı yaş yapısının görüldüğünü söylebiliriz. *Eulamprus tympanum* (Scincidae) türünde erişkin dişilerde düşük rakımlı örneklerde yaş 2-15 yıl (ortalama 4.24 ± 0.54) arasında değişirken yüksek rakımlı örneklerde 5-10 yıl (ortalama 7.16 ± 0.67) arasında değişmektedir. Düşük rakımlı dişilerde eşeyssel üreme yaşı 2 yıl olarak tanımlanırken, yüksek rakımlı olanlarda 5 yıl olarak bildirilmiştir (Rohr, 1997). Fakat Dubey vd. (2013) *Eulamprus leuraensis* dişi bireyleri için maksimum yaşı 6 yıl olarak tespit etmişlerdir. Smith vd. (2013) *Ctenotus atlas* (Scincidae) türünde örneklerin minimum ve maksimum yaşı 3 ve 4 olarak bildirmiştir. Bununla birlikte bu bahsedilen tür için araştırmacılar yaş ve boy arasında anlamlı bir korelasyon tespit edememişlerdir. Bu çalışmada ise; *Heremites vittatus* türünde ortalama yaş 3.53 ± 0.87 (2-5) yıl olarak bulunurken, eşeyssel olgunluğa ulaşma yaşı 2 ve 3 yıl olarak tespit edilmiştir. Ektoterm canlılarda ömür uzunluğu habitat özelliklerine (besin bulunabilirliği, ortam sıcaklığı vb.) bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Habitat yıkımları ve insani faktörlerde popülasyonlar üzerinde etkili olmaktadır (Eksilmez ve Altunışık, 2017) Ayrıca mevcut çalışma da analiz edilen dişi bireylerde yaş ve boy arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmuştur. Kertenkelelerde yaş ve boy arasındaki pozitif korelasyon muhtemel yavaş büyümenin sonucu olabilmektedir (Smith vd., 2013). Bununla birlikte birçok kertenkele türünde yaş ve boy arasında pozitif bir ilişkiye rastlanmıştır (Kurnaz vd., 2018; Üzüm vd., 2018).

Rastegar-Pouyani ve Fattahi (2015) Zagros (İran)'da yaşayan *Trachylepis vittata* dişi bireylerinde ortalama vücut boyunu 77.83 mm (90.72-69.13 mm), ortalama baş uzunluğunu 12.68 mm (14.09-11.55 mm) ve ortalama baş genişliğini 8.2 mm (9.47-6.52 mm) olarak bildirmiştir. Nassar vd. (2013) ise Lübnan'da yaşayan dişi bireylerde ortalama vücut uzunluğunu 68.42 mm olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmaya göre dişilerde ortalama vücut boyu 71.25 ± 7.20 mm olarak tespit edilmiştir. Ortalama baş uzunluğu 14.01 ± 0.93 mm (12.79-15.06 mm) ve ortalama baş genişliği 9.29 ± 0.93 mm (7.59-10.71 mm) olarak tespit edilmiştir. Lübnan ve Türkiye'de benzer habitat yapılarını (dağlık alanları) tercih eden *Trachylepis vittata* türü dişi bireyleri için benzer ortalama vücut uzunluğu değerleri tespit edilmiştir. Yaşam tarihi özellikleri lokal adaptasyonlar (habitat seçiciliği ve çevresel öngörülebilirlik dahil olmak üzere) tarafından etkilenmektedir (Wapstra, 1998).

Sonuç olarak, bu çalışma ile Türkiye'de dağılım gösteren *Heremites* cinsine ait *H. vittatus* türünde ömür uzunluğu bilgileri ilk defa ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen veriler literatürde bu anlamdaki boşluğu doldurmaktadır. İskelet kronolojisi yöntemi türlerin habitat yönetimi hakkında bilgi edinmek ve popülasyon yaş yapısı ve ömür uzunluğu üzerinde karşıt iklim koşullarının etkilerini araştırmak için oldukça kullanışlı bir tekniktir. Ayrıca, yaş tayini metodları arasındaki en yaygın olan iskelet kronolojisi yöntemi de bu tür üzerinde ilk defa uygulanmıştır.

Kaynaklar

- Anderson, S. C. (1999). The lizards of Iran (Vol. 15). Ithaca, New York, USA: Society for the Study of Amphibians and Reptiles.
- Bahmani, Z., Rastegar-Pouyani, E., Rastegar-Pouyani, N. (2017). The phylogenetic relationships and molecular systematics of scincid lizards of the genus *Heremites* (Sauria, Scincidae) in the Middle East based on mtDNA sequences. *Mitochondrial DNA Part A*, 1-10.
- Castanet, J., Smirina, E. (1990). Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. *Annales des Sciences Naturelles*, 11, 191-196.
- Comas, M., Reguera, S., Zamora-Camacho, F. J., Salvadó, H., & Moreno-Rueda, G. (2016). Comparison of the effectiveness of phalanges vs. humeri and femurs to estimate lizard age with skeletochronology. *Animal Biodiversity and Conservation*, 39(2), 237-240.
- Driscoll, D. A. (1999). Skeletochronological assessment of age structure and population stability for two threatened frog species. *Australian Journal of Ecology*, 24, 182-189.
- Dubey, S., Sinsch, U., Dehling, M. J., Chevalley, M., Shine, R. (2013). Population demography of an endangered lizard, the Blue Mountains Water Skink. *BMC Ecology*, 13, 4.
- Dunham, A. E., Miles, D. B., Reznick, D. N. (1988). Life history patterns in squamate reptiles. *Biology of the Reptilia*, 16, 441-522.
- Eksilmez, H., Altunışık, A., Özdemir, N. (2017). The Herpetofauna of Karçal Mountains (Artvin/Turkey). *Biodicon*, 10(1), 1-5.
- Fair, J., Paul, E., Jones, J. (2010). Guidelines to the Use of Wild Birds in Research. Washington, USA: Ornithological Council No: 222.
- Fattahi, R., Hosseinian Yousefkhani, S. S., Ilgaz, Ç., Kumlutaş, Y., Avci, A., Rastegar-Pouyani E. (2013). Distribution of *Trachylepis vittata* (Olivier, 1804) in Middle East and North Africa. *WebPub*, 1, 55-57.

- Fattahi, R., Ficetola, G. F., Rastegar-Pouyani, N., Avcı, A., Kumlutaş, Y., Ilgaz, Ç., Hosseinian Yousefkhani, S. S. (2014). Modelling the potential distribution of the Bridled Skink, *Trachylepis vittata* (Olivier, 1804), in the Middle East. *Zoology in the Middle East*, 60, 1–9.
- Gibbons, M. M., McCarthy, T. K. (1983). Age Determination of Frogs and Toads (Amphibia, Anura) from North-western Europe. *Zoologica Scripta*, 12(2), 145-151.
- Güçlü, Ö., Candan, K., Kankılıç, T., Kumlutaş, Y., Durmuş, S. H., Poulakakis, N., Ilgaz, Ç. (2014). Phylogeny of *Trachylepis sp.* (Reptilia) from Turkey inferred from mtDNA sequences. *Mitochondrial DNA*, 25(6), 456-463.
- Hemelaar, A. S. M., Van Gelder, J. J. (1979). Annual growth rings in phalanges of *Bufo bufo* (Anura, Amphibia) from the Netherlands and their use for age determination. *Netherlands Journal of Zoology*, 30(1), 129-135.
- Hraoui-Bloquet, S., Sadek, R. A., Sindaco, R., Venchi, A. (2002). The herpetofauna of Lebanon: new data on distribution. *Zoology in the Middle East*, 27, 35-46.
- Karin, B. R., Metallinou, M., Weinell, J. L., Jackman, T. R., Bauer, A. M. (2016). Resolving the higher-order phylogenetic relationships of the circumtropical *Mabuya* group (Squamata: Scincidae): An out-of-Asia diversification. *Molecular phylogenetics and evolution*, 102, 220-232.
- Kumlutaş, Y., Candan, K., Ilgaz, Ç. (2015). A New Locality Record of *Trachylepis vittata* (Olivier, 1804) (Reptilia: Scincidae) in Northeastern Anatolia, Turkey. *Russian Journal of Herpetology*, 22 (4), 310-314.
- Kurnaz, M., Bülbül, U., Eroğlu, A. İ., Uzun, F., Koc, H., Kutrup, B. (2018). Age and growth of the Artvin Lizard, *Darevskia derjugini* (NIKOLSKY, 1898), in Turkey. *Herpetozoa*, 30(3-4), 147-158.
- Nassar, F., Challita, M., Sadek, R., Hraoui-Bloquet, S. (2013). Sexual dimorphism and female reproductive cycle in the scincid lizard *Trachylepis vittata* (Olivier, 1804) in Lebanon (Reptilia: Scincidae). *Zoology in the Middle East*, 59(4), 297-301.
- Rastegar-Pouyani N., Fattahi, R. (2015). Sexual dimorphism in *Trachylepis vittata* (Olivier, 1804) (Sauria: Scincidae) in the Zagros Mountains, western Iran. *Turkish Journal of Zoology*, 39, 59-65.
- Rohr, D. H. (1997). Demographic and life history variation in two proximate populations of a viviparous skink separated by a steep altitudinal gradient. *Journal of Animal Ecology*, 66, 567-578.
- Smith, A. L., Bull, C. M., Driscoll, D. A. (2013). Skeletochronological analysis of age in three 'fire-specialist' lizard species. *South Australian Naturalist*, 87, 6-17.
- Sutherland, W. J. (1997). *Ecological census techniques*. Cambridge, England: Cambridge University Press.
- Üzüm, N., Ilgaz, Ç., Avcı, A., Candan, K., Güler, H., Kumlutaş, Y. (2018). Comparison of the body size and age structure of Lebanon lizard, *Phoenicolacerta laevis* (Gray, 1838) at different altitudes in Turkey. *Vertebrate Zoology*, 68(1), 83-90.
- Wapstra, E., (1998). *Life history and reproductive variation in the spotted skink, Niveoscincus ocellatus* (Gray 1845). Thesis, Department of Zoology, University of Tasmania, Australia, PhD thesis,

(Received for publication January 2018; The date of publication 15 August 2018)



The ecological status and macroinvertebrate diversity of the Nerodime River in Kosova

Albulene EMINI¹, Ferdije Zhushi-ETEMI^{*2}, Osman SEYYAR¹

¹Niğde Ömer Halisdemir University, Faculty of Science and Arts, Department of Biology, Niğde, Turkey

²University of Prishtina "Hasan Prishtina", Faculty of Mathematical and Natural Sciences, Department of Biology, Prishtina, Kosovo

Abstract

Macroinvertebrates are a mandatory required Biological Quality Element by the WFD as indicator for the ecological status of the surface waters. In this paper we present the results of the investigation of macroinvertebrate benthic fauna in the river Nerodime in Kosovo, conducted from June to September 2012. The EPT index and Hilsenhoff's family biotic index (BI) were calculated to evaluate the Ecological status of the river Nerodime.

Key words: macroinvertebrates, ecological status, benthic fauna, river Nerodime, EPT, BI

1. Introduction

The state of Kosovo is located in South-East Europe, in Central Balkan Peninsula. Geographic position, climate conditions, altitude and high mountains that surround the country have influenced its hydrographic network. Four river basins that comprise Kosovo's watersheds drain into three seas: the Adriatic Sea (43.5%), the Aegean (5.8%) and the Black Sea (50.7%).

The importance of biological parameters as indications of the health of the river is highlighted in the European water Framework Directive (EWFD, 2000). The general goal of the Directive is to achieve good water status for all water bodies within the territory of the EU by year 2015 (Pont *et al.*, 2006).

Among the biological quality elements, the macroinvertebrates are by far the most frequently used group for bio-indication in standard water management (De Pauw *et al.*, 1992; Rosenberg and Resh, 1993; Metcalfe- Smith, 1994; Hering *et al.*, 2004). Macroinvertebrates are organisms that form an integral part of an aquatic environment and have ecological and economic importance. They are bottom-dwelling organisms and include insects, crayfish, snails, clams and aquatic worms.

The main threats for living organisms of freshwater ecosystems are habitat destruction and the changes in physical and chemical parameters due to discharges of untreated wastewaters, industry, agriculture pollution, acidification, etc.

Benthic macroinvertebrates are found in most aquatic habitats, they have limited mobility, they play an important role in food web, they have a relatively long life span and their sampling is easy.

Macroinvertebrates act as biological indicators because they react quickly to changes in water quality conditions. Some of them are sensitive; some are semi tolerant or tolerant to different pollutants. Thus, macroinvertebrate species should reflect deleterious events that have occurred in the aquatic environment during any stage of their development (Cairns and Pratt, 1993). Therefore, the species composition and their abundance in aquatic ecosystems are the basis for water quality monitoring and classification.

The aim of this study was to evaluate the Ecological status of river Nerodime based on macroinvertebrate fauna as an indicator of water quality.

River Nerodime is the left tributary of the River Lepenci. It is the main river in the municipality of Ferizaj. It originates on the eastern side of Mount Jezerc (42°22'09"N 21°04'48"E) at an altitude of 660 m. The length of the river is 41km² and reaches 228km² catchment area. The river bed width is 2-5m, and water flows with average speed of 0.9 m³ / sec (Figure 1). The river Nerodime in its middle flow enters the city of Ferizaj where it becomes collector of many

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +38344249636; Fax.: +38344249636; E-mail: feirdije.zhushi@uni-pr.edu

pollution substances from municipal wastewaters, agriculture, industry and other sources (Kosova Environmental Protection Agency (2008–2009).

Although with the poor flow, river Nerodime has an important hydrographic role due to the bifurcation phenomenon its two tributaries form. One tributary of the river flows into river Sitnica (Black Sea basin) and the second one into the river Lepenc (Aegean Sea basin) (Kosova Environmental Protection Agency (2008–2009).



Figure 1. A view from Nerodime River in Kosova

2. Materials and methods

Both qualitative and quantitative analyses of macroinvertebrates in three localities (T1, T2 and T3) along the course of the river Nerodime was performed during the period June to September 2012. The organisms were collected with the help of the D frame net or with Surber net with mesh holes of up to 500 μ , in different habitat types. The collected samples in the field were preserved in 75 % alcohol and were transported in the laboratory in the Department of Biology at Faculty of Mathematics and Natural Sciences where they were classified with the help of adequate keys (McCafferty,1981; Merritt and Cummins,1984). Two indices were used to evaluate the quality of water in river Nerodime: Biotic index (BI) and the (EPT) Ephemeroptera-Plecoptera-Trichoptera taxa/family index. (Lenat, 1988). The ratio and number of these macroinvertebrates change with the stream food resources and human impacts and therefore can be used as a tool for assessing the ecological status of the biotic community and water quality. The Hilsenhoff biotic index (BI) modified by Bode (Bode-s et al. 1988)and adapted from Hilsenhoff (1997) was calculated to assess the organic pollution based on the tolerance values of macroinvertebrate species to various levels of dissolved oxygen. The classification of collected animals for calculation of both indices in our investigation is done to family level.

3. Results

The results of our research are presented in tables 2 and 3. During our investigation of the benthic macroinvertebrate fauna in river Nerodime in total 2192 specimens were collected. In taxonomic terms these organisms belong to 23 different families of 10 animal groups. (Table 2). Taxa Richness indicates the health of the community through its' diversity, and increases with increasing habitat diversity, suitability, and water quality (Plafkin et al., 1989). Among the recorded groups in our study, Ephemeroptera and Plecoptera have the highest diversity of the families-5, followed by Diptera and Trichoptera, respectively. Other groups (Oligochaeta, Hirudinea, Mollusca, Amphipoda, Odonata) were represented by a small number of taxa. The taxa richness was highest (18-17) in upper and middle part of the river (T1 and T2) and it decreased significantly down the river to 7 (T3) .In the first two sampling sites (T1and T2), families of Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera comprised up to 97% of macronvertebrates. The number of EPT taxa is 9-11 families, (EPT score 44%) whereas the value of Biotic index (Hilsenhoff's family Biotic Index) BI is 3.62-3.18, that indicates very good, respectively excellent water quality (Figure 2).

Table 2. Macroinvertebrate structure in the sampling localities in the river Nerodime

	Macroinvertebrate groups	Sampling localities		
		T1	T2	T3
	<i>Trichoptera</i>			
1	Hydrophychidae	+	+	
2	Rhyacophilidae	+	+	
3	Glossosomatidae	+	+	
	<i>Ephemeroptera</i>			
4	Ephemeridae	+	+	
5	Heptagenidae	+	+	
6	Caenidae	+		
7	Baetidae	+	+	
8	Ephemerellidae	+	+	+
	<i>Plecoptera</i>			
9	Perlidae	+	+	
10	Perlodidae	+		
11	Nemouridae	+		
12	Capnidae		+	
	<i>Odonata</i>			
13	Galopterygidae	+		
14	Gomphidae	+	+	
	<i>Diptera</i>			
15	Tipulidae	+	+	
16	Chironomidae	+	+	+
17	Simulidae			+
18	Tabanidae	+	+	+
	<i>Oligochaeta</i>			
19	Lumbricidae	+		
	<i>Amphipoda</i>			
20	Gammaridae	+	+	+
	<i>Mollusca</i>			
21	Lymnaeidae			+
	<i>Hirudinea</i>			
22	Hirudinidae		+	+
	<i>Crustace</i>			
23	Astacidae		+	

Table 3. The values of Hilsenhoff's family Biotic Index (Hilsenhoff, 1997) in sampling localities in the river Nerodime

Localities	Biotic index	Water quality	Degree of organic pollution
T1	3.62	Very good	Possible slight organic pollution
T2	3.18	Excellent	No apparent organic pollution
T3	7.92	Poor	Very significant organic pollution

In the sampling locality downstream of the river (T3) the macroinvertebrate structure changed in favor of semi tolerant and tolerant groups. The richness of taxa (family) is significantly lower in comparison with two other localities. Macroinvertebrate fauna in this locality comprises from Diptera, Amphipoda, Molluscs and Hirudinea. The dominant taxa recorded in this part of the river course are Chironomidae, Simulidae, Tabanidae and Hirudinidae, generally the most pollution tolerant groups (Armitage *et al.*, 1983). This community type is characteristic for degraded stream zones influenced by organic pollution. Regarding the EPT taxa, only a family was recorded while most sensitive stoneflies completely disappeared and even the presence of pollution tolerant Ephemeroptera and Trichoptera families was not recorded. According to Rosenberg and Resh (1993) changes in presence/absence, numbers, morphology, physiology or behavior of indicator organisms can indicate that the physical and/or chemical conditions are outside their preferred limits.

The composition of macroinvertebrate communities in first two sampling station in the upper course of the river Nerodime and the BI values indicate a healthy water ecosystem or a good ecological status along this part of the river course. Low EPT index and the value of BI in the third sampling site (T3) show poor water quality as a result of many anthropogenic activities in this area. Similar studies of the surface water bodies in Kosovo, using the

macroinvertebrate taxa as indicators of water quality (Gashi 1996,2006; Zhushi Etemi, 2005; Grapci, 2006 and Ibrahim, 2011) have indicated a good quality of waters in the upper stream of the investigated rivers in Kosovo, and significant decrease in water quality downstream the rivers due to many pressure/disturbance factors.

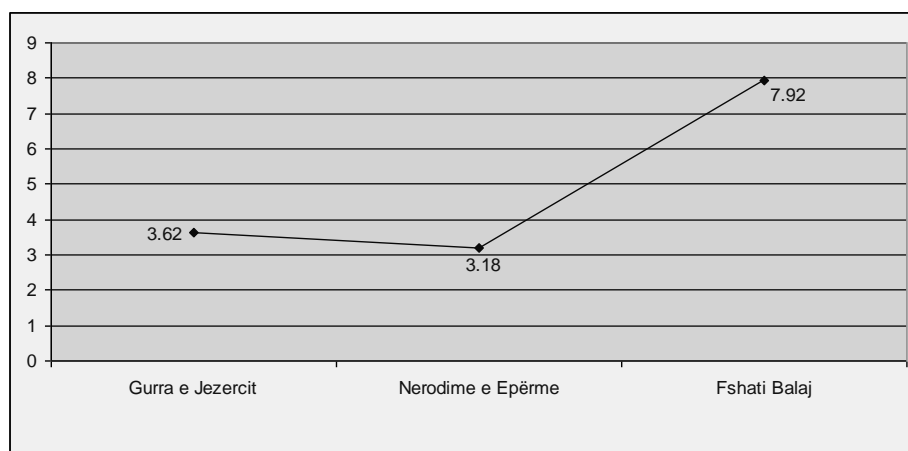


Figure 2. The graphic presentation of BI values in three sampling sites in the river Nerodime

4. Conclusions and discussion

The high value of EPT index and BI (biotic index) in first two sampling sites indicates a good water quality. In our study the most presented taxa /families in these sites were insect families sensitive to dissolved oxygen in the water. This composition changed significantly in the sampling locality T3, where most of the sensitive taxa disappeared due to the decrease of water quality as the result of changed environmental parameters. The macroinvertebrate community in T3 was dominated by tolerant organisms such as Chironomidae and Hirudinea which usually indicate poor water quality (Armitage et al., 1983)

Organic pollution as a result of discharge of untreated municipal wastewaters remains the main problem of the surface waters in Kosovo. From our investigation it can be concluded that in the near future the responsible authorities in the country should develop a Monitoring program for Surface water bodies which complies with the requirements of the WFD(2000) that should investigate Physicochemical, Hydro morphological and Biological quality elements.

References

- Armitage P.D., Moss D., Wright J.F. and M.T. Furse (1983). The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running-water sites. *Water Research*, 17, 333–347.
- De Pauw, N., Ghatti, P. F., Manzini, P. and Spaggiari, P., (1992). ‘Biological assessment methods for running water’. In: *River Water Quality – Assessment and Control*, Newman, P., Piavaux, A. and Sweeting, R. (Eds), EUR 14606 EN-FR, 1992-III. Commission of the European Communities: Brussels, Belgium, pp. 217–248.
- Gashi A (2006). Biocenological and ecological analyses of macroinvertebrates and necton in River Llap. PhD thesis, University of Prishtina”Hasan Prishtina”
- Grapci-Kotori, L. (2002). The investigation of benthic macrofauna in the upperstream of Drini i Bardhe River and its role in distribution of fish species *Salmo trutta fario* L. and *Barbus barbus* L. University of Prishtina”Hasan Prishtina”
- Hering, D., Moog, O., Sandin, L. and Verdonschot, P., (2004). ‘Overview and application of the AQEM assessment system’. *Hydrobiologia*, 516, 1–20.
- Hilsenhoff, W. L., (1988). ‘Rapid field assessment of organic pollution with a family-level biotic index’. *J. North Am. Benthol. Soc.*, 7, 65–68.
- Ibrahim H. (2011). Faunističke, ekološke i biogeografske značajke tulara (insecta: trichoptera) Kosova. Doktorska disertacija, predložena Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktorata prirodnih znanosti biologije. Zagreb, 2011
- Illies, J., Ed (1967). *Limnofauna Europaea*. Gustav Fisher Verlag.
- Jali, M, Mohamed A. H ., (2007): *Freshwater Macroinvertebrates*
- Lenat, D.R. (1988). Water quality assessment using a qualitative collection method for benthic macroinvertebrates. *J.N. Am. Benthological Soc.* 7: 222-233.
- McCafferty, W. Patrick: *Aquatic Entomology - The Fisherman's and ecologists' Illustrated Guide to Insects and Their Relatives*, Science Books International, Boston (1981)Metcalf-Smith, J. L., (1994). ‘Biological water quality

- assessment of rivers: use of macroinvertebrate communities'. In: *The Rivers Handbook*, Vol. 2. Calow, P. and Petts, G. E. (Eds). Blackwell Scientific Publications: Oxford, UK, pp. 144–170.
- Nature Report, (2010): Report on the State of Nature 2008 – 2009, Kosova Environmental Protection Agency Prishtina,
- Ricard W. Merritt and Kenneth W. Cummins: Introduction to the Aquatic Insects of North America, Kendall Hunt Pub Co; 2nd/Sprl edition (August 1984)
- Rosenberg, D. M. and Resh V. H., (1982). 'The use of artificial substrates in the study of freshwater benthic macroinvertebrates'. In: *Artificial Substrates*, Cairns, J. (Ed.) Ann Arbor Science: Ann Arbor, MI, USA, pp. 175–235.
- WFD (2000). Water Framework Directive – Directive of European Parliament and of the Council 2000/60/EC – Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy.
- Zhushi Etemi F. (2005). Biological evaluation of River Sitnica based on macroinvertebrate composition, University of Prishtina"Hasan Prishtina.

(Received for publication 27 March 2017; The date of publication 15 August 2018)



Two new records (*Sorbus persica*, *Cotoneaster morulus*) for the Lebanon flora

Ali A. DÖNMEZ^{*1}, Magda BOU DAGHER-KHARRAT², Zübeyde UĞURLU AYDIN¹

¹ Molecular Plant Systematic Laboratory (MOBIS), Department of Biology, Faculty of Science, Hacettepe University, Ankara, Turkey

² Laboratoire Caractérisation génomique des plantes, Département Sciences de la Vie et de la Terre, Faculté des Sciences, Campus Sciences et technologies, Université Saint-Joseph, Mar Roukos, Mkalles, Liban

Abstract

Two taxa of Rosaceae, *Sorbus persica* and *Cotoneaster morulus*, are reported as new records for Lebanon flora. A detailed description, geographical distributions and illustrations of the new records are provided in this study.

Key words: *Cotoneaster*, flora, new record, Lebanon, *Sorbus*

----- * -----

Lübnan florası için iki yeni kayıt (*Sorbus persica*, *Cotoneaster morulus*)

Özet

Bu çalışmada, Rosaceae familyasına ait olan *Sorbus persica* ve *Cotoneaster morulus* türleri Lübnan Florası için yeni kayıt olarak tespit edilmiştir. Bu yeni kayıtların ayrıntılı betimleri, yayılışları ve fotoğrafları da çalışma içerisinde yer almaktadır.

Anahtar kelimeler: *Cotoneaster*, Flora, Lübnan, *Sorbus*, yeni kayıt

1. Introduction

Lebanon is a relatively small country of 10,450 km² considered as a regional hotspot for biodiversity (Médail & Quézel, 1997; Myers et al., 2000). Its floristic richness is estimated at 2612 vascular plant taxa, of which 108 are endemic to Lebanon and 336 are endemic to neighbor area including to Turkey (Tohme and Tohme, 2007).

Sorbus and *Cotoneaster* were threatened under subfamily Maloideae C. Weber for a long time. After the phylogenetic and nomenclature changes (Potter et al., 2007; Reveal, 2012a; 2012b), these genera are accepted under subfamily Maloideae C. Weber, tribe Maleae Small, subtribe Malinae Reveal. In Lebanon, the genus *Sorbus* is represented by only two species, *S. graeca*, Lodd. ex Schauer and *S. torminalis* (L.) Crantz, and these taxa are reported on Lebanon Flora (2017) online database featuring an update of the “Flore du Liban et de la Syrie” by Mouterde (1984). The new record, *S. persica*, was collected from Ehden Nature Reserve (North Lebanon) and from Bekaa valley in Lebanon. The first place is common habitat for *S. torminalis* and the new record. The genus *Cotoneaster* is represented by one species in Lebanon according to Mouterde (1984). A second new record, *Cotoneaster morulus*, was also founded in Ehden Nature reserve.

2. Materials and methods

Specimens of the new records were collected from different localities during the field trip in Lebanon by first two authors. Samples are identified using the Turkish flora (Gabrielian, 1972) and using the relevant literature (Gabrielian, 1978). All collected specimens are deposited in HUB.

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903122976165; Fax.: +903122992028; E-mail: donmez@hacettepe.edu.tr

3. Results

Sorbus persica Hedl.; Monogr. Gatt. Sorbus 70, f. 18: 1901. Figure 1.

Lectotype: Iran. Persia borealis, in M. Elburs, pr. pagum Passgala, 21.5.1843, *Kotschy* 187 (lectotype designed by Schönbeck-Temesy, 1969: W!; isolectotypes: G! BM! LE!).

Shrub with branched at base, 3–4(–7) m; crown oblong. Stem bark grey; young branches brown, villose, with numerous lenticels. Buds ovate, oblong, 5–7 × 3–4 mm, ovate with small mucro, sticky. Leaves obovate, deltoid or widely elliptic, (4–)5–7(–10) × 4–6(–9) cm, 4–6-lobed at margin, dull or dark green, glabrous or sparsely hairy at above, grey, densely lanate at below, shortly cuneate truncate or rounded at base, entire or serrate at margin, rounded or obtuse at apex, mid-vein 5–7 pairs; petioles 10–15(–22) mm long, lanate; stipules triangular or subulate, 3–5 mm, sparsely lanate, deciduous. Inflorescence a corymb with (15–)25–40(–70)-flowered, (4–)6–8(–12) cm in diameter; inflorescence axis lanate; bracts subulate, 8–12 mm, long or sparsely lanate, deciduous; bracteoles similar to bracts, smaller. Flowers 10–15 mm in diameter, epigyn. Hypanthium cupular, lanate at outside, partly deciduous at fruit. Sepals narrowly triangular, erect, 2–2.5 × 1.5–2 mm, densely lanate at outside, sparsely lanate, acute at apex, persistent in fruit. Petals white, elliptic or rounded, 4–6 × 4–6 mm, concave with claw, sparsely lanate at base. Stamens 20, unequal; ovary lanate at outside, styles 2, lanate at base. Fruits 10–14 × 8–10 mm, red, orange, short oblong, elliptic or ellipsoid with typical numerous lenticels, 10–20 in frutescence. Seeds 5–8 × 3–4 mm, brown, 4(–6), long triangular.

Distribution and habitat: Turkey, Georgia, Azerbaijan, Armenia, Iran, Lebanon and Middle Asia, occurring in deciduous scrub and junipers, 700–2500 m.

Specimen examined: LEBANON. Bekaa: Yammounek, 34°08'38"N, 36°03'09"E, 1393 m, on rock crack, 10 June 2010, AAD 17065-*M. Bou Dagher-Kharrat*; North Ehden: before entry of the Nature reserve, limestone, mixed forest opening, 9 December 2014, AAD 18977-*M. Bou Dagher-Kharrat*.



Figure. 1. *Sorbus persica* in Lebanon (from AAD 18977)

Cotoneaster morulus Pojark.; Bot. Mater. Gerb. Bot. Inst. Komarova Akad. Nauk S.S.S.R. 21: 177. 1961.

Figure 2.

= *C. armenus* Pojark.; Bot. Mater. Gerb. Bot. Inst. Komarova Akad. Nauk S.S.S.R. 17: 202. 1955.

Holotype: [Soviet Azerbaijan] 8 km boream versus ad oppidulo Nucha, 12 ix 1949, *Pojarkova* 1156 (LE!).

Deciduous, (0.5–)1–1.5 m varying from ground-hugging prostrate to erect shrubs; branches intricate or symmetric. Young branches greyish-brown or reddish, initially pilose, later sparsely pilose or glabrous. Leaves elliptic, rounded or lanceolate, rarely oblong, (0.5)1–2(–2.5) × 0.4–1.5(–2) cm, initially sparsely pilose later glabrous at below, sparsely pilose or glabrous at above, widely truncate or rounded at base, obtuse or rounded rarely emarginate at apex, margin entire; petiole 2–3(–4) mm long; stipules lanceolate, 1–1.5 mm, usually red, sparsely tomentose, deciduous. Inflorescence corymbose, 3–5(–8)-flowered; bracts linear, 0.6–1 mm, glabrous or sparsely long hairy; bracteoles small; pedicels short, 1–2 mm, pilose. Flowers 7–9 mm in diameter. Hypanthium widely campanulate, sparsely pubescent. Sepals triangular, 1–1.6 × 0.8–1.2 mm, acute at apex, incurved. Petals rounded, spreading, slightly concave with claw, pilose at inner base, white, 4–5 mm in diameter, entire or slightly dentate at margin, emarginate at apex. Stamens (18–)20(–21), filaments in single row, enlarged at base. Ovary pubescent apically in flower; styles mainly 2(–3), free. Fruit elliptic or ovate, 5–7 × 4–6 mm, purple-black, glabrous or sparsely lanate at apex; pyrenes 2(–3), hairy at apex.

Distribution and habitat: Turkey, Lebanon, Caucasia occurring in forests and shrubs at 450-1500 m.

Specimen examined: LEBANON. North Ehden: before entry of the Nature reserve, limestone, mixed forest opening, 34°19'23"N, 035°57'42"E, 1400 m, 17 May 2014, AAD 18970-*M.Bou Dagher-Kharat*, *ibid.* AAD 18987.



Figure. 2. *Cotoneaster morulus* in Lebanon (from AAD 18977)

4. Conclusions and discussion

Sorbus is taxonomically difficult genus like most genera of *Rosaceae* because of hybridization and apomixes (Sennikov & Kurtto, 2017). It occurs wide range of western, central and southern Europe, in North-western part of Africa. The distribution of the genus is expanded to Turkey, Lebanon, Caucasus and the Middle East. *Sorbus persica* can be found in Transcaucasia, east and north part of Iran with east part of Turkey (Kurtto, 2009). Therefore, Lebanon has potential to be habitat for *Sorbus persica* and it was collected from northern of Lebanon.

Leaf shape is important taxonomic character to distinguish species of the genus. Among *Sorbus* in Lebanon, the new record has obovate or elliptic leaves with crenate or entire margin, while *Sorbus torminalis* is characterized lobed and ovate leaves and *S. graeca* is well distinguished by ovate and glabrous leaves.

Cotoneaster is another woody genus of *Rosaceae*, which has complicated taxonomy by interspecific hybridization and apomixis. It occurs northwestern Africa, southern India and Taiwan, Europe and North Africa (Dickoré & Kasperek 2010). It is also known various parts of Turkey (Browicz, 1972; Bağcı et al. 2012). Fryer and Hylmö (2009) are included about 400 species with 70 new species in latest monograph of the genus. Both native and alien species of *Cotoneaster* are also attractive as ornamental plants in Europe (Dickoré & Kasperek 2010). Despite it has species richness in the family, only *C. nummularius* are recorded in Lebanon flora until now. The new record, *C. morulus* is distinguished having by smaller flower (7–9 mm in diam.) and smaller oblong leaves from *C. nummularius*.

Acknowledgements

The authors AAD and ZUG would like to thank TUBITAK-KBAG, project entitled “Taxonomic Revision of the Pomeae (*Rosaceae*) Genera (excluded *Crataegus* L.) in Turkey, Project No: 111 T 850” for financial support.

References

- Bağcı, Y., Can, A. A., Doğu, S. (2012). The flora of region among Ahırlı-Yalıhüyük and Bozkır (Konya/Turkey). *Biodicon*, 5/1, 43-62.
- Browicz, K. (1972) *Cotoneaster*. In: Davis P. H. (ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* 4, pp. 129-132. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Dickoré, W.B., Kasperek, G. (2010). Species of *Cotoneaster* (*Rosaceae*, *Maloideae*) indigenous to, naturalizing or commonly cultivated in Central Europe. *Willdenowia*, 40, 13-45. doi:10.3372/wi.40.40102.

- Fryer, J., Hylmö, B. (2009). *Cotoneasters. A comprehensive guide to shrubs for flowers, fruit, and foliage*. Portland.
- Gabrielian, E.T. (1972). *Sorbus* L. In: Davis, P.H. (Ed). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol 4, pp. 147-156, Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Gabrielian, E. (1978). Rjabiny (*Sorbus* L.) *Zapadnoj Azii i Gimalaev*. Yerevan.
- Kurtto, A. (2009) Rosaceae (pro parte majore). Euro+Med Plantbase—the information resource for Euro Mediterranean plant diversity. <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/> (Accessed: 01.10.2017).
- Lebanon flora. *Sorbus*, *Cotoneaster*. Available from <http://www.lebanon-flora.org>. (Accessed: 01.10.2017).
- Médail, F., Quézel, P. (1997). Hot-Spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean Basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 84(1), 112-127.
- Mouterde, P. (1984). *Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie*. (French edition). Editions de l'Impr. catholique
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(24), 853-858.
- Potter, D., Eriksson, T., Evans, R.C., Oh, S., Smedmark, J.E.E., Morgan, D.R., Kerr, M., Robertson, K.R., Arsenault, M., Dickinson, T.A., Campbell, C.S. (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematic and Evolution*, 266(1), 5-43. doi: 10.1007/s00606-007-0539-9.
- Reveal, J.L. (2012a). Newly required infrafamilial names mandated by changes in the Code of nomenclature for algae, fungi and plants. *Phytoneuron*, 33, 1-31.
- Reveal, J.L. (2012b). An outline of a classification scheme for extant flowering plants. *Phytoneuron* 37, 1-221.
- Sennikov, A.N., Kurtto, A. (2017). A phylogenetic checklist of *Sorbus* s.l. (Rosaceae) in Europe Memoranda Soc. Fauna. *Flora Fennica*, 93, 1-78.
- Tohme, G., Tohme, H. (2007). *Illustrated flora of Lebanon: 2600 wild flower*. Beirut: CNRS Lebanon publications. .

Additional specimen examined

Sorbus persica

Turkey. Karabük: Keltepe, 1579 m, 41°03'13"N, 032°34'35"E, 18 Oct. 2012, AAD 18253-Z.Uğurlu; Çankırı: Kurşunlu, 1299 m, 40°56'26"N, 033°16'14"E, 13 Oct. 2013, AAD 18845; Zonguldak: Keltepe, above Karabük, 1700 m, Davis 38875 (E!); Tokat: from Reşadiye to Aybastı, steppe, 1369 m, 40°29'36"N, 037°16'48"E, 15 Oct. 2013, AAD 18868; Bitlis: Tatvan, Nohutlu village, 1760 m, 38°21'63.6"N, 042°40'04"E, 2 Oct. 2013, AAD 18748-K.Özgişi; Tatvan, Nemrut Mountain, 2300 m, 30 July 1972, H. Peşmen 3139 (HUB!); Bingöl: ad Boglan, 1060 m, Kotschy 802 (G!-another syntypes). Kars: from Kağızman to Horosan, 1326 m, 40°04'23.5"N, 042°53'45"E, 6 Oct. 2013, AAD 18828-K.Özgişi; Artvin: Ardanuç, 700 m, Aydın (ISTO 4316!); Van: 15 km N. of Çatak, Davis 23153(E!); İçel: Bolkar Mountain, Jau Schaula (summit of Armadschek), 2100 m, Eig & M.Zohary 276 (HUJ!); Hakkari: Şapatan, 1864 m, 37°21'33.7"N, 44°31'48.8"E, 4 Oct. 2013, AAD 18802-K. Özgişi; 12-16 km from Şemdinli to Yüksekova, 1600-1650 m, Davis 45007(E!); Samdi Da., 1800 m, Rix 41(E!).

Azerbaijan. İsmaili, Taglobion village, 5 June 1979, Zaykovnikova s.n (LE!)

Armenia. Mikayan, Cermuh, 17 Sept. 1952, Gabriellien s.n (LE!); Azizbeyov, S. of Cermuk, Zaykovnikova s.n (LE!); Vedi, Kaladivi village, 22 July 1952, Gabriellien s.n (LE!); Begun, 17 Sept. 1967, Zaykovnikova (LE!).

Cotoneaster morulus

Turkey. Artvin: Yusufeli, around Morkaya village, 1541 m, 41°32'17.3"N, 042°47'50"E, 5 June 2013, AAD 18501; Çoruh: Ardanuç, 450 m, Aydın (ISTO 4309)! d. Yusufeli, 900-950 m, Davis 47668!; Sarıgöl, 848 m, 40°58'59"N, 041°30'01.1"E, 15 March 2015, AAD 19347; Ardanuç, Ovacık village, 394 m, 18 August 2013, AAD 18642; Şavşat-Yusufeli, 250 m, 25 August 1995, AAD 5026.

Georgia. Sagarejo: Gaze Kakheti, Khasmi village, David Gazeji area, *Paliurus-Pyrus* scrub slopes, 844 m, 41°44'82.5"N, 045°12'65.7"E, 9 August 2012, AAD 18156-Z.Uğurlu & N.Lachashvili; Garici area, Udabno village, 931 m, 41°33'50.3"N, 045°20'55.5"E, 10 August 2012, AAD 18163-Z.Uğurlu & N.Lachashvili.

Azerbaijan. Cingilli, 12 September 1949, A. Pojarkova 1156 (LE!).

Armenia. Megri region, 17 October 1937, Pojarkova 385 (LE!); Erivan, near the Gehart Church, 17 October 1937, Pojarkova 385 (LE!).

(Received for publication 20 OCTOBER 2017; The date of publication 15 August 2018)



Essential oil characterization of *Cousinia sivasica* Hub.-Mor. (Asteraceae)

Mehmet TEKİN^{*1}, Gülmira ÖZEK², Esra MARTİN³, Temel ÖZEK^{2,4}, Gül den YILMAZ⁵, Kemal Hüsnü Can BAŞER^{2,6}

¹Trakya University, Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, 22030, Edirne, Turkey

²Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 26470, Eskişehir, Turkey

³Necmettin Erbakan University, Faculty of Science, Department of Biotechnology, 42090, Konya, Turkey

⁴Anadolu University, Medicinal Plant Drug and Scientific Research Center, 26470, Eskişehir, Turkey

⁵Trakya University, Faculty of Science, Department of Biology, Balkan Campus, 22030, Edirne, Turkey

⁶Near East University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Lefkoşe, Nord Cyprus

Abstract

In this study, essential oil properties of an endemic plant of Turkey, *Cousinia sivasica* Hub.-Mor. were studied for the first time. Essential oil of *C. sivasica* was obtained by using Clevenger apparatus with hydrodistillation technique. The essential oil was analyzed by GC-FID and GC/MS techniques on a polar column and total 44 compounds were identified representing 98.3%. Fatty acids, their esters, methyl-branched carboxylic acids and aromatic acid esters predominated (66.3%) in the oil with hexadecanoic acid (42.8%), 1-isobutyl 4-isopropyl 3-isopropyl-2,2-dimethyl succinate (12.2%) and methyl salicylate (7.1%) as major constituents.

Key words: Compositae, *Cousinia*, endemic, essential oil, GC/MS, Turkey

----- * -----

Cousinia sivasica Hub.-Mor. (Asteraceae)'nın uçucu yağ karakterizasyonu

Özet

Bu çalışmada Türkiye için endemik bir bitki olan *Cousinia sivasica* Hub.-Mor.'nın uçucu yağı ilk defa çalışılmıştır. *C. sivasica*'nin uçucu yağı hidrodistilasyon yöntemi ile Clevenger aparatı kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen uçucu yağın analizi GC-FID and GC/MS teknikleri kullanılarak polar kolonda gerçekleştirilmiş ve yağın %98.3'ünü oluşturan 44 bileşik tespit edilmiştir. Yağ asitleri, onların esterleri, metil bağlı karboksilik asitler ve aromatic asit esterleri yağın %66.3'ünü oluştururken ana bileşikler olarak hegzadekanik asit (%42.8), 1-izobütül 4-izopropil 3-izopropil-2,2-dimetil süksinat (%12.2) ve metil salisilat (%7.1) bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Compositae, *Cousinia*, endemik, uçucu yağ, GC/MS, Türkiye

1. Introduction

Asteraceae family is represented by 23.600 species, 1620 genera and 12 subfamilies in the world. Members of Asteraceae family are distributed naturally in temperate, sub-tropical and tropical climates, and they can be used for ornamental, vegetable and some of them also used in pharmaceuticals due to their aromatic and medicinal property (Stevens, 2001). This family is the largest family of flowering plants in Turkey, with a total of 1209 recorded species. From these species, 447 are endemic, with an endemism ratio of 37% (Dogan et al., 2009). The genus *Cousinia* Cass. includes about 600-700 species throughout the world and nearly all of them grown in the central and southwestern Asia (Attar and Djavadi, 2010; Attar and Maroofi, 2010). In Turkey, *Cousinia* genus is represented with 39 species from which 26 are endemic with an endemism ratio of 66% (Güner et al., 2012). There are some natural hybrids for Turkish flora such as *Cousinia x kurubasgeciensis* Ilcim & H. Ozcelik (Asteraceae) (İlçim et al., 2013). Especially, in Asia where *Cousinia* genus has been densely distributed, some species are used traditionally by local people against various

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903462191010; Fax.: +903462191634; E-mail: mtekin2280@gmail.com

© 2008 All rights reserved / Tüm hakları saklıdır

BioDiCon. 651-0217

diseases. For this aim, an infusion and decoction of the aboveground and underground parts of some *Cousinia* species are used for treatment of stomach and gastrointestinal ulcers and hypoxia in mountainous conditions and also to prevent tumor growth. Therefore, number of chemical studies on *Cousinia* genus were carried out (Plekhanova et al., 1983; Turdumambetov et al., 2007). In Pakistan, whole plant of *Cousinia stocksii* C. Winkl. is used for diuretic and antiseptic properties. The fresh juice of the plant is used for the dropsy, hematuria, vomiting and also used for chronic diarrhea, dysentery, asthma and liver complaints (Tareen et al., 2010).

Cousinia sivasica Hub.-Mor. is one of the endemic species in Flora of Turkey which belonging to sect. *Cousinia* and is spread only in a very few localities from Sivas and Kahramanmaraş provinces of Turkey. Ekim et al. (2000) reported that the threat category of *Cousinia sivasica* is “Vulnerable” (VU) at the basis of IUCN threat category (Anonymous, 1994). The aim of this study is to reveal the essential oil characteristics of *Cousinia sivasica*.

2. Materials and methods

Plant materials: As a plant material, flowering aerial and underground parts of *C. sivasica* were collected in 2012-2015 years from the following localities. **Locality 1. B6** Sivas: Gürün to Darende, 2. km roadside, 1302 m, 38° 43' 07,2" N, 37° 18' 38,5" E, M. Tekin 1262, 21 June 2012 ibid. Tekin 1556, 05 June 2014; **Locality 2. B6** Sivas: Crossroads of Sivas-Kangal-Gürün, roadside, 1520 m, 39° 07' 52,4" N, 37° 14' 33,3" E, M. Tekin 1488, 19 July 2015 (Figure 1).



Figure 1. A. General view of *Cousinia sivasica* in natural habitat; B. Capitula and flowers of *Cousinia sivasica*

Essential oil characterization methods:

Hydrodistillation:

Hydrodistillation was performed according to the method described in the European Pharmacopoeia (Eu.Ph.). Air-dried aerial parts of *C. sivasica* (50.0 g) were ground and then hydrodistilled for 3 h using a Clevenger-type apparatus. The oil yield was calculated on a dry weight basis. The essential oil was dried over anhydrous sodium sulfate and stored in sealed vials in the dark, at 4°C. The oil dissolved in *n*-hexane (10%, v/v) before the chromatographic determination of its composition was subsequently subjected to GC/FID and GC/MS analyses.

Gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS):

The gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS) analysis of the oil was carried out with an Agilent 5975 GC/MSD system as reported previously (Abbas et al., 2015; Özek et al., 2010). An Innowax FSC column (60 m × 0.25 mm, 0.25 μm film thickness) was used with Helium as the carrier gas (0.9 mL/min). GC oven temperature was kept at 60°C for 10 min, increased to 220°C at a rate of 4°C/min, kept constant at 220°C for 10 min, and then increased to 240°C at a rate of 1°C/min. The split ratio was adjusted to 40:1, and the injector temperature was at 250°C. MS were taken at 70 eV. Mass range was from *m/z* 35 to 450.

Gas chromatography (GC):

The volatiles were analyzed by capillary GC using an Agilent 6890N GC system (SEM A.Ş., Istanbul, Turkey). Flame ionization detector (FID) temperature was set at 300°C. In order to obtain the same elution order with GC/MS, simultaneous injection was performed using the same column and appropriate operational conditions.

Identification and quantification of compounds:

The components of the essential oil were identified by coinjection with standards (wherever possible) which were purchased from commercial sources and/or isolated from natural sources. Confirmation was also achieved using

our *in-house* “Başer Library of Essential Oil Constituents” database, which was obtained from chromatographic runs of pure compounds performed with the same equipment and conditions together with comparison of their retention indices. Also, compounds were confirmed by comparison of their mass spectra with those in Wiley GC/MS Library (Wiley, New York, NY, USA), MassFinder software 4.0 (Dr. Hochmuth Scientific Consulting, Hamburg, Germany), Adams Library, and NIST Library. A C₈–C₄₀ *n*-alkane standard solution (Fluka, Buchs, Switzerland) was used to spike the samples for the determination of relative retention indices (RRI). Relative percentage amounts of the separated compounds were calculated from FID chromatograms.

3. Results

Hydrodistillation of the aerial parts of *C. sivasica* gave yellowish oil with a specific odor in 0.012% yield (moisture free basis). The list of detected compounds with their relative percentages, relative retention indices (RRI), and percentages of compound classes is given in Table 1 in the order of their elution on the HP-Innowax FSC column. A total of 44 volatile compounds accounting 98.3% of the oil were identified and quantified. Among the detected volatile constituents aldehydes (11 compound), fatty acids, fatty acid esters (3 compound), esters (5 compound), sesquiterpenes (5 compound), phenylpropanoids (2 compound), nor-isoprenoids (5 compound), alkanes (4 compound) were found. Percentage distribution of the main compound classes in the essential oil and chromatographic profile of *C. sivasica* volatiles are presented in Figure 2 and Figure 3.

Mostly the oil of *C. sivasica* consisted of fatty acids and their esters (46.1%), among which were hexadecanoic, pentadecanoic and tetradecanoic acids, methyl and ethyl esters. In addition, methyl-branched carboxylic acid and aromatic acid esters were detected. Nonacosane (7.0%) and heptacosane (4.5%) were the major alkane type compounds detected in the oil of *C. sivasica*.

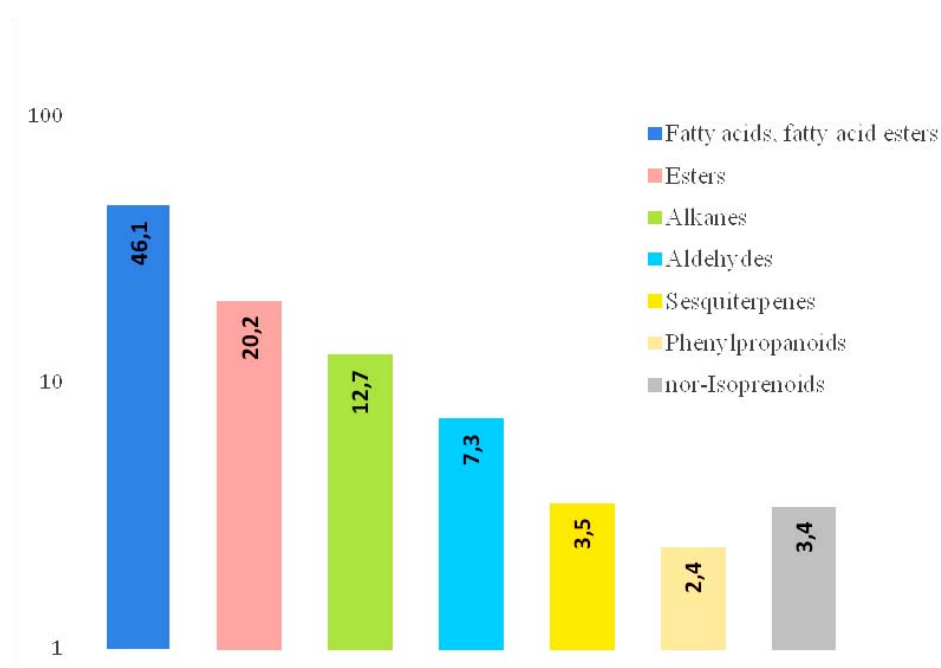


Figure 2. Percentage distribution of main compound classes in the essential oil of *C. sivasica*

Table 1. Chemical composition of volatile compounds of *C. sivasica*

No	RRI ^a	Compound class	Compound	% ^b	ID method
1	1496	alcohol	2-Ethyl hexanol	0.2	c, d
2	1506	aldehyde	Decanal	t	c, d
3	1533	nor-isoprenoid	Theaspirane A	0.8	c, d
4	1560	nor-isoprenoid	Theaspirane B	0.5	c, d
5	1599	aldehyde	(<i>E,Z</i>)-2,6-Nonadienal	t	c, d
6	1600	alkane	Hexadecane	t	c, d
7	1611	monoterpene	Terpinen-4-ol	0.1	c, d
8	1618	aldehyde	Undecanal	0.5	c, d
9	1638	monoterpene	□-Cyclocitral	t	c, d
10	1655	aldehyde	(<i>E</i>)-2-Decenal	0.4	c, d
11	1715	aldehyde	(<i>E,E</i>)-2,4-Nonadienal	0.3	c, d
12	1722	aldehyde	Dodecanal	0.5	c, d
13	1764	aldehyde	(<i>E</i>)-2-undecenal	0.6	c, d
14	1779	aldehyde	(<i>E,Z</i>)-2,4-Decadienal	0.3	c, d
15	1786	sesquiterpene	<i>ar</i> -Curcumene	t	c, d
16	1798	aromatic acid ester	Methyl salicylate	7.1	c, d
17	1822	ester	Ethyl salicylate	0.6	c, d
18	1827	aldehyde	(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	2.2	c, d
19	1845	phenylpropanoid	(<i>E</i>)-Anethole	1.0	c, d
20	1868	sesquiterpene	(<i>E</i>)-Geranyl acetone	1.0	c, d
21	1880	ester	1-Isobutyl 4-isopropyl 3-isopropyl-2,2-dimethyl succinate (= 2,2,4-trimethyl-3-carboxy isopropyl-isobutyl pentanoate)	12.2	e
22	1882	fatty acid ester	1-Methylethyl dodecanoate (= <i>Isopropyl laurate</i>)	t	c, d
23	1940	nor-isoprenoid	(<i>E</i>)-□□-Ionone	1.3	c, d
24	1973	alcohol	Dodecanol	t	c, d
25	2008	sesquiterpene	Caryophyllene oxide	0.5	c, d
26	2009	nor-isoprenoid	<i>trans</i> -□-Ionone-5,6-epoxide	0.5	c, d
27	2041	aldehyde	Pentadecanal	1.1	c, d
28	2131	sesquiterpene	Hexahydrofarnesyl acetone	1.8	c, d
29	2179	furanone	3,4-Dimethyl-5-pentylidene-2(5H)-furanone (= <i>Bovolide</i>)	0.8	c, d
30	2186	Phenylpropanoid	Eugenol	1.4	c, d
31	2228	furanone	3,4-Dimethyl-5-pentyl-5H-furan-2-one	0.6	c, d
32	2232	sesquiterpene	□-Bisabolol	0.2	c, d
33	2242	aldehyde	Heptadecanal	1.1	c, d
34	2237	nor-isoprenoid	2,6-Diisopropyl naphthalene	0.3	f
35	2262	fatty acid ester	Ethyl hexadecanoate (= <i>Ethyl palmitate</i>)	0.3	c, d
36	2300	alkane	Tricosane	0.3	c, d
37	2480	aromatic ketone	Benzophenone	0.6	c, d
38	2500	alkane	Pentacosane	0.9	c, d
39	2670	Fatty acid	Tetradecanoic acid (= <i>Myristic acid</i>)	2.3	c, d
40	2700	alkane	Heptacosane	4.5	c, d
41	2822	Fatty acid	Pentadecanoic acid	1.0	c, d
42	2874	furanone	□-Palmitolactone (= <i>4-Hexadecanolide</i>)	0.7	c, d
43	2900	alkane	Nonacosane	7.0	c, d
44	2931	Fatty acid	Hexadecanoic acid	42.8	c, d
				Total	98.3
				Aldehydes (11 compound)	7.3
				Fatty acids, fatty acid esters (3 compound)	46.1
				Esters (5 compound)	20.2
				Sesquiterpenes (5 compound)	3.5
				Phenylpropanoid (2 compound)	2.4
				nor-Isoprenoids (5 compound)	3.4
				Alkanes (4 compound)	12.7
				Others	2.7

^a Relative retention indices calculated against n-alkanes (C₈-C₄₀) on HP-Innowax column; ^b Percentage calculated from FID data; ^c Identification based on co-injection and retention index of genuine compounds on the HP-Innowax column; ^d Identification on the basis of computer matching of the mass spectra from Başer, Adams, Mass Finder, Wiley, and NIST libraries; ^e Identification based on comparison of RRI and spectrum of compound isolated from other natural sources; ^f tentatively identified using Wiley mass spectra library. t, trace (<0.1%).

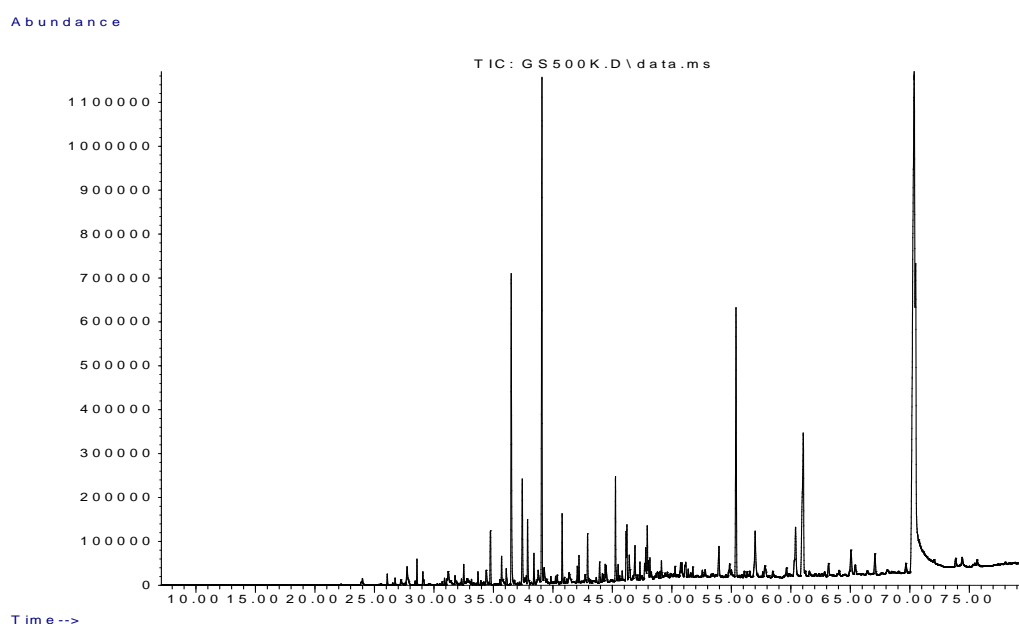


Figure 3. Chromatographic profile of *C. sivasica* volatiles

4. Conclusions and discussion

The present work is the first report on the composition of volatiles of endemic *C. sivasica*. The volatile compounds were isolated by hydrodistillation and investigated by GC-FID and GC/MS techniques on a polar column. Fatty acids, their esters and methyl-branched carboxylic acids (66.3%) predominated in the oil with hexadecanoic acid (42.8%), 1-isobutyl 4-isopropyl 3-isopropyl-2,2-dimethyl succinate (12.2%), methyl salicylate (7.1%) as main constituents. Hexadecanoic acid is known to be as common constituent in the oils of a number of Asteraceae plants: *Helichrysum* spp. (Öztürk et al., 2014), *Centaurea* spp. (Senatore et al., 2005), *Tripleurospermum callosum* (Boiss. & Heldr) E. Hossain (Yaşar et al., 2005).

1-Isobutyl 4-isopropyl 3-isopropyl-2,2-dimethyl succinate (or 2,2,4-trimethyl-3-carboxyisopropyl-isobutyl pentanoate) has earlier been detected in many natural sources like fungus *Polyporus sulphureus* (Bull.) Fr. (Wu et al., 2005), *Allomyrina dichotoma* larvae (Youn et al., 2012), cabbage and lettuce (Barry-Ryan et al., 2009). It was interesting to find aromatic acid ester, methyl salicylate (7.1%) in the oil of *C. sivasica*. Methyl salicylate is known to be the main constituent of wintergreen oil (*Gaultheria procumbens*). Also it was found in several Asteraceae plants, *Tanacetum* spp., *Centaurea* (Christensen et al., 1999; Formisano et al., 2008). This constituent was reported as an important allelopathic agent (De Feo et al., 2002) and repellent (Hardie et al., 1994).

Methyl salicylate has also an acaricidal activity on *Varroa jacobsoni* (Lindberg et al., 2000). It should be noted that spiro-ethers theaspirane A and B were detected in the oil of *C. sivasica*. Previously these rare nor-isoprenoids were found in several representatives of Asteraceae family, *Helichrysum* spp. (Öztürk et al., 2014), *Telekia speciosa* (Schreb.) Baumg. (Radulovic et al. 2010), *Centaurea luschaniana* Heimerl (Köse et al., 2008). In addition, other 13-carbon constituents like (*E*)- α -ionone and *trans*- β -ionone-5,6-epoxide were detected in the oil of *C. sivasica* (Table 1, Figure 2). The essential oil of *C. sivasica* has unique composition due to containing rare constituents like theaspiranes, aromatic acid esters and methyl-branched carboxylic acids.

References

- Abbas, A., Tabanca, N., Özek, G., Özek, T., Aytaç, Z., Bernier, U.R., Agramonte, N.M., Başer, K.H.C., Khan, I.A. (2015). Essential oils of *Echinophora lamondiana* (Apiaceae: Umbelliferae): A Relationship between chemical profile and biting deterrence and larvicidal activity against mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 52(1), 93-100.
- Anonymous. (1994). Species Survival Commission IUCN Red List Categories, Gland, Switzerland.
- Attar, F., Djavadi, S.B. (2010). A taxonomic revision of *Cousinia* sect. *Cynaroides* (Asteraceae, Cardueae) in the flora of Iran. *The Iranian Journal of Botany*, 16(1), 130-184.

- Attar, F., Maroofi, H. (2010). *Cousinia* (sect. *Albidae*) *iranshahriana* (Asteraceae, Cardueae), a new endemic species from Kurdistan province, Iran. The Iranian Journal of Botany, 16(2), 197-199.
- Barry-Ryan, C., Devereux, M., Lonchamp, J. (2009). Identification of volatile quality markers of ready-to-use lettuce and cabbage. Food Research International, 42, 1077-1086.
- Christensen, L.P., Jakobsen, H.B., Paulsen, E., Hodal, L., Andersen, K.E. (1999). Airborne *Compositae dermatitis*: monoterpenes and no parthenolide are released from flowering *Tanacetum parthenium* (feverfew) plants. Archives of Dermatological Research, 291(7-8), 425-431.
- Doğan, B., Duran, A., Martin, E., Hakkı, E.E. (2009). Chromosome numbers of species of the genus *Jurinea* Cass. (Asteraceae) in Turkey. Caryologia, 62, 16-23.
- De Feo, V., De Simone, F., Senatore, F. (2002). Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. Phytochemistry, 61(5), 573-578.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytac, Z., Adıgüzel, N. (2000). Red Data Book of Turkish Plants. Turkish Association for the Conservation of Nature, Ankara.
- Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Çelik, S., Bruno, M., Rosselli, S. (2008). Volatile constituents of aerial parts of three endemic *Centaurea* species from Turkey: *Centaurea amanicola* Hub.-Mor., *Centaurea consanguinea* DC. and *Centaurea ptosimopappa* Hayek and their antibacterial activities. Natural Product Research, 22(10), 833-839.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M.T. (eds.). (2012). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul.
- Hardie, J., Isaacs, R., Pickett, J.A., Wadhams, L.J., Woodcock, C.M. (1994). Methyl salicylate and (-)-(1R, 5S)-myrtenal are plant-derived repellents for black bean aphid, *Aphis fabae* Scop. (Homoptera: Aphididae). Journal of Chemical Ecology, 20(11), 2847-2855.
- İlçim, A., Özçelik, H., Çenet, M. (2013). A new natural hybrid of *Cousinia* Cass. (Asteraceae) from Türkiye. Biological Diversity and Conservation 6(1): 71-75.
- Köse, Y.B., Demirci, B., Başer K.H.C., Yücel E. (2008). Composition of the essential oil of three endemic *Centaurea* species from Turkey. Journal of Essential Oil Research, 20(4), 335-338.
- Lindberg, C.M., Melathopoulos, A.P., Winston, M.L. (2000). Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite. Journal of Economic Entomology, 93(2), 189-198.
- Özek, G., Demirci, F., Özek, T., Tabanca, N., Wedge, D.E., Khan, S.I., Başer, K.H.C., Duran A., Hamzaoglu E. (2010). Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatiles obtained by four different techniques from *Salvia rosifolia* Sm., and evaluation for biological activity. Journal of Chromatography, 1217, 741-748.
- Öztürk, B., Özek, G., Özek, T., Başer, K.H.C. (2014). Chemical diversity in volatiles of *Helichrysum plicatum* DC. subspecies in Turkey. Records of Natural Products, 8(4), 373-384.
- Plekhanova, N.V., Turdumambetov, K., Sudnitsyna, I.G. (1983). Carbohydrates of *Cousinia*. Chemistry of Natural Compounds, 19(5), 603-604.
- Radulovic, N., Blagojevic, P., Palic, R., Zlatkovic, B. (2010). Volatiles of *Telekia speciosa* (Schreb.) Baumg. (Asteraceae) from Serbia. Journal of Essential Oil Research, 22(3), 250-254.
- Senatore, F., Arnold-Apostolides, N., Bruno, M. (2005). Volatile components of *Centaurea eryngioides* Lam. and *Centaurea iberica* Trev. var. *hermonis* Boiss. Lam., two Asteraceae growing wild in Lebanon. Natural Product Research, 19(8), 749-754.
- Stevens, P.F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 8, June 2007 [and more or less continuously updated since]. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. (Accessed March 27, 2008).
- Tareen, R.B., Bibi, T., Khan, M.A., Ahmad, M., Zafar, M. (2010). Indigenous knowledge of folk medicine by the women of Kalat and Khuzdar regions of Balochistan, Pakistan. Pakistan Journal of Botany, 42(3), 1465-1485.
- Turdumambetov, K., Rakhimov, D.A., Malikova, M.K. (2007). Oligo- and Polysaccharides from *Cousinia umbrosa*. Chemistry of Natural Compounds, 43(3), 308-309.
- Wu, S., Zorn, H., Krings, U., Berger, R.G. (2005). Characteristic volatiles from young and aged fruiting bodies of wild *Polyporus sulfureus* (Bull.:Fr.) Fr. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 4524-4528.
- Yaşar, A., Üçüncü, O., Güleç, C., İnceer, H., Ayaz, S., Yaylı, N. (2005). GC-MS analysis of chloroform extracts in flowers, stems, and roots of *Tripleurospermum callosum*. Pharmaceutical Biology, 43(2), 108-112.
- Youn, K., Kim, J.Y., Yeo, H., Yun, E.Y., Hwang, J.S., Jun, M. (2012). Fatty acid and volatile oil compositions of *Allomyrina dichotoma* larvae. Preventive Nutrition and Food Science, 17, 310-314. .

(Received for publication 13 February 2017; The date of publication 15 August 2018)



Removal of a toxic basic dye-malachite green from aqueous solution by *Onopordum turcicum* Danin as natural biosorbent

Nuraniye ERUYGUR ^{*1}, Tulay OYMAK ²

¹Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Cumhuriyet University, 58140 Sivas, Tukey

²Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Cumhuriyet University, 58140 Sivas, Tukey

Abstract

Biosorption of malachite green (MG) was studied using natural origin adsorbent *Onopordum turcicum* Danin. Batch adsorption studies were carried out to evaluate the potentiality of *O. turcicum* for the removal of malachite green dye from wastewater, on different parameters such as pH, adsorbent dose, contact time and initial MG concentration. The effective pH was 8.0 for adsorption of MG by the biomass. The equilibrium isotherm was analyzed with the Langmuir and Freundlich models of adsorption. The biosorption data of MG on *Onopordum turcicum* Danin was fitted with Langmuir model with a maximum adsorption capacity was 1110.1 mg/g. The acquired results show that *O. turcicum* was effective in removal of MG dye from aqueous solution.

Key words: *Onopordum turcicum*, dye removal, biosorption

----- * -----

Doğal biyosorbent olarak *Onopordum turcicum* Danin tarafından sulu çözeltilerden toksik bir bazik boya-malakit yeşili uzaklaştırılması

Özet

Bu çalışmada doğal kaynaklı olan *Onopordum turcicum* Danin bitkisi adsorban olarak kullanılarak, Malakit yeşil (MG) boyasının sulu ortamdan uzaklaştırılması çalışılmıştır. Bitkinin potansiyel MG boya uzaklaştırma özelliklerini araştırmak amacıyla, pH, adsorban miktarı, temas süresi ve başlangıç MG konsantrasyonu gibi değişik parametrelere göre değerlendirilmiştir. MG boyasının *O. turcicum* biyokütle tarafından adsorlanan en etkin pH'sı 8.0 olarak tespit edildi. Adsorpsiyon izotermini ise Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modeli kullanılarak analiz edildi. Langmuir izotermine göre adsorpsiyon kapasitesi 1110.1 mg/g olarak bulundu. Elde edilen sonuçlara göre, *O. turcicum* bitkisinin MG boyasının sulu çözeltilerden uzaklaştırabilme özelliğine sahip olduğu görülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Onopordum turcicum*, boya uzaklaştırma, biyosorpsiyon

1. Introduction

The use of synthetic dyes in textile industry is increasing rapidly, and as a result, the release of dye contained wastewaters in the environment does not only contaminate the ecological environment but also puts the lives of all the aquatic living creatures in danger.

Malachite green (MG) is a cationic water soluble dye, often used in textile, ceramic, paper, leather, and paint industry. It also used for insecticide and preservative of aquatic products (Raval et al., 2016). But the dye is dangerous even toxic to aquatic life when it discharged to water without any treatment. In previous reports indicated that the MG dye reduced to leuco-MG in animal tissue which is acting as tumor promotor (Mittal 2006). Therefore, it is vital important to remove these dye molecules from water environment before their disposal (Iqbal and Ashiq, 2007).

A variety of methods have been developed over the years for the removal of textile dyes in waste water, among which there are aerobic and anaerobic microbial degradation, coagulation, chemical oxidation, membrane separation,

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: + 903462191010; Fax.: + 903462191110; E-mail: : neruygur@cumhuriyet.edu.tr

filtration and reverse osmosis (Kumar, 2007; Doğan et al., 2009). However, all of the methods were not successful on removal of dyes from wastewater because of the reasons such as high cost, complexity of implementation and incompleteness. Therefore, it is important to find out more effective, easily available and costless biosorbents (Guari et al., 2015; Rahmat and Ali, 2016). In this context, our research mainly focused on evaluating the adsorption capacity of *O. turcicum*, its possible use on removal of malachite green dye from wastewater, to find out more affordable and environmental-friendly bio- adsorption.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and Instrumentation

All the chemicals used in this study are analytical grade. MG was obtained from Riedel-de Haen. Multi rotator, Biosan R 24 was employed for the effective mixing of sorbent and solution. MG stock solution was prepared by dissolving the appropriate amount in extra pure water. Then the working solution of MG was prepared by diluting stock solution to the desired concentrations and measured at 615 nm by UV-1600 spectrophotometer (Shimadzu, Japan). The pH measurement of solutions was carried out using the pH meter (Metler, USA). All solutions were prepared in ultra-pure water. pH of solutions was adjusted by Britton Robinson Buffer (boric, acetic and phosphoric acid, each of 0.04 M) and base (0.2 M of NaOH) solutions.

2.2. Plant materials and preparation of adsorbent

The plant material used in this study was collected from Sivas city in Turkey. Then the leaves were dried in shade for two weeks and the spines on the edges of the leaves were cut off. Before use, the leaves were crushed into coarse powder and sieved through 40- 60 mesh size sieve. The sieved particles were waited in the deionized water for about 12h, washed several times with deionized water and ethanol then dried at 50°C in an oven



Figure 1. A: General view of *O. turcicum* in natural habitat; B: Leaves of *O. turcicum*

2.3. Biosorption studies

Equilibrium experiments were performed by contacting 100 mg of *O. turcicum* dried leaves with 50mL of 50 mg/L MG solution at pH 8. A mixture of bioadsorbent and MG solution in conical flasks were shaken in a multi rotator (Biosan R 24) with a constant speed of 100 rpm. After reaching equilibrium (20 min), the absorbance of MG in supernatant was measurement by UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu Brand UV-1600) at a maximum absorbance wavenumber 615 nm after a proper dilution.

The calibration plot which is produced from standard MG serial solution was used to calculate the final concentration of MG dye. The percent removal of MG was calculated by using the following formula:

$$\text{removal \%} = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \times 100$$

Where, C_0 is the initial MG concentration in mg/mL, C_f is the equilibrium MG concentration in mg/ mL.

2.4. Bioadsorbent characterization

In order to characterization study on *O. turcicum* dried leaves of before and after adsorption of MG dye, scanning electron microscopy (SEM) studies were performed on a Tescan Mira 3XMU with an Oxford EDS analysis system. As can be seen from Figure 2, surface morphology of *O. turcicum* leaves had changed after biosorption of dyes.

The remarkable difference of SEM images of *O. turcicum* leaves before and after biosorption of dyes was the surface roughness. MG dyes are adsorbed on porous of *O. turcicum* leaves and among layers.

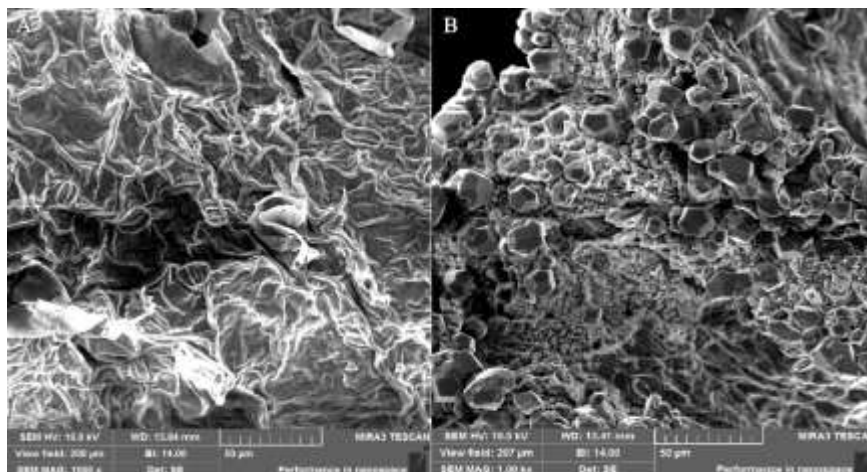


Figure 2. SEM images of *E. O. turcicum* leaves a: before biosorption, B: after biosorption of MG

Point of Zero charge (pH_{pzc})

The surface charge on *O. turcicum* leaves was obtained by means of batch equilibrium procedure by measuring the point of zero charge as experimental results. In brief, 100 mg of biosorbent was introduced to 50 mL of solution with different pH (1-10, adjusted with 0.1 M HCl acid and 0.1 M NaOH). After shaking 24 hours, the final pH values were measured with pH meter. The ΔpH value was calculated from the difference between initial and final pH. A plot of ΔpH vs. pH was used for determination of point of zero charge. The value of pH correspondence to $\Delta pH = 0$ was taken as point of zero charge (Haddad et al. 2013) Point of zero charge was found as pH 5.0. At higher pH ranges ($pH > 5.0$) surface of *O. turcicum* leaves is negatively charged. Therefore, cationic species were more feasible to biosorption on to *O. turcicum* leaves at this range. Point of zero charge of *O. turcicum* leaves are given Figure 3.

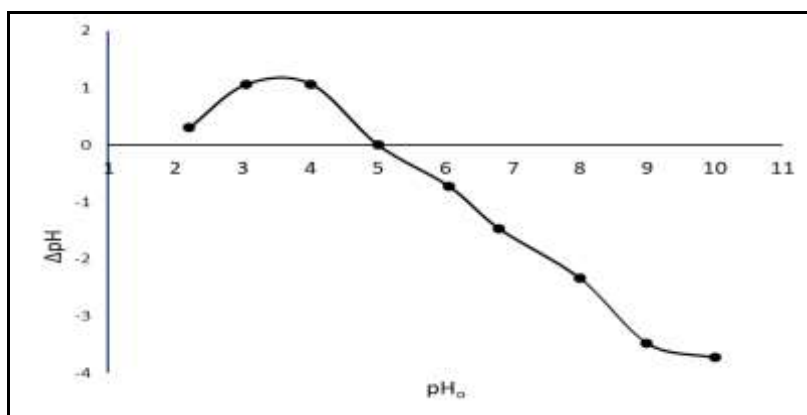


Figure 3. Point of zero charge of *O. turcicum* leaves

3. Results

3.1. Effect of pH on the dye adsorption

To examine an effect of pH on the dye adsorption, the pH values of the dye solution-biosorbent mixture were adjusted with addition of BR buffer. After equilibration reached to sufficient, the equilibrium pH values and dye concentrations were measured and the adsorbed amounts of dye by biosorbent were calculated. As can be seen from Fig. 4, the adsorption of Malachite Green increased with pH value after $pH = 7$, adsorption remained almost unchanged. The biosorbent had maximum dye adsorption ($\geq 95\%$) over the pH range of 7-10. The biosorption process could be explained by the electrostatic interactions between the negatively charged surface and the positively charged molecule (MG^+) in the medium because the MG uptake increased with increase in initial pH (Ayed et al. 2009; Tsai and Chen, 2010).

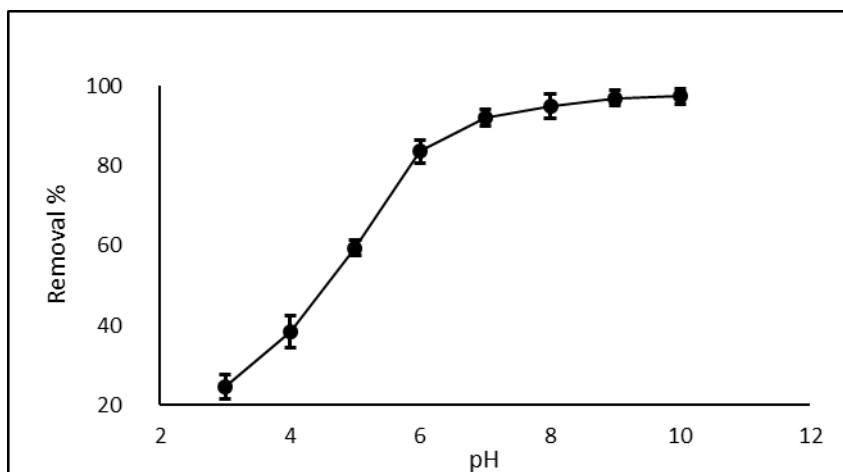


Figure 4. Effect of pH on the removal of MG dye solution

3.2. Effect of initial dye concentration

The influence of initial concentration of malachite green in the solutions on the rate of adsorption on *O. turcicum* dried leaves was studied. The experiment was performed at fixed adsorbent dose (0.1g/50 mL) in the test solution at different initial concentrations of malachite green (50, 100, 150, 200, 300, and 500 mg/L). Maximum dye removal ($\geq 95\%$) was achieved at 30 min. Figure 6A is shown the UV-VIS spectrum of 50 mg/L MG before and after biosorption in *O. turcicum* at 5, 10 and 15 min, respectively. Photographs of the same solutions are given in Figure 6B.

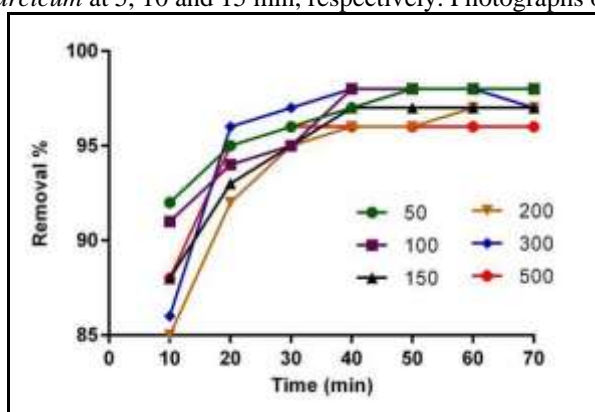


Figure 5. Effect of initial dyes concentration on the adsorption of malachite green on *O. turcicum* leaves (adsorbent dose=0.1g/50 mL, pH=8.0)

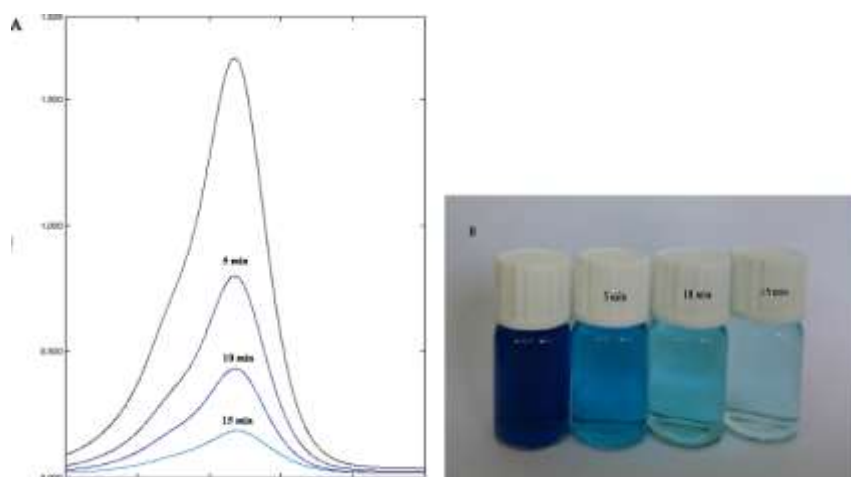


Figure 6. UV spectrum of 50 mg/L MG solution with time after absorption by *O. turcicum* leaves (A) and the image of the MG solution (B)

3.3. Effect of the biosorbent amount

The adsorption of malachite green on *O. turcicum* dried leaves was studied by altering the quantity of adsorbent (25, 50, 75 and 150 mg) in the test solution while keeping the other parameters such as dye concentration (50 mg/L), room temperature and pH=8.0 constant for 30 min. The adsorption was increased from 93% to 97% as the biosorbent dose was increased from 25 mg to 150 mg at equilibrium time.

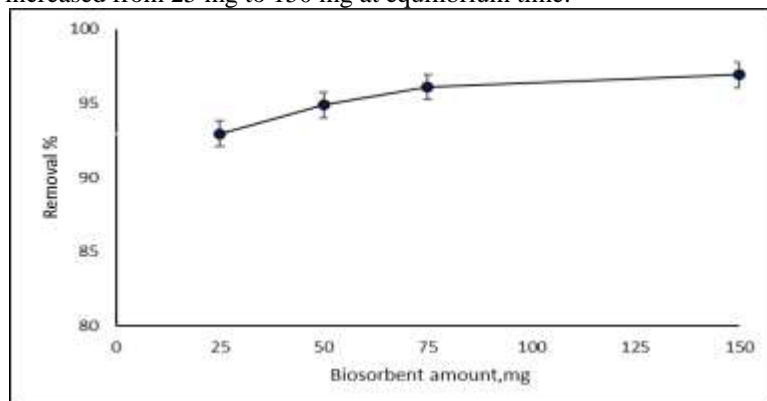


Figure 7. Effect of biosorbent amount on the removal of MG dye solution

3.4. Effects of possible coexisting metal ions

The removal % of MG was studied in the presence of various metal ions such as Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Ag^{+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} with final concentration of 50 mg/L of and Ca^{2+} , K^{+} , Mg^{2+} , Na^{+} with concentration of 250 mg/L. The ion solutions were added individually to 50 mL of dye solution which is containing 50 mg/L of MG and 100 mg of biosorbent. As can be seen from the Table 1. No significant removal differences were found in the presence of metal ions in textile wastewater.

Table 1. Tolerance limits for interference ions on the determination of U(VI)

Ions	Recovery % ,U(VI)
Zn^{2+}	96.4 ± 0.3
Cd^{2+}	96.5 ± 0.6
Pb^{2+}	96.0 ± 0.8
Fe^{3+}	93.4 ± 0.3
Cr^{3+}	93.4 ± 0.2
Ag^{+}	95.2 ± 0.6
Ni^{2+}	96.1 ± 0.2
Cu^{2+}	95.2 ± 0.8
Ca^{2+}	98.1 ± 1.0
K^{+}	97.1 ± 0.1
Mg^{2+}	97.2 ± 0.5
Na^{+}	96.5 ± 0.4
A*	95.8 ± 0.5

* Mixture of all the metal ions, (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Ag^{+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} , Mg^{2+} , Na^{+}).

3.5. Adsorption isotherms

The adsorption isotherms widely used for understanding the situation of the adsorption and its mechanisms. There are currently most used two classical models namely Langmuir and Freundlich equation, are used for explaining these isotherms. The Langmuir sorption isotherm is used for sorption of a pollutant from a liquid medium, while the Freundlich isotherms applies to adsorption on heterogeneous surfaces with interaction between adsorbed molecules (Crini et al., 2007)

The Langmuir equation is given as follows:

$$Q_e = \frac{Q_{max}KC_e}{1 + KC_e}$$

Where Q_e is the amount of MG dye per mass of adsorbent (mg/g); Q_{max} is the maximum adsorption capacity (mg/g); C_e is the equilibrium MG liquid phase concentration (mg/L) and K is a Langmuir isotherm constant that is related with adsorption rate (Wawrzekiewicz and Hubicki, 2010).

Langmuir equation can be presented in as follows:

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_{max}}C_e + \frac{1}{KQ_m}$$

The Freundlich isotherm is used for describing heterogeneous systems and the equation of Freundlich is expressed as follows (Zhou et al., 2016) (Robinson et al., 2002):

$$Q_e = K_f C_e^{1/n}$$

where Q_e is the equilibrium MG dye concentration on adsorbent (mg/g), C_e the equilibrium dye concentration in solution (mg/l), K_f is the Freundlich constant (l/g), $1/n$ is a constant related with adsorption intensity (Kannan et al., 2013).

Freundlich isotherm can be expressed in the linear form as follows by taking logarithms of the former equation:

$$\ln Q_e = \ln K_f + \frac{1}{n} \ln C_e$$

the plot of $\ln Q_e$ versus $\ln C_e$ was employed to make the intercept equal to $\ln K_f$ and the slope of $1/n$.

The experimental data demonstrated that, the biosorption mechanism for MG were suited with Langmuir model with a correlation constant of > 0.9998 . The Q_{max} value was found as 1110.1mg/g for MG as given in Fig 8. The n value calculated from Freundlich isotherm is 2.9 and this indicated the favorable biosorption of MG on *O. turcicum*. The calculated isotherm parameters for both Langmuir and Freundlich model are summarized Table 2.

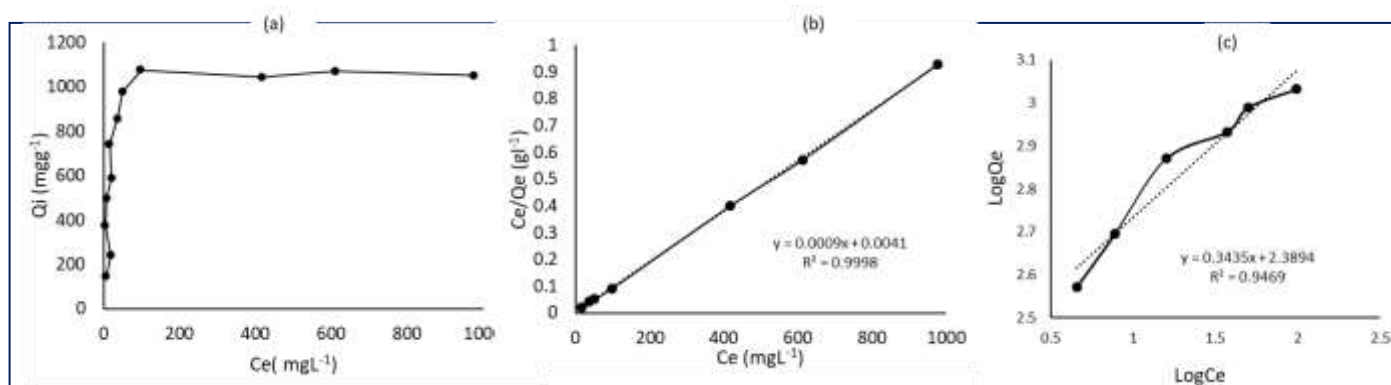


Figure 8. Isotherms of adsorption of MG dye on adsorbent at room temperature (a); Langmuir isotherm linear plots (b); Freundlich Isotherm (c);

Table 2. Langmuir and Freundlich isotherm Parameters

Dye	Langmuir Parameters			Freundlich Parameters		
	Q_{max} (mg/g)	K (L/mg)	R^2	K_f (L/mg)	n	R^2
MG	1110.1	0.219	0.9998	245.13	2.9	0.9469

4. Conclusions and discussion

It was found that the dried leaves of *O. turcicum* can be used for adsorption of malachite green dyes from aqueous medium. The adsorption was highly dependent on pH, initial dye concentration and adsorbent mass. *O. turcicum* is a commonly grown plant in Anatolia of Turkey, so it is easily available in the countryside. Therefore, the use of these costless materials by dyeing unit is recommended for removal of dye in wastewater. The maximum sorption capacity was 1110.1 mg/g, which has a considerable rapid and high removal capacity than the other biosorbents suggested for the removal of MG dye from wastewater (Table 2). The adsorption of MG dye increased with increasing pH. In separate experiment, the reusability of adsorbed *O. turcicum* leaves with MG dye, also can be used one more times because its adsorption capacity almost unchanged after first adsorption of the dye. *O. turcicum* is recommended for the treatment of basic wastewater because of its higher removal capacity in alkaline aqueous solutions.

Table 3. Comparison on removal capacity of bioadsorbents on MG dye with literature

Adsorbent	q _{max} (mg/g)	Reference
<i>Hydrilla verticillata</i>	91.97	(Rajeshkannan et al. 2010)
Neem sawdust	4.354	(Khattari, 2009)
<i>Polygonum orientale</i> Linn	556.00	(Wang et al. 2010)
Coco peat	276.80	(Vijayaraghavan et al. 2016)
Groundnut shell	222.22	(Malik et al. 2007)
Lemon peel(Type2)	51.418	(Kumar, 2007)
Coffee bean	55.3	(Baek et al. 2010)
Chlorella-based biomass	9.775	(Tsai and Chen, 2010)
<i>O. turcicum</i>	1110.1	This study

References

- Ayed, L., Chaieb, K., Cheref, A., Bakhrouf, A. (2009). Biodegradation of triphenylmethane dye Malachite Green by *Sphingomonas paucimobilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 705–711.
- Baek, M.H., Ijagbemi, C.O., O, S.J., Kim, D.S. (2010). Removal of Malachite Green from aqueous solution using degreased coffee bean. *Journal of Hazardous Materials*. 176, 820–828.
- Crini, G., Peindy, H.N., Gimbert, F., Robert, C. (2007). Removal of C.I. Basic Green 4 (Malachite Green) from aqueous solutions by adsorption using cyclodextrin-based adsorbent: Kinetic and equilibrium studies. *Separation and Purification Technology*. 53, 97–110.
- Doğan, M., Abak, H., M.A. (2009). Adsorption of methylene blue onto hazelnut shell: kinetics, mechanism and activation parameters. *Journal of Hazardous Materials*. 164, 172–181.
- Guari, E.B., Janaina, É., Almeida, R. De, Jesus, M. De, Martiarena, S., Yamagami, N.S., Corso, C.R. (2015). Azo Dye Acid Blue 29: Biosorption and Phytotoxicity Test. doi: 10.1007/s11270-015-2611-3
- Haddad, M. E., Slimani, R., Mamouni, R., ElAntri, S., Lazar, S. (2013). Removal of two textile dyes from aqueous solutions onto calcined bones. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*. 14, 51–59.
- Kannan, C., Muthuraja, K., Devi, M.R. (2013). Hazardous dyes removal from aqueous solution over mesoporous aluminophosphate with textural porosity by adsorption. *Journal of Hazardous Materials* 244–245, 10–20.
- Kumar, K.V. (2007). Optimum sorption isotherm by linear and non-linear methods for malachite green onto lemon peel. 74, 595–597.
- Malik, R., Ramteke, D.S., Wate, S.R. (2007). Adsorption of malachite green on groundnut shell waste based powdered activated carbon. *Waste Management*. 27, 1129–1138.
- Mittal, A., (2006). Adsorption kinetics of removal of a toxic dye, Malachite Green, from wastewater by using hen feathers. *Journal of Hazardous Materials*. 133, 196–202.
- Muhammed J.Iqbal, M.N.A. (2007). Adsorption of dyes from aqueous solutions on activated charcoal. *Journal of Hazardous Materials*. 139, 57–66.
- Rahmat, N.A., Ali, A.A. (2016). Removal of Remazol Brilliant Blue R from Aqueous Solution by Adsorption Using Pineapple Leaf Powder and Lime Peel Powder. doi:10.1007/s11270-016-2807-1
- Rajeshkannan, R., Rajasimman, M., Rajamohan, N. (2010). Removal of Malachite Green from Aqueous Solution using *Hydrilla verticillata* - Optimization, Equilibrium and Kinetic Studies 222–229.
- Raval, N.P., Shah, P.U., Shah, N.K. (2016). Malachite green “a cationic dye” and its removal from aqueous solution by adsorption. *Applied Water Science*. doi:10.1007/s13201-016-0512-2
- Robinson, T., Chandran, B., Nigam, P. (2002). Removal of dyes from a synthetic textile dye effluent by biosorption on apple pomace and wheat straw. *Water Research*. 36, 2824–2830.
- S.D.Khattari, M.K.S. (2009). Removal of malachite green from dye wastewater using neem sawdust by adsorption. *Journal of Hazardous Materials*. 167, 1089–1094.
- Tsai, W.T., Chen, H.R. (2010). Removal of malachite green from aqueous solution using low-cost chlorella-based biomass. *Journal of Hazardous Materials*. 175, 844–849.
- Vijayaraghavan, K., Premkumar, Y., Jegan, J. (2016). Malachite green and crystal violet biosorption onto coco-peat: characterization and removal studies. *Desalination and Water Treatment*. 57, 6423–6431.
- Wang, L., Zhang, J., Zhao, R., Li, C., Li, Y., Zhang, C. (2010). Adsorption of basic dyes on activated carbon prepared from *Polygonum orientale* Linn: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Desalination*. 254, 68–74
- Wawrzekiewicz, M., Hubicki, Z. (2010). Weak Base Anion Exchanger Amberlite FPA51 as Effective Adsorbent for Acid Blue 74 Removal from Aqueous Medium – Kinetic and Equilibrium Studies. *Separation Science and Technology*. 45, 1076–1083.
- Zhou, Q., Chen, F., Wu, W., Bu, R., Li, W., Yang, F. (2016). Reactive orange 5 removal from aqueous solution using hydroxyl ammonium ionic liquids/layered double hydroxides intercalation composites. *Chemical Engineering Journal*. 285, 198–206.

(Received for publication 26 August 2017; The date of publication 15 April 2018)



Anatomical and micromorphological investigations on some *Centaurea* (Asteraceae, Cardueae) taxa from NE Anatolia

Melahat OZCAN *¹

¹ Department of Forest Engineering, Faculty of Forestry, Artvin Coruh University, 08000 Artvin, Turkey

Abstract

This study evaluates the phylogenetic relationships of some *Centaurea* s.l. taxa native to Northeast Anatolia, Turkey. Stem, leaf and cypsela anatomical structures and cypsela micromorphologies were characterized and compared in detail by using variance analysis and cluster analysis (UPGMA). Macro and micromorphological characteristics of cypsela were investigated using a stereomicroscope and scanning electron microscope. Significant differences were observed in stem features, leaf midrib and lamina thickness, number of stomata, and epidermal cell wall patterns in the abaxial and adaxial surfaces among the taxa. Cypsela shapes were determined as ovoid or widely oblong. Cypselas can be distinguished into four types of surface ornamentations. The structure of the pericarp was described, as well as the testa, and the distribution of the sclerenchymatic zone of the ribs and secretory ducts (resin) in the mesocarp were evaluated.

Key words: anatomy, *Centaurea*, cypsela, micromorphology, SEM

----- * -----

Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi'ndeki bazı *Centaurea* (Asteraceae, Cardueae) taksonları üzerinde anatomik ve mikromorfolojik araştırmalar

Özet

Bu çalışma Kuzeydoğu Anadolu, Türkiye için doğal olan bazı *Centaurea* taksonlarının akrabalık ilişkilerini ele almaktadır. Gövde, yaprak ve sipsela anatomik yapıları ve mikromorfolojik özellikleri belirtilmekte ve varyas ile kümeleme analizi (UPGMA) uygulayarak detaylı olarak karşılaştırılmaktadır. Sipsela makro ve mikromorfolojik özellikleri stereomikroskop ve taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelendi. Taksonlar arasında gövde özellikleri, yaprak orta damar ve lamina kalınlığı, stoma sayısı ve üst ile alt epidermis yüzey şekillerinde önemli farklılıklar gözlemlendi. Sipselalar şekillerine göre ovoid ve genişçe oblong olarak tanımlandı. Yüzey süslemelerine göre dört tip ayırt edildi. Testa yapısı ile perikarp yapısı tanımlandı ve damarlardaki sklerenkimatik kısımların ve mezokarpta salgı kanallarının dağılımı değerlendirildi.

Anahtar kelimeler: Anatomi, *Centaurea*, sipsela, mikromorfoloji, SEM

1. Introduction

Centaurea L. consists of approximately 600 species in the Mediterranean area and Southwest Asia (Wagenitz and Hellwig, 1996; Brummitt, 2004). In recent studies, combining morphological with molecular investigation, this genus has been divided into four genera; *Centaurea* L., *Rhaponiticoides* Vaill., *Psephellus* Cass. and *Cyanus* Mill. (Wagenitz and Hellwig, 2000; Greuter, 2003a; 2003b). Susanna and Garcia-Jacas (2007), however, does not accept *Cyanus* as a separated genus. *Centaurea* and *Cyanus* are represented by ca. 190 species in Turkey, and most of *Centaurea* taxa are endemics (Davis et al., 1988; Duran and Duman, 2002; Kaya et al., 2010).

Centaurea is one of the largest genera of the tribe *Cardueae* Cass. It has complex taxonomy characteristics. Through several studies were conducted on the genus (Romaschenko et al., 2004; Inceer et al., 2007; Kose and Yücel, 2007; Martin et al., 2009; Tekeli et al., 2010), some taxonomical problems are have not been resolved yet.

The stem, and particularly the leaves' anatomical characters provide important data for classification (Metcalf and Chalk, 1979; Stace, 1984; Inceer and Ozcan, 2011; Eminagaoglu and Ozcan, 2014; Ozcan et al., 2015). Several studies have been carried out on the anatomy of *Centaurea* taxa (Uysal et al., 2005; Celik et al., 2008; Aydin et al., 2013; Ozcan et al., 2014), and important features in their anatomies have been reported. Fruit and seed surface ornamentations are also a useful tool for taxonomic considerations in several families (Sheikh Akbari and Azizian, 2006; Kaya and Dirmenci, 2008; Pinar et al., 2009; Bayrakdar et al., 2010; Shabestari et al., 2013). Cypsela (as a name of fruit in Asteraceae) external morphology and anatomy have been widely used for the classification of species in the Compositae family (Lavialle, 1912; Zhu et al., 2006; Lo Presti et al., 2010), and the tribes *Cynareae* (Kadereit and Jeffrey, 2007) and *Cardueae* (Dittrich, 1985; Häffner, 2000; Zarembo and Boyko, 2008; Abid and Qaiser, 2009; Abid and Ali, 2010; Ozcan, 2017).

The objectives of the present study were (i) to give detailed descriptions of stem and leaf anatomical characteristics in selected taxa of the genus *Centaurea* s.l, (ii) to investigate cypsela morphology and anatomy by using light and stereomicroscopes, and (iii) to discuss the taxonomic value of these characters using statistical analyses. The paper presents the first detailed account of the stem, leaf and cypsela anatomy, and cypsela micromorphology of four *Centaurea* s.l. taxa growing in Turkey. This is the first comprehensive study with several aspects, and taxonomical evaluations and comparisons with the literatures have been also discussed.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

The plant samples (*Centaurea nigrifimbria*, one of them is indicated in here as *Cyanus nigrofimbrius*) examined were collected from natural populations. Taxonomical descriptions of the plants were made according to Wagenitz (1975) and Güner et al. (2012). Details of the voucher number are provided in Table 1. Voucher specimens were deposited in the Artvin Coruh University Herbarium (ARTH).

Table 1. Collection data of investigated taxa

Taxon	Locality	Voucher
<i>Centaurea aggregata</i> subsp. <i>albida</i> (K. Koch) Bornm.	Artvin, Salkımlı Village (Tolgum), eroded banks, 508 m, 18.viii. 2014	<i>M. Ozcan 699</i>
<i>C. macrocephala</i> Puschk. ex Willd.	Artvin, Ardanuç, Bilbilan high plateau, among grass, 1576 m, 30.vi. 2012	<i>M. Ozcan 546</i>
<i>C. salicifolia</i> M. Bieb. ex Willd.	Trabzon, Araklı Village, roadsides, 312 m, 17.viii.2013	<i>M. Ozcan 641</i>
<i>Cyanus nigrofimbrius</i> (K. Koch) Soják	Trabzon, Çaykara, near Soğanlı Mountain, 2236 m, 16.viii. 2014	<i>M. Ozcan 697</i>

2.2. Anatomical preparation

Anatomical observations were performed in the stem, leaf and cypsela of the taxa. Fresh cauline leaves and parts of the stems or removed parts from herbarium materials were used for preparations. Handmade cross-sections were prepared from the median part of the stem and leaf lamina using commercial razor blades. Peripheral sections of leaves were obtained by hand. Mature cypselas of at least three individual plants for each taxon were collected from the capitula, softened by boiling in water for 3-4 days and stored in glycerin. A cryostat was used for cross-sections of cypselas. Sections were cut to a thickness of 15- 20 µm. All sections were stained in hematoxylin for approximately 15 min (Algan, 1981). Semi-permanent slides were mounted in glycerin. Well-stained sections were examined under a light microscope and photographed using an Olympus BX 53 research microscope with a digital camera attachment DP 73.

Five cross-sections from at least three different individual plants from each taxon were measured to assess the consistency of anatomical characters and to calculate the means and standard error among different cross-sections. Ten peripheral slides were prepared, and 50 stomatal lengths were measured for each taxon. The stomatal index was calculated according to the method described by Meidner and Mansfield (1968). Fifty quantitative and qualitative characters were investigated (Tables 2-5).

2.3. Micromorphological examination

Micro and macromorphological features of the cypselas were studied using a stereomicroscope (Leica M60 with a digital camera attachment DFC 295) and a scanning electron microscope (Zeiss Evo LS10, ACU-Science

Research Center). Five specimens were selected from each taxon. The cypselas were first examined using a stereomicroscope to determine size, shape, color and maturity, and were then photographed. For scanning electron microscopy, mature cypselas were placed on stubs using double-sided adhesive tape, and coated with gold in a Cressington sputter coater 108 auto coating apparatus for 2-3 minutes. All cypselas were examined and photographed from the same region (from the middle part of the lateral region).

The terminology for cypselar characteristics proposed by Stearn (1985) was adopted to describe the fruit coat, size and shape, cell arrangements and primary sculpturing.

2.4. Cluster analysis

Data analysis was carried out on SPSS (version 19) software. Duncan's multiple-range test, a one-way analysis of variance technique, was used in 40 quantitative values to identify the statistical importance of distinctions among the data (Tables 2-5). Grouping of taxa was performed using the clustering analysis method (UPGMA)..

3. Results

In this study, stem, leaf and cypselar anatomical properties and cypselar micromorphology of four taxa were investigated in detail. A transverse section of stem, leaf blade, midrib and cypselar, and peripheral sections of leaf were investigated. The main anatomical characters, 42 being assessed among the taxa studied, are shown in Tables 2-5 and in Figures 1-6.

3.1. Stem

The taxa studied exhibited more or less similar morphological patterns. However important differences were also noted. *C. aggregata* subsp. *albida* and *C. salicifolia* have 7-8 corners, while *C. macrocephala* and *Cy. nigrofimbrius* exhibited two-three wings in addition to the corners. Wings were also previously reported in *Centaurea cheiranthifolia* var. *purpurascens* by Ozcan et al. (2014). All taxa investigated have collenchyma in the corners and chlorenchyma between the corners. The largest cortex and collenchyma thickness are seen in *C. macrocephala*, while the smallest ones are present in *C. aggregata* subsp. *albida* (Table 2). Collateral type vascular bundles appear in two layers in *C. macrocephala*, in contrast to the other taxa (Figure 1). They are arranged in one row in these three taxa (Figure 1D, Table 2). The number of vascular bundles in the stem is much higher (72-80) in *C. macrocephala*, but almost the same in the others. The largest sclerenchymatic cap is present above the phloem in *C. macrocephala*, and the smallest occurs in *Cy. nigrofimbrius* (Figure 1, Table 2). Several secretory canals (ducts) were observed in the cortex opposite the bundles in all taxa near the bundles. These structures have been previously reported by Metcalfe and Chalk (1979) in some species of the family Asteraceae and by Celik et al. (2008), Kaya et al. (2010), Aydin et al. (2013), Özcan (2013) and Ozcan et al. (2014) in several *Centaurea* s.l. taxa. Parenchymatic pith cells are situated in the center of the stem. However, a large pith cavity is present at the center of the stem in *C. salicifolia* and *Cy. nigrofimbrius* (Figure 1G,J).

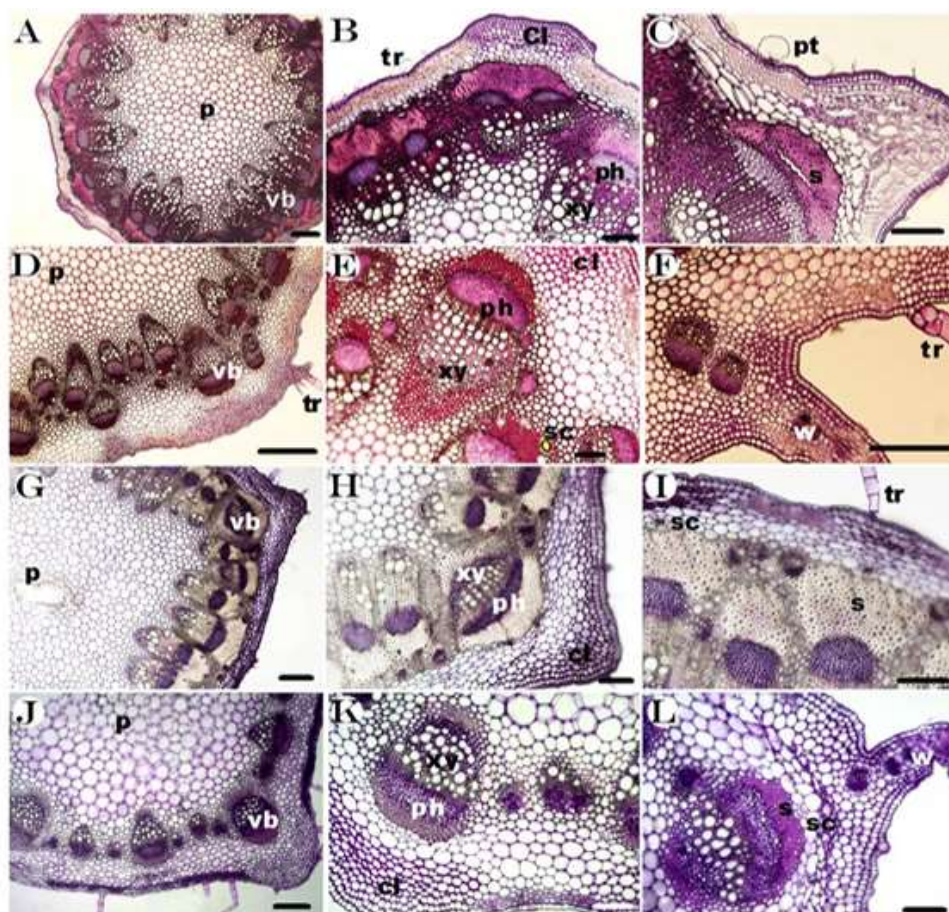


Figure 1. Stem anatomy of investigated taxa. A-C, *Centaurea aggregata* subsp. *albida*; D-F, *C. macrocephala*; G-I, *C. salicifolia*; J-L, *Cyanus nigrofimbrius*. cl = collenchymas, pp = palisade parenchyma, p = pith, ph = phloem, pt = peltate trichome, sc = secretory canal (duct), tr = simple trichome, vb = vascular bundle, w = wing, xy = xylem. Scale bars: A, D, G, J = 200 µm; B, C, E, F, K, L = 100 µm

Table 2. Stem features of investigated taxa. *mean± standard deviation

Character	<i>Centaurea aggregata</i> subsp. <i>albida</i>	<i>C. macrocephala</i>	<i>C. salicifolia</i>	<i>Cyanus nigrofimbrius</i>
Shape	angled	angled and winged	angled	angled and winged
Epidermis length (µm)	13.10±2.21 ^a	19.77±0.96 ^b	10.94±0.60 ^a	18.33±0.71 ^b
Epidermis width (µm)	19.63±3.76 ^a	20.77±0.72 ^a	14.92±0.93 ^a	20.67±0.35 ^a
Cortex thickness in the corner (µm)	179.1±3.10 ^a	389.69±17.52 ^c	221.3±22.59 ^{ab}	272.4±30.87 ^b
Number of cortex layer	8-9	15-20	10-13	8-14
Collenchyma thickness in the corner (µm)	114.19±5.53 ^a	264.07±12.56 ^c	133.59±10.72 ^a	193.2±18.61 ^b
Breadth of sclerenchymatic cap in phloem	121.70±6.21 ^{bc}	114.18±15.84 ^b	134.96±7.82 ^c	62.20±4.23 ^a
Number of vascular bundles	24-26 (1 row)	75-80 (2 rows)	22-35 (1 row)	15-23 (1 row)
Vascular bundle Length (µm)	606.2±29.63 ^b	717.20±32.78 ^c	552.99±14.79 ^b	355.2±18.26 ^a
Vascular bundle breadth (µm)	230.8±11.54 ^{ab}	318.82±20.48 ^c	190.65±7.40 ^a	262.9±17.13 ^b
Trachea (µm)	36.76±1.72 ^a	36.09±2.65 ^a	46.86±2.56 ^b	36.44±0.77 ^a
Pith cell (µm)	93.25±20.21 ^{ab}	120.1±5.18 ^{ab}	86.1±2.02 ^a	129.07±8.07 ^c

3.2. Leaf

The leaves are amphistomatic with eglandular and peltate glandular trichomes in adaxial and abaxial parts of the taxa, but *Cy. nigrofimbrius* does not have glandular trichomes (Figure 3). These trichome types have previously been reported in different *Centaurea* taxa by Ozcan et al. (2014). Stomatal numbers per mm² are lower in both of the

Character	<i>Centaurea aggregata</i> subsp. <i>albida</i>	<i>C. macrocephala</i>	<i>C. salicifolia</i>	<i>Cyanus nigrofimbrius</i>
Leaf type	isobilateral	isobilateral	dorsiventral	isobilateral
Upper epidermis	length(μm) 11.84±0.26 ^a width (μm) 16.33±0.88 ^a	21.85±0.90 ^c 25.77±1.26 ^c	18.17±0.85 ^b 26.53±1.46 ^c	17.63±0.82 ^b 20.93±0.97 ^b
Lower epidermis	length(μm) 11.81±0.41 ^a width (μm) 15.32±0.49 ^a	19.12±0.63 ^c 23.20 ^b ±0.73	12.82±0.56 ^a 17.07±0.49 ^a	15.50±0.53 ^b 21.53±1.44 ^b
Midrib mesophyll size (μm)	652.98±31.10 ^a	1161.32±44.9 ^{bc}	988.63±104.5 ^b	1228.0±63.32 ^c
Midrib mesophyll breadth (μm)	410.54±12.16 ^a	1535.03±55.80 ^c	1108.59±66.24 ^b	1557.61±73.72 ^c
Lamina mesophyll breadth (μm)	223.42±13.41 ^c	179.42±5.86 ^b	127.93±3.95 ^a	215.6±2.70 ^c
Trachea diameter (μm)	20.34±1.41 ^a	27.58±1.46 ^b	22.63±0.94 ^a	27.25±0.98 ^b
Vascular bundle	Length (μm) 254.28±18.18 ^a breadth (μm) 167.29±13.41 ^a Number in midrib 1	396.53±14.66 ^c 249.07±6.59 ^c 4+1	333.24±15.36 ^b 249.5±9.49 ^c 3	412.80±10.89 ^c 214.40±11.95 ^b 3+1
Adaxial surface	Cuticle thickness (μm) 2.65±0.05 ^a Stomatal length (μm) 22.81±0.77 ^a Stomatal index 13.36±1.30 ^b Number of stomata (1 mm ²) 280.0±24.34 ^b	2.97±0.17 ^a 29.10±0.58 ^c 12.83±0.67 ^b 150.0±17.17 ^a	2.51±0.15 ^a 23.59±0.03 ^a 8.91±0.74 ^a 160.00±24.34 ^a	1.90±0.06 ^a 25.62±0.29 ^b 06.90±0.42 ^a 115.00±16.93 ^a
Abaxial surface	Cuticle thickness (μm) 2.47±0.13 ^b Stomatal length (μm) 21.29±0.19 ^a Stomatal index 15.44±0.68 ^{ab} Number of stomata (1 mm ²) 400.0±31.43 ^b	2.57±0.16 ^b 30.41±0.65 ^c 13.54±0.96 ^a 180.00±19.96 ^a	2.08±0.09 ^a 23.36±0.59 ^b 16.58±1.10 ^b 380.0±37.18 ^b	1.80±0.12 ^a 23.90±0.16 ^b 14.31±0.26 ^{ab} 220.0±24.20 ^a

Table 3. Leaf anatomical features of investigated taxa. *mean± standard deviation.

two leaf surfaces of *C. nigrofimbrius* than in the others. In addition, cypsela is ovoid for this species, in contrast to the others. These differences are in accordance with the classification of this species in the genus *Cyanus*. All the taxa studied have more or less sinuous-undulate anticlinal cell walls. However, less undulation was observed in *C. aggregata* subsp. *albida* and *C. salicifolia*, because of their growing habits in more or less dry conditions. This observation supports the idea that epidermal cells of most leaves of shade-loving dicotyledons have sinuous anticlinal walls (Fahn 1990). The leaf lamina is isobilateral in *C. aggregata* subsp. *albida*, *C. macrocephala* and *Cy. nigrofimbrius*, whereas it is dorsiventral in *C. salicifolia*. Isobilateral and dorsiventral types of leaf lamina are commonly reported in the genus *Centaurea* and some related genera (Metcalf and Chalk, 1979; Uysal et al., 2005; Celik et al., 2008; Aydin et al., 2013; Ozcan et al., 2014). One to three collateral vascular bundles are observed in the midrib of the leaf in investigated taxa. *C. aggregata* subsp. *albida* has only one large vascular bundle in the midrib, as in *C. pecho* as previously reported by Ozcan et al. (2014). These two taxa grow in very dry conditions, in contrast to the other taxa. Various numbers of secretory ducts (Figure 2) are observed near the bundles, as with the stems. It has been suggested that these ducts may act as a sieve tube in the transfer of organic material (Tetley, 1925; Williams, 1954), and this is probably correct for several *Centaurea* taxa, as in this study.

3.3. Cypsela

It is made up from pericarp, testa, endosperm and cotyledons. The mature pericarp is differentiated into two zones, i.e. exocarp and mesocarp, and exhibits variation in the structure (Figure 4). The exocarp is composed of relatively thickened and flat epidermal cells, and sclerenchymatous fiber cells cover the entire mesocarp in all taxa. Sclerified epidermal cells have been previously reported in *Carduus*, *Cirsium*, *Notobasis* Cass., *Picnomon* Adans., *Silybum* Adans.

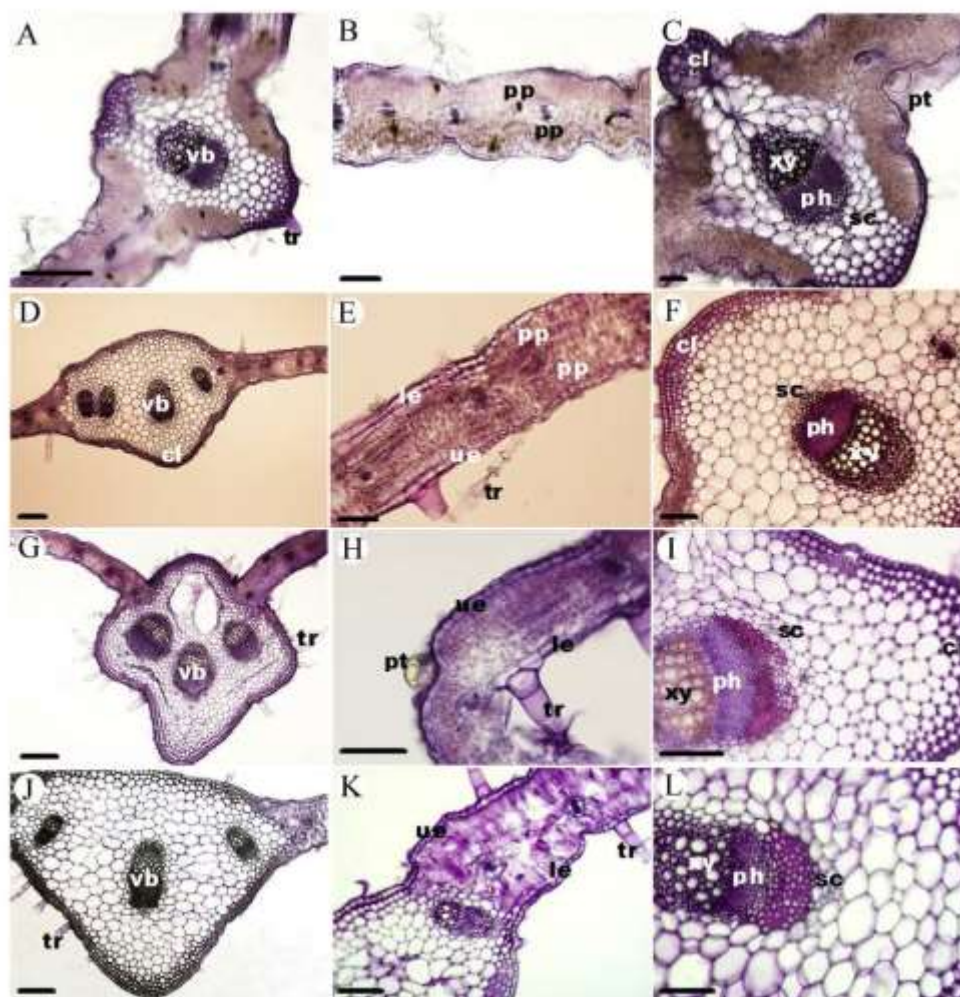


Figure 2. Leaf anatomy of investigated taxa. A-C, *C. aggregata* subsp. *albida*; D-F, *C. macrocephala*; G-I, *C. salicifolia*; J-L, *Cy. nigrofimbrius*. cl = collenchymas, le = lower epidermis, p = pith, ph = phloem, pp = palisade parenchyma, pt = peltate trichome, sc = secretory canal (duct), tr = simple trichome, ue = upper epidermis, vb = vascular bundle, xy = xilema. Scale bars: A, D, G, J = 200 μ m; B, E = 100 μ m; C, F, H, K = 50 μ m

and *Trymnus* Cass. by Häffner (2000). In contrast, thin epidermal cells and parenchymatic mesocarp have also been reported in *Rhaponticum* Vaill. In the species of *Klasea* Cass. and *Serratula* L., the mesocarp is represented by both parenchymatous and sclerenchymatous tissue (Zaremba and Boyko, 2008). Mukherjee (2001) studied some taxa in the tribe Senecioneae and reported sclerenchymatic braces and parenchymatic cells layers in the mesocarpic zone of the pericarp. The testa is elongated, with radially stretched lignified cell and crushed cell layers near the single row endodermis. This type of pericarp and testa structure were previously reported by Häffner (2000) in some *Carduinae* and *Centaureinae* taxa, and by Zaremba and Boyko (2008) in some *Cardueae* genera, *Rhaponticum*, *Klasea*, *Serratula* and *Synurus* Iljin. Singh and Pandley (1984) reported an elongated and lignified testa structure in *Centaurea moschata* L. and in *Silybum marianum* (L.) Gaertn. A similar testa structure has been also determined in some species of *Klasea* and *Serratula*. *Cy. nigrofimbrius* is characterized by a very thick testa and a comparatively thin pericarp among the investigated taxa (Table 4).

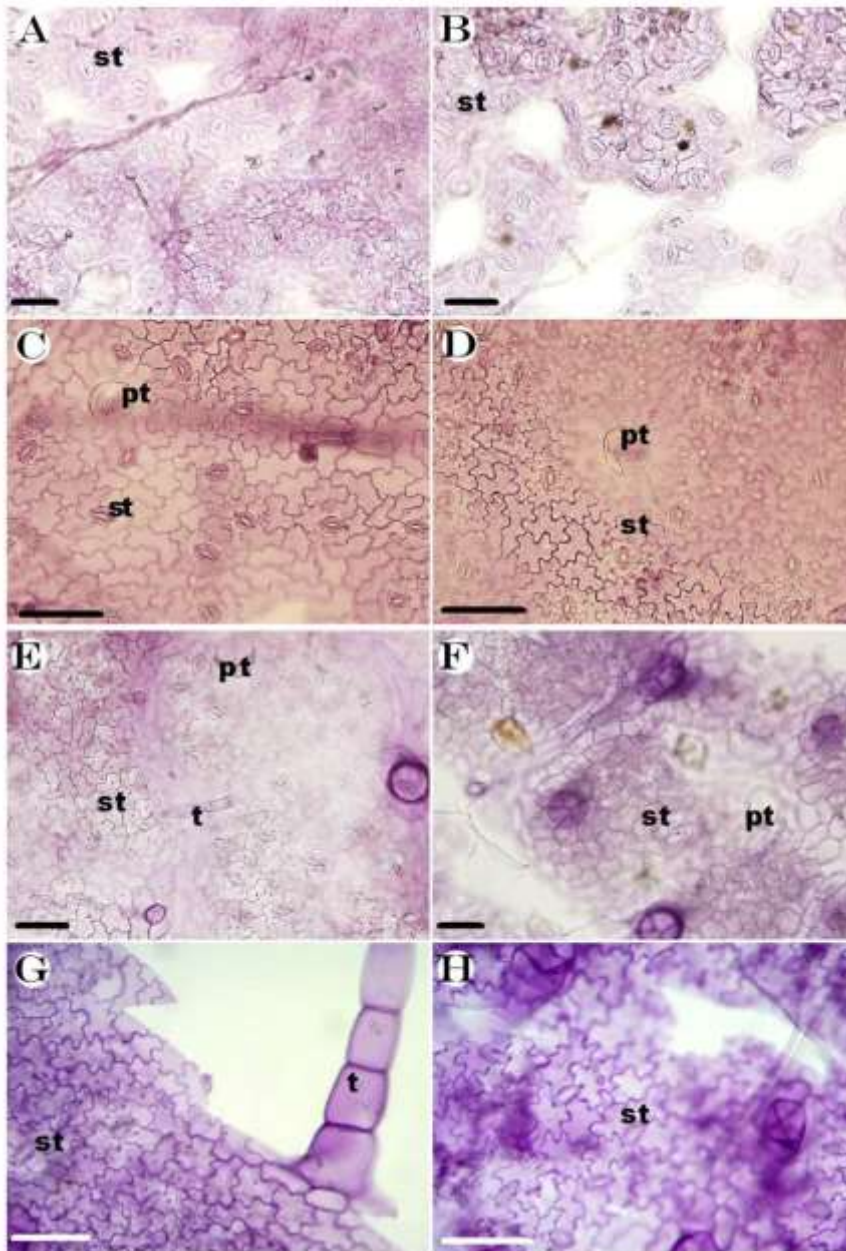


Figure 3. Stomata of investigated taxa. A-C, *C. aggregata* subsp. *albida*; D-F, *C. macrocephala*; G-I, *C. salicifolia*; J-L, *Cy. nigrofimbrius*. (A, C, E, G) adaxial surface. (E, D, F, H) abaxial surface. (pt) peltate trichome; (st) stomata; (t) trichome. Scale bars: 50 μ m

Secretory ducts are clearly visible in *C. salicifolia* and *Cy. nigrofimbrius* near the bundle traces. Lavalie (1912) reported that secretory ducts are of great importance in the taxonomy of the *Cardueae*. These have been described in the species of *Carthamus* by Singh and Pandey (1984) and *Serratula*, some sections of *Centaurea* by Dittrich (1985), and some species of the tribe Senecioneae by Pandey and Singh (1982). A one-layer, elongated and thin-walled parenchymatous endosperm is observed in all taxa investigated. Häffner (2000) also reported that the appearance of endosperm does not differ significantly among genera of the subtribe *Carduinae*.

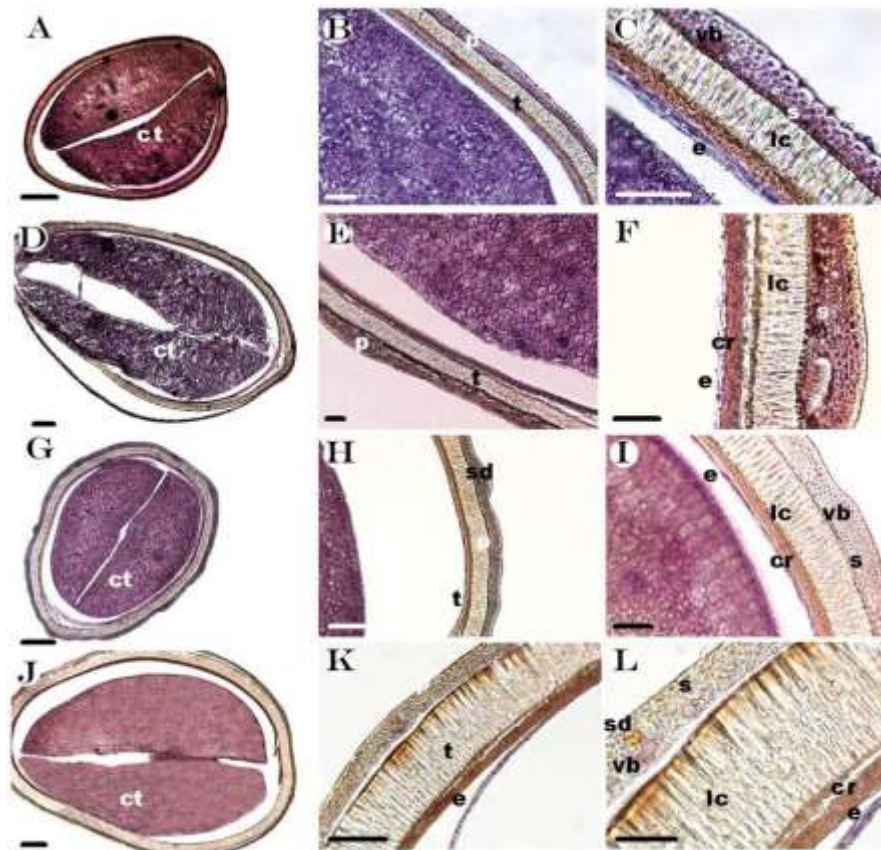


Figure 4. Cypsel anatomy of investigated taxa. A-C, *C. aggregata* subsp. *albida*; D-F, *C. macrocephala*; G-I, *C. salicifolia*; J-L, *Cy. nigrofimbrius*. cr = crushed cell, e = endosperm, lc = lignified palisade cell, s = sclerenchymatic cell, sd = secretory duct, vb = vascular bundle. Scale bars: A, D, G, J = 200 μ m; B, E, H, K = 100 μ m; C, F, I, L = 50 μ m

Table 4. Cypsel anatomical characters of investigated taxa. *mean \pm standard deviation.

Character	<i>Centaurea aggregata</i> subsp. <i>albida</i>	<i>C. macrocephala</i>	<i>C. salicifolia</i>	<i>Cyanus nigrofimbrius</i>
Cuticle (μ m)	1.65 \pm 0.18 ^b	1.18 \pm 0.04 ^a	1.49 \pm 0.07 ^a	1.40 \pm 0.10 ^a
Pericarp (μ m)	27.02 \pm 1.56 ^a	38.68 \pm 1.72 ^b	39.44 \pm 1.34 ^b	41.01 \pm 2.52 ^b
Palisade sclerenchyma (μ m)	35.96 \pm 1.41 ^a	57.26 \pm 0.91 ^b	54.74 \pm 0.64 ^b	113.84 \pm 1.16 ^c
Crushed cell layer (μ m)	14.53 \pm 0.43 ^a	22.83 \pm 1.12 ^b	16.65 \pm 0.44 ^a	25.71 \pm 0.95 ^c
Vascular bundle length (μ m)	14.87 \pm 0.39 ^a	27.57 \pm 1.52 ^c	14.42 \pm 0.46 ^a	22.45 \pm 1.94 ^b
Vascular bundle width (μ m)	23.97 \pm 2.56 ^a	64.80 \pm 1.29 ^d	32.72 \pm 1.11 ^b	48.08 \pm 3.12 ^c
Endosperm (μ m)	5.69 \pm 0.47 ^a	6.54 \pm 0.30 ^a	6.16 \pm 0.36 ^a	5.44 \pm 0.21 ^a
Cypsel length (μ m) in transverse section	1297.8 \pm 43.29 ^a	3257.9 \pm 101.73 ^c	1459.9 \pm 11.29 ^a	2799.35 \pm 71.5 ^b
Cypsel width (μ m) in transverse section	1002.2 \pm 26.81 ^a	1661.8 \pm 66.80 ^b	1118.0 \pm 24.51 ^a	2130.76 \pm 23.72 ^c
Secretory cell in bundle	invisible	invisible	12.56 \pm 0.76	17.59 \pm 1.92

3.4. Micromorphology

Shape, size, color, and surface ornamentalions of cypselas were observed and indicated in Table 5, as well as in Figures 4 and 5. Jana and Mukherjee (2012) reported that epidermal cell orientations are also important for characterization of taxa. In the present study, the cypselas of the investigated taxa are smooth (not ribbed), ovoid or widely oblong, with swollen or compressed dorsal and ventral margins (Figure 5). They also have a scabrous pappus

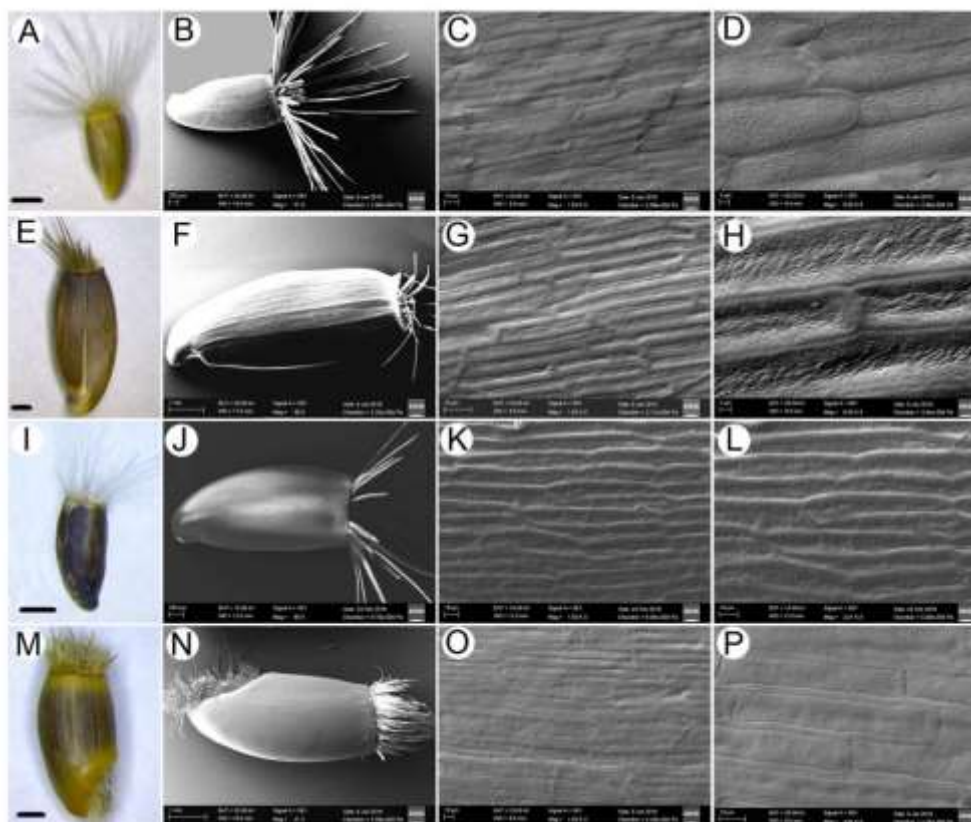


Figure 5. LM and SEM micrographies of Cypsela. A-D, *C. aggregata* subsp. *albida*; E-F, *C. macrocephala*; I-L, *C. salicifolia*; M-P, *Cy. nigrofimbrius*. Scale bars: A, E, H, L = 500 μ m

with different sizes in above of cypselas (Table 5). However, both ribbed and non-ribbed cypselas were previously reported in the family Asteraceae by Abid and Qaiser (2009). Shabestari et al. (2013) previously examined various *Centaurea* taxa and described their seed (cypsela) types as a striate sculpture, strongly depressed on the both sides, with or without hairs on the surfaces.

Table 5. Cypsela micromorphology of investigated taxa. *mean \pm standard deviation.

Character	<i>Centaurea aggregata</i> subsp. <i>albida</i>	<i>C. macrocephala</i>	<i>C. salicifolia</i>	<i>Cyanus nigrofimbrius</i>
Length (cm)	2.40 \pm 0.05 ^a	6.83 \pm 0.13 ^d	2.72 \pm 0.08 ^b	4.55 \pm 0.04 ^c
Width (cm)	1.05 \pm 0.04 ^a	2.82 \pm 0.10 ^c	1.05 \pm 0.04 ^a	2.42 \pm 0.05 ^b
Shape (L/W)	widely oblong	widely oblong	widely oblong	ovoid
Color	brown	dark brown	light brown	brown-dark brown
Ornamentation	fine sulcate	scrobiculate-ribbed	Striate to scrobiculate-ribbed	scalariform
Anticlinal cell wall	straight	raised, straight	slightly raised, straight	straight
Periclinal cell wall	faintly rugulate	rugulate	coarse rugulate	smooth

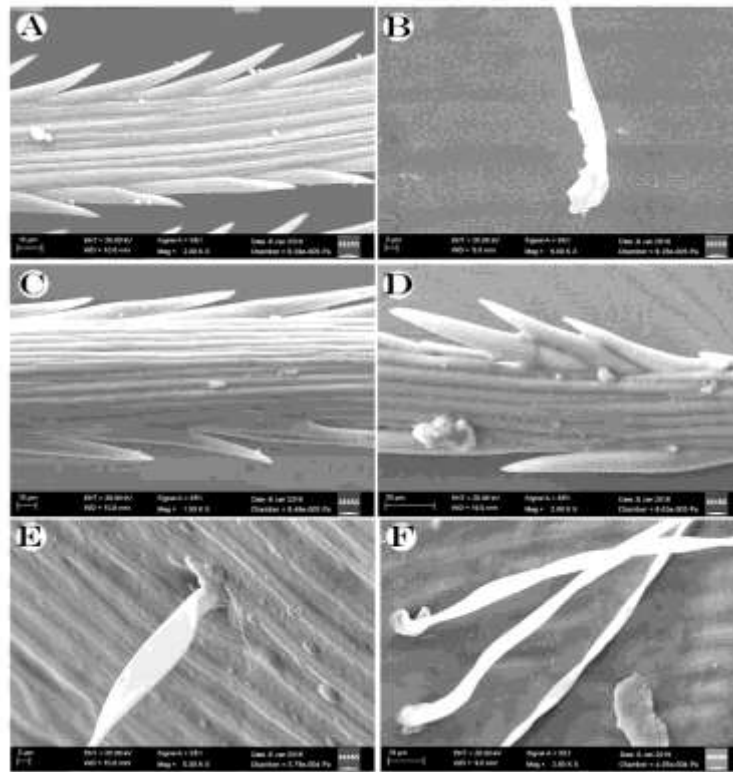


Figure 6. Pappus and trichomes. A-B, *C. aggregata* subsp. *albida*; C, *C. macrocephala*; D-F, *Cy. nigrofimbrius*

Cypsela colors vary from yellowish brown to brown or dark brown (sometimes blackish in the middle part). They are swollen in 3 taxa (*C. aggregata* subsp. *albida*, *C. salicifolia*, *Cy. nigrofimbrius*), and compressed slightly on both sides in *C. macrocephala*, and symmetric or asymmetric in outline. Cypselas have a narrow base, sublateral hilum, thin and acute apex. They are widely oblong in three *Centaurea* taxa, but ovoid in *Cy. nigrofimbrius* (Figure 5).

Anticlinal cell walls observed in the taxa are straight, forming rectangular cells uniformly organized into more or less distinct longitudinal columns, while the periclinal cell walls are smooth or with small irregular elevation (Figure 5, Table 5). The taxa can be divided into four types according to their surface ornamentations, fine sulcate (*C. aggregata* subsp. *albida*), scrobiculate-ribbed (*C. macrocephala*), striate (*C. salicifolia*) and scalariform (*Cy. nigrofimbrius*). In some fruits samples of *C. salicifolia* scrobiculate-ribbed was also observed. Striate structure and sparsely long hairs were also reported in the achene of *C. polyclada* by Uysal et al. (2005). Three different striation types have been described in Turkish *Carthamus* taxa by Tarikahya-Hacıoğlu et al. (2012). Bona (2014, 2015) described 8 ornamentation types in some *Centaurea* and *Cyanus* taxa. In this mentioned study, surface ornamentation of *C. aggregata* subsp. *aggregata* was determined as glebulate-ruminant (Bona 2014) and smooth surface pattern was reported in four *Cyanus* species (Bona 2015). Candan et al. (2016) investigated some taxa present in the sect. *Acrolopus* and striate type ornamentation reported in *C. aggregata* subsp. *albida*. In the present study, the cypselas surfaces of 3 *Centaurea* taxa have more or less rugulate pattern, while *Cyanus nigrofimbrius* has smooth surface pattern and scalariform ornamentation. In one previous study, cypselas ornamentation of *Cy. nigrofimbrius* was reported by Şirin et al. (2017) as irregularly sulcate and not smooth surface, differently from this study. Striate ornamentation has been also reported by Shabestari et al. (2013) and Candan et al. (2016) in some *Centaurea* taxa.

In some species in the family Asteraceae, four ornamentations were determined as rectangular, rectangular with septae, hexagonal with septae or rugose by Kulkarni (2013). Based on the present results, the septum is not present in the surfaces of the *Centaurea* taxa investigated. Andrés-Sánchez et al. (2015) referred to twin hairs in some species (e.g. *Filago* L.) in the family Asteraceae. Dittrich (1985), however, reported that twin hairs are never present on the achene surface in the subtribe *Carduinae* and *Centaureinae*. Similarly, only sparsely long hairs were observed in the present study (Figure 6). Simple indumentum is sparsely found in cypselas from three taxa (*C. aggregata* subsp. *albida*, *C. salicifolia*, *Cy. nigrofimbrius*). The hilum densely covered with hair is only observed in *Cy. nigrofimbrius* (Figure 5M), similar to Şirin et al. (2017)'s report. Mean lengths of cypselas varied from 2.4 mm (*C. salicifolia*) to 6.83 mm (*C. macrocephala*), while their mean widths varied between 1.05 mm and 2.42 mm. The largest cypselas were characteristic of *C. macrocephala* while the smallest were in *C. aggregata* subsp. *albida* (Table 5). The pappus is scabrous, and one or two seriate in all taxa investigated. Mean length ranged from 0.3 mm to 5.2 mm in the taxa (Figure 6).

3.5. Multivariate Analyses

Analysis of variance analysis was performed on all quantitative (40) values (Tables 2-5). For the cluster analysis (UPGMA), 42 anatomical and micromorphological characteristics of stem, leaf and cypsela were analyzed (Figures 1-5; Tables 2-5). The phenogram (Figure 7) showed that clusters were separated from all species in a distinct position. The delimitation of these groups is mainly based on the occurrence of a winged structure in stem, height, width and number of vascular bundles and mesophyll thickness in the leaf midrib, thickness of pericarp in cypsela ($P < 0.05$). In the dendrogram, four taxa were divided into two major clusters at a distance coefficient of approximately 25.0. Each cluster consisted of two different taxa. The first included *C. macrocephala* and *Cy. nigrofimbrius* and the second contained *C. aggregata* subsp. *albida* and *C. salicifolia*. The clustering of *C. macrocephala* and *Cy. nigrofimbrius* at a low distance coefficient of approximately 3.0, together with *C. aggregata* subsp. *albida* and *C. salicifolia* at a distance coefficient of approximately 1.0, reflects an underlying resemblance between them. In UPGMA, *C. aggregata* subsp. *albida* and *C. salicifolia* positioned together have also share similar morphological features such as small cluster capitula. On the other hand, *C. macrocephala* and *Cy. nigrofimbrius* found in second cluster have big single capitula and also winged type stems (Figure 7).

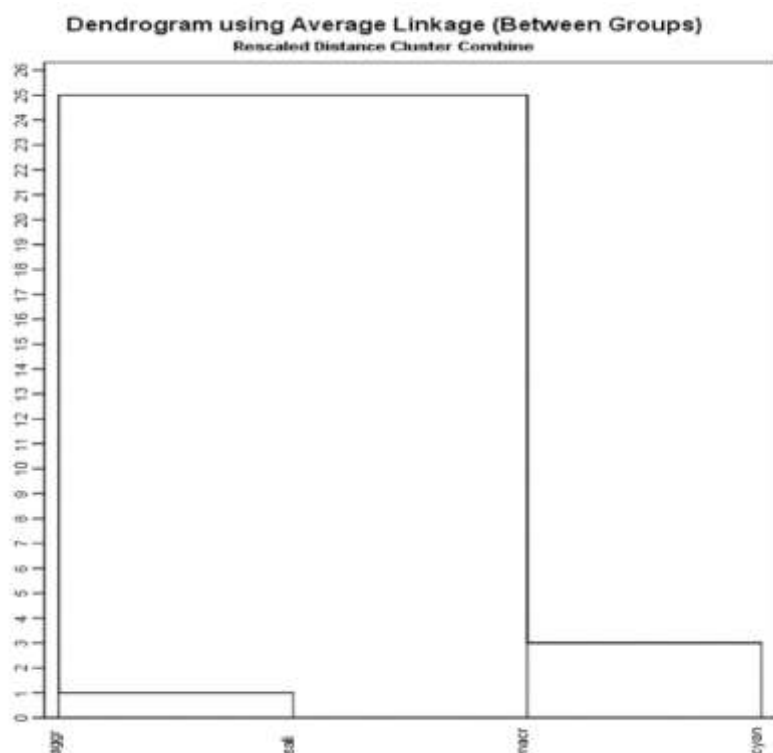


Figure 7. UPGMA Cluster analysis using anatomical and micromorphological characters of investigated taxa. Each code represents a taxon. Taxa codes; aggr: *C. aggregata* subsp. *albida*, cyan: *Cy. nigrofimbrius*, macr: *C. macrocephala*, sali: *C. salicifolia*

Cluster analysis performed with 42 characters was useful in demonstrating the existence of clearly distinct groups of taxa, without generic delimitation. According to surface ornamentation, four different cypsela surface types were observed as fine sulcate, scrobiculate-ribbed, striate to scrobiculate-ribbed and scalariform (Table 5). Data obtained from the present study show that the anatomical and micromorphological characters investigated are mostly informative. They can be used as a parameter to support species identification. Investigation of vegetative parts and cypsela structures should therefore be included in future taxonomic and phylogenetic studies of the genus *Centaurea*.

Acknowledgements

The author is thankful to the Research Foundation of Artvin Coruh University for financial support (Project number: 2016.F10.01.08).

References

- Algan, G. (1981). Bitkisel Dokular için Mikroteknik. Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Bot. No.1. İstanbul. Matbaa Teknisyenleri Basımevi (in Turkish).

- Andrés-Sánchez, S., Galbany-Casals, M., Bergmeier, E., Rico, E., Martínez-Ortega, M. M. (2015). Systematic significance and evolutionary dynamics of the achene twin hairs in *Filago* (Asteraceae, Gnaphalieae) and related genera: further evidence of morphological homoplasy. *Plant Systematics and Evolution*, 301, 1653-1668.
- Aydin, Ö., Coşkunçelebi, K., Gültepe, M., Güzel, M.E. (2013). A contribution to taxonomy of *Centaurea* including *Psephellus* (Asteraceae) based on anatomical and molecular data. *Turkish Journal of Botany*, 37, 419-427.
- Abid, R., Ali, N. (2010). Cypselas morphology and its taxonomic significance for the tribe Senecioneae (Asteraceae) from Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 42 (SI), 117-133.
- Abid, R.D., Qaiser, M. (2009). Taxonomic significance of the cypselas morphology in the tribe Anthemideae (Asteraceae) from Pakistan and Kashmir. *Pakistan Journal of Botany*, 41(2), 555-579.
- Bayrakdar, F., Aytac, Z., Suludere, Z., Candan, S. (2010). Seed morphology of *Ebenus* L. species endemic to Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 34, 283-289.
- Bona, M. (2014). Achene characteristics of Turkish *Centaurea* (Asteraceae) and their systematic application. *Bangladesh Journal of Botany*, 43, 163-166.
- Bona, M. (2015). Systematic implications of achene characteristics in genera *Centaurea* L., *Cyanus* Mill., *Psephellus* Cass. and *Rhaponticooides* Vaill. (Asteraceae). *Bangladesh Journal of Botany*, 22(2), 125-136.
- Brummitt, R.K. (2004). Report of the committee for spermatophyta: 54. *Taxon*, 53, 813-825.
- Candan, F., Uysal, T., Tugay, O., Bozkurt, M., Ertuğrul, K., Demirelma, H. (2016). The examinations of achene ultrastructural features of section *Acrolophus* (*Centaurea*, Asteraceae) via scanning electron microscopy. *Turkish Journal of Botany*, 40, 147-163.
- Celik, S., Uysal, T., Menemen, Y. (2008). Morphology, anatomy, ecology and palynology of two *Centaurea* species from Turkey. *Bangladesh Journal of Botany*, 37, 67-74.
- Davis, P.H., Tan, K., Mill, R.R. (eds.) (1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 10 (suppl. 1): Edinburgh University Press, Edinburgh, pp. 164-165.
- Dittrich, M. (1985). Morphologische und anatomische Untersuchungen an Blüten und Früchten der Gattung *Carlina* (Compositae). I Teil. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, 107, 591-609.
- Duran, A., Duman, H. (2002). Two new species of *Centaurea* (Asteraceae) from Turkey. *Annales Botanici Fennici*, 39, 43-48.
- Eminagaoglu, O., Ozcan, M. (2014). Morphology and leaf anatomy of some *Euonymus* taxa from Turkey. *Biodicon* 7(3), 167-176.
- Greuter W (2003a). The Euro + Med treatment of Cardueae (Compositae) generic concepts and required new names. *Willdenowia*, 33, 49-61.
- Greuter, W. (2003b). The Euro + Med treatment Senecioneae and the minor Compositae tribes-generic concepts and required new names, with an addendum to *Cardueae*. *Willdenowia*, 33, 245-250.
- Güner, A. Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M.T. (eds.) (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*, İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği yayımları, 141-146.
- Häffner, E. (2000). On the phylogeny of the subtribe Carduinae (tribe Cardueae, Compositae). *Englera*, 21, 1-208.
- Inceer, H., Hayirlioglu-Ayaz, S., Ozcan, M. (2007). Chromosome numbers of the twenty-two Turkish plant species. *Caryologia*, 60, 349-357.
- Inceer, H., Ozcan, M. (2011). Leaf anatomy as an additional taxonomy tool for 18 taxa of *Matricaria* L. and *Tripleurospermum* Sch. Bip. (Anthemideae-Asteraceae) in Turkey. *Plant Systematics and Evolution*, 296, 205-215.
- Jana, B.K., Mukherjee, S.K. (2012). Comparative morphological and anatomical studies of cypselas of some members of the tribe *Millerieae* (Asteraceae). *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science*, 1(5), 317-330.
- Kadereit, J.W., Jeffrey, C. (eds.) (2007). Flowering Plants. Eudicots: Asterales. *In the Families and Genera of Vascular Plants* (K Kubitzki, ed.), vol. 8, Springer, Berlin.
- Kaya, A., Dirmenci, T. (2008). Nutlet surface micromorphology of the genus *Nepeta* L. *Lamiaceae* in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 32, 103-112.
- Kaya, Z., Orcan, N., Binzet, R. (2010). Morphological, anatomical and palynological study of *Centaurea calcitrapa* L. subsp. *cilicica* (Boiss. & Bal.) Wagenitz and *Centaurea solstitialis* L. subsp. *carneola* (Boiss.) Wagenitz endemic for Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 42, 59-69.
- Kulkarni, S.V. (2013). SEM studies of Achenes in some taxa of Asteraceae. *International Journal for Environmental Rehabilitation and Conservation*, 4(2), 87-97.
- Kose, Y.B., Yücel, E. (2007). An investigation on comparison of ecological and biological properties of two endemic *Centaurea* species from Turkey (*Centaurea lycia* and *Centaurea luschaniana*). *International Conference on Environment: Survival and Sustainability Proceedings*, 2, 659-670. Turkish Republic of Northern Cyprus.
- Lavialle, P. (1912). Recherches sur le developpement de l'ovaire en fruit chez les Composées. *Annales des Sciences Naturelles-Botanique Ser.*, 9. 15, 39-149.
- Lo Presti, R.M., Oppolzer, S., Oberprieler, C. 2010. A molecular phylogeny and revised classification of the Mediterranean genus *Anthemis* s.l. (Compositae, Anthemideae) based on three molecular markers and micromorphological characters. *Taxon*, 59(5), 1441-1456.
- Martin, E., Dinc, M., Duran, A. (2009). Karyomorphological study of eight *Centaurea* L. taxa (Asteraceae) from Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 33, 97-104.
- Metcalf, C.R., Chalk, L. (1979). *Anatomy of Dicotyledones I*. Oxford. University Press, pp. 783-803.
- Meidner, H., Mansfield, T.A. (1968). *Physiology of Stomata*. London: McGraw-Hill.
- Mukherjee, S. K. (2001). Cypselar features nineteen taxa of the tribe Senecioneae (Asteraceae) and their taxonomic significance. *Journal of Economic & Taxonomic Botany (Recent Researches in Plant Anatomy and Morphology)*, Additional Series No. 19.
- Ozcan, M. (2017). Cypselas micromorphology and anatomy in *Cirsium* sect. *Epitrichys* (Asteraceae, Carduoideae) and its taxonomic implications. *Nordic Journal of Botany*, 35, 653-668.

- Ozcan, M., Demiralay, M., Kahrirman, A. (2015). Leaf anatomical notes on *Cirsium* Miller (Asteraceae, Carduoideae) from Turkey. *Plant Systematics and Evolution*, 301, 1995-2012.
- Ozcan, M., Unver, M.C., Eminagaoglu, O. (2014). Comparative anatomical and ecological investigations on some *Centaurea* (Asteraceae) taxa from Turkey and their taxonomic significance. *Pakistan Journal of Botany*, 46 (4), 1287-1301.
- Özcan, M. (2013). Türkiye’de Yetişen *Psephellus pulcherrimus* (syn: *Centaurea pulcherrima* var. *freynii*) (Cardueae, Asteraceae)’un morfolojik ve anatomik Özellikleri. *ACU Journal of Forest Faculty*, 14(1), 104-112.
- Pandey, A.K., Singh, R.P. (1982). Development and structure of seeds and fruits in the Compositae, tribe Senecioneae. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, 103, 413-422.
- Pinar, N.M., Duran, A., Çeter, T., Tug, G.N. (2009). Pollen and seed morphology of the genus *Hesperis* L. (Brassicaceae) in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 33, 83-96.
- Romaschenko, K., Ertugrul, K., Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Uysal, T., Arslan, E. (2004). New chromosome counts in the *Centaurea jacea* group (Asteraceae, Cardueae) and some related taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 145, 345-352.
- Singh, R. P., Pandey, A. K. (1984). Development and structure of seeds and fruits in Compositae-Cynareae. *Phytomorphology*, 34(1-4), 1-10.
- Shabestari, E.S.B., Attar, F., Riahi, H., Sheidai, M. (2013). Seed morphology of the *Centaurea* species (Asteraceae) in Iran. *Phytologia Balcanica*, 19 (2), 209-214.
- Sheikh Akbari, R., Azizian, D. (2006). Seed morphology and seed coat sculpturing of *Epilobium* L. species (Onagraceae Juss.) from Iran. *Turkish Journal of Botany*, 30, 435-440.
- Stearn, W.T. (1985). *Botanical Latin*. 3th edition. David & Charles Publishers, USA, ISBN 0715385488.
- Stace, C.A. (1984). The Taxonomic Importance of the Leaf Surface. In: Heywood, V. H., Moore D. M., eds. *Current concepts in plant taxonomy*, 25. Systematic association special Academic Press, London.
- Susanna, A., Garcia-Jacas, N. (2007). Tribe Cardueae. In: Kadereit, J. W., Jeffrey, C. (eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants*, 8, 123-146, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg & New York.
- Şirin, E., Ertuğrul, K., Uysal, T. (2017). Achene micromorphology of the genus *Cyanus* Mill. (Compositae) in Turkey and its taxonomic importance. *Phytotaxa*, 313 (1), 77-90.
- Tarıkahya-Hacıoğlu, B., Arslan, Y., Subaşı, İ., Katar, D., Bülbül, A.S., Çeter, T. (2012). Achene morphology of Turkish *Carthamus* species. *Australian Journal of Crop Science*, 6(8), 1260-1264.
- Tekeli, Y., Sezgin, M., Aktumsek, A., Gule, G.O., Sanda, M.A. (2010). Fatty acid composition of six *Centaurea* species growing in Konya, Turkey. *Natural Product Research*, 24, 1883-1889.
- Tetley, U. (1925). The secretory system of the roots of the Compositae. *New Phytologist*, 24, 138-162.
- Uysal, I., Celik, S., Menemen, Y. (2005). Morphology, anatomy, ecology, pollen and achene features of *Centaurea polyclada* DC. (Sect. *Acrolophus*) in Turkey. *International Journal of Biological Sciences*, 5, 176-180.
- Wagenitz, G. (1975). *Centaurea* L. In: Davis, P. H. (ed.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 5, Edinburgh University Press, Edinburgh, pp.465-585.
- Wagenitz, G., Hellwig, F.H. (1996). Evolution of characters and phylogeny of the *Centaureinae*. In: Hind, D. J. N., Beentje, H. G. (eds.), *Compositae: Systematics*. Proceedings of the international Compositae conference Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 491-510.
- Wagenitz, G., Hellwig, F.H. (2000). The genus *Psephellus* Cass. (*Compositae, Cardueae*) revisited with a broadened concept. *Willdenowia*, 30, 29-44.
- Williams, B.C. (1954). Observations on intercellular canals in root tips with special reference to the Compositae. *American Journal of Botany*, 41, 104-106.
- Zarembo, E.V., Boyko, E.V. (2008). Carpology of some East Asian *Cardueae* (Asteraceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 65(1), 129-134. Zhu, S.X., Qin, H.N., Shih, C. (2006). Achene wall anatomy and surface sculpturing of *Lactuca* L. And related genera (Compositae: Lactuceae) with notes on their systematic significance. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(4), 390-399.

(Received for publication 11 January 2017; The date of publication 15 August 2018)



Cytotoxic effects of *Satureja cuneifolia* extract in liver cancer cell line (HepG2)

Dilge YÜCEL *¹

¹ Eskişehir Fatih Fen Lisesi, Eskişehir, Turkey

Abstract

In this study, it was aimed to investigate the effects of extracts obtained from the seed of Rock thyme (*Satureja cuneifolia*) on the cytotoxic cell death in HepG2 human liver cancer cell lines. The plant samples collected from the vicinity of Kanlıpınar Village of Eskişehir were grounded after drying and then extracts were obtained. The liver cancer cells were replicated in a specially prepared medium. Plant extracts taken at doses of 1, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 µg/µl were added to replicated liver cancer cells and the effects levels were examined at 24, 48 and 72 hour intervals.

In the study, the data obtained after 24 hours showed that the doses of 1, 5, 10, and 15 µg/µl inhibited the development of cancer cells while 20 µg/µl dose was not effective, the doses of 25 and 30 µg/µl were not effective on the development of cancerous cells. According to the results of 48 hours of experiments; a significant death was observed in cancer cells at all doses applied (1-30 µg/µl). According to the results of 72 hours of experiments; all doses applied (1-30 µg/µl) inhibited the development of cancer cells and caused significant death of cancer cells. As a result, it has been determined that *Satureja cuneifolia* extracts inhibit the development of liver cancer cells and that this plant may be used in the design of cancer medicines. Future studies are needed to determine the most effective dose/time applications and action of mechanisms of *Satureja cuneifolia* extracts.

Key words: liver cancer, HepG2, Rock thyme, *Satureja cuneifolia*.

----- * -----

Karaciğer kanser hücre dizilerinde (HepG2) *Satureja cuneifolia* ekstresinin sitotoksik etkileri

Özet

Bu çalışmada Kaya kekiği (*Satureja cuneifolia*) bitkisinden elde edilen ekstrelerin HepG2 insan karaciğer kanser hücrelerinde in vitro sitotoksik hücre ölümü üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bitki örnekleri Eskişehir'in Kanlıpınar Köyü çevresinden toplanarak kurutulduktan sonra öğütülmüş ve ekstreleri elde edilmiştir. Karaciğer kanser hücreleri özel olarak hazırlanmış olan besi ortamında çoğaltılmıştır. 1, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30µg/µl'lik dozlarda alınan bitki ekstreleri, çoğaltılan karaciğer kanser hücrelerine verilmiştir ve etki düzeyleri 24, 48 ve 72 saat aralıklarla incelenmiştir. Kanser hücrelerinde canlılık testleri tripan mavisi ve MTT testi yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Çalışmada 24 saat sonunda elde edilen veriler, 1, 5, 10 ve 15µg/µl dozların kanser hücrelerinin gelişimini engellemesine karşın; 20, 25 ve 30µg/µl dozların ise kanserli hücrelerin gelişimi üzerinde etkili olmadığını göstermiştir. Deneylerin 48 saat sonucuna göre; uygulanan tüm dozlarda (1-30µg/µl) kanser hücrelerinde belirgin şekilde bir ölüm gözlenmiştir. Deneylerin 72 saat sonucuna göre; uygulanan tüm dozların (1-30µg/µl) kanser hücrelerinin gelişimini engellediği ve kanserli hücrelerin önemli oranda ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak; *Satureja cuneifolia* ekstresinin karaciğer kanser hücrelerinin gelişimini engellediği ve kanser ilaçlarının tasarımında bu bitkinin kullanılabileceği belirlenmiştir. İleride yapılacak ayrıntılı çalışmalarla *Satureja cuneifolia* ekstresinin en etkin doz/süre uygulamaları ve etki mekanizmalarının belirlenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: karaciğer kanseri, HepG2, Kaya kekiği, *Satureja cuneifolia*

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905319228818; Fax.: +905319228818; E-mail:dilgeyucel@gmail.com

© 2008 All rights reserved / Tüm hakları saklıdır

1. Giriş

Hücrede DNA'nın hasarının olması halinde hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalması kanser olarak adlandırılır. Kanserın esas nedeni hücre bölünmesi esnasında DNA replikasyonunun hatalı olması sonucu hücrenin farklılaşması olarak bildirilmektedir (Kuş, 2016). İnsan vücudunda çok sayıda mutasyona uğramış hücre olmasına karşın bunların büyük bir kısmı immün sistem tarafından yok edilmektedir. Normal sağlıklı vücut hücreleri bölünerek ölen hücrelerin yenilenmesini sağlar. Ancak normal hücrelerin bölünmeleri sonsuz olmayıp sınırlıdır. Sağlıklı bir hücrenin ne zaman, hangi sayıda bölünebileceği bilgisine sahiptir. Fakat kanser hücreleri, bu bilinci kaybederek, kontrolsüz bir şekilde bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Çoğalan bu kanser hücreleri toplanarak tümörleri oluştururlar ve oluşturdukları bu tümörden ayrılarak dolaşım ile vücudun diğer bölgelerine giderlerse buralarda da tümör kolonileri oluştururlar. Karaciğerde bulunan hücrelerin ani, kontrolsüz ve aşırı biçimde çoğalması sonucu tümör oluşumu ortaya çıkmaktadır. Karaciğer kanseri, kanser türleri arasında ölümcül olarak bilinen kanserlerdendir (İsan ve Tonbuş, 2016).

Lamiaceae familyasının bir üyesi olan Kaya kekiği-Dağ kekiği (*Satureja cuneifolia*) 20cm ye kadar boylanan, öbeler halinde bulunan, beyaz çiçekli, çok yıllık yarı odunsu bir bitki olup (Şekil 1); taşlık, kayalık, kurak ve açıklık alanları tercih eder (Kan ve ark. 2006). Temmuz-Ağustos aylarında çiçek açar. Ülkemizde oldukça geniş bir alanda doğal olarak yayılış gösterir (Yücel, 2014).



Şekil 1. Kaya kekiğinin genel görünüşü

Kaya kekiği halk arasında, zihin yorgunluğu giderici, kuvvet verici, cinsel isteği artırıcı, göğüs hastalıkları ve şeker hastalığı tedavisinde, mideyi güçlendirici, baharat ve gıda olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999; 2004; Kargioğlu ve ark., 2008).

Yapılan çalışmalar kaya kekiğinin antioksidan ve antimikrobial etkisinin yüksek olduğu (Çavar et al., 2008; Mihajilov-Krstev et al., 2010; Oke, et al., 2009; Skočibušić et al., 2006); ayrıca analjezik (ağrı kesici) etkisinin olduğu bildirilmiştir (Aydın ve ark.,1996). Bu bitki ile ilgili yapılmış değişik araştırmalar olmasına karşın; yapılan kaynak araştırmalarında karaciğer kanserine etkisi üzerine yapılmış bir çalışma bulunamamıştır.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Bitki materyalinin toplanması ve ekstraksiyon hazırlama

Bitki örnekleri Eskişehir'in Akpınar Köyü çevresin tekniğine uygun olarak Temmuz ayında toplanmıştır. Analizler için gerekli örnekler, sağlıklı bireylerden, bitkiye fazla zarar vermeyecek şekilde, toprak üstünde bulunan dallar bir makasla kesilerek, steril torbalara konmuştur. Laboratuvara getirilen bitki örnekleri temizlenerek, steril bir ortamda kurutulmuştur. Kuruyan bitkilerin yaprakları ayrılarak değirmende öğütülmüş, daha sonra gözenek çapı 2 mm olan bir elekten elenmiştir. Bir erlene; 10 gram öğütülmüş bitki örneği üzerine 100mL saf su konarak, etüv içinde 60°C de 12 saat bekletildikten sonra Por açıklık çapı 110 mm olan whatman filtreden süzülerek ekstrakt elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen ekstrakt 0.22 µm por büyüklüğündeki mikrobiyolojik filtrelerden süzülerek steril edilmiştir.

Bitki örneklerinden ekstrelerin elde edilmesi Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Bitki Ekolojisi Laboratuvarında; sitotoksite deneyleri Moloküler Biyoloji laboratuvarında yapılmıştır.

2.2. Hücre dizileri ve kültür aşaması

İnsan kanser hücre dizisi olarak “HepG2 insan karaciğer kanser” hücreleri kullanılmıştır. İnsan karaciğer kanseri hücre dizileri besiyeri (%10 (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS), 100 unite/mL penisilin/streptomisin, 2 mL- glutamin içeren ve %9,2 NaHCO₃ DMEM) içinde, 37°C de %0.5 karbondioksitli ortamda yetiştirilmiştir. Hücre dizisi 12-48-72 saat CO₂ inkübatöründe bekletildikten sonra ışık mikroskopunda yoğunluğuna bakılmıştır. Besiyeri çekilmiş flasklara 37°C su banyosunda ısıtılan 1X’lik Tripsin-EDTA (Etilendiamin Tetraasetik Asit)’dan 1-2 mL eklenmiştir. Hücreler ılık (%1) tripsin/EDTA ile kaldırılarak, tripan mavisi ile sayımı yapılmış ve 96 kuyucuklu plakalara 10x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde besiyeri ile süspansiyon haline getirildikten sonra her bir kuyucuğa 100 µL hücre süspansiyonu aktararak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırılıp, sonunda Kaya kekiği ekstralarının 1, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 µg/µL’lik dozlarını içeren besiyerlerinden 200 µL/kuyucuk konularak 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Deneylerde herbir doz için dört kuyucuk kullanılmış, sonuçlarda bunların ortalama değerleri kullanılmıştır.

2.3. Hücre canlılığının tripan mavisi atılım testi ile belirlenmesi

Hücre dizisi için hücre sayımı yapılmış ve trypan blue atılım testi ile hücrelerin canlılığına bakılmıştır. Lam üzerine 10µL. hücre +10µL. trypan blue koyularak ışık mikroskopunda boya almayan hücreler sayılarak canlılık belirlenmiştir. Alanda 100 hücre sayılarak boya almayan hücrelerin yüzde (%) oranı hesaplanmıştır.

2.4. Hücre canlılığının MTT testi ile belirlenmesi

Yöntem sağlıklı hücrelerde, mitokondrideki dehidrogenaz enziminin MTT (Difeniltetrazolyum Bromür) boyasındaki tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise, boyanmamaktadır (Tokur ve Aksoy, 2017). Oluşan formazan kristalleri; DMSO, izopropanol gibi organik çözücülerde kolaylıkla çözünebilmektedir. Çözünmüş olan bu boya, konsantrasyona bağlı olarak, spektrofotometrik yöntemle, görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorpsiyon verir ve bulunan miktar, direk olarak canlı hücrelerin oranını vermektedir.

MTT, PBS (5 mg/ml) içinde çözülerek, filtrasyon ile steril edilmiş ve -20°C’de saklanmıştır. Hücrelerin madde dozları ile muamelesinin ardından plakalardan medyum uzaklaştırılmış ve final konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde medyum ile hazırlanan MTT solüsyonu her kuyucuğa 125 µL ilave edilerek 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra plakalardaki MTT –medyum solüsyonu uzaklaştırılmış ve canlı hücrelerin oluşturduğu formazan tuzların çözünmesi için plakalardaki kuyucuklara 100 µL DMSO ilave edilerek plakalar 10 dakika çalkalayıcıya bırakılmış, daha sonra ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Yukarıda belirtilen analizlerde, tüm deneyler üçer tekrarlı yapılmış ve deney sonuçları ortalama ± standart hata olarak verilerek ilgili grafikte topluca gösterilmiştir. Grafik çizimi Microsoft Excel programında yapılmıştır.

3. Bulgular

Deney sonuçları 24, 48 ve 72 saat aralıklarla kontrol edilerek hücre sayımları yapılmıştır. Elde edilen bulgular aşağıda sıra ile verilmiştir.

3.1. Bitki ekstralarının 24 saatlik süre sonunda kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

Yapılan deneylerde sonunda 24 saat sonunda 1, 5, 10 ve 15 µg/µL dozlarda canlı kanser hücrelerinde azalma gözlenmiş, 20 µg/µL dozda kontrol grubu ile aynı düzeyde bir gelişme izlenmiş, 25 ve 30 µg/µL dozlarda ise kontrol grubunda hücre sayısının daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 2). Bu sonuca göre 20 µg/µL doz etkili olmazken 1, 5, 10 ve 15 µg/µL dozlar kanser hücrelerinin gelişimini engellerken, 25 ve 30 µg/µL dozlar kanserli hücrelerin gelişimini üzerine etkili olmamıştır. Ancak burada ilginç olan 1 µg/µL’lik dozun 24 saat sonunda uygulanan diğer dozlara göre hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisi üzerine çok daha etkili olduğu gözlenmiştir.

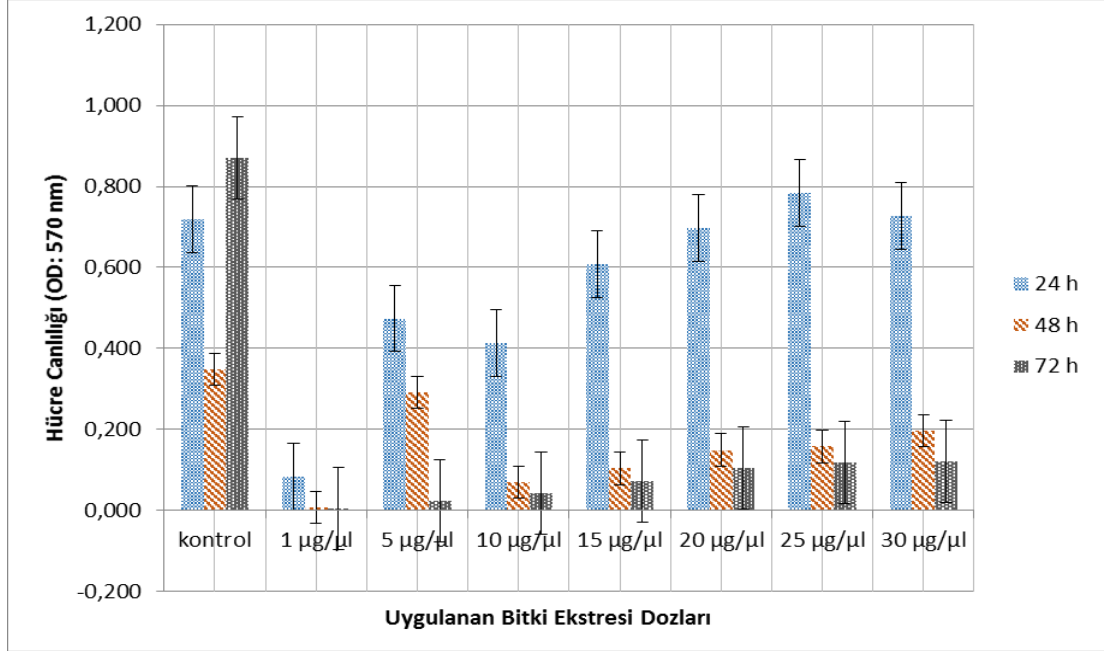
3.2. Bitki ekstralarının 48 saatlik süre sonunda kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

Deneylerin 48 saat sonucuna göre; uygulanan tüm dozlarda (1-30 µg/µL) kanser hücrelerinde belirgin şekilde bir ölüm gözlenmiştir (Şekil 3).

3.3. Bitki ekstralarının 72 saatlik süre sonunda kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

Deneylerin 72 saat sonucuna göre; uygulanan tüm dozların (1-30 µg/µL) kanser hücrelerinin gelişimini

engellediği ve kanserli hücrelerin önemli oranda ölümüne neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 2). Özellikle, 1 µg/µL'lik ve 10 µg/µL'lik dozların kanserli hücreler üzerinde daha etkili olduğu gözlenmiştir.



Şekil 2. Kaya kekiği (*Satureja cuneifolia*) bitkisinden elde edilen ekstraların HepG2 Karaciğer kanser hücrelerine in vitro sitotoksik hücre ölümü üzerine etkileri

4. Sonuçlar ve tartışma

Satureja sp. cinsinin türleri ile yapılmış bazı çalışmaların bulunmamaktadır (Grosso, et al., 2009; Sadeghi, et al., 2013). *Satureja cuneifolia* türünün fitokimyasal özellikleri (Tümen et al., 1998; Kan vd., 2006) ile antioksidan (Ćavar et al., 2008) ve antimikrobiyal etkileri (Skočibušić and Bezić, 2004; Aydın et al. 1996; Koşar et al. 2008) üzerine yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmasına karşın, insan karaciğer kanseri üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamıştır.

Kaya kekiğinden alınan örnekler üzerinde yapılan analizlere göre; Timol (42,5-45,2%), p-simen (19,4-24,3%) ve karvakrol (8,5-13,2%) ana bileşen olarak tespit edilmiştir (Koşar ve ark. 2008; Tümen et al., 1998; 2005). Kaya kakeğinde elde edilen ekstrelerin *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, bakterileri üzerinde 62.5 ve 250 mg/ml lik miktarların antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Koşar ve ark. 2008; Kan ve ark. 2006). Yapılan bir diğer çalışmada; Güney-Hırvatistanda bulunan dört *Satureja sp.* türünün uçucu yağ profillerinin nükleer ribozomal DNA yapıları karşılaştırılmış olup, filogenetik analiz sonucu *S. montana* ve *S. cuneifolia*, monoterpen hidrokarbon karvakrol açısından zengin benzer bir uçucu yağ kompozisyonuna sahip olduğu; *S. cuneifolia*'da bir uçucu yağ beta-cubebene (% 8.7), limonen (% 8.3), alfa-pinen (% 6.9), spathulenol ve beta-karyofilen olarak karakterize edildiği bulunmuştur (Bezić et al., 2009).

S. cuneifolia yağlarının antimikrobiyal etkisi sıvı mikrodistilasyon yöntemi ile birçok ilaca dirençli patojenlere karşı geniş spektrumlu bir aktiviteye sahip olduğu, bu yağların *Pseudomonas aeruginosa* hariç olmak üzere, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve maya (*Candida albicans*) karşı maksimum aktiviteye sahip olduğu, ayrıca *S. aureus* ve *E. coli* gibi tıbbi açıdan önemli patojenlerinin büyümesini inhibe ettiği ve *C. albicans* ile *S. cerevisiae* karşı mantar öldürücü aktivitesi olduğu da gözlenmiştir (Skocibusic M and Bezić N. 2004).

Bu araştırmada yapılan deneyler sonunda; etki süresinin 24 saat olarak uygulandığı ve 1-15 µg/µl dozların kullanıldığı deney serilerinde karaciğer kanser hücrelerinin gelişiminin engellendiği, 20-30 µg/µl dozlarda ise bir engellenmenin olmadığı gözlenmiştir. Buna göre 1 µg/µl'lik dozun 24 sat sonunda uygulanan diğer dozlara göre hücre ölümü üzerine çok daha etkili olduğu gözlenmiştir. Bu durum yapılacak ayrıntılı çalışmalarla açıklığa kavuşturulmalıdır.

Bitki ekstralarının etki süresinin 48 saat olarak uygulandığı deney serilerinde tüm dozların belirgin bir şekilde kanserli hücreler üzerinde öldürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Buna göre sürenin 48 saate uzaması ile birlikte bitki ekstresinin karaciğer hücreleri üzerindeki öldürücü etkisi belirgin bir şekilde ortaya çıkmıştır.

Bitki ekstralarının etki süresinin 72 saat olduğu deneylerde uygulanan tüm Kaya kekiği ekstresinin dozları kanser hücrelerinin gelişimini engelleyerek önemli oranda ölümüne neden olmuştur. Bu sonuca göre bitki ekstresi, sürenin 72 saate uzaması ile birlikte etkisini daha belirgin bir şekilde göstererek karaciğer hücrelerinin gelişimini engellemiş ve ölmelerini sağlamıştır.

Sonuç olarak; Kaya kekiği ekstreleri HepG2 tip insan karaciğer kanser hücrelerinin gelişimini engellediği ve öldürdüğü belirlenmiş olup, gelecekte kanser tedavisi için gerekli ilaçların tasarımında bu bitkinin kullanılabileceği belirlenmiştir.

Kaynaklar

- Aydın, S., Öztürk, Y., Beis, R., Hüsnü Can Başer, K. (1996). Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic activity. *Phytotherapy Research*, 10 (4), 342-344.
- Baytop, T. (1999). Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- Çavar, S., Maksimović, M., Šolić, M. E., Jerković-Mujkić, A., Bešta, R. (2008). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*, 111(3), 648-653.
- Grosso, C., Oliveira, A. C., Mainar, A. M., Urieta, J. S., Barroso, J. G., Palavra, A. M. F. (2009). Antioxidant activities of the supercritical and conventional *Satureja montana* extracts. *Journal of food science*, 74 (9).
- İsan, H., Tonbuş, A. (2016). Karaciğer Kanseri Hücrelerinin Sitoplazmik Özellikleri ile Kültür Süreci İlişkisi: Konfokal Mikroskopik Karşılaştırmalı Kantitatif Bir Çalışma, *Maltepe Tıp Dergisi* 8 (3), 18-23
- Kan, Y., Uçan, U.S., Kartal, M., Altun, M.L., Aslan, S., Sayar, E., Ceyhan, T. (2006). GC-MS Analysis and Antibacterial Activity of Cultivated *Satureja cuneifolia* Ten. Essential Oil, *Turk J Chem*, 30, 253 – 259.
- Kargioğlu, M., Cenki, S., Serteser, A., Evliyaoglu, N., Konuk, M., Kök, M. Ş., Bağcı, Y. (2008). An ethnobotanical survey of inner-west Anatolia, Turkey. *Human Ecology*, 36 (5), 763-777.
- Koşar, M., Demirci, B., Demirci, F. H., Başer, K. H. C. (2008). Effect of maturation on the composition and biological activity of the essential oil of a commercially important *Satureja* species from Turkey: *Satureja cuneifolia* Ten.(Lamiaceae). *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(6), 2260-2265.
- Kuş, G., (2017). Hepatosellüler karsinom hücrelerinde karmofurun sitotoksik ve apoptotik etkileri, *Kocatepe Tıp Dergisi Kocatepe Medical Journal* (18) 55-60.
- Mihajilov-Krstev, T., Radnovic, D., Kitic, D. (2010). Antimicrobial activity of *Satureja* L. essential oils against phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora*. *Biologica Nyssana*, 1, 95-8.
- Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., Altundag, S. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, 112(4), 874-879.
- Sadeghi, I., Yousefzadi, M., Behmanesh, M., Sharifi, M., Moradi, A. (2013). In vitro cytotoxic and antimicrobial activity of essential oil from *Satureja intermedia*. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15 (1), 70.
- Skočibušić, M., Bezić, N. (2004). Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytotherapy Research*, 18(12), 967-970.
- Skočibušić, M., Bezić, N., Dunkić, V. (2006). Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subs picata* Vis. growing in Croatia. *Food chemistry*, 96(1), 20-28.
- Tokur, O., Aksoy, A. (2017). In Vitro Sitotoksikite Testleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 6 (1) 112-118
- Tümen G., Kırimer N., Ermin N., Başer, KH. (1998). The essential oil of *Satureja cuneifolia*. *Planta Med.*, 64 (1). 81-3.
- Yücel, E. (2014). Türkiye’de Yetişen Tıbbi Bitkiler Tanıma Klavuzu”, *Türmatsan, Eskişehir*.

(Received for publication 23 February 2017; The date of publication 15 August 2018)



Morphological and anatomical studies on hayıt fruit (fructus agni-casti) and leafs sold in the market

Muhammed Mesud HÜRKÜL^{*1}, Ayşegül KÖROĞLU¹

¹ Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Ankara University, 06100 Tandoğan, Ankara, Turkey

Abstract

The *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) plant of which the fruits are registered at the European Pharmacopoeia (Fructus agni-casti), grows naturally especially where the Mediterranean climate prevails in the territory of our country (Turkey), and is known as "hayıt" in vernacular. Fruits are traditionally used in our country as well as in various parts of the world, especially in the treatment of menstrual disorders. Furthermore, the leaves of the plant are also consumed for the same purpose in our country. In this study, samples of *Vitex agnus-castus* to be sold under the name of "hayıt" on the market are purchased from various districts of Turkey, as well as the samples collected from nature are used as a standard. All of the samples to be sold in the market are the fruits of the plant, however leaves are also used among people. In this study, the morphological characteristics of the fruits and leaves of this plant have been determined firstly. Their anatomical features were determined by cross-sections and the microphotographs were taken. Powdered drug analysis of the fruit was also carried out and microphotographs of the characteristic structures were given. It has been determined that the samples sold under the name "hayıt" in different cities belong to *V. agnus-castus*. However, according to the findings from the study, it has been determined that these samples do not have appropriate characteristics in terms of public health. This is the very first study to determine the suitability of "hayıt" samples in the market where people have used as medicinal plants, to the European Pharmacopoeia.

Key words: *Vitex agnus-castus*, hayıt fruit, hayıt leaf, anatomy, morphology

----- * -----

Piyasada satılan hayıt meyve (fructus agni-casti) ve yaprakları üzerinde morfolojik ve anatomik çalışmalar

Özet

Avrupa Farmakopesi'nde meyveleri (Fructus agni-casti) kayıtlı olan *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) bitkisi, ülkemizde özellikle Akdeniz ikliminin hüküm sürdüğü bölgelerde doğal olarak yetişir ve "hayıt" adıyla tanınır. Meyveler, dünyanın çeşitli bölgelerinde olduğu gibi ülkemizde de özellikle kadın hastalıklarının tedavisinde halk arasında geleneksel olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde ayrıca bitkinin yaprakları da aynı amaçla tüketilmektedir. Bu çalışmada, piyasada "hayıt" adı altında satılan *Vitex agnus-castus* örnekleri çeşitli illerimizden satın alınmış, doğadan topladığımız örnekler ise standart olarak kullanılmıştır. Piyasada satılan örneklerin tamamı bitkinin meyveleridir, ancak halk arasında yaprakları da kullanılmaktadır. Bu çalışmada, öncelikle kullanılan bitki kısımları olan meyve ve yaprakların morfolojik özellikleri belirlenmiştir. Alınan enine kesitlerle meyve ve yaprakların anatomik özellikleri belirlenmiş ve mikrografları çekilmiştir. Meyvenin toz drog analizi de yapılmış ve karakteristik yapılarının mikrografları verilmiştir. Değişik illerimizde "hayıt meyvesi" adı altında satılan örneklerin *V. agnus-castus* bitkisine ait olduğu tespit edilmiştir. Fakat çalışmadan elde edilen bulgular doğrultusunda bu numunelerin halk sağlığı açısından uygun nitelikler taşımadığı belirlenmiştir. Türkiye'de halk arasında kullanıldığı bilinen ve daha çok halkın tıbbi bitki temin ettiği piyasada yer alan "hayıt" örneklerinin Avrupa Farmakopesi'ne uygunluğunu tespit etmek amacıyla yapılmış ilk çalışmadır.

Anahtar kelimeler: *Vitex agnus-castus*, hayıt meyvesi;, hayıt yaprağı; anatomi, morfoloji

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903122033111; Fax.: +903122033111; E-mail: huerkulmm@gmail.com

1. Giriş

Verbenaceae familyası, yeryüzünde yaklaşık 100 cins ve 3000 tür ile temsil edilen bir familyadır. Otsu, çalı ve ağaç formundaki bitkilerden oluşan ve bu familyanın üyesi olan *Vitex L.* cinsi, yaklaşık 250 taksona sahiptir (Evans, 2000). *Vitex agnus-castus L.* (Hayıt) çalı, nadiren küçük ağaç, 1-3 m uzunluğunda, çok dallanmış, gövdesi kısa, sık, yumuşak, kır renkli tüylerle kaplı bir bitkidir (Şekil 1) (Townsend, 1982). Hayıt bir Akdeniz bitkisi olup Anadolu'da çok yaygındır (Townsend, 1982; Baytop, 1999) ve cinsin ülkemizde yetişen tek üyesidir (Güner vd., 2012).



Şekil 1. *Vitex agnus-castus*, çiçek ve yaprak (Foto.: A. Köroğlu)

Avrupa Farmakopesi'nde kayıtlı olan bitki kısımları *Vitex agnus-castus* türünün olgun ve kuru meyveleridir. Drog Avrupa Farmakopesi'ne göre en az % 0,08 kastisin taşımalıdır (EP, 2011). Meyve küre biçiminde, 3 mm çapında, sert, özel kokulu ve hafif acımsı lezzetlidir (Baytop, 1999).

Drog uçucu yağ ve reçine taşır (Baytop, 1999). Uçucu yağ başlıca monoterpen ve seskiterpenlerden oluşur (Evans, 2000). Bitkinin kök kabuğundan flavonoid yapısında bileşikler izole edilmiştir (Hirobe vd., 1997). Bitkinin çiçekli gövdesinden hazırlanan metanol ekstresinden iridoitler ve fenilbutanon glikoziti (mizodendron) izole edilerek tanımlanmıştır (Kuruüzüm-Uz vd., 2003). Hayıt meyvesinden elde edilen ekstreler ile yapılan çalışmalarda diterpenoid, flavonoid, neolignan ve fenolik bileşikler ile gliserit (Chen vd., 2011; Hoberg vd., 1999) varlığı belirlenmiştir (Hoberg vd., 1999). Bitkinin ham meyvelerinden elde edilen uçucu yağda ana bileşik olarak sabinen (% 17,8) ve 1,8-sineol (% 17,5), olgun meyvede ise 1,8-sineol (% 16,3) ve sabinen (% 13,4) tespit edilmiştir. Ayrıca ham meyvede % 12,2, olgun meyvede % 9,4 ve yaprakta % 9,4 oranında α -pinen belirlenmiştir. Yapraktan elde edilen uçucu yağın ana bileşiğinin 1,8-sineol (% 22,0) olduğu tespit edilmiştir (Stojkovic vd., 2011).

Vitex agnus-castus Klasik Yunan ve Roma döneminden beri Avrupa'da premenstrüel sendromlar ve menopoz ile ilgili sorunlarda tedavide kullanılmış ve halen kullanılmaktadır (Evans, 2000). Brezilya'da yapılan bir etnobotanik çalışmada *V. agnus-castus* yapraklarının dini ritüellerde kullanıldığı belirtilmiştir (De Albuquerque vd., 2007). Yine aynı ülkede yapılan başka bir çalışmada ise bitkinin yapraklarının ateş, baş ağrısı, bacak ağrıları, sarı humma, öksürük ve boğaz rahatsızlıklarında, hiperkoagülabilite (trombofili) tedavisinde, inme, diş ağrısı ve böcek sokmasında geleneksel olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (Coelho-Ferreira, 2009). Ürdün'de yapılan bir etnobotanik çalışmaya göre de bitkinin yaprakları ve gövdesi dekoksion şeklinde göz rahatsızlıklarında geleneksel olarak kullanılmaktadır (Al-Qura'n, 2009). Hayıt meyvesi, ülkemizde de kadın hastalıklarının tedavisinde halk arasında bilinmekte ve kullanılmaktadır. Ayrıca bitkinin meyvelerinin infüzyonu (% 2-5) idrar arttırıcı, gaz söktürücü ve yatıştırıcı etkileri nedeniyle de tüketilmektedir (Baytop, 1999). Ülkemizin değişik bölgelerinden derlenmiş etnobotanik envanter verilerine göre, bitkinin meyve ve yapraklarının halkımız tarafından değerlendirildiği tespit edilmiştir. Türkiye'de Aydın, Kütahya, Afyon, Denizli, Muğla çevrelerinde halk geleneksel olarak mide rahatsızlıklarında bitkinin meyvelerini kullanır (Honda vd., 1996). Balıkesir'de halk bitkinin meyvelerini ishale karşı kullanılmaktadır (Polat ve Satıl, 2012). Muğla'nın Marmaris ilçesinde bitkinin yaprakları haricen romatizma, ağrı ve sıtma tedavisinde; dalları haricen, lapa şeklinde ishale; toprak üstü kısımları infüzyon şeklinde haricen akrep sokmalarında, kaşıntıda uygulanmaktadır; gövdesi dekoksion şeklinde öksürük ve bronşitte; tohumları dekoksion şeklinde böbrek taşı ve karın ağrısında; çiçekleri ve tohumları birlikte lapa şeklinde haricen karın ağrısında ve mide bulantısında geleneksel olarak kullanılır (Gürdal ve Kültür, 2013). Manisa ilinin Turgutlu ilçesinde bitkinin yapraklarının dekoksion şeklinde mide rahatsızlıklarında ve parçalanıp bir bez ile sarılarak haricen karın ağrısında; meyvelerinin ise infüzyon şeklinde bronşit, yutularak hemoroid tedavisinde, kireçlenme ve karın ağrısında ise parçalanıp bir bezle sarılarak haricen kullanıldığı belirtilmiştir (Bulut ve Tuzlacı, 2013).

Hayıt meyve ekstresinin sıçanların hipofiz bezi hücrelerinde prolaktin salgısını inhibe ettiği, kadınlarda kısırlığı tedavi ettiği, mastalji ve premenstrüel sendromlarda etkili olduğu belirtilmiştir (PDR, 2004). Bitkinin yaprak ve meyvelerinden elde edilen metanol ekstrelerinin, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH) ile radikal süpürme kapasitesi incelenmiştir. Her iki ekstrenin de belirgin derecede radikal süpürücü kapasiteye sahip olduğu görülmüştür (Gökbulut vd., 2010). Hayıt bitkisinin meyvelerinden ve meyvesiz herbasından elde edilen uçucu yağın sitotoksik ve

apoptotik etkisi C6, A549 ve MCF7 kanser hücre dizilerinde çalışılmıştır. Meyveden elde edilen uçucu yağın çalışılan tüm hücre dizilerinde yüksek sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Duymuş vd., 2014). Hayıt meyvesinden elde edilen metanol, *n*-hekzan, etanol ve su ekstraheleri ile antimikrobiyal ve sitotoksik etki çalışması yapılmıştır. Brine shrimp yöntemi ile yapılan sitotoksik etki çalışmasında *n*-hekzan ekstresi (LC50 < 1000) aktivite göstermiştir. *Escherichia coli* ATCC 29998, *E. coli* ATCC 11230, *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10239 mikroorganizmaları kullanılarak yapılan antimikrobiyal etki çalışmasında ise; tüm ekstraheler *E. coli*'nin her iki suşu ile *Salmonella typhimurium* ve *S. epidermidis*'in büyümesini inhibe etmiştir. Metanol ekstresi hariç diğer ekstraheler *S. aureus* ve *P. aeruginosa* mikroorganizmaların büyümesini inhibe etmiştir. Tüm ekstrahelerin *S. typhimurium* mikroorganizmasına karşı Cefotaxime'den daha aktif olduğu belirtilmiştir. *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu ile, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı hiçbir ekstrahenin aktif olmadığını belirtmiştir (Kıvıçak vd., 2002). Ames *Salmonella*/mikrozom testi ile yapılan antimutajenite çalışmasında, hayıt bitkisinin yapraklarından elde edilen uçucu yağ ve tohumlarından elde edilen etanol ekstresi kullanılmıştır. Çalışmada, uçucu yağın 0.125, 0.0125 ve 0.00125 mg/plaka konsantrasyonlarda; etanol ekstresinin ise 2.5, 0.25 ve 0.025 mg/plaka konsantrasyonlarda *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (Saraç vd., 2015).

Meyvesi dünyanın çeşitli bölgelerinde kadın hastalıkları tedavisinde geleneksel olarak kullanılan *V. agnus-castus*, aynı amaçla ülkemizde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Halk meyve teminini piyasadan satın alarak sağlamaktadır. Ayrıca bitkinin doğal olarak yetiştiği güney bölgelerimizde doğadan toplayarak da tüketmektedir. Bu çalışmada, meyveleri gibi yaprağı da geleneksel olarak kullanılan bitkinin piyasada satışa sunulurken halk sağlığı açısından tehdit oluşturacak unsurlarını belirlemek ve doğru droğun pazarlanıp pazarlanmadığını tespit etmek amacımız olmuştur. Bu amaç doğrultusunda, doğru droğun teşhis edilebilmesi için, meyve ve yaprağına ait morfolojik ve anatomik özellikler incelenip fotoğraflanmıştır.

2. Materyal ve yöntem

Materyal temini için Ankara (6), Gaziantep (5), İstanbul (1) ve Van (3) illerinden 2016 yılında 15 örnek satın alınmıştır (Tablo 1). Morfolojik ve anatomik özellikleri türe özgü olarak belirlemek için iki farklı coğrafyadan toplanan hayıt meyveleri ve yaprakları standart örnek olarak kullanılmıştır (AEF 26116, AEF 26908).

Bu çalışmada öncelikle doğadan topladığımız hayıt meyvelerinin ve yapraklarının morfolojik ve anatomik yapısı belirlenmiştir. Morfolojik olarak meyve ve yaprak örneklerinin genel görünüşü, rengi, şekli ve boyutu tespit edilmiştir. Hayıt meyve ve yapraklarının % 70 alkol ile hazırlanan örneklerinden el ile alınan enine kesitlerinden anatomik yapıları belirlenmiştir. Mikrograflar Leica CME ile çekilmiştir. Standart droğ (meyve ve yaprak) olarak kullandığımız örneklerin karakteristik elemanlarının belirlenmesi için toz edilen örneklerden Sartur reaktifi (Çelebioğlu ve Baytop, 1949) ile hazırlanan preparatlar mikroskopta (Leica CME) incelenmiş ve karakteristik elemanlarının fotoğrafları çekilmiştir (Leica DM 4000B). Ayrıca satın alınan örneklerin teşhisleri yapılmış, droğna ait olmayan maddeler belirlenmiş ve fotoğraflanmıştır (Panasonic DMC-FX33). Piyasadan satın alınan örneklerden hazırlanan toz droğların anatomik özellikleri belirlenmiş ve standart droğun anatomik özellikleri ile karşılaştırılmıştır.

Tablo 1. Çalışma sırasında materyal olarak kullanılan aktar örneklerinin satın alındığı yerler

Materyal	Aktar örneklerinin satın alındığı yer	Şekil no
A 1	Ankara	Şekil 6
A 2	Ankara	Şekil 7
A 3	Ankara	Şekil 8
A 4	Ankara	Şekil 9
A 5	Ankara	Şekil 10
A 6	Ankara	Şekil 11
A 7	Gaziantep	Şekil 12
A 8	Gaziantep	Şekil 13
A 9	Gaziantep	Şekil 14
A 10	Gaziantep	Şekil 15
A 11	Gaziantep	Şekil 16
A 12	İstanbul	Şekil 17
A 13	Van	Şekil 18
A 14	Van	Şekil 19
A 15	Van	Şekil 20
Standart	B1 Çanakkale: Behramkale, antik limana inerken yol kenarı, 10 m. 15.06.2009, A.Güvenç, AEF 26116 C3 Antalya: Kaş, yaklaşık 10-50 m. 14.08.2010 A. Güvenç, AEF 26908	

3. Bulgular

3.1. Droğun kullanılışı ile ilgili bulgular

Standart örneğin toplandığı Çanakkale ve ayrıca Antalya (Kaş)'da bitkinin meyvelerinin ve aynı zamanda yapraklarının (meyveler olgunlaşmadan önceki dönemlerde) çay (infüzyon) şeklinde hazırlanıp özellikle adet ağrılarında ve menopoz dönemi sorunlarında kullanıldığı yöre halkıyla yapılan görüşmelerde tespit edilmiştir. Piyasadan örnekler satın alınırken ne amaçla önerildiği ve ne şekilde kullanıldığı sorularına, droğun infüzyon şeklinde, kadın hastalıkları tedavisinde, idrar yolları rahatsızlıklarında ve yara iyi edici olarak tavsiye edildiği bilgisi elde edilmiştir.

3.2. Morfolojik bulgular

Bu çalışmada piyasadan satın alınan bütün örnekler bitkinin meyveleridir. Yaprak örnekleri drog halinde satılmamaktadır. İncelenen piyasa örneklerinin morfolojik özellikleri Tablo 2'de verilmiştir.

Doğadan topladığımız ve standart olarak kullandığımız hayıt yaprağı 5(-7) foliole ayrılmış palmat parçalı bileşik yapraklıdır. Yaprığın üst yüzeyi koyu yeşil renkte (Şekil 4), alt yüzeyi ise beyaz-tomentozdur (Şekil 5). Meyve oval-küremsi, 4 gözlü, siyah-kahverengi, stilusu genellikle kalıcı, her gözde 1 tohum taşıyan drupadır; 2-3 mm kadar çapa sahiptir. Olgunlukta kaliks taşır, kaliks meyvenin 2/3'lik kısmını örter. Kaliks yeşilimsi gri renkte ve tüylüdür. Meyve 1-3 mm uzunluğunda kısa bir sap taşır (Şekil 3). Piyasa örnekleri incelendiği zaman droğa katıştırma yapılmadığı belirlenmiştir.



Şekil 2. *Vitex agnus-castus*, meyve durumu. (Foto.: A.Köroğlu)



Şekil 3. Hayıt meyvesi: 1. Meyve, 2. Kaliks



Şekil 4. Hayıt yaprağı üst yüzeyi











Şekil 5. Hayıt yaprağı alt yüzeyi

3.3. Organoleptik bulgular

Organoleptik incelemede meyveden elde edilen toz drogların heterojen, gri-açık kahverengi renkli, kendine özgü aromatik koku ve tada sahip olduğu belirlenmiştir.

<p>Şekil 6. Hayıt meyvesi örnekleri (A1) ve yabancı madde içerikleri.</p>	<p>Şekil 7. Hayıt meyvesi örnekleri (A2) ve yabancı madde içerikleri.</p>
<p>Şekil 8. Hayıt meyvesi örnekleri (A3) ve yabancı madde içerikleri.</p>	<p>Şekil 9. Hayıt meyvesi örnekleri (A4) ve yabancı madde içerikleri.</p>
<p>Şekil 10. Hayıt meyvesi örnekleri (A5) ve yabancı madde içerikleri.</p>	<p>Şekil 11. Hayıt meyvesi örnekleri (A6) ve yabancı madde içerikleri.</p>

	
Şekil 12. Hayıt meyvesi örnekleri (A7) ve yabancı madde içerikleri.	Şekil 13. Hayıt meyvesi örnekleri (A8) ve yabancı madde içerikleri.
	
Şekil 14. Hayıt meyvesi örnekleri (A9) ve yabancı madde içerikleri.	Şekil 15. Hayıt meyvesi örnekleri (A10) ve yabancı madde içerikleri.
	
Şekil 16. Hayıt meyvesi örnekleri (A11) ve yabancı madde içerikleri.	Şekil 17. Hayıt meyvesi örnekleri (A12) ve yabancı madde içerikleri.
	
Şekil 18. Hayıt meyvesi örnekleri (A13) ve yabancı madde içerikleri.	Şekil 19. Hayıt meyvesi örnekleri (A14) ve yabancı madde içerikleri.



Şekil 20. Hayıt meyvesi örnekleri (A15) ve yabancı madde içerikleri.

Tablo 2. Satın alınan “Hayıt” örneklerinin morfolojik özellikleri

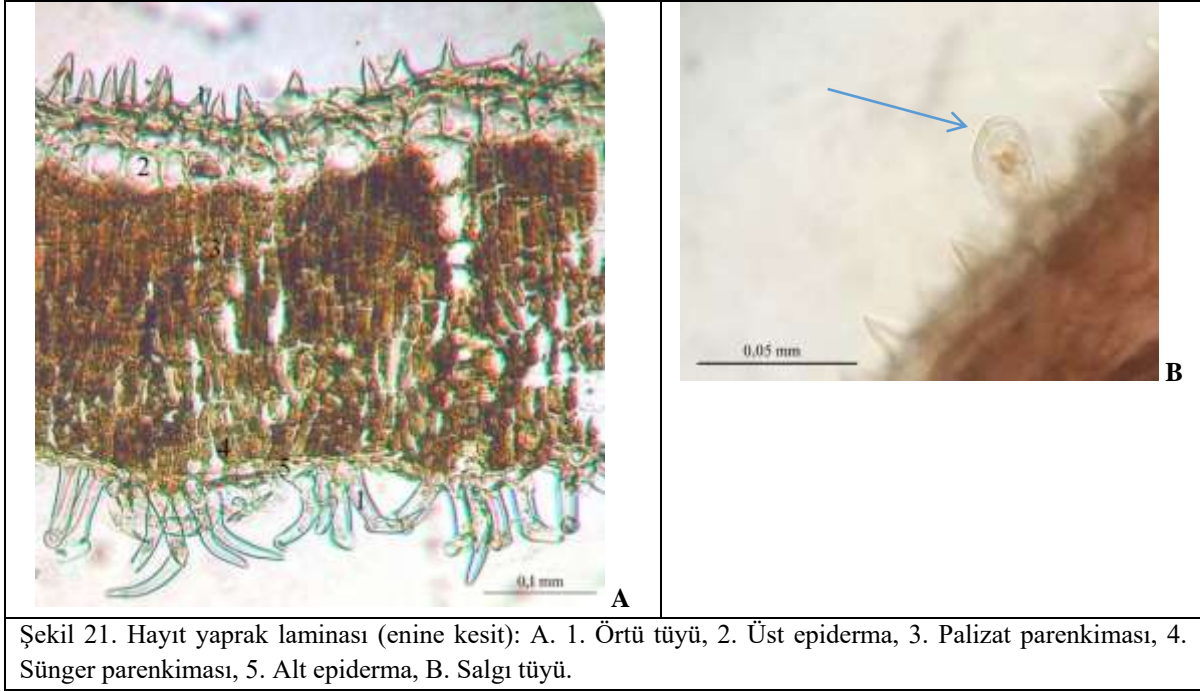
Numune	Satış şekli	Genel görünüş	Renk	Meyve Boyutu (mm) (Sap/Çap)	Droğa ait olmayan maddelerin varlığı
A 1	Paketli	Tozlu meyveler	Gri-Açık Kahverengi	1-3 / 2-3	Bitkiye ait dal ve yaprak parçaları
A 2	Paketli	Tozlu meyveler	Gri-Açık Kahverengi	1-3 / 2-3	Bitkiye ait dal ve yaprak parçaları
A 3	Paketli	Tozlu meyveler	Gri-Açık Kahverengi	1-3 / 2-3	Bitkiye ait dal ve yaprak parçaları
A 4	Paketli	Çok tozlu meyveler	Gri-Açık Kahverengi	1-3 / 2-3	Bitkiye ve başka bitkiye ait dal ve yaprak parçaları
A 5	Paketli	Çok tozlu meyveler	Gri-Açık Kahverengi	1-3 / 2-3	Bitkiye ve başka bitkiye ait dal ve yaprak parçaları
A 6	Paketli	Çok tozlu meyveler	Gri-Açık Kahverengi	1-3 / 2-3	Bitkiye ait dal ve yaprak parçaları
A 7	Açıkta	Çok tozlu meyveler	Gri-Siyah	1-3 / 2-3	Bitkiye ait dal ve yaprak parçaları, taş parçası
A 8	Açıkta	Çok tozlu meyveler	Gri-Siyah	1-3 / 2-3	Bitkiye ait dal ve yaprak parçaları, başka bitkilere ait parçalar, böcek kalıntıları ve taş parçaları
A 9	Açıkta	Çok tozlu meyveler	Gri-Siyah	1-3 / 2-3	Bitkiye ait dal ve yaprak parçaları, başka bitkilere ait parçalar
A 10	Açıkta	Çok tozlu meyveler	Gri-Siyah	1-3 / 2-3	Bitkiye ait dal ve yaprak parçaları, taş parçaları
A 11	Açıkta	Tozlu meyveler	Gri-Siyah	1-3 / 2-3	Bitkiye ait dal ve yaprak parçaları, başka bitkilere ait parçalar, taş parçaları, böcek kalıntısı
A 12	Açıkta	Tozlu meyveler	Gri-Siyah	1-3 / 2-3	Bitkiye ait dal ve yaprak parçaları
A 13	Açıkta	Çok tozlu meyveler	Gri-Siyah	1-3 / 2-3	Bitkiye ait dal ve yaprak parçaları, başka bitkilere ait parçalar
A 14	Açıkta	Tozlu meyveler	Gri-Siyah	1-3 / 2-3	Bitkiye ait dal ve yaprak parçaları, başka bitkilere ait parçalar
A 15	Açıkta	Tozlu meyveler	Gri-Siyah	1-3 / 2-3	Bitkiye ait dal ve yaprak parçaları, taş parçaları

3.4. Anatmik bulgular

3.4.1. Yaprak ayası enine kesiti

Yaprak bifasiyaldir. Üst epiderma tek sıralı, kare şeklindeki hücrelerden meydana gelmiştir. Üst epiderma çoğunlukla 1 nadiren 2 hücreli basit ve alt epidermada yer alanlara göre daha kısa olan sık yerleşmiş örtü tüyleri ile kaplıdır. Üst epidermanın altında yer alan palizat parenkiması 5-7 sıralı, ince, uzun, silindirik hücrelerden oluşur. Palizatın altında hemen hemen hiç hücreler arası boşluk buldurmeyen, düzensiz dizilişli, sünger parenkiması yer alır. Sünger parenkimasının altında üst epidermaya göre çok küçük olan, kare şeklinde, tek sıra halinde dizilmiş alt epiderma bulunur. Alt epidermada üst epidermaya oranla çok daha yoğun olan, 1 ya da 2 hücreli, basit ve daha uzun olan örtü

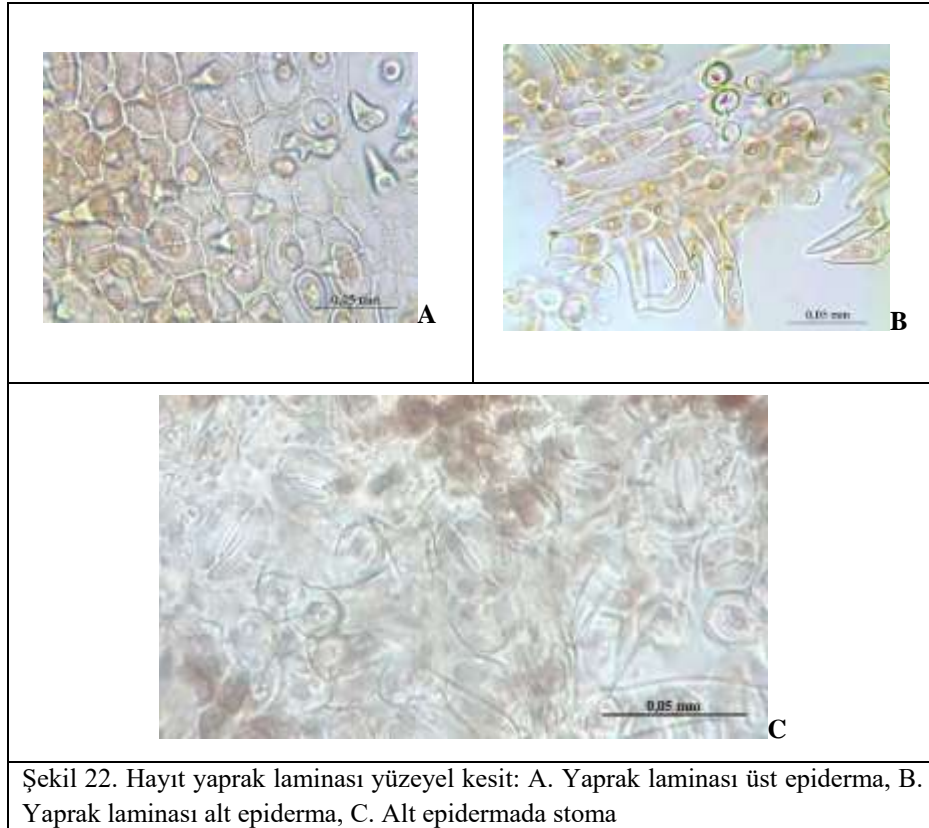
tüyleri görülmektedir. Hem üst hem de alt epidermada salgı tüyleri örtü tüyleri arasında yerleşmiştir. Salgı tüylerinin başı tek hücreli, sapı kısa 1 hücrelidir.



Şekil 21. Hayit yaprak laminası (enine kesit): A. 1. Örtü tüyü, 2. Üst epiderma, 3. Palizat parenkiması, 4. Sünger parenkiması, 5. Alt epiderma, B. Salgı tüyü.

3.4.2. Yaprak yüzeyel kesiti

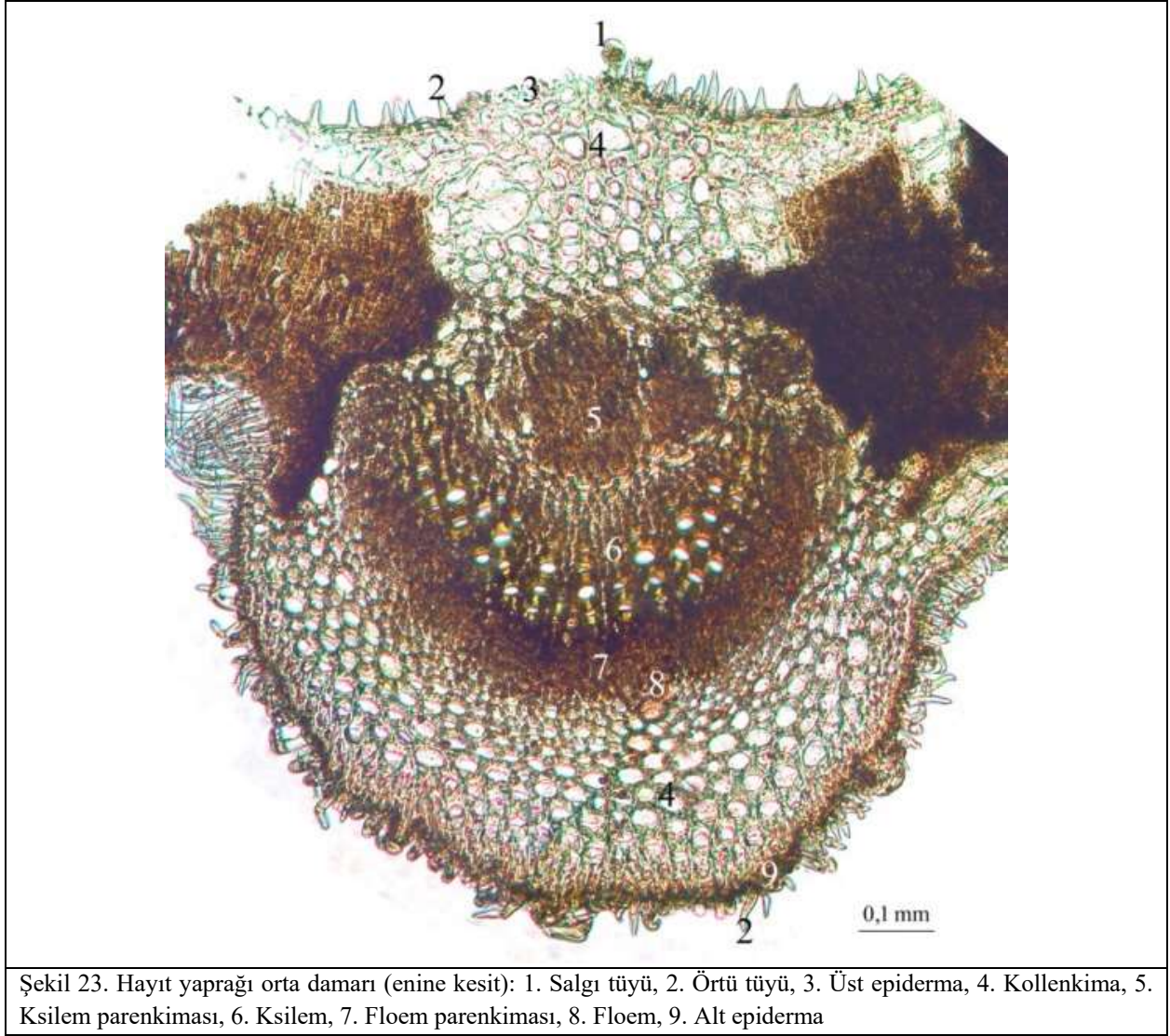
Üst epiderma hücreleri genellikle düzensiz şekilli ve çok köşeli, genellikle 1 bazen 2 hücreli basit, alt epidermadakilere göre daha kısa örtü tüyleri ile kaplıdır. Nadiren başı tek, sapı kısa ve 1 hücreli salgı tüyleri de görülür (Şekil 22-A). Alt epiderma hücreleri üst epiderma hücrelerine göre daha ince ve uzun yapılı, mekik ya da üçgen şekilli hücrelerdir. Alt epidermada anomositik tip stomaya rastlanmıştır. Çok yoğun bir şekilde 1-2 hücreli basit örtü tüyleri taşımaktadır (Şekil 22-B). Yer yer salgı tüyleri de görülür.



Şekil 22. Hayit yaprak laminası yüzeyel kesit: A. Yaprak laminası üst epiderma, B. Yaprak laminası alt epiderma, C. Alt epidermada stoma

3.4.3. Yaprak orta damar enine kesiti

Yaprak orta damarından alınan enine kesitte, tek sıralı, ince çeperli, kare ya da dikdörtgen şekilli hücrelerden meydana gelmiş üst epiderma görülür. Üst epiderma çoğunlukla 1 hücreli, basit ve sık dizilişli örtü tüylerini barındırır. Nadiren 2 hücreli örtü tüyleri de bulunur. Üst epidermanın hemen altında 3-10 sıralı, kalın çeperli ve köşeli hücrelerden meydana gelen kollenkima yer alır. Orta damar bu bölgede hafifçe dışarı doğru çıkıntı yapmıştır. Ksilem 2-12 sıralı olup, ksilem parenkiması hücreleri ile kuşatılmıştır. Floem küçük, düzensiz dizilişli, 3-8 sıralı hücrelerden meydana gelmiştir. Floem parenkiması ile kuşatılan floemin altında 2-9 sıralı kollenkima dışa doğru çıkıntı yapmıştır. Alt epiderma hücreleri tek sıralı ve üst epiderma hücreleri büyüklüğünde olup 1 ya da 2 hücreli çok sık dizilişli örtü tüyleriyle kaplanmıştır. Hem üst hem de alt epidermada başı tek, sapı kısa ve 1 hücreli salgı tüyleri yer almaktadır (Şekil 23).

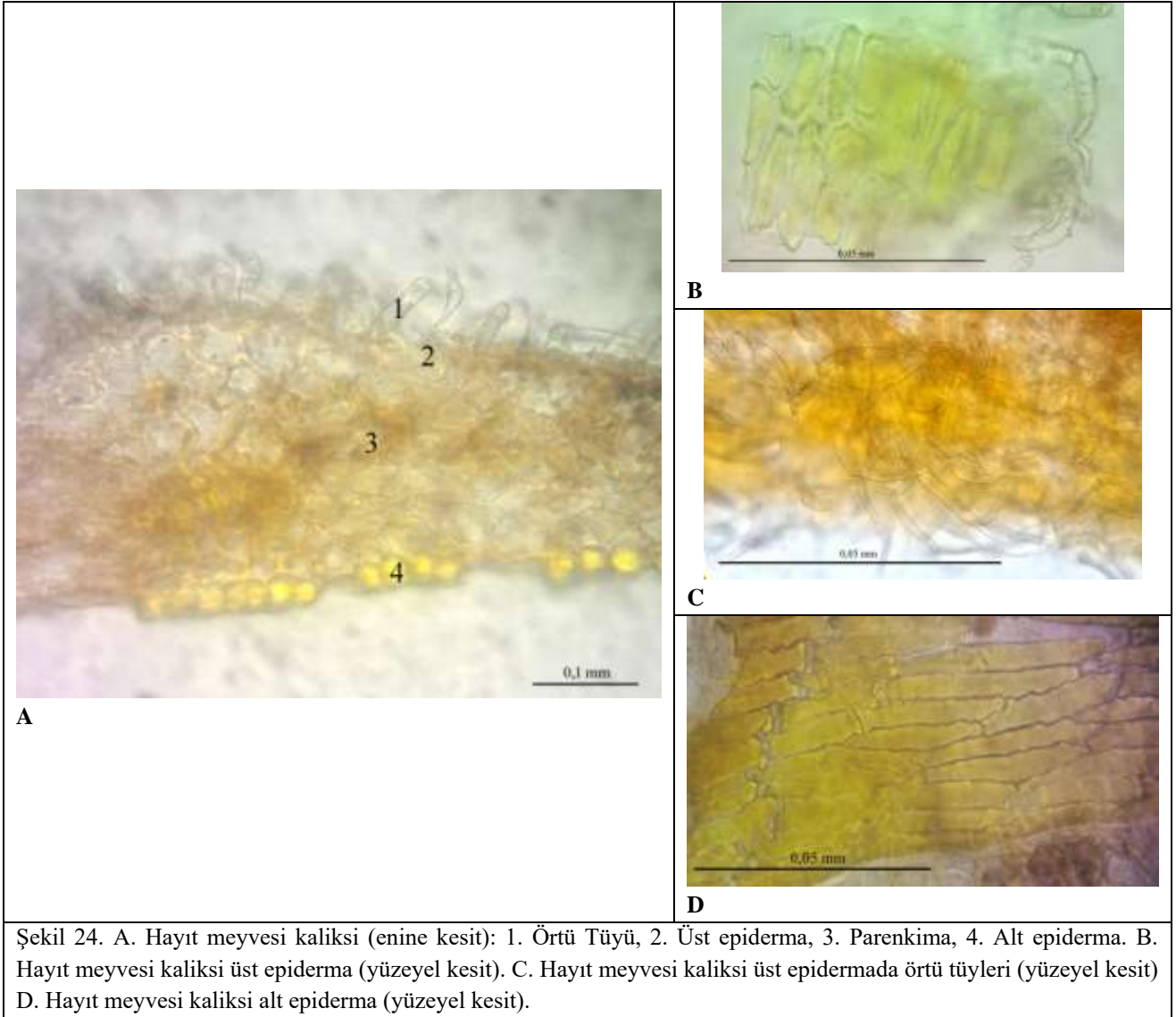


Şekil 23. Hayıt yaprağı orta damarı (enine kesit): 1. Salgı tüyü, 2. Örtü tüyü, 3. Üst epiderma, 4. Kollenkima, 5. Ksilem parenkiması, 6. Ksilem, 7. Floem parenkiması, 8. Floem, 9. Alt epiderma

3.4.4. Meyvenin enine kesiti

Hayıt meyvelerinde kaliks kısmı meyve üzerinde kalıcıdır. Bu nedenle kaliks ve meyveden ayrı ayrı enine kesit alınıp incelenmiştir.

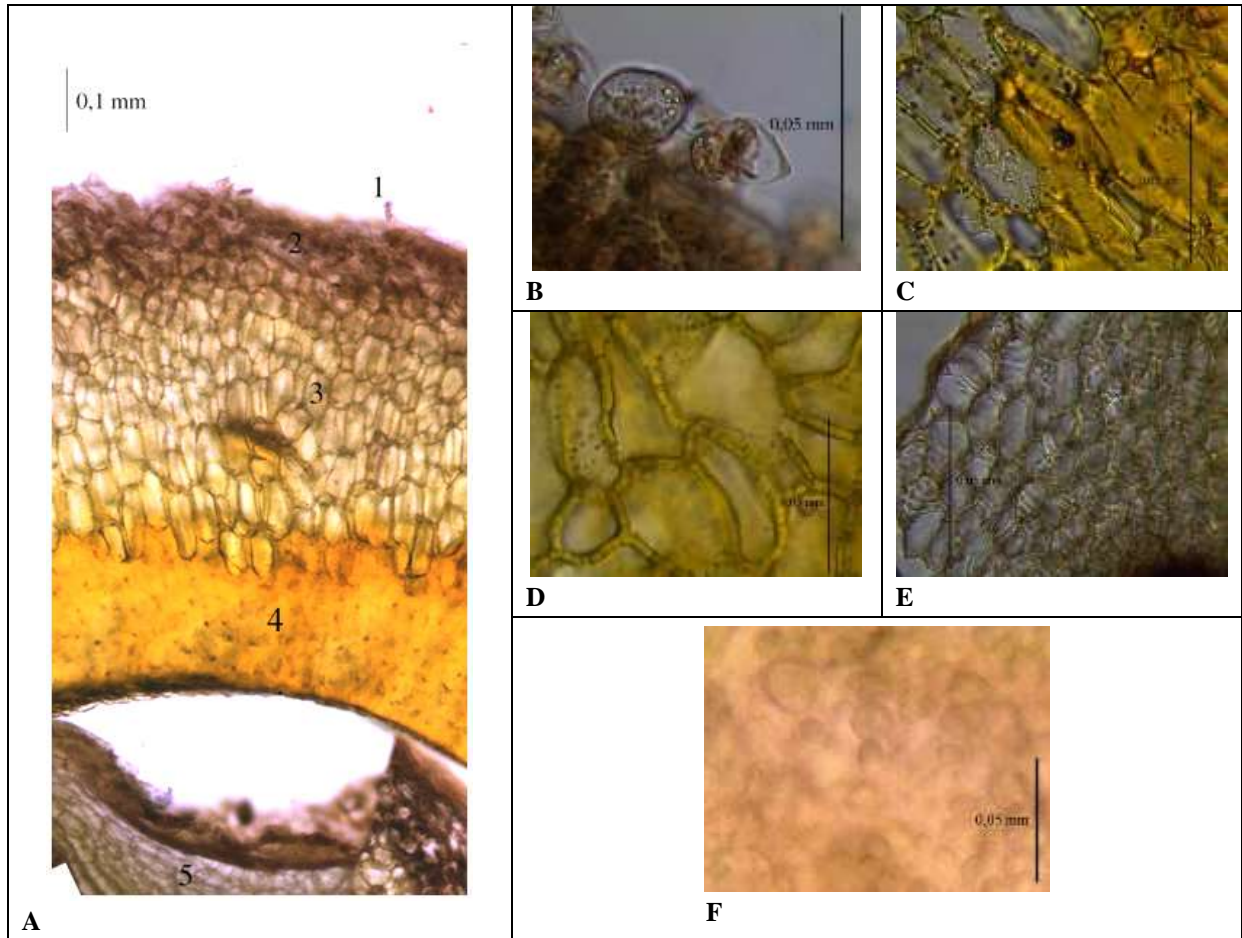
Kaliks enine kesitinde, üst epiderma tek sıralı, dikdörtgen şekilli, küçük hücrelerden oluşur. Üst epiderma yoğun olarak 1 ya da 2 hücreli, basit örtü tüyleri ile kaplıdır. Epidermanın altında hücreler arası boşluğu olmayan, oval şekilli, kalın çeperli parenkima hücreleri yer alır. Alt epiderma hücreleri tek sıralı, oval ve dışa doğru çıkıntı yapmış, ligninleşme gösteren hücrelerden oluşur (Şekil 24).



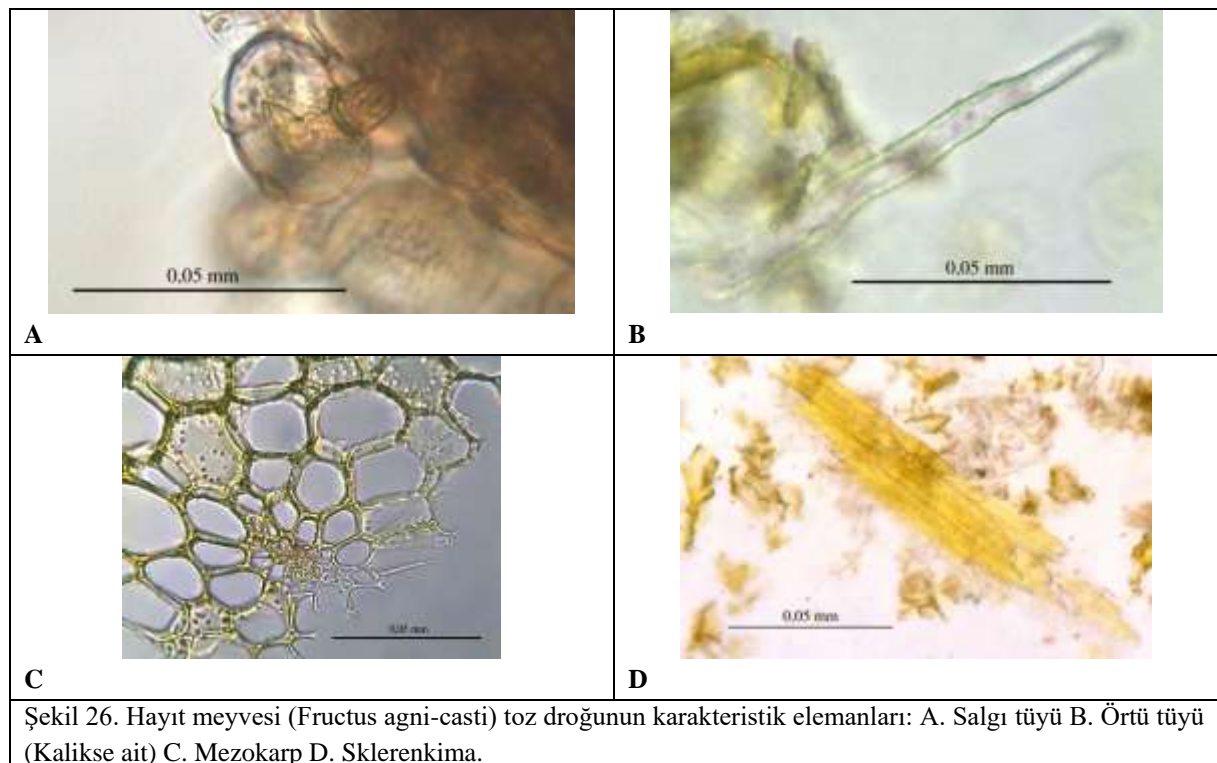
Meyve enine kesitinde, dış yüzeyde tek hücreli sap, tek ya da çok hücreli baş kısmı olan salgı tüyleri oldukça yoğun yer alır. Mezokarp hücrelerinin bazıları kahverenkli pigment taşır. Mezokarpın alt kısmındaki hücreler ince çeperli, çukurlu, sklerenkimatik hücrelerden ve çok kalın çeperli izodiyametrik sklerenkima hücrelerinden oluşur. Endokarp küçük, kahverenkli hücrelerden oluşmuştur. Testa elemanları ince, ligninleşmiş çeperli, geniş lümenli hücrelerdir ve ağsı kalınlaşma görülür. Endosperma yoğun şekilde alevron ve yağ damlacıkları içerir (Şekil 25. A.-F.).

3.4.5. Toz drog incelemesi

Satın alınan 10 örnek ve standart olarak kullanılan hayıt meyvesinden elde edilen toz drogların, Sartur reaktifi ile hazırlanan preparatları, ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Standart olarak kullanılan toz droğun karakteristik elemanlarının özellikleri tanımlanarak, mikrografları çekilmiştir (Şekil 26). Elde edilen bulgular satın alınan hayıt meyvesi örneklerinin karakteristik özellikleri ile karşılaştırılmıştır. İnceleme sonucunda bu örneklerin anatomik açıdan da standart olarak kullanılan meyve örneklerine uygun olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 25. A. Hayıt meyvesi (Fructus agni-casti) enine kesiti: 1. Salgı tüyü 2. Ekzokarp 3. Mezokarp 4. Endokarp 5. Endosperm B. Salgı tüyü C.-D. Mezokarpta sklerenkimatik hücreler E. Ağsı kalınlaşmış hücreler F. Endosperma.



Şekil 26. Hayıt meyvesi (Fructus agni-casti) toz droğunun karakteristik elemanları: A. Salgı tüyü B. Örtü tüyü (Kalikse ait) C. Mezokarp D. Sklerenkima.

4. Sonuçlar ve tartışma

Bu çalışmada Klasik Yunan ve Roma dönemlerinden beri Avrupa’da kullanılan, Anadolu’da da yaygın olan ve “Hayıt meyvesi” olarak adlandırılan, Avrupa Farmakopesi 2011’de kayıtlı *Vitex agnus-castus* bitkisinin meyveleri (Fructus agni-casti) ve halk arasında meyve olgunlaşmadan önceki dönemde aynı amaçla kullanıldığı bilgisine ulaştığımız yaprakları incelenmiştir. Ülkemizde kadın hastalıklarının tedavisinde kullanılan bu drog, halkımız tarafından piyasadan temin edilmektedir. Hayıt meyvesinin ve yaprağının halk arasında kullanımı, morfolojik ve anatomik özelliklerinin tespit edilmesi çalışmamızın amacını oluşturmaktadır.

Avrupa Farmakopesi’nde tıbbi olarak kullanılacak bitki kısmı meyvelerdir (EP, 2011). Ülkemiz piyasasında da satılan kısımlar bitkinin meyveleridir. Ayrıca halk arasında yapraklar da aynı amaçla kullanılmaktadır. Buna rağmen yaptığımız çalışma sırasında piyasada yaprak örneklerinin drog olarak satılmadığını gözlemledik. Hayıt meyvesi adı altında satılan drogların bir kısmının paketlenmiş olarak diğer bir kısmının ise açıkta satıldığı tespit edildi (Tablo 2). Satın alma sırasında satıcılardan edinilen bilgilere göre drog infüzyon şeklinde kadın hastalıklarında ve idrar yolları rahatsızlıklarında önerilmektedir. Bitkinin kadın hastalıklarında ve idrar yolları rahatsızlıklarında kullanılmak üzere satılması bilgisi kaynak verileri ile uyumludur (Baytop, 1999; Evans, 2000; PDR, 2004). Ancak yara iyileştirici etkisini destekleyecek geleneksel kullanım bulgusu ve biyolojik etki çalışmasına rastlanmamıştır. Bu bilginin bilimsel olarak teyit edilmesi gerekmektedir. Standart olarak kullandığımız ve doğadan topladığımız hayıt meyveleri ile yapılan morfolojik ve anatomik çalışmalardan elde edilen bulgular Avrupa Farmakopesi 2011 ile uyumludur (EP, 2011). Daha önce yapılmış anatomik çalışmalara baktığımızda bulgularımızın, Metcalfe ve Chalk (1957)’in yapmış olduğu çalışma verileri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Doğan ve arkadaşları (2008)’nin yapmış olduğu çalışma bulgularından farklı olarak, çalışmamızda yaprak alt ve üst yüzeyinde başı tek, sapı kısa ve 1 hücreli salgı tüyleri tespit edilmiştir (Şekil 21 ve Şekil 23). Ayrıca prizmatik kristal yaprak ve meyve örneklerinin anatomik incelemesinde görülmemiştir.

Piyasadaki numunelerin genellikle açıkta paketlenmemiş halde satıldığı görülmüştür (Tablo 2; Şekil 27). Ayrıca numunelerin çok tozlu olduğu belirlenmiştir. Bu durum satışa sunulan drogların kontrollerinin gereği gibi yapılmadığını göstermektedir. Çalışma sırasında morfolojik olarak incelenen örneklerde katıştırmanın olmadığı tespit edilmiştir. Fakat A4 (Şekil 9), A5 (Şekil 10), A8 (Şekil 13), A9 (Şekil 14), A11 (Şekil 16), A13 (Şekil 18), A14 (Şekil 19) numunelerinde başka bitkilere ait dal ve yaprak parçaları belirlenmiştir. A7 (Şekil 12), A8 (Şekil 13), A10 (Şekil 15), A11 (Şekil 16) ve A15 (Şekil 20) numunelerinde taş parçaları, A8 (Şekil 13) ve A11 (Şekil 16) numunelerinde ise böcek kalıntıları tespit edilmiştir (Tablo 2).



Şekil 27. Paketlenmeden satılan Hayıt meyvesi.

Tıbbi bitkiler doğadan toplanarak elde edildiği gibi kültürü yapılan bitkilerden de elde edilirler. Tedavi edici amaçla kullanılacak olan tıbbi bitki kısımları, elde edilmelerinden halka ulaştırılana kadar geçecek süreci “iyi ziraat uygulamaları” ve “iyi imalat uygulamaları” ilkelerine göre tamamlamalıdır. Bu süreçler droğun kalitesi, emniyeti ve etkinliğinin sağlanması için önemlidir. Tekrarlanabilir fizyolojik cevap sağlayabilecek şekilde standardizasyon tıbbi bitkiler için de kaçınılmazdır. Tıbbi bitkiler için standardizasyon doğru bitki ve doğru bitki kısmı ile başlayan bir süreçtir (Evans, 2000; Kuruüzüm Uz, 2009; Güvenç, 2011; Kılıçarslan, 2014; Köroğlu, 2015). Ayrıca bir droğun kalitesi görünüş, etken madde içeriği, koku ve tat özelliklerine bağlıdır. Bu özelliklerin korunması da doğru toplama, kurutma ve depolamaya dayanır. Droglar öncelikle toz geçirmeyen, havadar, kuru yerde tutulmalıdır. Nemden dolayı droglar risk altındadır. Nem drogda küf mantarlarının gelişimini kolaylaştırır. Droglarda böceklenme de büyük bir tehdit oluşturur. Genellikle böcekler toplanma yerinde bulaştığı gibi saklama sırasında da bulaşmaya yol açabilir. Böceklerden arındırılmadığı takdirde drog larva ya da böceklerin droğu yemesi nedeniyle kullanılamaz hale gelir, ayrıca böcek kontaminasyonu droglar için sağlık açısından istenen bir özellik değildir (Diener, 1965; Haensel ve Sticher, 2009; Köroğlu, 2015).

Bütün bu bilimsel veriler ışığında piyasadan satın aldığımız örnekler üzerinde standardizasyona yönelik yaptığımız morfolojik ve anatomik çalışmalarda elde ettiğimiz tespitler, “Hayıt meyvesi” adıyla satılan drogların *Vitex*

agnus-castus bitkisinden elde edildiğini göstermiştir. Bitkinin yoğun tüylü olması nedeniyle meyvelerin çok tozlu olduğu tespit edilmiştir. Örneklerin bir kısmında başka bitkilere ait kısımların, böcek ve inorganik bulaşmaların varlığı piyasa örneklerinin bilimsel drog tanımına uymadığını ve halk sağlığı açısından da uygun nitelikler taşımadığını göstermiştir.

Kaynaklar

- Al-Qura'n, S. (2009). Ethnopharmacological survey of wild medicinal plants in Showbak. Jordan. Journal of Ethnopharmacology, 123, 45-50.
- Baytop, T. (1999). Türkiye'de bitkilerle tedavi, geçmişte ve bugün. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Bulut, G., Tuzlacı, E. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants in Turgutlu (Manisa-Turkey). Journal of Ethnopharmacology, 149, 633-47.
- Chen, S.-N., Friesen, J.B., Webster, D., Nikolic, D., Van Breemen, R.B., Wang, Z.J., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Pauli, G.F. (2011). Phytoconstituents from *Vitex agnus-castus* fruits. Fitoterapia, 82, 528-533.
- Coelho-Ferreira, M. (2009). Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). Journal of Ethnopharmacology, 126, 159-75.
- Çelebioğlu, S., Baytop, T. (1949). A new reagent for microscopical investigation of plant. Publication of the Institute of Pharmacognosy. 10 (19), 301.
- De Albuquerque, U.P., Monteiro, J.M., Ramos, M.A., De Amorim, E.L.C. (2007). Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. Journal of Ethnopharmacology, 110, 76-91.
- Diener, H. (1965). Drogenkunde. Leipzig : VEB Fachbuchverlag.
- Doğan, Y., Ay, G., Kozuharova, E. (2008). A study on the anatomical characteristics of *Vitex agnus-castus* (Verbenaceae). Phytologia Balcanica, 14 (1), 97-101.
- Duymuş, H.G., Akalın Çiftçi, G., Ulusoylar Yıldırım, Ş., Demirci, B., Kırmırcı, N. (2014). The cytotoxic activity of *Vitex agnus castus* L. essential oils and their biochemical mechanisms. Industrial Crops and Products, 55, 33-42.
- EP (2011). European Pharmacopoeia, 7th Edition, Vol. 1., Council of Europe. Strasbourg.
- Evans, W.C. (2000). Trease and Evans pharmacognosy. Fifteenth Edition. Edinburgh: Saunders.
- Gökbulut, A., Özhan, O., Karacaoğlu, M., Şarer, E. (2010). Radical scavenging activity and vitexin content of *Vitex agnus-castus* leaves and fruits. FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, 35, 85-91.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M.T., (edlr.), (2012). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul.
- Gürdal, B., Kültür, Ş. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey). Journal of Ethnopharmacology, 146, 113-26.
- Güvenç, A. (2010). Türkiye'de Kültürü Yapılan Tıbbi Bitkilerin Bitkisel Drog Olarak Değerlendirilmesi. 19. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (Bihat 2010), Mersin 27-30 Ekim 2010, Bildiri kitabı, Mersin Üniversitesi Yayınları No: 28, Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 1.
- Haensel, R., Sticher, O. (2009). Pharmakognosie-Phytopharmazie. 9. Auflage. Heidelberg: Springer.
- Hirobe, C., Qiao, Z.-S., Takeya, K., Itokawa, H. (1997). Cytotoxic flavonoids from *Vitex agnus-castus*. Phytochemistry, 46 (3), 521-24.
- Hoberg, E., Orjala, J., Meier, B., Sticher, O. (1999). Diterpenoids from the fruits of *Vitex agnus-castus*. Phytochemistry, 52, 1555-58.
- Honda, G., Yeşilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaiishi, Y., Tanaka, T. (1996). Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces. Journal of Ethnopharmacology, 53, 75-87.
- Kılıçarslan, M. (2014). Bitkisel tıbbi ürünler ve iyi imalat uygulamaları (GMP). Hayat Sağlık ve Sosyal Bilimler Dergisi, 12, 64-73.
- Kıvçak, B., Mert, T., Öztürk, H.T. (2002). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Vitex agnus-castus* L. Journal of faculty of pharmacy of gazi university, 19 (1), 55-59.
- Koroğlu, A. (2015). Tıbbi bitkilerin yeri: Eczane. Hayat ve sağlık, 14, 56-61.
- Kuruüzüm Uz, A. (2009). Bitkisel farmasötik ürünlerde GACP (iyi tarım ve toplama uygulamaları) ve GMP (iyi üretim uygulamaları). Modern fitofarmakoterapi ve doğal farmasötikler, 1, 54-58.
- Kuruüzüm Uz, A., Ströck, K., Demirezer, Ö., Zeeck, A. (2003). Glucosides from *Vitex agnus-castus*. Phytochemistry, 63, 959-64.
- Metcalf, C.R., Chalk, L. (1957). Anatomy of the Dicotyledons. Vol. 2. Oxford: Clarendon Press.
- PDR (2004). PDR for Herbal Medicines. 3th Ed. Montvale, NJ: Medical Economics Company.
- Polat, R., Satıl, F. (2012). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir – Turkey). Journal of Ethnopharmacology, 139, 626 – 641.
- Sarac, N., Uygur, A., Sen, B. (2015). In vitro antimutagenic activity of *Vitex agnus-castus* L. essential oils and ethanolic extracts. Industrial Crops and Products, 63, 100-103.
- Stojkovic, D., Sokovic, M., Glamoclija, J., Dzamic, A., Ciric, A., Ristic, M., Grubisic, D. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. Food Chemistry, 128, 1017-22.
- Townsend, C.C. (1982). "*Vitex* L." In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 7, P.H. Davis (Ed.). Edinburgh: Edinburgh University Press.

(Received for publication 13 February 2018; The date of publication 15 August 2018)



Seed mucilage components in 11 *Alyssum* taxa (Brassicaceae) from Turkey and their taxonomical and ecological significance

Mehmet Cengiz KARAİSMAİLOĞLU *¹

¹ Istanbul University, Faculty of Science, Department of Biology, Istanbul, Turkey

Abstract

In this work, mucilage characterization and their taxonomical and ecological significance in the seeds of 11 *Alyssum* taxa (*A. dasycarpum* var. *dasycarpum*, *A. desertorum*, *A. filiforme*, *A. hirsutum* var. *hirsutum*, *A. linifolium* var. *linifolium*, *A. minutum*, *Alyssum murale* var. *murale*, *A. parviflorum*, *A. sibiricum*, *A. strictum* and *A. strigosum* subsp. *strigosum*) were investigated. The mucilage producing cells were seen on the seed surface of the all studied taxa when hydrated in water. The seed mucilage was comprised of cellulose or pectin in the all examined taxa. There were differences in columella lines such as flattened, prominent or reduced forms. Besides, soil adhesion capacities of the seeds of the examined taxa ranged from 29 mg to 106 mg. The mucilage production in examined taxa can provide advantages in seed dispersion and colonization.

Key words: *Alyssum*, colonization, morphology, pectin, mucilage

----- * -----

Türkiye'den 11 *Alyssum* taksonundaki tohum musilaj bileşenleri ve onların taksonomik ve ekolojik önemi

Özet

Bu çalışmada, 11 *Alyssum* taksonunun (*A. dasycarpum* var. *dasycarpum*, *A. desertorum*, *A. filiforme*, *A. hirsutum* var. *hirsutum*, *A. linifolium* var. *linifolium*, *A. minutum*, *Alyssum murale* var. *murale*, *A. parviflorum*, *A. sibiricum*, *A. strictum* ve *A. strigosum* subsp. *strigosum*) tohumlarındaki musilaj karakterizasyonu ve onların taksonomik ve ekolojik önemi çalışılmıştır. Musilaj hücreleri su ile temas halinde çalışılan taksonların tohum yüzeylerinde görülmüştür. Tohum musilajı incelenilen tüm taksonlarda selüloz veya pektinden oluşmuştur. Kolumela şekillerinde düzlenmiş, belirginleşmiş veya indirgenmiş gibi farklılıklar vardı. Ayrıca, incelenilen taksonların tohumlarının toprak bağlama kapasiteleri 29 mg ile 106 mg arasında çeşitlilik gösterdi. İncelenen taksonlardaki musilaj üretimi tohum dağılımı ve kolonizasyonda avantajlar sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: *Alyssum*, kolonizasyon, morfoloji, pektin, musilaj

1. Introduction

Brassicaceae family is spread worldwide, excluding Antarctica (Koch and Kiefer, 2006). It has approximately 321 genera, and 3660 species (Al-Shehbaz, 2012; Fidan et al., 2017). The *Alyssum* L. genus is spread mainly in Europe, Southwest Asia, and Northern Africa (Al-Shehbaz, 1987; Al-Shehbaz et al., 2006; Karabacak et al., 2016). Anatolia is one of the main diversity areas of genus. *Alyssum* has 113 taxa in the Flora of Turkey, 56 of which are endemic (Yilmaz, 2012).

Some genera in the Brassicaceae family has a common convergence for old characteristics utilized in taxonomy, particularly in fruit (Mummenhoff et al., 1997). This situation induces some difficulties in their classification now and again; thus, extra characters in diagnostic are required in the re-classification of such as *Alyssum*, *Aethionema* W.T. Aiton and *Thlaspi* L. genera within family.

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905379869551; Fax.: +902124555700; E-mail:.karaismailoglu@istanbul.edu.tr

© 2008 All rights reserved / Tüm hakları saklıdır

Mucilage is placed in distinguished epidermis cells. It provides adaptive advantages such as germination, dispersion, and adhesion to soil in terms of colonization (Ryding, 2001; Western, 2012). The mucilage layer has a key role in blocked of germination (Kreitschitz et al., 2009). Also, Seed mucilage can help seed development, with providing a humid location and preserving metabolic activity in the seed. In arid surroundings, mucilage can stop drying of the seeds or recruit DNA repair mechanisms. Mucilage decreases oxygen circulation to the seed and therefore has a key role in the regulation of the seed dormancy (Yang et al., 2012). Besides, mucilage layer offers the defensive against pathogenic incidences (Young and Martens, 1991; Huang and Gutterman, 1999; Western, 2012). It is seen in many angiosperm families such as Plantaginaceae, Asteraceae and Brassicaceae (Greubert, 1974; Ryding, 2001; Kreitschitz et al., 2007; Western, 2012). The former many works have reported presence of the mucilage cells of some taxa in Brassicaceae family (Harper and Benton, 1966; Gutterman and Shem-tov, 1997; Western et al., 2000; Lu et al., 2010; Karaismailoğlu, 2017).

The information about mucilage content of the seeds in the genus *Alyssum* is quite limited (Young and Evans, 1973; Baskin and Baskin, 1974; Koocheki et al., 2009; Sun et al., 2012). The purpose of this investigation has been to work the mucilage contents of the seeds and soil adhesion capacity, and taxonomical and ecological importance of the mucilage in the examined *Alyssum* seeds.

2. Materials and methods

Plants were collected from natural populations in Turkey. The vouchers and location data of the examined taxa were presented in Table 1. The specimens of the plants were stored in ISTF herbarium or M.C. KARAIŞMAILOĞLU collection.

The changes on wetted seeds was detected, and assessments on the ability to hydrate were made. The wetted analysis with distilled water were done at room temperature for 10 minutes. Methylene blue and safranin dyes were used to define the mucilage type with 10 minutes dyeing (Kreitschitz et al., 2009).

Pure sea sand was used for determining the soil adhesion capacity of the seeds of the examined taxa. Firstly, the 20 seeds were placed on the wetted sea sand in a petri dishes, mucilage shaped later 10 min. Later, the petri dishes with the seeds and sand were transferred to 50°C for 24 h. Afterwards, seeds were sensibly detached from petri dishes and the weights (final weights) were calculated. The soil adhesion capacity of the mucilage layer was determined by comparison of the first and final weight of the seeds (Huang et al., 2000; Karaismailoğlu, 2017).

Mucilage characters were noticed by an Olympus CX21FS1 microscope and Kameram Imaging Software.

3. Results

The wetted seed analyses indicate that there are the mucilage cells on surface of the seeds, which are in cellulosic structure display a heterogenous form. The *Alyssum* seeds dyed with safranin and methylene blue have pectin matrix and cellulosic edge (Fig. 1). Methylene blue enclosed with blue, violet or violet-blue cover around seeds as orange was found with staining safranin (Fig. 1).

The volume of the shaped mucilage has offered differences in the examined *Alyssum* taxa (Table 2). Besides, there were differences in columellae figures in the studied *Alyssum* taxa, which are in prominent, reduced or flattened shapes. The soil adhesion capacities of the examined taxa ranged from 29 mg to 106 mg. Mucilage occurrence among the examined *Alyssum* taxa was the highest at *A. filiforme*. Also, it is the lowest at *A. linifolium* var. *linifolium* (Table 2). The differences in mucilage occurrence may arise from the habitat structures of the examined taxa. This situation has been reported in some families such as Lamiaceae, Asteraceae and Brassicaceae (Mosquero et al., 2004; Kreitschitz et al., 2009; Karaismailoğlu, 2017). The seeds of *A. filiforme* and *A. strigosum* subsp. *strigosum* scattering in mostly thirsty and stone regions propagate more mucilage than other studied taxa. They are hold to soil surface by virtue of the mucilage layer (Gutterman and Shem-Tov, 1997), and thus became colonized. This finding is suitable with the obtained information from this study, especially in invasive plant such as *A. murale* var. *murale*. Alike variation condition has been reported in *Matricaria chamomilla* (Inceer, 2011) and in some *Aubrieta* species (Karaismailoğlu, 2017).

The mucilage structure of the examined *Alyssum* taxa is cellulosic form, with cellulose and pectin. The cellulosic mucilage is a sample of colloiddally dispersal cellulose and typically derive from pectins, which are acidic polysaccharides with a special capacity for hydration (Grant et al., 1969; Fahn and Werker, 1972; Kreitschitz et al., 2007; Karaismailoğlu, 2017, Table 3). This work is the first on the mucilage structure of the genus *Alyssum*. The structure of cellulose threads is alike in examined taxa, which is consistent with their taxonomic closeness. This finding is compatible with earlier works (Gerlach, 1972; Braune et al., 1975; Western et al., 2000; Western, 2006; Kreitschitz et al., 2009; Inceer, 2011; Karaismailoğlu, 2017).

References

- Al-Shehbaz, I.A. (1987). The genera of Alyseae (Cruciferae; Brassicaceae) in the Southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum*, 68, 185-240.

- Al-Shehbaz, I.A., Beilstein, M.A., Kellogg, E.A. (2006). Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution*, 25, 89-120.
- Al-Shehbaz, I. A. (2012). A generic and tribal synopsis of the Brassicaceae (Cruciferae). *Taxon*, 61, 931-954.
- Baskin J.M., Baskin, C.C. (1974). Germination and survival in a population of the winter annual *Alyssum alyssoides*. *Canadian Journal of Botany*, 52, 2439–2445.
- Braune, W., Leman, A., Taubert, H. (1975). *Practicum of plant anatomy* (In Polish). Warszawa: PWN.
- Broda, B. (1971). *Methods of plant histochemistry*. Warszawa: PWZL.
- Fahn, A., Werker, E. (1972). Anatomical mechanisms of seed dispersal. In: Kozłowski, T.T. (ed), *Seed biology, I. Importance development and germination*, 151–221. New York: Academic Press.
- Fidan, M., Özgökçe, F., Pinar, S.M. (2017). A new monotypic genus (*Diptychocarpus* Trautv.) record from Brassicaceae (Cruciferae) family for the Flora of Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 10, 20-24.
- Gerlach, D. (1972). *Basics of botanical microtechnique*. Warszawa: PWRiL.
- Grant, G.T., Nab, C., Rees, D.A., Skerrett, R.J. (1969). Seed mucilages as examples of polysaccharide denaturation. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, 805-806.
- Greubert, M. (1974). Studies on the distribution of myxospermy among seeds and fruits of Angiospermae and its ecological importance. *Acta Biologica Venezuelica*, 8, 315-551.
- Gutterman, Y., Shem-Tov, S. (1997). Mucilaginous seed coat structure of *Carrichtera annua* and *Anastatica hierochuntica* from the Negev Desert highlands of Israel, and its adhesion to the soil crust. *Journal of Arid Environments*, 35, 695-705.
- Harper, J., Benton, R. (1966). The behavior of seeds in soil. II. The germination of seeds on the surface of a water supplying substrate. *Journal of Ecology*, 54, 151-166.
- Huang, Z., Gutterman, Y. (1999). Water absorption by mucilaginous achenes of *Artemisia monosperma*: floating and germination as affected by salt concentrations. *Israel Journal of Plant Sciences*, 47, 27-34.
- Huang, Z., Gutterman, Y., Hu, Z. (2000). Structure and function of mucilaginous achenes of *Artemisia monosperma* inhabiting the Negev desert of Israel. *Israel Journal of Plant Sciences*, 48, 255-266.
- Inceer, H. (2011). Achene slime content in some taxa of *Matricaria* L. (Asteraceae). *Acta Botanica Croatica*, 70, 109-114.
- Karabacak, O., Duran, A., Celik, M. (2016). *Alyssum amasianum* (Brassicaceae), a new species from North Anatolia, Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 40, 402-411.
- Karaismailoğlu, M.C. (2017). Seed Mucilage Contents in Some Taxa of *Aubrieta* Adans. Genus (Brassicaceae) and Their Systematic Importance. *Turkish Journal of Life Sciences*, 2, 145-148.
- Koch, M., Kiefer, C. (2006). Molecules and migration: biogeographical studies in cruciferous plants. *Plant Syst Evol*, 259, 121-142.
- Koochekia, A., Mortazavia, S.A., Shahidia, F., Razavia, S.M.A., Taherian, A.R. (2009). Rheological properties of mucilage extracted from *Alyssum homolocarpum* seed as a new source of thickening agent. *Journal of Food Engineering*, 91, 490-496.
- Kreitschitz, A., Vallès, J. (2007). Achene morphology and slime structure in some taxa of *Artemisia* L. and *Neopallasia* L. (Asteraceae). *Flora*, 202, 570-580.
- Kreitschitz, A., Tadele, Z., Gola, E.M. (2009). Slime cells on the surface of *Eragrostis* seeds maintain a level of moisture around the grain to enhance germination. *Seed Science Research*, 19, 27-35.
- Lu, J., Tan, D., Baskin, J.M., Baskin, C.C. (2010). Fruit and seed heteromorphism in the cold desert annual ephemeral *Diptychocarpus strictus* (Brassicaceae) and possible adaptive significance. *Annals of Botany*, 105, 999-1014.
- Mosquero, M.A., Juan, R., Pastor, J. (2004). Observaciones micromorfológicas y anatómicas en núculas de *Prunella* L. y *Cleonia* L. (Lamiaceae) del suroeste de España. *Acta Botanica Malacitana*, 29, 203-214.
- Mummenhoff, K., Franzke, K.A., Koch, M. (1997). Molecular data reveal convergence in fruit characters used in the classification of *Thlaspi* s.l. (Brassicaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 125, 183-199.
- Ryding, O. (2001). Myxocarpy in the Nepetoideae (Lamiaceae) with notes on myxodiaspory in general. *Systematics and Geography of Plants*, 71, 502-514.
- Sun, Y., Tan, D.Y., Baskin, C.C., Baskin, J.M. (2012). Role of mucilage in seed dispersal and germination of the annual ephemeral *Alyssum minus* (Brassicaceae). *Australian Journal of Botany*, 60, 439-449.
- Western, T.L., Debra, J.S., Haughn, G.W. (2000). Differentiation of mucilage secretory cells of the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiology*, 122, 345-355.
- Western, T.L. (2006). Changing spaces: the *Arabidopsis* mucilage secretory cells as a novel system to dissect cell wall production in differentiating cells. *Canadian Journal of Botany*, 84, 622-630.
- Western, T.L. (2012). The sticky tale of seed coat mucilages: production, genetics, and role in seed germination and dispersal. *Seed Science Research*, 22, 1-2.
- Young, J.A., Evans, R.A. (1973). Mucilaginous Seed Coats. *Weed Science*, 21, 52-54.
- Yang, X., Baskin, J. M., Baskin, C. C., Huang, Z. (2012). More than just a coating: Ecological importance, taxonomic occurrence and phylogenetic relationships of seed coat mucilages. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 14, 434-442.
- Yilmaz, O. (2012). *Alyssum kaynakiae* sp. nov. (sect. Gamosepalum, Brassicaceae) from southwest Anatolia, Turkey. *Nordic Journal of Botany*, 30, 190-194.
- Young, J. A., Martens, E. (1991). Importance of hypocotyl hairs in germination of *Artemisia* seeds. *Journal of Range Management*, 44, 438-442.

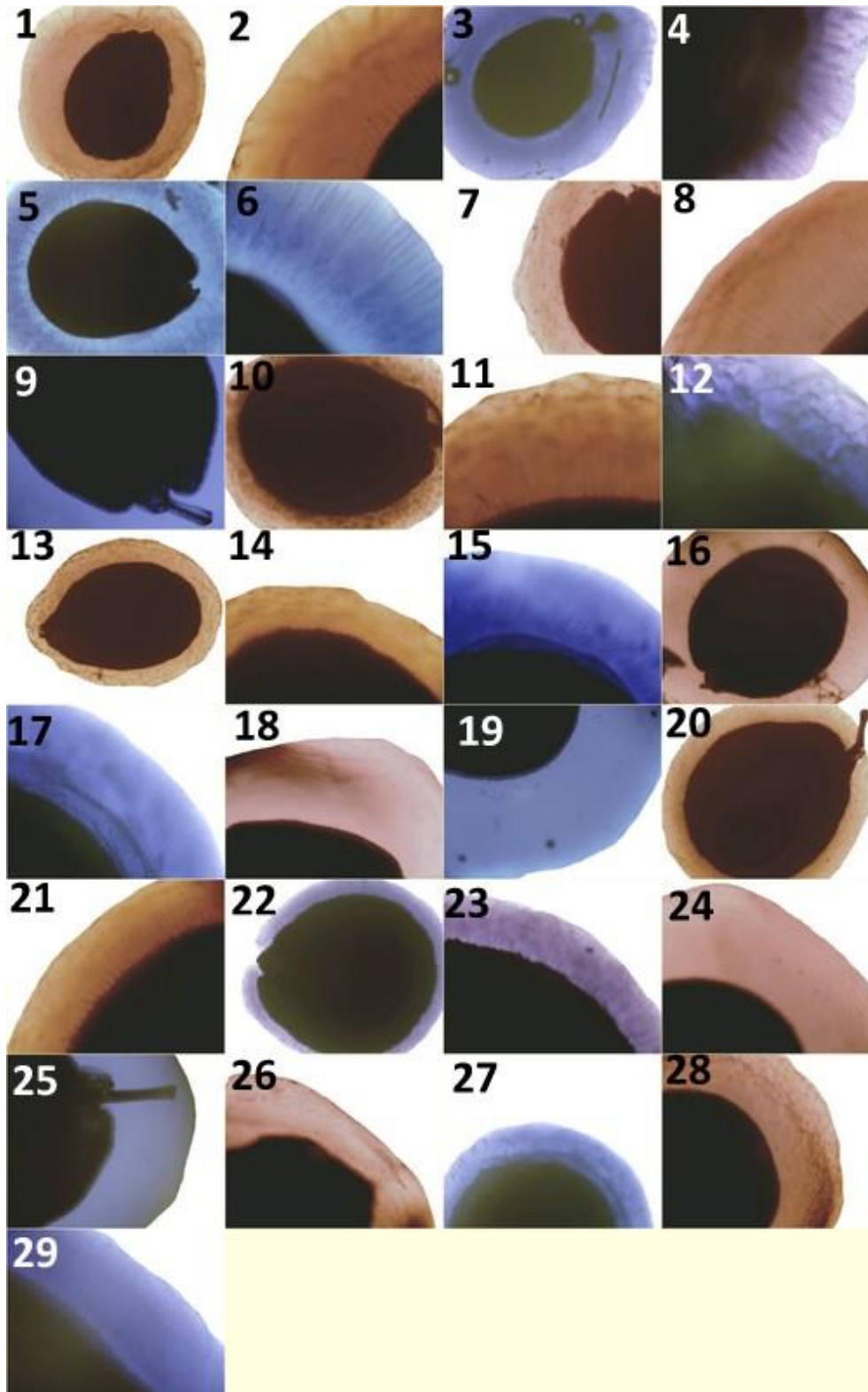


Figure 1. The mucilage structure in seeds of the examined taxa; *Alyssum dasycarpum* var. *dasycarpum*: 1-2 (Safranin), 3-4 (Methylene Blue), *A. desertorum*: 5-6 (Methylene Blue), 7 (Safranin), *A. filiforme*: 8 (Safranin), 9 (Methylene Blue), *A. hirsutum* var. *hirsutum*: 10-11 (Safranin), 12 (Methylene Blue), *A. linifolium* var. *linifolium*: 13-14 (Safranin), 15 (Methylene Blue), *A. minutum*: 16 (Safranin), 17 (Methylene Blue), *A. murale* var. *murale*: 18 (Safranin), 19 (Methylene Blue), *A. parviflorum*: 20-21 (Safranin), 22-23 (Methylene Blue), *A. sibiricum*: 24 (Safranin), 25 (Methylene Blue), *A. strictum*: 26 (Safranin), 27 (Methylene Blue), *A. strigosum* subsp. *strigosum*: 28 (Safranin), 29 (Methylene Blue).

Table 1. The examined taxa and their locations

Taxa	Location	Voucher
<i>Alyssum dasycarpum</i> STEPHEN EX WILLD. var. <i>dasycarpum</i>	Ankara, Haymana, open areas around Mogan lake, 980 m, 10.8.2016	Karaismailoğlu 330
<i>Alyssum desertorum</i> STAPP.	Ankara, Keçiören, roadside, open areas, 900 m, 17.08.2016	Karaismailoğlu 337
* <i>Alyssum filiforme</i> NYAR.	Gümüşhane, Kürtün, Karagöl, roadsides, inclined slopes, 1600 m, 13.7.2014	Karaismailoğlu 85b
<i>Alyssum hirsutum</i> BIEB. var. <i>hirsutum</i> VENT.	Mersin, Mut, Kucukeğre mountain, inclined stone slopes, 900 m, 27.7.2012	Karaismailoğlu 8
<i>Alyssum linifolium</i> STEPH. EX WILLD. var. <i>linifolium</i>	Konya, Cihanbeyli-Yavşan, salt lake edge, 960 m, 11.7.2016	Karaismailoğlu 316
<i>Alyssum minutum</i> SCHLECHT. EX DC.	Bursa, Uludağ, Yiğitalı, roadsides, inclined slopes, 1500 m, 1.7.2016	Karaismailoğlu 295
<i>Alyssum murale</i> WALDST. ET KIT. var. <i>murale</i> WALDST. ET KIT.	Gümüşhane, Kürtün, Karagöl mountain road, 675 m, 13.7.2014	Karaismailoğlu 74b
<i>Alyssum parviflorum</i> FISCH. ex M. BIEB.	İstanbul, Büyükçekmece-Çatalca, roadsides, 4 m, 8.7.2016	Karaismailoğlu 312
<i>Alyssum sibiricum</i> WILLD.	Kütahya, Gediz, Çukurören, 1350 m, 24.6.2016	Karaismailoğlu 290
<i>Alyssum strictum</i> WILLD.	Niğde, Çamardı, Yelatan village hills, 2083 m, 12.6.2016	Karaismailoğlu 271
<i>Alyssum strigosum</i> BANKS ET SOL. subsp. <i>strigosum</i>	Bursa, Uludağ, past the hotels, open inclined slopes, 1800 m, 1.7.2016	Karaismailoğlu 296

Table 2. Columellae structures and soil adhesion capacities of the mucilage cells in the examined *Alyssum* taxa

Taxa	Columellae structure	Soil adhesion capacity of seeds		
		First weight (mg)	Final weight (mg)	Net (Final-First w.) (mg)
<i>Alyssum dasycarpum</i> var. <i>dasycarpum</i>	flattened or prominent	18	58	40
<i>A. desertorum</i>	flattened or reduced	53	119	66
<i>A. filiforme</i>	flattened	99	205	106
<i>A. hirsutum</i> var. <i>hirsutum</i>	prominent	63	118	55
<i>A. linifolium</i> var. <i>linifolium</i>	flattened or reduced	10	39	29
<i>A. minutum</i>	prominent	43	115	68
<i>A. murale</i> var. <i>murale</i>	prominent	34	141	87
<i>A. parviflorum</i>	prominent	13	45	32
<i>A. sibiricum</i>	prominent	10	77	67
<i>A. strictum</i>	prominent or reduced	8	91	82
<i>A. strigosum</i> subsp. <i>strigosum</i>	flattened or reduced	52	151	99

Table 3. The staining of mucilage layer and literature data

Dyeing	Target	Obtained Color	Literature data	Prior works
Safranin	Pectin	Orange	Orange, Orange-Red	Gerlach 1972, Braune et al. 1975, Kreitschitz et al. 2009, Inceer 2011, Karaismailoğlu 2017
	Cellulose	Orange	Orange, Orange-Red, Red	
Methylene Blue	Pectin	Blue, Violet-Blue, Violet	Blue, Violet Blue	Broda 1971, Gerlach 1972, Kreitschitz and Valles 2007, Kreitschitz et al. 2009, Inceer 2011, Karaismailoğlu 2017
	Cellulose	Blue, Violet-blue	Violet-Blue, Blue	

(Received for publication 14 June 2017; The date of publication 15 August 2018)



Relationship between some wild mammalian species and agricultural crops

Şengül AKSAN *¹

¹ Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Orman Fakültesi, Yaban Hayatı Ekolojisi ve Yönetimi Bölümü. Isparta, Turkey

Abstract

This study was carried out in order to determine whether there is a relationship between some wild mammal species and agricultural crops in farm land of Isparta-Atabey province. 60 sample plots were taken in the course of the study in Atabey province. Presence/absence data for mammalian wild animals and agricultural crops were recorded at each sample plot. To examine the data, Interspecific correlation analysis was preferred in various analytical methods. According to the results were determined as positive relationship between, *Prunus persica* (p=0,031), to brown hare (*Lepus europaeus*); *Vitis vinifera* (p=0,012) and *Prunus persica* (p=0,04) to wild boar (*Sus scrofa*); *Prunus persica* (p=0,011), *Juglans regia* (p=0,028) and *Vitis vinifera* (p=0,032) to badger (*Meles meles*) and *Prunus persica* (p=0,003), *Prunus avium* (p=0,013), *Juglans regia* (p=0,027), *Amygdalus communis* (p=0,088) to marten (*Martes foina*). Besides, between *Triticum aestivum* (p=0,047) and *Malus domestica* (p=0,073) for brown hare and *Triticum aestivum* (p=0,009) ve *Medicago sativa* (p=0,08) for wild boar, *Hordeum vulgare* (p=0,057) and *Triticum aestivum* (p=0,064) for badger and *Vitis vinifera* (p=0,055) for marten were determined as negative relationship.

Key words: agricultural crops, wild mammals, interspecific correlation analysis

----- * -----

Zirai bitki türleri ile bazı memeli yaban hayvanı türleri arasındaki ilişki

Özet

Bu çalışma Isparta-Atabey ovası ziraat alanlarında rastlanan bazı memeli yaban hayvanları ile zirai bitkiler arasında ilişki olup olmadığını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Atabey ovasında rastgele 60 adet örnek alan alınmıştır. Her örnek alanda memeli yaban hayvanları ve zirai bitki türlerine ait var-yok verileri kaydedilmiştir. Analitik değerlendirme için nitelikler arası ilişki analizi tercih edilmiştir. Analiz sonucunda yaban tavşanı (*Lepus europaeus*)'nın *Prunus persica* (p=0,031) ile, yaban domuzu (*Sus scrofa*)'nın *Vitis vinifera* (p=0,012) ve *Prunus persica* (p=0,04) ile, porsuk (*Meles meles*)'un *Prunus persica* (p=0,011) ile, *Juglans regia* (p=0,028) ve *Vitis vinifera* (p=0,032) ile, kaya sansarı (*Martes foina*)'nın *Prunus persica* (p=0,003), *Prunus avium* (p=0,013), *Juglans regia* (p=0,027) ve *Amygdalus communis* (p=0,088) ile pozitif ilişkili türler olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte yaban tavşanı için *Triticum aestivum* (p=0,047) ve *Malus domestica* (p=0,073), yaban domuzu için *Triticum aestivum* (p=0,009) ve *Medicago sativa* (p=0,08), porsuk için *Hordeum vulgare* (p=0,057) ve *Triticum aestivum* (p=0,064), sansar için ise *Vitis vinifera* (p=0,055) türleri negatif ilişkili türler olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: tarım ürünü, memeli yaban hayvanları, nitelikler arası ilişki analizi

1. Giriş

Günümüzde yaban hayvanlarının doğal habitat istekleri bilinmekle birlikte insan etkisi altındaki zirai alanlarda varlık gösteren yaban hayvanları hakkında kesin bir habitat tanımlaması yoktur. Yaban hayvanı bulunduğu alanın yaşam şartlarına göre değişik tercihlerde bulunabilir. Tercihinde birçok ekolojik etmenin farklı türlerde ve alanlarda farklı şekilde birleşmesi sonucu özel durumlarla karşılaşmaktadır. Yaban hayvanlarının tarım alanlarını beslenme, gizlenme

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902462113958; Fax.: +902462371810; E-mail: sengulaksan@gmail.com

ve örtü gibi hangi özelliği için tercih ettikleri ve meydana getirdikleri zararlar hakkında az sayıda çalışma mevcuttur. Genel olarak zirai alanlarda böcek zararı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yaban hayvanlarının da zirai alanlar ve besi hayvanları üzerinde zayıya yol açtıkları bilinmektedir. Yaban hayvanları ve meydana getirdikleri zararlar neticesinde insan ve yaban hayvanı anlaşmazlığı/çatışması denen kavram ortaya çıkmıştır. Bitkisel ve hepçil beslenen yaban hayvanları ziraat alanlarında zarara yol açarken, etçil beslenenler ise besi hayvanları ile evcil hayvanlara zarar vermekte ve hatta insanlar için tehlike oluşturmaktadır.

Çiftçilerin yaban hayvanları ile birebir karşılaşmaları ve zirai ürünlerde meydana getirdikleri zararlar ile ilgili çeşitli şikâyetleri mevcuttur. Ülkemizde genellikle yaban domuzu zirai alanlara, kurt ise besi hayvanlarına zarar vermektedir. Diğer ülkelerde farklı yaban hayvanları çeşitli zayıtlara neden olmaktadır. Yaban hayvanı zararını konu alan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Cai vd., (2008) Çin’de gerçekleştirdikleri çalışmada yaban domuzunun mısır, patates ve buğday ziraatı yapılan alanlarda hasara neden olduğunu bildirmiştir (ss. 723–728). Chiyo ve arkadaşlarının (2005) Uganda Kibale Orman Milli Parkı’ndaki fillerin ziraat alanlarına olan hasarı incelenmiş, vejetasyonun yükselmesi ve mısır olgunlaşması ile zararın arttığını ifade etmişlerdir (ss. 48–55). Hill (2000) tarafından Uganda Budongo Orman Rezervinin güney kenarındaki ekin tarlalarına başta babun olmak üzere primatlar tarafından yapılan baskınların etkisini incelemiştir (ss. 299–315). Vijayan ve Pati (2002) değişen zirai modellerin şeker kamışı ve mango yetiştiriciliği arttıkça aslan ve panter dağılımı ile tarım alanlarındaki besi hayvanı ve insana yönelik saldırıların arttığını bildirmiştir (ss. 541–559). Virgos vd. (2010) kaya sansarı ile taze meyve varlığı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır (ss. 423–43). Araştırmacılar ağaç örtüsünün çok önemli olduğunu ve böğürtlen varlığının kaya sansarının habitat tercihinde etkili olduğunu bildirmiştir. Özen ve Uluçay (2010) porsuğun badem, kiraz, ceviz, ardıç, elma, dut, karaçam, doğu çınarı, erik, ahlat, armut, meşe, kuşburnu, söğüt, akkavak, mısır, nohut, fasulye, buğday, pancar ve ayçiçeği bitkilerinin bulunduğu alanları yaşam alanı olarak tercih ettiğini kaydetmiştir (ss. 9–20). Ayberk (2003) yaban tavşanının kışın kayın, gürgen, dişbudak, akçaağaç, karaağaç, titrek kavağı, bazen de meşenin tomurcuk ve sürgünlerini yediğini hatta akasya ve katırtırnağının kabuğunu soyarak diri odununu kemirdiğini bildirmiştir (ss. 79–86).

Ekolojik çalışmalarda hedef tür (hayvan veya bitki) ile ilişkili gösterge türlerin kullanılması değerlendirmelerin hızlı bir şekilde gerçekleşmesine imkân sağlamaktadır. Türkiye’de bazı bitki türlerinin potansiyel yayılış alanlarının gösterge türlerini belirlemeye yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Çelik vd., 2006; Gülsoy vd., 2013; Gülsoy ve Özkan, 2013; Gülsoy ve Negiz, 2014; Negiz vd., 2015; Kaya vd., 2017). Bitkiler yaban hayvanları için besin ve örtü sağlamasından dolayı önemlidir. Yaban hayvanlarının habitat tercihlerinin belirlenmesinde yaşama ortamı faktörlerinden en çok etkili olan değişken bitkilerdir. Bazı çalışmalarda ise korunan alan veya doğal alanlarda, yaban hayvanı varlığı ve odunsu bitki türlerinin dağılımı arasındaki ilişkiler araştırılmıştır (Oğurlu ve Aksan, 2013; Süel vd., 2013; Süel vd., 2016). Oğurlu ve Aksan (2013) toros sedirinin yaban tavşanı, yabani eriğin yaban domuzu, yabani erik, ahlat, doğu çınarı ve toros sedirinin porsuk ve kuşburnunun ise kaya sansarı için pozitif gösterge odunsu türler olduğunu tespit etmiştir (ss. 81-87). Yine aynı çalışmada yaban tavşanı için kavak ve meşenin, porsuk için ise Anadolu karaçamının negatif gösterge türler olduğu kaydedilmiştir. Köprüçay yöresinde yaban hayvanların habitat tercihlerine yönelik gösterge türler araştırılmış; tespith çalışması, menengic ve akçakesme tavşanı ile, tespith çalışması yaban domuzu ile, menengic porsuk ile, dafne ve akçakesme kaya sansarı türleri ile istatistiksel olarak önemli pozitif birliktelikler gösterdiği rapor edilmiştir (Oğurlu ve Aksan 2013; Süel vd., 2013). Bu çalışmalar ışığında yaban hayatı araştırmacıları çalışmada konu edilen bitki türlerini bulunduran bir sahada çalıştıklarında, buradaki bir bitki türü ile hedef hayvan türü arasındaki ilişkiyi kullanarak alanda çok kısa bir sürede ve zahmetsizce yaban hayvanlarının potansiyel varlığını belirleyebilecektir. Yine bu çalışmalar neticesinde elde edilen veriler ışığında yaban hayvanlarını doğal alanlarında doğal bitki türlerinin ekim veya dikimi gerçekleştirilebilir.

Gerçekleştirilen çalışmada ise Atabey ovasında ekim ve dikimi yapılan zirai bitki türleri ile bazı memeli yaban hayvanı türleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar ile insan yaban hayvanı karşılaşması/çatışmasına çözüm olabilecek maddeler belirtilmiştir.

2. Materyal ve yöntem

1.1. Materyal

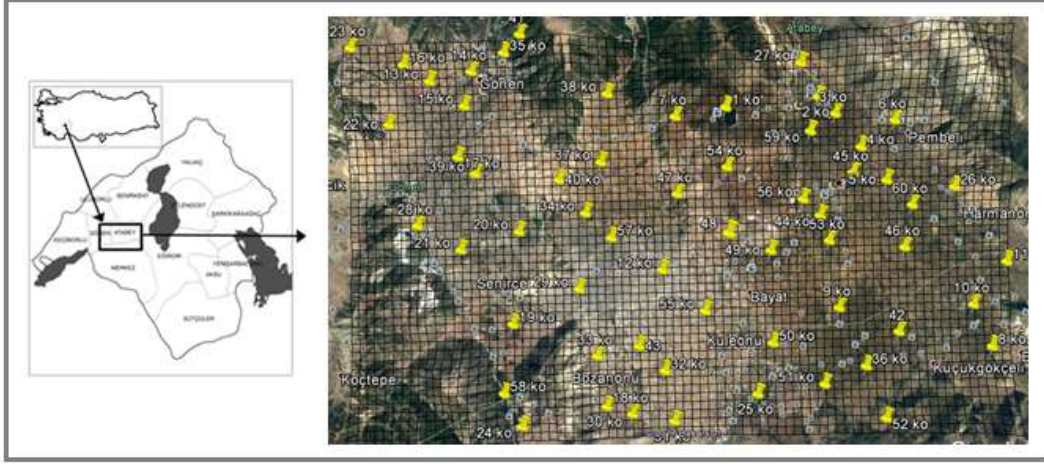
Atabey ovası Isparta ilinin 15 km kuzeydoğusunda, 30° 27.718' - 30° 39.039' doğu boylamları ile 37° 50.547' - 37° 58.328' kuzey enlemleri arasında yer almaktadır. Sahada karasal iklim etkilidir. 2017 yılına ait ortalama sıcaklık değerlerine göre yıllık ortalama sıcaklık 12 °C en yüksek sıcaklık 22,3 °C ile Temmuz, en düşük sıcaklık 2 °C ile Ocak aylarında belirlenmiş olup, yıllık toplam yağış ise 560 mm olarak ölçülmüştür (Climate-data, 2017).

Atabey Ovası toplam 202.000 dekar arazi alanına sahiptir. Sahanın 79.190 dekarı tarım alanı, 63.480 dekarı orman alanı, 7.267 dekarı mera alanı ve 52.063 dekarı diğer (akarsu, gölet, 2B, kadastro dışı arazi, yerleşim alanı) alanı özelliğindedir (IGTHM, 2017). Sahada geleneksel ve klasik tarım yöntemleri uygulanmaktadır.

2.2. Yöntem

Atabey ovası 300 m x 300 m büyüklüğünde olacak şekilde 3666 adet kareye bölünmüştür. Bu karelerden 60 adedinde envanter çalışması yapılmıştır (Şekil 1). Rastgele alınan 60 adet örnek alanda kaydedilen yaban hayvanları ve

bitki türlerine ait var-yok verileri, zirai türler ile yaban hayvanları arasındaki pozitif veya negatif ilişkiyi belirlemek üzere değerlendirilmiştir.



Şekil 1. Atabey Ovası örnek alanlar

Arazi çalışmaları 2016 yılının vejetasyonun canlı olduğu Nisan-Ağustos ayları arasında dolaylı gözlem tekniklerinden yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnek alanlarda karşılaşılan iz ve belirtilerin teşhisinde Elbroch (2003, ss. 779) ve Murie ve Elbroch (2005, ss. 391)'dan yararlanılmıştır.

Çalışmamızda zirai bitki türleri ile yaban hayvanlarının varlığı arasındaki ilişki, nitelikler arası ilişki analizi yöntemiyle araştırılmıştır. Nitelikler arası ilişki analizinin yapılabilmesi için Özkan'ın Cole (1949)'a atfen bildirdiği sıralama [4 gözlü 2x2 tablosunun oluşturulması, Kikare değerinin (x^2) elde edilmesi, Kikare cetvelinden n-1 için önem düzeyi (p) değerinin bulunması, ilişki yönü (-/+) ve korelasyon katsayısının hesap edilmesi (C3)] takip edilmiştir (aktaran Özkan, 2002; Özkan, 2004; Özkan vd., 2007; Güner vd., 2011; Oğurlu ve Aksan, 2013).

3. Bulgular

Sahadaki tarımı yapılan ürünler tarla bitkileri, sebzelikler, meyvelikler, bağlar, endüstri ve süs bitkileridir. Örnek alanlarda ziraatı yapılan toplam 15 zirai bitki türü tespit edilmiştir (Tablo 1). Her zirai türün memeli yaban hayvanı varlığı bağlamında ilişki ve anlam düzeyi Kikare analiziyle, Kikare cetvelinden, n-1 için p (önem düzeyi) değerleri ve türler arası birlikteliğin yönü ise nitelikler arası ilişki analizi C3 katsayısı hesaplamasına göre pozitif/negatif olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 1. Bitki türleri ve verilen kodlar

Sıra no	Türkçe ismi	Latince ismi
1	Arpa	<i>Hordeum vulgare</i>
2	Badem	<i>Amygdalus communis</i>
3	Buğday	<i>Triticum aestivum</i>
4	Ceviz	<i>Juglans regia</i>
5	Elma	<i>Malus domestica</i>
6	Erik	<i>Prunus domestica</i>
7	Fiğ	<i>Vicia sativa</i>
8	Gül	<i>Rosa damascena</i>
9	Haşhaş	<i>Papaver somniferum</i>
10	Kavak	<i>Populus nigra.</i>
11	Kiraz	<i>Prunus avium</i>
12	Şeftali	<i>Prunus persica</i>
13	Üzüm	<i>Vitis vinifera</i>
14	Vişne	<i>Prunus cerasus</i>
15	Yonca	<i>Medicago sativa</i>

Tablo 2. Hedef memeli yaba hayvanı türleri ile zirai bitki türleri arasındaki ilişki

No	Türler	Yaban Tavşanı			Yaban Domuzu			Porsuk			Sansar		
		x2	p	C3	x2	p	C3	x2	p	C3	x2	p	C3
1	Arpa	0,59	0,443	-0,17314	0,923	0,337	-0,2323	3,614	0,057	-0,43886	1,004	0,316	-0,24236
2	Badem	0,171	0,679	0,090811	0,019	0,891	0,033186	2,261	0,133	0,329876	2,911	0,088	0,403846
3	Buğday	3,952	0,047	-0,408	6,898	0,009	-0,56807	3,436	0,064	-0,40367	0,767	0,381	-0,21562
4	Ceviz	1,532	0,216	0,199804	2,675	0,102	0,30083	4,855	0,028	0,362069	4,904	0,027	0,425214
5	Elma	3,214	0,073	-0,36175	0,034	0,853	-0,0444	0	1	0	1,635	0,201	-0,3027
6	Erik	0,017	0,897	0,011753	0,812	0,368	0,096154	1,392	0,238	0,114	0,285	0,594	0,06
7	Fiğ	0,26	0,61	-0,06116	1,054	0,305	-0,14381	0,539	0,463	-0,09615	0,152	0,697	0,055556
8	Gül	0,005	0,945	0,012645	0,137	0,711	0,076419	2,591	0,107	0,294	0,648	0,421	0,170354
9	Haşhaş	0,051	0,821	-0,024	0,49	0,484	-0,08801	0,188	0,664	-0,05058	1,22	0,269	-0,14081
10	Kavak	0,584	0,445	0,149378	0,156	0,693	-0,08879	0,734	0,392	0,222306	0,184	0,668	0,097669
11	Kiraz	0,055	0,815	0,052402	0,992	0,319	0,237838	1,669	0,196	0,290832	6,17	0,013	0,566769
12	Şeftali	4,643	0,031	0,284672	4,22	0,04	0,326198	6,492	0,011	0,359214	8,635	0,003	0,488936
13	Üzüm	0,624	0,43	0,105779	6,326	0,012	0,37	4,622	0,032	0,293103	3,679	0,055	-0,01284
14	Vişne	1,837	0,175	-0,14938	0,122	0,726	0,043243	0,188	0,664	-0,05058	0,005	0,945	-0,00888
15	Yonca	0,051	0,821	-0,024	3,061	0,08	-0,22198	0,188	0,664	-0,05058	1,22	0,269	-0,14081

Elde edilen sonuçlara göre sulu veya kuru meyveli odunsu türlerin varlığı ile memeli yaban hayvanlarının sahadaki varlığı arasında pozitif yönde bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.

Yaban tavşanı ile şeftali varlığı arasında istatistiksel olarak ($p=0,031/+$) pozitif yönde ilişki var iken, buğday ($p=0,047/-$) ve elma ($p=0,073/-$) ile negatif yönde bir ilişkili olduğu belirlenmiştir. Yaban domuzu varlığının zirai bitki türlerinden üzüm ($p=0,012/+$) ve şeftali ($p=0,04/+$) ile pozitif yönde ilişkili olduğu, ancak buğday ($p=0,009/-$) ve yonca ($p=0,08/-$) ile ise negatif yönde bir ilişkisinin olduğu saptanmıştır. Arazi çalışmalarından elde edilen var-yok durumlarına göre porsuk ile şeftali ($p=0,011/+$), ceviz ($p=0,028/+$) ve üzüm ($p=0,032/+$) arasında pozitif yönde, arpa ($p=0,057/-$) ve buğday ($p=0,064/-$) arasında ise negatif yönde ilişki gözlenmiştir. Kaya sansarı varlığı ile zirai türlerden şeftali ($p=0,003/+$), kiraz ($p=0,013/+$), ceviz ($p=0,027/+$) ve badem ($p=0,088/+$) varlığı arasında pozitif yönde bir ilişki, üzüm ($p=0,055/-$) ile negatif yönde bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.

Yaban hayvanlarının özellikle şeftali bahçelerinin olduğu zirai alanları çoğunlukla tercih ettiği kaydedilmiştir. Türler bu alanları şeftali ağaçlarının düzenli sulanması ile zemin örtüsünde taze ot bulabildiği, tarlaların arasında ve etrafında saklanıp gizlenebilecekleri uygun alanların bulunmasından dolayı bu alanları tercih ettiği belirlenmiştir. Yine şeftali bahçelerinin bulunduğu alanların çevresinin yapısal olarak ve zirai bitki türü açısından çeşitlilik göstermesinden dolayı yaban hayvanları için uygun habitatlar oluşturduğu gözlenmiştir. Tahıl alanları ile hedef türlerin varlığı arasında negatif yönde bir ilişki tespit edilmiştir. Bu alanlar geniş düzlüklerde yer almakta ve civarı yine buğday, arpa ve fiğ gibi tahıl alanlarından oluşmaktadır. Hedef türlerimiz, vejetasyonun gelişip saklanma örtüsü oluşturana kadar gizlenmek için uygun olmadığı için bu alanlardan uzak durmaktadır. Ayrıca bu alanların çevresi tür habitat ihtiyaçlarına uygun özellikte değildir. Ancak etrafında saklanıp gizlenebileceği örtü bulunan sahalara yakın örnek alanlarda kısmen hedef türlere ait iz ve belirtilere rastlanmıştır.

4. Sonuçlar ve tartışma

Ekolojik çalışmalarda hedef tür (hayvan veya bitki) ile ilişkili gösterge türlerin kullanılması değerlendirmelerin hızlı bir şekilde gerçekleşmesine imkân sağlamaktadır. Bu sayede sorunlara çözümler geliştirilebilmekte ve zarara yönelik önlemler alınabilmektedir.

Cai vd., (2008) yaban domuzunun mısır, patates ve buğday ziraatı yapılan alanlarda hasara neden olduğunu, ziraat alanının yaban domuzu habitatına yani dağlara ve suya yakınlığı arasındaki bağlantının hasarı arttırdığı bildirilmiştir (s. 726). Chiyo ve arkadaşlarının (2005) fillerin ziraat alanlarına olan hasarını incelediği çalışmalarında vejetasyonun yükselmesi ve mısır olgunlaşması ile zararın arttığını belirtmiştir (s. 53). Vijayan ve Pati (2002) şeker kamışı ve mango yetiştiriciliği arttıkça aslan ve panter dağılımı ile tarım alanlarındaki besi hayvanlarına ve insana

yönelik saldırıların arttığını bildirmiştir (s. 256). Çünkü bu alanlar yırtıcılara gizlenme örtüsü sağlamaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar ve yapılan tüm bu çalışmalar yaban hayvanlarının besin tercihi yanında besinlerin yetiştiği ortam faktörlerinin de etkili olduğunu göstermektedir. Oğurlu ve Aksan (2013) odunsu tür çeşitliliğinin yüksek olduğu alanlarda yaban hayvanlarının bulunma sıklığının oldukça yüksek olduğunu ifade etmişlerdir (s. 85). Alandaki yapısal çeşitlilik ile birlikte otsu ve odunsu bitki türlerinin çeşitliliği yaban hayvanlarının barınma, sığınma, saklanma, beslenme ve dinlenme gibi aktiviteleri için kullanabilecekleri yaşam alanlarının zenginliğini artırmaktadır (Aksan 2013 s. 249). Yapısal çeşitlilik ve tür çeşitliliği arttıkça yaban hayvanlarının bulunma olasılığı yükselmektedir. İnsan müdahalesi ile (tarım ve bazı ormancılık uygulamaları) alanlar tekdüzeleştikçe yaban hayvanları kendileri için uygun alanlara çekilmekte ve bu alanlarda sıkışmaktadır. Yaban hayvanlarının ihtiyaçlarını karşılayabilecek uygun alanların azalması nedeniyle insan ve yaban hayvanı karşılaşmaları ve dolayısı ile çıkar çatışmaları (ekin/besin) artmaktadır. Hayvanlar besin ve su gibi ihtiyaçları için zaruri olarak ziraat alanlarına veya yerleşim yerlerine yaşlaşmak zorunda kalmaktadır. Çiftçiler yaban hayvanı türleri içerisinde en fazla yaban domuzundan şikâyet etmektedir. Yaban domuzu ise daha çok su ve nemin bulunduğu alanları/tarlaları tercih etmektedir (Cai vd., 2008; Aksan,2013; Aksan vd., 2013; Oğurlu ve Aksan, 2014). Özellikle sebze ve meyve bahçelerinde hasara neden olan yaban domuzundan korunmak için çiftçiler ses çıkaran çeşitli sistemler kurmak gibi uygulamalara başvurmaktadır. Ancak yaban domuzu sistematik olarak çıkarılan bu seslere alışmakta ve maalesef bu uygulamalarda yaban domuzunun neden olduğu hasarı engelleyememektedir. Yaban domuzu hasarını önleyebilmek için en uygun yöntem ziraat alanını tel örgü ile çevirmektir.

Zirai bitki türleri ile memeli yaban hayvanı türlerinin varlığı arasındaki ilişkinin tespitine yönelik yapılan bu çalışma ile hangi zirai bitki türünü hangi yönde (pozitif/negatif) ve niçin tercih ettikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu sayede çiftçi ve yaban hayvanı arasında gerçekleşen çıkar çatışmasını engellemeye yönelik önlemler alınabilir.

Gerçekleştirilen bu çalışmanın sonuçlarından faydalanılarak doğal alanlara yakın ve yaban hayvanlarının habitatlarına yakın bulunan tarım alanlarına, yaban hayvanlarının uzak durduğu veya tercih etmediği zirai bitki türlerinin ekimi ve dikimi yapılarak yaban hayvanlarının zararına karşı bir güvenlik bölgesi oluşturulabilir. Bu alanlar ilk olarak yaban hayvanlarının tercih etmedikleri besin türü veya kendilerini güvende hissedemedikleri örtü tipi gibi özellikler taşımalarından dolayı yabani türler bu alanlardan uzak duracaktır ve bu alandan öteye ilerlemeleri kısmen önlenmiş olacaktır. Bu tampon denilebilecek alanlar sayesinde yaban hayvanı doğal habitatından uzak ziraat alanlarında yani daha iç kesimlerde sulu veya kuru meyveli ya da sebze veya meyve yetiştiriciliği daha az zararlı gerçekleştirilebilir. Çünkü yaban hayvanları kendilerini güvende hissetmedikleri koruma alanını geçerek zirai alanlara nadiren gelme eğilimi gösterecektir. Yaban hayvanları habitatlarına yakın, güvenli ve kolay şekilde besin bulabilecekleri alanları tercih eder. Zirai alanların tel örgü ile çevrelenmesi yine yaban domuzu zararını engellemektedir. Ancak porsuk, sansar ve yaban tavşanı açısından tel örgünün pek faydası olmamaktadır. Gölcük tabiat parkında gerçekleştirdiğimiz çalışmada porsuk, sansar ve yaban tavşanının tarım alanına tel örgü altına kazarak girdiği gözlenmiştir. Yaban hayvanlarını ziraat alanlarından uzaklaştırmanın en uygun yolu ise yaban hayvanları ile pozitif yönde ilişkisi bulunan bitki türlerinin doğal alanlar içerisinde ekimi, dikimi ve su kaynaklarının oluşturulması gibi yöntemler uygulanarak yaban hayvanlarının doğal habitatlarında kalmalarını sağlamaktır (Oğurlu ve Aksan, 2013, ss. 81-87). Ancak bu uygulamalar alanın doğal yapısını bozmayacak şekilde uygulanacak yenileme ve rehabilitasyon çalışmaları ile gerçekleştirilebilir.

Kaynaklar

- Aksan, Ş. (2013). *Gölcük Tabiat Parkı'nda bazı yabani memeli türlerinin dağılımlarının modellenmesi*. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Mühendisliği Anabilim Dalı, ISPARTA.
- Aksan, Ş., Özdemir, İ., Oğurlu, İ. (2014). Modeling the distributions of some wild mammalian species in Gölcük Natural Park. *Biological Diversity and Conservation*, 7(1), 1-15.
- Ayberk, H. (2003). Yaban hayvanlarında kış yememesi. *İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*. 53(1), 79–86.
- Cai, J., Jiang, J., Zeng, Y., Li, C., Bravery, B. D. (2008). Factors affecting crop damage by wild boar and methods of mitigation in a giant panda reserve. *European Journal of Wildlife Research*, 54(4), 723–728.
- Çelik S., Özkan, K., Yücel, E., Göktürk, R. S., Öztürk, M. (2006). Determination of indicator species and comparison of soil characteristics of *Centaurea mucronifera* DC. and *Centaurea pyrrhoblephera* Boiss. distributed in Turkey. *International Journal of Biology and Biotechnology* . 3(3), 609-617.
- Chiyo, P.I., Cochrane, E. P., Naughton, L., Basuta, G. I. (2005). Temporal patterns of crop raiding by elephants: a response to changes in forage quality or crop availability? *African Journal of Ecology*. 43(1). 48–55.
- Climate-data. (2017). Climate-Data.Org. <https://tr.climate-data.org/location/19359/>. (Erişim Tarihi: 25/08/2017).
- Elbroch, M. (2003). *Mammal tracks & Sing: A Guide to North American Species*. Stackpole Books Press Pennsylvania, 779.
- Gülsoy, S. Negiz, M.G. (2014). Determination of environmental factors and indicator species affecting the distribution of *Origanum onites* L.: a case study from the Lakes district, Turkey. *Environmental Engineering and Management Journal*, 13(4), 1013-1019.

- Gülsoy, S., Özkan, K. (2013). Determination of Environmental Factors and Indicator Plant Species for Site Suitability Assessment of Crimean Juniper in the Acipayam District, Turkey. *Sains Malaysiana*, 42(10), 1439–1447.
- Gülsoy, S., Şentürk, Ö., Negiz, M.G. (2013). Hedef türler için gösterge bitki türlerinin sayısal metotlar kullanılarak tespiti: Acipayam Yöresi örneği. *SDÜ Orman Fakültesi Dergisi*, 14(1), 10-14.
- Güner, Ş.T., Özkan, K., Çömez, A., Çelik, N. (2011). İç Anadolu Bölgesi'nde Anadolu Karaçamı'nın (*Pinus nigra* subsp. *pallasiana*) verimli olabileceği potansiyel alanların odunsu gösterge türleri. *Ekoloji*, 20(80), 51–58.
- Hill, C. M. (2000). Conflict of Interest Between People and Baboons: Crop Raiding in Uganda. *International Journal of Primatology*, 21(2), 299–315.
- IGTHM. 2017. Isparta İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü. <http://isparta.tarim.gov.tr/Menu/9/Atabey>, (Erişim Tarihi: 19.09.2017).
- Kaya, C., Şentürk, Ö., Gülsoy, S., Negiz, M.G., Baş, M. (2017). Environmental and species indicators of *Pistacia terebinthus* L.: A case study from Gaziantep district. I. International Congress on Medicinal and Aromatic Plants: "Natural and Healthy Life" Book of Abstracts 09-11 May, P.203, Konya Turkey.
- Murie, O., J. and Elbroch, M. (2005). The Peterson Field guide to Animal Tracks. Houghton Mifflin Company, Boston New York, Printed in Singapore.
- Negiz, M.G., Eser, Y., Kuzugüdenli, E., Özkan, K. (2015). Indicator species of essential forest tree species in the Burdur district. *Journal of Environmental Biology*, 36(Special issue), 107-111.
- Oğurlu, İ., Aksan, Ş. (2013). Determination of indicator woody plant species for potential habitats of some wild mammalian species. *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 14(2), 81-87.
- Özen, A.S., Uluçay, İ. (2010). Kütahya İli *Meles meles* Linneus, 1758 (Mammalia: Carnivora)'ın bazı ekolojik, biyolojik ve taksonomik özellikleri. *Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21(1), 9–20.
- Özkan, K. (2002). Türler arası birlikteliğin interspesifik korelasyon analizi ile ölçümü. *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 2(1), 71–78.
- Özkan, K. (2004). Beyşehir Gölü Havzası'nda Anadolu Karaçamı'nın (*Pinus nigra* Arnold) yayılışı ile fizyografik yetiştirme ortamı faktörleri arasındaki ilişkiler. *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 2(1), 30–47.
- Özkan, K., Mert, A., Gülsoy, S. (2007). Beyşehir gölü havzası topraklarının bazı özellikleri ile toprak rengi ve strüktürü arasındaki ilişkiler. *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 2(1), 9–22.
- Süel, H. (2014). Isparta-Sütçüler yöresinde av türlerinin habitat uygunluk modellemesi. Doktora Tezi. SDÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Mühendisliği Anabilim Dalı, ISPARTA.
- Süel, H., Akdemir, D., Kıracı, A., Ünal, Y. (2016). The Indicatory Plant Species Of Wild Animals In The Gidengelmez Mountains District. 4th International Geography Symposium, Book of Proceedings, 23 - 26 May, Kemer, Antalya, TURKEY.
- Süel, H., Ertuğrul, E.T., Aksan, Ş., Ünal, Y., Akdemir, D., Cengiz, G., Bayrak, H., Ersin, M.Ö., Oğurlu, İ., Özkan, K., Özdemir, İ. (2013). Indicator Species of Habitat Preferences to Wildlife Animals in Köprüçay District. *GeoMed 2013. The 3rd International Geography Symposium*, 10-13 June, Kemer-ANTALYA, Türkiye. pp. 553-565
- Vijayan S., Pati B. P. (2002). Impact of Changing Cropping Patterns on Man-Animal Conflicts Around Gir Protected Area with Specific Reference to Talala Sub-District, Gujarat, India. *Population and Environment*, 23(6), 541–559
- Virgos, E., Cabezas-Diaz, S., Mangas, J. G., Lozano, J. (2010). Spatial distribution models in a frugivorous carnivore, the stone marten (*Martes foina*): is the freshy-fruit availability a useful predictor? *Animal Biology*, 60(4), 423–43.

(Received for publication 02 October 2017; The date of publication 15 August 2018)



Rare and undercollected liverworts from Turkey – including new province records

Mesut KIRMACI^{*1}, Harald KÜRSCHNER², Adnan ERDAĞ¹

¹ Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 09010 Kepez-Aydın, Turkey

² Freie Universität Berlin, Institut für Biologie, Altensteinstr. 6, D-14195 Berlin, Germany

Abstract

26 new regional records of liverworts are presented. They include species, which are re-collected after a long collection gap, often of more than 100 years ago or represent up to now rarely collected taxa or new records for several provinces.

Key words: Bryophyte, flora, distribution, phytogeography, Turkey

----- * -----

Türkiye’den yeni il kayıtlarını da içeren, nadir ve az toplanmış ciğerotları

Özet

Bu çalışmada il bazında 26 yeni ciğerotu sunulmuştur. Bunların bazıları iller için yeni kayıt, bazıları ise 100 yıllık bir zaman aralığından sonra tekrar toplanmış türleri içermektedir.

Anahtar kelimeler: Briyofit, flora, dağılım, fitocoğrafya, Türkiye

1. Introduction

Species knowledge and its distribution is of fundamental importance and urgently needed for the understanding of the dynamics and changes in ecosystems. This holds true for all organisms, including bryophytes. As bryophytes are found in a very broad array of ecosystems and landscapes they act as excellent monitoring tool to help us to understand sustainability of natural resources. Studying bryophytes therefore sheds light on distribution and ecology and is an important biological need for conservation of biodiversity and their rational use.

Since 2001, many new records and regional additions have been published which made it necessary to provide a new checklist for the Turkish bryophyte flora (Erdağ & Kürschner, 2017). However, species inventory and knowledge rarely comes to an end, especially in an ecological so highly divers country such as Turkey. Ongoing field studies therefore will reveal also in future new or rare species.

During several field excursions within the last years, carried out mainly in North, North-East (Karadeniz Dağları), and East Anatolia, the identification of our collections revealed several liverworts, which up to now are rarely collected in Turkey. Often it turned out that they represent first records for many provinces long the Black Sea coast. To the often neglected, less or none collected areas belong the Bayburt, Erzurum (e.g., Palandöken Dağları), Gümüşhane, Hâkkari, Kars and Van. But even well or best collected areas such as Artvin, Bolu, Düzce, Rize, or Trabzon areas present surprises when collecting liverworts. For a better understanding of the distributional patterns, migration processes in the past and presence, ecosystems, nature and the influence of sustainable livelihoods, 26 rare or rarely collected liverworts are presented in the following.

The treatment of families and genera strictly follows the most recent tentative system proposed by Frey & Stech (2009). Voucher specimens are kept at the herbarium of the Adnan Menderes University, Aydın (AYDN).

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905326028165; Fax.: +905326028165; E-mail: mkirmaci@gmail.com

2. Results and discussion

The records presented include species, which are re-collected for the first time after a long collection gap, often of more than 100 years ago or represent up to now rarely collected taxa or new province records. However, a wider distribution in Turkey can not be excluded, when carefully looked for these taxa in future.

Antheliaceae

Anthelia juratzkana (Limpr.) Trevis.

Second record for Turkey. Previously known only from a single locality from the Rize province [İkizdere, Başköy-Cermanin Yayla, (cf. Henderson & Muirhead, 1955)].

RIZE: İkizdere, Ovitdağı Geçidi, Aksu Göller area, 40°39'8.1''N 40°50'33.9''E, 3060 m, melting snow community, 15 September 2004 H. Kürschner & G. Parolly 04-955.

Cephaloziaceae

Fuscocephaloziopsis pleniceps (Austin) Váňa et L.Söderstr.

(Syn. *Cephalozia pleniceps* (Austin) Lindb.)

At present rarely collected in Turkey and known only from western Turkey (Uludağ, Walther, 1967) and the Artvin province (Abay et al., 2009).

First record for the Ağrı province.

AĞRI: Aras Güney Dağları, south of Yukarıkent Geçidi, between Kağızman and Ağrı, 8 km north of Cumaçay, 39°56'58"N, 43°15'48.7"E, 2072 m, in bog with *Sphagnum squarrosum*, 22 June 2014 M. Kırmacı & H. Kürschner 14-465.

Gymnomitriaceae

Gymnomitrium concinatum (Lightf.) Corda

At present rarely collected in Turkey and known only from three localities in north-eastern Anatolia (Artvin and Rize provinces, cf. Henderson, 1963). This is the second record of the rare species for the Rize province.

RIZE: İkizdere, Çağrankaya Yayla, 40°49'38"N, 40°38'11.3"E, 2130 m, on rock in *Drosera* bog, 21 July 2012 M. Kırmacı & H. Kürschner 12-194.

Jungermanniaceae

Liochlaena lanceolata Nees.

(Syn. *Jungermannia leiantha* Grolle)

First record for the Düzce province.

DÜZCE: Yiğılca area, Saklıkent Şelalesi, 40°56'59.3"N 31°29'07.8"E, 400 m, on calcareous rock with tufa formation, 26 June 2015, A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 15-251.

Nardia compressa (Hook.) Gray

Second record for Turkey. Previously known only from an older collection by H. v. Handel-Mazzetti 1907 from the Giresun province (cf. Schiffner, 1909).

First record for the Artvin province.

ARTVIN: Marsis Dağı, Yusufeli, Sarıgöl-Salikvan Yayla, above Zologara Yayla, 41°04'46.1"N 41°26'44"E, 2220 m, in flushes with *Sphagnum tenellum*, 25 June 2016 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 16-110.

Lophoziaceae

Barbilophozia sudetica (Nees ex Huebener) L. Söderstr., De Roo & Hedde.

First record for the Gümüşhane province.

GÜMÜŞHANE: Zigana Dağları, 40°37'49.4"N, 39°25'46.8"E, 2410 m, subalpine meadows and flushes, 19 July 2012 M. Kırmacı & H. Kürschner 12-156.

Gymnocolea inflata (Huds.) Dumort. subsp. *acutiloba* (Schiffn.) R. M. Schust. & Damsh. ex L. Söderstr. & Váňa

(Syn. *Gymnocolea acutiloba* (Schiffn.) Müll.Frib.)

Known at present only from two records from Turkey [Giresun (Schiffner, 1909) and Aydin provinces (Özenoğlu & Gökler, 2002)].

First records for the Düzce and Gümüşhane provinces.

DÜZCE: Yedigöller Milli Parkı, way to Devrek, 40°59'06.4"N 31°44'40.9"E, 430 m, on serpentine rock, 26 June 2015 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 15-264.

GÜMÜŞHANE: Torul, Kürtün, way from Çatalkaya to Kızılali Yayla, 40°49'02.8"N 39°03'27.08"E, 1800 m, on soil in *Fagus orientalis*-*Picea orientalis* forest, 27 June 2016 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 16-135.

Leiocolea alpestris (Schleich. ex F. Weber) Isov.

Second record for Turkey. Previously known only from an older collection by H. v. Handel-Mazzetti 1907 from the Trabzon province (cf. Schiffner, 1909).

First records for the Gümüşhane and Rize provinces.

Gümüşhane: Zigana Dağları, 40°37'49.4"N, 39°25'46.8"E, 2410 m, subalpine meadow and flushes, 19 July 2012 M. Kırmacı & H. Kürschner 12-150.

Rize: İkizdere, Ovitdağı Geçidi, Dağbaşı Gölü, 40°37'29.3"N, 40°46'53.8"E, 2700 m, swampy meadows and flushes, 20 July 2012 M. Kırmacı & H. Kürschner 12-181.

Lophozia excisa (Dicks.) Konstant. & Vilnet(Syn. *Lophozia excisa* (Dicks.) Dumort.)

Although known from the mountains of western (İzmir province, Crundwell & Nyholm, 1979) and southern Turkey (Hatay province, Ezer et al., 2009), the new record represents the first finding for northern Turkey and the Trabzon province.

TRABZON: South of Tonya, between Şarlı Yayla and Yıldız Yayla, Kızılağac Obası, 40°43'44.5"N, 39°17'03.3"E, 2130 m, subalpine meadow, 18 July 2012 M. Kırmacı & H. Kürschner 12-129.

Mesoptychia badensis (Gottsche ex Rabenh.) L. Söderstr. & Váňa(Syn. *Leiocolea badensis* (Gottsche) Jørg.)

First record for the Bolu province.

BOLU: Köroğlu Dağları, summit area of Kartalkaya Dağı above Kartal Otel, 40°35'18.9"N 31°47'50.6"E, 2120 m, subalpine flushes, partly submerged, 29 June 2015 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 15-313.

Mesoptychia turbinata (Raddi) L.Söderstr. et Váňa(Syn. *Leiocolea turbinata* (Raddi) H.Buch)

First record for the Erzurum province (e.g., Palandöken Dağları).

ERZURUM: Palandöken Dağları, Palandöken Geçidi, way to Küçük Palandöken, 39°49'10.12"N 41°19'14.6"E, 2930 m, alpine flushes, 22 June 2016 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 16-8.

Neoorthocaulis attenuatus (Mart.) L. Söderstr., De Roo & Hedd.(Syn. *Barbilophozia attenuata* (Mart.) Loeske)

Second record for Turkey. Previously known only from a single locality from the Artvin province [Tiryal Dağ above Murgul (Henderson, 1961)].

First record for the Trabzon province.

TRABZON: North of Soğanlı Geçidi, between Dumlu köyü and Karaçam/Çaykara, 40°39'23.2"N 40°14'06.6"E, 1950 m, on rock and soil, 28 June 2016 M. Kırmacı & H. Kürschner 16-175.

Schistochilopsis incisa (Schrad.) Konstant.(Syn. *Lophozia incisa* (Schrad.) Dumort.)

First record for the Gümüşhane province.

GÜMÜŞHANE: Zigana Dağları, 40°37'49.4"N, 39°25'46.8"E, 2410 m, subalpine meadows and flushes. 19 July 2012 M. Kırmacı & H. Kürschner 12-156.

Tritomaria quinquedentata (Huds.) H.Buch

Well known from north-eastern Anatolia (Rize province), but rarely collected in the north-western Karadeniz Dağları.

First record for the Düzce province.

DÜZCE: Yedigöller Milli Parkı, way to Devrek, 40°59'06.4"E, 31°44'40.9"E, 430 m, on serpentine rock, 26 June 2015 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 15-263.

Marchantiaceae***Marchantia polymorpha*** L. subsp. *montivagans* Bischl. et Boissel.-Dub.[*M. alpestris* (Nees) Burgeff]

M. polymorpha is present in Turkey with three subspecies: subsp. *montivagans*, *polymorpha*, and subsp. *ruderalis* (Erdağ & Kürschner, 2017). Except in subsp. *polymorpha*, the presence and distribution of the other two subspecies is only imperfectly known. The here presented locality data are the first records for the Erzurum, Rize and Van provinces.

ERZURUM: Erzurum Tekman road, Palandöken Dağları Geçidi, 39°51'38.2"N 41°20'24"E, 2550 m, on rock in subalpine flushes, 22 June 2016 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 16-24.

RİZE: İkizdere, Çimil Yayla, between Başköy and Çirmaniman Yaylası, Kalçarak Yayla, 40°43'31.5"N, 40°47'55.7"E, 2260 m, flushes, 23 July 2012 M. Kırmacı & H. Kürschner 12-244.

RİZE: İkizdere, Ovitdağı Geçidi, Dağbaşı Gölü, 40°36'59"N 40°46'22.8"E, 2800 m, flushes, 14 September 2004 H. Kürschner & G. Parolly 04-934.

VAN: Çatak-Bahçesaray, 37°59'21.2"N, 42°53'09.7"E, 2700 m, flushes, 18 June 2014 M. Kırmacı & H. Kürschner 14-381.

Ricciaceae***Riccia bifurca*** Hoffm.

Previously known from central (Erciyes Dağı, Bornmüller, 1931) and southern Turkey (Antalya province, Özçelik et al., 2016).

First record for the Rize province and north-east Anatolia.

RİZE: İkizdere, Ovitdağı Geçidi, Dağbaşı Gölü, 40°37'29.3"N, 40°46'53.8"E, 2700 m, peaty lake shore, 20 July 2012 M. Kırmacı & H. Kürschner 12-175.

Riccia glauca L.

Widely distributed in Turkey. The two collections presented, however, are the first one from the Erzurum and Kars provinces and north-east Anatolia.

ERZURUM: Çoruh valley, 12 km northeast of İspir, close to Öztoprak, 500-700 m, sandy-pepply banks and muddy pools along the Çoruh river, 27 August 1999 M. Döring, G. Parolly & D. Tolimir (7406), det. H. Kürschner.

KARS: North of Horasan, between Karaorgan and Sarıkamış, Handere Geçidi West of Sarıkamış, 40°16'22.7"N 42°29'21.1"E, 2320 m, boggy meadow, 29 June 2016 M. Kırmacı & H. Kürschner 16-180.

Riccia sorocarpa Bisch.

A widely distributed taxon in Turkey with a Mediterranean distribution pattern. The first record for the east Anatolian Hakkari province.

HAKKARI: Karadağ area, Nebirnov Yayla, 37°49'19.9"N, 43°40'36.2"E, 2920 m, flushes, 17 June 2014 M. Kırmacı & H. Kürschner 14-374.

Scapaniaceae

Scapania compacta (Roth) Dumort.

Widely distributed in western and south-western Turkey. First records for the Bayburt and Rize provinces and north-eastern Turkey.

BAYBURT: Soğanlı Geçidi, Dunlu köyü-Çaykara, 40°31'22.9"N 40°13'55.6"E, 2350 m, subalpine flushes, 28 June 2016 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 16-167.

RIZE: İkizdere, Ovitdağı Geçidi, Kızıldağ, 40°36'59''N 40°46'22.8''E, 2800 m, in flushes, 13 September 2004 H. Kürschner & G. Parolly 04-933.

RIZE: İkizdere, Ovitdağı Geçidi, Dağbaşı Gölü, 40°37'29.3"N, 40°46'53.8"E, 2700 m, swampy meadows and flushes, 20 July 2012 M. Kırmacı & H. Kürschner 12-176.

Scapania curta (Mart.) Dumort.

Second record for Turkey. Previously known only from an older collection by K. Krause 1926 from the Trabzon province (cf. Reimers, 1927).

First record for the Rize province.

RIZE: İkizdere, Ovitdağı Geçidi, Aksu Yayla-Aksu Göller area, 40°38'39.9''N 40°50'28.3''E, 2800 m, in flushes, 15 September 2004 H. Kürschner & G. Parolly 04-945.

RIZE: İkizdere, Ovitdağı Geçidi, Aksu Göller area, 40°39'08.1''N 40°50'33.9''E. 3060 m, on peat near lake shore, 15 September 2004 H. Kürschner & G. Parolly 04-962.

Scapania subalpina (Nees ex Lindenb.) Dumort.

First records for the Düzce, Bayburt and Artvin provinces.

DÜZCE: Yığılca-Yedigöller Milli Parkı, crossing Mengen/Bolu road, 40°58'44"N 31°44'20.5"E, 450 m, on soil in *Fagus orientalis* forest, 26 June 2015 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 15-253 !

DÜZCE: Yedigöller Milli Parkı, way to Devrek, 40°59'06.4"N 31°44'40.9"E, 430 m, on serpentine rock, 26 June 2015 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 15-261.

BAYBURT: Soğanlı Geçidi, Dunlu köyü-Çaykara, 40°31'22.9"N 40°13'55.6"E, 2350 m, in subalpine flushes, 28 June 2016 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 16-163.

ARTVIN: Marsis Dağı, Yusufeli, Sarıgöl-Salıkvana Yayla, above Zologara Yayla, 41°04'46.1"N 41°26'44"E, 2220 m, in flushes with *Sphagnum*, 25 June 2016 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 16-107.

Scapania undulata (L.) Dumort.

Widely distributed along the Black Sea coast (Karadeniz Dağları).

First record for the Gümüşhane province.

GÜMÜŞHANE: Torul district, Kürtün, between Kızılıyalı Yayla and Çatalkaya, 40°47'39.9"N 39°04'20.6"E, 1660 m, on rock, partly submerged, 27 June 2016 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 16-157.

Scapania verrucosa Heeg

Widely distributed along the Black Sea coast (Karadeniz Dağları).

First record for the Düzce province.

DÜZCE: Yedigöller Milli Parkı, way to Devrek, 40°59'06.4"N 31°44'40.9"E, 430 m, on serpentine rock, 26 June 2015 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 15-262.

Solenostomataceae

Solenostoma handelii (Schiffn.) Müll.Frib.

(Syn. *Jungermannia handelii* (Schiffn.) Amak.)

Previously known only from two older collections from Ordu and Trabzon provinces by H. v. Handel-Mazzetti 1907 (cf. Schiffner, 1909). For a long time thought to be an endemic of Turkey. Known also from Japan (Furuki & Mizutani, 1994) and meanwhile by collections of Crete and Spain (Frey et al., 2006). Probably a Tertiary relict species of the former widely distributed broad-leaved, deciduous *Fagus* forests of the Northern Hemisphere and along the Black Sea coast.

First record for the Rize province.

RIZE: Kaçkar Dağları, Anzer Yayla, Lapazeli Yatak Yayla, Öküz Yatağı, 40°31'55"N, 40°30'18.8"E, 2620 m, flushes, 22 July 2012 M. Kırmacı & H. Kürschner 12-222b.

Solenostoma obovatum (Nees) R.M.Schust.

(Syn. *Jungermannia obovata* Nees)

First record for the Bayburt province.

BAYBURT: Soğanlı Geçidi, Dunlu köyü-Çaykara, 40°31'22.9"N 40°13'55.6"E, 2350 m, in subalpine flushes, 28 June 2016 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 16-169.

Solenostoma sphaerocarpum (Hook.) Steph.

(Syn. *Jungermannia sphaerocarpa* Hook.)

Widely distributed in the mountains of Inner, West and North-East Anatolia.

First record for the Bayburt province.

BAYBURT: Soğanlı Geçidi, Dunlu köyü-Çaykara, 40°31'22.9"N 40°13'55.6"E, 2350 m, subalpine flushes, 28 June 2016 A. Erdağ, M. Kırmacı & H. Kürschner 16-164..

Acknowledgements

We special thanks to TÜBİTAK (the Scientific and Technological Research Council of Turkey) for financial support to Mesut Kırmacı (KBAG – 1113Z631).

References

- Abay, G., Uyar, G., Keçeli, T., Çetin, B. (2009). *Sphagnum centrale* and other remarkable bryophyte records from the Kaçkar Mountains (Northern Turkey). *Cryptogamie, Bryologie* 30, 399-407.
- Bornmüller, J. (1931). Zur Bryophyten-Flora Kleinasiens. *Magyar Botanikai Lapok* 30, 1-21.
- Crundwell, A. C., Nyholm, E. (1979). Some additions to the bryophyte flora of Turkey. I. Hepaticae. *Journal of Bryology* 10, 479-489.
- Erdağ, A., Kürschner, H. (2017). Türkiye Bitkileri Listesi. Karayosunları. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi, İstanbul.
- Ezer, T., Kara, R., Düzenli, A. (2009). The hornworts (Anthocerotae) and liverworts (Hepaticae) of the Mount Musa (Hatay-Turkey). *Botanika-Steciana* 13, 137-143.
- Frey, W., Frahm, J.-P., Fischer, E., Lobin, W. (2006). *The Liverworts, Mosses and Ferns of Europe*. English edition, ed. Blockeel, T. L., Harley Books, Colchester, Essex, England.
- Frey, W., Stech, M. (2009). Marchantiophyta, Bryophyta, Anthocerotophyta. – In: Frey, W. (ed.): *Syllabus of Plant Families. Adolf Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien*. 13th ed., Part 3: Bryophytes and seedless vascular plants. Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Furuki, T., Mizutani, M. (1994). Checklist of Japanese Hepaticae and Anthocerotae. *Proceedings of the Bryological Society of Japan* 6, 75-83.
- Henderson, D. M. (1961). Contributions to the bryophyte flora of Turkey: IV. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh 23, 263-278.
- Henderson, D. M. (1963). Contributions to the bryophyte flora of Turkey: VI. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh 25, 279-291.
- Henderson, D. M., Muirhead, C. W. (1955). Contributions to the bryophyte flora of Turkey. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh 22, 29-43.
- Özçelik, A. D., Uyar, G., Ören, M. (2016). Bryophyte flora of Gevne and Dimçayı Valleys (Antalya-Konya/Turkey). *Biological Diversity and Conservation* 9, 25-34.
- Özenoğlu, H., Gökler, I. (2002). Liverworts (Marchantiopsida) of the Dilek Peninsula National Park. *Turkish Journal of Botany* 26, 297-301.
- Reimers, H. (1927). Die von Prof. Dr. K. Krause in Kleinasien besonders im Pontus, 1926 gesammelten Leber- und Laubmoose. *Notizblatt des Botanischen Gartens und Museums zu Berlin-Dahlem* 10, 27-42.
- Schiffner, V. (1909). Hepaticae. – In: Handel-Mazzetti, H. v.: *Ergebnisse einer botanischen Reise in das Pontische Randgebirge im Sandschak Trapezunt*. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien* 23, 133-141.
- Walther, K. (1967). Beiträge zur Moosflora Westanatoliens I. Mitteilungen aus dem Staatsinstitut für Allgemeine Botanik in Hamburg 12, 129-186..

(Received for publication 13 October 2017; The date of publication 15 August 2018)



Effects of boric acid on electrolyte balance and lipid profile against renal ischemia/reperfusion injury

Ceyhan HACIOĞLU¹, Fatih KAR¹, Hakan ŞENTÜRK^{*2}, Güngör KANBAK¹

¹ Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Eskişehir, Turkey

² Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Eskişehir, Turkey.

Abstract

Renal ischemia/reperfusion injury may occur due to hypotension, hypovolemic shock, vascular occlusion and renal transplantation. The severity of the damage increases with the duration of ischemia. Renal ischemia/reperfusion injury can also cause distant tissue damage, especially in the kidney. Boric acid with antioxidant properties is suggested to be a protective agent against ischemia / reperfusion injury. The aim of this study was to investigate the effects of boric acid on serum lipid profile and electrolyte levels in renal ischemia/reperfusion injury. 35 rats were divided into five groups: sham, ischemia/reperfusion and ischemia/reperfusion+50 mg/kg boric acid, ischemia/reperfusion+100 mg/kg boric acid, ischemia/reperfusion+200 mg/kg boric acid. Sham group was only subjected to surgical stress procedure. In the ischemia/reperfusion group, left renal artery was isolated and ischemia was induced for 45 minutes with anti-traumatic vascular clamp, followed by 24-hour reperfusion. In ischemia/reperfusion+boric acid groups, boric acid was administered intraperitoneally 10 minutes before reperfusion. Serum sodium, potassium, triglyceride, cholesterol, LDL and HDL levels were determined. In the ischemia/reperfusion injury group, boric acid decreased increasing potassium, triglyceride, cholesterol and LDL levels, while increasing decreasing sodium and HDL levels ($p<0.05$). Increased lipid profile due to ischemia/reperfusion damage and balancing electrolyte balance were balanced by boric acid application. In conclusion, this study showed protective effects of boric acid against renal ischemia / reperfusion injury.

Key words: renal ischemia/reperfusion, boric acid, sodium, potassium, lipid profiles

----- * -----

Renal iskemi/reperfüzyon hasarına karşı borik asidin elektrolit dengesi ve lipit profili üzerine etkileri

Özet

Hipotansiyon, hipovolemik şok, damar tıkanıklığı ve böbrek transplantasyonu gibi nedenler ile renal iskemi/reperfüzyon hasarı oluşabilir. Hasarın şiddeti iskeminin süresi ile artmaktadır. Renal iskemi/reperfüzyon hasarı başta böbrek olmak üzere uzak doku hasarlarına da neden olabilmektedir. Antioksidan özelliklere sahip borik asit iskemi/reperfüzyon hasarlarına karşı koruyucu bir ajan olabileceği önerilmektedir. Bu çalışmanın amacı, renal iskemi/reperfüzyon hasarında borik asidin serum lipit profili ve elektrolit düzeyleri üzerindeki etkilerini araştırmaktır. 35 sıçan beş gruba ayrıldı: sham, iskemi/reperfüzyon ve iskemi/reperfüzyon+50 mg/kg borik asit, iskemi/reperfüzyon+100 mg/kg borik asit, iskemi/reperfüzyon+200 mg/kg borik asit. Sham grubuna sadece cerrahi stres prosedürü uygulandı. İskemi/reperfüzyon grubunda, sol renal arter izole edilerek, anti-travmatik vasküler klemplarıyla 45 dakika süreyle iskemi oluşturuldu, ardından 24 saat reperfüzyon uygulandı. İskemi/reperfüzyon+borik asit gruplarında, reperfüzyondan 10 dakika önce intraperitoneal olarak borik asit uygulandı. Serum sodyum, potasyum, trigliserit, kolesterol, LDL ve HDL düzeyleri belirlendi. Borik asit, iskemi/reperfüzyon hasarı grubunda artan potasyum, trigliserit, kolesterol ve LDL seviyelerini düşürürken, azalan sodyum ve HDL seviyelerini arttırmıştır ($p<0.05$). İskemi/reperfüzyon hasarına bağlı artan lipit profili ve bozulan elektrolit dengesi borik asit uygulaması ile dengelendi. Sonuç olarak, bu çalışma da, borik asidin renal iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkileri gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: renal iskemi/reperfüzyon, borik asit, sodyum, potasyum, lipit profili

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905327817981; Fax.: +905327817981; E-mail: hsenturk@ogu.edu.tr

1. Giriş

Böbrek, toksik maddeleri kandan arındırmak ve vücuttaki su, elektrolit ve asit-baz dengesini düzenlemek için hayati bir organdır. Bununla birlikte, diğer açılardan böbrek, peri-operatif dönemde iskemi/reperfüzyon hasarı gibi birçok hastalık sürecinin verdiği zarara karşı hassas bir organdır (Suzuki vd., 2008). Böbrekte iskemi/reperfüzyon (I/R), transplantasyon ve vasküler cerrahi durumlarında ortaya çıkan karmaşık bir sendromdur (Feng vd., 2016). I/R hasarı, akut böbrek hasarının önde gelen nedenlerinden birini temsil eder ve böbrek kan akımının geçici olarak kesilmesiyle oluşur. İskemi, çeşitli nedenlerle bir organa kan akışının yetersizliği veya durmasıdır. Reperfüzyon, iskemiye neden olan faktörü ortadan kaldırarak dokuya kan akışının restorasyonudur (Montalvo-Jave vd., 2008). I/R'nin, başlangıçta iskemik hasardan etkilenmeyen organlar üzerinde de yıkıcı bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Thurman, 2007).

İskemi/reperfüzyonun patogenezi tam olarak anlaşılamamış olsa da, mitokondriyal ATP oluşumunun azalması, hücre zarlarının selektif geçirgenliğinin kaybı, hücrel iyon homeostazının bozulması (hücre içi sodyum ve kalsiyumun yükselmesi) ile hidrolazların aktivasyonu ve hücre hasarına veya ölümüne neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin artması gibi çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal süreçler üzerinde etkileri vardır (de Groot ve Rauwen, 2007). ROS'un aşırı üretimi, antioksidan seviyelerde azalmaya ve oksidan/antioksidan dengesizliğinin ortaya çıkmasına yol açar (Aksit ve Bildik, 2014). Oksidatif stres sırasında ROS'un aşırı üretimi, nükleik asitlere, hücrel proteinlere ve lipitlere de zarar verir (Baykara vd., 2009). Bu tür hasarlar hücre ölümüne, organ işlev bozukluğuna ve organ kaybına neden olabilir. Bugüne kadar, I/R hasarlarının önlenmesi için birçok antioksidan ve antiinflatuar ajan değerlendirilmiştir (Sahin vd., 2013). Oksidatif stres sırasında oluşan ROS, lipit peroksidasyonunu başlatabilir, proteinleri okside edebilir ve DNA iplikçiklerinin kırılmasına neden olabilir ve bunların hepsi normal hücrel fonksiyona zarar verebilir. Lipit peroksidasyonu, hücrel membranların oksidatif tahribatına yol açan bir otokatalitik mekanizmadır ve bunların yıkımı, toksik reaktif metabolitlerin üretilmesine ve hücre ölümüne yol açabilir (Pincemail vd., 1993). Böbrek hasarından sorumlu olan iskemi/reperfüzyon, meydana geldiği doku başta olmak üzere diğer çevre dokularda da ROS üretimini arttırdığı gösterilmiştir (Dobashi vd., 2002). ROS aşırı üretimi ile indüklenen ve lipit peroksidasyonun bir ürünü olan okside haldeki düşük yoğunluklu lipoprotein (oks-LDL), post-iskemik dönemde böbrek yetmezliğinin önemli bir nedeni olarak tanımlanmıştır (Troncoso vd., 1995). Paraoksonaz (PON-1), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) üzerinde bulunan bir esteraz enzimidir (Mackness vd., 1998). Bir antioksidan enzim olan PON-1, lipit peroksidlerin oluşumunu önleyerek düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu geciktirdiği bilinmektedir (Paragh vd., 1998). Kronik böbrek yetmezliği durumunda artmış oksidatif stres, PON-1 aktivitesini düşürerek serum lipit profillerini değiştirerek hiperkolesterolemiye neden olduğu bildirilmiştir (Ayub vd., 1999).

Bor (B), periyodik tablonun 13. Grubunda yer alan metal olmayan bir elementtir. Borik asit, vücuda alındıktan sonra sindirim sonrası borun en muhtemel şeklidir ve hidroksil grupları sayesinde biyomoleküller ile etkileşim bilmektedir (Greenwood ve Earnshaw, 1984). Borik asit mineral ve hormonal metabolizmalarda, hücre membran fonksiyonlarında ve enzim reaksiyonlarında önemli bir rol oynamaktadır (Forrest ve Nielsen, 2008). Borik asidin, oksidatif hasara karşı DNA için koruyucu bir madde olarak potansiyeli olduğu öne sürülmektedir (Guindon vd., 2007). Ayrıca, bor bileşikleri, hayvanlarda hem in vitro hem de in vivo olarak etkili antiosteoporotik, antiinflatuar, hipolipidemik, antikoagülan ve antineoplastik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Benderdour vd., 1998).

Son zamanlarda borik asidin koruyucu ve antioksidan etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Colak vd., 2011). Borik asidin renal I/R'ye bağlı hasarı önleyip önleyemeyeceği tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle, bu deneysel çalışmada, borik asidin renal I/R hasarına karşı koruyucu etkileri olup olmadığını ortaya koymak için serum lipit profili ve elektrolit seviyelerini araştırdık.

2. Materyal ve yöntem

Çalışma için gerekli etik kurul onayı ESOĞÜ Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulu'dan alındı. Deneysel çalışmamızda 180-220 gram ağırlıkta, sağlıklı, 3-4 aylık, Sprague Dawley cinsi, dişi sıçanlar arasından rastgele seçimle her bir grupta 7 sıçan olmak üzere toplam 5 grupta 35 adet sıçan kullanıldı. Deneyle gruplarının tasarımı ve uygulanan deneysel prosedür işlemleri Tablo 1.'de gösterilmiştir. Deneyle hayvanlarına uygulanan borik asit çözeltisi 0,5 mL serum fizyolojik (SF) solüsyon içerisinde, sırasıyla 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda borik asit içecek şekilde, çalışmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

2.1 Nefroktomi İşlemleri

Nefroktomi uygulanacak deneyle hayvanlarına intramüsküler yol ile 10 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin anestezisi uygulandı. Deneyle hayvanları, anestezisi altında sıcaklığı sabit diseksiyon tablasına, rektal ısı takibi yapılarak sırt üstü pozisyonda tespit edildi. Cerrahi uygulama bölgesinin temizliği %70'lik etil alkol ile sağlanıp steril şartlar altında sağ böbrek nefroktomisi gerçekleştirildi. Her bir sıçana yapılan nefroktomiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olmak için karın boşluğuna steril SF verildi. Kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek sütürlü dikilerek kesi bölgesi kapatıldı. Cerrahi işlem görmüş her bir hayvan kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli şeffaf kafeslere ayrı ayrı koyularak 15 gün süreyle iyileşmesi sağlandı.

2.2 I/R Uygulanması

I/R yapılacak sıçanlara anestezi altında midline laparotomi yapıldı. Sol renal arter izole edilerek, antitravmatik vaskular klemp yardımıyla 45 dakika süre ile kan akışı durduruldu. 45 dakika iskeminin hemen ardından 24 saat reperfüzyon uygulandı. Reperfüzyon süresince kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olmak için karın boşluğuna steril SF verildi. Bu işlemin ardından kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek sütürlle dikilerek kesi bölgesi kapatıldı.

2.3 Anestezi İşlemi

Tüm cerrahi işlemler steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirildi. Deney gruplarına ait hayvanlara intramuskular olarak 10 mg.kg-1 ksilazin ve 70 mg.kg-1 ketamin anestezisi uygulandı. Deney gruplarına ait hayvanlar reperfüzyon süresinin bitiminde ketamin/ksilazin anestezisi altında diseksiyonları gerçekleştirildi ve intrakardiyak olarak kalpten bütün kanın alınması ile yaşamları sonlandırıldı.

2.4 Doku Örneklerinin Analizi

Deney işlemlerinin sonunda intrakardiyak olarak alınan kan, biyokimyasal analizlerin yapılması için jelli biyokimya tüplerine konuldu. Alınan kan örnekleri 10 dk 3000 rpm'de santrifüjlenerek serumlar elde edildi. Serum örnekleri polietilen tüplere aktarılarak analiz süresine kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. Serumda sodyum (Na), potasyum (K), trigliserit, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve kolesterol düzeyleri ROCHE-COBAS C-501 otoanalizör cihazında ölçülmüştür.

2.4 İstatistiksel Analiz

Sonuçlar Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk normallik testleri kullanılarak değerlendirildi. Deney grupları arasındaki farkı belirlemek için tek yönlü ANOVA testi yapıldı ve tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal değer (p) olarak ortaya çıkan deney grupları arasındaki farklar, p<0,05 önem derecesinde anlamlı olarak kabul edildi. Çoklu karşılaştırmalarda Tukey testi ve Tamhane T2 testi kullanıldı. İstatistiksel analiz SPSS Versiyon 21.0 tarafından yapıldı.

Tablo 1. Deney gruplarının tasarımı ve deneysel prosedür

Gruplar	Grup İsimleri	Yapılan İşlemler	Hayvan Sayısı
Grup 1	Sham Grubu	Bu grup deney hayvanlarına nefroktomi işlemi uygulanarak 15 gün süreyle iyileşmenin olması beklendi. İyileşmenin sonrasında, iskemi işlemi yapılmadan 0,5 mL serum fizyolojik, reperfüzyon süresinden 10 dakika önce intraperitoneal olarak enjekte edildi. 24 saat reperfüzyon bitiminde anestezi altında deney hayvanları sakrifiye edilerek diseksiyonları gerçekleştirildi.	7
Grup 2	I/R Grubu	Bu grup deney hayvanlarına nefroktomi işlemi uygulanarak 15 gün süreyle iyileşmenin olması beklendi. İyileşmenin sonrasında, her bir hayvana 45 dakika boyunca iskemi uygulandı. Reperfüzyondan 10 dakika önce, 0,5 mL serum fizyolojik intraperitoneal olarak enjekte edildi. 24 saat reperfüzyon sonrasında anestezi altında deney hayvanları sakrifiye edilerek diseksiyonları gerçekleştirildi.	7
Grup 3	I/R +50 mg/kg Borik asit	Bu gruptaki deney hayvanlarına nefroktomi işlemi uygulanarak 15 gün süreyle iyileşmenin olması beklenildi. İyileşmenin sonrasında, her bir hayvana 45 dakika boyunca iskemi uygulandı. Reperfüzyondan 10 dakika önce, 50mg/kg borik asit, 0,5 mL serum fizyolojik içerisinde çözülerek intraperitoneal olarak enjekte edildi. 24 saat reperfüzyon sonrasında anestezi altında deney hayvanları sakrifiye edilerek diseksiyonları gerçekleştirildi.	7
Grup 4	I/R +100 mg/kg Borik asit	Bu gruptaki deney hayvanlarına nefroktomi işlemi uygulanarak 15 gün süreyle iyileşmenin olması beklenildi. İyileşmenin sonrasında, her bir hayvana 45 dakika boyunca iskemi uygulandı. Reperfüzyondan 10 dakika önce, 100mg/kg borik asit, 0,5 mL serum fizyolojik içerisinde çözülerek intraperitoneal olarak enjekte edildi. 24 saat reperfüzyon sonrasında anestezi altında deney hayvanları sakrifiye edilerek diseksiyonları gerçekleştirildi.	7
Grup 5	I/R +200 mg/kg Borik asit	Bu gruptaki deney hayvanlarına nefroktomi işlemi uygulanarak 15 gün süreyle iyileşmenin olması beklenildi. İyileşmenin sonrasında, her bir hayvana 45 dakika boyunca iskemi uygulandı. Reperfüzyondan 10 dakika önce, 200mg/kg borik asit, 0,5 mL serum fizyolojik içerisinde çözülerek intraperitoneal olarak enjekte edildi. 24 saat reperfüzyon sonrasında anestezi altında deney hayvanları sakrifiye edilerek diseksiyonları gerçekleştirildi.	7

3. Bulgular

Tablo 2’de görüldüğü gibi, I/R grubunda potasyum, LDL, trigliserit, ve kolesterol seviyelerinde sham grubuna kıyasla istatikselsel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$). Fakat, I/R grubu sham grubu ile karşılaştırıldığında serum sodyum ve HDL seviyelerinde istatikselsel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,05$).

50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda uygulanan borik asit konsantrasyonları I/R grubu ile karşılaştırıldığında serum sodyum seviyelerinde istatikselsel olarak anlamlı bir artışın olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Sham grubuna en yakın iyileşmeyi 50 mg/kg borik asit dozunda sağlamıştır (Tablo 2).

I/R grubu ile karşılaştırıldığında borik asidin 50 ve 100 mg/kg dozları serum potasyum seviyelerindeki istatikselsel anlamlı bir düşüş sağlarken, 200 mg/kg dozdaki borik asit uygulaması anlamlı bir azalma göstermemiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Borik asidin serum lipit profili ile sodyum ve potasyum değerleri üzerine etkilerinin sonuçları

Gruplar	Sodyum (mmol/L)	Potasyum (mmol/L)	Trigliserit (mg/dL)	Kolesterol (mg/dL)	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)
Sham Grubu	146,37±5,82	5,08±0,73	31,25±2,77	30,47±1,32	7,45±2,03	39,46±1,85
I/R Grubu	119,14±3,61*	7,11±0,48*	51,61±4,12*	47,37±2,15*	15,64±1,25*	36,32±2,67*
I/R +50 mg/kg Borik asit	140,08±4,17**	5,25±1,16**	36,52±3,71**	34,58±2,03**	9,05±2,14**	36,71±2,46
I/R +100 mg/kg Borik asit	132,24±4,17**	5,48±0,75**	43,26±1,04**	37,26±2,62**	12,16±1,55**	35,25±1,67
I/R +200 mg/kg Borik asit	137,15±2,51**	6,14±1,24	45,52±2,53**	45,23±3,45	14,73±1,36	37,91±3,81

*Veriler, her grupta 7 hayvandan ortalama ± standart hata olarak sunulmuş ve tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiş ve ardından Tukey HSD testi ile analiz edilmiştir. $p<0,05$ Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ** $p<0,05$ Sigara dumanı grubuna göre karşılaştırıldığında.

Tüm borik asit dozları renal I/R hasarı sonucu artmış trigliserit seviyelerinde istatikselsel olarak anlamlı bir düşüş sağlamıştır ($p<0,05$). Tablo 2’de görüldüğü gibi, sham grubu trigliserit seviyelerine en yakın azalma 50 mg/kg borik asit dozunda bulunmuştur.

I/R grubu, I/R+50 mg/kg borik asit ve I/R+100 mg/kg borik asit grupları ile karşılaştırıldığında kolesterol ve LDL seviyelerinde istatikselsel olarak anlamlı bir düşüşün olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Başka bir değişle, I/R hasarına karşı artış gösteren kolesterol ve LDL seviyeleri, 50 ve 100 mg/kg dozlarda borik asit uygulamasıyla anlamlı bir düşüş göstermiştir. Oysa, 200 mg/kg borik dozu, kolesterol ve LDL seviyeleri bakımından I/R grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir düşüş göstermemiştir (Tablo 2).

Sham grubu ile karşılaştırıldığında renal I/R hasarı HDL seviyeleri istatikselsel olarak anlamlı bir düşüşe neden olmuştur ($p<0,05$). I/R grubuna kıyasla, uygulanan tüm borik asit dozları anlamlı bir iyileşme göstermemiştir (Tablo 2).

4. Sonuçlar ve tartışma

Böbrek transplantasyonu, parsiyel nefrektomi ve renal arter anjiyoplasti gibi birçok klinik durumda böbrek kan akımının geçici olarak kesilmesi ile karşılaşmaktadır (Paller, 1998). Bu geçici kan akımındaki devamsızlık, renal I/R hasarına neden olur. İskemi ve reperfüzyon sonucu oluşan renal I/R hasarı, histopatolojik olarak geniş tübüler hasara, tübüler hücre nekrozuna, glomerüler hasara ve tübüler tıkanmaya neden olan bulgular ile karakterizedir (Chatterjee vd., 1999). Bu tübüler ve glomerüler disfonksiyonun çoğu, anoksiyi takip eden reperfüzyon periyodu sırasında ortaya çıkan ROS tarafından kaynaklanmakta ve reperfüzyon hasarına katkıda bulunan başlıca faktörlerden biri olarak da kabul edilmektedir (Chatterjee vd., 2000). I/R hasarında, ROS, biyolojik membranlarda ve serumda bulunan lipitler ile reaksiyona girerek lipit peroksidasyonuna yol açmakta, bu da iyon kanallarına ve DNA'ya zarar vererek hücrel ve metabolik süreçleri sekteye uğratmaktadır (Singh vd., 2004).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar da, kronik hastalıklar için en önemli risk faktörlerinden lipit profillerinin ve elektrolit dengesinin düzenlenmesini sağlayan potansiyel koruyucu ajanların ortaya konmasına odaklanmıştır. Bu çalışma, borik asidin böbrek I/R hasarına karşı serum lipit profili ve elektrolit dengesi açısından koruyucu etkisinin ortaya konulduğu ilk çalışmadır. Borik asit, böbrek I/R hasarı sonucu meydana gelen patofizyolojik yolların çeşitli basamaklarını etkileyebilir. En muhtemel mekanizma, doğrudan veya dolaylı olarak ROS temizleyici olarak hareket ederek serum ozmolit dengesini sağlamasıdır.

Çalışmamızda, iskemiye indüklediğimiz sıçanlarda sham grubuna göre, sodyum ve potasyum değerleri arasında istatikselsel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. Bu olgu iskemi modelimizin sonuçta ortaya çıkan anormal serum sodyum ve potasyum düzeyleri ile nefropatiye neden olabileceğini göstermektedir. İskemi sonrası borik asit tedavisinin

uygulandığı sıçanlarda, iskemi nedeniyle azalan soyum seviyelerinin yeniden arttığını gözlemledik. Benzer şekilde I/R hasarına bağlı olarak artan serum potasyum seviyeleri borik asit uygulanması sonrasında bir düşüşün olduğu bulunmuştur. Renal I/R hasarının serum potasyum seviyelerini artırırken (Sagiroglu vd., 2012), sodyum seviyelerini de düşürdüğü (Pektas vd., 2014; Bazzano vd., 2015) önceki çalışmalar da bildirilmiştir. Bu çalışmada, antioksidan özellikleri sayesinde borik asit, I/R bağlı artan oksidatif hasarı azaltarak/gidererek, azalan serum sodyum seviyelerini arttırarak ve artan serum potasyum seviyelerini düşürerek, böbrek tübül fonksiyonları üzerinde koruyucu etkilere sahip olduğunu söyleyebiliriz.

İskemi sonrası borik asit uygulanması, sham grubu ile I/R gruplarının serum lipid profillerinin karşılaştırıldığında, renal iskemi grubundaki serum trigliserit düzeyleri sham grubuna göre %64.5'e varan artışla 51.61 ± 4.12 mg/dl olduğu bulunmuştur. I/R grubundaki yüksek trigliserit düzeyleri, iskemiden kaynaklı lipoprotein lipaz aktivitesinin azalmasına bağlı olabileceği bildirilmiştir (Sharifkan vd., 2012). I/R sonrası 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda borik asit tedavisi, serum trigliserit seviyelerini I/R grubuna göre sırasıyla %29.9, 15.7, ve 11.8 oranlarında düşürmüştür (Tablo 2). Lipitler, I/R patogenezinde önemli bir rol oynayan aktivemetabolik maddeleri içeren heterojen bir gruptur. I/R sırasında en sık görülen lipit anormallikleri hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemi (Riesen ve Mordasini, 2008), ki bu çalışmada da ortaya konmuştur. Benzer şekilde, artan trigliserit seviyeleri lipaz aktivitesindeki azalmaya bağlı olabileceken, borik asit tedavisi sonra düşen trigliserit seviyesi, borik asidin ROS süpürücü özelliği sayesinde azalan lipit oksidasyonundan veya artmış lipaz aktivitesinden kaynaklanabilir. Bu çalışmada, I/R sonrası sıçanların serumunda hiperlipidemi doğrulanmıştır.

Tablo 2'de görüldüğü gibi, I/R grubu sham grubu ile karşılaştırıldığında kolesterol ve LDL seviyeleri sırasıyla %56.6 ve %114.2 artarken, HDL seviyeleri %7.6 azalmıştır. 50 mg/kg dozdaki borik asit tedavisi ile I/R grubundaki kolesterol seviyesini %37.5 düşürerek, sham grubu kolesterol seviyesine en yakın sonuç elde edilmiştir. Benzer şekilde, 50 mg/kg dozdaki borik asit tedavisi ile I/R grubundaki LDL seviyesini %39.4 düşürerek, sham grubu kolesterol seviyesine en yakın sonuç elde edilmiştir. Öte yandan, iskemi sonrası uygulanan farklı dozlardaki borik asit konsantrasyonları serum HDL seviyelerinde ılımlı bir artış sağlasa da, borik asit renal I/R hasarına karşı meydana gelen HDL seviyelerindeki değişiklikler üzerinde etkili olamamıştır. Sonuçlarımız literatür ile de paralel olarak, renal I/R hasarı sonrası serum trigliserit, kolesterol ve LDL seviyeleri artarken, HDL seviyelerinde bir düşüş olduğunu ortaya koymuştur (Bhalodia vd., 2009). Borik asit tedavisine bağlı LDL, trigliserit ve kolesterol seviyelerindeki azalış ile HDL seviyelerindeki makul artış, lipit oksidasyonundaki azalma ile açıklanabilir. Serum lipit oranlarındaki değişiklikler, lipoprotein lipaz aktivitesindeki artış ile birlikte dolaşımdaki trigliseritlerin yakıt olarak kullanımının artması (Nounou vd., 2012) ve borik asit sayesinde ROS temizlenmesinin bir artışı olabilir. Bu enzimin aktivasyonundaki artış ile de çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (VLDL) HDL'ye dönüşümü hızlandırılmaktadır (Lee ve Prasad, 2003).

Sonuç olarak, renal iskemi indüksiyonundan sonra intraperitonel olarak borik asidin uygulanması, serum lipit profilini ve elektrolit dengesini düzenleyerek böbrek hasarına karşı koruyabilir. Borik asidin antioksidan özellikleri sayesinde, renal I/R'ye karşı lipit peroksidasyonunu azaltabilecek bir koruyucu ajan olarak kullanılabileceğinden serum lipit profilinin düzenlenmesine de katkı sağlayabilir. Bu, borik asidin renal I/R hasarı nedeniyle meydana gelen artmış lipit ve potasyum seviyelerine karşı düşürücü etkileri hakkında yapılan ilk çalışmadır. Fakat, borik asidin lipit profilini düzenlediğinden bahsederken, lipoprotein lipaz aktivitesi üzerindeki etkilerine bakılmamış olmaması bu çalışma için önemli bir limitasyondur. Borik asidin I/R hasarını önlemedeki rolünü daha fazla araştırmak için daha titizlikle tasarlanmış çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

- Aksit, H., Bildik, A. (2014). Determination of DNA Damage in Experimental Liver Intoxication and Role of N-Acetyl Cysteine. *Cell Biochemistry Biophysics*, 70, 1119-1125.
- Ayub, A., Mackness, M.I., Arrol, S., Mackness, B., Patel, J., Durrington, P.N. (1999). Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19, 330-335.
- Baykara, B., Tekmen, I., Pekcetin, C., Ulukus, C., Tuncel, P., Sagol, O., Ormen, M., Ozogul, C. (2009). The protective effects of carnosine and melatonin in ischemia reperfusion injury in the rat liver. *Acta Histochemica*, 111, 42-51.
- Bazzano, T., Restel, T.I., Porfirio, L.C., Souza, A.S., Silva, I.S. (2015). Renal biomarkers of male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) undergoing renal ischemia and reperfusion. *Acta Cirurgica Brasileira*, 30(4), 277-88.
- Benderdour, M., Bui-Van, T., Dicko, A., Belleville, F. (1998). In vivo and in vitro effects of boron and boronated compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 121, 2-7.
- Bhalodia, Y., Sheth, N., Vaghasiya, J., Jivani N. (2009). Cardiac Damage Induced by Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Hyperlipidemic Rats: Role of PPAR- α Agonist. *Hong Kong Journal of Nephrology*, 11, 59-65.
- Chatterjee, P.K., Cuzzocrea, S., Brown, P.A., Zacharowski, K., Stewart, K.N., Mota-Filipe, H., Thiemermann, C. (2000). Tempol, a membraneporeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney International*, 58, 658-73.
- Chatterjee, P.K., Cuzzocrea, S., Thiemermann, C. (1999). Inhibitors of poly (ADPribose) synthetase protect rat proximal tubular cells against oxidant stress. *Kidney International*, 56, 973-84.

- Colak, S., Geyikoglu, F., Keles, O.N., Türkez, H., Topal, A., Unal, B. (2011). The neuroprotective role of boric acid on aluminum chloride-induced neurotoxicity. *Toxicology and Industrial Health*, 27(8), 700-710.
- de Groot, H., Rauwen, U. (2007). Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenic networks: a review. *Transplantation Proceedings*, 39, 481-4.
- Dobashi, K., Singh, I., Orak, J.K., Asayama, K., Singh, A.K. (2002). Combination therapy of N-acetylcysteine, sodium nitroprusside and phosphoramidon attenuates ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 240, 9-17.
- Feng, W., Tang, R., Ye, X., Xue, C., Liao, Y. (2016). Identification of Genes and Pathways Associated with Kidney Ischemia-Reperfusion Injury by Bioinformatics Analyses. *Kidney and Blood Pressure Research*, 41, 48-54.
- Forrest, H., Nielsen, F.H. (2008). Is boron nutritionally relevant? *Nutrition Reviews*, 66, 183-191.
- Greenwood, N.N., Earnshaw, A. (1984). *Chemistry of the elements*. UK: Pergamon Press.
- Guindon, K.A., Bedard, L.L., Massey, T.E. (2007). Elevation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA from isolated mouse lung cells following in vivo treatment with aflatoxin B-1. *Toxicological Sciences*, 98, 57-62.
- Lee, P., Prasad, K. (2003). Effects of flaxseed oil on serum lipids and atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 8(3), 227-235.
- Mackness, B., Durrington, P.N., Mackness, M.I. (1998). Human serum paraoxonase. *General Pharmacology*, 31, 329-336.
- Montalvo-Jave, E.E., Escalante-Tattersfield, T., Ortega-Salgado, J.A., Pina, E., Geller, D.A. (2008). Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *Journal of Surgical Research*, 147, 153-159.
- Nounou, H.A., Deif, M.M., Shalaby, M.A. (2012). Effect of flaxseed supplementation and exercise training on lipid profile, oxidative stress and inflammation in rats with myocardial ischemia. *Lipids in Health and Disease*, 11, 129.
- Paller, M.S. (1998). Acute renal failure: Controversies, clinical trials, and future directions. *Seminars in Nephrology*, 18, 482-9.
- Paragh, G., Seres, I., Balogh, Z., Varga, Z., Karpati, I., Matyus, J., Ujhelyi, L., Kakuk, G. (1998). The serum paraoxonase activity in patients with chronic renal failure and hyperlipidemia. *Nephron*, 80, 166-170.
- Pektas, A., Gemalmaz, H., Balkaya, M., Ünsal, C., Yenisey, Ç., Kılıçarslan, N., Çulhacı, N. (2014). The short-term protective effects of lycopene on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Turkish Journal of Urology*, 40(1), 46-51.
- Pincemail, J., Delfraigne, J.O., Franssen, C., Bonnet, P., Deby-Dupont, G., Pirenne, J., Deby, C., Lamy, M., Limet, M., Merisse, M. (1993). Evidence for free radical formation during human kidney transplantation. *Free Radical Biology and Medicine*, 15, 343-8.
- Riesen, W.F., Mordasini, R.C. (2008). Update of lipid lowering therapy. *Praxis*, 97, 1179-1184.
- Sagiroglu, T., Torun, N., Yagci, M., Yalta, T., Sagiroglu, G., Oguz, S. (2012). Effects of apelin and leptin on renal functions following renal ischemia/reperfusion: An experimental study. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3(5), 908-914.
- Sahin, T., Begeç, Z., Toprak, H.İ., Polat, A., Vardi, N., Yücel, A., Durmuş, M., Ersoy, M.Ö. (2013). The effects of dexmedetomidine on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Surgical Research*, 183, 385-90.
- Sharifkan, A., Marjani, A., Zaker, F. (2012). Serum lipid profiles in acute myocardial infarction patients in Gorgan. *Biomedical Research*, 23(1), 19-124.
- Singh, D., Chander, V., Chopra, K. (2004) The effect of quercetin: A bioflavonoid on ischemia/reperfusion induced renal injury in rats. *Archives of Medical Research*, 35, 484-94.
- Suzuki, C., Isaka, Y., Takabatake, Y., Tanaka, H., Koike, M., Shibata, M., Uchiyama, Y., Takahara, S., Imai, E. (2008). Participation of autophagy in renal ischemia/reperfusion injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368, 100-106.
- Thurman, J.M. (2007). Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clinical Immunology*, 123, 7-13.
- Troncoso, P., Dominguez, J., Martinez, L., Zambrano, N. (1995). Oxidative damage markers in a renal ischemic-reperfusion model: the protective effect of monoamine oxidase inhibition. *Transplantation Proceedings*, 27, 1836-1838.

(Received for publication 17 May 2018; The date of publication 15 August 2018)



Seasonal distribution of epilithic and planktonic algae in estuary zone of Aksu Stream (Isparta, Antalya/Turkey)

Nezire Lerzan ÇİÇEK *¹

¹ Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Temel Bilimleri Bölümü, Isparta, Turkey

Abstract

Epilithic and planktonic algae samples were investigated seasonally between August 2012-April 2013 in estuary zone of Aksu Stream (Isparta-Antalya). During the study period total 44 taxa belong to Bacillariophyta (42), Chlorophyta (1), Cyanobacteria (Cyanophyta) (1) were identified in epilithic habitat, and total 56 taxa belong to Bacillariophyta (26), Charophyta (6), Chlorophyta (9), Cyanophyta (Cyanobacteria:4), Euglenophyta (Euglenozoa:1), Miozoa (9), Ochrophyta (1) in phytoplankton of estuary zone. During the research dominance, frequency and diversity of benthic and planktonic algae were varied according to seasons. *Rhoicosphenia abbreviata* (C.Agardh) Lange-Bertalot, *Pantocsekiella ocellata* (Pantocsek) K.T.Kiss & E.Ács, *Nitzschia sigma* (Kützing) W. Smith were dominant taxa in benthic, and *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen, *Ulnaria ulna* (Nitzsch) Compère, *Tripos furca* (Ehrenberg) F.Gómez,

Closterium aciculare T.West were dominant taxa in phytoplankton. As seasonally according to the mean values, highest diversity was determined in summer season in benthic, and in autumn season in phytoplankton.

Key words: : epilithic algae, estuary, phytoplankton, Aksu Stream, diversity

----- * -----

Aksu Çayı (Isparta-Antalya) nehirağzı bölgesi epilithic ve planktonik alglerinin mevsimsel dağılımı

Özet

Aksu Çayı nehirağzı bölgesinin epilithic ve planktonik alg örnekleri Ağustos 2012-Nisan 2013'de mevsimsel olarak incelenmiştir. Araştırma süresince epilithic habitatda, Bacillariophyta (42), Chlorophyta (1), Cyanophyta (1) bölümlerine ait toplam 44 takson, nehirağzı bölgesi fitoplanktonunda Bacillariophyta (26), Charophyta (6), Chlorophyta (9), Cyanophyta (Cyanobacteria:4), Euglenophyta (Euglenozoa:1), Miozoa (9), Ochrophyta (1) bölümlerinden toplam 56 takson saptanmıştır. Araştırma süresince bentik ve planktonik alg taksonlarının baskınlık, sıklık ve çeşitlilik değerleri mevsimlere göre değişim göstermiş, *Rhoicosphenia abbreviata* (C.Agardh) Lange-Bertalot, *Pantocsekiella ocellata* (Pantocsek) K.T.Kiss & E.Ács, *Nitzschia sigma* (Kützing) W. Smith bentikte, *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen, *Ulnaria ulna* (Nitzsch) Compère, *Tripos furca* (Ehrenberg) F.Gómez, *Closterium aciculare* T.West fitoplanktonda baskın taksonlar olmuştur. Mevsimsel olarak belirlenen ortalama değerlere göre, en yüksek çeşitlilik bentikte yaz, fitoplanktonda ise sonbahar döneminde belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: epilithic alg, nehirağzı, fitoplankton, Aksu Çayı, çeşitlilik

1. Giriş

Nehirağzı bölgeleri yerkürenin önemli sucul bileşenlerinden biri olup, nehir ve denizleri birbirine bağlayan yüksek dinamiğe sahip sistemlerdir. (Chaudhuri vd., 2012; Dixit vd., 2013). Bu sistemler genellikle kıyısız bölgenin dar olduğu alanlarda tatlı su ve deniz suyunun karışımından oluşan acı su (miksohalin) ortamlarını içerirler (Kocataş, 2006). Evsel, endüstriyel atıklar nehirağzı sistemlerini etkileyen önemli faktörler olmakla birlikte, yüzey akışı, sel suları, mevsimsel değişimler de oldukça önemli etkiye sahiptir (Dixit vd., 2013).

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902462118688; Fax.: +02462118697; E-mail: lerzancecek@gmail.com

Fitoplankton tüm su kütlelerindeki besin zincirinin en önemli bileşenidir. Bütün diğer tüm canlılar direk ya da dolaylı olarak beslenmelerini algler ile sağlamaktadır. Bu nedenle herhangi bir su kütleindeki fitoplanktonun hem bolluğunun hem de türlerinin belirlenmesi sadece su kütlelerinin verimliliğinin saptanması açısından değil aynı zamanda diğer canlıların yaşam döngüsü ve dinamiklerinin belirlenmesi açısından önemlidir. Nehirağzı fitoplankton komunitası iklimsel değişimlerden ve insan aktivitelerinden etkilenmektedir. Çevresel faktörler ile fitoplankton ve bentik alg komunitaslarındaki değişiklikler arasında belirgin bir ilişki vardır. Bu nedenle algler nehir ağzı sistemlerinin mevcut durumunun değerlendirilmesi için kullanılmaktadırlar (Ajuonu vd., 2011).

Türkiye'nin güneybatısında yer alan Aksu Çayı, Isparta ilindeki Akdağ'dan doğmaktadır. Çok sayıda yan kolun birleşmesiyle oluşan akarsu, yaklaşık 145 km'lik mesafeyi geçtikten sonra Antalya'nın Aksu ilçe sınırlarından Akdeniz'e dökülmektedir. Akarsuya katılan yan kollardan yüksek debili olanları Isparta Deresi, Ağlasun Deresi ve Değirmen Deresi'dir (Kalyoncu vd., 2009). Bu çalışmada Aksu nehir ağzı bölgesi epilithik alg ve fitoplankton taksonlarının saptanmasına, taksonların bolluğunun, mevsimsel dağılımının belirlenmesine, nehir ağzı bölgesi epilithik ve planktonik alg çeşitliliğinin ortaya konulmasına çalışılmıştır. Aksu Çayı nehir ağzı bölgesinde fitoplankton taksonunu belirlemeye yönelik çalışma bulunmamaktadır. Çalışmanın ülkemiz nehir ağzı fitoplankton ve bentik alg listesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. Materyal ve yöntem

Aksu Çayı nehir ağzı bölgesi epilithik algleri kıyı bölgesinde seçilen 3 örnekleme noktasından, fitoplankton örnekleri 5 örnekleme noktasından mevsimsel olarak (Ağustos 2012-Nisan 2013) alınmıştır (Şekil 1). Epilithik alg örnekleri, kıyı bölgeden alınan taşların üzeri (25 cm²'lik alan) bir fırça yardımıyla küvet içine fırçalanarak saklama kaplarına aktarılmıştır (Anonim, 2014). Fitoplankton örnekleri ön ağız çapı 17 cm ve ağ göz açıklığı 55 µm olan Hensen tipi plankton kepçesiyle dikey ve yatay çekimlerle alınmıştır. Dikey çekimler için dipten yüzeye doğru, yatay çekimlerde 1,5-2 km/saat hızla 2-3 dk çekim yapılmış, süzülen su miktarının hesaplanması için plankton kepçesine flowmetre (akıntıölçer) takılmıştır. Epilithik ve planktonik örnekler % 4'lük formaldehitte fikse edilerek laboratuvara getirilmiş, fitoplankton örnekleri imhoff hunilerinde çökmeye bırakılıp yoğunlaştırılarak nicel ve nitel değerlendirmelere hazır hale getirilmiştir. Diatom dışındaki alg örnekleri geçici preparatlarla, diatom örnekleri asitte kaynatılarak (eşit hacimli HNO₃ : H₂SO₄ karışımı) daimi preparat haline getirildikten sonra incelenmiştir (Round, 1953). Taksonların teşhisleri ilgili kaynaklardan yararlanılarak yapılmıştır (Huber-Pestalozzi, 1955; 1968; 1982; 1983; Krammer ve Lange-Bertalot 1986; 1988; 1991a, b; Bourrelly ve Couté, 1991; John vd., 2005; Komárek, 2000; 2008). Fitoplanktonda saptanan taksonların sayımı Sedgewick-Rafter ve Neuber sayım kamarası kullanılarak, aşağıda verilen formüllerle saptanmıştır (Greenberg vd., 2005; Lind, 1985; Wetzel ve Likens, 2000). Epilithik alg örneklerinde, her preparatta en az 200 diatom kabuğu sayılmış, bu sayıya ulaşılmayan örneklerde sayım üç kez tekrarlanarak ortalama değer alınmıştır. Klorofil-a değerinin bulunması amacıyla 1 L'lik siyah renkli polietilen kaplara, yüzey suyu örnekleri alınarak laboratuvara getirilmiş, % 90'luk aseton özütlemeye yöntemiyle klorofil-a değeri saptanmıştır (Greenberg vd., 2005; Lind, 1985; Wetzel ve Likens, 2000). Fitoplankton örnekleri, fizikokimyasal ölçümlerin yapıldığı aynı örnekleme noktalarından alınmıştır. Elektriksel iletkenlik (YSI 30 S-C-T metre ile), pH (WTW pH 330-i pH metre ile), sıcaklık, çözülmüş oksijen, oksijen doygunluğu (YSI 55A oksijenmetre ile) örnekleme sırasında yatay (yüzeyden) ve dikey olarak (1,5 m'den) ölçülmüş, suyun ışık geçirgenliği Secchi diski kullanılarak belirlenmiştir. Fitoplankton ve epilithik alg tür çeşitliliği Shannon-Weaver's ve Simpson's indeksiyle, türlere bağlı olarak örnekleme noktalarının birbirlerine benzerliği Sørensen benzerlik indeksiyle belirlenerek, UPGMA (Unweighted pair group mean averages) dendogramı verilmiştir. Analizlerde Multi-Variate Statistical Packet (MVSP 3.1) Program kullanılmıştır (Kovach, 2002)

<p>Neuber sayım kamarası: A: Yoğunlaştırılmış örneğin her 1ml'sindeki birey sayısı B: Yoğunlaştırma katsayısı C: Birey sayısı D: Sayım karelerinin yüzey alanı (mm²) E: Sayım lamının (hücresinin) derinliği (mm) F: Sayım tekrarı G: Alınan göl suyu örneği (ml) H: Yoğunlaştırılan örnek miktarı (ml)</p>	$\text{Birey/litre: } \frac{A}{B} \times 1000$ $A: \frac{C}{D \times E \times F} \times 1000$ $B: \frac{G}{H}$
<p>Sedgewick-Rafter sayım kamarası: K¹: Yoğunlaştırılmış örneğin her 1ml'sindeki birey sayısı (adet) L: Yoğunlaştırma katsayısı M: Alınan göl suyu örneği (ml) N: Yoğunlaştırılan örnek miktarı (ml)</p>	$\text{Birey/litre: } \frac{K^1}{L} \times 1000$ $L: \frac{M}{N}$



Şekil 1. Aksu Çayı nehirağzı bölgesi ve örnekleme noktaları (P:Fitoplankton, E: Epilitik alg)

3. Bulgular

3.1 Fizikokimyasal Özellikler

Araştırma süresince saptanan fizikokimyasal değerler istasyonlara ve mevsimlere göre değişim göstermiştir. Ortalama sıcaklık, elektriksel iletkenlik ve tuzluluğun en yüksek değerleri dip suyunda belirlenmiş, ortalama pH, çözülmüş oksijen ve saturasyonun en yüksek değerleri ise yüzeyde saptanmıştır (Tablo 1). Mevsimsel olarak en yüksek sıcaklık (26,9 C°), pH (8,9), yaz döneminde, çözülmüş oksijen (11,2 mg/L) ve saturasyon (111,5%) ilkbahar döneminde yüzeyde belirlenmiştir. Elektriksel iletkenlik ve tuzluluk değerleri yüzey ve dip suyunda birbirinden oldukça farklı değerler almış, en yüksek elektriksel iletkenlik yüzeyde 10330 $\mu\text{S}/\text{cm}$, dipte 55500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, tuzluluk yüzeyde 21,9 ppt, dipte 36,6 ppt olarak sonbaharda saptanmıştır. Ortalama en yüksek Klorofil-a (5,47 mg/l) ilkbaharda, Secchi Diski görünürlüğü ise yaz döneminde belirlenmiştir. Fizikokimyasal parametrelerin mevsimsel değişimleri Şekil 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Aksu Çayı nehirağzı bölgesi bazı fizikokimyasal değerlerinin istasyonlara göre dağılımı (E.C.: Elektriksel İletkenlik, Ç.Ö.: Çözülmüş Oksijen)

	5	4	3	2	1
	Ort. \pm SD	Ort. \pm SD	Ort. \pm SD	Ort. \pm SD	Ort. \pm SD
pH	8,61 \pm 0,303	8,65 \pm 0,19	8,49 \pm 0,28	8,31 \pm 0,33	8,28 \pm 0,29
Sıcaklık (C°)	17,13 \pm 3,95	17,5 \pm 4,82	17,68 \pm 4,96	17,93-5,17	18,03-5,07
Ç.Ö (mg/L)	10,3 \pm 0,73	10,17 \pm 0,75	9,70 \pm 1,13	10,12 \pm 0,85	10,15 \pm 0,98
Saturasyon (%)	105,4 \pm 7,28	104,93 \pm 6,24	105,3 \pm 7,32	105,25 \pm 6,99	107,25 \pm 7,63
Yüzey					
E. C. ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	1332 \pm 1694,43	2076 \pm 2142,74	3545,53 \pm 3300,74	4383 \pm 4263,72	6091,5 \pm 4051,07
Tuzluluk(ppt)	0,75 \pm 1,01	1,23 \pm 1,29	2 \pm 1,88	2,58 \pm 2,69	8,15 \pm 9,49
Klorofil-a (mg/m ³)	2,12 \pm 1,19	4,18 \pm 1,02	5,47 \pm 1,75	4,93 \pm 0,82	3,48 \pm 0,97
Secchi Diski (cm)	76,25 \pm 34,49	87,5 \pm 42,13	97,5 \pm 47,34	82,5 \pm 35	90 \pm 43,39
	5	4	3	2	1
pH	8,54 \pm 0,30	8,59 \pm 0,22	8,53 \pm 0,17	8,25 \pm 0,25	8,23 \pm 0,19
Sıcaklık (C°)	18,75 \pm 6,08	19,43 \pm 6,59	19,87 \pm 6,92	20,3 \pm 7,18	20,35 \pm 7,15
Ç.Ö (mg/L)	9,78 \pm 0,76	9,93 \pm 0,79	9,39 \pm 1,07	10,05 \pm 0,77	9,94 \pm 0,89
Saturasyon (%)	92,37 \pm 20,43	101 \pm 9,83	101,65 \pm 6,51	105,75 \pm 6,88	106,08 \pm 11,98
Dip					
E.C. ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	14755,5 \pm 26224,95	26293,25 \pm 28492,61	37535,6 \pm 25156,6	36906 \pm 24773,67	41507 \pm 27459,26
Tuzluluk(ppt)	9,73 \pm 17,36	12,83 \pm 16,56	25,3 \pm 16,90	24,98 \pm 16,76	27,2 \pm 18,00

3.2 Epilitik Alg ve Fitoplankton Dağılımı

Epilitik örneklerde Bacillariophyta (42), Chlorophyta (1), Cyanophyta (1) bölümlerinden 44 takson saptanmış, *Cocconeis placentula* var. *euglypta* (Ehrenberg) Grunow, *Cymbella affinis* Kützing, *Nitzschia palea* (Kützing) W.Smith, *Rhoicosphenia abbreviata* (C.Agardh) Lange-Bertalot sürekli, *Diatoma vulgare* Bory, *Gyrosigma attenuatum* (Kützing) Rabenhorst, *Navicula cari* Ehrenberg, *Nitzschia sigma* (Kützing) W.Smith, *Ulnaria ulna* (Nitzsch) Compère genellikle gözlemlenen taksonlar olmuştur (Tablo 2).

Tablo 2. Epilitik alg taksonlarının istasyonlardaki dağılımı ve sıklık değerleri

Epilitik Alg Taksonları	1. İstasyon	2. İstasyon	3. İstasyon
Bacillariophyta			
Bacillariophyceae			
<i>Achnanidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	25	25	25
<i>Amphora ovalis</i> (Kützing) Kützing	50	50	25
<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg	25	25	25
<i>Cocconeis placentula</i> var. <i>euglypta</i> (Ehrenberg) Grunow	100	25	25
<i>Cocconeis scutellum</i> Ehrenberg	25	0	0
<i>Craticula cuspidata</i> (Kützing) D.G.Mann	25	0	0
<i>Ctenophora pulchella</i> (Ralfs ex Kützing) D.M.Williams & Round	75	50	50
<i>Cymatopleura elliptica</i> (Brébisson) W.Smith	25	0	25
<i>Cymatopleura solea</i> (Brébisson) W.Smith	25	0	0
<i>Cymbella affinis</i> Kützing	75	100	50
<i>Cymbella helvetica</i> Kützing	25	0	0
<i>Cymbella tumida</i> (Brébisson) Van Heurck	0	50	25
<i>Denticula kuetzingii</i> Grunow	25	0	0
<i>Diatoma ehrenbergii</i> Kützing	0	25	25
<i>Diatoma moniliformis</i> (Kützing) D.M.Williams	0	0	25
<i>Diatoma vulgare</i> Bory	50	75	25
<i>Diploneis ovalis</i> (Hilse) Cleve	25	50	50
<i>Encyonema caespitosum</i> Kützing	0	0	25
<i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch) D.G.Mann	50	0	25
<i>Encyonopsis microcephala</i> (Grunow) Krammer	25	0	0
<i>Fragilaria acus</i> (Kützing) Lange-Bertalot	50	25	50
<i>Gomphonema minuta</i> P.Fusey	25	25	0
<i>Gomphonema olivaceum</i> (Hornemann) Brébisson	75	50	50
<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing	50	0	50
<i>Gyrosigma attenuatum</i> (Kützing) Rabenhorst	25	50	75
<i>Gyrosigma balticum</i> (Ehrenberg) Rabenhorst	0	25	25
<i>Halamphora coffeiformis</i> (C.Agardh) Levkov	25	0	0
<i>Halamphora veneta</i> (Kützing) Levkov	25	0	25
<i>Navicula cari</i> Ehrenberg	50	75	50
<i>Navicula radiosa</i> Kützing	0	25	0
<i>Navicula viridula</i> (Kützing) Ehrenberg	25	25	25
<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W.Smith	100	50	75
<i>Nitzschia sigma</i> (Kützing) W.Smith	50	75	75
<i>Nitzschia sigmoidea</i> (Nitzsch) W.Smith	25	50	25
<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson ex Kützing) Lange-Bertalot	25	0	0
<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C.Agardh) Lange-Bertalot	75	75	100
<i>Surirella brebissonii</i> Krammer & Lange-Bertalot	0	25	0
<i>Surirella minuta</i> Brébisson ex Kützing	0	25	50
<i>Tabellaria flocculosa</i> (Roth) Kützing	0	25	0
<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) Compère	75	50	25
Coscinodiscophyceae			
<i>Melosira varians</i> C.Agardh	0	0	25
Mediophyceae			
<i>Pantocsekiella ocellata</i> (Pantocsek) K.T.Kiss & E.Ács	25	25	25
Chlorophyta			
Chlorophyceae			
<i>Scenedesmus quadricauda</i> (Turpin) Brébisson	25	0	0
Cyanobacteria (Cyanophyta)			
Cyanophyceae			
<i>Kamptonema formosum</i> (Bory ex Gomont) Strunecký	0	0	25

Epilitik alg taksonları arasında yaz döneminde *Pantocsekiella ocellata* (Pantocsek) K.T.Kiss & E.Ács (1.,2.,3. ist.), sonbahar döneminde *N. sigma* (1., 2. ist.), sonbahar (3. ist.) ve kış döneminde (1.,2.,3. ist.) *R. abbreviata*, ilkbahar döneminde *Ctenophora pulchella* (Ralfs ex Kützing) D.M.Williams & Round (1., 3. ist.) ve *N. sigma* (2. ist.) baskın taksonlar olarak belirlenmiştir.

Fitoplanktonda Bacillariophyta (26), Charopyta (6), Chlorophyta (9), Cyanophyta (Cyanobacteria:4), Euglenophyta (Euglenozoa:1), Miozoa (9), Ochrophyta (1) bölümlerinden toplam 56 takson belirlenmiş, *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen, *U. ulna*, *Tripos furca* (Ehrenberg) F.Gómez sürekli, *Fragilaria dilatata* (Brébisson) Lange-Bertalot, *Closterium aciculare* T.West, *Monactinus simplex* (Meyen) Corda genellikle tespit edilen taksonlardır (Tablo 3). Yaz döneminde *A. granulata* (2., 3.,ist.), *Merismopedia tenuissima* Lemmermann (1. ist), *Ulnaria ulna* (Nitzsch) Compère (4. ve 5. ist.), sonbaharda *T. furca* (1., 2., 3. ist.), *Monactinus simplex* (Meyen) Corda (4. ist.), *Peridinium* sp. (5. ist.), kış döneminde *Closterium aciculare* T.West (1., 4. ve 5. ist.), *A. granulata* (2. ist.), *Gyrosigma balticum* (Ehrenberg) Rabenhorst (3. ist.), ilkbaharda *C. aciculare* (1. 2., 3. 4. ve 5. ist.) baskın taksonlar olmuştur (Şekil 3). Fitoplankton tür dağılımına göre 2. ve 3. birbirine en fazla, 1. ve 4. birbirine en az benzeyen istasyonlar olmuştur. Epilitik taksonların dağılımına göre ise 2. ve 3. birbirine en fazla benzeyen, 1. ve 2. en az benzeyen istasyonlar olarak saptanmıştır.

Tablo 3. Fitoplankton taksonlarının istasyonlara göre dağılımı ve sıklık değerleri*

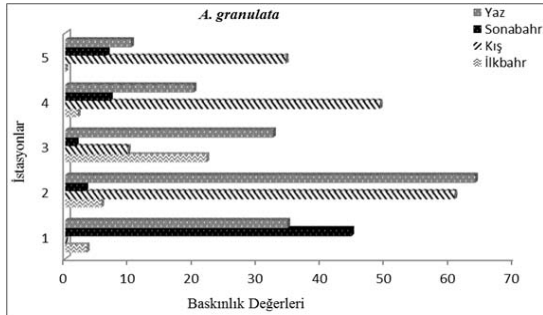
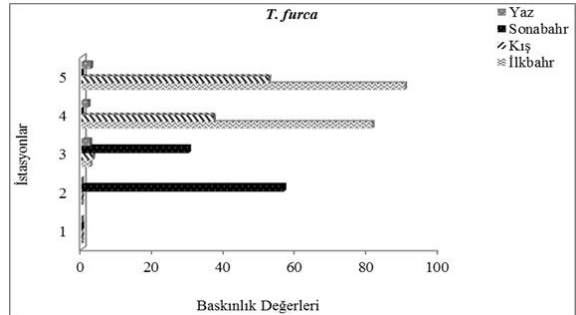
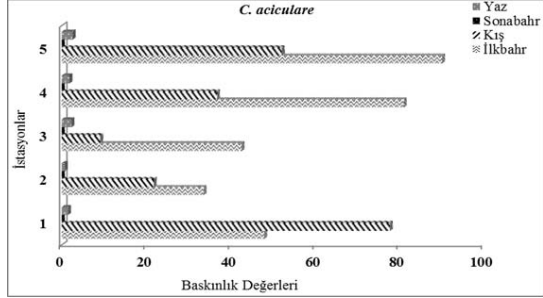
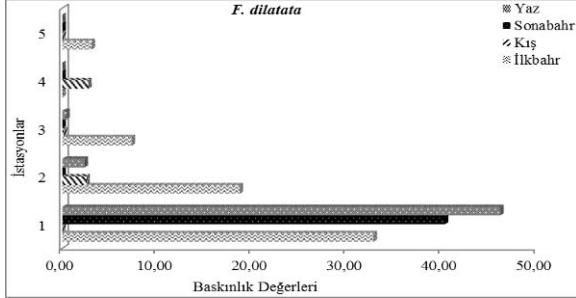
Fitoplankton Taksonları	1. İstasyon	2. İstasyon	3. İstasyon	4. İstasyon	5. İstasyon
Bacillariophyta					
Bacillariophyceae					
<i>Amphora ovalis</i> (Kützing) Kützing	50	25			
<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg					25
<i>Cocconeis placentula</i> var. <i>euglypta</i> (Ehrenberg) Grunow		25		25	
<i>Craticula cuspidata</i> (Kützing) D.G.Mann				25	
<i>Ctenophora pulchella</i> (Ralfs ex Kützing) D.M.Williams & Round		25			
<i>Cymatopleura elliptica</i> (Brébisson) W.Smith		25	50	50	
<i>Cymatopleura solea</i> (Brébisson) W.Smith	25			50	50
<i>Cymbella helvetica</i> (Kützing)	25				
<i>Cymbella tumida</i> (Brébisson) Van Heurck			25	25	
<i>Diatoma vulgare</i> Bory			25	25	
<i>Fragilaria crotonensis</i> Kitton		25	50	25	25
<i>Fragilaria dilatata</i> (Brébisson) Lange-Bertalot	75	75	75	25	25
<i>Gyrosigma acuminatum</i> (Kützing) Rabenhorst					25
<i>Gyrosigma attenuatum</i> (Kützing) Rabenhorst	50	25	25	25	25
<i>Gyrosigma balticum</i> (Ehrenberg) Rabenhorst		25	25		
<i>Halamphora veneta</i> (Kützing) Levkov				25	
<i>Nitzschia sigma</i> (Kützing) W.Smith		25	25		
<i>Nitzschia sigmoidea</i> (Nitzsch) W.Smith		25	50	25	
<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C.Agardh) Lange-Bertalot	25	25			
<i>Surirella biseriata</i> var. <i>bifrons</i>					
<i>Surirella brebissonii</i> Krammer & Lange-Bertalot		50	25	25	
<i>Ulnaria capitata</i> (Ehrenberg) Compère					25
<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) Compère	100	100	100	100	100
<i>Aulacoseira granulata</i> (Ehrenberg) Simonsen	75	100	75	100	75
<i>Melosira varians</i> C.Agardh		25		25	
Mediophyceae					
<i>Biddulphia</i> sp.	25		25	25	
Charophyta					
Conjugatophyceae					
<i>Closterium moniliferum</i> Ehrenberg ex Ralfs				25	
<i>Closterium aciculare</i> T.West	75	75	75	75	75
<i>Dictyosphaerium pulchellum</i> H.C.Wood					
<i>Mougeotia</i> sp.		25	25		50
<i>Spirogyra</i> sp.		25		25	25
<i>Staurastrum</i> sp.		25		25	25
Miozoa					
Dinophyceae					
<i>Ceratium hirundinella</i> (O.F.Müller) Dujardin	25	25	25		
<i>Gonyaulax</i> sp.		50	50		
<i>Peridinium</i> sp.	25		50		75
<i>Tripos candelabrum</i> (Ehrenberg) F.Gómez	25				
<i>Tripos furca</i> (Ehrenberg) F.Gómez	25	25	100	25	25
<i>Tripos fusus</i> (Ehrenberg) F.Gómez	25		25		

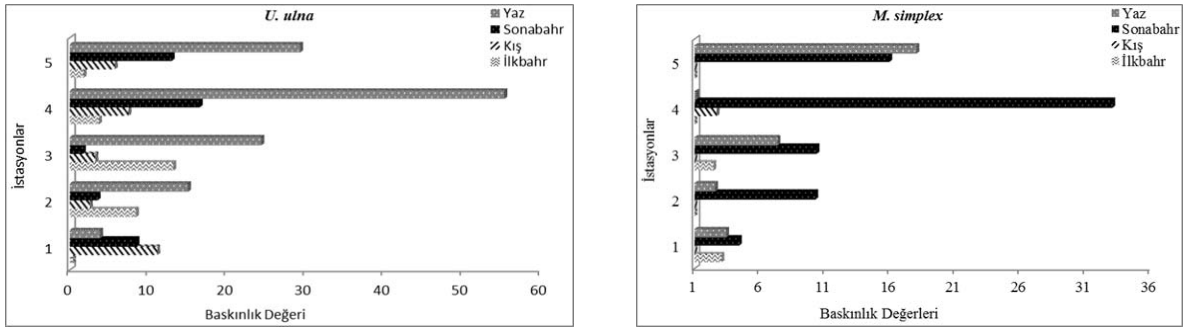
<i>Triplos lineatus</i> (Ehrenberg) F.Gómez					25
---	--	--	--	--	----

Tablo 3. Devam ediyor

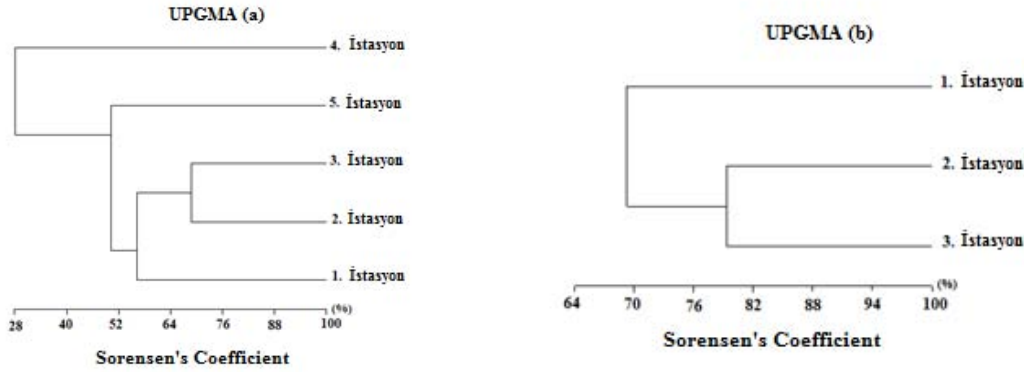
<i>Triplos longipes</i> (J.W.Bailey) F.Gómez	25	25	50		
<i>Triplos macroceros</i> (Ehrenberg) F.Gómez	50	25	25	25	
Chlorophyta					
Chlorophyceae					
<i>Coelastrum microporum</i> Nägeli					25
<i>Hariotina reticulata</i> P.A.Dangeard					25
<i>Monactinus simplex</i> (Meyen) Corda	75	50	75	75	75
<i>Monactinus simplex var. echinulatum</i> (Wittrock) Pérez					50
<i>Pediastrum duplex</i> Meyen	75	50	50	50	50
<i>Pseudopediastrum boryanum</i> (Turpin) E.Hegewald					25
<i>Scenedesmus acuminatus</i> (Lagerheim) Chodat					25
<i>Scenedesmus quadricauda</i> (Turpin) Brébisson	25	25			
<i>Crucigenia quadrata</i> Morren					25
Ochrophyta					
Chrysophyceae					
<i>Dinobryon sertularia</i> Ehrenberg					25
Cyanobacteria (Cyanophyta)					
Cyanophyceae					
<i>Chroococcus limneticus</i> Lemmermann					25
<i>Oscillatoria tenuis</i> C.Agardh ex Gomont					50
<i>Kamptonema formosum</i> (Bory ex Gomont) Strunecký					25
<i>Merismopedia tenuissima</i> Lemmermann	25				25
Euglenazoa					
Euglenophyceae					
<i>Euglena</i> sp.					25

Sıklık Değerleri*: % 1-20: Çok seyrek bulunan türler, % 21-40: Seyrek bulunan türler, % 41-60: Genellikle bulunan türler, % 61-80: Çoğunlukla bulunan türler, % 81-100: Sürekli bulunan türler.





Şekil 3. Aksu Çayı bazı baskın taksonlarının istasyonlara ve mevsimlere göre dağılımı



Şekil 4. Fitoplankton (a) ve epilitik alg (b) taksonlarının örnek yerlerindeki dağılımına göre UPGMA (Unweighted pair group mean averages) sonuçları

Mevsimsel olarak en yüksek epilitik alg çeşitliliği Shannon-Weaver's ve Simpson's indeksine göre yaz, en düşük çeşitlilik Shannon-Weaver's indeksine göre ilkbahar ve Simpson's indeksine göre sonbaharda saptanmıştır. Her iki çeşitlilik indeksine göre istasyonlarda en yüksek çeşitlilik değeri 3. istasyonda sonbaharda belirlenmiştir. Fitoplankton taksonları kullanılarak belirlenen çeşitlilik değerlerine göre (Shannon-Weaver's ve Simpson's indeksi) mevsimsel olarak en yüksek çeşitlilik sonbaharda, en düşük çeşitlilik kış döneminde, istasyonlar arasında en yüksek çeşitlilik değeri 5. istasyonda sonbaharda saptanmıştır (Tablo 4).

Tablo 4. Aksu Çayı Shannon-Weaver (H') ve Simpson (D) çeşitlilik indeks değerlerinin istasyonlara ve mevsimlere göre dağılımı

	Epilitik İstasyonlar						Fitoplankton İstasyonlar									
	1		2		3		1		2		3		4		5	
	H'	D	H'	D	H'	D	H'	D	H'	D	H'	D	H'	D	H'	D
Yaz	2,50	0,88	2,23	0,86	1,88	0,71	1,45	0,67	1,48	0,56	2,02	0,81	1,54	0,64	2,10	0,82
Sonbh	1,50	0,63	1,34	0,52	2,52	0,91	1,81	0,78	1,34	0,63	1,98	0,83	1,97	0,82	2,21	0,87
Kış	1,90	0,80	2,15	0,82	1,37	0,69	0,83	0,39	1,22	0,57	2,08	0,82	1,17	0,62	1,17	0,60
İlkbh	1,41	0,65	0,84	0,40	1,51	0,75	1,39	0,66	1,69	0,77	1,59	0,72	0,74	0,33	0,49	0,19
Mevsimsel Çeşitlilik Değerleri																
	Yaz		Sonbahar		Kış		İlkbahar									
	H'	D	H'	D	H'	D	H'	D	H'	D	H'	D	H'	D	H'	D
Epilitik	2,24	0,86	2,01	0,73	2,14	0,81	1,78	0,77								
Fitoplankton	2,18	0,77	2,20	0,83	1,29	0,57	1,80	0,73								

4. Sonuçlar ve tartışma

Nehir ağzı bölgeleri dinamik ekosistemler olup nehir ve deniz ortamları arasındaki geçiş bölgeleridir. Nehir ağzı bölgesi gelgit, dalga, tuzlu su akıntısı gibi denizel sistemin ve diğer akarsu sisteminden kaynaklı etkilere maruz kalmakta, buna bağlı olarak fizikokimyasal değişkenler ve canlı dağılımı sürekli değişim göstermektedir (Chaudhuri vd., 2012). Araştırma süresince nehir ağzı bölgesinde en yüksek sıcaklık değeri yüzey ve dipte farklılık göstermiş

yüzeyde 23,2 C° (yaz), dipte 26,9 C° (yaz), en düşük değer yüzeyde ve dipte 11,2 C° (kış) olarak saptanmıştır. Erdoğan vd. (2012) Manavgat nehirağzı bölgesinde yaz boyunca yüzey ve dip suyu arasında sıcaklık farkının oluştuğunu bildirmiştir. Yüzey ve dip suyunda saptanan ortalama pH değerleri 8,28 ile 8,61 arasında değişim göstermiş, en yüksek pH değeri (8,9) yüzeyde yaz döneminde nehir sistemine yakın noktada (5. istasyon), en düşük (7,97) kış döneminde denize yakın istasyonda belirlenmiştir. Zeybek ve Kalyoncu (2016) yaptıkları çalışmada en yüksek pH değerini nehirağzı bölgesinde yaz döneminde belirlediklerini, Dixit vd. (2013) Mahanadi nehirağzında en yüksek sıcaklık ve pH değerlerinin yaz döneminde saptandığını belirtmiştir. Weinstein vd. (1977) nehirağzı sisteminde yaz döneminde yüksek pH değerinin saptandığını vurgulamıştır. Araştırma süresince elde edilen pH değerlerine göre Aksu Çayı nehirağzı bölgesi alkali özellik göstermiştir. Çözünmüş oksijen değerleri her iki su sütununda da çok büyük dalgalanma göstermemiş, ortalama değerler 10,3-9,39 mg/l arasında saptanmıştır. En düşük çözünmüş oksijen değeri 3. istasyonda (8,48 mg/l) yaz döneminde dip suyunda, en yüksek değer (11,2 mg/l) 1. istasyonda ilkbaharda yüzey suyunda saptanmıştır. 3. istasyon suyun akış hızının yavaşladığı ve akarsuyun kanal şeklini alarak denize döküldüğü bölgedir. 1. istasyon akarsuyun denize döküldüğü nokta olup burada ilkbahar döneminde dalgalanmanın ve nehir akış hızının artması, birincil üretimin artış göstermesi çözünmüş oksijen değerinde artış sağlamıştır. Manavgat nehirağzı bölgesinde yapılan çalışmada dip suyunda düşük oksijen değerinin yaz döneminde belirlendiği, yüksek oksijen değerinin ise yüzey suyunda kış döneminde saptandığı, bunda tuzluluğun ve su sütunundaki tabakalaşmanın etkili olduğu belirtilmiştir (Erdoğan vd., 2012). Araştırmamızda Aksu Çayı nehirağzı bölgesinde de dip suyunda yüzey suyuna oranla daha düşük çözünmüş oksijen değeri belirlenmiştir. Bunda dip suyundaki elektriksel iletkenlik ve tuzluluk değerlerindeki yükselmenin, yine bu dönemde sıcaklık artışı ile birlikte akış hızındaki yavaşlamanın etkili olduğu düşünülmektedir. Elektriksel iletkenlik ve tuzluluk değerleri yüzey ve dip suyunda farklılık göstermiş, en yüksek değerler (Elektriksel iletkenlik: 55800 µS/cm, tuzluluk: 36,6 ppt) dip suyunda 1. istasyonda yaz döneminde, en düşük değerler yüzey ve dip suyunda (elektriksel iletkenlik: 322 µS/cm, tuzluluk: 0,1) kış döneminde saptanmıştır. Yağış ile birlikte oluşan sel suları, akarsu etkisinin artış göstermesi nehirağzı suyunun seyrelmesinde etkili olmuştur. Dixit vd., (2013) yaptıkları çalışmada gel-git ve taşkın sularının nehirağzı bölgesinde düşük tuzluluk ve elektriksel iletkenlik değerlerinin saptanmasına neden olduğunu bildirmiştir. Aksu Çayı nehirağzı bölgesinde saptanan tuzluluk ve elektriksel iletkenlik değerlerine göre 1. istasyon dışında kalan örnekleme noktalarının, daha çok tatlı su etkisinde olduğu, dönemsel olarak özellikle sonbaharda tuzlu suyun etkisinde kaldığı gözlenmiştir. Klorofil-a'nın en yüksek değeri (7,8 mg/m³) ilkbahar döneminde 3. istasyonda, en düşük değeri (1,2 mg/m³) 5. istasyonda kış döneminde belirlenmiştir. Klorofil-a değerinin artış gösterdiği noktada nehirağzı bölgesi bir kanal görüntüsü almış, suyun akış hızı yavaşlamış ve derinlikte artış görülmüştür. İlkbahar döneminde sıcaklık ve ışıklandırma süresindeki artışa ve bu istasyondaki fiziksel koşulların değişimine paralel olarak klorofil-a değerinde artış olduğu söylenebilir. Kış döneminde sıcaklık ve ışıklandırmanın azalmasının, söz konusu istasyonda dalgalanmanın fazla olmasının klorofil-a değerinin düşük saptanmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Erdoğan vd. (2012) yaptıkları çalışmada benzer sonuçları vurgulamıştır. Malon vd. (1988) nehir akışının nehirağzı bölgesine etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada klorofil-a değerinin mevsimlere ve derinlik farkına göre değişim gösterdiğini, özellikle ilkbahar döneminde belirgin bir artışın saptandığını bildirmiştir.

Araştırma süresince epilitik örneklerde Bacillariophyta, Chlorophyta, Cyanophyta bölümlerinden 44 takson saptanmış, Bacillariophyta en yüksek takson ve birey sayısı ile temsil edilmiştir. Chindah (2004) nehirağzı perifitonunda yaptığı çalışmada Bacillariophyta'nın daha fazla takson sayısına sahip olduğunu ve komünitenin %50'den fazlasını temsil ettiğini bildirmiştir. Sürekli gözlemlenen taksonlar örnekerlerine göre değişim göstermiştir. Epilitik örneklemenin yapıldığı tüm noktalarda *R. abbreviata* genellikle gözlemlenmiştir. *P. ocellata*, *N. sigma*, *R. abbreviata* ve *C. pulchella* baskın takson olarak saptanmıştır. Kalyoncu vd. (2008) Aksu Çayı'nda *D. vulgaris*'in nehirağzı önekleme noktasında baskın takson olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda *D. vulgaris* genellikle saptanan taksonlar arasında yer almıştır. Solak vd. (2018) Türkiye akarsu ve durgun su sistemlerinde *P. ocellata*'nın yaygın olarak gözlemlenen sentrik diatom taksonları arasında bulunduğunu bildirmiştir. Köprüçay Nehri nehirağzı bölgesinde *C. pulchella*'nın baskın taksonlar arasında yer aldığı, özellikle tatlı su etkisinin olduğu nehirağzı sistemlerinde daha iyi gelişim gösterdiği bildirilmiştir (Çiçek ve Ertan, 2012). En yüksek epilitik alg çeşitliliği 3. istasyonda sonbahar döneminde belirlenirken, ortalama çeşitlilik değerlerine göre nehirağzında en yüksek çeşitlilik yaz döneminde belirlenmiştir. Kalyoncu vd. (2008) Aksu Çayı'nda nehirağzı bölgesinde en yüksek epilitik alg çeşitliliğinin sonbahar döneminde belirlendiğini, elektriksel iletkenliğin alg çeşitliliğine etki ettiğini bildirmiştir. Aksu Çayı nehirağzı bölgesinde sonbaharda elektriksel iletkenliğin artmasının epilitik alg çeşitliliği üzerinde etkili olduğu söylenebilir. Akarsu üzerinde epilitik alg örneklemede seçilen 3. örnekeri hem akarsu hem de denizel etki altında kalmaktadır. Bu nedenle dönemsel olarak tatlısu ve acısu sistemlerine uyum sağlamış bazı taksonların da ortama uyum sağlaması ile çeşitliliğin bu noktada yüksek olduğu düşünülmektedir.

Fitoplanktonda Bacillariophyta, Charophyta, Chlorophyta, Cyanophyta (Cyanobacteria), Euglenophyta (Euglenozoa), Miozoa, Ochrophyta bölümlerinden toplam 56 takson belirlenmiş, Bacillariophyta takson ve birey sayısı baskın olan bölüm olmuştur. Köprüçay ve Manavgat nehirağzı bölgesinde yapılan çalışmalarda da Bacillariophyta bölümünün yüksek takson ve birey sayısı ile temsil edildiği bildirilmiştir (Erdoğan vd., 2012; 2016). Nehirağzı fitoplanktonu ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda da benzer sonuçlar vurgulanmıştır (Huang vd. 2004; Ajuonu vd. 2011; Kirchman vd. 2017). Saptanan fitoplankton taksonlarından *A. granulata*, *U. ulna*, *T. furca* araştırma süresince sürekli gözlenmiştir. *A. granulata*, *M. tenuissima*, *U. ulna* yaz, *T. furca*, *M. simplex*, *Peridinium* sp. sonbahar, *C.*

aciculare, *G. balticum* kış, *C. aciculare* ilkbahar döneminde baskın takson olarak belirlenmiştir. Saptanan taksonlar arasında diyatomlar en yüksek baskınlık değerine ulaşmıştır. Özellikle yaz döneminde diyatom bölümüne ait tasonlar (*A. granulata*, *F. dilatata*, *U. ulna*) yüksek birey sayısı ile temsil edilmiştir. Popovich vd. (2012) Bahía Blanca nehirağzı (Arjantin) bölgesinde yapmış olduğu çalışmada, diyatomların kış döneminde fitoplanktonda dominant bölüm olduğunu, toplam fitoplankton yoğunluğunun %82'sini oluşturduğunu bildirmiştir. Sonbaharda tuzluluk değerindeki artışa paralel olarak *T. furca*, *Peridinium* sp taksonlarının baskınlık gösterdiği düşünülmektedir. Bu dönemde özellikle denize yakın örnekleme noktasında *T. candelabrum*, *T. fusus*, *T. lineatus*, *T. longipes*, *T. macroceros* daha yüksek birey sayısında saptanmış, bu taksonlardan *T. macroceros*, *T. furca*, *Peridinium* sp, diğer örnekleme noktalarında da belirlenmiştir. Manavgat Nehirağzı bölgesinde deniz etkisinin arttığı dönemlerde denizel türlerin daha sık ve yüksek birey sayısında görüldüğü bildirilmiştir (Erdoğan vd. 2012). Cloern (1991) nehir ağzı bölgesinde fitoplanktonun mevsimsel değişiminin yoğunluk tabakalaşmasıyla ilişkili olduğunu, yoğunluk tabakalaşmasının dönemsel olarak tatlı su etkisinin artmasından kaynaklandığını belirtmiştir. Fitoplankton taksonları kullanılarak belirlenen çeşitlilik değerlerine göre (Shannon-Weaver's ve Simpson's indeksi) mevsimsel olarak en yüksek çeşitlilik sonbaharda, örnekyerleri arasında en yüksek çeşitlilik değeri 5. istasyonda sonbaharda saptanmıştır. Huang vd. (2004) yaptıkları çalışmada yağmurlu dönemlerde nehirağzı bölgesinde yüksek çeşitlilik değerlerine ulaşıldığını bildirmiştir. Alao (2009) iklimsel değişimlerin biyolojik çeşitliliği etkilediğini bildirmiştir. Elde edilen fizikokimyasal ve biyolojik veriler doğrultusunda Aksu Çayı nehir ağzı bölgesinin çoğunlukla tatlı su etkisinde kaldığı dönemsel olarak gel-git ve dalgalanmanın etkisi ile denizel etki altında kaldığı söylenebilir.

Teşekkür

Araştırma süresince arazi çalışmalarında desteğini esirgemeyen Dr. Öğretim Üyesi Ömer ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Kaynaklar

- Anonymous (2014). Lake assessment method macrophytes and phytobenthos-diatoms for assessing river and lake ecological quality (Lake DARLEQ2). Water Framework Directive–United Kingdom Technical Advisory Group (WFD-UKTAG), Scotland, 20 p.
- Ajuonu, N., Ukaonu, S.U., Oluwajoba, E.O., Mbwaike, B.E., Williams, A. B', Myade, E.F. (2011). The abundance and distribution of plankton species in the bonny estuary; Nigeria. Agriculture and Biology Journal of North America, 2(6), 1032-1037. DOI:10.5251/abjna.2011.2.6.1032.1037
- Alao, J.S. (2009). Need for biodiversity conservation in Nasarawa State, Nigeria. Biological Diversity and Conservation, 2(1), 14-20.
- Bourrilly, P., Couté, A. (1991). Desmidiées de Madagascar (Chlorophyta, Zygothryxales). Bibliotheca Phycologica. Band 86, Berlin-Stuttgart, 348p.
- Chaudhuri, K., Manna, S., Sarma, K. S., Naskar, P., Bhattacharyya, S., Bhattacharyya, M. (2012). Physicochemical and biological factors controlling water column metabolism in Sundarbans estuary, India. Aquatic Biosystems, 8(26), 1-16.
- Chindah, A. C. (2004). Response of periphyton community to salinity gradient in tropical estuary, Niger Delta. Polish Journal of Ecology, 51(1), 83-89.
- Cloern, E. J. (1991). Tidal stirring and phytoplankton bloom Dynamics in an estuary. Journal of Marine Research, 49, 203-221.
- Çiçek, N. L., Ertan, Ö. O. (2012). Köprüçay Nehri epilithic alg çeşitliliğinin bazı fizikokimyasal değişkenlerle ilişkisi. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 8(1), 22-41.
- Dixit, P. R., Karı, B., Chattopadhyay, P., Panda, C. R. (2013). Seasonal variation of the physicochemical properties of water samples in Mahanadi estuary, east coast of India. Journal of Environmental Protection. 4, 843-848. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/jep.2013.48098>
- Erdoğan, Ö., Çiçek, N. L., Ertan, Ö. O. (2012). Manavgat Nehri nehirağzı bölgesi fitoplanktonunun mevsimsel dağılımı. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 8(1), 9-21.
- Erdoğan, Ö., Çiçek, N. L., Ertan, Ö. O. (2016). Köprüçay Nehri nehirağzı bölgesi fitoplanktonunun mevsimsel dağılımı. Akademia Disiplinlerarası Bilimsel Araştırmalar Dergisi, 2 (1), 31-41.
- Greenberg A.E., Connors, J.J., Jenkins, D., Franson, M.A.H. (2005). Standart methods for the examination of water and wastewater, APHA, AWWA, WPCF. Washington, ABD. American Public Health Association press, 1134.
- Guinder, V. A., Popovich, C. A., Perillo, G. M. E. (2012). Phytoplankton and physicochemical analysis on the water system of the temperate estuary in South America: Bahía Blanca Estuary, Argentina. International Journal Environment Research, 6(2), 547-556.
- Huang, L., Jian, W., Song, X., Huang, X., Liu, S., Quian, P., Yin, K., Wu, M. (2004). Species diversity and distribution for phytoplankton of the Peral River estuary during rainy and dry season. Marine Pollution Bulletin, 49(7-8), 588-596. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.03.015>

- John, D. M., Whitton, B. A., Brook A. J., 2005. The freshwater algal flora of the britishisles, an identification Guide To Freshwater And Terrestrial Algae. Cambridge University Press, United Kingdom. 694p.
- Kalyoncu, H., Barlas, M., Ertan, Ö. O. (2009). Aksu Çayı'nın su kalitesinin biotik indekslere (diyatomlara ve omurgasızlara göre) ve fizikokimyasal parametrelere göre incelenmesi, organizmaların su kalitesi ile ilişkileri. *TUBAV Bilim Dergisi*, 2(1), 14-25.
- Kalyoncu, H., Barlas, M., Yorulmaz, B. (2008). Aksu Çayı'nda (Isparta-Antalya) epilithic alg çeşitliliği ve akarsuyun fizikokimyasal yapısı arasındaki ilişki. *Ekoloji*, 17(66), 15-22.
- Kirchman, D., Cottrel, T. M., DiTullio, T. M. (2017). Shaping of bacterial community composition and diversity by phytoplankton and salinity in the Delaware estuary, USA. *Aquatic Microbial Ecology*, 78(2), 93-106. DOI: <https://doi.org/10.3354/ame01805>
- Kocataş, A. (2006). *Ekoloji ve Çevre Biyolojisi*. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, 50, 597S.
- Kovach, W.L. (2002). *MVSP—a Multivariate Statistical Package for Windows*, ver. 3.21. Wales UK.
- Komárek, J. (2000). *Cyanoprocaryota 1. Teil: Chroococcales Süßwasserflora Von Mitteleuropa Band 19/1, Cyanoprocaryota 1. Teil: Chroococcales*. Berlin, Spectrum Akademischer Verlag Heidelberg, 548 p
- Komárek, J. (2008). *Cyanoprocaryota 2. Teil: Oscillatoriales*. Germany, Spectrum Akademischer Verlag Heidelberg, 759p.
- Krammer, K., & Lange-Bertaloth, H. (1986). *Bacillariophyceae. 1. Teil: Naviculaceae*. In: Ettl H., Gerloff J., Heynig H. & Mollenha Uer d. (Eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/2*. VEB Gustav Fischer Verlag: Jena.
- Krammer, K., & Lange-Bertaloth, H. (1988). *Bacillariophyceae. 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae*. In: : Ettl H., Gerloff J., Heynig H. & Mollenha Uer d. (Eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/1*. VEB Gustav Fischer Verlag: Jena.
- Krammer, K., & Lange-Bertaloth, H. (1991a). *Bacillariophyceae. 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae*. In:Ettl H., Gerloff J., Heynig H. & Mollenha Uer d. (Eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/3*. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart, Jena.
- Krammer, K., & Lange-Bertaloth, H. (1991b). *Bacillariophyceae. 4. Teil: Achnanthaceae, Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema*. *Gesamtliteraturverzeichnis Teil1-4*. In: Ettl H., Gerloff J.,Heynig H. & Mollenha Uerd. (Eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/4*. Gustav Fischer Verlag:Stuttgart, Jena, 437 pp.
- Lind, O.T. (1985). *Handbook of common methods in Limnology*. Second Ed., Iowa, USA: Kendall/ Hunt Pub. Comp. Press.
- Malone T. C., Crocker L. H., Pike S. E., Wendler B. W. (1988). Influences of river flow on the dynamics of phytoplankton production in a partiallystratified estuary. *Marine Ecology Progress Series*, 48(3), 235-249
- Pestalozzi, H. G. (1955). *Das Phytoplankton Des Süßwassers, Band XVI, 4. Teil; Euglenophyceen*.
- Pestalozzi, H. G. (1968). *Das Phytoplankton Des Süßwassers, Band XVI, 1. Teil, Cyanophyta*.
- Pestalozzi, H. G. (1982). *Das Phytoplankton Des Süßwassers 8. Teil, 1. Hälfte, Conjugatophyceae;Zygnematales und Desmidiaceae, Germany*.
- Pestalozzi, H. G. (1983). *Das Phytoplankton Des Süßwassers 7. Teil: 1. Hälfte, Chlorophyceae;Chlorococcales, Germany*.
- Round, F. E. (1953). An investigation of two benthic algal communities in Malharm Tarn, Yorkshire. *Journal Ecology*, 41, 174-197. DOI: 10.2307/2257108
- Solak C. N., Kullikovskiy M., Kıs T. K., Kaleli A., Kociolek J.J. P., Acs E. (2018). The distribution of centric diatoms in different river catchments in the Anatolian Peninsula, Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 42,100-122. DOI:10.3906/bot-1703-23
- Weinstein M. P., Charles M. Courtney C. M., Kinch J. C. (1977). *The Marco Island Estuary: a summary of physicochemical and biological parameters*. Florida Academy of Sciences, 40(2), 97-124
- Wetzel, R. G., Likens, G. E. (2000). *Limnological Analyses*. Third Edition, New York: Springer-Verlag Inc., Press.
- Zeybek, M., Kalyoncu H. (2016). Kargı Çayı (Antalya, Türkiye) su kalitesinin fizikokimyasal parametrelere göre belirlenmesi. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 33(3), 223-231 DOI: 10.12714/egejfas.2016.33.3.06

(Received for publication 10 May 2018; The date of publication 15 August 2018)



A new record of a Marasmioid species for Turkish mycobiota

Yasin UZUN, Semiha YAKAR, Abdullah KAYA *¹

¹Karamanoğlu Mehmetbey University, Kâmil Özdağ Science Faculty, Department of Biology, 70100, Karaman, Turkey

Abstract

A new marasmioid species, *Marasmius curreyi* Berk. & Broome belonging to the family *Marasmiaceae*, is given as new record for the mycobiota of Turkey from Tonya district of Trabzon province. A brief description of the taxon is given together with its photographs related to macro and micromorphologies.

Key words: new record, macrofungi, *Marasmius*, Trabzon, Turkey

----- * -----

Türkiye mikobiyotası için yeni bir Marasmioid tür kaydı

Özet

Marasmiaceae familyasına ait bir marasmioid tür olan *Marasmius curreyi* Berk. & Broome Trabzon'un Tonya ilçesinden Türkiye makromikotasi için yeni kayıt olarak verilmiştir. Taksonun kısa betimlemesi makro ve mikromorfolojisine ait fotoğraflarla birlikte verilmiştir.

Anahtar kelimeler: yeni kayıt, makromantar, *Marasmius*, Trabzon, Türkiye

1. Introduction

Marasmius Fr. is a marasmioid genus within the family *Marasmiaceae* Roze ex Kühner (*Agaricales*, Basidiomycota). Its members are characterised with marasmioid or collybioid, small to medium-sized basidiocarps; smooth, glabrous, grooved or radially sulcate pileus; well-developed, white to pale cream, pale ochraceous, collariate or non collariate lamellae; insititious or non-insititious stipe; white to pale cream spore print; hyaline, smooth, thin-walled, nondextrinoid spores (Antonín and Noordeloos 2010).

Marasmioid species play an essential saprobic role in forest ecosystems and widely distributed especially in tropical regions where they play an important role in litter decomposition. But they are often overlooked by collectors due to their tiny size (Kuo, 2013; Oliveria and Sanchez-Ramirez, 2014).

Though more than 500 species of *Marasmius* taxa are estimated to exist worldwide (Kirk et al., 2008) and 60 and 40 of them had been reported from North America and Europe respectively (Kuo, 2013), only 20 conformed members of the genus *Marasmius* have so far been recorded from Turkey (Öner, 1972; Demirel, 1998; Kaya and Öztürk, 1999; Kaşık et al., 2001; Öztürk et al., 2003; Pekşen and Karaca, 2003; Demirel et al., 2004; Uzun et al., 2006; Türkekul, 2005, 2008; Alı et al., 2007; Kaya, 2009; Hüseyinov et al., 2001; Işiloğlu et al., 2009; Sesli and Denchev, 2014; Solak et al., 2015).

During our routine field trips in Tonya (Trabzon) district, within the scope of a university research fund project, some marasmioid fungi samples were collected. After necessary investigations they were identified as *Marasmius curreyi* Berk. & Broome. A control of the current checklists (Sesli and Denchev, 2014; Solak et al., 2015) and the latest records related to *Agaricales* (Akata et al., 2016; Dengiz and Demirel, 2016; Öztürk et al., 2016; Sesli et al., 2016; Uzun and Demirel, 2017; Uzun et al., 2017; Sadullahoğlu and Demirel, 2018) on the macromycetes of

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903382262156; Fax.: +903382262150; E-mail: kayaabd@hotmail.com

Turkey, indicated that the taxon was not recorded from Turkey before. Therefore, the study aims to make a contribution to the mycobiota of Turkey.

2. Materials and methods

Marasmius Fr. samples were collected in Tonya district of Trabzon province in 2016. The samples were photographed at their natural habitats and necessary characteristics related to its ecology and morphology were noted. After transferring the samples to the laboratory, they were dried and prepared as fungarium specimens. Investigation related to its micromorphology were carried out under Nikon Eclipse Ci trinocular light microscope. Meltzer's reagent was used as a chemical media. Micromorphologic photographs were obtained with the help of a DS-Fi2 digital camera. Identification of the samples were carried out according to Antonín (1989), Breitenbach and Kränzlin (1991), Baird et al. (1992), Antonín and Buyck (2006), Antonín and Noordeloos (2010), Desjardin et al. (2015). The studied *Marasmius* samples are stored at Karamanoğlu Mehmetbey University, Kamil Özdağ Science Faculty, Department of Biology.

3. Results

Sytematics of the taxon is in accordance with Kirk et al. (2008) and speciesfungorum.org (accessed at July 2017). The description of macroscopic and microscopic characters, ecology, and distribution of the species are provided and discussed briefly.

Marasmius curreyi Berk. & Broome

Synonyms: *Androsaceus curreyi* (Berk. & Broome) Rea, *Chamaeceras curreyi* (Berk. & Broome) Kuntze, *Marasmius curreyi* var. *bicystidiatus* Antonín & Hauskn., *Marasmius curreyi* var. *distantifolius* Antonín.

Macroscopic features: Pileus 2-9 mm in diameter, conical-hemispherical when young, convex to plano-convex when mature, depressed at the center, sulcate, with a crenulate to wavy margin, surface finely tomentose, light to ochraceous-brown, darker at the center. Flesh thin, membranous, odor and taste mild to not distinctive. Gills distans, collariate, collarium broadly umbilicate when mature, whitish to cream colored, with concolorous, finely pubescent edge. Stipe 10-27 × 0.3-0.5 mm, filiform, more or less equal, surface smooth, brown, paler to whitish at apex, blackish-brown at basal part (Figure 1a).

Microscopic features: Basidia 22-25 × 8.5-9 μm, clavate, generally four spored. Cheilocystidia 14-19 × 8-12 μm, clavate to subcylindrical, thin walled, with projections. Pileipellis made up of broom cells of the Siccus-type with clavate or cylindrical-clavate basal part (Figure 1b). Pleurocystidia not observed. Clamp connections present. Spores 8-9.6 × 4.5-5.5 μm, ellipsoid, ellipsoid-fusoid or amygdaliform, thin-walled, hyaline (Figure 1c), not dextrinoid, spore print not observed.

Ecology: Gregarious in humid forest on dead stems of plants (Antonín and Buyck, 2006; Desjardin et al., 2015), occasionally on decaying remmants of *Cyperaceae*, *Juncaceae* and *Poaceae* (Antonín and Noordeloos, 2010) especially during summer.

Specimen examined: Trabzon, Tonya, Karağaçaılı village, hazelnut garden, on grass remains, 40°55'N-39°17'E, 640 m, 20.06.2016, Yuzun 5156.



Figure 1. *Marasmius curreyi*: a. basidiocarps, b. pileipellis cells, c. basidiospores

4. Conclusions and discussion

Marasmius curreyi is mainly characterized by a brownish pileus, rather distant collariate lamellae with concolorous edges, pileipellis with broom cells of the Siccus-type, and mainly monocotyledonous substrate (Antonín and Noordeloos, 2010; Antonin and Buyck, 2006). Like *M. curreyi*, *Marasmius nigrobrunneus* (Pat.) Sacc. is another grass-loving *Marasmius* species and may be confused with *M. curreyi*. But the generally longer stipe which arises directly from rhizomorphs or from substrate and more brownish pileus distinguishes it from *M. curreyi* (Wannathes et al., 2009). *Marasmius curreyi* is most likely to be confused with several other gramminicolous species, *M. epodius* Bres. and *M. armeniacus* Gilliam. Among them, *M. epodius* differs from *M. curreyi* with its longer basidiospores and *M. armeniacus* differs with collarless lamellae (Gilliam, 1975), the absence of depressed to umbilicate pileal disc and non-institious stipe (Desjardin et al., 2015).

Acknowledgements

The authors would like to thank Karamanoğlu Mehmetbey University Research Fund for supporting the project (02-M-15) financially.

References

- Diversity and Conservation, 9(2), 57-69.
- Allı, H., Işıloğlu, M., Solak, H. (2007). Macrofungi of Aydın Province, Turkey. Checklist to Mycotaxon, 99, 163-165.
- Antonín, V. (1989). Type studies in Marasmioid and Collybioid Fungi (Tricholomataceae) II. *Agaricus graminum*. Mycotaxon 36(1), 19-27.
- Antonín, V., Buyck, B. (2006). *Marasmius* (Basidiomycota, Marasmiaceae) in Madagascar and the Mascarenes. Fungal Diversity 23, 17-50.
- Antonín, V., Noordeloos, M.E. (2010). A monograph of marasmioid and collybioid fungi in Europe. IHW-Verlag: Eching, Germany.
- Baird, R.E., Wilson, J.P., Summer, D.R. (1992). Identity and Pathogenicity of Two *Marasmius* Species from the Sterile While Basidiomycete Complex. Plant Dis. 76, 244-247.
- Breitenbach, J., Kränzlin, F. (1991). Fungi of Switzerland. Volume 3, Verlag Mykologia: Luzern, Switzerland.
- Demirel, K. (1998). New records for the fungus flora of Turkey. Turkish Journal of Botany 22, 349-353.
- Demirel, K., Uzun, Y., Biber, G. (2004). Macrofungi of Şavşat (Artvin) District. The Herb Journal of Sytematic Botany, 11(2), 191-206.
- Dengiz, Y., Demirel, K. (2016). Şirvan (Siirt) Yöresinde Yetişen Makrofunguslar Üzerinde Taksonomik Bir Araştırma. Yüzüncü Yıl University Journal of the Institute of Natural & Applied Sciences 21(2), 112-123.
- Desjardin, D.E., Wood, M.G. & Stevens, F.A. (2015). California Mushrooms: The Comprehensive Identification Guide. Timber Press: Portland, OR.
- Gilliam, M.S. (1975). New North American Species of *Marasmius*. Mycologia 67 (4), 817-844.
- Huseyinov, E., Selçuk, F., Aslantaş, I. (2001). Some data on agaricoid fungi from Sivas Province (Turkey). Mikologia & Fitopatologia 35(4), 29-33.
- Işıloğlu, M., Allı, H., Solak, M.H., Watling, R. (2009). A new *Marasmius* on *Castanea sativa* from Turkey. Mycotaxon 107, 343-347.
- Kaşık, G., Öztürk, C. & Toprak, E. (2001). Macrofungi of Niğde Province (Turkey). The Herb Journal of Systematic Botany, 8(2), 137-142.
- Kaya, A. (2009). Macrofungi of Huzurlu high plateau (Gaziantep-Turkey). Turkish Journal of Botany, 33, 429-437.
- Kaya, A., Öztürk, A. (1999). Two new records for the mycoflora of Turkey. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6(1), 27-29.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. (2008). Dictionary of the Fungi, 10th ed. Wallingford, UK: CAB International.
- Kuo, M. (2013, January). Marasmioid mushrooms. Retrieved from the MushroomExpert.Com Web site: <http://www.mushroomexpert.com/marasmioid.html>
- Oliveira, J.J.S., Sanchez-Ramirez, S., Capelari, M. (2014). Some new species and new varieties of *Marasmius* (Marasmiaceae, Basidiomycota) from Atlantic Rainforest areas of São Paulo State, Brazil. Mycol Progress 13, 923-949.
- Öner, M. (1972). A contribution to the knowledge of common Turkish higher fungi. Mycopathologia et Mycologia Applicata 47(4), 369-373.
- Öztürk, C., Kaşık, G., Doğan, H.H., Aktaş, S. (2003). Macrofungi of Alanya District. Turkish Journal of Botany 27, 303-312.
- Öztürk, Ö., Doğan, H.H., Şanda, M.A. (2016). Some new additions to Turkish mycobiota from Sakarya region. Biological Diversity and Conservation, 9(1), 97-100.

- Pekşen, A., Karaca, G.H. (2003). Macrofungi of Samsun Province. *Turkish Journal of Botany*, 27, 173-184.
- Sadullahoğlu, C., Demirel, K. 2018. *Flammulina fennae* Bas, A New Record from Karz Mountain (Bitlis). *Anatolian Journal of Botany* 2(1), 19-21.
- Sesli, E., Türkekel, İ., Akata, I., Niskanen, T. (2016). New records of Basidiomycota from Trabzon, Tokat, and İstanbul provinces in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 40(5), 531-545.
- Sesli, E., Denchev, C.M. (2014). Checklists of the myxomycetes, larger ascomycetes, and larger basidiomycetes in Turkey. 6th edn. *Mycotaxon Checklists Online*. (<http://www.mycotaxon.com/resources/checklists/sesli-v106-checklist.pdf>), 1-136.
- Solak, M.H., Işıloğlu, M., Kalmış, E., Allı, H. (2015). Macrofungi of Turkey Checklist Vol II. Üniversiteliler ofset, İzmir.
- Türkekel, İ. (2005). Two new records for macrofungi of Turkey. *The Herb Journal of Sytematic Botany* 12(2), 187-190.
- Türkekel, İ. (2008). Macrofungus flora of Almus and Çamiçi plateau (Tokat). *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 1(1), 53-55.
- Uzun, Y., Demirel, K. 2017. A New *Mycena* Record for the Mycobiota of Turkey. *Anatolian Journal of Botany* 1(1), 9-11.
- Uzun, Y., Kaya, A., Karacan, İ.H., Yakar, S. (2017). New additions to Turkish Agaricales. *Biological Diversity and Conservation*, 10(2), (in print).
- Uzun, Y., Keleş, A., Demirel, K. (2006). Contributions to the macrofungi flora of Gümüşhane Province. *Turkish Journal of Botany*, 30, 39-46.
- Wannathes, N., Desjardin, D.E., Hyde, K.D., Perry, B.A., Lumyong, S. (2009). A monograph of *Marasmius* (Basidiomycota) from Northern Thailand based on morphological and molecular (ITS sequences) data. *Fungal Diversity* 37, 209-306.

(Received for publication 27 July 2017; The date of publication 15 August 2018)



Occurrence of the Mediterranean Monk seal (*Monachus monachus*) in Yeşilovacık bay (Mersin, Turkey); a case report for anthropogenic impact assessments

Nuri YİĞİT ^{*1} Deniz AYAS ², Ercüment ÇOLAK ¹

¹ University of Ankara, Faculty of Science, Department of Biology, Beşevler Ankara Turkey

² University of Mersin, Faculty of Fisheries, Mersin, Turkey

Abstract

Up to 2013 there was a small-scale mine loading port with small pier in Yeşilovacık bay. Then the new pier extending to open sea in south west direction was built. The impact assessments of the former and later port on the monk seal were evaluated by monitoring their activities in the bay.

The monk seal records were very rare during the period of extensive commercial fishing and small scale mine loading activity in 2012. In period of the construction, although monk seal was less frequently observed on the rocky east shore, on the sandy beach and harbor area, a new pup was seen around the same breeding cave with the distance of approximately 500 meters to new pier. In our monitoring period, the daily activities of monk seal were mostly recorded between 8-12 am based total of 21 monk seal records. The speed of a juvenile were recorded as maximum 16.8 km/ h during fish chasing in the evening.

Our findings supported that major threat on the monk seal are by catch in gill nets, bottom trawl nets, over-fishing and deliberate killing more than the pier constructions caused noise, turbidity and over-lighting. Up to 2017, the observing frequencies are getting increased in the harbor area. The reason for that is though due to the alternative employment for local people, which mitigates the conflicts between monk seals and fishermen.

Key words: Monk seal, threats, Yeşilovacık bay, Turkey

----- * -----

Yeşilovacık Koyu'ndaki (Mersin, Türkiye) Akdeniz Fokunun (*Monachus monachus*) Varlığı; antropojenik etki değerlendirmesi vaka raporu

Özet

Yeşilovacık körfezinde, 2013 yılına kadar küçük bir iskele ve küçük ölçekli bir maden yükleme limanı bulunmaktaydı. Daha sonra güneybatı yönünde açık denize uzanan yeni iskele inşa edilmiştir. Eski ve sonraki yapılan limanın Keşiş fokunun üzerindeki etkileri, bunların körfezdeki faaliyetlerinin izlenmesi ile değerlendirilmiştir.

Keşiş foku kayıtları, 2012 yılında yaygın ticari balıkçılık ve küçük çaplı mayın yükleme faaliyetleri sırasında çok azdı. İnşaat döneminde, kayalığın doğu kıyısında, kumlu plaj ve liman bölgesinde Keşiş foku daha az gözlenmiş olmasına rağmen, yeni bir yavru aynı üreme mağarasının etrafında yeni iskeleye yaklaşık 500 metre uzaklıkta gözlenmiştir. İzleme periyodumuzda, kaydedilen toplam 21 fokun günlük faaliyetleri çoğunlukla gündüz 8-12 saatleri arasında kaydedildi. Yavruların maksimum hızı akşam balık avlamaları sırasında 16,8 km/s olarak kaydedildi.

Bulgularımız, balık ağları, dip trol ağları, aşırı avlanma ve kasıtlı öldürmenin Keşiş foku üzerindeki en büyük tehditler olarak, gürültü, bulanıklık ve aşırı aydınlatmaya neden olan iskele yapımlarından daha fazla olduğunu desteklemiştir. 2017 yılına kadar liman bölgesinde gözlem frekansları gittikçe artmıştır. Bunun sebebi foklar ve balıkçılar arasındaki çatışmaları azaltan, yerel halkın alternatif istihdamıdır.

Anahtar kelimeler: Keşiş foku, tehditler, Yeşilovacık körfezi, Türkiye

1. Introduction

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903122126720; Fax.: +903122232395; E-mail: nyigit@science.ankara.edu.tr

Monachus monachus (Hermann, 1779) which belongs to the genus *Monachus* (Fleming, 1822) is distributed in Mediterranean coast of Turkey as a single seal species (Mursaloğlu, 1964; Gücü et al., 2004; Güçlüsoy, 2008; MOm, 2009). Preliminary studies about The Mediterranean monk seal on Turkish coast was started by Bahtiye Mursaloğlu establishing a monitoring station at Alaçatı town of İzmir province (Mursaloğlu 1964, 1984, 1986, 1992). The population size was estimated approximately 300 – 350 individuals in the eastern Mediterranean Sea by MOm (2009) and up to 600 by Johnson et al. (2006) and around 700 by (Karamanlidis et al., 2015) in the Mediterranean population. Apart from these, some reports indicated that the abundance of the monk seal population decreased (Aguilar, 1999; Johnson et al., 2006), and thus Mediterranean monk seal is classified as endangered species according to IUCN criteria (IUCN, 2017).

On Turkish coasts, the researches were increasingly focused on the Mediterranean monk seal due to the threats for the Turkish population (Berkes, 1978; Berkes et al., 1979; Öztürk and Dede, 1995; Veryeri et al., 2001; Güçlüsoy and Savaş 2003a, b; Gücü et al., 2004; Güçlüsoy et al., 2004; Kıraç and Güçlüsoy, 2008; Danyer et al., 2013). However, the precise data on Turkish population are absent, 9 individual around Foça and 22 around the west coast of Antalya province were reported by Güçlüsoy and Savaş (2003a) and Gücü et al., (2004), respectively.

Androukaki et al. (1999, 2006) listed the main threats for the Mediterranean monk seal in Greece as gradual destruction of the coastal ecosystem, tourism, deliberate killings, drowning in fishing gear. They also noticed marine pollution, over-fishing and stochastic events (virus outbreak and an oil spill as potential and imminent threats). According to the IUCN mammal review, the primary threats to marine mammals were accidental deaths and pollution, and it was also suggested that harvesting remained a major threat for half of the marine mammal species in the world (Schipper et al., 2008). Gonzales and Larrinoa (2013) also reported that the most frequent negative interactions between monk seals and fisheries were by catch in gillnets and bottom trawl nets.

On Turkish coasts, there are many hotspot locations for the Mediterranean monk seal; one in Black sea, one in Marmara Sea, a few in Aegean (western coast) and Mediterranean (southern coast). This research is focused on southern population around Taşucu with long term monitoring in Yeşilovacık bay of Mersin province (Figure 1, 2), especially Taşucu coast is well known location for the Mediterranean monk seal with suitable breeding caves. Yeşilovacık bay is located at 30 km west of Taşucu town, and covers a long sand coast and rocky slope in eastern side with a cave (Figure 2). There was a small port in Yeşilovacık bay used by fishermen and small vessels transporting sand mine. After a large concrete plant started to be built around Yeşilovacık town, new and large port come into the agenda for intensive transporting, and NGOs reacted to the investment as harmful to local monk population. This research focused on the situation of monk population using the bay before and after new port construction and also human – monk conflict along with long term monitoring between 2012 and 2017.

2. Materials and methods

The study was conducted between 2012–2017 in Yeşilovacık bay (Mersin province) of Eastern Mediterranean coast of Turkey to determine the Mediterranean monk seal activity (Figure 1, 2). For this purpose, all around the bay, 6 monitoring spots were determined and these spots were observed weekly by cameras and direct observations. Also a camera was mounted in front of the suspected breeding cave (Figures 3, 4) and camera records were weekly controlled during the period. The chasing speed of the monk seal was calculated based on the distance between two points in the harbor and chasing time of this distance on video records (m/sec). Also major fishes and invertebrate fauna which are the food source of the seal are also investigated by scuba diving.

3. Results

The studies conducted on the Yeşilovacık bay provide us to compare the seal activity for the bay before and after the new port construction (Table 1). Prior to the construction of the new port, small-scale loading activities were carried out in the port. According to the long term observations by Dr. Deniz Ayas who is working on marine biology around the Mersin Bay, monk seal observation was very rare before the construction of the new port.

During the study period of 2012 – 2017, anthropogenic factors such as fishing, netting and other disturbing factors were taken under control in the bay via employing security officers and a specialist. 21 seal records were taken from one adult female and two pups at Yeşilovacık bay. Of these records, 17 are video or photograph and 4 are visual recordings. In addition, the most of records were made from pups (17 records) and 4 from adult female (Table 1, Figure 5, 6, 7). It was also determined that the daily activity ranges from early morning until late night with the latest records from 01: 33 am. However the most activities (n=7) were observed between 8 – 12 am. The first juvenile surviving his life has frequently used both port and harbor to find foods (Figure 8, 9) the speed of the first juvenile at an age of three year old were recorded as 11 km /h, 14.4 km/ h and 16.8 km/ h in the distances of 30-35 meters for fish chasing in the evening video records (Figure 10).

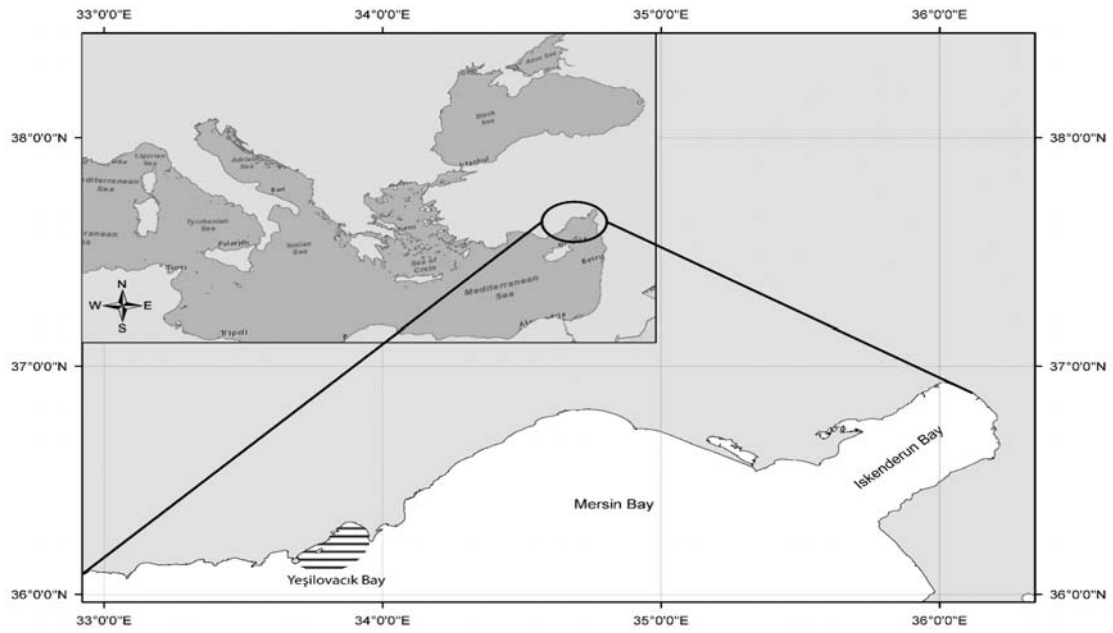


Figure 1. Yeşilovacık bay of Mersin provinces



Figure 2. Yeşilovacık bay and the rocky slopes (arrows) on the eastern coast



Figure 3. Former port (left), mounted camera (middle) and position of breeding cave (right) (arrows showed the location of the camera (1) and the cave (2))



Figure 4. Mounted camera system directed to the cave

The activity of the juvenile varied from day time to evening but adult showed tendency towards late afternoon and evening. It is also observed that especially, the juvenile prefers to chase food under the pier without being disturbed by human activities. Reason for this is there is a restricted area for fisheries around the pier probably abundant with the fish and invertebrates. Fishes that were more abundantly observed around the pier are *Liza* spp., *Siganus* spp., *Pagellus* spp., *Nemipterus randalli*, *Sphyræna* spp., *Diplodus vulgaris*, *Diplodus sargus*, *Oblada melanura*, *Epinephelus* spp., *Saurida lessepsianus*. In addition to the fishes, some invertebrates in the littoral zone of port filling and pier pillars such as Mollusc (*Chthamalus stellatus*, *Brahiodontes pharaonis*, *Patella caerulea*), shrimp and prawn (*Penaeus semisulcatus*, *Marsupenaeus japonicus*, *Melicertus kerathurus*, *Parapenaeus longirostris*, *Metapenaeus monoceros*), carps (*Callinectes sapidus* and *Portunus segnis*), cephalopods (*Sepia officinalis*, *Loligo vulgaris*) were observed. Of two juvenile monk seals under monitoring, one was found dead (borne in October 2013) on the sandy beach of the bay in February 2014.

The nearest monk seal cave in the bay is Balıklı cave (sometime misused as Kaklık slit), which is located on the east coast of the bay and is about 500 meters away from the harbor is the only known breeding cave in the bay. According to our estimation, the birth should occur between September and early November. So the port construction was interrupted not to disturb the breeding monk seal. This cave was used by a female, and it gave birth to two pups in the successive years of 2012 and 2013 during the five years monitoring. Human-induced attack with explosive was done in front of the breeding cave, and many death fishes were observed around the cave. However this attack did not cause the seal's death and monk seals continue to inhabit the cave and the bay.

Table 1. Mediterranean monk records on Yeşilovacık bay

Date and hours	Locations	Sex	Record types	Comments
30.12.2012 / 16 ⁴⁹	Cave entrance	Adult female	Photograph	Mother and pup in the cave; breast-feeding period
20.01.2013 / 11 ²⁸	Cave entrance	First juvenile	Photograph	First juvenile born in the cave, and first observation out of the cave
24.02.2013 12 ¹²	Cave entrance	First juvenile	Photograph and video	First juvenile was observed in front of cave
20.12.2013 16 ⁰⁰	Swimming around the cave	First juvenile	Photograph	First juvenile was observed in swimming to entering the cave
16.02.2014 09 ³⁴	In the port area	Second juvenile	Photograph and video	The photograph of second juvenile before dying
17.02.2014 14 ¹⁵	In the port area	Second juvenile	Photograph	The photograph of second juvenile before dying
01.05.2014-11 ²⁵	Swimming around the cave	First juvenile	Photograph	The first juvenile at an age of 1.5 year old swimming from the cave to open ocean still use the cave
03.02.2015-14 ³¹	In the port area	First juvenile	Photograph	First juvenile which is at an age of 2.5 year old is feeding under the port, and leaving the port to ocean with fish caught
10.03.2015-17 ³⁰	Swimming around the cave	First juvenile	Photograph and video	First juvenile swimming from the port to the cave after the feeding activity around the port
13.03.2015-11 ⁰⁰	In the harbor	Adult female	Photograph and video	Adult female swimming and searching the food in the harbor
16.04.2015 20 ¹⁵	In the harbor	Adult female	Photograph and Video	Adult female swimming and searching the food in the harbor
29.04.2015 10 ⁰³	Swimming around the cave	First juvenile	Photograph and Video	First juvenile swimming from the port to the cave
28.01.2016-16 ⁰⁵	In the port area	Adult female	Visual record	Adult female chasing the fish under the port
12.02.2016-21 ³⁰	In the port area	First juvenile	Video	Feeding activity under the port
16.02.2016-17 ³⁴	In the port area	First juvenile	Photograph and Video	Feeding activity under the port
27.09.2016-17 ⁰⁵	In the harbor	First juvenile	Photograph and Video	Feeding activity under the port and in the harbor
22.01.2017-01 ⁰¹	In the port area	First juvenile	Photograph and Video	Feeding activity under the port
28.02.2017-22 ⁴³ 25.05.2017- 9.30 08.06.2017- 18.50 18.06.2017- 1.33	In the port area	First juvenile	Video Visual record	Feeding activity under the port



Figure 5. The seals were recorded around the breeding cave

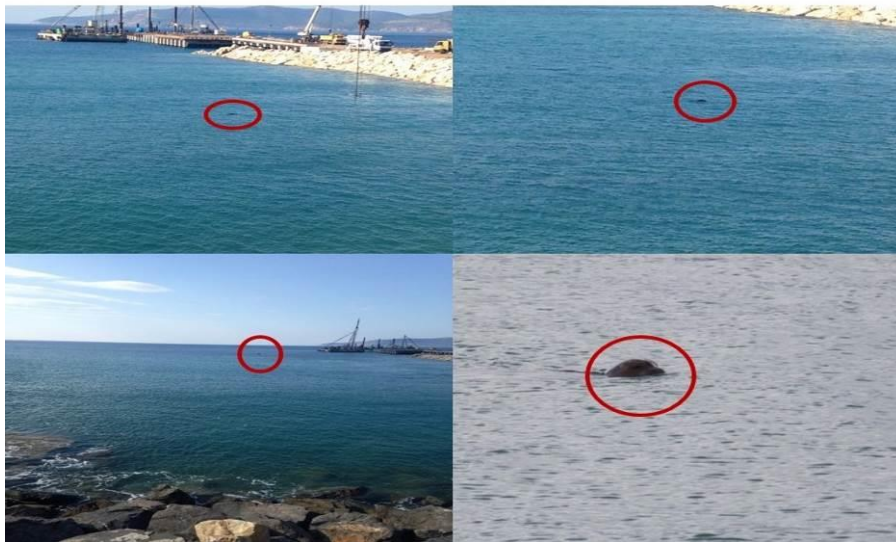


Figure 6. The seal were seen between rocky coast and pier

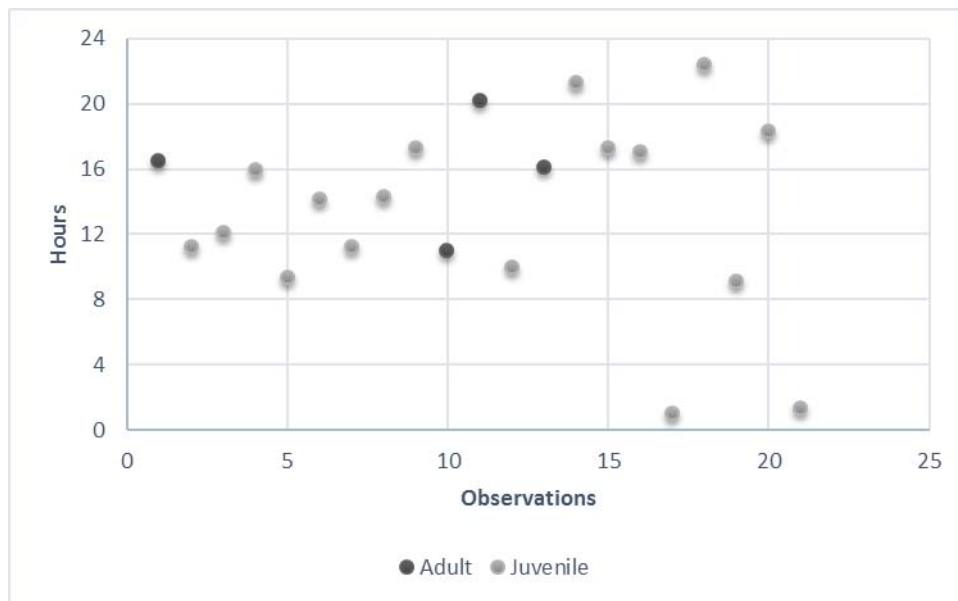


Figure 7. Recorded activities of The Mediterranean monk seals between November 2012 and June 2017.



Figure 8. The seals were recorded in very proximity to the coast and boats



Figure 9. The seal hunting in harbor without any anthropogenic threats



Figure 10. The seals hunting in harbor; their chasing speed was calculated based on video records.

4. Conclusions and discussion

The major threat to the seal is originated from fishermen which frequently kill monk seals for breaking up fish nets. In consistent with our opinion, some of the seal dead found on the coast between Antalya and Hatay were shot by gun (Figure 11). The fishermen of Yeşilovacık had the same attitude towards the seal. In the beginning of the harbor construction, a number of measures were taken to protect the seals in the bay, and also the protection measures were increased by employing security officers and a specialist. Under the measurements, fishing along the eastern rocky slopes were hindered, harbor and port were observed through the day, and the training was given to company employees for raising the awareness. Also the cameras were placed on the rocky hillside on the east coast (especially in front of the cave) and into the harbor, and also visual observations were made during the day. The dead juvenile (born in October 2013) was found lying on the sandy beach in February, 2014. In the investigation of local authorities, the cause of death was not human attack and was reported as infection but our opinion on this death was malnutrition due to stormy ocean in winter. Neves and Pires (1999) stated that the starvation, waves surging into caves and separation from mother can cause the death of newborn pups. Habitat destruction and using the cave without an internal beach have been identified as a major threat to the eastern Mediterranean population of monk seal (Güçlüsoy and Savaş 2003 a, Gücü et al 2009 a,b, Kırac et al 2013). Danyer et al. (2013) examined a dead monk seal found in Antalya coast and reported the death causes as endoparasite, internal bleeding, and systemic infection. Neves (1998) reported that *Liza aurata*, *Sephia officinalis* are among the food of adult seal but crabs and limpets of the mostly sub adult. Such food

types are abundant around the pier, and it is thought that the lack of food is not the cause of the juvenile death. But the reason is probably the juvenile seal's being unable to reach food due to severe weather conditions.



Figure 11. The seal deaths between Antalya and Hatay coasts (<http://www.iha.com.tr/haber-hatayda-olu-fok-bulundu-253438/>, <http://www.iha.com.tr/haber-dumana-otopsi-yapilacak-274926/>, <http://www.aksam.com.tr/doga-hayvan/gazipasada-olu-akdeniz-foku-kiyiya-vurdu/haber-235898>, <http://www.yabantv.com/haber/13988-antalyanin-maskotu-%E2%80%98dumani-katlettiler>, <http://www.milliyet.com.tr/yavru-foku-vurdular-gundem/detay/1845536/default.htm-yeşilovacık>).

The area where Yeşilovacık bay is located is especially important for the seal population in the eastern Mediterranean, many caves used by the seal are known between Yeşilovacık and Taşucu town which is on the east of Yeşilovacık bay (Güçlüsoy et al 2004, Gücü et al. 2004, Ok 2006, Gücü 2010). Although it is known that there are more seal populations around Taşucu town, only one adult female with two litters were monitored in Yeşilovacık bay during the study period, this finding supported the idea that adult female depends on the breeding cave and has relatively smaller home range than male. In support of our suggestion, most of the seals recorded dead between Antalya and Hatay coasts were males, especially, adult specimens (Figure 11).

According to our estimation, the birth should occur between September and early November, when the considering the gestation period as eleven months (Pastor and Aguilar 2003), it can be said that the mating occurs in January – February. According to some references, it was reported that the births occur through the year (Gazo et al. 1999, 2000 and Pastor and Aguilar 2003) but no such an observation was made in Yeşilovacık bay in the period of 5 years. Our finding on pupping is consistent with Gücü et al (2004) and Pires et al (2008).

The view of the port before and after construction is given in Figure 12. During the port construction, the construction was interrupted to prevent the seal from being disturbed by noise (piling up caused by staking into the sea) in the breeding season (September and November). After the construction was completed, it was determined that there was no regular excessive noise to scare the seals. After this interval, the port was in the operation, up to now 121 indigenous people of Yeşilovacık were employed as trucks drivers (60), cleaner and security (11), mariner and loader (38) and others (12). When the considering the population of Yeşilovacık town with 2024 people in 2016, The number of employed people in the port is about 6 % of the population of Yeşilovacık. When the Turkish families are generally thought to be composed of 4-5 persons, the number of people benefiting from the port is about 24 % of total population, this number does not cover the people who work in the nearby cement factory providing cargo to the port. This was considered the major factor to mitigate the conflict between the seal and indigenous people. However, fishing activities such as gillnets and bottom trawl nets continue the threat on the Mediterranean monk seal around the Yeşilovacık and Taşucu. The deliberate killing was reported to be major threat on monk seal in Turkish coast (Güçlüsoy et al 2004, Kıracı et al. 2013). This was supported by the fact that some dead monk seals found between Antalya and Hatay were reported to be shot by gun, especially two dead in Gazipaşa coast, therefore the restriction of fisheries and establishment of the protected area should be recommended to the authority in the shore line with the pupping caves.

Acknowledgement

This study was sponsored by Serdar Engineering Ltd Company behalf on Eren Holding in the frame of the harbor project of Yeşilovacık bay.

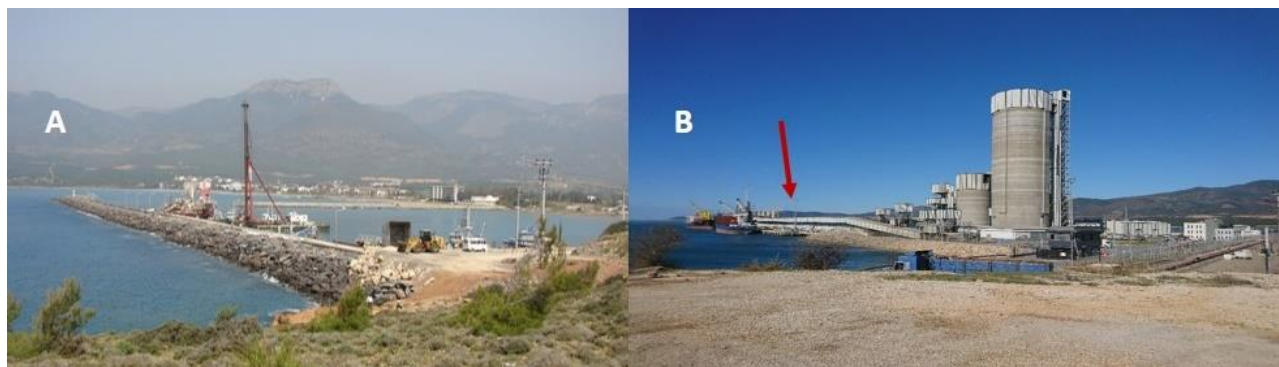


Figure 12. The port before (A) and after (B) construction (arrow shows new pier).

References

- Aguilar, A. (1999). Biological factors affecting variability of persistent pollutant levels in cetaceans. *Journal of Cetacean Research and Management*, 1, 83-116.
- Androukaki, E., Adamantopoulou, S., Dendrinou, P., Tounta, E., Kotomatas, S. (1999). Causes of mortality in the Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) in Greece. *Contributions to the Zoology and Ecology of the Eastern Mediterranean Region*, 1, 405-411.
- Androukaki, E., Chatzisprou, A., Adamantopoulou, S., Dendrinou, P. *et al.* (2006). Investigating the causes of death in monk seals, stranded in coastal Greece (1986–2005). 20th European Cetacean Society Conference, Gdynia, 2–6 April 2006.
- Berkes, F. (1978). The possibility of movements of *Monachus monachus* between the coastal waters of Greece and Turkey. September 1978. Institute of Urban and Environmental Studies, Ontario: Brock University, .
- Berkes, F., Anat, H., Esenel, M., Kislaloglou, M. (1979). Distribution and Ecology of *Monachus monachus* on Turkish coasts. UNEP Technical Report 1, Oxford: Pergamon Press.
- Danyer, E., Aytemiz, I., Özbek, E. Ö., Tonay, A. M. (2013). Preliminary study on a stranding case of Mediterranean monk seal *Monachus monachus* (Hermann, 1779) on Antalya coast, Turkey, August 2013. *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, 19(3), 359-364.
- Gazo, M., Layna, J.F., Aparicio, F., Cedenilla, M.A., González, L.M., Aguilar, A. (1999). Pupping season, perinatal sex ratio and natality rates of the Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) from the Cabo Blanco colony. *Journal of Zoology*, 249, 393-401
- Gazo, M., Aparicio, F., Cedenilla, M. A., Layna, J. F., Gonzalez, L. M. (2000). Pup survival in the Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) colony at Cabo Blanco Peninsula (Western Sahara-Mauritania). *Marine Mammal Science*, 16(1), 158-168.
- González, L.M. 2004. Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*). Up-date of the status and conservation progress. Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals. Twelfth Meeting of the CMS Scientific Council Glasgow, Scotland, United Kingdom, 31 March - 3 April 2004: 1-7
- González, L.M., De Larrinoa, P.F. (2013). Mediterranean monk seal *Monachus monachus* distribution and fisheries interactions in the Atlantic Sahara during the second half of the 20th century. *Mammalia*, 77(1), 41-49.
- Güçlüsoy, H. (2008). Interaction between monk seals, *Monachus monachus* (Hermann, 1779), and artisanal fisheries in the Foca Pilot Monk Seal Conservation Area, Turkey. *Zoology in the Middle East*, 43, 13–20.
- Güçlüsoy, H., Savas, Y. (2003a). Status of the Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) in the Foça Pilot Monk Seal Conservation Area, Turkey. *Zoology in the Middle East*, 28, 5-16.
- Güçlüsoy, H., Savaş, Y. (2003b). Interaction between monk seals *Monachus monachus* (Hermann, 1779) and marine fish farms in the Turkish Aegean and management of the problem. *Aquaculture Research*, 34(9), 777-783.
- Güçlüsoy, H., Kırac, C.O., Veryeri, N.O., Savaş, Y. (2004). Status of the Mediterranean Monk Seal, *Monachus monachus* (Hermann, 1779) in the Coastal Waters of Turkey. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 21 (3-4), 201–210.
- Gücü, A.C., Gücü, G., Örek, H. (2004). Habitat use and preliminary demographic evaluation of the critically endangered Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) in the Cilician Basin (eastern Mediterranean). *Biological Conservation*, 116(3), 417-431.
- Gücü, A.C., Ok, M., Sakinan, S. (2009a). A survey of the critically endangered Mediterranean monk seal, *Monachus monachus* (Hermann, 1779) along the coast of Northern Cyprus. *Israel Journal of Ecology and Evolution*, 55(1), 72-82.
- Gücü, A.C., Sakinan, S., Ok, M. (2009b). Occurrence of the critically endangered Mediterranean monk seal, *Monachus monachus*, at Olympos-Beydaglari National Park, Turkey. *Zoology in the Middle East*, 46, 3-8.
- Gücü, A.C. (2010). New population size assessment study in the NE Mediterranean. *The Monachus Guardian* 13 (1); June 2010. www.monachus-guardian.org. (Erişim tarihi: 16.07.2018)
- The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3. <www.iucnredlist.org>. (Erişim tarihi: 04.07.2018)
- Johnson, W.M., Karamanlidis, A.A., Dendrinou, P., Fernandez, P., Gazo, M., Gonzalez, L.M., Güçlüsoy, H., Pires, R., Schnellmann, M. (2006). Monk seal fact files. Biology, behaviour, status and conservation of the Mediterranean monk seal, *Monachus monachus*. *The Monachus Guardian*, www.monachus-guardian.org. (Erişim tarihi: 16.07.2018)
- Karamanlidis, A.A., Dendrinou, P., Fernandez de Larrinoa, P., Gücü, A.C., Johnson, W.M., Kırac, C.O., Pires, R. (2015). The Mediterranean monk seal *Monachus monachus*: status, biology, threats, and conservation priorities. *Mammal Review*, 46, 92-105.

- Kıraç, C.O., Veryeri, N.O., Güçlüsoy, H., Savaş, H. (2013). National Action Plan for the Conservation of Mediterranean monk seal *Monachus monachus* in Türkiye. UNEP MAP RAC/SPA and Republic of Türkiye Ministry of Forest and Water Works. Ankara, Turkey.
- Kıraç, C. O., Güçlüsoy, H. (2008). Foça ve Akdeniz Foku; Foça Özel Çevre Koruma Bölgesi'nde Akdeniz Fokunun (*Monachus monachus*) Korunması ve İzlenmesi. T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı, Ankara: Özel Çevre Koruma Kurumu Başkanlığı Yayınları.
- MOm. (2009). MOFI project: Monk seal and fisheries: Mitigating the conflict in Greek seas. Athens, Greece: MOm/Hellenic Society for the Study and Protection of the Monk Seal. http://mofi.mom.gr/pdf/laymans_report_ENG.pdf. (Erişim tarihi: 09.06.2011)
- Mursaloglu, B. (1964). Occurrence of the monk seal on the Turkish coasts. *Journal of Mammalogy*, 45 (2), 316-317.
- Mursaloglu, B. (1984). The Survival of Mediterranean Monk Seal, *Monachus monachus*, pup on the Turkish coast. Proc of the II. International Conference 5-6 October. La Rochelle, France Suppl. pp. 41-47.
- Mursaloglu, B. (1986). Pup-mother environmental relations in the Mediterranean Monk Seal, *Monachus monachus* (Herman 1779) on Turkish coasts. 3rd International Congress, Helsinki, Abstr. 267.
- Mursaloglu, B. (1992). Biology and Distribution of the Mediterranean Monk Seal *Monachus monachus* on Turkish Coasts, Council of Europe Conservation of the Mediterranean Monk Seal, Technical and Scientific Aspects. Antalya, Turkey. May 1991, pp. 54-57.
- Neves, H.C. (1998). Preliminary findings on the feeding behaviour and general ecology strategy of the Mediterranean monk seal *Monachus monachus* (Pinnipedia: Monachinae) on the Desertas Islands. *Boletim do Museum Municipal do Funchal*, Suppl. no. 5, 263-271.
- Neves, H.C., Pires, R. (1999). The recuperation of a monk seal pup, *Monachus monachus*, in the Ilhas Desertas – the conditions for its success. *The Monachus Guardian*, 1 (2), 45-48.
- Ok, M. (2006). Past, Present Status and Future of the Mediterranean Monk Seal (*Monachus monachus*, Hermann 1779) In the Northeastern Mediterranean. *Marine Biology and Fisheries Middle East Technical University Graduate School of Marine Sciences*. Master of Science. Mersin. 114 pages.
- Öztürk, B., Dede, A. (1995). Present status of the Mediterranean monk seal, *Monachus monachus* (Hermann, 1779) on the coasts of Foça in the Bay of Izmir (Aegean Sea). *Turkish Journal of Marine Sciences*, 1 (2/3), 105-107.
- Pastor, T., Aguilar, A. (2003). Reproductive cycle of the female Mediterranean monk seal in the Western Sahara. *Marine Mammal Science*, 19(2), 318-330.
- Pires, R., Neves, H.C., Karamanlidis, A.A. (2008). The Critically Endangered Mediterranean monk seal *Monachus monachus* in the archipelago of Madeira: priorities for conservation. *Oryx*, 42(2), 278-285.
- Schipper, J., Chanson, J., F. Chiozza, Cox, N.A., Hoffmann, M., et al. (2008). The Status of the World's Land and Marine Mammals: Diversity, Threat, and Knowledge. *Science* 322:225–230.
- Veryeri, O., Güçlüsoy, H., Savas, Y. (2001). Snared and drowned – are fishing nets killing off a new generation of monk seals in Turkey's protected areas? *The Monachus Guardian*, 4 (1), May 2001. .

(Received for publication 13 April 2018; The date of publication 15 August 2018)



Molecular identifications of rhizobial samples isolated from *Phaseolus vulgaris* L. in Eskişehir province of Turkey

Cem Tolga GÜRKANLI^{*1}, İbrahim ÖZKOÇ², Merih KIVANÇ³

¹Ordu University, Fatsa Faculty of Marine Sciences, 52400, Fatsa, Ordu/Turkey

²Ondokuz Mayıs University, Faculty of Arts and Science, Department of Biology, Atakum, Samsun/Turkey

³Anadolu University, Faculty of Science, Department of Biology, 26470, Eskişehir/Turkey

Abstract

In this study three rhizobial samples (R28, R51, R66) were analysed using molecular phylogenetic methods. Rhizobial samples were isolated (from *P. vulgaris* L. root nodules collected from Eskişehir province of Turkey) and morphologically characterized in a previous study. Analyses were performed using a concatenated data set which composed of three housekeeping genes (*recA*, *atpD* and *glnII*). Additionally two symbiotic genes, *nodA* and *nifH*, were sequenced and analysed to determine the symbiotic plasmid type. As a result of housekeeping gene phylogeny, isolate R28 was found to be related to *R. laguerreae*. Although other two isolates, R51 and R66, placed in the same lineage with *R. sophoriradicis*, they showed enough divergence to be considered as a new species. But this presumption need to be confirmed with further investigations. Network analyses of *nodA* and *nifH* genes clearly showed that R28 has a unique symbiotic plasmid. On the other hand, symbiotic plasmids of R51 and R66 found to be related to p42d which is the most common symbiotic plasmid in rhizobia nodulating *P. vulgaris* L. in Europe and also Turkey. In this study first report of *R. laguerreae* from Turkey is presented. More over, first report of a *R. laguerreae* isolate from *P. vulgaris* L. root nodules is also presented and suggested isolate R28 as *R. laguerreae* bv. *phaseoli*. Additionally, molecular hints for a potentially new rhizobial species have also given. But this presumption must be supported with some additional molecular and morphological investigations.

Key words: rhizobia, phylogeny, housekeeping genes, nodulation, nitrogen fixation

----- * -----

Türkiye'nin Eskişehir ilinden, *Phaseolus vulgaris* L.'den izole edilen rhizobial örneklerin moleküler karakterizasyonu

Özet

Bu çalışmada üç rizobial örnek (R28, R51, R66) moleküler filogenetik yöntemler kullanarak analiz edilmiştir. Rizobial örnekler önceki bir çalışmada izole edilmiş (Türkiye'nin Eskişehir ilinden toplanmış *P. vulgaris* L. bitkisinin kök nodüllerinden) ve morfolojik analizleri yapılmıştır. Analizler üç adet housekeeping genden (*recA*, *atpD* and *glnII*) oluşan birleştirilmiş bir veri seti kullanılarak yapılmıştır. Ek olarak, simbiyotik plazmit tipini belirlemek için *nodA* ve *nifH* olmak üzere iki simbiyotik genin dizilemesi yapılmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Housekeeping gen filogenisinin sonucu olarak izolat R28 *R. laguerreae* ile ilişkili olarak bulunmuştur. Diğer iki izolat R51 ve R66, *R. sophoriradicis* ile aynı soy hattında yer almasına rağmen yeni bir tür sayılabilecek kadar yeterli farklılık göstermiştir. Fakat bu öngörünün ileri araştırmalar ile doğrulanmaya gereksinimi vardır. *NodA* and *nifH* genlerinin network analizleri R28 in özgün bir simbiyotik plazmite sahip olduğunu açık bir şekilde göstermiştir. Diğer taraftan R51 ve R66'nın simbiyotik plazmitlerinin p42d ile ilişkili olduğu bulunmuştur, bu plazmit Avrupa ve Türkiye'de *P. vulgaris* L. ile kök nodülü oluşturan rhizobiadaki yaygın görülen simbiyotik plazmittir. Bu çalışmada *R. laguerreae* in Türkiye'den ilk kaydı sunulmuştur. Ötesinde, bir *R. laguerreae* izolatının *P. vulgaris* L. kök nodüllerinden ilk kaydı verilmiştir ve izolat R28 *R. laguerreae* bv. *phaseoli* olarak önerilmiştir. Ek olarak yeni bir rizobial tür için moleküler ip uçları da sunulmuştur. Fakat bu öngörünün ilave bazı moleküler ve morfolojik araştırmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: rhizobia, filogeni, housekeeping genler, nodülasyon, azot fiksasyonu.

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +9004524235053; Fax.: +9004524239953; E-mail: cgurkanli44@gmail.com

Introduction

Phaseolus vulgaris L. is the most important food legume in the World which represents 50% of leguminous grain products for direct human consumption (Jones, 1999; Wang et al., 2016). This plant species has two centres of origins, one in Mesoamerica and another in the Andean South America, likewise it also have been domesticated in the same regions for more than 7000 years (Gepts and Bliss 1988; Gepts et al. 1990). Seeds of *P. vulgaris* L. introduced to Anatolia approximately 250-300 years ago and currently is the third commonest leguminous grain in Turkey with 215.000 tons of annual production after chickpeas and lentils (Şehrali, 1988; Gülümser, 2016). Like other leguminous plants, *P. vulgaris* L. roots make symbiotic association with symbiotic diazotrophic bacteria collectively known as rhizobia. Although *Rhizobium etli* and *R. tropici* are distributed world wide and are dominant symbionts of *P. vulgaris* L., many other local isolates of different rhizobial species have also reported as symbiotic partners because of the promiscuous nature of this plant as a host (Martinez-Romero et al., 1991; Segovia et al., 1993; Tamimi and Young, 2004; Kaschuck et al., 2006). These species includes; *Rhizobium giardinii*, *R. gallicum* (Amarger et al., 1997), *R. lusitanum* (Valverde et al., 2006), *R. phaseoli* (Ramirez-Bahena et al., 2008), *R. azibense* (Mnasri et al., 2014), *R. freirei* (Dall'Agnol et al. 2013), *R. esperanzae* (Cordeiro et al. 2017), *Ensifer meliloti* (Zurdo-Pineiro et al. 2009), *E. americanus* (Mnasri et al., 2012), *E. fredii* like isolates (Herrera-Cervera et al., 1999), *Bradyrhizobium* sp. (Han et al., 2005), *Mesorhizobium* isolates (Grange et al., 2004), *Burkholderia caballeronis* (Martinez-Aguilar et al., 2013). Although molecular based studies about the diversity of various bacterial groups from Turkey are available, unfortunately there are not much studies concerning species diversity of rhizobia nodulating *P. vulgaris* L. in Turkey (Bekler, 2016). Most comprehensive study was published by Gurkanli et al. (2013) where *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli* bv. *phaseoli* and *R. phaseoli* were reported as symbionts of *P. vulgaris* L. cultivated in Blacksea region of Turkey. Thus, many more molecular based studies are necessary to fully determine the species diversity of rhizobia nodulating *P. vulgaris* L. cultivated in different geographical parts Turkey.

The goal of this study is to phylogenetically examine three rhizobial isolates which were obtained (from *P. vulgaris* L. root nodules collected from Eskişehir province of Turkey) and morphologically characterized in a previous study (Küçük et al., 2006).

2. Materials and methods

For phylogenetic analyses, three morphologically characterized (Küçük et al., 2006) rhizobium isolates (R28, R51 and R66) were selected. The selection was made within the isolates which showed the highest ecological valence. Rhizobium isolates were grown in TY (Tryptone Yeast Extract) broth medium for genomic DNA isolations with the conditions given in Gurkanli et al. (2013). A CTAB/NaCl miniprep method was used for genomic DNA isolations (Temizkan and Arda, 2004). For identification of isolates three housekeeping genes, *recA* (recombinase A), *atpD* (ATP synthase subunit beta), *glnII* (glutamine synthetase II) were analysed. Additionally, two symbiotic genes, *nodA* (acyltransferase nodulation protein) and *nifH* (nitrogenase reductase Fe protein) were analysed for determination of the sym plasmid (symbiotic plasmid) type. All PCR amplifications were made with the primers and PCR conditions explained in Gurkanli et al. (2013). PCR amplifications were performed using a Techne (TC-Plus) thermal cyler and products were electrophoresed on 1% agarose gel (Amresco, USA) which prepared in 1X TBE. A Vilber Lourmat Imaging System was used to visualize the PCR products. Nucleotide sequencings were made commercially by Macrogen (Korea) from both strands with the same primers used for the PCR amplifications. BioEdit (Hall 1999) was used to assemble the sequencings from both strands. Multiple nucleotide sequence alignments were generated using ClustalX (Thompson et al., 1997) and optimized by hand using BioEdit. Akaike information criterion (AIC; Akaike, 1974) and Bayesian information criterion (BIC) tests were performed using jModelTest v. 0.1 package program (Guindon and Gascuel, 2003; Posada, 2008) to determine the best fitting evolutionary model(s) to our data sets. To evaluate the phylogenetic relationships between haplotypes, Neighbor-Joining (NJ), Maximum-Parsimony (MP) and Maximum-Likelihood (ML) algorithms were employed. NJ and MP analyses were performed using PAUP* v. 4.0b10 (Swofford, 1998) and PhyML 3.0 (Guindon and Gascuel, 2003) was used for ML analyses. MP analyses were performed with the heuristic search approach by using the TBR swapping algorithm (10 random repetitions). 10 000 pseudo-replicates were conducted for the Bootstrap tests (Efron, 1982; Felsenstein, 1985) of the NJ analyses and 1,000 pseudo-replicates for MP and ML analyses. For symbiotic genes we conducted Neighbor NetWork analyses using the Splitstree4 program (Huson and Bryant, 2006). All our new sequences have deposit in GenBank under accession numbers MH299832 MH299846 (Table).

3. Results

To identify our isolates (R28, R51 and R66) we sequenced approximately 570, 500 and 650 bp of their three housekeeping genes *recA*, *atpD* and *glnII*, respectively. To construct phylogenies we created a concatenated sequence data with these genes.

Table. Names, GenBank accession numbers and sources of rhizobia used in this study

Species	Isolate	GenBank Accession Numbers			Source
		<i>recA</i>	<i>atpD</i>	<i>glnII</i>	
<i>Rhizobium</i> spp.	R28	MH299835	MH299838	MH299832	This study
<i>Rhizobium</i> spp.	R51	MH299836	MH299839	MH299833	This study
<i>Rhizobium</i> spp.	R66	MH299837	MH299840	MH299834	This study
<i>R. leguminosarum</i>	USDA 2370 ^T	AJ294376 ^A	AJ294405 ^A	EU155089 ^B	^A Gaunt et al. (2001) ^B Han et al. (Unpublished)
<i>R. indigoferae</i>	CCBAU 71042 ^T	EF027965 ^A	GU552925 ^B	JN580717 ^C	^A Martinez-Romero and Lloret (Unpublished) ^B Wu et al. (2011) ^C Aserse et al. (2012)
<i>R. sophorae</i>	CCBAU 03386 ^T	KJ831252	KJ831235	KJ831241	Jiao et al. (2015)
<i>R. laguerreae</i>	FB206 ^T	JN558681	JN558661	JN558671	Saidi et al. (2014)
<i>R. laguerreae</i>	FB14022	JN558690	JN558670	JN558680	Saidi et al. (2014)
<i>R. laguerreae</i>	FB310	JN558682	JN558662	JN558672	Saidi et al. (2014)
<i>R. laguerreae</i>	FB403	JN558683	JN558663	JN558673	Saidi et al. (2014)
<i>R. anhuiense</i>	CCBAU 23252 ^T	KF111980	KF111890	KF111913	Zhang et al. (2015)
<i>R. fabae</i>	CCBAU 33202 ^T	EF579941	EF579929	EF579935	Tian et al. (2008)
<i>R. pisi</i>	DSM 30132 ^T	DQ431676 ^A	EF113149 ^B	JN580715 ^C	^A Ramirez-Bahena et al. (2008) ^B Santillana et al. (2008) ^C Aserse et al. (2012)
<i>R. vallis</i>	CCBAU 65647 ^T	GU211770	GU211768	GU211771	Wang et al. (2011)
<i>R. acidisoli</i>	FH13 ^T	KJ921098	KJ921069	KJ921080	Verastegui-Valdes et al. (2014)
<i>R. sophoriradicis</i>	CCBAU 03470	KJ831248	KJ831231	KJ831237	Jiao et al. (2015)
<i>R. sophoriradicis</i>	CCBAU 03433 ^T	KJ831250	KJ831233	KJ831239	Jiao et al. (2015)
<i>R. phaseoli</i>	ATCC 14482 ^T	EF113136 ^A	EF113151 ^A	JN580716 ^B	^A Santillana et al. (2008) ^B Aserse et al. (2012)
<i>R. bangladeshense</i>	BLR175 ^T	JN649057	JN648967	JN648979	Rashid et al. (2012)
<i>R. etli</i>	USDA 9032	AJ294375 ^A	AJ294404 ^A	AF169585 ^B	^A Gaunt et al. (2001) ^B Turner and Young (2000)
<i>R. lentis</i>	BLR27 ^T	JN649031	JN648941	JN648976	Rashid et al. (2012)
<i>R. hainanense</i>	CCBAU 57015 ^T	HQ394252	HQ394217	GU726294 ^B	^A Robledo et al. (2011) ^B Chang et al. (Unpublished)
<i>R. tropici</i>	USDA 9030 ^T	AJ294373 ^A	AJ294397 ^A	AF169584 ^B	^A Gaunt et al. (2001) ^B Turner and Young (2000)

Our data set was comprised of rhizobium species which showed the highest BLAST scores (Table). Phylogenetic analyses were performed over 1192 aligned nucleotides containing 308 variable sites. Both AIC and BIC tests suggested TIM2+I+G (I: 0.572; G:0.862) substitution model. Parsimony analysis was performed over 225 synapomorphic characters and suggested 3 most parsimonous trees with 713 steps (CI: 0.541374, RI: 649142, HI: 458626). In all phylogenetic trees created with NJ (Figure 1), MP and ML algorithms, our sample R28 appeared in the same lineage with *Rhizobium laguerreae* isolates, FB206^T, FB14022, FB310 and FB403. This lineage was supported with sufficient bootstrap values, and the nucleotide sequence similarities among R28 and *R. laguerreae* isolates were between 98.5% and 97.9%. Our other isolates, R51 and R66, showed similar haplotypes with 99.3% nucleotide sequence similarity thus possibly representing same species. This group appeared as sister to *R. sophoriradicis* isolates CCBAU 03470^T, CCBAU 03433 and these relationships were supported with very high bootstrap values (Figure 1). Although isolates R51 and R66 formed a lineage with *R. sophoriradicis*, the nucleotide sequence similarities between them were quite low (between 96.3% and 96%) to consider this lineage as a single species.

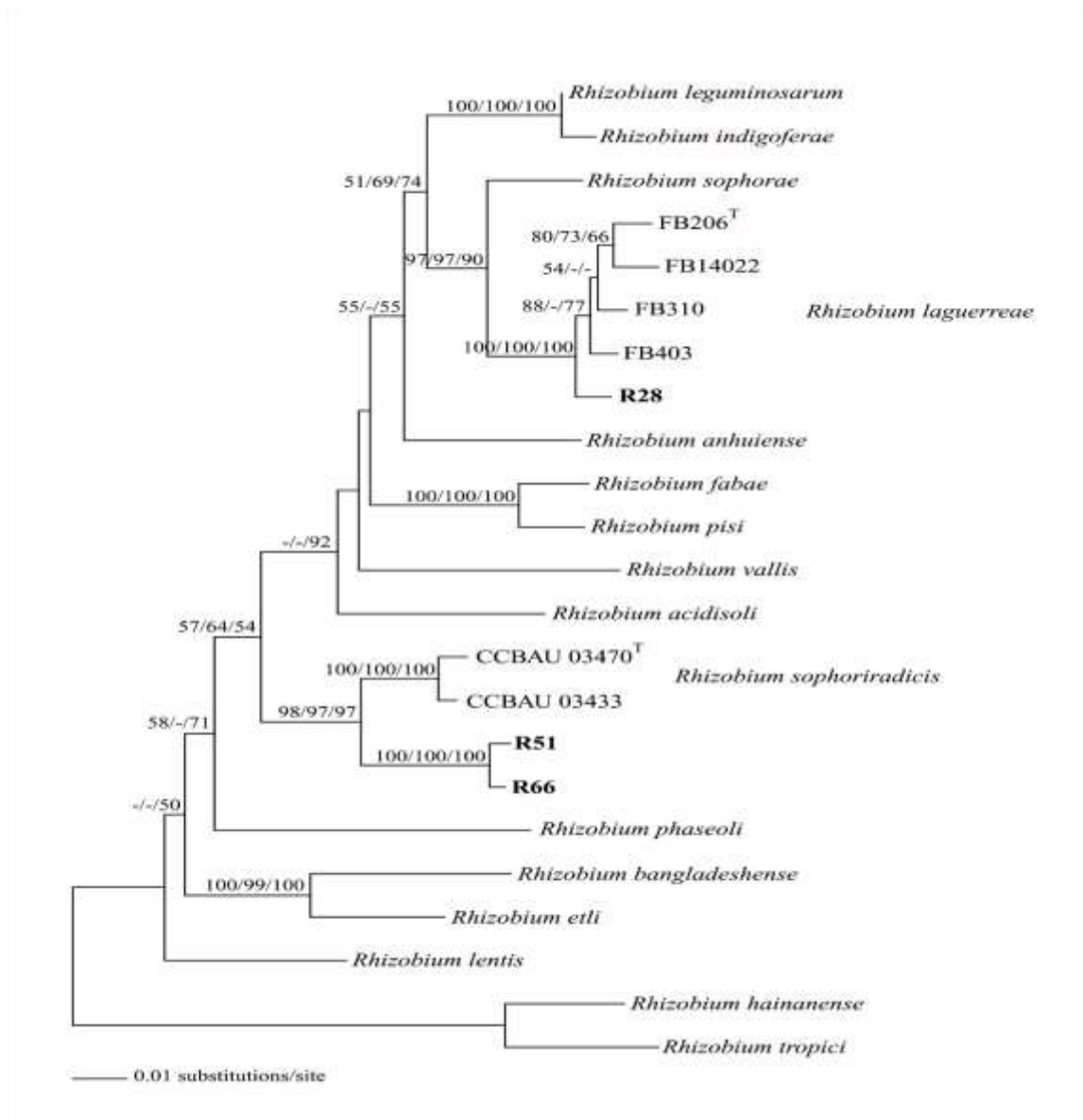


Figure 1. NJ tree showing the phylogenetic relationships between our isolates (R28, R51 and R66) and related *Rhizobium* species abotained from GenBank (Table). The tree is based on concatenated nucleotide sequences of *recA*, *atpD* and *glnII* genes. Bootstap values ($\geq 50\%$) obtained from NJ, MP and ML analyses are given on each related node

As the representative for the nodulation genes we sequenced approximately 550 bp of the *nodA* (N-acyltransferase) gene to determine the symplasmid type of our isolates. Our data set was comprised of *nodA* haplotypes of different rhizobial species isolated from *P. vulgaris* L. root nodules (Figure 2 legend). A neighbor NetWork analysis was performed over 526 aligned nucleotides containing 262 segregated sites (Figure 2). As a result, our two isolates R51 and R66 showed the same *nodA* haplotype with isolates CTG-403 and CTG-416 which were isolated from the Blacksea part of Turkey in our previous study, Gurkanli et al. (2013). This haplotype appeared as closely related to symbiotic plasmid p42d *nodA* haplotype which was harboured by *R. etli* isolates; CFN-42 and Kim5, *R. phaseoli* isolates; Bra5 and N161, *R. gallicum* bv. *phaseoli* isolate 8C-3 and *R. giardinii* bv. *phaseoli* isolate Ro84 (Figure 2), and the nucleotide sequence similarity between these two haplotypes was 99.8%. On the otherhand our other isolate, R28, showed a unique *nodA* haplotype which is relatively close to *R. gallicum* bv. *phaseoli* *nodA* haplotype with 99.8% nucleotide sequence similarity (Figure 2).

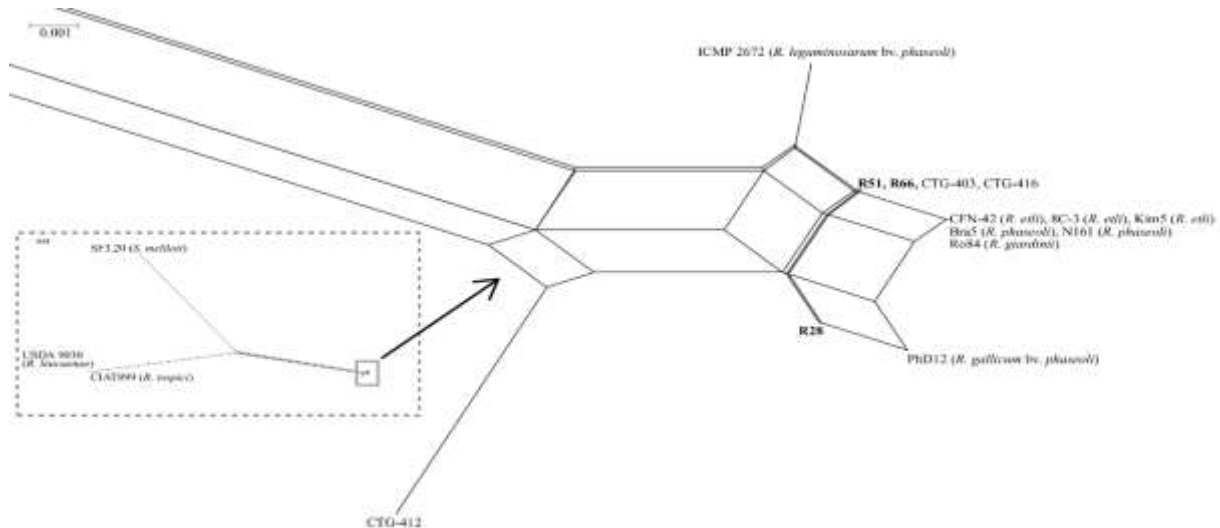


Figure 2. Neighbor network tree derived from *nodA* nucleotide sequences of our isolates, R28 (MH299841), R51 (MH299842), R66 (MH299843) and related *Rhizobium* species obtained from GenBank (Below): SF3.20_KP765346 (Alias-Villegas et al., Unpublished); CIAT 899_CP004017 (Ormeno-Orrillo et al., 2012); USDA 9039_X98514 (Debelle et al., 1996); Ro84_AJ300239 (Moulin, Unpublished); PhD12_AJ300237 (Moulin, Unpublished); ICMP 2672_DQ100403 (Weir, 2006); CFN 42_U80928 (Girard et al., 1991); Kim5_CP021125 (Santamaría et al., 2017); 8C-3_CP017243 (Bustos et al., 2017); Bra5_CP020898 (Santamaría et al., 2017); N161_CP013587 (Perez-Carrascal et al., Unpublished); CTG-403, CTG-412, CTG-416 (Gurkanli et al., 2013)

As a second type of symbiotic gene we sequenced approximately 750 bp of the *nifH* gene which codes Fe protein of nitrogenase reductase. We conducted a data set containing *nifH* haplotypes of different rhizobial species isolated from *P. vulgaris* L. root nodules. Neighbor NetWork analysis was carried over 456 aligned nucleotides containing 58 variable sites (Figure 3). As a result our isolates R51 and R66 showed the p42d *nifH* haplotype with *R. etli* isolate CFN42, *R. phaseoli* isolates Bra5 and N161, *R. vallis* isolate CCBAU 65647; *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* isolate Gut-2; *R. gallicum* bv. *phaseoli* isolate 8C-3 and CTG-403, our previously published isolate (Gurkanli et al., 2013). Another *R. etli* isolate Kim5 showed the closest *nifH* haplotype with 99.3% nucleotide sequence similarity (Figure 3). On the otherhand concordant with *nodA*, isolate R28 showed a unique *nifH* haplotype which is quite close to *R. acidisoli* *nifH* haplotype with 99.7% nucleotide sequence similarity.

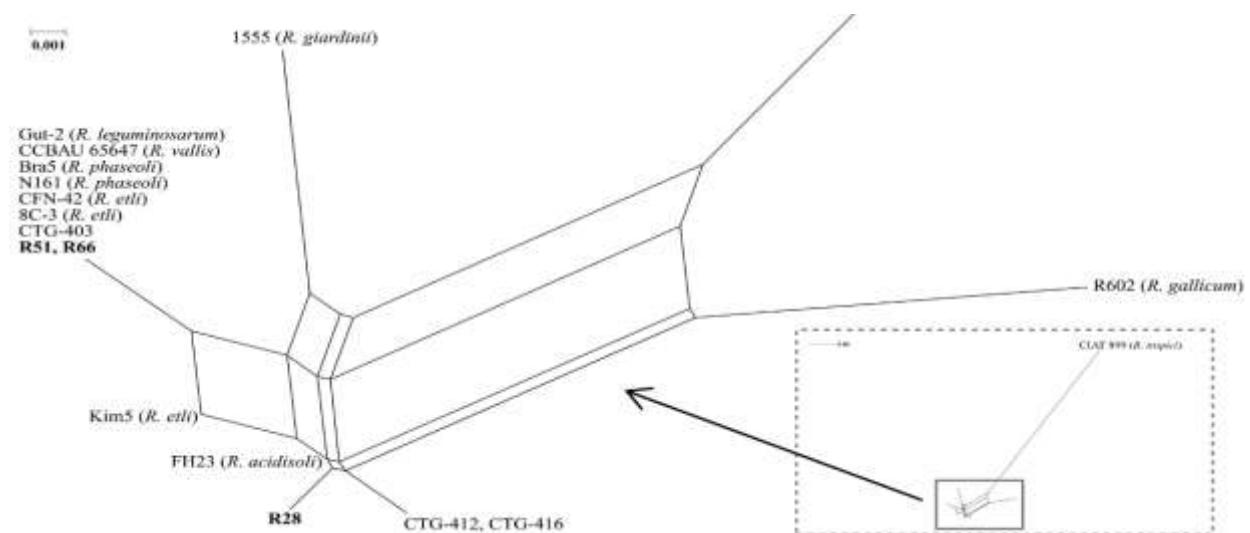


Figure 3. Neighbor network tree derived from *nifH* nucleotide sequences of our isolates, R28 (MH299844), R51 (MH299845), R66 (MH299846) and related *Rhizobium* species obtained from GenBank (Below): Gut-2_AB740522 (Adhikari et al., Unpublished); CCBAU 65647_GU211767 (Wang et al., 2011); Bra5_CP020898 (Santamaría et al., 2017); N161_CP013587 (Perez-Carrascal et al., Unpublished); CFN-42_U80928 (Girard et al., 1991); 8C-3_CP017243 (Bustos et al., 2017); Kim5_CP021125 (Santamaría et al., 2017); FH23_KJ921065 (Roman-Ponce et al., 2016); R602_AF218126 (Laguette et al., 2001); CIAT 899_JX863573 (Ricon-Rosales et al., 2013); 1555_KR262797 (Zhao, Unpublished); CTG-403, CTG-412, CTG-416 (Gurkanli et al., 2013)

4. Conclusions and discussion

Rhizobia are classically defined as symbiotic bacteria capable of eliciting and invading root or stem nodules on leguminous plants, where they differentiate into N₂-fixing bacteroids (Tan et al., 2001). Members of this group have been classified within at least 21 genera of *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria* (de Lajudie and Young, 2017). *P. vulgaris* L., the host plant we focused on in this study, has known as a promiscuous host which has been nodulated by at least 13 different rhizobial species belonging to the genera *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Burkholderia* (Amarger et al., 1997; Herrera-Cervera et al., 1999; Grange et al., 2004; Han et al., 2005; Martinez-Aguilar et al., 2010). As a result of phylogenetic analyses depending on the concatenated data set composed of three housekeeping genes, *recA*, *atpD* and *glnII*, our isolate R28 clearly appeared as related to *R. laguerreae* (FB206^T, FB140022, FB310 and FB403) which is not reported as a microsymbiont of *P. vulgaris* L. previously (Figure 1). Phylogenetic analyses of housekeeping genes (especially *recA*, *atpD*, *glnII*, *rpoB*) are very useful and have been used for description of recent rhizobial species which does not show any differentiation from closely related species in 16S rDNA sequences (Tindall et al., 2010; Mousavi et al., 2015). *R. laguerreae* is a good example for the case that Saidi et al. (2014) showed that there is no 16S rDNA sequence variations between *R. laguerreae*, *R. leguminosarum* and *R. indigoferae*, and that is why we did not sequence the 16S rDNA of our isolates. *R. laguerreae* is identified from rhizobial strains isolated from countries (Spain, Peru and Tunisia) of different continents thus it is obvious that this species has distributed across the World (Saidi et al., 2014). On the other hand, it did not reported from Turkey so far, that is why here we are giving the first report of *R. laguerreae* from Turkey. Another important feature about isolate R28 is, so far all *R. laguerreae* isolates were isolated from *V. faba* L. root nodules thus this isolate is the first *R. laguerreae* sample isolated from a different host (*P. vulgaris* L.) other than faba bean. Our other two isolates R51 and R66 showed closely related *recA*, *atpD* and *glnII* haplotypes with 99.3% nucleotide sequence similarity (possibly indicating the same species) and formed a lineage with *R. sophoriradicis* isolates CCBAU 03470^T and CCBAU 03433. On the otherhand, the nucleotide sequence similarities between isolates R51, R66 and *R. sophoriradicis* isolates were quite low (between 96-96.3%) to consider this lineage as a single species. In our analyses, *recA*, *atpD* and *glnII* nucleotide sequence similarities between sister rhizobial species were between 94% and 98%, the only exception was *R. leguminosarum* and *R. indigoferae* which was 99.4%. From this view of point, our isolates are probably representing a new rhizobial species. But this hypothesis needs to be supported with further morphological and molecular analyses. Symbiotic nitrogen fixation genes (*nod*, *nif*, *fix*) of fast growing rhizobia exists on megaplasmids namely symbiotic plasmids (pSym), where exists on symbiotic islands in middle and slow growing rhizobia. These plasmids transfers between different rhizobial species thus phylogenies of the genes carried by pSym do not necessarily corresponds with the chromosomal genes (especially 16S rDNA) and that is why they are useless in taxonomy. Some researchers speculate that phylogeny of nodulation genes may correlate with the host plant because of the convergent evolution thus phylogenetic analyses depending on symbiotic genes gives information for determining the biovars (host range) within rhizobial species (Fischer, 1994; Young and Haukka, 1996; Haukka et al., 1998; Rivas et al., 2009). As the result of network analysis depending on *nodA* sequences (Figure 2), isolate R28 appeared as closely related to PhD12, R51 (and related isolates) and CFN-42 (and related isolates) and showed only 1, 2 and 3 substitutions, respectively (Figure 2). Network of *nifH* partly supported this result (Figure 3). These results indicates that R28 contains a symbiotic plasmid corresponding to biovar. *phaseoli* and that is why we suggest R28 as *R. laguerreae* biovar. *phaseoli*. Our other two isolates, R51 and R66, showed the same *nodA* haplotype with isolates CTG-403 and CTG-416 which we isolated from *P. vulgaris* L. root nodules collected from Black Sea part of Turkey in our previously published study, Gurkanli et al., (2013). This haplotype appeared as related to *nodA* of p42d (*R. etli* isolate CFN-42) and showed only one substitution. Results of *nifH* network also supported *nodA*, that R51 and R66 showed exactly the same *nifH* haplotype with p42d. Depending on the results we can speculate that both of isolates R51 and R66 transferred a symbiotic plasmid of *R. etli* CFN-42 (p42d) from Mexico. This result is not surprising that, it is one of the most common symbiotic plasmid seen in rhizobia nodulating *P. vulgaris* L. in old and new World rhizobial species (Figures 2 and 3).

As conclusion, here we are giving the first report of *R. laguerreae* from Turkey, also reporting this species as microsymbiont of *P. vulgaris* L. for the first time and suggesting R28 as *R. laguerreae* bv. *phaseoli*. Additionally, we are giving the molecular hints for a potentially new rhizobial species close to the *R. sophoriradicis*, but this hypothesis must be supported with further molecular and morphological investigations before giving a latin binomial.

References

- Akaike, H. (1974). A new look at statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19, 716-723.
- Amarger, N., Macheret, V., Laguerre, G. (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 996-1006.
- Aserse, A. A., Rasanen, L. A., Assefa, F., Hailemariam, A., Lindstrom, K. (2012). Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(2), 120-131.

- Bekler, F. M. (2016). Isolation and identification of a novel thermo-alkalophilic *Anoxybacillus* sp. strain KB4 from Kuşburnu hot spring in Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 9(2), 169-179.
- Bustos, P., Santamaría, R. I., Pérez-Carrascal, O. M., Acosta, J. L., Lozano, L., Juárez, S., Martínez-Flores, I., Martínez-Romero, E., Cevallos, M. A., Romero, D., Dávila, G., Vinuesa, P., Miranda, F., Ormeño, E., González, V. (2017). Complete genome sequences of three *Rhizobium gallicum* symbionts associated with common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Genome Announcements*, 5(11).
- Cordeiro, A. B., Ribeiro, R. A. Helene, L. C. F., Hungria, M. (2017). *Rhizobium esperanzae* sp. nov., a N₂-fixing root symbiont of *Phaseolus vulgaris* from Mexican soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 3937-3945.
- Dall'Agnol, R. F., Ribeiro, R. A., Ormeno-Orrillo, E., Rogel, M. A., Delamuta, J. R. M., Andrade, D. S., Martínez-Romero, E., Hungria, M. (2013). *Rhizobium freirei* sp. nov.: a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 4167-4173.
- Debelle, F., Plazamet, C., Roche, P., Pujol, C., Savagnac, A., Rosenberg, C., Prome, J. C., Denarie, J. (1996). The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Molecular Microbiology*, 22 (2), 303-314.
- De Lajudie, P. M., Young, J. P. W. (2017). International committee on systematics of prokaryotes subcommittee for the taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium* minutes of the meeting, Budapest, 25 August 2016. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 2485-2494.
- Efron, B. (1982). The jackknife, the bootstrap and other resampling plans. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics, Monograph 38.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Fischer, H. M. (1994). Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. *Microbiological Reviews*, 58, 352-386.
- Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A., Young, J. P. (2001). Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 2037-2048.
- Gepts, P. (1990). Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) beans. *Economic Botany*, 44, 28-38.
- Gepts, P., Bliss, F. A. (1988). Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. *Economic Botany*, 42, 86-104.
- Girard, M. L., Flores, M., Brom, S., Romero, D., Palacios, R., Davila, G. (1991). Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Journal of Bacteriology*, 173 (8), 2411-2419.
- Grange, L., Hungria, M. (2004) Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil. Biol. Biochem.* 36, 1389–1398.
- Guindon, S., Gascuel, O. (2003). A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696-704.
- Gülümser, A. (2016). Dünyada ve Türkiye’de Yemeklik Dane Baklagillerin Durumu. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 25, 292-298.
- Gurkanli, C. T., Ozkoc, I., Gunduz, I. (2013). Genetic diversity of rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Central Black Sea region of Turkey. *Annals of Microbiology*, 63(3), 971-987.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Han, S. Z., Wang, E. T., Chen, W. X. (2005). Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campylotropis* and *Cassia* grown in China. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 265-276.
- Haukka, K., Lindstrom, K. and Young, J. P. W. (1998). Three Phylogenetic Groups of *nodA* and *nifH* Genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* Isolates from Leguminous Trees Growing in Africa and Latin America. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 419-426.
- Herrera-Cervera, J. A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H. V., Requena, N., Amarger, N., Martínez-Romero, E., Olivares, J., Sanjuan, J. (1999). At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30, 87-97.
- Huson, D. H., Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 254-267.
- Jiao, Y. S., Yan, H., Ji, Z. J., Liu, Y. H., Sui, X. H., Wang, E. T., Guo, B. L., Chen, W. X., Chen, W. F. (2015). *Rhizobium sophorae* sp. nov. and *Rhizobium sophoriradicis* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume *Sophora flavescens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 497-503.
- Jones, A. L. (1999). Phaseolus bean: Post-harvest operations. FAO, 24p.
- Kaschuck, G., Hungria M., Andrade D. S., Campo R. J. (2006). Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Applied Soil Ecology*, 32, 210-220.

- Küçük, Ç., Kıvanç, M., Kınacı, E. (2006). Characterization of *Rhizobium* sp. isolated from Bean. Turkish Journal of Botany, 30, 127-132.
- Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. Microbiology, 147(4), 981-993.
- Martinez-Aguilar, L., Salazar-Salazar, C., Mendez, R. D., Caballero-Mellado, J., Hirsch, A. M. Vasquez-Murrieta, M. S., los Santos, P. E. (2013). *Burkholderia caballeronis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) with the ability to effectively nodulate *Phaseolus vulgaris*. Antonie van Leeuwenhoek, 104, 1063-1071.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P., Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. International Journal of Systematic Bacteriology, 41, 417-426.
- Mnasri, B., Liu, T. Y., Saidi, S., Chen, W. F., Chen, W. X., Zhang, X. X., Mhamdi, R. (2014). *Rhizobium azibense* sp. nov.: a nitrogen fixing bacterium isolated from root-nodules of *Phaseolus vulgaris*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64, 1501-1506.
- Mnasri, B., Saïdi, S., Chihaoui, S. A., Mhamdi, R. (2012). *Sinorhizobium americanum* symbiovar mediterraneense is a predominant symbiont that nodulates and fixes nitrogen with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a Northern Tunisian field. Systematic and Applied Microbiology, 35, 263-269.
- Mousavi, S. A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P., Lindström, K. (2015). Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. Systematic and Applied Microbiology, 38, 84-90.
- Ormeno-Orrillo, E., Menna, P., Almeida, L. G., Ollero, F. J., Nicolas, M. F., Pains Rodrigues, E., Shigueyoshi Nakatani, A., Silva Batista, J. S., Oliveira Chueire, L. M., Souza, R. C., Ribeiro Vasconcelos, A. T., Megias, M., Hungria, M., Martinez-Romero, E. (2012). Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). BMC Genomics, 13(1), 735.
- Posada, D. (2008). jModel test: phylogenetic model averaging. Molecular Biology and Evolution, 25, 1253-1256.
- Ramirez-Bahena, M. H., Garcia-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J. M., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E., Velazquez, E. (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 2484-2490.
- Rashid, M. H., Schafer, H., Gonzalez, J., Wink, M. (2012). Genetic diversity of rhizobia nodulating lentil (*Lens culinaris*) in Bangladesh. Systematic and Applied Microbiology, 35, 98-109.
- Rincon-Rosales, R., Villalobos-Escobedo, J. M., Rogel, M. A., Martinez, J., Ormeno-Orrillo, E., Martinez-Romero, E. (2013). *Rhizobium calliandrae* sp. nov., *Rhizobium mayense* sp. nov. and *Rhizobium jaguaris* sp. nov., rhizobial species nodulating the medicinal legume *Calliandra grandiflora*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63, 4323-4329.
- Rivas, R., Garcia-Fraile, P., Velazquez, E. (2009). Taxonomy of bacteria nodulating legumes. Microbiology Insights, 2, 51-69.
- Robledo, M., Velazquez, E., Ramirez-Bahena, M. H., Garcia-Fraile, P., Perez-Alonso, A., Rivas, R., Martinez-Molina, E., Mateos, P. F. (2011) The *celC* gene, a new phylogenetic marker useful for taxonomic studies in Rhizobium. Systematic and Applied Microbiology, 34, 393-399.
- Roman-Ponce, B., Jing Zhang, Y., Soledad Vasquez-Murrieta, M., Hua Sui, X., Feng Chen, W., Carlos Alberto Padilla, J., Wu Guo, X., Lian Gao, J., Yan, J., Hong Wei, G., Tao Wang, E. (2016). *Rhizobium acidisoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in acid soils. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66 (1), 398-406.
- Saidi, S., Ramirez-Bahena, M. H., Santillana, N., Zuniga, D., Alvarez-Martinez, E., Peix, A., Mhamdi, R., Velazquez, E. (2014). *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64, 242-247.
- Santamaría, R. I., Bustos, P., Pérez-Carrascal, O. M., Miranda-Sánchez, F., Vinuesa, P., Martínez-Flores, I., Juárez, S., Lozano, L., Martínez-Romero, E., Cevallos, M. A., Romero, D., Dávila, G., Ormeño-Orrillo, E., González, V. (2017). Complete Genome Sequences of Eight *Rhizobium* Symbionts Associated with Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). Genome Announcements, 5(30), 1-2
- Santillana, N., Ramirez-Bahena, M. H., Garcia-Fraile, P., Velazquez, E., Zuniga, D. (2008). Phylogenetic diversity based on *rrs*, *atpD*, *recA* genes and 16S-23S intergenic sequence analyses of rhizobial strains isolated from *Vicia faba* and *Pisum sativum* in Peru. Archives of Microbiology, 189(3), 239-247.
- Şchirali, S. (1988). Yemeklik Dane Baklagiller. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, Türkiye.

- Segovia, L., Young, J. P. W., Martínez-Romero, E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 43, 374-377.
- Swofford, D.L. (1998). PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4 beta 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tan, Z., Hurek, T., Vinuesa, P., Müller, P., Ladha, J.K., Reinhold-Hurek, B., 2001. Specific Detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* Strains Colonizing Rice (*Oryza sativa*) Roots by 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer-Targeted PCR. Applied and Environmental Microbiology, 67 (8), 3655-3664.
- Tamimi, S. M., Young, J. P. W. (2004). *Rhizobium etli* is the dominant common bean nodulating rhizobia in cultivated soils from different locations in Jordan. Applied Soil Ecology, 26, 193-200.
- Temizkan, G., Arda, N. (2004). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Tian, C. F., Wang, E. T., Wu, L. J., Han, T. X., Chen, W. F., Gu, C. T., Gu, J. G., Chen, W. X. (2008). *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 2871-2875.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The ClustalX-Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25, 4876-4882.
- Turner, S. L. and Young, J. P. (2000). The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. Molecular Biology and Evolution, 17(2), 309-319.
- Valverde, A., Igual, J. M., Peix, A., Cervantes, E., Velazquez, E. (2006). *Rhizobium lusitanum* sp. nov.: a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 2631-2637.
- Verastegui-Valdes, M. M., Zhang, Y. J., Rivera-Orduna, F. N., Cheng, H. P., Sui, X. H., Wang, E. T. (2014). Microsymbionts of *Phaseolus vulgaris* in acid and alkaline soils of Mexico. Systematic and Applied Microbiology, 37(8), 605-612.
- Wang, F., Wang, E. T., Wu, L. J., Sui, X. H., Li, Y. Jr., Chen, W. X. (2011). *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61, 2582-2588.
- Wang, L., Cao, Y., Wang, E. T., Qiao, Y. J., Jiao S., Liu, Z. S., Zhao, L., Wei, G. H. (2016). Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Shaanxi Province. Systematic and Applied Microbiology, 39, 211-219.
- Weir, B. (2006). Systematics, specificity, and ecology of New Zealand Rhizobia. PhD thesis, The University of Auckland, New Zealand.
- Wu, L. J., Wang, H. Q., Wang, E. T., Chen, W. X., Tian, C. F. (2011). Genetic diversity of nodulating and non-nodulating rhizobia associated with wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) in different ecoregions of China. FEMS Microbiology Ecology, 76(3), 439-450.
- Young, J. P. W., Haukka, K. E. (1996). Diversity and Phylogeny of rhizobia. New Phytologist, 133, 87-94.
- Zhang, Y. J., Zheng, W. T., Everall, I., Young, J. P., Zhang, X. X., Tian, C. F., Sui, X. H., Wang, E. T., Chen, W. X. (2015). *Rhizobium anhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65 (9), 2960-2967.
- Zurdo-Pineiro, J. L., García-Fraile, P., Rivas, R., Peix, A., León-Barríos, M., Willems, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Velázquez, E., van Berkum, P. (2009). Rhizobia from Lanzarote, the Canary Islands, that nodulate *Phaseolus vulgaris* have characteristics in common with *Sinorhizobium meliloti* isolates from mainland Spain. Applied and Environmental Microbiology, 75, 2354-2359.

(Received for publication 26 October 2017; The date of publication 15 August 2018)



Production and characterization of α -amylase from lactic acid bacteria isolated with whey

İhsan REZZUKOĞLU², Sema AGÜLOĞLU FİNCAN^{*1}, Barış ENEZ³

¹Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, Dicle University, Diyarbakır, Turkey

²Department of Biology, Faculty of Science, Dicle University, Diyarbakır, Turkey

³Veterinary Health Department, Vocational School of Technical Sciences, Bingöl University, Bingöl, Turkey

Abstract

In this study, lactic acid bacteria were isolated from whey, to provide economic and biotechnological benefits. These bacteria which were isolated were described with the aid of morphological, physiological, and biochemical tests and named as PS-2A, PS-3B, PS-3C and PS-4B. And then, by investigating extracellular α -amylase production capabilities of these bacteria, PS-2A bacterium which showed the best activity was selected.

It was found that bacterium PS-2A was round-like, Gram positive, catalase negative, active. For produce the PS-2A; the optimum incubation time as 16th hours, optimum pH as 7.0 and optimum incubation temperature was determined as 35°C. It was found that PS-2A conducted its optimum α -amylase activity at the 20th hour in LB medium performed, and optimum pH and temperature values of α -amylase activity were 7.0 and 35°C, respectively.

In carbon sources; 1% soluble starch was increased the α -amylase production 2 fold. In nitrogen sources; it was determined that with 1% ammonium chlorid the α -amylase production was increased.

Key words: whey, lactic acid bacteria, α -amylase, production, characterization

----- * -----

Peynir altı suyundan izole edilen laktik asit bakterisinden α -amilaz üretimi ve karakterizasyonu

Özet

Bu çalışmada, peynir altı suyundan, ekonomik ve biyoteknolojik olarak fayda sağlamak amacıyla laktik asit bakterileri izole edildi. İzole edilen bakteriler morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler yardımıyla tanımlandı. Bakterilerin ekstraselüler α -amilaz üretme yeteneği araştırıldı. En iyi α -amilaz aktivitesi gösteren *Lactococcus* sp. PS-2A ile çalışmalara devam edildi.

Lactococcus sp. PS-2A bakterisinin kok (yuvarlak) şekilli, Gram pozitif, katalaz negatif, hareketli olduğu belirlendi. Bakteri üremesinin optimum koşulları pH 7.0, 35°C ve 16. saat olarak tespit edildi. *Lactococcus* sp. PS-2A'nın en yüksek α -amilaz aktivitesini; LB besi yerinde, pH 7.0, 35°C ve 20. saatte gösterdiği belirlendi. Karbon kaynaklarında %1'lik çözünebilir nişastanın α -amilaz üretimini iki kat arttırdığı saptandı. Azot kaynaklarından %1'lik amonyum klorür ile α -amilaz üretiminin arttığı tespit edildi.

Anahtar kelimeler: peynir altı suyu, laktik asit bakterisi, α -amilaz, üretim, karakterizasyon

1. Giriş

Laktik asit bakterileri (LAB), karbonhidrat fermentasyonunun temel metaboliti olarak laktik asit üreten ve spor oluşturmeyen Gram pozitif bakterilerin geniş bir grubunu teşkil ederler. LAB, mayalanmış süt ürünleri, ekmek ve tahıllar ve sebzeleri içeren değerli gıdaların üretimiyle ilişkili olarak; insanoğlu için en önemli mikroorganizma gruplarından biridir (Kim ve ark. 2008) (Yücel Şengün 2011) (Souza ve ark 2018). Günümüzde en tipik LAB mensupları; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsleridir (Ammor ve ark. 2007)

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905322678815; Fax.: +905322678815; E-mail: semaagul@dicle.edu.tr

Laktokoklar; fermente edilmiş yiyeceklerin (peynir gibi) imalatında kullanılmalarından dolayı laktik asit bakterilerinin en önemli grubudur. Çoğunlukla üremeleri sırasında asidik koşullar sayesinde oluşmuş proteince zengin ürünlerin hızlı bozulmasını engellemeye yardımcı olurlar. Bakteriyofaj dirençliliği ve bakteriyosin üretme yeteneği gibi özelliklere sahiptirler (Ayad ve ark. 2002). Süt ve peynir endüstrilerinin bir yan ürünü olan peyniraltı suyu süt proteinlerinin yaklaşık %20'sini içeren, peynir üretimi sırasında oluşan bir yan üründür (Yerlikaya ve ark. 2010). Peynir altı suyu veya bileşenleri; tarımsal gübre ve hayvan yemi olarak kullanımının yanı sıra, çeşitli gıda, kozmetik ve eczacılık ürünlerini de içinde barındırmaktadır (Marek ve ark. 2004).

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmekle birlikte bir kısmı da bitkisel ve hayvansal kaynaklardan sağlanmaktadır (Agüloğlu ve ark., 2014) (Gupta ve ark., 2003). α -Amilaz (1,4- α -D-glucanohydrolase; EC 3.2.1.1), bira yapımı, ekmekçilik, tekstil, kağıt ve deterjan gibi çok sayıda endüstriyel işlemlerde kullanılabilen, biyoprotein üretiminde ve nişastanın fermentasyonunda önemli bir yer tutan en önemli endüstriyel enzimlerden biridir (Agüloğlu ve Enez 2014), (Liu ve Xu 2008), (Ortakaya ve ark., 2017).

Çalışmamızda endüstriyel atık su olarak kabul edilen ve yeterince değerlendirilmeyen peynir altı suyundan laktik asit bakterileri izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilerek endüstriyel öneme sahip α -amilaz üretme yetenekleri saptandı. En yüksek α -amilaz üretme yeteneğine sahip süştan elde edilen α -amilazın karakterizasyonu yapılarak, peynir altı suyunun değerlendirilmesi için imkan sağlanması amaçlandı.

2. Materyal ve yöntem

2.1 Biyolojik Materyal

Peynir altı suyu örneklerinden izole edilen *Lactococcus* sp. PS-2A kullanılmıştır.

2.2 Metot

2.2.1 *Lactococcus* sp. PS-2A'nın izolasyonu

Laktik asit bakterisi elde etmek amacıyla 10 ml peynir altı suyu 90 ml steril su içeren erlenlere aktararak 10^{-1} lik süspansiyon hale getirildi ve benzer şekilde ardışık transferler yapılarak 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 'lik dilüsyonlar sağlandı. Tek koloni elde etmek amacıyla seri sulandırma yapılan örneklerden MRS agar besi yerine yayma ekim yapıldı ve 37°C 'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

Biyokimyasal Testler

Seçilen farklı morfolojik görünüme sahip bakteri örneğini teşhis edebilmek amacı ile biyokimyasal testler yapıldı.

Sıcaklığın Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

25 ml Luria Broth (LB) sıvı besi yeri hazırlanarak 100 ml'lik erlenmayerde otoklavlandı ve gecelik taze kültürden 1 ml bakteri ekimi yapıldı; 20°C 'den başlayarak 5°C artırılarak 60°C 'ye kadar 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi.

pH'nin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

25 ml LB sıvı besi yerleri pH'ları 4.0-10.0 olacak şekilde ayarlanarak otoklavlandı ve taze kültürden 1 ml ekim yapıldı. Bakterinin optimum sıcaklığında 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi.

Inkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

25 ml LB sıvı besi yerine gecelik taze kültürden 1 ml ekim yapılarak bakterinin optimum pH ve sıcaklığında 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda üretilen 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 ve 48. saatlerde alınan bakteri örneklerinin 600 nm'de spektrofotometrede absorbansı ölçüldü.

2.2.2 Amilaz Aktivite Tayini

Amilaz aktivitesi tayini Bernfeld'e göre yapıldı. (Bernfeld 1955)

2.2.3 Protein Miktar Tayini

Protein miktarı Lowry yöntemine göre hesaplandı (Lowry 1951).

2.2.4 α -Amilaz Üretimi Üzerine Farklı Parametrelerin Etkisi

Farklı Besi Yerlerinin α -Amilaz Üzerine Etkisi

Farklı besi yerlerinin α -amilaz üretimine etkisini belirlemek amacıyla katı besi yerinde üretilen bakteri suşu farklı besi yerlerine (MRS, NB, LB ve BM) aktarıldı ve 1 gece üretilti.

α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın α -amilaz üretimine etkisini incelemek için 20°C 'den 60°C 'ye kadar 5°C 'lik artan sıcaklık aralıklarında enzim aktivitesi ölçüldü.

α -Amilaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Substrat olarak kullandığımız nişasta % 0.5'lik olacak şekilde sırasıyla sitrik asit (0.1 M pH 4.0, 5.0 ve 6.0), Tris-HCl (0.1 M pH 7.0, 8.0 ve 9.0) ve glisin/NaOH (0.1 M pH 9.0, 10.0) tamponları içerisinde hazırlandı. Daha sonra optimum sıcaklıkta α -amilaz aktivitesi ölçüldü.

Inkübasyon Süresinin α -Amilaz Üretimine Etkisi

Üretim süresinin α -amilaz üretimine etkisini görmek için üreme ortamının değişik zaman periyotlarında (4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 ve 48. saat) optimum sıcaklık ve pH'da üretilen bakteri kültüründen elde edilen süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılıp Bernfeld yöntemine göre aktivitesi ölçüldü.

α -Amilaz Üretimi Üzerine Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi

LB besi yerlerinde %1 konsantrasyonda olacak şekilde karbon ve azot kaynakları tek tek ilave edildi, daha sonra bakteri ekimi yapıldı. α -Amilaz üretimi için optimum üretim zamanı, sıcaklık ve pH'da inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda üst sıvılardan α -amilaz aktivite tayini yapıldı..

3. Bulgular

3.1 Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu

3.1.1 *Lactococcus sp. PS-2A'nın İzolasyonu*

Laktik asit bakterileri için selektif besi yeri olan Peynir altı suyu kullanılarak laktik asit bakterisi elde etmek amacıyla MRS agara yayma ekim yapılan örneklerden sonra MRS besi yerinde tek tek düşmüş farklı morfolojik görünüme sahip 4 çeşit koloni seçilerek bu koloniler PS-2A, PS-3B, PS-3C ve PS-4B olarak isimlendirildi. Seçilen koloniler NB agar besi yerine çizgi şeklinde ekim yapıldı. Üretilen bakteri kültürlerinin hepsinin; <1 mm, kok şeklinde, düzgün görünümlü, pigment oluşturmeyen kolonilerden oluştuğu tespit edildi. Amilaz varlığı tespit edildikten sonra PS-2A'yı tanımlamaya yönelik biyokimyasal testler yapıldı. Bu izolatlardan yapılan biyokimyasal testlerde nişastalı agarda en iyi amilaz aktivitesine sahip olan izolatın PS-2A olduğu belirlendi.

3.1.2 *Lactococcus sp. PS-2A'nın İdentifikasyonu*

3.1.2.1 *Biyokimyasal Testler:*

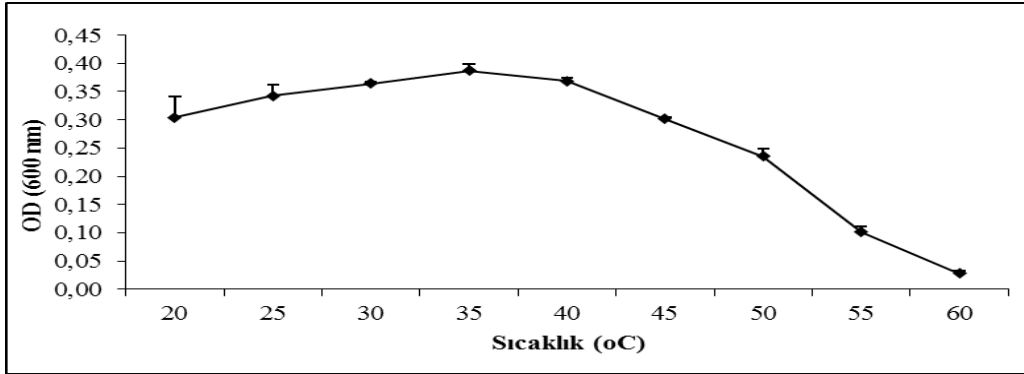
Seçilen PS-2A, PS-3B, PS-3C ve PS-4B bakteri örneklerini teşhis edebilmek amacı ile nişasta, jelatin, katalaz, kazein, üreaz ve lipaz hidrolizi ile hareket, indol, fosfataz, hemoliz gibi biyokimyasal testler yapıldı. Bu bakterilerin birbirleriyle ve laktik asit bakterilerinden Laktokokus ile olan benzerlikleri ve farklılıkları Tablo 1'de verilmektedir. Bu izolatlardan yapılan biyokimyasal testlerde nişastalı agarda en iyi amilaz aktivitesine sahip olan izolatın PS-2A olduğu belirlendi. Daha sonraki çalışma basamaklarında bu izolat kullanıldı.

Tablo 1. Laktik Asit Bakterilerinin, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri (Kav ve ark. 2008, Çağırğan 2004, Evans ve ark 2006, Ravelo ve ark. 2001, Sharifiyazdi 2010, Vendrel ve ark. 2006, Kubilay ve ark. 2005, Soltani ve ark. 2008) + pozitif sonuç – negatif sonuç ND belirsiz (d) değişken

Özellikleri	PS-2A	PS-3B	PS-3C	PS-4B	<i>Lactococcus</i>
Gram	+	+	+	+	+
Koloni büyüklüğü	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm
Koloni morfolojisi	kok	kok	kok	kok	kok
Hareketlilik	-	-	-	-	-
Pigment üretimi	-	-	-	-	-
Katalaz	-	-	-	-	-
Hemoliz	-	+	-	-	+
İndol	+	+	-	+	(d)
Nutrient Agar	+	+	+	+	ND
Fosfataz	+	+	+	+	+
Şeker (Glukoz, laktoz, sukroz)	-	-	-	-	(d)
EMB	+	+	-	+	ND
Caso Agar	+	+	+	+	ND
Nişasta+NB	+	+	+	+	ND
Büyüme					
Sıcaklık aralığı	20-60 °C	20-60 °C	20-60 °C	20-60 °C	10-45°C
pH aralığı	4-10	4-10	4-10	4-10	4.5-9.6
Hidroliz					
Nişasta	+	+	-	+	ND
Kazein	+	+	+	+	ND
Jelatin	-	-	-	-	ND
Aktivite					
Lipaz	+	+	-	+	ND
Üreaz	+	-	-	+	-
α -amilaz	+	+	+	+	ND

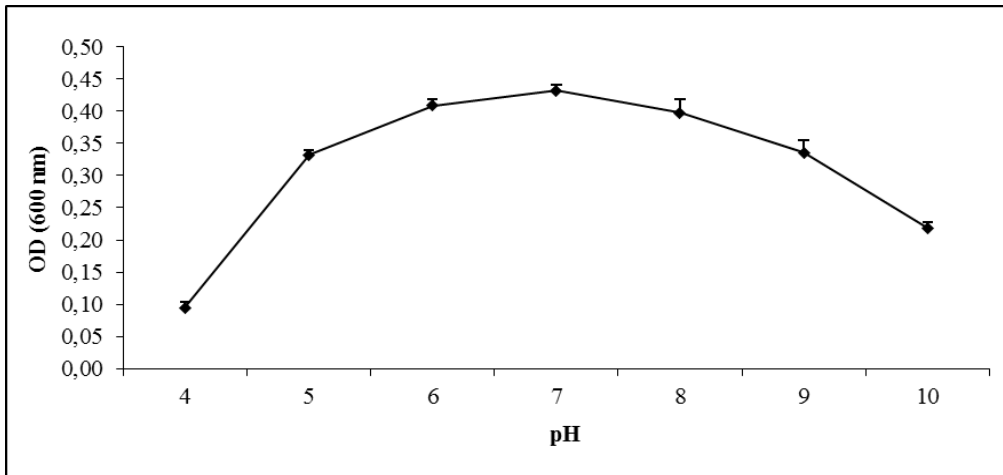
3.2. Sıcaklık, pH ve İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

Sıcaklığın mikroorganizma gelişimi üzerine etkisini belirlemek için; 20°C'den başlayarak 5°C arttırılarak 60°C'ye kadar üretilen *Lactococcus sp.* PS-2A izolatının her bir sıcaklık için spektrofotometrede 600 nm'de absorbansı ölçüldü. Şekil 1'de görüldüğü gibi *Lactococcus sp.* PS-2A 35°C'de maksimum büyüme elde edildi.



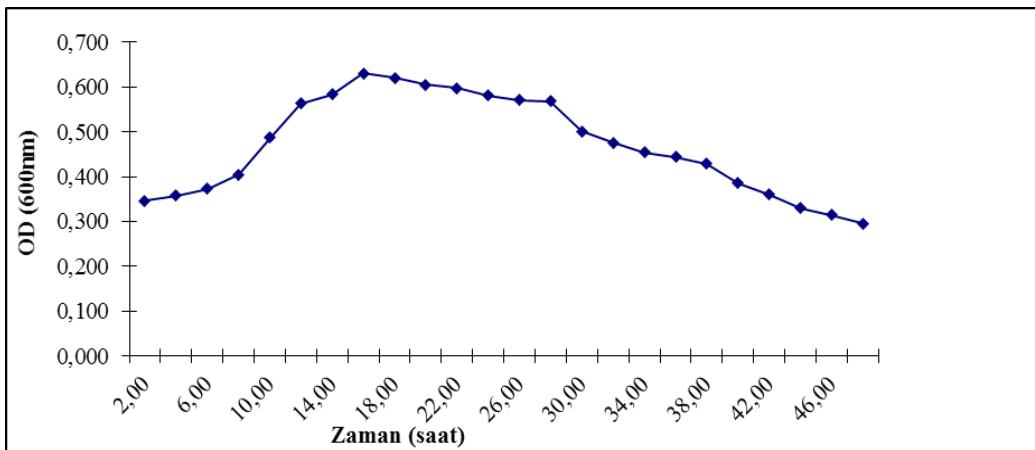
Şekil 1 Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Sıcaklık Etkisi

Mikroorganizma gelişimi üzerine pH etkisini belirlemek için, elde edilen *Lactococcus sp.* PS-2A izolatı LB besi ortamında Farklı pH'lara sahip besi yerlerindeki bakteri üremesi ölçüldü ve pH 7.0'te maksimum değerde olduğu belirlendi (Şekil 2).



Şekil 2 Mikroorganizma Gelişimi Üzerine pH Etkisi

4- 48. saatlerde üretilen 4. saatten itibaren artarak 16. saatte maksimuma ulaşan ve 36. saatten itibaren de düşüş gösteren bir büyüme grafiğine sahip olduğu görüldü. (Şekil 3)

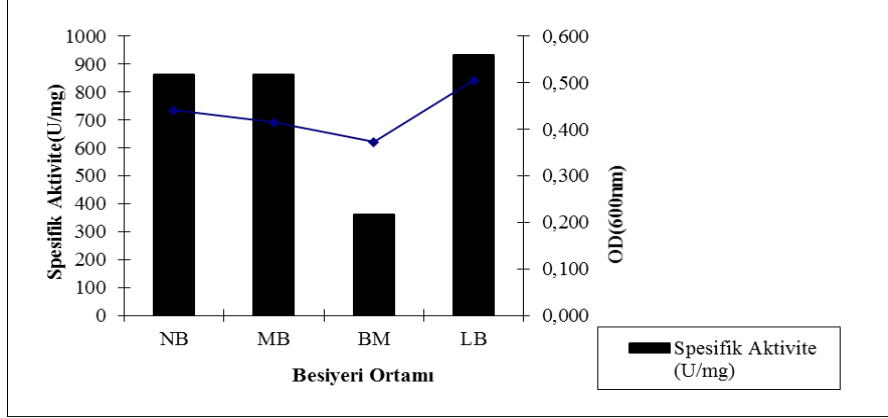


Şekil 3 İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Etkisi

3.3 α -Amilaz Üretimine Çeşitli Parametrelerin Etkisi

3.3.1 Farklı Besi Yerlerinin α -Amilaz Üretimine Etkisi

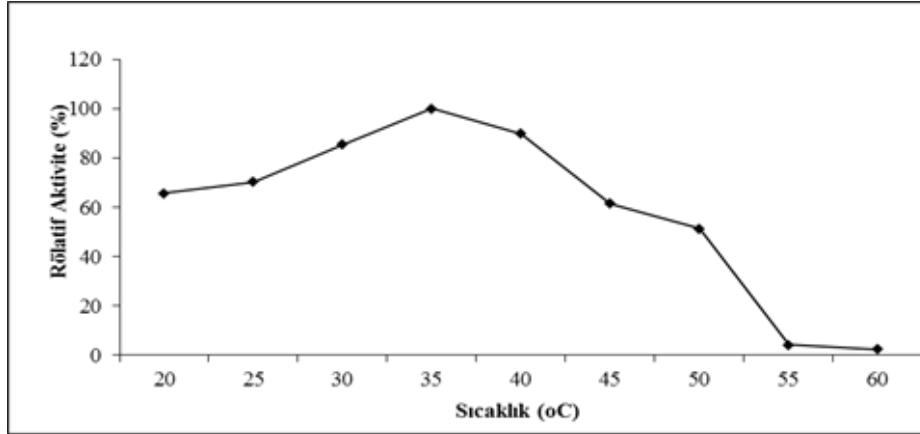
Lactococcus sp. PS-2A'dan en iyi α -amilaz üretimi LB besiyerinde elde edildi. (Şekil 4).



Şekil 4 Farklı Besi Yerlerinin α -Amilaz Üretimine Etkisi

3.3.2 α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

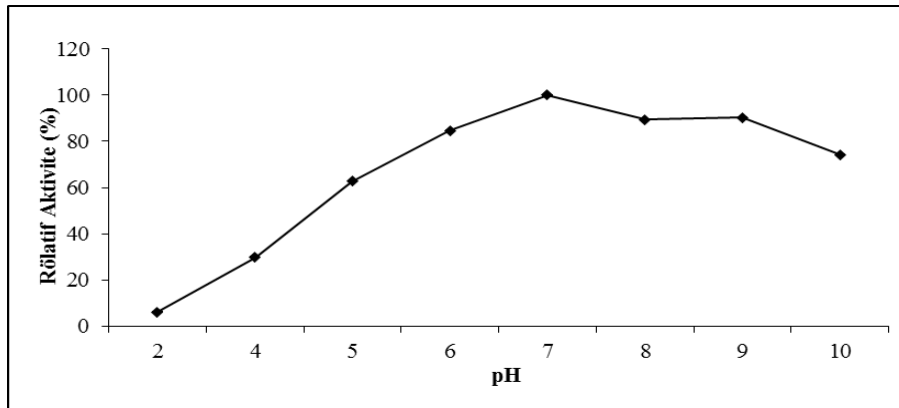
20-60°C aralığında yapılan sıcaklık tespitinde enzimin maksimum üretim gösterdiği sıcaklığın 35°C olduğu belirlendi. (Şekil 5)



Şekil 5 α -Amilaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

3.3.3 α -Amilaz Aktivitesi pH'nın Etkisi

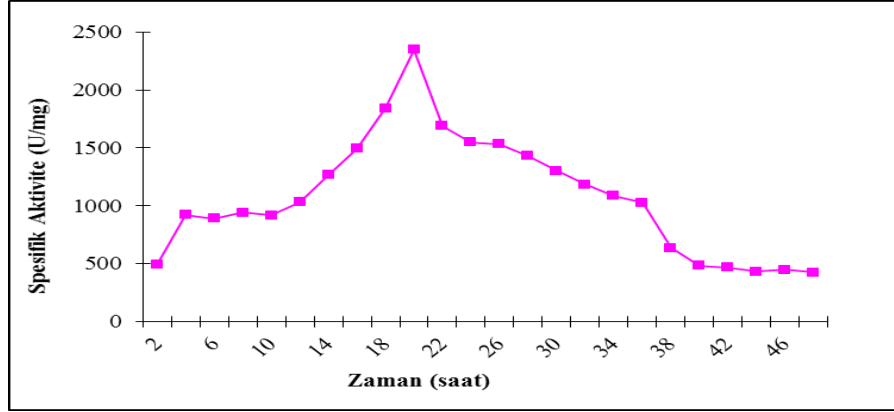
Bakteri optimum koşullarda üretilip pH 4-10.0 aralığında yapılan incelemede α -amilaz aktivitesinin en fazla pH 7.0 de olduğu tespit edildi (Şekil 6)



Şekil 6 α -Amilaz Üretimi Üzerine pH'nın Etkisi

3.3.4 İnkübasyon Süresinin α -Amilaz Üretimine Etkisi

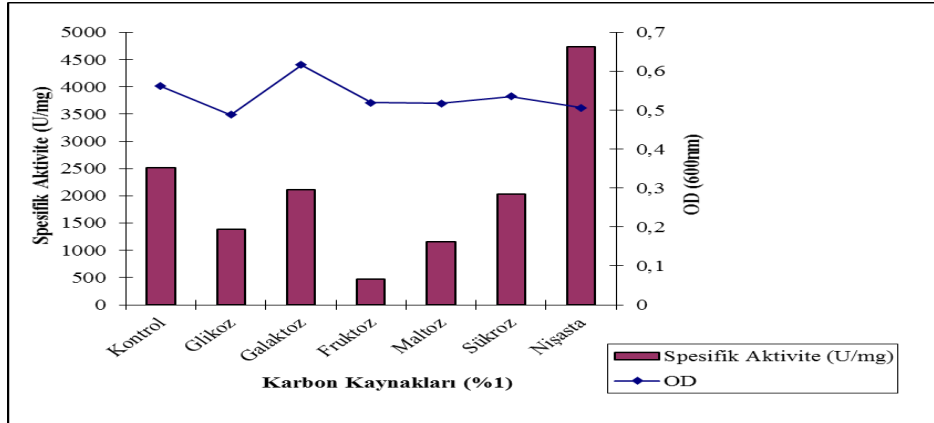
İnkübasyon süresinin α -amilaz üretimi üzerine etkisini incelemek için değişik zaman periyodlarında alınan örneklerde *Lactococcus sp.* PS-2A izolatının 20. saatte en yüksek α -amilaz aktivitesine ulaştığı tespit edildi (Şekil 7).



Şekil 7 İnkübasyon Süresinin α -Amilaz Üretimine Etkisi

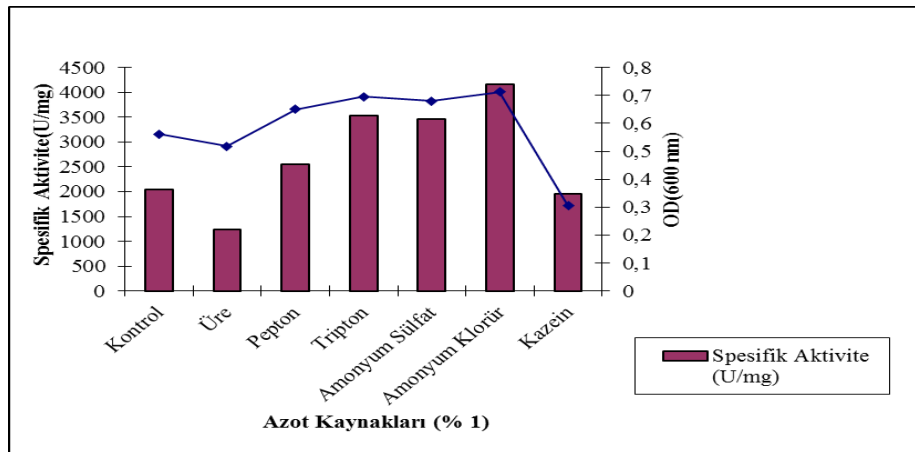
3.3.5 α -Amilaz Üretimi Üzerine Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi

Çalışılan karbon kaynaklarından %1'lik çözünebilir nişastanın amilaz üretimini 2 kat arttırdığı, galaktoz ve sukrozun eklenmesiyle kontrole yakın değer elde edildiği, glukoz, fruktoz ve maltoz ilavesiyle de enzim üretimindeki azalma Şekil 8'de gösterilmektedir. Çözünebilir nişasta α -amilaz üretimi için en iyi karbon kaynağı olarak belirlendi.



Şekil 8 α -Amilaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

Azot kaynaklarından %1'lik pepton, tripton, amonyum sülfat ve amonyum klorür ile α -amilaz üretiminin kontrole göre arttığı, üre ve kazein ilavesi ile enzim üretiminin azaldığı Şekil 9'da gösterilmektedir. α -Amilaz üretimi için en uygun azot kaynağının amonyum klorür olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 9 α -Amilaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

4. Sonuçlar ve tartışma

Peynir altı suyu; süt ürünlerinin yapımı sırasında ortaya çıkan, sıvı atık sayılıp değerlendirilmeden kanalizasyonlara ve akarsulara verildiğinde ciddi çevre ve sağlık problemlerine neden olan, yüksek organik içeriğe sahip bir yan üründür. Aynı zamanda gelişen teknoloji ile insan ve hayvan kullanımı için bir besin kaynağı olarak kullanılabilirliği ve endüstriyel önemi olan enzimleri üreten mikroorganizmaların üremesi için çok uygun bir ortam olduğu için peynir altı suyu örneklerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirildi.

Laktik asit bakterileri için selektif besi yeri olan MRS agarda çoğaltılıp, buradan seçilen PS-2A, PS-3B, PS-3C ve PS-4B'nin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testleri yapıldı ve <1 mm, kok şeklinde, düzgün görümlü, pigment oluşturmeyen kolonilerden oluştukları tespit edildi. Bu bakteri örneklerinden hazırlanan preparatlardan mikroskop altında Gram boyama özellikleri ve morfolojik özellikleri incelendiğinde Gram pozitif ve kok şeklinde oldukları, laktik asit bakterileri için selektif besi yeri olan MRS agarda üremelerinden ve Gram boyanma özellikleriyle koloni şekillerinden dolayı *Lactococcus* cinsinin özellikleriyle benzerlik gösterdikleri için *Lactococcus* oldukları belirlendi.

Zamfir ve ark. 2006, ham ve fermente edilmiş süt, peynir gibi kaynaklardan topladıkları 110 örnekten laktik asit bakterisi izolasyonu yapmış ve buradan elde ettikleri 599 izolatın Gram boyamasını, katalaz aktivitesini ve morfolojisini test etmişlerdir. İzolatlardan çoğunun *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc spp.*, *Enterococcus spp.* ve *E. saccharominimus* türleri olduklarını tespit etmişlerdir. Adnan ve Tan 2007, keçi sütüyle yapılan tapai ve tempoyak besinlerinden laktik asit bakterisi izolasyonu yapmışlar. 126 suş izole ederek Gram boyama ve katalaz aktivitelerini saptamışlardır. Bu suşlardan yedi tanesini tanımlayıp ikisinin laktobasil, birinin de laktokok olduğunu belirlemişlerdir.

Sengun ve ark. 2009, yoğurt ve buğday unundan yapılan "Tarhana" dan MRS, M17 ve SBM besi yerlerini kullanarak 226 Gram pozitif ve katalaz negatif bakteri izole etmişlerdir. İzolatları fenotipik ve genotipik birçok yöntem kullanarak tanımlamış ve gruplandırmışlardır. Yaptığımız çalışmada; uygun besi ortamında pH 4.0-10.0 arasında pH denemeleri gerçekleştirilerek, optimum üreme pH'sının 7.0 olduğu, 20°C-60°C arasında sıcaklık denemelerinde ise optimum üreme sıcaklığının 35°C olduğu ve 4-48 saat arası inkübasyon sonrası 16. saatte bakterinin optimum üreme gösterdiği belirlendi. Çalışmamız yukarıda belirtilen çalışmalarda *Lactobacillus* ve *Lactococcus*'ların belirtilen optimum üretim sıcaklıklarıyla benzer özellik göstermektedir.

Badis ve ark. 2004, 4 farklı Cezayir ırkı keçilerin sütünden izole ettikleri 725 laktik asit bakterisini karakterize etmişlerdir. 30-45°C inkübasyon sonrasında birinci *Lactococcus* 'ları; Elliker besi yerinde, 30°C'de, 72 saat, aerobik ortamda üretmişlerdir. Sıcaklık, mikroorganizmanın büyümesi ve buna bağlı olarak α -amilaz üretimiyle ilişkilidir. Çoğu araştırmacı tarafından bakterilerde optimum bakteri büyümesi ve α -amilaz üretimi için geniş sıcaklık aralığı (35-80°C) verilmiştir (Asgher 2007). Konsula ve Kyriakides tarafından taze koyun sütünden izole edilen *B.subtilis*'in maksimum ekstrasellüler α -amilaz üretiminin 40°C'de olduğu belirtilmiştir. Elde ettiğimiz *Lactococcus* sp. PS-2A'nın ürettiği ekstrasellüler α -amilaz enziminin optimizasyonu yapılarak, optimum sıcaklık 35°C olarak tespit edilmiştir. Konsula ve Kyriakides 2004, taze koyun sütünden izole ettikleri ılımlı termofilik *Bacillus subtilis* suşundan elde ettikleri ekstrasellüler termostabil α -amilazın nişasta hidrolizine etkisini araştırmışlardır. Maksimum amilaz üretiminin düşük nişasta içeren ortamda ve 40°C'de elde etmişlerdir.

Sanni ve ark. 2002, Nijerya'nın yöresel fermente edilmiş yiyeceklerinden, izole etmiş oldukları *L. plantarum* suşundan elde ettikleri α -amilazın optimum pH 6.0 ve 65°C'de, *L. fermentum* K9 suşu için ise pH 4.0 ve 45°C maksimum aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Ekstrasellüler α -amilazların optimum pH'sı 3.0-10.0 arasında değişmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bakterinin ekstrasellüler α -amilazının nötral koşullarda maksimum aktivite göstermesi endüstriyel işlemlerde kullanılabilir özelliğinin olduğunu göstermektedir. Enzimler modern deterjanların içeriğinde bulunmaktadır. Ticari olarak kullanılan pek çok *Bacillus* suşunda bakteri üretimi ve ekstrasellüler α -amilaz üretimi için optimum pH, 6.0 ve 9.0 arasında verilmektedir (Burhan ve ark. 2003), (Castro ve Bull 1992), (Jin ve Patel 1999). Çalışmamızda da *Lactococcus* sp. PS-2A bakterisi optimum büyümeyi ve maksimum ekstrasellüler α -amilaz üretimini pH 7.0'de gerçekleştirmiştir.

Değerlendirilmeden doğaya bırakılan çok ciddi çevre ve sağlık sorunlarına yol açabilen peynir altı suyundan izole ettiğimiz *Lactococcus* sp. PS-2A'dan optimum koşullar sağlanarak büyük endüstriyel önemi olan α -amilaz kolay ve ekonomik proseslerle üretilerek optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Böylece yapılan bu çalışma ile peynir altı suyundan ekonomik ve biyoteknolojik olarak fayda sağlanabileceği ortaya konmuştur. Elde ettiğimiz α -amilaz 35°C'de maksimum aktivite gösterdiği için düşük ısıda yıkama işlemini gerçekleştiren çamaşır makinelerinde kullanılan deterjanların içeriğinde kullanılabilir. Nötral pH'da maksimum aktivite vermesi ise kuru temizlemede kullanılabilir özellikte olduğunu göstermektedir.

Kaynaklar

- Adnan, A. F. M., Tan, G. K. P. (2007). Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*, 98, 1380–1385.
- Agüloğlu, S., Enez, B. (2014). Purification, and characterization of α -amylase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Starch/Stärke* 66, 182–189

- Agüloğlu Fincan, S., Enez, B. Ozdemir, S., Matman Bekler, F. (2014). Purification and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. *Carbohydrate Polymers*, 102, 144-150.
- Ammor, M. S., Florez, A. B., Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24:559–570.
- Asgher, M., Asad, M. J., Rahma, S.U., Legge, R.L. (2007). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79, 950–955.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M., Smit, G. (2002). Antimicrobial-producing wild *lactococci* isolated from artisanal and non-dairy origins. *International Dairy Journal*, 12, 145–150.
- Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B. M., Henni, D.E., Kihal, M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21, 579–588.
- Bernfeld, P. (1955). *Enzymes Carbohydrate Metabolism*. In *Methods In Enzymology* Academic Press, 17, 149-158.
- Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, C., Omer, C., Ashabil, A., & Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkalophilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38, 1397–1403.
- Castro, P. M. L., Hayter, P. M., Ison, A. P., Bull, A. T. (1992). Application of statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 84–90.
- Çağırğan, H. (2004). Biotyping of *Lactococcus garvieae* isolated from Turkey. *Ege University Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 21, 267–269.
- Evans, J. J., Pasnik, D. J., Klesius, P. H., Al-Ablani, S. (2006). First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 42, 561–569.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylase: biotechnological perspective. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 1599–1616.
- Jin, B., Van-Leeuwen, J. H., Patel, B. (1999). Mycelial morphology and fungal protein production from starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry*, 34, 335–340.
- Kav, K., Erganiş, O. (2007). Konya bölgesinde bulunan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinden *Lactococcus garvieae* izolasyonu, identifikasyonu ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi. *Veterinerlik Bilimleri Dergisi*, 23, 7–17.
- Kim, J., Sunako, M., Ono, H. Murooka, Y., Fukusaki, E., Yamashita, M. (2008). Characterization of gene encoding amylopullulanase from plant-originated lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* L137. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 449–459.
- Konsula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, M. (2004). Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 39, 1745–1749.
- Kubilay, A., Altun, S., Uluköy, G., Diler, Ö. (2005). *Lactococcus garvieae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 1, 39-48.
- Liu, X. D. Xu, Y. (2007). A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: purification and characterization. *Bioresource Technology*, 99, 4315–4320.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Marek, P., Nair, M. K. M., Hoagland, T., Venkitanarayanan, K. (2004). Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized Cheddar cheese whey. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 1–7.
- Ortakaya, V., Agüloğlu Fincan, S., Enez, B. (2017). α -Amylase from *Bacillus simplex*- production, characterization and partial purification. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26, 4446-4455.
- Ravelo, C., B. Magarinos, Romalde, J. L., Toranzo, A. E. (2001). Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 21, 136–144.
- Sanni, A.I., Morlon-Guyot, J., Guyot, J.P. (2002). New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 53–62.
- Sengun, I. Y., Nielsen D. S., Karapinar M., Jakobsen M. (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from arhana, a traditional Turkish fermented food. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 105–111.
- Sharifiyazdi, H., Akhlaghi, M., Tabatabaei, M., Mostafavi Zadeh, S. M. (2010). Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultured in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 11, (4), 33.
- Soltani, M., Nikbakht, G.H., Ebrahimzadeh, H. A., Ahmadzadeh, N. (2008). Epizootic outbreaks of *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 28, 209–214.
- Souza, B.M. S., Borgonovi, T.F., Casarotti, S. N., Todorov, S. D., Penna, A.L.B. (2018). *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* Strains Isolated from Mozzarella Cheese: Probiotic Potential, Safety, Acidifying Kinetic Parameters and Viability under Gastrointestinal Tract Conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9406-y>.
- Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J. L. (2006). *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 29, 177-198.
- Yerlikaya, O., Kınık, Ö., Akbulut, N. (2010). Peyniraltı Suyunun Fonksiyonel Özellikleri ve Peyniraltı Suyu Kullanılarak Üretilen Yeni Nesil Süt Ürünleri. *GIDA*, 35, 289–296.
- Yücel Şengün, İ. (2011). Lactic acid bacteria used in the production of fermented foods. *Biological Diversity and Conservation* 4, 42–53
- Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J., De Vuyst, L. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 487–495.

(Received for publication 19 May 2018; The date of publication 15 August 2018)



Urban vascular flora and ecological characteristics of Mamak District (Ankara/Turkey)

Muhammed Hakan ÇAKMAK *¹, Zeki AYTAÇ²

¹ Ministry of Forestry and Water Affairs, General Directorate of Nature Conservation and National Parks, Ankara, Turkey

² Gazi University, Faculty of Science, Biology Department, Ankara, Turkey

Abstract

In this research, the urban flora of Mamak district in Ankara was studied and the negative consequences of unplanned urbanization ignoring ecological conditions were analysed in the context of urban ecology. For inventorying the species, primarily, plant specimens were collected from green areas such as parks, gardens, etc. within the district in vegetation periods. Then, the specimens were preserved in GAZI Herbarium. In this study, totally 233 plant taxa were determined; 118 of them were indigenous and 115 taxa were exotic and cultivated. Besides, archaeophyte and neophyte, endemic, urbanophile-urbanoneutral-urbanophobe taxa, and hemeroby scale of the study area were mentioned. In addition, the precautions to be taken against the negative consequences of unplanned urbanization were also emphasized in this paper. Finally, the importance of urban ecological and floristic studies for Mamak district in Ankara were presented with this study.

Key words: Ankara, Mamak, urban ecology, urban ecosystem, urban flora

----- * -----

Mamak İlçesinin (Ankara/ Türkiye) kentsel vasküler florası ve ekolojik özellikleri

Özet

Bu araştırmada, Mamak ilçesinin kentsel florası araştırılmış ve ekolojik koşullar göz ardı edilerek gerçekleştirilen plansız kentleşmenin olumsuz sonuçları kentsel ekoloji bağlamında analiz edilmiştir. Türlerin envanteri çıkarılırken öncelikle, vejetasyon döneminde ilçedeki park, bahçe vb. yeşil alanlardan bitki örnekleri toplanmıştır. Toplanan örnekler, GAZI herbaryumunda muhafaza edilmektedir. Çalışmada toplam 233 takson tespit edilmiştir; bunlardan 118'i doğal, 115'i ise egzotik ve kültüredir. Bununla beraber, arkeofit ve neofit, endemik, urbanofil ve urbanofob bitkiler ile çalışma alanının hemerobi basamaklarından bahsedilmiştir. Bu çalışmada ayrıca plansız kentleşmenin olumsuz sonuçlarına karşı alınması gereken önlemler üzerinde de durulmuştur. Son olarak, bu çalışmayla Ankara'nın Mamak ilçesi için kent ekolojisi ve florası çalışmalarının önemi ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Ankara, Mamak, kentsel ekoloji, kent ekosistemi, şehir florası

1. Introduction

Cities are the most important naturally and/or anthropogenically influenced ecosystems in which millions of people live (Antipina, 2003). Urban ecosystems and the composition of urban flora and fauna are greatly dependent on human activities (Sukopp, 2004) and human impact has been the most important influence especially on the composition of the flora and vegetation for about the last 50 centuries (Shaltout and El-Sheikh, 2002; Wheater, 2002). Because of human impacts, species are estimated to go extinct all around the world at a rate of 0.5% per year due to habitat loss and fragmentation (Van der Veken et al., 2004). Flora and vegetation are very important components and elements of urban ecosystems. The urban flora, basically, consists of plants that naturally grow there (Antipina, 2003).

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: + 903122075000; Fax.: +903122075000; E-mail: muhammedhakan.cakmak@gmail.com

© 2008 All rights reserved / Tüm hakları saklıdır

Species occur in urban areas which are directly linked to the ecological structure, city planning strategies, politics, topography, economic and cultural life of cities (Maurer et al., 2000).

There are many studies on urban flora in the world. Studies in cities of Mumbai/India (Graham, 1839), Los Angeles/United States (Abrams, 1917), Buenos Aires/Argentina (Guaglianone, 1980), London/England (Burton, 1983), Mexico City/Mexico (Rapoport et al., 1983), Plzen/Czech Republic (Pyšek and Pyšek, 1988), Berlin/Germany (Böcker et al., 1991), Beijing/China (He, 1992), Melbourne/Australia (Jones and Jones, 1999), Sousse/Tunisia (Brandes, 2001) are main urban floristic researches in the world. On the other hand, studies on urban flora in Turkey are fairly limited. Studies in cities of Antalya (Göktürk and Sümbül, 1997), Ankara (Akaydın and Erik, 2002), Bursa (Daşkın and Kaynak, 2006), Muğla (Kaya et al., 2008), Adana (Karakuş and Türkmen, 2011), İstanbul (Altay et al., 2012), Denizli (Gürcan and Düşen, 2015) and studies in districts of Kadıköy (Osma et al., 2010), Kartal (Altay et al., 2010), Beykoz (Tarakçı et al., 2012), Pendik (Eskin et al., 2012) are urban floristic researches in Turkey.

Mamak is one of the extremely active districts of Ankara, where urbanization is constantly growing and unplanned slum areas emerge. As a result, there are old settlements that have suffered a lot of destruction in the district. The reason of choosing this area is to reveal the negative effects and pressures of urbanization on nature and the environment. This study aims to reveal the negative consequences of unplanned urbanization and industrialization ignoring ecological conditions and the precautions to be taken in this context.

In this study, the urban flora and ecological characteristics of Mamak district was presented. Moreover, indigenous and exotic-cultivated plants that exist in urban habitats were mentioned.

2. Materials and methods

The Mamak district is located at the eastern part of Ankara, which is the capital city of Turkey (32°55'23" E and 39°56'31" N). Neighboring districts are Elmadağ (in the east), Altındağ (in the north-northwest), Çankaya (in the south-southwest-west) (Figure 1). Total land area is 342 km² which also covers some rural areas (Governorship of Ankara, 2016).



Figure 1. The satellite view of Mamak district (Google Earth Pro, 2016)

The basement rocks in the Mamak district consist of impermeable rocks of Emir Formation of Triassic age. It is unconformably overlain by semipermeable units of Keçikaya, Ortaköy and Elmadağ Formations which are also of Triassic in age. Besides, Gölbaşı Formation of Late Pliocene is unconformably overlies the formations beneath and of permeable character. The uppermost part of the stratigraphic column consists of permeable units of talus and alluvium (Çelik et al., 2007). Elmadağ Formation consists of limestone, metasandstone, agglomerate, calcarenite, metaconglomerate, sandstone and sandy limestone. Ortaköy Formation comprises agglomerate, calcarenite, tuff, split and diabasis. Keçikaya Formation consists of only limestone and finally, Gölbaşı Formation is composed of mudstone, conglomerate and sandstone (Akyürek et al., 1997).

In the district, a total area of 34245.6 hectares, 7 soil types were determined. Soil types were identified in the district respectively are as follows; brown soils (20375.6 ha, 59.5%), brown forest soils without lime (2473.39 ha, 7.22%), brown soils without lime (2296.01 ha, 6.70%), reddish brown soils (2094.64 ha, 6.12%), brown forest soils (808.628 ha, 2.36%), alluvial soils (356.757 ha, 1.04%), colluvial soils (261.891 ha, 0.76%). Mamak's 5578.71 hectares (16.29%) is covered with other land types and settlements (Ministry of Food, Agriculture and Livestock, 2015).

Mediterranean Region's continental climate is dominant in the study area. Climate data were taken from the Ankara Meteorological Station. January is the coldest month (mean low -1.9°C) while July is the warmest month (mean high 31.4°C). Annual precipitation is about 425.7 mm per year; the most precipitation occurs in spring. For the period

of 1996 - 2015 (20 years), the mean annual temperature is 12.8°C and the mean annual precipitation is 35.5 mm. Extreme winter cold (< 0°C) is usual and the late frost danger is generally present in the area. In relation to the Mediterranean bioclimatic divisions, the area adjacent to the slightly humid zone with semi-arid cold winter (Turkish State Meteorological Service, 2016).

Green areas in the Mamak district can be classified in 5 groups based on their functions; (1) parks, gardens and playgrounds, (2) meadows, tree nurseries and forests, (3) visual green spaces, medians and squares, (4) cemeteries, (5) public buildings with green spaces. The changes in green space per capita of Mamak district between 2011 - 2015 years are as follows; 7.28 m² (in 2011), 7.51 m² (in 2012), 8.18 m² (in 2013), 8.43 m² (in 2014), 8.68 m² (in 2015) (Mamak Municipality, 2016).

The plant specimens were gathered from green areas (parks, gardens, etc.) and other urban habitats. The inventory of the flora was conducted in the vegetation period of 2012 - 2017. Specimens were dried according to herbarium methods and were identified by using “*Flora of Turkey and the East Aegean Islands*” (Davis, 1965 – 1985; Davis et al., 1988; Güner et al., 2000) and “*Manual of Cultivated Plants*” (Bailey, 1949). The specimens were preserved in GAZI Herbarium (GAZI). The identified taxa were first classified as Gymnosperm and Angiosperm. The taxa beneath them were arranged in alphabetical order respectively; family, genus, species, subspecies and varieties. For such information like current names and authors of taxa and their phytogeographical region, “*Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler) [Turkish Plant List (Vascular Plants)]*” (Güner et al., 2012) and “www.theplantlist.org” (The Plant List, 2017) were used. Life forms of taxa (phanerophytes, chaemaphytes, hemicryptophytes, therophytes, geophytes and helophytes) were determined based on Raunkier system (Akman and Ketenöglü, 1987). The categories and criteria of the rare and endangered species were assessed and determined according to “IUCN 2017-1” (The IUCN Red List of Threatened Species, 2017). Life cycles of taxa (annual, biennial, perennial) were also determined according to “*Flora of Turkey and the East Aegean Islands*” (Davis, 1965 – 1985; Davis et al., 1988; Güner et al., 2000) and “*Manual of Cultivated Plants*” (Bailey, 1949). Archaeophyte and neophyte plants were also emphasized in this research. Besides that, urbanophile, urbanoneutral and urbanophobe plants for 118 native taxa were determined and presented according to Wittig et al. (1985). Finally, study area was also determined according to hemeroby scale of Sukopp and Weiller (1988).

Abbreviations

VU: Vulnerable, NT: Near Threatened, Ch: Chamaephyte, G: Geophyte, He: Helophyte, H: Hemicryptophyte, Ph: Phanerophyte, Th: Therophyte, C-W: Cosmopolitan or Widespread, E-S: Euro-Siberian element, I-T: Irano-Turanian element, M: Mediterranean element, A: Annual, B: Biennial, P: Perennial, Arc: Archaeophyte, Neo: Neophyte, *: Urbanophobe, **: Urbanoneutral.

3. Results

List of Native Plants

Angiospermae

Amaranthaceae

Amaranthus retroflexus L., C-W, Th, A, Neo, *
Chenopodium album L. subsp. *album* var. *album*, C-W, Th, A, Arc, *

Amaryllidaceae

Allium sp., C-W, G, P, **

Apiaceae

Bifora radians M.Bieb., C-W, Th, A, **
Caucalis platycarpus L., C-W, Th, A, *
Torilis arvensis subsp. *neglecta* (Spreng.) Thell., C-W, Th, A, *

Apocynaceae

Cynanchum acutum L. subsp. *acutum*, C-W, H, P, *

Araliaceae

Hedera helix L., C-W, Ph, P, *

Asparagaceae

Hyacinthella micrantha (Boiss.) Chouard, Endemic, VU, C-W, G, P, **
Muscari neglectum Guss. ex Ten., C-W, G, P, *

Asteraceae

Carduus nutans L. subsp. *nutans*, C-W, H, B, *
C. pycnocephalus subsp. *albidus* (M.Bieb.) Kazmi, C-W, Th, A, **
Centaurea iberica Trev. ex Sprengel, C-W, Th, A-B, *
C. solstitialis L. subsp. *solstitialis*, C-W, Th, A, *
C. urvillei subsp. *stepposa* Wagenitz, C-W, H, P, *

C. virgata Lam., I-T, H, P, *

Cichorium intybus L., C-W, H, P, Arc, *

Cirsium arvense (L.) Scop., C-W, H, P, Arc, *

C. vulgare (Savi) Ten., C-W, H, B, *

Conyza canadensis (L.) Cronquist, C-W, Th, A, Neo, *

Cota austriaca (Jacq.) Sch.Bip., C-W, Th, A, **

Crepis alpina L., C-W, Th, A, **

C. foetida subsp. *rheadifolia* (M.Bieb.) Čelak., C-W, Th, A, Neo, *

Crupina crupinastrum (Moris) Vis., C-W, Th, A, *

Cyanus depressus (M.Bieb.) Soják, C-W, Th, A, **

Echinops pungens Trautv. var. *pungens*, I-T, H, P, **

Lactuca serriola L., C-W, H, B, Arc, *

Onopordum tauricum Willd., E-S, H, B, *

Senecio vernalis Waldst. & Kit., C-W, Th, A, **

S. vulgaris L., C-W, Th, A, Arc, *

Sonchus asper subsp. *glaucescens* (Jord.) Ball, C-W, Th, A-B, *

Tragopogon dubius Scop., C-W, H, B, *

Tripleurospermum oreades (Boiss.) Rech.f. var. *oreades*, C-W, H, P, *

T. parviflorum (Willd.) Pobed., C-W, Th, A, *

Xeranthemum annuum L., C-W, Th, A, *

Boraginaceae

Alkanna orientalis (L.) Boiss. var. *orientalis*, I-T, H, P, *

Anchusa azurea Mill. var. *azurea*, C-W, H, P, *

A. hybrida Ten., M, H, B-P, *

A. leptophylla Roem. & Schult. subsp. *leptophylla*, C-W, H, B-P, **

A. pusilla Guşul., C-W, Th, A, **

Echium italicum L., M, H, B, *

Heliotropium europaeum L., I-T, Th, A, *

Brassicaceae

Alyssum desertorum Stapf., C-W, Th, A, *

Brassica elongata Ehrh., C-W, H, B-P, *

Calepina irregularis (Asso) Thell., C-W, Th, A, *

Capsella bursa-pastoris (L.) Medik., C-W, H, B, Arc, *

Descurainia sophia (L.) Webb ex Prantl, C-W, Th, A-B, *

Diplotaxis tenuifolia (L.) DC., C-W, H, P, Neo, **

Eruca vesicaria (L.) Cav., C-W, Th, A, *

Lepidium draba L., C-W, H, P, Neo, *

L. latifolium L., C-W, H, P, *

L. perfoliatum L., C-W, Th, A-B, *

Microthlaspi perfoliatum (L.) F.K.Mey., C-W, Th, A, **

Sinapis arvensis L., C-W, Th, A, Arc, **

Sisymbrium altissimum L., C-W, Th, A-B, *

S. loeselii L., C-W, Th-H, A-B-P, Neo, *

Caprifoliaceae

Scabiosa rotata M.Bieb., I-T, Th, A, *

Caryophyllaceae

Silene conoidea L., C-W, Th, A, *

Stellaria media (L.) Vill., C-W, Th, A, Arc, *

S. pallida (Dumort.) Piré, C-W, Th, A, *

Colchicaceae

Colchicum triphyllum Kunze, M, G, P, **

Convolvulaceae

Convolvulus arvensis L., C-W, H, P, Arc, **

C. galaticus Rost. ex Choisy, I-T, H, P, *

Crassulaceae

Phedimus spurius (M.Bieb.) t Hart, E-S, H, P, *

Euphorbiaceae

Euphorbia helioscopia L., C-W, Th, A, Arc, **

Fabaceae

Lotus corniculatus L. var. *corniculatus*, C-W, H, P, *

Medicago sativa L. subsp. *sativa*, C-W, H, P, *

Medicago x varia Martyn, C-W, H, P, *

Melilotus albus Desr., C-W, Th, A-B, Arc, *

M. officinalis (L.) Desr., C-W, Th, A-B, Arc, *

Trifolium pratense L. var. *pratense*, C-W, H, P, Arc, *

T. repens L. var. *repens*, C-W, H, P, Arc, *

T. resupinatum L. var. *resupinatum*, C-W, Th, A, *

Trigonella capitata Boiss., C-W, Th, A, *

T. spruneriana Boiss., C-W, Th, A, **

Vicia cracca subsp. *stenophylla* Vel., C-W, H, P, *

Geraniaceae

Erodium cicutarium (L.) L Hér. subsp. *cutarium*, C-W, Th, A, Arc, **

Hypericaceae

Hypericum perforatum subsp. *veronense* (Schrank) H.Linb., C-W, H, P, *

Iridaceae

Crocus danfordiae Maw subsp. *danfordiae*, Endemic, VU, C-W, G, P, **

Lamiaceae

Ajuga chamaepitys subsp. *chia* (Schreb.) Arcang., C-W, Th-H, A-B-P, **

Ballota nigra subsp. *anatolica* P.H.Davis, I-T, H, P, Arc, *

Lamium orientale (Fisch. & C.A.Mey.) E.H.L.Krause, I-T, Th, A, **

L. purpureum L. var. *purpureum*, E-S, Th, A, Arc, *

Marrubium globosum Montbret & Aucher ex Benth. subsp. *globosum*, Endemic, NT, I-T, H, P, **

M. parviflorum Fisch. & C.A.Mey. subsp. *parviflorum*, I-T, H, P, *

Salvia frigida Boiss., I-T, H, P, **

Liliaceae

Gagea peduncularis (C.Presl) Pascher, M, G, P, **

Malvaceae

Alcea biennis Winterl., C-W, H, P, *

Malva neglecta Wallr., C-W, Th, A, *

M. sylvestris L., C-W, H, B-P, Arc, *

Orobanchaceae

Orobanche ramosa L., C-W, Th, A, **

Papaveraceae

Fumaria asepala Boiss, I-T, Th, A, *

F. officinalis L., C-W, Th, A, Arc, *

Glaucium grandiflorum Boiss. & A.Huet subsp. *grandiflorum* var. *grandiflorum*, I-T, H, P, *

G. grandiflorum subsp. *refractum* (Nábelek) Mory var. *refractum*, I-T, H, P, *

Papaver lacerum Popov, C-W, Th, A, *

P. rhoeas L., C-W, Th, A, Arc, *

Plantaginaceae

Plantago major subsp. *intermedia* (Gilib.) Lange, C-W, H, P, *

Veronica persica Poir., C-W, H, P, Neo, **

V. polita Fr., C-W, Th, A, *

V. triphyllus L., C-W, Th, A, **

Poaceae

Dactylis glomerata subsp. *hispanica* (Roth) Nyman, C-W, H, P, Arc, *

Hordeum murinum subsp. *leporinum* (Link) Arcang., I-T, Th, A, Arc, *

Lolium perenne L., E-S, H, P, Arc, *

Phragmites australis (Cav.) Trin. ex Steud., E-S, He, P, **

Poa annua L., C-W, Th, A, Arc, *

P. bulbosa L., C-W, H, P, *

Polygonaceae

Rumex crispus L., C-W, H, P, *

R. obtusifolius subsp. *subalpinus* (Schur) Celak., C-W, H, P, *

Ranunculaceae

Adonis aestivalis L. subsp. *aestivalis*, C-W, Th, A, **

Consolida orientalis (J.Gay) Schrödinger, C-W, Th, A, **

Ranunculus marginatus d'Urv., C-W, Th, A, **

Resedaceae

Reseda lutea L. var. *lutea*, C-W, Th-H, A-B-P, Neo, *

Rubiaceae

Galium spurium L. subsp. *spurium*, E-S, Th, A, Arc, *

Scrophulariaceae

Verbascum cheiranthifolium Boiss. var. *cheiranthifolium*, C-W, H, P, **

Urticaceae

Urtica dioica L. subsp. *dioica*, E-S, H, P, Arc, *

Verbenaceae

Verbena officinalis L., C-W, Ch, P, *

Zygophyllaceae

Tribulus terrestris L., C-W, Th, A, *

List of Exotic and Cultivated Plants

Gymnospermae

Cupressaceae

Cupressus arizonica Greene, Ph, P

C. macrocarpa Hartw., Ph, P

- C. sempervirens* L., Ph, P
Cupressus × leylandii A.B.Jacks. & Dallim., Ph, P
Juniperus sabina L., Ph, P
J. squamata Buch.-Ham. ex D.Don, Ch, P
J. virginiana L., Ph, P
Platycladus orientalis (L.) Franco, Ph, P
Thuja occidentalis L., Ph, P, Neo
- Ginkgoaceae**
Ginkgo biloba L., Ph, P
- Pinaceae**
Abies alba Mill., Ph, P
Cedrus atlantica (Endl.) Manetti ex Carrière, Ph, P
C. deodara (Roxb. ex D.Don) G.Don, Ph, P
C. libani A.Rich., Ph, P
Picea abies (L.) H.Karst., Ph, P
P. glauca (Moench) Voss, Ph, P
P. orientalis (L.) Peterm., Ph, P
P. pungens Engelm., Ph, P
Pinus nigra J.F.Arnold, Ph, P
P. pinea L., Ph, P
P. sylvestris var. *hamata* Steven, Ph, P
- Taxaceae**
Taxus baccata L., Ph, P
- Angiospermae**
- Adoxaceae**
Sambucus nigra L., Ph, P
Viburnum opulus L., Ph, P
V. tinus L., Ph, P
- Anacardiaceae**
Cotinus coggygria Scop., Ph, P
- Asparagaceae**
Yucca filamentosa L., He, P
- Asteraceae**
Calendula officinalis L., Th, A, Neo
Taraxacum campylodes G.E.Haglund, H, P
- Berberidaceae**
Berberis aquifolium Pursh, Ph, P, Neo
B. thunbergii DC., Ph, P, Neo
B. vulgaris L., Ph, P
- Betulaceae**
Betula pendula Roth, Ph, P, Arc
- Bignoniaceae**
Catalpa bignonioides Walter, Ph, P, Neo
- Buxaceae**
Buxus sempervirens L. subsp. *sempervirens*, Ph, P, Neo
- Caprifoliaceae**
Lonicera japonica Thunb., Ph, P
L. ligustrina var. *yunnanensis* Franch., Ph, P
Symphoricarpos × chenaultii Rehder, Ph, P, Neo
- Caryophyllaceae**
Cerastium tomentosum L., H, P
Silene pendula L., Th, A
- Celastraceae**
Euonymus japonicus Thunb., Ph, P
- Convolvulaceae**
Ipomoea purpurea (L.) Roth, Th-H, A-P
- Cucurbitaceae**
Cucurbita pepo L., Th, A
- Elaeagnaceae**
Elaeagnus angustifolia L., Ph, P
- Euphorbiaceae**
Ricinus communis L., Ph, P
- Fabaceae**
Anagyris foetida L., Ph, P
- Cercis siliquastrum* L. subsp. *siliquastrum*, Ph, P
Gleditsia triacanthos L., Ph, P
Robinia hispida L., Ph, P
R. pseudoacacia L., Ph, P, Neo
Styphnolobium japonicum (L.) Schott, Ph, P, Neo
Quercus pubescens Willd., Ph, P
Q. robur L. subsp. *robur*, Ph, P
- Grossulariaceae**
Ribes aureum Pursh, Ph, P
- Hydrangeaceae**
Philadelphus coronarius L., Ph, P, Neo
- Juglandaceae**
Juglans regia L., Ph, P
- Lamiaceae**
Lavandula angustifolia Mill. subsp. *angustifolia*, Ch, P
- Malvaceae**
Hibiscus syriacus L., Ph, P
Tilia cordata Mill., Ph, P
T. tomentosa Moench, Ph, P
- Moraceae**
Ficus carica L. subsp. *carica*, Ph, P
Morus alba L., Ph, P, Neo
M. nigra L., Ph, P
- Nyctaginaceae**
Mirabilis jalapa L., H, P
- Oleaceae**
Forsythia × intermedia Zabel, Ph, P, Neo
Fraxinus angustifolia Vahl subsp. *angustifolia*, Ph, P
F. excelsior L., Ph, P
F. ornus L. subsp. *ornus*, Ph, P
Ligustrum japonicum Thunb., Ph, P
L. vulgare L., Ph, P
Syringa vulgaris L., Ph, P, Neo
- Plantaginaceae**
Antirrhinum majus L. subsp. *majus*, H, P
- Platanaceae**
Platanus orientalis L., Ph, P
- Rosaceae**
Amygdalus communis L., Ph, P
Armeniaca vulgaris Lam., Ph, P
Cerasus avium (L.) Moench, Ph, P
C. mahaleb (L.) Mill., Ph, P
C. vulgaris Mill., Ph, P
Cotoneaster dammeri C.K.Schneid., Ph, P
C. horizontalis Decne., Ph, P, Neo
C. salicifolius Franch., Ph, P, Neo
Crataegus laevigata (Poir.) DC., Ph, P
C. meyeri Pojark., Ph, P
C. monogyna Jacq., Ph, P
Cydonia oblonga Mill., Ph, P
Laurocerasus officinalis M.Roem., Ph, P
Malus floribunda Siebold ex Van Houtte, Ph, P
M. pumila Mill., Ph, P
Malus sp., Ph, P
Persica vulgaris Mill., Ph, P
Prunus divaricata var. *pissardi* Koch., Ph, P, Neo
Prunus sp., Ph, P
Prunus x domestica L., Ph, P
Pyracantha coccinea M.Roem., Ph, P
Pyrus elaeagnifolia Pall. subsp. *elaeagnifolia*, Ph, P
Pyrus sp., Ph, P
Rosa canina L., Ph, P
R. pulverulenta M.Bieb., Ph, P
Rosa sp., Ph, P

Spiraea vanhouttei (Briot) Carrière, Ph, P

Salicaceae

Populus canescens (Aiton) Sm., Ph, P

P. nigra L. subsp. *nigra*, Ph, P

Salix alba L. subsp. *alba*, Ph, P

S. babylonica L., Ph, P

Salix sp., Ph, P

Sapindaceae

Acer negundo L., Ph, P, Neo

A. pseudoplatanus L., Ph, P, Arc

Aesculus hippocastanum L., Ph, P, Neo

Koelreuteria paniculata Laxm., Ph, P

Simaroubaceae

Ailanthus altissima (Mill.) Swingle, Ph, P, Neo

Tamaricaceae

Tamarix parviflora DC., Ph, P

T. tetrandra Pall. ex M.Bieb., Ph, P

Ulmaceae

Ulmus minor Mill., Ph, P

Violaceae

Viola tricolor L., Th, A

Vitaceae

Parthenocissus quinquefolia (L.) Planch., Ph, P,

Neo

4. Conclusions and discussion

In this study, totally 233 taxa (180 species, 36 subspecies and 17 varieties) were collected from the research area, belonged to 160 genera and 63 families. 118 taxa (50.64%) are indigenous (79 species, 25 subspecies and 14 varieties), belong to 87 genera and 34 families and 115 taxa (49.36%) are exotic and cultivated (101 species, 11 subspecies and 3 varieties), belong to 74 genera and 39 families. It was determined that 106 indigenous taxa (89.83%) belong to dicots, while 12 (10.17%) to monocots.

When the floristic results of this study were compared with other studies, it was revealed that this study has the lowest number of families, genera, species, taxa and endemic taxa because of the differences between the area studied in this research and others regarding climatic factors and the size (Table 1).

Table 1. Comparison in numbers with other urban floristic studies

Studies	Number of families	Number of genera	Number of species	Number of taxa	Number of endemic taxa
Mamak	63	160	180	233	3
Ankara (Akaydın and Erik, 2002)	76	385	995	1142	146
Antalya (Göktürk and Sümbül, 1997)	130	569	1023	1065	75
Bursa (Daşkın and Kaynak, 2006)	86	377	677	706	25
Denizli (Gürcan and Düşen, 2015)	113	438	667	675	12
Muğla (Kaya et al., 2008)	86	327	555	576	31

The first 5 families which have the most taxa in this study are: Rosaceae (27, 11.59%), Asteraceae (27, 11.59%), Fabaceae (17, 7.30%), Brassicaceae (14, 6.01%) and Pinaceae (11, 4.72%). When the richest families in our study were compared with the Ankara study by Akaydın and Erik (2002), it can be seen that the sorting in the current study does not resemble the other paper except for the listing for Asteraceae, Fabaceae, Brassicaceae. The cause of this difference is thought to be the size of the study areas, and habitat structures of these research (Table 2).

Table 2. Comparison of the richest families with the Ankara study

Mamak	Ankara (Akaydın and Erik, 2002)
Asteraceae - 27	Asteraceae – 130
Rosaceae - 27	Fabaceae – 99
Fabaceae - 17	Poaceae – 81
Brassicaceae - 14	Brassicaceae – 68
Pinaceae - 11	Lamiaceae – 63

The most common genera in the study area are *Anchusa* L., *Cupressus* L., *Centaurea* L. and *Picea* A.Dietr. with 4 taxa for each (1.72%), while *Cupressus* and *Picea* are represented with one native taxa in the flora of Turkey. The reason why *Picea* and *Cupressus* have the most taxa in this study is that the areas where these plants were collected lost their naturalness (Table 3).

Table 3. Comparison of the richest genera with the Ankara study

Mamak	Ankara (Akaydın and Erik, 2002)
<i>Anchusa</i> - 4	<i>Astragalus</i> - 23
<i>Cupressus</i> - 4	<i>Salvia</i> - 17
<i>Centaurea</i> - 4	<i>Alyssum</i> - 17
<i>Picea</i> - 4	<i>Ranunculus</i> - 16

In this study, determinations of life forms showed that the largest group was phanerophytes with 104 taxa (44.64%). The others were as follows: therophytes with 61 taxa (26.18%), hemicryptophytes with 53 taxa (22.75%), geophytes with 6 taxa (2.58%), therophytes-hemicryptophytes with 4 taxa (1.72%), chamaephytes with 3 taxa (1.29%) and helophytes with 2 taxa (0.86%). In addition, the life cycles of 233 taxa were as follows; 157 perennial (67.38%), 54 annual (23.18%), 7 biennial (3.00%), 7 annual-biennial (3.00%), 4 biennial-perennial (1.72%), 3 annual-biennial-perennial (1.29%) and 1 annual-perennial (0.43%). Especially, intensive use of woody plants in urban planting process around the district can be shown as the reason why the proportion of phanerophytes and perennials were that high.

The distribution of phytogeographical elements in the study area are as follows; Irano-Turanian (15 taxa, 12.71%), Euro-Siberian (7 taxa, 5.93%), Mediterranean (4 taxa, 3.39%) and cosmopolitan or widespread (92 taxa, 77.97%). In terms of phytogeographical elements, the first rank is occupied by cosmopolitan or widespread taxa, which is followed by Irano-Turanian elements in both studies (Table 4). This is because the areas studied in both studies were urban areas and study areas are in Irano-Turanian phytogeographic region.

Table 4. Comparison of the distribution of the phytogeographical elements with the Ankara study

Mamak	Ankara (Akaydin and Erik, 2002)
Irano-Turanian - 15	Irano-Turanian - 276
Euro-Siberian - 7	Mediterranean - 76
Mediterranean - 4	Euro-Siberian - 62
Cosmopolitan or widespread - 92	Cosmopolitan or widespread - 581

In the study, 3 taxa are endemic (2.54%), *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (Lamiaceae), *Hyacinthella micrantha* (Asparagaceae), *Crocus danfordiae* subsp. *danfordiae* (Iridaceae).

While the most common native plant species were *Capsella bursa-pastoris*, *Trifolium pratense*, *Veronica persica* and *Senecio vernalis*; the most common exotic and cultivated plant species were *Platycladus orientalis*, *Robinia pseudoacacia*, *Pyracantha coccinea* and *Acer negundo* in the research area.

This study site was analyzed based on a hemeroby scale which was developed by Sukopp and Weiller (1998). In the boundaries of the study area, there are not HO, H1 and H2 classes. However, H3, H4, H5, H6, H7, H8 and H9 classes were presented as follows; H3 by the areas such as forests in and/or nearby villages (e.g. villages around Hüseyingazi Mountain); H4 memorial forests (e.g. Şehit Öğretmenler Memorial Forest); H5 hilly areas and old small village settlements (e.g. Hatip rivulet and surroundings); H6 small meadows (among the neighborhood and picnic areas) (e.g. Şehitlik Parkı); H7 agricultural fields, gardens and small-scale greenhouses; H8 agricultural areas where especially intensive agricultural spraying is applied; H9 main arteries of all the roads, railways and dump sites within the district.

Despite the fast-developing and continuously urbanizing nature of Mamak, it is fair to say that the district still has a rich flora. There are some factors which contribute to the richness of plant species in urban areas; such as wild-growing plant species (e.g. garden weeds and crops) and spontaneously occurring ornamental plants that escaped from original cultivations (Zerbe et al., 2003; Altay et al., 2010).

Although, floristic diversity could be rich in urban habitats, rapid urbanization may cause some problems for the survival of some species (Chocholoušková and Pyšek, 2003; Van der Veken et al., 2004). For example, while the number of therophytes increases, the number of endemic, rare and wasteland plant species decrease in urbanized areas (Maurer et al., 2000). A similar situation can be seen in the areas where the urbanization process continues rapidly just like in Mamak.

In this research, it was also observed that there is an increase of annuals, ruderals, non-native plants and cultivated species. As a result of increasing number of inhabitants in cities, increased traffic and trade cause an increase of the proportion of non-native species in the urban flora (Pyšek, 1998; Altay et al., 2010; Garcia-de-Lomas et al., 2010). These species can be imported to urban areas through human activity directly or indirectly and sometimes they can be more dominant than indigenous plants (Zerbe et al., 2003). *Cupressus arizonica*, *Acer negundo*, *Robinia pseudoacacia*, *Ailanthus altissima*, *Juglans regia* and *Morus nigra* are good examples for this situation in the district. Similarly, Kowarik (1992) mentioned that the most frequent non-native species on different habitats of Berlin/Germany were *Acer negundo*, *Robinia pseudoacacia* and *Prunus serotina* Ehrh.. Species such as *Acer negundo*, *Robinia pseudoacacia* and *Ailanthus altissima* were found and stated as some of the most frequent non-native species in some other studies as well (Altay et al., 2010; Osma et al., 2010; Eskin et al., 2012).

Introduction and establishment of non-native species to an area is always a big risk factor for inhabitants, native species and natural habitats. In this research, extremely increased snail (*Helix* L. sp.) populations were observed in some parks. This situation can be caused by the plantation of a cultivar of a grass species (*Lolium* L. sp.) which is not native to these areas. Furthermore, the plantation of a limited variety of a non-native plant species could be harmful for urban ecosystem. In the future, a plant disease of a particular species could damage all the specimens or any other species. Moreover, one of the non-native species could replace or become dominant in the area by suppressing other species (Altay et al., 2010). Consequently, native species may go extinct or habitats may become monotypic, which result in destruction of ecosystem processes.

In urban planning, under the ecological perspective, one of the main principles is to protect natural habitats. Today we are witnessing wrong plantation practices with non-native or exotic plant species in many cities all over the world. These practices affect and change natural habitats in the end. For example, people, who migrate into big cities such as Ankara from rural areas, transport some of their rural area plants (e.g. fruit and vegetable plants). Consequently, although urban flora becomes richer, natural flora becomes affected negatively from these plants and eventually neutrality is lost. The following plant taxa can be given as good examples for this situation; *Platycladus orientalis*, *Eucalyptus* L'Hér. spp. *Ficus carica*, *Cucurbita* L. spp., *Robinia pseudoacacia*, *Juglans regia*. In some cases, this situation may be just the opposite; for instance, sometimes immigrants may consume some species in cities (e.g. *Hypericum perforatum*, *Euphorbia helioscopia*, *Chenopodium album*, etc.) for their ethnobotanical uses and ultimately this may cause a decrease of the population of these plants (Altay et al., 2010).

The concept of open-green space per capita is calculated by dividing the all green patches of the city into the total population of the city and it is expressed by "m²". It is an important criterion for understanding how much of the green space demands of inhabitants are met. In developed countries, green space per capita varies based on the topography and different socioeconomic structures of the cities. Some of them are as follows; U.S.A. 100 m², Russia 60 m², England 70-80 m², France 60 m². In Turkey, on district scale it is designated as 10 m² by regulations (Regulation on the Construction of Spatial Plans, 2014). In this study area, green space per capita has been in an increasing trend over the years. Notwithstanding about 8 m² green space per capita, it does not match the values which are designated by regulations. Besides such values and numbers, the quality of green spaces is also very important. In the district, it was observed that suitability for use of green spaces is not functional. Urban transformation projects have been started in the city in the last few years and it still continues. It could be a big opportunity for the district to restore green spaces and gain functionality to these areas.

One of the reasons of urban heat islands is the surface area of buildings that absorb the heat. As it is known; vertical gardens and green roof practices prevent buildings from overheating. In the study area, although there were not so many examples, just a few of them were observed. The plantation on roofs and such kind of surfaces is an important issue. The determination of the species to be used for that purpose is another important matter as well. Species should be resistant to exhaust gases, drought and other stress factors. For this purpose, these species are good examples in the research area; *Berberis thunbergii*, *Hedera helix*, *Euonymus fortunei*, *Parthenocissus quinquefolia*.

This study clarifies the dramatic decrease of indigenous species, the increase of exotic and non-native species and the establishment of new ecotypes of the study area. As a result, the environment we live in must meet the needs of future generations as much as it meets the needs of people today. We must adopt sustainable policies and practices in order to leave a more livable environment for future generations as the protectors of the environment we live in.

Acknowledgements

The authors thank to Ms. Seval Çelik and Mr. Mustafa Erdem for checking the language of the document.

References

- Abrams, L. (1917). Flora of Los Angeles and vicinity. Stanford, CA : Stanford University.
- Akaydin, G., Erik, S. (2002). Flora of Ankara city. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 31, 35-93.
- Akman, Y., Ketenoglu, O. (1987). Vejetasyon ekolojisi (Vegetation ecology). Ankara: Ankara University, Faculty of Science.
- Akyurek, B., Duru, M., Sutcu, Y. F., Papak, I., Saroglu, F., Pehlivan, N., Gonenç, O., Granit, S., Yasar, T. (1997). Scale 1/100,000 geological maps of Turkey. MTA Report, No. 55.
- Altay, V., Özyigit, İ. İ., Yarci, C. (2010). Urban flora and ecological characteristics of the Kartal District (Istanbul): A contribution to urban ecology in Turkey. Scientific Research and Essay, 5(2), 183-200.
- Altay, V., Özyigit, İ. İ., Yarci, C. (2012). Plant communities in urban habitats of Istanbul-Turkey. Pakistan Journal of Botany, 44, 177-186.
- Antipina, G. S. (2003). Urban Flora as a component of the urban ecosystems in the taiga zone: an example of karelian cities. Russian Journal of Ecology, 34(4), 215-218.
- Bailey, L. H. (1949). Manual of cultivated plants (Revised Edition). New York: The Macmillan Company.
- Böcker, R., Auhagen, A., Brockmann, H., Kowarik, I., Scholz, H., Sukopp, H., Zimmermann, F. (1991). Liste der wildwachsenden Farn- und Blütenpflanzen von Berlin (West) [List of the wild-growing ferns and flowering plants of (west) Berlin]. In A. Auhagen, R. Platen & H. Sukopp (Eds.), Rote Listen der gefährdeten Pflanzen und Tiere in Berlin 1990 [Red lists of endangered plants and animals in Berlin 1990]. Landschaftsentwicklung und Umweltforschung, 6, 57-88.
- Brandes, D. (2001). Urban flora of Sousse (Tunisia). Botanisches Institut und Botanischer Garten der TU Braunschweig.
- Burton, R. M. (1983). Flora of the London area. London: London Natural History Society.
- Chocholoušková, Z., Pyšek, P. (2003). Changes in composition and structure of urban flora over 120 years: a case study of the city of Plzeň. Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 198(5), 366-376.
- Çelik, M., Taştekin, M., Kayabali, K. (2007). An investigation of the surface and groundwater leachate from an old waste disposal site at Mamak, Ankara, Turkey. Int. J. Environment and Pollution, 30(3-4), 548-560.
- Daşkın, R. G., Kaynak, G. (2006). Bursa şehir florası (The synanthropic flora of Bursa). Ot Sistematik Botanik Dergisi, 13(1), 125-158.
- Davis, P. H. (Ed.) (1965-1985). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 1-9. Edinburgh: Edinburgh University Press.

- Davis, P. H., Mill, R. R., Tan, K. (Eds.) (1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, supplement 1. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Eskin, B., Altay, V., Özyiğit, İ. İ., Serin, M. (2012). Urban vascular flora and ecologic characteristics of the Pendik District (Istanbul-Turkey). *African Journal of Agricultural Research*, 7(4), 629-646.
- García-de-Lomas, J., Cózar, A., Dana, E. D., Hernández, I., Sanchez-García, I., García, C. M. (2010). Invasiveness of *Galenia pubescens* (Aizoaceae): A new threat to Mediterranean-climate coastal ecosystems. *Acta Oecologica*, 36(1), 39-45.
- Google Earth Pro (2016). In Google. Retrieved June 1, 2016, from <https://www.google.com.tr/intl/tr/earth/>.
- Governorship of Ankara (2016). In Governorship of Ankara. Retrieved February 4, 2016, from <http://www.ankara.gov.tr/mamak>.
- Göktürk, R. S., Sümbül, H. (1997). Flora of Antalya City. *Turkish Journal of Botany*, 21, 341-378.
- Graham, J. (1839). *A catalogue of the plants growing in Bombay and its vicinity; spontaneous, cultivated or introduced, as far as they have been ascertained*. Bombay: Government Press.
- Guaglianone, R. (1980). Algunas hierbas espontáneas en los espacios verdes de la ciudad de Buenos Aires [Some spontaneous weeds in the green spaces of the city of Buenos Aires]. Buenos Aires: Municipalidad de la Ciudad de Buenos Aires, Secretaría de Educación.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M. T. (Eds.) (2012). *Türkiye bitkileri listesi (damarlı bitkiler) [Turkish plant list (vascular plants)]*. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.
- Güner, A., Ekim, T., Başer, K. H. C. (Eds.) (2000). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, supplement 2. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Gürcan, B., Düşen, O. (2015). The flora of Denizli city. *Biological Diversity and Conservation*, 8(2), 92-113.
- He, S. Y. (1992). *Beijing zhi wu zhi [Flora of Beijing]* (2nd ed., 2 vols.). Beijing: Beijing chu ban she: Xin hua shu dian Beijing fa xing suo fa xing.
- Jones, D., Jones, B. (1999). *Native plants of Melbourne and adjoining areas: a field guide*. Hawthorn, Victoria: Bloomings Books.
- Karakuş, H., Türkmen, N. (2011). Adana kent içi park ve cadde kenarlarında yetişen bitkilerin floristik özellikleri (floristic characteristics of plants species growing in the park and street edges in Adana city). *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 26(3), 57-64.
- Kaya, E., Varol, Ö., Aytepe, H. A. (2008). Urban flora of Muğla (Muğla, Turkey). *Fl. Medit.*, 18, 127-148.
- Kowarik, I. (1992). Einführung und ausbreitung nichteinheimischer gehölzarten in Berlin und Brandenburg und ihre folgen für flora und vegetation. Berlin: Botanischer Verein, 1-188.
- Mamak Municipality. (2016). *Mamak district green areas inventory*. Ankara: Directorate of Parks and Gardens.
- Maurer, U., Peschel, T., Schmitz, S. (2000). The flora of selected urban land-use types in Berlin and Potsdam with regard to nature conservation in cities. *Landscape and Urban Planning*, 46(4), 209-215. [https://doi.org/10.1016/S0169-2046\(99\)00066-3](https://doi.org/10.1016/S0169-2046(99)00066-3)
- Regulation on the Construction of Spatial Plans. (2014). *Official Gazette of the Republic of Turkey*, 29030, 14.06.2014.
- Ministry of Food, Agriculture and Livestock. (2015). *The presence of Ankara province land*. Ankara: General Directorate of Agricultural Reform, 3-53.
- Osma, E., Özyiğit, İ. İ., Altay, V., Serin, M. (2010). Urban vascular flora and ecological characteristics of Kadıköy district, Istanbul, Turkey. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 4(01), 64-87.
- Pyšek, P. (1998). Alien and native species in Central European urban floras: a quantitative comparison. *Journal of Biogeography*, 25(1), 155-163.
- Pyšek, A., Pyšek, P. (1988). Ruderální flóra Plzne [Ruderal flora of the city of Plzen]. *Príroda*, 68, 1-34.
- Rapoport, E., Díaz-Betancourt, M. E., López-Moreno, I. R. (1983). Aspectos de la ecología urbana en la ciudad de México : flora de las calles y baldíos [Aspects of the urban ecology in the city of Mexico: flora of the streets and wastelands]. México: Editorial Limusa.
- Shaltout, K. H., El-Sheikh, M. A. (2002). Vegetation of the urban habitats in the Nile Delta region, Egypt. *Urban Ecosystems*, 6(3), 205-221.
- Sukopp, H. (2004). Human-caused impact on preserved vegetation. *Landscape and Urban Planning*, 68(4), 347-355.
- Sukopp, H., Weiller, S. (1988). Biotope mapping and nature conservation strategies in urban areas of the Federal Republic of Germany. *Landscape and Urban Planning*, 15(1-2), 39-58.
- Tarakçı, S., Altay, V., Keskin, M., Sümer, S. (2012). Beykoz ve çevresi (İstanbul)'nin kent florası (urban vascular flora of Beykoz (Istanbul) and its surroundings). *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 2(7), 47-66.
- The IUCN Red List of Threatened Species (2017). In IUCN. Retrieved July 10, 2017, from <http://www.iucnredlist.org/>.
- The Plant List (2017). In The Plant List. Retrieved July 10, 2017, from <http://www.theplantlist.org/>.
- Turkish State Meteorological Service. (2016). *Ankara Climate Data*. Ankara: Meteorological Data Processing Department.
- Van der Veken, S., Verheyen, K., Hermy, M. (2004). Plant species loss in an urban area (Turnhout, Belgium) from 1880 to 1999 and its environmental determinants. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 199(6), 516-523.
- Wheater, C. P. (2002). *Urban Habitats*. USA: Routledge. Taylor & Francis e-Library.
- Wittig, R., Diesing, D., Gödde, M. (1985). Urbanophob - urbanoneutral - urbanophil das verhalten der arten gegenüber dem Lebensraum Stadt. *Flora*, 177(5-6), 265-282.
- Zerbe, S., Maurer, U., Schmitz, S., Sukopp, H. (2003). Biodiversity in Berlin and its potential for nature conservation. *Landscape and Urban Planning*, 62(3), 139-148.

(Received for publication 12 December 2017; The date of publication 15 August 2018)



Investigation of the antifungal activity of some epiphytic and terricolous lichen extracts

Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ *¹, Meral YILMAZ CANKILIÇ ¹, Mehmet CANDAN ¹

¹Department of Biology, Faculty of Sciences, Anadolu University, Eskişehir, Turkey

Abstract

Antifungal activity of two terricolous (*Cetraria aculeata*, *Cladonia foliacea*) and four epiphytic (*Parmelia sulcata*, *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea*, *Ramalina farinacea* and *Tornabea scutellifera*) lichens were investigated by using acetone, methanol and chloroform extracts against five fungal pathogens: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani* and *Alternaria brassicicola*. The microbroth dilution method was used for minimal inhibitory concentration (MIC) values of the lichen extracts. The MIC values of the lichen extracts were determined ranging from 156.25 to 1250 µg/ml for tested fungi. Generally, all of the lichen extracts showed the strong antifungal activity. *F. moniliforme* and *A. brassicicola* were the most sensitive fungal species against the lichen extracts, whereas *A. fumigatus* was the most tolerant pathogenic fungus.

Key words: : antifungal activity, lichen extracts, pathogenic fungi

----- * -----

Bazı epifitik ve terrikol liken ekstraktlarının antifungal aktivitesinin araştırılması

Özet

İki terrikol (*Cetraria aculeata*, *Cladonia foliacea*) ve dört epifitik (*Parmelia sulcata*, *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea*, *Ramalina farinacea* ve *Tornabea scutellifera*) likenin aseton, metanol ve kloroform ekstraktlarının *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani* ve *Alternaria brassicicola* fungal patojenlerine karşı antifungal aktivitesi incelenmiştir. Liken ekstraktlarının minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerinin belirlenmesinde mikrobroth dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Liken ekstraktlarının MİK değerlerinin, test edilen funguslar için 156.25 ila 1250 µg/ml aralığında değiştiği belirlenmiştir. Genel olarak, liken ekstraktlarının tamamı güçlü antifungal aktivite göstermiştir. *F. moniliforme* ve *A. brassicicola* liken ekstraktlarına karşı en duyarlı fungal türler olarak belirlenirken, *A. fumigatus* en dirençli patojen fungus olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: antifungal aktivite, liken ekstraktları, patojenik funguslar

1. Introduction

Lichens are symbiotic organisms consisting of fungi, algae and/ or cyanobacteria. They produce various secondary metabolites known as lichen substances, are mostly low molecular weight and generally insoluble in water but can be extracted into organic solvents. Their secondary metabolites have a wide various biological activities such as antibacterial, antifungal, antiviral, antiprotozoal, antiherbivore, antimutagenic, antitumor, antioxidant, antiulcerogenic, antiinflammatory, antiproliferative, antipyretic, analgesic (Kosanić and Ranković, 2011; Mitrović et al., 2011; Xu et al., 2016).

Plant pathogenic fungi cause huge economic loss worldwide by destroying crops in the field and during storage in agriculture and the food industry (Goel et al., 2011; Song et al., 2017). Numerous environmental and human health problems are caused by synthetic chemicals used for control of these pathogenic fungi in agriculture (Halama and Van Haluwin, 2004). Natural products obtained from plants, bacteria, fungi, lichens etc. have been proposed as potential alternatives to synthetic fungicides for control of pre- and postharvest diseases. Environmentally safe, biodegradable

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902223350580; Fax.: +902223350585; E-mail: nalany@anadolu.edu.tr

and economical compounds obtained from natural origin can be ideal candidates for use as agrochemicals (Goel et al., 2011).

There are only a few reports on antifungal activities of lichens from Turkey (Aslan et al., 2006; Güllüce et al., 2006; Türk et al., 2006; Candan et al., 2007; Karabulut and Öztürk, 2015; Yılmaz Cankılıç et al., 2017; Bilgin Sökmen et al., 2018). The aim of the present study is to investigate antifungal activity of the acetone, methanol and chloroform extracts of the lichens *Cetraria aculeata*, *Cladonia foliacea*, *Parmelia sulcata*, *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea*, *Ramalina farinacea* and *Tornabea scutellifera* against five plant pathogenic fungi.

2. Materials and methods

2.1. Lichen samples

The lichen samples were collected from as follows; *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr., Bozdağ Eskişehir; *Cladonia foliacea* (Huds.) Willd., Bozdağ-Eskişehir; *Parmelia sulcata* Taylor, Bozdağ-Eskişehir; *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea* (L.) Zopf., Mihaliççık-Eskişehir; *Ramalina farinacea* (L.) Ach., Bozdağ-Eskişehir and *Tornabea scutellifera* (With.) J.R. Laundon, Çevrepınar mountain-Kahramanmaraş (Figure 1). The samples were identified using standard keys (Smith, 2009; Wirth, 2013). The lichen specimens were deposited in the Department of Biology, Herbarium of Anadolu University (ANES), Eskişehir, Turkey.

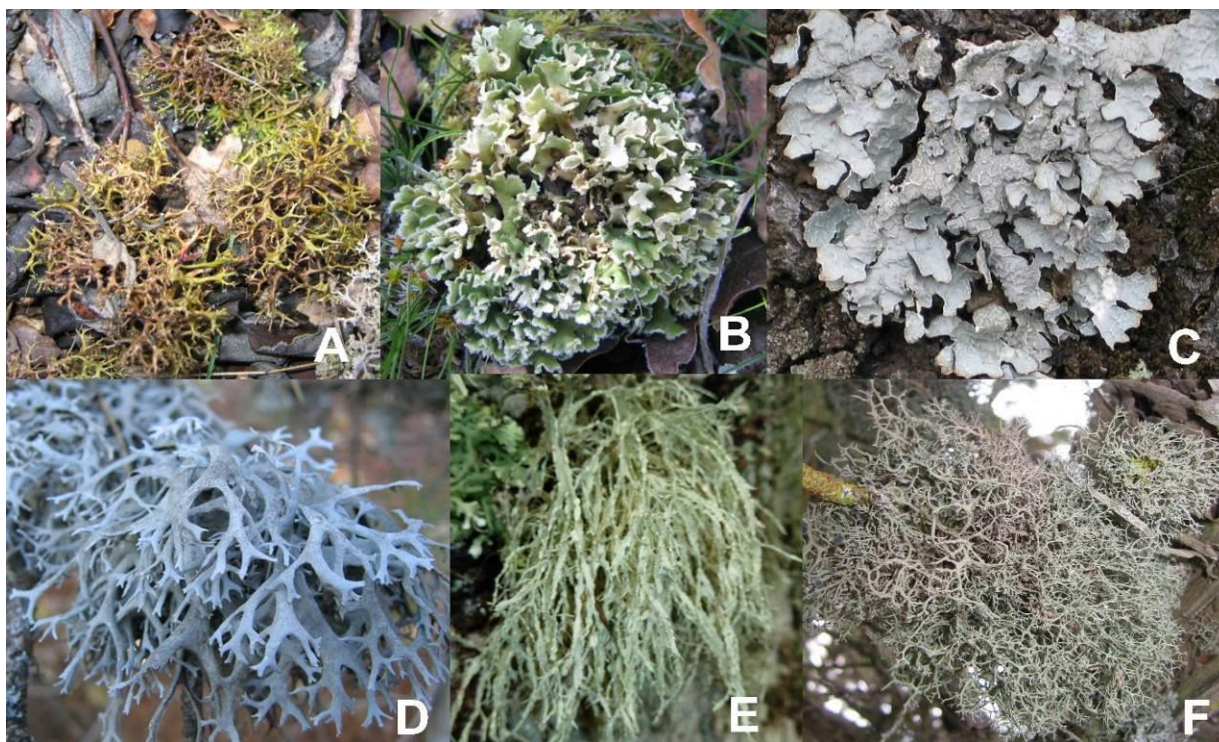


Figure 1. Lichen samples: A. *Cetraria aculeata*, B. *Cladonia foliacea*, C. *Parmelia sulcata*, D. *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea*, E. *Ramalina farinacea*, F. *Tornabea scutellifera*.

2.2. Preparation of the lichen extracts

Air-dried and ground thalli of the lichen samples (10 g) were extracted in 100 ml of acetone, methanol and chloroform using ultrasonic bath for 30 min, then left at room temperature overnight and filtered. Then the extracts concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator. The dry extracts were stored at 4 °C.

2.3. Microorganisms and media

Five fungal strains were used in this study: *Aspergillus fumigatus* NRRL 113, *Aspergillus parasiticus* NRRL 465, *Alternaria brassicicola*, *Fusarium moniliforme* NRRL 2374 and *Fusarium solani*. The strains obtained from our laboratory. Fungal test cultures were grown on Potato Dextrose agar (PDA) at 25 °C for 5-7 days.

2.4. Antifungal activity

Minimal inhibitory concentration (MIC) of the lichen extracts was determined by microbroth dilution method using 96-well microtiter plate (Winn, 2006; CLSI, 2008). The extracts were dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) and two-fold dilutions prepared from 10 mg/mL to 19.53 µg/mL concentrations in double-strength Potato Dextrose broth (PDB). Fungal cultures were grown on PDA at 25 °C for 5-7 days. The suspensions of fungal spores were prepared using sterile 0.1% Tween 80 and standardized to about 10⁶ colony forming unit / ml (CFU/ml). Ketoconazole used as a positive control of the fungal growth inhibition. As a negative control DMSO solution was used for the influence of the solvents. The microplates were incubated at 25 °C for 5-7 days. Antifungal activity was determined with stereo microscope by investigation of mycelia growing. MIC defined as the lowest concentration that inhibited fungal growth. All experiments were performed in duplicate.

3. Results

The antifungal activities of the acetone, methanol and chloroform extracts of *C. aculeata*, *C. foliacea*, *P. sulcata*, *P. furfuracea* var. *furfuracea*, *R. farinacea* and *T. scutellifera* against the tested five filamentous fungi were investigated and results are shown in Table 1. The antifungal activity of the lichens extracts were determined by the microbroth dilution method. The MIC values of the lichen extracts were found ranged from 156.25 to 1250 µg/ml for tested fungi.

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MIC) of acetone, methanol and chloroform extracts of *C. aculeata*, *C. foliacea*, *P. sulcata*, *P. furfuracea* var. *furfuracea*, *R. farinacea* and *T. scutellifera* against selected fungi

Lichens	Lichen extracts	Filamentous fungi				
		<i>A. fumigatus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. brassicicola</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>
<i>Cetraria aculeata</i>	A ^a	625 ^b	625	156.25	156.25	1250
	M	625	625	156.25	156.25	1250
	C	625	312.50	156.25	156.25	625
<i>Cladonia foliacea</i>	A	625	625	156.25	156.25	625
	M	1250	625	312.50	156.25	625
	C	1250	625	156.25	156.25	625
<i>Parmelia sulcata</i>	A	625	625	156.25	156.25	625
	M	625	312.50	156.25	156.25	312.50
	C	625	312.50	156.25	156.25	312.50
<i>Pseudevernia furfuracea</i> var. <i>furfuracea</i>	A	625	312.50	156.25	156.25	312.50
	M	625	312.50	156.25	156.25	156.25
	C	1250	625	156.25	156.25	156.25
<i>Ramalina farinacea</i>	A	312.50	625	156.25	156.25	625
	M	625	625	156.25	156.25	156.25
	C	625	625	156.25	156.25	625
<i>Tornabea scutellifera</i>	A	625	625	156.25	156.25	1250
	M	625	625	156.25	156.25	625
	C	625	625	312.50	156.25	625
Antifungal (standard)						
Ketoconazole		78.12	78.12	78.12	39.06	39.06

^a A: acetone extract; M: methanol extract; C: chloroform extract

^b Minimum inhibitory concentration (µg/ml)

The acetone extracts of *R. farinacea* showed the stronger antifungal activity against *A. fumigatus* with an MIC value of 312.50 µg/ml than the other tested lichen extracts. The methanol and chloroform extracts of the lichen *P. furfuracea* var. *furfuracea* and methanol extracts of *R. farinacea* exerted the stronger antifungal activity against *F. solani* than the other lichens extracts with an MIC value of 156.25 µg/ml.

All the lichen extracts showed same activity against to *F. moniliforme* and *A. brassicicola* with an MIC value of 156.25 µg/ml except methanole extract of *C. foliacea* and acetone extract of *T. scutellifera*. Generally, *A. fumigatus* was the most resistant fungi against the lichen extracts. *F. moniliforme* and *A. brassicicola* were the most sensitive fungi among the fungal species by lichen extracts.

Candan et al. (2007) investigated the antimicrobial activities of acetone, chloroform, diethyl ether, methanol, and petroleum ether extracts of the lichen *P. sulcata* and its salazinic acid constituent, and all of the extracts except of the petroleum ether extract showed antimicrobial activity against tested bacteria, yeasts and filamentous fungi including *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, and *Penicillium notatum*. In the present study, the methanol and chloroform extracts of *P. sulcata* showed significantly antifungal activity among the test fungi ranged from 156.25 to 625 µg/ml.

Türk et al. (2006) reported antifungal activity of some extracts of *P. furfuracea* var. *furfuracea* against tested filamentous fungi. All the extracts showed antifungal activity against *Alternaria alternata*, *Ascochyta rabiei*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, and *Penicillium notatum*. We determined the most strongest antifungal activity on *F. moniliforme*, *F. solani* and *A. brassicicola* for extracts of *P. furfuracea* var. *furfuracea*.

Ranković et al. (2007) reported antifungal activity on *A. fumigatus* with an MIC value of 25 mg/ml for acetone and methanol extracts of *P. sulcata*. Kosanić et al. (2013) find an antifungal activity for the acetone extract of the lichen *P. furfuracea* against same fungus with an MIC value of 12.5 mg/ml. In our study, we determined more activity than their results using acetone and methanol extracts of same lichen against *A. fumigatus* with an MIC value 625 µg/ml (Table 1).

In a similar study, Karabulut and Öztürk (2015) was reported that ethyl alcohol extracts of *Evernia prunastri*, *P. sulcata* and *P. furfuracea* var. *furfuracea* showed a significant inhibition against mycelia and spor growth of *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium expansum* and *Rhizoctonia solani*.

4. Conclusions and discussion

The extracts of *C. aculeata*, *C. foliacea*, *P. sulcata*, *P. furfuracea* var. *furfuracea*, *R. farinacea* and *T. scutellifera* were exhibited significantly antifungal activity against tested pathogenic fungi. Future studies should be done to search bioactive compounds responsible for antifungal effects in the lichen extracts. Our results indicated these lichen extracts can be used as natural antifungals especially against some plant pathogenic fungi in future.

Acknowledgements

The financial support for this study was provided by Anadolu University, Research Project 1705F336.

References

- Aslan, A., Güllüce, M., Sökmen, M., Adigüzel, A., Sahin, F., Özkan, H. (2006). Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Evernia divaricata*, *Evernia prunastri* and *Neofuscelia pulla*. *Pharmaceutical Biology*, 44, 247-252.
- Bilgin Sökmen, B. Kınalıoğlu, K., Aydın, S. (2018). Evaluation of antifungal potentials and antioxidant capacities of some foliose lichen species. *Süleyman Demirel University Journal of Natural and Applied Sciences*, 22, 148-152.
- Candan, M., Yılmaz, M., Tay, T., Erdem, M., Özdemir Türk, A. (2007). Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Parmelia sulcata* and its salazinic acid constituent. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62, 619-621.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2008). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. CLSI document M38-A2. Clin Lab Stand Inst (2nd ed.).
- Goel, M., Dureja, P., Rani, A., Uniyal, P.L., Laatsch, H. (2011). Isolation, characterization and antifungal activity of major constituents of the Himalayan lichen *Parmelia reticulate* Tayl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2299-2307.
- Güllüce, M., Aslan, A., Sokmen, M., Sahin, F., Adigüzel, A., Agar, G., Sokmen, A. (2006). Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nyländeriana*. *Phytomedicine* 13, 515-521.
- Halama, P., Van Haluwin, C. (2004). Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *BioControl*, 49, 95-107.
- Karabulut, G., Ozturk, S. (2015). Antifungal activity of *Evernia prunastri*, *Parmelia sulcata*, *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea*. *Pakistan Journal of Botany*, 47, 1575-1579.
- Kosanić, M., Manojlović, N., Janković, S., Stanojković, T. Ranković, B. (2013). *Evernia prunastri* and *Pseudevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 112-118.

- Kosanić, M., Ranković, B. (2011). Antibacterial and antifungal activity of different lichens extracts and lichen acid. *Research Journal of Biotechnology*, 6, 23-26.
- Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević, I., Stefanović, O., Čomić, L., Dačić, D., Ćurčić, M., Marković, S. (2011). Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5428-5448.
- Ranković, B., Mišić, M., Sukdolak, S. (2007). Evaluation of antimicrobial activity of the lichens *Lasallia pustulata*, *Parmelia sulcata*, *Umbilicaria crustulosa* and *Umbilicaria cylindrica*. *Microbiology*, 76, 723-727.
- Smith, C.W., Aptroot, A., Coppins, B.J., Fletcher, A., Gilbert, O.L., James, P.W., Wolseley, P.A. (2009). *The Lichens of Great Britain and Ireland*. 2nd ed. London: The British Lichen Society.
- Song, P.P., Zhao, J., Liu, Z.L., Duan, Y.B., Hou, Y.P., Zhao, C.Q., Wu, M., Wei, M., Wang, N.H., Lv, Y., Han, Z.J. (2017). Evaluation of antifungal activities and structure-activity relationships of coumarin derivatives. *Pest Management Science*, 73, 94-101.
- Türk, H., Yılmaz, M., Tay, T., Özdemir Türk, A., Kıvanç, M. (2006). Antimicrobial activity of extracts of chemical races of the Lichen *Pseudevernia furfuracea* and their physodic acid, chloroatranorin, atranorin, and olivetoric acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61, 499-507.
- Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E.W., Procop, G.W., Schreckenberger, P.C., Woods, G.L. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th ed. Baltimore and Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Wirth, V., Hauck, M., Schultz, M. (2013). *Die Flechten Deutschlands*. Stuttgart: Ulmer.
- Xu, M., Heidmarsson, S., Olafsdottir, E.S., Buonfiglio, R., Kogej, T., Omarsdottir, S. (2016). Secondary metabolites from cetrarioid lichens: Chemotaxonomy, biological activities and pharmaceutical potential. *Phytomedicine*, 23, 441-459.
- Yılmaz Cankılıç, M., Yılmaz Sariözlü, N., Candan, M., Tay, T. (2017). Screening of antibacterial, antituberculosis and antifungal effects of lichen *usnea florida* and its thamnolic acid constituents. *Biomedical Research*, 28, 3108-3113.

(Received for publication 19 December 2017; The date of publication 15 August 2018)



Flora of gypsiferous and marl soils in Eskisehir (Turkey)

Derviş ÖZTÜRK^{*1}, Okan SEZER¹, Onur KOYUNCU¹, Atila OCAK¹

¹ Biology Department, Art and Science Faculty, Eskişehir Osmangazi University, 26480, Meşelik, Eskişehir-Turkey

Abstract

The investigation area covers areas with gypsum and marl soils located within the borders of Eskişehir. According to Davis' squaring system, a large part of the research area is located on the B3 surface. 1750 samples were collected from the research area between 2012 and 2015 for the determination of florana. The APG III system was monitored while preparing the floristic list. As a result of the diagnoses made; 354 genus belonging to 72 families, 673 species and total 738 taxa were identified. Of the plant samples that were diagnosed, 738 taxa belong to the Spermatophyta divisosus. 42% (5,6%) of the total taxa in the area are Mediterranean, 152 (20.6%) Iranian-Turanian, 38 (5.1%) Euro-Siberian element, 27 (3.6%) E. Mediterranean elements and 478 (64,7%) are multi-regional or phytogeographic regions of unknown taxa. 129 (17.5%) endemic taxa were found in the research area.

Key words: B3 square , Eskişehir , Gypsum , Marl , Flora

----- * -----

Eskişehir'deki jipsli ve marnlı toprakların florası

Özet

Araştırma alanı Eskişehir sınırları içerisinde yer alan jipsli ve marnlı toprakların bulunduğu alanları kapsamaktadır. Davis'in kareleme sistemine göre araştırma alanının büyük bir bölümü B3 karesinde yer almaktadır. Floranın belirlenmesi için 2012-2015 yılları arasında araştırma alanından 1750 örnek toplanmıştır. Floristik liste hazırlanırken APG III sistemi izlenmiştir. Yapılan teşhisler sonucunda; 72 familyaya ait 354 cins, 673 tür ve toplam 738 takson tespit edilmiştir. Teşhisi yapılan bitki örneklerinden 738 takson Spermatophyta divizyonuna aittir. Alandaki toplam taksonların 42'si (% 5.6) Akdeniz elementi, 152'si (% 20.6) İran-Turan elementi, 38'i (% 5.1) Avrupa-Sibirya elementi, 27'si (% 3.6) D. Akdeniz elementi ve 478'i (% 64.7) çok bölgeli veya fitocoğrafik bölgesi bilinmeyen taksonlardır. Araştırma alanında 129 (% 17.5) endemik takson bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: B3 karesi, Eskişehir, jips, marn, flora

1. Introduction

The Study area is located in Eskişehir in the Northwest Central Anatolian Region between 29°58' and 32°04' Eastern longitudes and 39°06' and 40°09' Northern latitudes. According to the Grid System set by P. H. Davis (1965) for Eskişehir province, a large part is located in B3, a small part in south-east is located in B4, and a small part in north is located within A3 square (Figure 1). According to this system, The study area is within the square of B3. The study area Eskişehir is neighboring Bolu in the north, Ankara in the east, Afyon and Konya in the south, Kütahya in the west and Bilecik in the northwest (Report, 2011).

Gypsum is a mineral and its chemical composition is calcium sulfate. The type whose compound has two molecules of crystal water is called gypsum ($\text{CaSO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$) (Özdeniz et al., 2016). It is a mixture consisting naturally of marn, clay and calcium carbonate at various proportions (Akpulat and Celik, 2005). When the amount of calcium carbonate is more than clay, it is called limestone. Gypsiferous and gypsiferous-marn type bedrocks are very suitable for the settlement of endemic species (Akman et al., 2014).

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902222393750; Fax.: +902222393750; E-mail: dervisozturkk@gmail.com

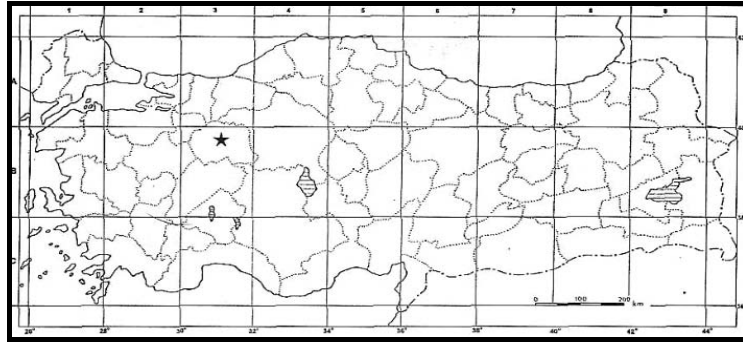


Figure 1. The Map of Turkey according to the Grid System of P. H. Davis (1965)

Gypsum outcrops are widely distributed globally and strongly affect the flora that grows on them. In fact, many plant species only grow on this type of rock (García, F,J,P., et al. 2018). Gypsum soils show a suite of chemical and physical properties that render them particularly restrictive for plant life (Bolukbasi et al.,2016).

This study was conducted to emphasize the importance of edaphic and geological isolation in terms of floristic diversity and endemism. Some of the important reasons of floristic diversity of Turkey are the intense endemism that develops from edaphic and geological rocks; and is explained by the term “geological island”; and such areas are called “geological island” or “edaphic island”. The main factors affecting the diversity of the species in the areas where gypsophila live are electrical conductivity, soil pH and soil anion and cation concentrations (Smith, H. W., & Weldon, M. D., 1941). These factors also determine the degree of influence of the biotic factors (Akman et al., 2014). In the context of the study, gypsiferous soils in Eskişehir and the vegetation cover, species diversity and ecological effects were determined (Türe, C. 2000). In the present study, the aim is to complete the lack of literature data on gypsiferous soils and plant cover in Eskişehir. It has been determined that some local floristic studies have been conducted around the study area (Özaydın and Yücel, 2004; Umay and Uğurlu, 2010; Özgişi et al., 2015).



Figure 2. Study area map

2. Materials and methods

In the study area, a total of 1750 samples were collected from 56 different fields which coincided with the vegetation period in all seasons of the year between 2012 and 2015. It was cared to collect at least three samples for each species together with organs like roots, leaves, flowers and fruits as much as possible. The localities of the samples collected in the field work were identified with the Garmin GPS device and the photographs were taken with Canon D5300 brand camera. The samples that were collected were pressed and dried in line with the relevant rules (Seçmen et al., 2004). The stations where the samples were collected were numbered and the altitude, locality, habitat, date, and latitude-longitude coordinates (GPS) of the area were noted in the land register. Although the determination of the samples was made on materials that were not dried during field works, it was mostly made on the materials dried in the laboratory environment. Olympus brand binocular stereo microscopes were used during the diagnoses. Several studies were made use of during the diagnoses of the plants that were collected like the Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Davis, 1965-1988), Flora Europae (Tutin, 1965-1980), Flora Palaestina Vol. I-II (Zohary, 1966-1987), Flora Palaestina Vol. III-IV (Freibrun-Dothan, 1977-1986), Ankara City Flora (Erik, S. 1993), List of Turkey Plants (Vascular Plants) (Güner et al., 2012). Eskişehir Osmangazi University (OUFE) herbarium was used in the diagnosis of some of the collected samples which were difficult to control and name. In some of the samples that were difficult to

diagnose, experts of the area were consulted. After the naming, all the samples that were made into herbarium material were placed in the Herbarium Center of the Eskişehir Osmangazi University Science and Literature Faculty (OUFE).

When the floristic findings were given, they were based on APG III, and the families were arranged in accordance with the evolutionary sequence given in the “Linear Angiosperm Phylogeny Group (APG III): A Linear Sequence of the Families in APG III” (Haston et al., 2009). Since there is no evolutionary classification made according to the APG System in terms of genus, species and subspecies, the subfamily categories were listed in alphabetical order. In writing the floristic list, the names of the family and species and the subspecies taxon names were written in bold and italic (Yeşilyurt et al., 2008). The locality data of the taxa whose localities were given in front of the floristic list were numbered in box brackets. The endemism status of the species, the defined phytogeographical regions and the collective numbers were also given.

3. Results

A total of 56 days of field work was carried out in the study area from March 2012 to October 2015. As a result of the field work, 1750 samples were collected; and as the result of the diagnoses, it was determined that there were 354 genera of 72 families and 738 species and subspecies taxa of these species. Of the families identified, 69 were Angiosperm, 3 were Gymnosperm, and 60 of the Angiosperm were dicotyl 9, which is Monocotyledon. 351 of the species are Angiosperm, 3 are Gymnosperm. 329 of the species are dicotyledonous, 22 are monocotyledonous. Of the identified taxa, 152 belong to Iranian Turan, 42 to Mediterranean, 27 to E. Mediterranean, 38 to Siberia and 1 to Black Sea phytogeographical regions and 478 to phytogeographical regions are unknown or very regional (Table 3). Up to now 129 endemic taxa have been identified in the region and the endemism rate is approximately 17.5%. 4 of endemic taxa are in EN, 3 in VU, 1 in CR, 3 in NT and 36 in LC category.

PINACEAE

Pinus nigra J.F. Arnold subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe [33], 15.10.2014, OUFE: 20200.

CUPRESSACEAE

Juniperus excelsa M.Bieb. [141], 15.04.12, OUFE: 20071.

J. oxycedrus L. [15], 07.08.13, OUFE: 20072.

EPHEDRACEAE

Ephedra major Host [3], 18.5.13, OUFE: 19945.

ARISTOLOCHIACEAE

Aristolochia maurorum L. [30], 10.07.13, OUFE: 19707.

A. pallida Willd. [161], 18.05.12, OUFE: 19708.

ARACEAE

Arum elongatum Steven [76], 26.06.15, OUFE: 19715.

COLCHICACEAE

Colchicum atticum Spruner ex Tommas (Syn: *Merendera attica* (Spruner ex Tommas.) Boiss. & Spruner) [49], 26.02.13 D. Akd., OUFE: 19854.

C. burtii Meikle [13], 1.04.15 D. Akd., End., LC, OUFE: 19855.

C. triphyllum Kunze [49], 26.02.13, Akd., OUFE: 19856.

C. umbrosum Steven [137], 23.09.12, Karadeniz, LC, OUFE: 19857.

LILIACEAE

Fritillaria fleischeriana Steud. & Hochst. ex Schult. & Schult.f. [20], 25.04.15, İr.-Tur., End., NT, OUFE: 19982.

Gagea bohémica (Zauschn.) Schult. & Schult.f. [65], 3.05.13, OUFE: 19993.

Gagea fibrosa (Desf.) Schult. & Schult.f. [65], 3.05.13, OUFE: 19994.

Gagea granatellii (Parl.) Parl. [48], 15.04.12, OUFE: 19995.

Gagea peduncularis (C.Presl) Pascher [23], 14.03.15, D.O. 802, OUFE: 19996.

Gagea taurica Steven [48], 14.03.12, OUFE: 19997.

Gagea villosa (M.Bieb.) Sweet [47], 15.04.12, Akd., OUFE: 19998.

Tulipa armena Boiss. var. *lycica* (Baker) Marais [19], 22.04.13, End., LC, OUFE: 20358.

ORCHIDACEAE

Cephalanthera longifolia (L.) Fritsch [23], 27.05.12, Avr.-Sib., OUFE: 19823.

C. rubra (L.) Rich. [17], 7.06.15, OUFE: 19824.

Dactylorhiza romana (Seb.) So'o subsp. *romana* [13], 21.04.14, Akd., OUFE: 19914.

Epipactis helleborine (L.) Crantz [28], 9.07.15, Akd., OUFE: 19914.

Orchis mascula (L.) L. subsp. *mascula* (Boiss. & Kotschy) G. Camus (Syn: *Orchis mascula* subsp. *pinetorum* (Boiss. & Kotschy) G. Camus) [3], 18.05.13 E. Med., OUFE: 20158.

O. purpurea Huds. [13], 21.04.14, Avr.-Sib., OUFE: 20159.

Iridaceae

Crocus ancyrensis (Herb.) Maw [14], 22.02.12, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 19891.

C. chrysanthus (Herb.) Herb. [49], 26.02.13, OUFE: 19892.

C. danfordiae Maw [49], 26.02.13, End., LC, OUFE: 19893.

Crocus flavus subsp. *dissectus* T.Baytop & B.Mathew [49], 26.02.13, OUFE: 19894.

C. olivieri J. Gay [160], 15.04.12, OUFE: 19895.

C. pallasii Goldb. [160], 15.04.12, OUFE: 19896.

Gladiolus atroviolaceus Boiss. [31], 9.07.15, İr.-Tur., OUFE: 20008.

I. kerneriana Asch. & Sint. ex Baker [49], 26.02.13, OUFE: 20064.

I. pumila subsp. *attica* (Boiss. & Heldr.) K.Richt. [134], 23.04.13, OUFE: 20065.

I. schachtii Markgr.

[1], 18.04.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 20067.

AMARYLLIDACEAE

Allium ampeloprasum L. [107], 03.07.13, Akd., OUFE: 19652.

A. atroviolaceum Boiss. [24], 22.07.13, OUFE: 19653.

Allium flavum L. [24], 02.07.13, Akd., OUFE: 19654.

Allium flavum subsp. *tauricum* (Besser ex Rchb.) K.Richt. [23], 22.06.15, Medit.,: 19656.

Allium guttatum Steven [81], 28.06.15, OUFE: 19657.

A. hirtovaginatun Kunth. (Syn: *Allium cupani* subsp. *hirtovaginatun* (Kunth) Stearn) [82], 25.07.15, Medit.,OUFE: 19658.

A. lycanicum Siehe ex Hayek [44], 25.06.15, OUFE: 19659.

Allium pallens L. [62], 03.07.13, OUFE: 19660.

Allium paniculatum L. [44], 23.06.13, OUFE: 19661.

A. rotundum L. (Syn: *Allium scorodoprasum* L. Stearn subsp. *rotundum* (L.) Stearn) [21], 06.06.12, Avr.-Sib., OUFE: 19663.

Allium scorodoprasum L. [21], 06.06.12, OUFE: 19664.

Allium sibthorpiatum Schult. & Schult.f. [18], 23.06.15, OUFE: 19665.

Allium stamineum Boiss. [18], 23.06.15, OUFE: 19666.

Allium wiedemannianum Regel [44], 25.06.15, OUFE: 19667.

Galanthus elwesii Hook.f. [8], 26.02.13 D. Akd., OUFE: 19999.

Xanthorrhoeaceae

Asphodeline taurica (Pall.) Endl. [18], 20.04.14 D. Akd., OUFE: 19721.

ASPARAGACEAE

Asparagus officinalis L. [13], 21.04.14, OUFE: 19716.

Hyacinthella lineata (Steud. ex Schult. & Schult.f.) Chouard

- [25], 25.04.15 D. Akd., End., LC, OUFE: 19716.
- Hyacinthella micrantha* (Boiss.) Chouard [25], 25.04.15, İr.-Tur., End., NT, OUFE: 20050.
- Leopoldia longipes* (Boiss.) Losinsk. (Syn: *Muscari longipes* Boiss.) [13], 10.06.15, İr.-Tur., OUFE: 20085.
- L. tenuiflora* (Tausch) Heldr. (Syn: *Muscari tenuiflorum* Tausch.) [25], 03.06.15, OUFE: 20086.
- Muscari armeniacum* Leichtlin ex Baker [48], 02.05.15, OUFE: 20128.
- M. neglectum* Guss. ex Ten. [15], 28.04.13, OUFE: 20129.
- M. sivrhisardaghlaensis* Yild. & B.Selvi [99], 23.04.13, OUFE: 20130.
- Ornithogalum alpinum* Stapf [89], 03.05.13 D. Akd., End., NT, OUFE: 20161.
- O. comosum* L. [2], 18.05.13, OUFE: 20162.
- O. fimbriatum* Willd. [43], 23.05.12, OUFE: 20163.
- O. montanum* Cirillo [18], 06.06.12 D. Akd., OUFE: 20164.
- O. neurostegium* Boiss. & Blanche [23], 07.06.15, OUFE: 20165.
- O. pyrenaicum* L. [13], 21.04.14, OUFE: 20167.
- O. sigmoideum* Freyn & Sint. [15], 28.04.13, OUFE: 20168.
- O. sphaerocarpum* A.Kern. [15], 23.06.15, OUFE: 20169.
- O. umbellatum* L. [25], 03.06.15, OUFE: 20170.
- Prospero autumnale* (L.) Speta (Syn: *Scilla autumnalis* L.) [17], 25.08.13, Akd., OUFE: 20218.
- Scilla bifolia* L. [23], 22.04.12, Akd., OUFE: 19655.
- POACEAE
- Aegilops cylindrica* Host [44], 09.07.15, İr.-Tur., OUFE: 19632.
- Aegilops geniculata* Roth [25], 07.06.15, ; 19633.
- A. triuncialis* L. [19], 03.06.15, OUFE: 19634.
- Aeluropus litoralis* (Gouan) Parl. [60], 22.06.15, OUFE: 19635.
- Agropyron cristatum* (L.) Gaertn. [21], 03.06.15, OUFE: 19876.
- Alopecurus arundinaceus* Poir. [138], 26.04.15, OUFE: 19668.
- A. gerardii* (All.) Vill. [149], 03.05.15, OUFE: 19669.
- A. myosuroides* Huds. [22], 03.06.15, OUFE: 19670.
- Avena barbata* Pott ex Link [75], 25.08.13, Akd., OUFE: 19757.
- Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng [79], 31.05.15, OUFE: 19769.
- Briza humilis* M.Bieb. [90], 25.06.15, OUFE: 19772.
- B. media* L. [21], 07.06.15, ; 19773.
- Bromus erectus* Huds. [79], 31.05.15, OUFE: 19774.
- B. hordeaceus* L. [90], 03.05.15, OUFE: 19775.
- B. japonicus* Thunb. [19], 03.06.15, OUFE: 19776.
- B. tectorum* L. [21], 03.06.15, OUFE: 19777.
- Calamagrostis pseudophragmites* (Haller f.) Koeler [88], 28.06.15, OUFE: 19788.
- Chrysopogon gryllus* (L.) Trin. [22], 03.06.15, OUFE: 19902.
- Cynodon dactylon* (L.) Pers. [18], 02.07.13, OUFE: 19911.
- Dactylis glomerata* subsp. *hispanica* (Roth) Nyman [20], 02.06.13, OUFE: 19899.
- Elymus hispidus* (Opiz) Melderis subsp. *barbulatus* (Schur) Melderis [17], 07.06.15, OUFE: 19802.
- Echinaria capitata* (L.) Desf. [74], 31.05.15, OUFE: 19935.
- Eremopyrum bonaepartis* (Spreng.) Nevski [16], 03.06.13, OUFE: 19655.
- Festuca arundinacea* Schreb. [19], 03.06.15, OUFE: 19976.
- Festuca valesiaca* Schleich. ex Gaudin [19], 23.06.15, OUFE: 19977.
- Hordeum murinum* L. [20], 02.06.13, OUFE: 20048.
- Koeleria pyramidata* (Lam.) P.Beauv. (Syn: *Koeleria cristata* (L.) Pers.) [18], 02.07.13, OUFE: 19803.
- Lolium multiflorum* Lam. [17], 07.06.15, OUFE: 20098.
- Lolium perenne* L. [17], 07.06.15, Avr.-Sib., OUFE: 20100.
- Melica ciliata* L. [1], 18.05.13, OUFE: 20119.
- Nardus stricta* L. [108], 02.05.15, OUFE: 20113.
- Phleum bertolonii* DC. [66], 18.04.15, OUFE: 20190.
- P. phleoides* (L.) H.Karst. [17], 07.06.15, OUFE: 20191.
- P. pratense* L. [11], 03.06.15, Avr.-Sib., OUFE: 20192.
- Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. [54], 04.08.13, Avr.-Sib., OUFE: 19655.
- Poa alpina* L. [60], 18.04.15, OUFE: 20206.
- P. bulbosa* L. [73], 31.05.15, OUFE: 20207.
- P. compressa* L. [74], 31.05.15, OUFE: 20208.
- P. pratensis* L. [10], 02.07.13, OUFE: 20209.
- Setaria viridis* (L.) P.Beauv. [18], 02.07.13, OUFE: 20273.
- Stipa arabica* Trin. & Rupr. [6], 18.05.13, OUFE: 20320.
- S. bromoides* (L.) Dörfel. [24], 07.06.15, Akd., OUFE: 20321.
- S. lessingiana* Trin. & Rupr. [112], 23.05.15, OUFE: 20322.
- Stipagrostis ciliata* (Desf.) De Winter [73], 31.05.15, OUFE: 20323.
- Taeniatherum caput-medusae* (L.) Nevski [11], 07.06.15, OUFE: 20326.
- PAPAVERACEAE
- Chelidonium majus* L. [16], 18.04.15, Avr.-Sib., OUFE: 19611.
- Corydalis solida* (L.) Clairv. [16], 18.04.15, OUFE: 20387.
- Fumaria officinalis* L. [57], 23.04.12, OUFE: 19987.
- Fumaria parviflora* Lam. [16], 06.06.12, OUFE: 19992.
- Glaucium corniculatum* (L.) Curtis [75], 31.05.15, OUFE: 20009.
- Glaucium grandiflorum* subsp. *refractum* (Nábělek) Mory [16], 06.06.12, OUFE: 20012.
- G. leiocarpum* Boiss. [141], 07.08.13, OUFE: 20013.
- Hypecoum imberbe* Sm. [45], 15.04.12, OUFE: 20053.
- H. procumbens* L. [16], 06.06.12, OUFE: 20054.
- Papaver apokrinomenon* Fedde [44], 25.06.15, End., LC, OUFE: 20179.
- P. argemone* L. [19], 03.07.13, OUFE: 20180.
- P. dubium* L. [9], 03.06.15, OUFE: 20181.
- P. lacerum* Popov [1], 18.05.13, OUFE: 20182.
- P. postii* Fedde [10], 03.06.15, OUFE: 20183.
- P. rhoeas* L. [141], 07.08.13, OUFE: 20184.
- P. trinifolium* Boiss. [11], 25.08.12, OUFE: 20185.
- Roemeria hybrida* (L.) DC. [79], 31.05.15, OUFE: 20235.
- Berberidaceae
- Berberis crataegina* DC. [16], 20.04.14, OUFE: 19760.
- Ranunculaceae
- Adonis aestivalis* L. [42], 26.04.15, OUFE: 19629.
- A. annua* L. [42], 26.04.15, OUFE: 19630.
- A. flammea* Jacq. [7], 02.07.13, OUFE: 19631.
- Ceratocephala falcata* (L.) Pers. [47], 18.04.15, OUFE: 19831.
- Consolida aconiti* (L.) Lindl. [98], 08.07.15, OUFE: 19865.
- C. hellespontica* (Boiss.) Chater [58], 23.06.15, OUFE: 19866.
- C. orientalis* (J.Gay) Schrödinger [63], 07.06.15, OUFE: 19868.
- C. raveyi* (J.Gay) Schrödinger [58], 23.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 19869.
- C. regalis* subsp. *paniculata* (Host) Soó [13], 02.07.13, OUFE: 19870.
- Delphinium fissum* subsp. *anatolicum* Chowdhuri & P.H.Davis [18], 02.07.13, OUFE: 19916.
- D. peregrinum* L. [1], 18.05.13, OUFE: 19917.
- Nigella arvensis* L. [99], 08.07.15, OUFE: 20140.
- N. arvensis* subsp. *glauca* (Boiss.) N.Terracc. (Syn: *Nigella arvensis* L. var. *glauca* Boiss.) [99], 08.07.15, OUFE: 20141.
- N. elata* Boiss. [100], 08.07.15, OUFE: 20142.
- N. segetalis* M.Bieb. [100], 08.07.15, OUFE: 20143.
- Ranunculus argyreus* Boiss. [14], 18.04.15, OUFE: 20390.
- R. constantinopolitanus* (DC.) d'Urv. [13], 02.07.13, OUFE: 20388.
- R. damascenus* Boiss. & Gaill. [13], 02.07.13, İr.-Tur., OUFE: 20389.
- Platanaceae
- Platanus orientalis* L. [28], 09.07.15, OUFE: 20391.
- Paeoniaceae
- Paeonia mascula* (L.) Mill. [44], 25.06.15, OUFE: 20392.
- CRASSULACEAE

- Sedum acre* L.
[52], 10.07.13, OUFE: 20293.
- S. album* L.
[52], 10.07.13, OUFE: 20294.
- ZYGOPHYLLACEAE
- Tribulus terrestris* L.
[2], 17.06.12, OUFE: 20393.
- Zygophyllum fabago* L.
[98], 08.07.15, İr.-Tur., OUFE: 20386.
- FABACEAE
- Alhagi pseudalhagi* (M. Bieb.) Desv. ex B. Keller & Shap.
[32], 21.10.12, İr.-Tur., LC, OUFE: 19648.
- Anthyllis vulneraria* subsp. *boissieri* (Sagorski) Bornm.
[11], 02.07.13, OUFE: 19702.
- Astracantha acicularis* (Bunge) Podlech (Syn: *Astragalus acicularis* Bunge)
[97], 25.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 19722.
- A. condensata* (Ledeb.) Podlech (Syn: *Astragalus condensata* Bunge)
[101], 08.07.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 19723.
- A. strictispina* (Boiss.) Podlech (Syn: *Astragalus strictispina* Bunge)
[144], 07.08.13, End., NT, OUFE: 19724.
- Astragalus aduncus* Willd.
[17], 03.06.15, OUFE: 19725.
- A. angustifolius* subsp. *pungens* (Willd.) Hayek
[4], 18.05.13, OUFE: 19726.
- A. campylosema* Boiss.
[13], 18.04.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 19727.
- A. flavescens* Boiss.
[13], 18.04.15, OUFE: 19728.
- A. hamosus* L.
[151], 08.07.15, OUFE: 19729.
- A. hirsutus* Vahl.
[121], 03.05.15, OUFE: 19730.
- A. hololeucoides* (Boiss.) Podl. & Sytin (Syn: *Astragalus mesogitanus* Boiss.)
[56], 03.05.15, End., LC, OUFE: 19731.
- A. kochakii* Aytac & H.Duman
[18], 23.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 19732.
- A. lydius* Boiss.
[65], 03.05.13, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 19732.
- A. macrocephalus* subsp. *finitimus* (Bunge) D.F.Chamb.
[71], 22.06.15, İr.-Tur., End., NT, OUFE: 19734.
- A. nutallii* (Torr. & A.Gray) J.T.Howell
[19], 02.07.13, OUFE: 19736.
- A. odoratus* Lam.
[72], 31.05.15, OUFE: 19737.
- A. oxyglottis* M.Bieb.
[94], 25.06.15, OUFE: 19738.
- A. oxytropifolius* Boiss.
[54], 23.05.15, İr.-Tur., OUFE: 19739.
- A. ponticus* Pall.
[154], 21.04.14, OUFE: 19740.
- A. stella* L.
[55], 23.05.15, OUFE: 19741.
- A. triradiatus* Bunge
[16], 23.06.15, İr.-Tur., OUFE: 19742.
- A. vulnerariae* DC.
[19], 02.07.13, End., LC, OUFE: 19743.
- A. xylobasis* var. *angustus* (Freyn & Sint.) Freyn & Bornm.
[61], 25.05.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 19744.
- Bituminaria bituminosa* (L.) C.H.Stirt. (Syn: *Psoralea bituminosa* L.)
[16], 23.06.15, Akd., D.O. 1457, OUFE: 19764.
- Cicer anatolicum* Alef.
[154], 21.04.14, OUFE: 19843.
- Colutea cilicica* Boiss. & Balansa
[1], 18.05.13, OUFE: 19858.
- Coronilla scorpioides* (L.) Koch
[55], 09.07.15, OUFE: 19880.
- Cytisopsis pseudocytisus* subsp. *reeseana* (Guyot) Lassen
[110], 25.06.15, OUFE: 19912.
- Cytisus hirsutus* L. (Syn: *Chamaecytisus hirsutus* (L.) Link)
[1], 18.05.13, OUFE: 19913.
- Dorycnium graceum* (L.) Ser.
[151], 23.09.12, Avr.-Sib., OUFE: 19929.
- Ebenus bourgeaui* subsp. *cappadocica* (Hausskn. & Siehe ex Bornm.) Ponert
[14], 07.06.15, OUFE: 19933.
- E. hirsuta* Jaub. & Spach
[10], 28.07.13, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 19934.
- Genista albida* Willd.
[45], 25.06.15, OUFE: 20003.
- G. aucheri* Boiss.
[14], 07.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 20004.
- G. lydia* Boiss.
[55], 09.07.15, Akd., OUFE: 19735.
- G. sessilifolia* DC.
[55], 09.07.15, Akd., OUFE: 20005.
- Glycyrrhiza glabra* L.
[44], 09.07.15, OUFE: 20018.
- Hedysarum cappadoccicum* Boiss.
[62], 28.06.15, End., LC, OUFE: 20030.
- H. varium* Willd.
[52], 31.05.15, İr.-Tur., OUFE: 20032.
- H. varium* subsp. *pestalozzae* (Boiss.) Ponert
[55], 31.05.15, End., LC, OUFE: 20031.
- Hippocrepis unisiliquosa* L.
[44], 09.07.15, OUFE: 20046.
- Lotus tenuis* Waldst. & Kit. (Syn: *Lotus corniculatus* var. *tenuifolius* L.)
[14], 07.06.15, OUFE: 20101.
- Medicago crassipes* (Ser.) Trautv. (Syn: *Trigonella crassipes* Boiss.)
[14], 07.06.15, İr.-Tur., OUFE: 20112.
- M. fischeriana* (Boiss.) E.Small (Syn: *Trigonella fischeriana* Ser.)
[73], 25.06.15, OUFE: 20113.
- M. minima* (L.) L.
[16], 03.06.15, OUFE: 20114.
- M. monspeliaca* (L.) Trautv. (Syn: *Trigonella monspeliaca* L.)
[31], 07.08.12, Akd., OUFE: 20115.
- Medicago radiata* L.
[65], 05.05.13, OUFE: 20116.
- M. rigidula* (L.) Ail.
[1], 18.05.13, OUFE: 20117.
- M. sativa* L.
[32], 07.08.12, OUFE: 20118.
- Melilotus officinalis* (L.) Pall.
[116], 26.06.13, OUFE: 20120.
- Onobrychis arenaria* subsp. *cana* (Boiss.) Hayek
[79], 31.05.15, OUFE: 20147.
- O. argyrea* Boiss. (Syn: *Onobrychis argyrea* Boiss. subsp. *argyrea* Boiss.)
[16], 10.06.15, End., LC, OUFE: 20148.
- O. paucijuga* Bornm.
[82], 08.07.15, İr.-Tur., End., VU, OUFE: 20149.
- O. tournefortii* (Willd.) Desv.
[83], 25.07.15, End., LC, OUFE: 20150.
- Ononis pusilla* L.
[3], 18.05.13, OUFE: 20151.
- O. spinosa* subsp. *antiquorum* (L.) Briq.
[3], 18.05.13, OUFE: 20152.
- Pisum sativum* L. subsp. *sativum* L.
[1], 24.05.13, OUFE: 19732.
- Oxytropis argyroleuca* Bornm.
[12], 06.06.12, OUFE: 20177.
- Securigera varia* (L.) Lassen (Syn: *Coronilla varia* subsp. *hirta* (Boiss.) Rech.f.)
[8], 07.06.15, OUFE: 20292.
- Tragacantha densifolia* (Lam.) Kuntze (Syn: *Astragalus densifolius* Lam.)
[2], 17.06.12, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 20344.
- Trifolium arvense* L.
[3], 26.04.15, OUFE: 20349.
- T. campestre* Schreb.
[115], 11.06.13, OUFE: 20350.
- T. ochroleucon* Huds. (Syn: *Trifolium ochroleucum* Huds.)
[3], 26.04.15, OUFE: 20351.
- T. pratense* L.
[1], 18.5.13, OUFE: 20352.
- T. repens* L.
[1], 18.5.13, OUFE: 20353.
- Trigonella astroides* Fisch. & C.A.Mey.
[16], 23.06.15, OUFE: 20355.
- T. capitata* Boiss.
[50], 31.05.15, İr.-Tur., OUFE: 20356.
- T. spruneriana* Boiss.
[65], 05.03.13, İr.-Tur., OUFE: 20357.
- POLYGALACEAE
- Polygala anatolica* Boiss. & Heldr.
[5], 18.05.13, OUFE: 20211.
- P. pruinosa* Boiss.
[6], 18.05.13, OUFE: 20212.
- ROSACEAE
- Agrimonia eupatoria* L.
[132], 23.09.12, OUFE: 19644.
- Cotoneaster nummularius* Fisch. & C.A. Mey.
[61], 10.07.13, OUFE: 19882.
- Crataegus monogyna* Jacq.
[23], 20.04.14, OUFE: 19887.
- C. orientalis* Pall. ex Bieb.
[24], 20.04.14, D.O. 739, OUFE: 19888.
- Potentilla recta* L.
[31], 09.07.15, OUFE: 20216.
- Prunus orientalis* (Mill.) Koehne
[20], 02.06.13, OUFE: 20219.
- P. spinosa* L.
[13], 07.08.12, Avr.-Sib., OUFE: 20220.
- Rosa canina* L.
[142], 07.08.13, OUFE: 20236.
- R. foetida* Herrm
[7], 18.05.13, OUFE: 20237.
- R. horrida* Fisch.
[7], 18.05.13, OUFE: 20238.
- R. turcica* Rouy (Syn: *Rosa horrida* Fisch. ex Crep.)
[61], 28.07.12, OUFE: 20357.
- Rubus canescens* DC. (Syn: *Rubus canescens* var. *canescens*)
[14], 18.04.15, Avr.-Sib., OUFE: 20354.
- R. sanctus* Schreb (Syn: *Rubus sanctus* DC.)
[14], 18.04.15, Avr.-Sib., OUFE: 20394.
- Sanguisorba minor* subsp. *muricata* Briq.
[20], 02.07.13, OUFE: 20395.
- RHAMNACEAE
- Paliurus spina-christi* Mill.
[19], 03.07.13, OUFE: 20396.
- Rhamnus thymifolia* Bornm.

- [12], 07.06.15, End., LC, OUFE: 20231.
FAGACEAE
Quercus cerris L.
[141], 07.08.12, Akd., OUFE: 20223.
Q. pubescens Willd.
[141], 07.08.12, OUFE: 20224.
CUCURBITACEAE
Ecballium elaterium (L.) A.Rich.
[74], 31.05.15, OUFE: 20397.
EUPHORBIACEAE
Andrachne telephioides L.
[14], 03.06.15, OUFE: 20398.
Chrozophora tinctoria (L.) A.Juss.
[46], 25.06.15, OUFE: 19842.
Euphorbia anacampseros Boiss.
[79], 31.05.15, End., LC, OUFE: 19959.
E. apios L.
[159], 25.04.15 D. Akd., OUFE: 19960.
E. erythron Boiss. & Heldr.
[66], 28.06.15, OUFE: 19961.
E. esula subsp. *tommasiniana* (Bertol.) Kuzmanov (Syn: *Euphorbia virgata* Waldst. et Kit.)
[66], 28.06.15, OUFE: 19962.
E. falcata L.
[111], 09.07.15, D.O. 1754, OUFE: 19964.
E. glareosa Pall. ex M.Bieb. (Syn: *Euphorbia nicaeensis* subsp. *glareosa* (Pall. ex M.Bieb.) Radcl.-Sm.)
[54], 26.04.15, Avr.-Sib., OUFE: 19965.
E. helioscopia L.
[114], 03.05.15, OUFE: 19966.
E. herniariifolia Willd.
[54], 26.04.15, OUFE: 19967.
E. macroclada Boiss.
[87], 10.06.15, OUFE: 19968.
E. nicaeensis All.
[46], 25.06.15, OUFE: 19971.
Euphorbia peplus L.
[87], 10.06.15, OUFE: 19972.
E. seguieriana Neck.
[87], 10.06.15, OUFE: 19973. SALICACEAE
Populus alba L.
[16], 28.04.12, Avr.-Sib., OUFE: 19969.
P. nigra L.
[16], 28.04.12, OUFE: 19970.
Salix alba L.
[16], 28.04.12, Avr.-Sib., OUFE: 19971.
VIOLACEAE
Viola kitaibeliana Schult.
[7], 25.04.15, OUFE: 20378.
V. occulta Lehm.
[58], 03.05.15, OUFE: 20379.
LINACEAE
Linum bienne Mill.
[19], 26.04.13, Akd., OUFE: 20095.
L. carniense Boiss.
[23], 31.05.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 20096.
L. hirsutum L.
[85], 25.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 20097. HYPERICACEAE
Hypericum lydiu Boiss.
[71], 31.05.15, OUFE: 20055.
H. montbretii Spach
[3], 18.05.13, OUFE: 20056.
H. origanifolium var. *depilatum* (Freyn & Bornm.)
[12], 07.06.15, OUFE: 20057.
H. perforatum L.
[9], 26.06.15, OUFE: 20058.
H. scabrum L.
[11], 02.07.13, İr.-Tur., OUFE: 20059.
GERANIACEAE
Erodium absinthoides Willd.
[2], 18.05.13, OUFE: 19949.
Erodium ciconium (L.) L'Hér.
[2], 18.05.13, OUFE: 19950.
E. cicutarium (L.) L'Hér.
[20], 18.04.15, OUFE: 19951.
Geranium sylvaticum L.
[3], 18.05.13, OUFE: 20006.
G. tuberosum L.
[53], 23.04.12, OUFE: 20007.
LYTHRACEAE
Lythrum salicaria L.
[104], 31.05.13, Avr.-Sib., OUFE: 20104.
NITRARIACEAE
Peganum harmala L.
[80], 08.07.15, OUFE: 20104.
Anacardiaceae
Pistacia terebinthus L.
[61], 18.04.15, Akd., OUFE: 20201.
Rhus coriaria L.
[9], 23.06.15, OUFE: 20233.
SAPINDACEAE
Acer platanoides L.
[132], 08.07.15, OUFE: 20094.
RUTACEAE
Haplophyllum myrtifolium Boiss.
[102], 24.05.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 20029.
Ruta thesioides Fisch. ex DC.
[143], 07.08.13, OUFE: 20243.
SIMAROUBACEAE
Ailanthus altissima (Mill.) Swingle
[23], 22.06.15, OUFE: 20380.
MALVACEAE
Alcea apterocarpa Boiss.
[158], 03.07.13, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 19647.
Althaea officinalis L.
[81], 28.06.15, OUFE: 20397.
Malva neglecta Wallr.
[116], 26.06.13, OUFE: 20107.
THYMELAEACEAE
Thymelaea passerina (L.) Coss. & Germ.
[115], 11.06.13, OUFE: 20398.
CISTACEAE
Fumana aciphylla Boiss.
[21], 23.06.15, İr.-Tur., OUFE: 19983.
F. laevis (Cav.) Pau (Syn: *Fumana thymifolia* var. *viridis* (Ten.) Boiss.)
[21], 23.06.15, Akd., OUFE: 19985.
F. paphlagonica Bornm. & Janch.
[21], 23.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 19986.
Helianthemum nummularium (Cav.) Losa & Rivas Goday
[54], 31.05.15, End., LC, OUFE: 20033.
H. oelandicum subsp. *incanum* (Willk.) G.López (Syn: *Helianthemum canum* (L.) Baumg.)
[54], 31.05.15, OUFE: 20034.
RESEDACEAE
Reseda inodora Rchb.
[93], 25.05.15, OUFE: 20228.
Reseda lutea L.
[14], 18.04.15, OUFE: 20228.
R. luteola L.
[14], 18.04.15, OUFE: 20228.
CAPPARACEAE
Capparis sicula Duhamel (Syn: *Capparis ovata* Desf. var. *canescens* (Coss.) Heywood)
[112], 10.06.15, OUFE: 19798.
BRASSICACEAE
Aethionema arabicum (L.) Andr. ex DC.
[1], 17.06.12, OUFE: 19636.
Ae. armenum Boiss.
[14], 03.06.15, İr.-Tur., OUFE: 19638.
Ae. cordatum (Desf.) Boiss.
[72], 25.06.15, OUFE: 19639.
Ae. dumanii M.Vural et N.Adıgüzel
[19], 28.06.15, İr.-Tur., End., VU, OUFE: 19640.
Ae. iberideum (Boiss.) Boiss.
[31], 09.07.15, OUFE: 19641.
Ae. subulatum (Boiss. & Heldr.) Boiss.
[79], 28.06.15, End., NT, OUFE: 19642.
Ae. turcica H.Duman & Aytaç
[80], 28.06.15, OUFE: 19643.
Alliaria petiolata (M.Bieb.) Cavara & Grande
[38], 25.04.15, OUFE: 19637.
Alyssum baumgartnerianum Bornm. ex Baumg.
[45], 25.06.15, OUFE: 19672.
A. corningii Dudley
[15], 03.06.15, OUFE: 19673.
A. desertorum Stapf
[14], 03.06.15, OUFE: 19674.
A. linifolium Stephan ex Willd.
[66], 31.05.15, OUFE: 19675.
A. minutum Schldt. ex DC.
[162], 18.04.15, OUFE: 19676.
A. murale Waldst. & Kit.
[25], 26.06.15, OUFE: 19677.
A. niveum Dudley
[13], 23.06.15, İr.-Tur., End., EN, OUFE: 19678.
A. obtusifolium Steven ex DC. (Syn: *Alyssum borzaeanum* Nyár.)
[60], 02.05.15, OUFE: 19679.
A. pateri Nyar.
[15], 03.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 19680.
A. sibiricum Willd.
[68], 03.05.14, OUFE: 19681.
A. simplex Rudolph (*Alyssum minus* (L.) Rothm. var. *micranthum* (Meyer) Dudley)
[73], 18.05.13, OUFE: 19682.
A. strigosum Schldt. ex DC.
[147], 18.05.13, OUFE: 19683.
Arabis caucasica (Willd.) Briq. (Syn: *Arabis caucasica* subsp. *caucasica* Willd.)
[15], 03.06.15, OUFE: 19703.
A. nova Vill.
[38], 25.04.15, OUFE: 19704.
A. sagittata (Bertol.) DC.
[35], 18.04.15, OUFE: 19705.
Aubrieta deltoidea (L.) DC.
[15], 03.06.15, OUFE: 19756.
Boreava orientalis Jaub. & Spach
[15], 06.06.12, OUFE: 19767.
Brassica elongata Ehrh.
[70], 31.05.15, OUFE: 19770.
Calepina irregularis (Asso) Thell.
[103], 23.05.15, OUFE: 19789.
Camelina rumelica Velen.
[3], 26.06.15, OUFE: 19793.
Capsella bursa-pastoris (L.) Medik.
[13], 23.06.15, OUFE: 19800.
Chorispora purpurascens (Banks & Sol.) Eig (Syn: *Chorispora syriaca* Boiss.)
[13], 23.06.15, İr.-Tur., OUFE: 19841.
Clypeola jonthlasi L.
[23], 25.04.15, OUFE: 19853.
Conringia clavata Boiss. (Syn: *Conringia perfoliata* (C.A.Meyer) Busch)
[55], 18.05.13, OUFE: 19863.
C. orientalis (L.) Dumort.
[154], 21.04.14, İr.-Tur., OUFE: 19864.
Crambe orientalis L.

- [154], 21.04.14, OUFÉ: 19884.
Crambe tataria Sebeok
 [154], 21.04.14, OUFÉ: 19886.
Descurainia sophia (L.) Webb ex Prantl
 [124], 03.06.15, OUFÉ: 19918.
Diplotaxis tenuifolia (L.) DC.
 [103], 23.05.15, OUFÉ: 19927.
Draba bruniifolia subsp. **olympica** (DC.)
 Coode & Cullen
 [35], 18.04.15, OUFÉ: 19931.
Erophila verna (L.) DC.
 [13], 01.04.15, OUFÉ: 19952.
Eruca vesicaria (L.) Cav. (Syn: **Eruca sativa** Mill.)
 [39], 21.10.12, OUFÉ: 19953.
Erysimum crassipes Fisch. & C.A.Mey.
 [88], 10.06.15, OUFÉ: 19957.
E. repandum L.
 [88], 10.06.15, OUFÉ: 19958.
Fibigia clypeata (L.) Medik.
 [57], 02.07.13, OUFÉ: 19978.
Hesperis balansae E. Fourn.
 [73], 02.05.15 D. Akd., End., NT, OUFÉ: 20042.
H. kotschy Boiss.
 [22], 23.06.15, İr.-Tur., End., VU, OUFÉ: 20043.
Hirschfeldia incana (L.) Lagr.- Foss.
 [60], 20.04.14, OUFÉ: 20399.
Iberis carnosa Willd.
 [83], 26.06.15, OUFÉ: 20060.
Iberis simplex DC. (Syn: **Iberis taurica** DC.)
 [72], 31.05.15 D. Akd., OUFÉ: 20061.
Isatis floribunda Boiss. ex Bornm.
 [127], 17.06.12, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20068.
I. glauca Aucher
 [3], 18.05.13, End., LC, OUFÉ: 20069.
Lepidium cartilagineum (J.Mayer) Thell.
 [32], 03.05.15, OUFÉ: 20087.
L. draba L. (Syn: **Cardaria draba** subsp. **draba** (L.) Desv.)
 [32], 03.05.15, OUFÉ: 20088.
L. perfoliatum L.
 [23], 25.08.12, OUFÉ: 20089.
Malcolmia africana (L.) R.Br.
 [119], 07.08.13, OUFÉ: 20106.
Matthiola anchoniifolia Hub.-Mor.
 [24], 31.05.15, İr.-Tur., End., NT, OUFÉ: 20110.
M. longipetala subsp. **bicornis** (Sm.)
 P.W.Ball
 [92], 23.05.15, OUFÉ: 20111.
Neslia paniculata subsp. **thracica**
 (Velen.) Bornm. (Syn: **Neslia apiculata**
 Fisch., Mey. & Avé-Lall.)
 [60], 20.04.14, OUFÉ: 20139.
Raphanus raphanistrum L.
 [73], 02.05.15, OUFÉ: 20400.
Rapistrum rugosum (L.) All.
 [92], 23.05.15, OUFÉ: 20401.
Rorippa sylvestris (L.) Besser
 [73], 02.05.15, OUFÉ: 20402.
Sinapis arvensis L.
 [69], 31.05.15, OUFÉ: 20309.
Sisymbrium altissimum L.
 [99], 03.05.15, OUFÉ: 20310.
S. loeselii L.
 [99], 03.05.15, OUFÉ: 20311.
Smyrniium perfoliatum L.
 [25], 03.06.15, OUFÉ: 20312.
Sonchus asper subsp. **glaucescens** (Jord.)
 Ball ex Ball
 [22], 23.06.15, OUFÉ: 20313.
Sterigmostemum incanum M.Bieb
 [58], 03.05.15, İr.-Tur., OUFÉ: 20319.
Thlaspi arvense L.
 [24], 31.05.15, OUFÉ: 19816.
T. jaubertii Hedge
 [2], 26.04.15, End., NT, OUFÉ: 20337.
T. ochroleucum Boiss. & Heldr.
 [4], 26.04.15, OUFÉ: 20339.
Turritis glabra L.
 [9], 07.06.15, OUFÉ: 20360.
 SANTALACEAE
Comandra umbellata subsp. **elegans**
 (Rochel ex Rchb.) Pehl
 [128], 10.07.13, Avr.-Sib., OUFÉ: 19861.
Thesium billardiieri Boiss.
 [91], 25.06.15, İr.-Tur., OUFÉ: 20334.
T. procumbens C.A.Mey.
 [7], 25.04.15, OUFÉ: 20335.
T. scabriflorum P.H.Davis
 [23], 18.04.15 D. Akd., End., VU, OUFÉ: 20336.
 FRANKENIACEAE
Frankenia hirsuta L.
 [144], 07.08.13, D.O. 682, OUFÉ: 19980.
F. pulverulenta L.
 [144], 07.08.13, OUFÉ: 19981.
 TAMARICAEAE
Reaumuria alternifolia (Labill.) Britten
 [104], 18.04.14, İr.-Tur., OUFÉ: 20227.
Tamarix smyrnensis Bunge
 [10], 07.06.15, OUFÉ: 20327.
 PLUMBAGINACEAE
Acantholimon acerosum (Willd.) Boiss.
 [109], 19.05.13, İr.-Tur., OUFÉ: 19615.
A. anatolicum Doğan & Akaydın
 [132], 08.07.15, End., LC, OUFÉ: 19616.
A. puberulum Boiss. & Balansa
 [90], 08.07.15, İr.-Tur., OUFÉ: 19617.
A. riyatguelii Yıldırım
 [90], 05.06.15, İr.-Tur., End., CR, OUFÉ: 20408.
A. ulicinum (Willd. ex Schult.) Boiss.
 [35], 09.07.15 D. Akd., OUFÉ: 19617.
Limonium gmelinii (Willd.) Kuntze
 [132], 08.07.15, Avr.-Sib., OUFÉ: 20336.
Plumbago europaea L.
 [142], 07.08.12, Avr.-Sib., OUFÉ: 20204.
 Polygonaceae
Polygonum bellardii All.
 [7], 18.05.13, OUFÉ: 20214.
P. cognatum Meisn.
 [7], 18.05.13, OUFÉ: 20215.
Rumex acetosella L.
 [51], 25.06.15, OUFÉ: 20241.
R. crispus L.
 [51], 25.06.15, OUFÉ: 20242.
 CARYOPHYLLACEAE
Arenaria serpyllifolia L.
 [126], 03.05.15, OUFÉ: 19706.
Bolanthus minuartioides (Jaub. & Spach)
 Hub.-Mor.
 [117], 23.05.15, End., LC, OUFÉ: 19765.
Cerastium banaticum (Rochel) Heuff.
 [70], 25.04.15, OUFÉ: 19829.
Cerastium perfoliatum L.
 [19], 25.08.12, OUFÉ: 19830.
Dianthus cibarius Clem.
 [62], 25.06.15, OUFÉ: 19830.
D. crinitus Sm.
 [62], 25.06.15, OUFÉ: 19920.
D. cruentus Griseb. (Syn: **Dianthus calocephalus** Boiss.)
 [70], 25.06.15, OUFÉ: 19922.
D. micranthus Boiss. & Heldr.
 [61], 26.06.15, OUFÉ: 19923.
D. zonatus Fenzl
 [15], 25.08.12, OUFÉ: 19924.
Gypsophila eriocalyx Boiss.
 [60], 28.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20020.
G. laricina Schreb. (Syn: **Gypsophila sphaerocephala** var. **cappadocica** (Boiss. & Balansa) Boiss.)
 [19], 25.08.12, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20021.
G. parva Barkoudah
 [54], 31.05.15, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20022.
G. perfoliata L.
 [107], 03.07.13, D.O. 616, OUFÉ: 20023.
G. pilosa Huds.
 [107], 03.07.13, İr.-Tur., OUFÉ: 20026.
G. viscosa Murray
 [52], 23.05.15, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20027.
Herniaria glabra L.
 [84], 18.06.12, OUFÉ: 20040.
H. incana Lam.
 [53], 31.05.15, OUFÉ: 20041.
Holosteum umbellatum L.
 [61], 30.04.13, OUFÉ: 20047.
Minuartia anatolica (Boiss.) Woronow
 [100], 25.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20122.
M. juniperina (L.) Maire & Petitm.
 [8], 23.06.15, OUFÉ: 20123.
Moenchia mantica (L.) Bartl.
 [17], 07.06.15, OUFÉ: 20124.
Paronychia carica Chaudhri
 [45], 25.06.15, End., LC, OUFÉ: 20187.
P. dudleyi Chaudhri
 [51], 02.06.13, İr.-Tur., End., NT, OUFÉ: 20188.
Saponaria kotschy Boiss.
 [70], 25.06.15, End., LC, OUFÉ: 20262.
S. viscosa C.A.Mey.
 [51], 25.06.15, İr.-Tur., OUFÉ: 20263.
Scleranthus annuus L.
 [73], 31.05.15, D.O. 1166, OUFÉ: 20274.
S. orientalis Rössler
 [73], 31.05.15, OUFÉ: 20275.
Silene cappadocica Boiss. & Heldr.
 [10], 07.06.15, İr.-Tur., OUFÉ: 20301.
S. conica L. (Syn: **Silene subconica** Friv.)
 [17], 07.06.15, OUFÉ: 20302.
S. dichotoma Ehrh.
 [19], 06.06.12, OUFÉ: 20303.
S. falcata Sm.
 [18], 02.07.13, OUFÉ: 20304.
S. italica (L.) Pers.
 [55], 31.05.15, OUFÉ: 20305.
S. latifolia Poir (Syn: **Silene alba** subsp. **divaricata** (Rchb.) Walters)
 [141], 07.08.12, OUFÉ: 20306.
S. pruinosa Boiss. (**Silene supina** subsp. **pruinosa** Chowdhuri)
 [92], 31.05.15, OUFÉ: 20307.
S. vulgaris (Moench) Garcke (**Silene vulgaris** var. **vulgaris** (Moench) Garcke)
 [92], 31.05.15, OUFÉ: 20308.
Spergularia media (L.) C.Presl
 [58], 10.07.13, OUFÉ: 20308.
Stellaria media (L.) Vill.
 [10], 07.06.15, OUFÉ: 20205.
Telephium imperati L. subsp. **orientale**
 (Boiss.) Nyman
 [10], 07.06.15, OUFÉ: 20024.
Vaccaria hispanica (Mill.) Rauschert.
 [16], 23.06.15, OUFÉ: 20197.
Velezia rigida L.
 [51], 25.06.15, OUFÉ: 20025.
 AMARANTHACEAE
Amaranthus albus L.

- [16], 06.06.12, OUFÉ: 19684.
A. blitoides S.Watson
 [16], 06.06.12, OUFÉ: 19685.
A. retroflexus L.
 [93], 25.06.15, OUFÉ: 19687.
Atriplex hortensis L.
 [45], 19.05.13, OUFÉ: 19750.
A. lasiantha Boiss.
 [109], 07.08.12, OUFÉ: 19751.
Atriplex patula L.
 [42], 17.10.13, OUFÉ: 19752.
Camphorosma monspeliaca var. *lessignii* (Litv.) Aellen
 [148], 25.08.12, OUFÉ: 19797.
Chenopodium album L.
 [128], 10.07.13, OUFÉ: 19837.
C. foliosum Asch.
 [128], 10.07.13, OUFÉ: 19838.
Dysphania botrys (L.) Mosyakin & Clemants (Syn: *Chenopodium botrys* L.)
 [120], 26.04.15, OUFÉ: 19932.
Krascheninnikovia ceratoides (L.) Gueldenst.
 [93], 25.06.15, OUFÉ: 20078.
Microcnemum coralloides (Loscos & J.Pardo) Font Quer
 [16], 06.06.12, OUFÉ: 20121.
Noaea mucronata (Forssk.) Asch. & Schweinf.
 [16], 06.06.12, OUFÉ: 19686.
Salicornia europaea L.
 [143], 07.08.13, OUFÉ: 20244.
Salsola kali subsp. *ruthenica* (Iljin) Soó
 [143], 07.08.13, OUFÉ: 20403.
Suaeda confusa Iljin
 [143], 07.08.13, OUFÉ: 20325.
 Portulacaceae
Portulaca oleracea L.
 [5], 18.05.13, OUFÉ: 20404.
 CORNACEAE
Cornus mas L.
 [160], 15.04.12, Avrupa- Sibiry, OUFÉ: 20405. PRIMULACEAE
A. arvensis subsp. *foemina* (Mill.) Schinz & Thell. (Syn: *Anagallis foemina* Mill.)
 [49], 09.07.15, Akd., OUFÉ: 19688.
Androsace maxima L.
 [65], 18.03.15, OUFÉ: 19692.
A. villosa L.
 [70], 22.05.15, Avr.-Sib., OUFÉ: 19693.
 RUBIACEAE
Asperula arvensis L.
 [113], 18.05.12, OUFÉ: 19718.
Asperula glomerata (Bieb.) Griseb.
 [9], 18.04.15, OUFÉ: 19719.
A. lilaciflora Boiss.subsp. *phrygia* (Borrm.) Schönb.-Tem.
 [1], 18.05.15, End., LC, OUFÉ: 19720.
Cruciata taurica (Pall. ex Willd.) Ehrend.
 [125], 18.05.13, İr.-Tur., OUFÉ: 19720.
Galium incanum Sm. subsp. *elatius* (Boiss.) Ehrend.
 [10], 26.06.15, OUFÉ: 20000.
G. rivale (Sibth. & Sm.) Griseb.
 [15], 02.05.15, OUFÉ: 20001.
G. verum L.
 [14], 03.07.13, Avr.-Sib., OUFÉ: 20002.
Rubia peregrina L.
 [58], 26.06.15, Akd., OUFÉ: 20240.
R. tinctorum L.
 [58], 26.06.15, İr.-Tur., OUFÉ: 20102.
 GENTIANACEAE
Centaurium erythraea Rafn subsp. *turcicum* (Velen.) Melderis
 [122], 10.07.13, OUFÉ: 19821.
Centaurium spicatum (L.) Fritsch
 [163], 02.06.13, OUFÉ: 19822.
 APOCYNACEAE
Cynanchum acutum L.
 [143], 07.08.13, OUFÉ: 19910.
Periploca graeca L.
 [143], 07.08.13 D. Akd., OUFÉ: 20407.
Vinca herbacea Waldst. & Kit.
 [143], 07.08.13, OUFÉ: 20406.
V. major L.
 [15], 20.04.14, Akd., OUFÉ: 20376.
Vincetoxicum fuscatum (Hornem.) Endl.
 [1], 18.05.13, OUFÉ: 20377.
 BORAGINACEAE
Alkanna orientalis (L.) Boiss.
 [20], 03.07.13, İr.-Tur., OUFÉ: 19649.
A. orientalis var. *leucantha* (Borrm.) Hub.-Mor.
 [82], 31.05.15, İr.-Tur., End., NT, OUFÉ: 19650.
A. tinctoria Tausch
 [142], 03.05.15, Akd., OUFÉ: 19651.
Anchusa azurea Mill.
 [21], 02.07.13, OUFÉ: 19689.
A. leptophylla subsp. *incana* (Ledeb.) D.F.Chamb.
 [21], 02.07.13, End., LC, OUFÉ: 19690.
Arnebia densiflora (Nordm.) Ledeb.
 [10], 20.04.14, İr.-Tur., OUFÉ: 19709.
Asperugo procumbens L.
 [110], 03.05.15, Avr.-Sib., OUFÉ: 19717.
Brunnera orientalis (Schenk) I.M.Johnst.
 [11], 25.06.15, OUFÉ: 19778.
Buglossoides arvensis (L.) I.M.Johnst.
 [34], 03.05.15, OUFÉ: 19780.
Cerintho minor L.
 [34], 03.05.15, OUFÉ: 19832.
Echium italicum L.
 [2], 18.05.13, Akd., OUFÉ: 19944.
Heliotropium europaeum L.
 [102], 25.04.15, Akd., OUFÉ: 20038.
Lappula barbata (M. Bieb.) Gürke
 [3], 17.06.12, İr.-Tur., OUFÉ: 20081.
Moltkia aurea Boiss.
 [2], 18.05.13, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20125.
M. caerulea Lehm.
 [36], 03.05.15, İr.-Tur., OUFÉ: 20126.
Myosotis lithospermifolia (Willd.) Hornem.
 [96], 26.06.15, OUFÉ: 20131.
M. ramosissima Roehel
 [136], 25.04.15, OUFÉ: 20132.
Nonea macrosperma Boiss. & Heldr.
 [36], 03.05.15, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20145.
Onosma armenum DC.
 [44], 09.07.15, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20154.
O. isaurica Boiss. & Heldr.
 [19], 31.05.15, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20155.
O. roussaei DC.
 [19], 31.05.15, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20156.
O. taurica Pall. ex Willd. var. *brevifolium* DC.
 [63], 10.06.15, End., LC, OUFÉ: 20157.
Paracaryum racemosum Britten
 [4], 18.05.13, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20157.
Rochelia disperma (L.f.) K.Koch
 [55], 23.05.13, OUFÉ: 20234.
 CONVULVULACEAE
Convolvulus arvensis L.
 [160], 15.04.12, OUFÉ: 19871.
C. cantabricus L.
 [44], 08.07.15, OUFÉ: 19872.
C. compactus Boiss.
 [55], 08.07.15, OUFÉ: 19873.
C. galaticus Rost. ex Choisy
 [78], 03.07.13, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 19874.
C. holosericeus M. Bieb.
 [58], 23.06.15, OUFÉ: 19875.
C. lineatus L.
 [44], 08.07.15, OUFÉ: 19877.
C. phrygius Borrm.
 [19], 23.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 19878.
C. pulvinatus Sa'ad
 [12], 03.06.15, OUFÉ: 19879.
Cuscuta approximata Bab.
 [13], 23.05.15, OUFÉ: 19901.
C. europaea L.
 [29], 18.06.12, OUFÉ: 19903.
C. palastina Boiss.
 [26], 23.06.15, OUFÉ: 19904.
 SOLANACEAE
Datura stramonium L.
 [12], 07.06.15, OUFÉ: 20039.
Hyoscyamus niger L.
 [18], 06.06.12, OUFÉ: 20051.
H. reticulatus L.
 [18], 06.06.12, İr.-Tur., OUFÉ: 19904.
Solanum americanum Mill. (Syn: *Solanum nigrum* subsp. *nigrum* L.)
 [65], 05.03.12, OUFÉ: 20134.
S. dulcamara L.
 [2], 11.08.12, Avr.-Sib., OUFÉ: 20146.
 OLEACEAE
Jasminum fruticans L.
 [52], 23.05.15, Akd., OUFÉ: 20070.
 PLANTAGINACEAE
Digitalis ferruginea L.
 [161], 23.09.12, Avr.-Sib., OUFÉ: 19925.
Globularia orientalis L.
 [129], 07.08.12, İr.-Tur., OUFÉ: 20014.
G. trichosantha Fisch. & C.A.Mey.
 [19], 18.04.15, İr.-Tur., OUFÉ: 20017.
Linaria corifolia Desf.
 [2], 18.05.13, Akd., End., LC, OUFÉ: 20090.
L. grandiflora Desf.
 [26], 27.07.13, İr.-Tur., OUFÉ: 20091.
L. simplex (Link) DC.
 [19], 18.04.15, Akd., OUFÉ: 20092.
L. vulgaris Mill.
 [137], 28.08.12, OUFÉ: 20093.
Plantago crassifolia Forssk.
 [28], 09.07.15, Akd., VU, OUFÉ: 20202.
P. lanceolata L.
 [28], 09.07.15, OUFÉ: 20203.
Veronica grisebachii Walters
 [92], 10.06.15 D. Akd., OUFÉ: 20369.
V. hederifolia L.
 [58], 21.10.12, OUFÉ: 20370.
V. multifida L.
 [4], 18.05.13, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20371.
V. pectinata L.
 [117], 02.05.15, OUFÉ: 20372.
V. persica Poir.
 [13], 18.04.15, OUFÉ: 20373.
V. samuelssonii Rech.f.
 [19], 18.04.15, OUFÉ: 20374.
V. triphyllus L.
 [19], 18.04.15, OUFÉ: 20375.
 SCROPHULARIACEAE
Scrophularia scopoli Hoppe ex Pers.
 [51], 23.05.15, OUFÉ: 20284.
S. xanthoglossa var. *decipiens* (Boiss. et Kotschy) Boiss.

- [151], 07.08.13, İr.-Tur., OUFE: 20285.
Verbascum cheiranthifolium var. *cheiranthifolium* Boiss.
 [100], 08.07.15, OUFE: 20366.
V. flavidum (Boiss.) Freyn et Bornm.
 [88], 23.06.15, Avr.-Sib., OUFE: 20283.
V. gypsicola Vural & Aydogdu
 [92], 26.06.15, İr.-Tur., End., EN, OUFE: 20367.
V. lasianthum Boiss. ex Benth.
 [90], 26.06.15, OUFE: 20368
V. splendidum Boiss.
 [88], 23.06.15 D. Akd., OUFE: 20365.
 LAMIACEAE
Ajuga chamaepitys subsp. *chia* (Schreb.) Arcang.
 [2], 17.06.12, OUFE: 19645.
A. salicifolia (L.) Schreb.
 [161], 10.07.13, İr.-Tur., OUFE: 19646.
Ballota nigra L.
 [79], 03.07.13, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 19758.
Clinopodium graveolens subsp. *rotundifolium* (Pers.) Govaerts (Syn: *Acinos rotundifolius* (Pers.))
 [93], 09.07.15, OUFE: 19852.
Eremostachys molucelloides Bunge
 [53], 09.07.15, OUFE: 19948.
Lamium amplexicaule L.
 [2], 18.04.15, Avr.-Sib., OUFE: 20079.
L. orientale (Fisch. & C.A.Mey.) E.H.L.Krause (Syn: *Wiedemannia orientalis* Fisch. & Mey.)
 [54], 26.04.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 20079.
M. parviflorum subsp. *oligodon* (Boiss.) Seybold
 [120], 07.08.13, End., LC, OUFE: 20108.
M. peregrinum L.
 [34], 09.07.15, OUFE: 20109.
Nepeta italica L.
 [24], 25.04.15, OUFE: 20109.
N. nuda L.
 [3], 18.05.13, OUFE: 20136.
N. nuda subsp. *albiflora* (Boiss.) Gams
 [1], 18.05.13, OUFE: 20137.
Nepeta stricta (Banks & Sol.) Hedge & Lamond
 [15], 02.07.13, OUFE: 20138.
Origanum sipyleum L.
 [19], 03.07.13 D. Akd., End., LC, OUFE: 20160.
Phlomis armeniaca Willd.
 [19], 23.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 20193.
P. herba-venti subsp. *pungens* (Willd.) Maire ex DeFilipps (Syn: *Phlomis pungens* var. *pungens* Willd.)
 [15], 02.07.13, OUFE: 20195.
Prunella orientalis Bornm.
 [15], 02.07.13, OUFE: 20194.
Salvia absconditiflora Greuter & Burdet (Syn: *Salvia cryptantha* Montbret et Aucher ex Benth.)
 [5], 18.05.13, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 20246.
S. aethiopsis L.
 [51], 19.05.13, OUFE: 20247.
S. bracteata Banks & Sol.
 [19], 02.07.13, OUFE: 20247.
S. candidissima Vahl
 [22], 28.07.12, İr.-Tur., OUFE: 20248.
S. cyanescens Boiss. & Balansa
 [18], 23.06.15, OUFE: 20251.
S. dichroantha Stapf
 [69], 25.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 20252.
Salvia multicaulis Vahl
 [44], 08.07.15, OUFE: 20253.
S. sclarea L.
 [72], 26.06.15, OUFE: 20254.
S. tchihatcheffii (Fisch. & C.A.Mey.) Boiss.
 [18], 23.06.15, İr.-Tur., End., NT, OUFE: 20256.
S. tomentosa Mill.
 [80], 31.05.15, Akd., OUFE: 20257.
S. virgata Jacq.
 [22], 02.07.13, İr.-Tur., OUFE: 20258.
S. viridis L.
 [20], 02.07.13, Akd., OUFE: 20259.
S. wiedemannii Boiss.
 [78], 31.05.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 20260.
Scutellaria alba L. subsp. *velenovskiyi* (Rech.f.) Greuter & Burdet (Syn: *Scutellaria velenovskiyi* Rech. Fil.)
 [4], 18.05.13, OUFE: 20287.
S. orientalis subsp. *pectinata* (Montbret & Aucher ex Benth.) J.R.Edm.
 [123], 19.05.13, OUFE: 20286.
S. orientalis subsp. *santolinoides* (Hausskn. ex Bornm.) J.R.Edm.
 [15], 20.04.14, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 20290.
S. salviifolia Benth.
 [123], 19.05.13, End., LC, OUFE: 20291.
Sideritis galatica Bornm.
 [79], 03.05.13, End., NT, OUFE: 20298.
S. gulendamii H.Duman & Karaveliogullari
 [272], 25.06.15, İr.-Tur., End., NT, OUFE: 20299.
S. montana L.
 [50], 10.07.13, Akd., OUFE: 20300.
Stachys annua (L.) L.
 [21], 02.07.13, OUFE: 20315.
S. byzantina K.Koch
 [20], 02.07.13, Avr.-Sib., OUFE: 20316.
S. iberica M.Bieb.
 [62], 02.07.13, OUFE: 20317.
Teucrium chamaedrys subsp. *chamaedrys* L.
 [16], 23.06.15, Avr.-Sib., OUFE: 20331.
T. orientale var. *orientale* L.
 [10], 02.07.13, İr.-Tur., OUFE: 20332.
T. polium L.
 [31], 07.08.12, OUFE: 20333.
Thymus leucostomus Hausskn. & Velen.
 [91], 23.06.15, İr.-Tur., End., NT, OUFE: 20341.
T. longicaulis C. Presl
 [9], 03.06.15, OUFE: 20342.
Thymus sipyleus Boiss.
 [57], 23.05.15, OUFE: 20343.
Ziziphora tenuior L.
 [55], 23.05.15, İr.-Tur., OUFE: 20385.
 OROBANCHACEAE
Bornmuellerantha aucheri (Boiss.) Rothm.
 [14], 23.06.15, İr.-Tur., OUFE: 19768.
Bungea trifida (Vahl) C.A.Mey.
 [15], 07.06.15, İr.-Tur., OUFE: 19781.
Cistanche salsa (C.A.Mey.) Beck
 [20], 23.06.15, İr.-Tur., OUFE: 19851.
Euphrasia pectinata Ten.
 [2], 17.06.12, Avr.-Sib., OUFE: 20318.
Orobanche alba Stephan ex Willd.
 [2], 17.06.12, OUFE: 20171.
O. anatolica Boiss. & Reut.
 [1], 17.06.12, OUFE: 20172.
O. caryophyllacea Sm.
 [20], 23.06.15, OUFE: 20173.
O. elatior Sutton
 [15], 07.06.15, OUFE: 20174.
O. minor Sm.
 [98], 07.08.15, OUFE: 20175.
O. ramosa L.
 [115], 11.06.13, OUFE: 20176.
Parentucellia latifolia Caruel
 [1], 17.06.12, Akd., OUFE: 20288.
Pedicularis comosa L. var. *sibthorpii* (Boiss.) Boiss.
 [1], 17.06.12, OUFE: 20264.
 ACANTHACEAE
Acanthus hirsutus Boiss.
 [17], 02.07.13, End., LC, OUFE: 19619.
 VERBENACEAE
Verbena officinalis L.
 [117], 02.05.15, OUFE: 20255.
 CAMPANULACEAE
Asyneuma limonifolium (L.) Janchen subsp. *pestalozzae* (Boiss.) Damboldt
 [14], 23.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 19747.
A. linifolium (Boiss. & Heldr.) Bornm.
 [67], 28.06.12 D. Akd., End., LC, OUFE: 19748.
A. lobelioides (Willd.) Hand.-Mazz.
 [14], 23.06.15, OUFE: 19749.
Campanula argentea Lam.
 [78], 03.07.13, İr.-Tur., End., LC.
C. fastigiata Dufour ex Schult.
 [78], 03.07.13, OUFE: 19795.
C. lyrata Lam.
 [14], 23.06.15, End., LC, OUFE: 19796.
Legousia speculum veneris (L.) Durande ex Vill.
 [2], 18.05.13, Akd., OUFE: 20082.
 ASTERACEAE
Achillea arabica Kotschy
 [58], 31.05.15, İr.-Tur., OUFE: 19620.
Ac. biebersteinii Afan.
 [44], 25.06.15, OUFE: 19621.
Ac. gypsicola Hub.-Mor.
 [78], 10.06.15, İr.-Tur., End., VU, OUFE: 19622.
Ac. ketenoglui H.Duman
 [76], 10.06.15, İr.-Tur., End., EN, OUFE: 19623.
Ac. millefolium L.
 [23], 23.06.15, Avr.-Sib., OUFE: 19624.
Ac. phrygia Boiss. & Balansa
 [15], 06.06.12, İr.-Tur., End., LC, OUFE: 19627.
Ac. santolinoides subsp. *wilhelmsii* (K.Koch) Greuter [Syn: *Achillea wilhelmsii* K.Koch]
 [15], 06.06.12, İr.-Tur., OUFE: 19628.
Anthemis aciphylla Boiss.
 [69], 02.05.15, OUFE: 19695.
A. cretica subsp. *anatolica* (Boiss.) Grierson
 [69], 02.05.15, OUFE: 19696.
A. cretica subsp. *tenuiloba* (DC.) Grierson
 [93], 26.04.15, OUFE: 19698.
A. kotschyana Boiss. var. *gypsicola* H.Duman
 [76], 07.06.12, İr.-Tur., End., EN, OUFE: 19699.
A. pauciloba var. *microstephana* (Eig) Grierson
 [156], 26.06.15 D. Akd., End., LC, OUFE: 19701.
Artemisia absinthium L.
 [143], 25.08.12, OUFE: 19711.
Ar. campestris L.

- [143], 25.08.12, OUFÉ: 19712.
Ar.santonicum L.
[59], 02.05.15, OUFÉ: 19713.
Ar. scoparia Waldst. & Kitam.
[3], 18.05.13, OUFÉ: 19714.
Bombycilaena erecta (L.) Smoljan.
[65], 05.03.13, OUFÉ: 19766.
Carduus nutans L.
[15], 06.06.12, OUFÉ: 19981.
Carlina oligocephala Boiss. & Kotschy
[61], 18.05.13, OUFÉ: 19700.
Carthamus lanatus L.
[61], 18.05.13, OUFÉ: 19804.
C. persicus Desf. ex Willd.
[25], 03.06.15, OUFÉ: 19807.
Centaurea benedicta (L.) L.
[25], 03.06.15, OUFÉ: 19697.
C.calcitrapa L.
[145], 07.08.13, OUFÉ: 19808.
C. carduiiformis DC.
[55], 23.05.15, OUFÉ: 19808.
C. depressa M.Bieb.
[30], 13.07.13, OUFÉ: 19809.
C. drabifolia subsp. *cappadocica* (DC.) Wagenitz
[44], 25.06.15, End., LC, OUFÉ: 19810.
C. drabifolia subsp. *floccosa* (Boiss.) Wagenitz & Greuter
[44], 25.06.15, End., LC, OUFÉ: 19811.
C. iberica Trax. ex
[20], 06.06.12, İr.-Tur., OUFÉ: 19812.
C. kotschy var. *pesica* (Boiss.) Greuter
[20], 06.06.12, İr.-Tur., OUFÉ: 19813.
C. nivea (Bornm.) Wagenitz
[18], 26.06.15, End., CR, OUFÉ: 19814.
C. patula DC.
[65], 05.03.13, OUFÉ: 19815.
Centaurea sericea Wagenitz
[145], 07.08.13, OUFÉ: 19817.
C. solstitialis L.
[27], 03.07.13, OUFÉ: 19818.
C. urvilei (Syn: *Centaurea urvilei* subsp. *stepposa*)
[58], 10.07.13, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 19819.
C. virgata Lam.
[5], 17.06.12, İr.-Tur., OUFÉ: 19820.
Chardinia orientalis (L.) Kuntze
[65], 05.03.12, İr.-Tur., OUFÉ: 19835.
Chondrilla juncea L.
[63], 07.06.12, OUFÉ: 19840.
Cichorium intybus L.
[40], 09.07.15, OUFÉ: 19844.
Cirsium arvense (L.) Scop.
[61], 18.05.13, OUFÉ: 19846.
Cirsium sintenisii Freyn
[137], 23.09.12, OUFÉ: 19849.
Cirsium vulgare (Savi) Ten.
[145], 07.08.13, OUFÉ: 19850.
Cota tinctoria (L.) J.Gay
[46], 26.06.15, OUFÉ: 19881.
Cousinia iconica Hub.-Mor.
[34], 07.08.12, İr.-Tur., End., NT, OUFÉ: 19883.
Crepis foetida subsp. *rheoadifolia* (M.Bieb.) Čelak.
[18], 23.06.15, OUFÉ: 19889.
Crepis macropus Boiss. & Heldr.
[17], 25.08.12, OUFÉ: 19890.
Crupina crupinastrum (Moris) Vis.
[17], 07.06.15, OUFÉ: 19898.
Cyanus depressus (M.Bieb.) Soják
[24], 22.06.15, OUFÉ: 19905.
Cy. pichleri (Boiss.) Holub
[25], 03.06.15, OUFÉ: 19906.
Cy. thirkei (Sch.Bip.) Holub
[51], 23.05.15, OUFÉ: 19907.
Cy. triumfettii (All.) Dostál ex Á.Löve & D.Löve
[55], 18.05.15, OUFÉ: 19908.
Cymbolaena griffithii (A.Gray) Wagenitz
[24], 22.06.15, OUFÉ: 19908.
Echinops microcephalus Sm.
[145], 07.08.13, OUFÉ: 19941.
E. pungens Trautv.
[17], 25.08.12, İr.-Tur., OUFÉ: 19942.
E. ritro L.
[17], 25.08.12, OUFÉ: 19943.
Filago pyramidata L.
[86], 10.06.15, OUFÉ: 19979.
Gundelia tournefortii L.
[13], 23.05.15, İr.-Tur., OUFÉ: 20019.
Helichrysum arenarium (L.) Moench
[*Helichrysum arenarium* (L.) Moench. subsp. *aucheri* (Boiss.) Davis & Kupicha] [2], 19.05.13, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20035.
H. chionophyllum Boiss. & Balansa [152], 08.07.15, End., LC, OUFÉ: 20036.
H. graveolens (M.Bieb.) Sweet [152], 08.07.15, End., LC, OUFÉ: 20037.
Hieracium pannosum Boiss. [44], 09.07.15 D. Akd., OUFÉ: 20044.
Inula ensifolia L. [13], 02.07.13, Avr.-Sib., OUFÉ: 20062.
I. oculus-christi L. [13], 02.07.13, OUFÉ: 20063.
Jurinea consanguinea DC. [17], 25.06.15, OUFÉ: 20073.
J. pontica Hausskn. & Freyn ex Hausskn. [89], 07.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20075.
Klasea yunusemrei [23], 22.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20076.
Koelpinia linearis Pall. [52], 23.05.15, İr.-Tur., OUFÉ: 20077.
Lactuca serriola L. [28], 09.07.15, Avr.-Sib., OUFÉ: 20045.
Leontodon asperrimus (Willd.) J. Ball [87], 28.06.13, İr.-Tur., OUFÉ: 20083.
L. crispus Vill. [89], 07.06.15, OUFÉ: 20084.
Onopordum tauricum Willd. [17], 06.06.12, Avr.-Sib., OUFÉ: 20153.
Picnoman acarna (L.) Cass. [80], 08.07.15, Akd., OUFÉ: 20196.
Picris strigosa M.Bieb. [65], 05.03.13, İr.-Tur., OUFÉ: 20198.
Pilosella hoppeana (Schultes) C. H. ET F. W. Schultz [89], 07.06.15, OUFÉ: 20199.
Podospermum canum C.A.Mey. [28], 09.07.15, OUFÉ: 20210.
Ptilostemon afer (Jacq.) Greuter [138], 18.04.14, End., LC, OUFÉ: 20221.
Pulicaria dysenterica (L.) Gaertn. [156], 21.10.12, OUFÉ: 20222.
Rhaponticum repens (L.) Hidalgo (Syn: *Acroptilon repens* L.) [9], 23.06.15, İr.-Tur., OUFÉ: 20232.
Scolymus hispanicus L. [14], 02.07.13, Akd., OUFÉ: 20276.
S. eriophora DC. [53], 31.05.15, End., LC, OUFÉ: 20277.
S. laciniata L. [50], 31.05.15, OUFÉ: 20278.
Scorzonera pygmaea subsp. *nutans* (Czeczott) D.F.Chamb. [45], 18.04.15, End., NT, OUFÉ: 20279.
S. semicana DC. [10], 03.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20280.
S. suberosa K.Koch [76], 31.05.15, İr.-Tur., OUFÉ: 20281.
S.tomentosa L. [61], 25.06.15, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20282.
Senecio leucanthemifolius subsp. *vernalis* (Waldst. & Kit.) Greuter (Syn: *Senecio vernalis* Waldst. & Kit.) [11], 07.06.15, OUFÉ: 20295.
S. viscosus L. [10], 18.04.15, OUFÉ: 20297.
Sonchus asper (L.) Hill subsp. *glaucescens* (Jordan) Ball [10], 18.04.15, OUFÉ: 20296.
Stizolophus coronopifolius (Lam.) Cass. [100], 08.07.15, OUFÉ: 20324.
Taraxacum bessarabicum (Hornem.) Hand.-Mazz. [123], 23.05.15, OUFÉ: 20328.
T. farinosum Hausskn. & Bornm. ex Hand.-Mazz. [123], 23.05.15, İr.-Tur., End., LC, OUFÉ: 20045.
T. serotinum (Waldst. & Kit.) Poir. [100], 08.07.15, OUFÉ: 20330.
Tragopogon dubius Scop. [73], 31.05.15, OUFÉ: 20346.
T. latifolius Boiss. [79], 31.05.15, İr.-Tur., OUFÉ: 20347.
T. porrifolius subsp. *longirostris* (Sch.Bip.) Greuter [11], 07.06.15, OUFÉ: 20361.
Tussilago farfara L. [80], 14.04.12, Avr.-Sib., OUFÉ: 20361.
Xanthium spinosum L. [70], 25.06.15, D.O. 1577, OUFÉ: 20381.
X. strumarium L. [80], 31.05.15, OUFÉ: 20382.
Xeranthemum inapertum (L.) Mill. [41], 07.08.12, OUFÉ: 20384.
CAPRIFOLIACEAE
Cephalaria aristata K.Koch [138], 07.08.13, OUFÉ: 19825.
C. aytachii Göktürk & Sümbül [63], 07.06.12, İr.-Tur., End., CR, OUFÉ: 19826.
C. syriaca (L.) Schrad. ex Roem. & Schult. [12], 07.06.15, OUFÉ: 19827.
C. transsylvanica (L.) Schrad. ex Roem. & Schult. [14], 02.07.13, OUFÉ: 19828.
Dipsacus laciniatus L. [144], 07.08.13, D.O. 679, OUFÉ: 19928.
Morina persica L. [17], 02.07.13, İr.-Tur., OUFÉ: 20127.
Scabiosa argentea L. [2], 18.05.13, OUFÉ: 20265.
S. calocephala Boiss. [17], 23.06.15, İr.-Tur., OUFÉ: 20266.
S. hololeuca Bornm. [45], 08.07.15, İr.-Tur., End., EN, OUFÉ: 20267.
S. pseudograminifolia Hub.-Mor. [55], 31.05.15, OUFÉ: 20268.
S. rotata M. Bieb. [12], 06.06.12, İr.-Tur., OUFÉ: 20269.
Valerianella coronata DC. [15], 18.04.15, OUFÉ: 20363.
V. vesicaria Moench [159], 03.05.15, OUFÉ: 20364.
APIACEAE
Anethum graveolens L. [78], 03.07.13, OUFÉ: 19694.

- Artemisia squamata* L.
[12], 23.06.15, OUFU: 19710.
- Astrodaucus orientalis* (L.) Drude
[133], 10.07.13, İr.-Tur., OUFU: 19745.
- Berula erecta* (Huds.) Coville
[87], 25.06.15, OUFU: 19761.
- Bifora radians* M.Bieb.
[72], 08.07.15, OUFU: 19762.
- Bupleurum croceum* Fenzl
[87], 25.06.15, İr.-Tur., OUFU: 19782.
- B. croceum* Fenzl
[87], 25.06.15, İr.-Tur., OUFU: 19782.
- B. euboicum* Beauverd & Topali
[72], 08.07.15, Akd., OUFU: 19783.
- B. gerardii* All.
[78], 03.07.13, OUFU: 19784.
- B. rotundifolium* L.
[84], 02.06.13, OUFU: 19785.
- B. sulphureum* Boiss. & Balansa
[84], 02.06.13, İr.-Tur., End., LC, OUFU: 19786.
- B. turcicum* Snogerup
[88], 02.07.13, İr.-Tur., End., NT, OUFU: 19787.
- Chaerophyllum byzantinum* Boiss.
[27], 09.07.15, OUFU: 19833.
- Conium maculatum* L.
[72], 08.07.15, OUFU: 19862.
- Daucus carota* L.
[7], 18.05.13, OUFU: 19915.
- Echinophora tenuifolia* subsp. *sibthorpiana* (Guss.) Tutin
[72], 08.07.15, İr.-Tur., OUFU: 19938.
- E. tournefortii* Jaub. & Spach
[157], 07.06.12, Akd., OUFU: 19939.
- Eryngium bithynicum* Boiss.
[107], 03.07.13, İr.-Tur., End., LC, OUFU: 19939.
- E. campestre* L. var. *virens* (Link) Weins
[94], 07.06.12, OUFU: 19956.
- Falcaria vulgaris* Bernh.
[9], 25.08.12, OUFU: 19974.
- Ferula szowitziana* DC.
[59], 25.06.15, End., LC, OUFU: 19975.
- Malabaila secacul* Banks & Sol.
[123], 07.08.13, OUFU: 20105.
- Prangos meliocarpoides* Boiss.
[45], 23.04.12, İr.-Tur., End., LC, OUFU: 19694.
- Scandix pecten-veneris* L.
[45], 23.04.12, OUFU: 20270.
- S. stellata* Banks & Sol.
[1], 18.05.13, OUFU: 20271.
- Seseli tortuosum*
[1], 18.05.13, OUFU: 20383.
- Torilis leptophylla* (L.) Rchb. f.
[7], 18.05.13, OUFU: 20197.
- Turgenia latifolia* (L.) Hoffm.
[1], 06.06.12, OUFU: 20359.

3.1. The Localities List

3.1.1. The Localities where the plants were collected

The entire study area is located within the borders of Eskişehir province; and is in the A3 and B3 square according to the squaring system of Davis (Figure 1.)

- L1.** Eskişehir City Center; Musaözü Surroundings Opposite Riding Club, N 39°43'30.64"- E 030°20'38.33", 892 m.
- L2.** Eskişehir City Center; Between Musaözü-Takmak, N 39°41'59.93"- E 030°22'3.67", 895 m.
- L3.** Eskişehir City Center; Yenisofça Outlet, Inside The Forest, N 39°36'32.94"- E 030°22'0.11", 875 m.
- L4.** Eskişehir City Center; Yenisofça Water Tank, N 39°37'51.62"- E 030°21'54.70", 880 m.
- L5.** Eskişehir City Center; Yörük Akçayır Neighborhood Surroundings, N 39°43'37.08"- E 030°20'49.19", 882 m.
- L6.** Eskişehir City Center; Takmak Village Road Turning, White Soils, N 39°43'20.23"- E 030°20'39.71", 894 m.
- L7.** Eskişehir City Center; Gülpınar Surroundings, N 39°42'21.54"- E 030°35'27.82", 891 m.
- L8.** Alpu; Bozan Afforestation Field, N 39°47'54.6"- E 31°07'16.4"; 885 m.
- L9.** Alpu; Bozan Afforestation Field, Eastern Slope, N 39°47'41.7"- E 31°08'01.6"; 890 m.
- L10.** Alpu; Bozan Afforestation Field, Southern Slope, N 39°47'44.2"- E 31°06'18.1"; 903 m.
- L11.** Alpu; Bozan Afforestation Field, Southern-Eastern Slope, N 39°48'31.6"- E 31°07'06.5"; 925 m.
- L12.** Alpu; Bozan Afforestation Field, Northern Slope, N 39°48'14.6"- E 31°07'29.6"; 927 m.
- L13.** Alpu; Bozan Afforestation Field, Southern Western Slope, N 39°47'55.1"- E 31°07'23.4"; 845 m.
- L14.** Alpu; Bozan Afforestation Field, Western Slope, N 39°48'10.1"- E 31°06'37.7"; 924 m.
- L15.** Alpu; Bozan; N 39°48'34.07"- E 31°8'46.64", 788 m.
- L15.** Alpu; Alapınar Village Forest Area, N 40°00'52.42"- E 030°50'42.69", 1093 m.
- L16.** Alpu; Bozan Afforestation Field, N 39°47'40.99"- E 031°06'18.20", 891 m.
- L17.** Alpu; Bozan Afforestation Field, N 39°47'45.94"- E 031°06'41.12", 842 m.
- L18.** Alpu; Bozan Afforestation Field, N 39°48'9.78"- E 031°06'35.5", 916 m.
- L19.** Alpu; Bozan Road Left Hills, N 39°48'15.26"- E 031°04'37.30", 843 m.
- L20.** Alpu; Bozan Road Left Hills, N 39°48'9.111"- E 031°03'38.75", 829 m.
- L21.** Alpu; Bozan Road Left Hills, N 39°48'9.111"- E 031°03'38.75", 829 m.
- L22.** Alpu; Bozan Afforestation Field, N 39°47'58.06"- E 031°06'2.109", 897 m.
- L23.** Alpu; Bozan Afforestation Field, N 39°48'27.77"- E 031°06'39.75", 919 m.
- L24.** Alpu; Bozan Afforestation Field, N 39°48'19.58"- E 031°07'26.68", 926 m.
- L25.** Alpu; Mihalicık Road Bozan Road Junction, Bozan Opposite Slopes, N 39°49'2.440"- E 031°05'15.74", 858 m.
- L26.** Beylikova; Aşağıdoğanoğlu Road Junction, N 39°49'28.01"- E 031°10'20.89", 858 m.
- L27.** Beylikova; Aşağıdoğanoğlu Village Forest Area Road Surroundings, N 39°51'19.49"- E 031°11'43", 939 m.
- L28.** Beylikova; Between Aşağıdoğanoğlu-Yukarıdoğanoğlu, Forest Area Road, N 39°52'40.90"- E 031°12'57.13", 1026 m.
- L29.** Beylikova; Aşağı Dudaş Village Surroundings, N 39°50'22"- E 031°13'55.00", 926 m.
- L30.** Beylikova; Aşağı Doğanoğlu Village Surroundings, N 39°50'10.4"- E 31°12'57.7", 930 m.
- L31.** Beylikova; Aşağı Doğanoğlu Village, N 39°50'23.15"- E 31°11'15.01", 850 m.
- L32.** Beylikova; Aşağı Doğanoğlu Forest Afforestation Field, N 39°52'32.2"- E 31°12'20.8", 1350 m.
- L33.** Beylikova; Between Yukarı Doğanoğlu-Sultaniye Village, N 39°48'33.38"- E 031°12'35.88", 931 m.
- L34.** Beylikova; Aşağı Dudaş Village Surroundings, N 39°50'23.9"- E 31°34'03.3", 934 m.
- L35.** Beylikova; Yukarı Dudaş Village Parting Of The Ways, N 39°49'44.3"- E 31°17'15.8", 947 m.
- L36.** Beylikova; Between Beylikova-Alpu, N 39°48'20.4"- E 31°18'53.3", 918 m.
- L37.** Beylikova; Emircik Village, N 39°42'46.6"- E 31°16'36.9", 750 m.
- L38.** Beylikova; Yeniuyurt Village; N 39°42'24.10"- E 31°20'8.98", 752 m.
- L39.** Beylikova; Adahisar, Yalnız Village Outlet, N 39°41'52.69"- E 31°24'59.70", 705 m.
- L40.** Mihalgazi; Alpuğut, N 40°00'40.9"- E 30°30'33.3", 206 m.
- L41.** Mihalgazi; Çay Village Entrance, N 40°02'17.52"- E 30°29'4.73", 158 m.
- L42.** Mihalgazi; Sakarı Karacaören Village, N 40°0.1'16.7"- E 30°55'16.7", 470 m.
- L43.** Mihalicık; Between Biçer Village-Ahurözü Village, N 39°43'52.7"- E 31°42'31.5", 827 m.
- L44.** Mihalicık; Between Biçer Village-Üçbaşlı Village, N 39°44'16.7"- E 31°42'43.1", 862 m.
- L45.** Mihalicık; Between Ahrır Village-Ömerler Village, N 39°43'04.7"- E 31°46'20.1", 803 m.
- L46.** Mihalicık; Üçbaşlı Village Surroundings, N 39°45'16.8"- E 31°39'51.9", 909 m.
- L47.** Mihalicık; Karageyikli, N 39°50'49.04"- E 31°17'54.11", 983 m.
- L48.** Mihalicık; Between Biçer Village-Ahurözü Village, N 39°44'06.6"- E 31°42'24.9", 840 m.
- L49.** Sivrihisar; Demirciler Village Girişi, N 39°35'44.1"- E 31°47'12.5", 818 m.

- L50.** Sivrihisar; Demirciler Village-Ortaklar Village Between, N 39°35'31.58"- E 031°46'24.72", 812 m.
- L51.** Sivrihisar; Demirciler Village Entrance , N 39°35'31.9"- E 31°47'08.1", 799 m.
- L52.** Sivrihisar; Between Demirci Village-Ankara Road, N 39°35'31.55"- E 031°47'38.89", 839 m.
- L53.** Sivrihisar; Demirciler Village, N 39°35'44.5"- E 31°47'16.1", 820 m.
- L54.** Sivrihisar; Demirciler Village Surroundings, N 39°35'51.4"- E 31°48'07.4", 829 m.
- L55.** Sivrihisar; Ankara-Eskişehir Road, Demirci Village, N 39°35'5.70"- E 031°46'3.21", 747 m.
- L56.** Sivrihisar; Ankara-Eskişehir Road, Demirci Village Surroundings, N 39°35'32.17"- E 031°47'37.18", 838 m.
- L57.** Sivrihisar; Aşağıkepen Village Surroundings, N 39°22'32.6"- E 31°30'03.7", 955 m.
- L58.** Sivrihisar; Aşağıkepen Village Slopes, N 39°22'26.9"- E 31°30'14.1", 954 m.
- L59.** Sivrihisar; Eskişehir-İzmir Road Slopes, N 39°21'53.9"- E 31°29'38.2", 925 m.
- L60.** Sivrihisar; Eskişehir-İzmir Road Slopes, A. Kepen Village Surroundings, N 39°22'04.2"- E 31°29'21.8", 958 m.
- L61.** Sivrihisar; Aşağıkepen Road Right Slopes, N 39°22'9.6"- E 31°28'58.1", 910 m.
- L62.** Sivrihisar; Aşağıkepen Village, N 39°22'58.60"- E 31°29'40.28", 916 m.
- L63.** Sivrihisar; Aşağıkepen Village, N 39°21'5.098"- E 031°31'15.67", 946 m.
- L64.** Sivrihisar; Between Aşağıkepen- Yeşilköy, N 39°18'31.07"- E 31°30'28.67", 862 m.
- L65.** Sivrihisar; Aşağıkepen Surroundings, N 39°22'34.75"- E 031°30'3.538", 942 m.
- L66.** Sivrihisar; Aşağıkepen Village N 39°21'9.6"- E 31°29'5.6", 910 m.
- L67.** Sivrihisar; Between Sivrihisar-Aşağıkepen, N 39°23'18.02"- E 031°30'18.66", 943 m.
- L68.** Sivrihisar; Ballıhisar Village Surroundings, N 39°20'19.1"- E 31°35'5.2", 980 m.
- L69.** Sivrihisar; Yeşilköy Surroundings, N 39°17'47.77"- E 31°28'33.04", 830 m.
- L70.** Sivrihisar; Between Yeşilköy-Ballıhisar Village, N 39°18'15.1"- E 31°30'39.6", 857 m.
- L71.** Sivrihisar; Yeşilköy Outlet, Airport Surroundings, N 39°17'44.2"- E 31°29'17.4", 846 m.
- L72.** Sivrihisar; Between Yeşilköy-Ballıhisar Village, Left Slopes, N 39°18'21.4"- E 31°31'01.2", 850 m.
- L73.** Sivrihisar; Between Yeşilköy-Ballıhisar Village, N 39°18'38.7"- E 31°32'16.2", 956 m.
- L74.** Sivrihisar; Between Ballıhisar Village-Yeşilköy, Slopes, N 39°19'15.6"- E 31°34'11.9", 928 m.
- L75.** Sivrihisar; Between Ballıhisar Village-Ertuğrul Village, Slopes, N 39°19'38.02"- E 031°35'7.490", 957 m.
- L76.** Sivrihisar; Between Çaykoz Surroundings -Ballıhisar Village, N 39°17'47.82"- E 031°36'31.04", 884 m.
- L77.** Sivrihisar; Ballıhisar Village Surroundings, N 39°20'24.6"- E 31°34'52.6", 970 m.
- L78.** Sivrihisar; Ertuğrul Village Surroundings, N 39°19'17.1"- E 31°34'08.4", 837 m.
- L79.** Sivrihisar; Ertuğrul Village Center, N 39°17'47.3"- E 31°36'03.6", 885 m.
- L80.** Sivrihisar; Between Ertuğrul Village-Çaykoz Village, N 39°17'55.4"- E 31°36'07.5", 930 m.
- L81.** Sivrihisar; Ballıhisar Village Surroundings, N 39°19'08.1"- E 31°34'49.5", 926 m.
- L82.** Sivrihisar; Between Ballıhisar Village-Ertuğrul Village , N 39°19'20.8"- E 31°34'50.1", 935 m.
- L83.** Sivrihisar; Ballıhisar Village Outlet, Slopes, N 39°19'35.1"- E 31°35'07.2", 955 m.
- L84.** Sivrihisar; Afyon Road Aşağıkepen Village, N 39°22'42.64"- E 31°29'54.20", 943 m.
- L85.** Sivrihisar; Ertuğrul Village, N 39°17'2.26"- E 31°34'44.73", 920 m.
- L86.** Sivrihisar; Ertuğrul Village, N 39°17'3.66"- E 31°34'52.64", 937 m.
- L87.** Sivrihisar; Between Ertuğrul Village-Ballıhisar, N 39°19'9.23"- E 31°34'48.06", 912 m.
- L88.** Sivrihisar; Between Dinek Village-Ertuğrul village, N 39°20'43.1"- E 31°39'1.3", 914 m.
- L89.** Sivrihisar; Between Ertuğrul Village- Arayit Mountain; 3.Km Left Slopes, N 39°17'08.7"- E 31°37'12.5", 905 m.
- L90.** Sivrihisar; Between Ahiler Village-Ertuğrul Village, Right Slopes, N 39°15'49.2"- E 31°37'05.5", 856 m.
- L91.** Sivrihisar; Between Yeşilköy-Kurtşeyh, Airport Surroundings; N 39°18'16.7"- E 31°30'28.8", 863 m.
- L92.** Sivrihisar; İlören Village-Ahurözü Village Road, N 39°43'45.7"- E 31°42'21.4", 819 m.
- L93.** Sivrihisar; İlören Village Environment, Train Road Surroundings, N 39°42'44.1"- E 31°46'25.9", 780 m.
- L94.** Sivrihisar; Between İlören Village-Ahrözü Village, N 39°43'44.7"- E 31°42'17.2", 787 m.
- L95.** Sivrihisar; Biçer Village Surroundings, N 39°43'47.8"- E 31°42'22.2", 850 m.
- L96.** Sivrihisar; Between İlören Village-Biçer Village, Slopes, N 39°41'20.4"- E 31°43'28.6", 730 m.
- L97.** Sivrihisar; Gölçayır Village Surroundings, N 39°15'14.7"- E 31°23'56.9", 839 m.
- L98.** Sivrihisar; Between Gölçayır Village-Buhara Village, N 39°13'13.4"- E 31°25'38.7", 825 m.
- L99.** Sivrihisar; Buhara Village Surroundings, N 39°11'13.5"- E 31°30'01.9", 841 m.
- L100.** Sivrihisar; Buzluca Village Surroundings , N 39°12'45.3"- E 31°27'28.7", 840 m.
- L101.** Sivrihisar; Between Kurtşeyh Village-Ahiler Village , N 39°11'35.2"- E 31°35'23.7", 823 m.
- L102.** Sivrihisar; Nasrettin Hoca Village, N 39°31'35.2"- E 31°39'58.5", 881 m.
- L103.** Sivrihisar; Between Nasrettin Hodja Village -Hamamhisar, N 39°29'53.3"- E 31°40'31.1", 948 m.
- L104.** Sivrihisar; Nasrettin Hodja Village, Subaşı, N 39°30'00.0"- E 31°40'16.2", 940 m.
- L105.** Sivrihisar; Oğlankçı Village, N 39°34'54.05"- E 31°33'3.27", 1125 m.
- L106.** Sivrihisar; Pessinus Surroundings, N 39°19'53.97"- E 31°35'0.80", 943 m.
- L107.** Sivrihisar; İlören, Çevre Road İlören, N 39°33'8.90"- E 31°45'11.96", 775 m.
- L108.** Sivrihisar; Elcik Road, N 39°34'49"- E 31°46'002", 775 m.
- L109.** Sivrihisar; İlören Village, N 39°42'43.19"- E 31°46'26.40", 772 m.
- L110.** Sivrihisar; Ahrözü Road, N 39°44'51.68"- E 031°43'28.34", 930 m.
- L111.** Sivrihisar; Ahrözü Village, Üçbaşı Village Road, N 39°47'37.77"- E 031°41'21.03", 940 m.
- L112.** Sivrihisar; Ahr Village, N 39°46'23.85"- E 031°33'22.98", 782 m.
- L113.** Sivrihisar; Ortaklar Village Surroundings, N 39°38'0.08"- E 031°46'12.77", 733 m.
- L114.** Sivrihisar; Between Gencali Village Way, Ahrözü, N 39°43'0.58"- E 031°46'0.33", 804 m.
- L115.** Sivrihisar; Kavuncu Village-Bedil Surroundings, N 039°24'51.21"- E 031°56'58.85", 708 m.
- L116.** Sivrihisar; Gümüşkonak, Kayakent Surroundings, N 39°19'4.138"- E 031°48'55.57", 983 m.
- L117.** Sivrihisar; Nasrettin Hodja Village Surroundings, N 39°29'54.85"- E 031°40'20.57", 944 m.
- L118.** Sivrihisar; Nasrettin Hodja Village, Slopes, N 39°29' 47.59"- E 031°40'41.42", 953 m.
- L119.** Sivrihisar; Between Hamamkarahisar-Çardaközü, Slopes, N 39°26'18.90"- E 031°45'19.31", 902 m.
- L120.** Sivrihisar; Çardaközü Village Hillsides, N 39°25'50.43"- E 031°46'19.00", 857 m.
- L121.** Sivrihisar; Yazır Village And Surroundings, The Hills, N 39°26'58.87"- E 031°48'44.94", 827 m.
- L122.** Sivrihisar; Mülk Village Surroundings, Slopes, N 39°35'31.39"- E 031°47'16.22", 810 m.
- L123.** Sivrihisar; Between Ortaklar Village Againsts, Demirci, N 39°36'5.742"- E 031°45'20.61", 829 m.
- L124.** Sivrihisar; Ortaklar Village Surroundings, N 39°38'2.875"- E 31°45'59.95", 740 m.
- L125.** Sivrihisar; Yazır Village Surroundings, N 39°26'15.9"- E 31°48'13.6", 840 m.

- L126.** Sivrihisar; Yazır Village-Çardak Özü Village Surroundings, N 39°25'36.3"- E 31°47'13.5", 833 m.
- L127.** Sivrihisar; Altaşı Özü Village, N 39°18'40"- E 31°32'24", 970 m.
- L128.** Sivrihisar; Between Karadat Village- Biçer Village, Slopes, N 39°39'16.0"- E 31°39'04.2", 840 m.
- L129.** Sivrihisar; Forest Road On Yarımcıca Road, N 39°54'34.48"- E 030°37'15.44", 1275 m.
- L130.** Sivrihisar; Between Ballıhisar-Çaykoz, N 39°18'9.260"- E 031°36'46.52", 895 m.
- L131.** Sivrihisar; Arayit Mountation Road Surroundings, N 39°18'2.408"- E 031°49'55.15", 789 m.
- L132.** Sivrihisar; Between Hüdavendiğar Village-Demirci Village, N 39°35'03.1"- E 31°38'21.3", 1010 m.
- L133.** Sivrihisar; Yeşilköy Village Surroundings, N 39°17'45.00"- E 031°28'23.50", 842 m.
- L134.** Sivrihisar; Afyon Ankara Road Yeşilköy Slopes, N 39°21'16"- E 31°26'26", 850 m.
- L135.** Sivrihisar; Karadat Village Surroundings, N 39°38'21.2"- E 31°38'55.9", 910 m.
- L136.** Seyitgazi; Seyitgazi Outlet Slopes, N 39°25'24.27"- E 30°39'3.85", 965 m.
- L137.** Günyüzü; Çeltik Road Junction, N 039°25'34.82"- E 031°49'33.68", 803 m.
- L138.** Günyüzü; Çardaközü Village Surroundings, N 39°25'49.18"- E 031°46'42.64", 847 m.
- L139.** Günyüzü; Altınini Area, N 39°25'34.82"- E 031°21.9'33.72", 804 m.
- L140.** Günyüzü; Üç Kuyular Area, N 39°28'56.74"- E 031°52'25.40", 828 m.
- L141.** Günyüzü; Yeşilyaka Village Surroundings, N 39°19'14.72"- E 031°56'27.36", 883 m.
- L142.** Günyüzü; Kavuncu Village-Salty Area, N 39°24'54.6"- E 31°56'56.7", 710 m.
- L143.** Günyüzü; Kavuncu Village Surroundings, N 39°24'57.32"- E 031°57'45.34", 658 m.
- L144.** Günyüzü; Kavuncu Village Road, N 39°25'34.98"- E 031°49'33.61", 790 m.
- L145.** Günyüzü; Between Yazır Village-Kavuncu Village, N 39°27'21.28"- E 031°51'50.80", 825 m.
- L146.** Günyüzü; Kavuncu Village Road, N 39°25'33.58"- E 031°99'39.73", 790 m.
- L147.** Günyüzü; Between Kavuncu Village Fatih Village, N 039°24'36.60"- E 031°56'39.40", 704 m.
- L148.** Günyüzü; Kavuncu Village Surroundings, N 39°24'57.58"- E 031°53'40.34", 751 m.
- L149.** Günyüzü; Çardaközü Village, N 39°25'53.72"- E 031°46'42.13", 842 m.
- L150.** Günyüzü; Between Çardaközü Village-Gecek, N 39°25'32.97"- E 031°46'19.80", 905 m.
- L151.** Günyüzü; Ellezin Kaya, N 39°25'42.79"- E 031°51'47.09", 775 m.
- L152.** Günyüzü; Between Sazak Ahırköy, N 39°47'26.00"- E 031°36'36.34", 859 m.
- L153.** Günyüzü; Yazır Way Out, Left Slopes, N 39°25'57.44"- E 031°51'6.348", 815 m.
- L154.** Günyüzü; Between Çaykoz Village-Arayit Mountain Road, N 39°19'47.48"- E 031°43'16.87", 896 m.
- L155.** Günyüzü; Between Kadıncık Village-Hamamkarahisar Village, N 39°25'24.5"- E 31°42'14.9", 980 m.
- L156.** Günyüzü; Between Hamamkarahisar Village-Dutlu Village, N 39°24'28.7"- E 31°43'45.9", 980 m.
- L157.** Günyüzü; Dutlu Village Surroundings, N 39°23'36.8"- E 31°42'42.9", 1150 m.
- L158.** Günyüzü; Between Dutlu Village-Çardaközü Village, N 39°24'32.8"- E 31°43'44.5", 980 m.
- L159.** Günyüzü; Between Yazır Village-Günyüzü Turning, N 39°25'40.3"- E 31°49'29.3", 810 m.
- L160.** Günyüzü; Between Gecek Village-Atlas Village, N 39°21'33.1"- E 31°43'50.2", 1230 m.
- L161.** Günyüzü; Ayrıcalı Village Surroundings, N 39°20'58.7"- E 31°51'2.3", 850 m.
- Günyüzü; Northern Kavuncu Village, N 39°26'15.9"- E 31°54'21.3", 816 m.

The richest families in terms of number of species and underground taxa are given in Table 1. In terms of number of species and subspecies, 98 (% 13,29) species and subspecies taxa and Asteraceae family are the first order. Later on, Brassicaceae 70 (9.49%), Fabaceae 68 (9.22%), Lamiaceae 47 (6.73%), Poaceae 44 (5.97%), Caryophyllaceae 40 (3,66%), Boraginaceae 24 (3,25%), Ranunculaceae 19 (2,57%), Asparagaceae 19 (2,57%), Amaranthaceae 17 (2,30%), Papaveraceae 17), Plantaginaceae 16 (2,17%), Rosaceae 14 (1,89%), Euphorbiaceae 13 (1,76%) and others 283 (38,26%) were identified as taxa and species (Table 1.).

Table 1. The richest families in research

No	Family Name	Number of Species	Rate (%)
1	<i>Asteraceae</i>	98	13,29
2	<i>Brassicaceae</i>	70	9,49
3	<i>Fabaceae</i>	68	9,22
4	<i>Lamiaceae</i>	47	6,73
5	<i>Poaceae</i>	44	5,97
6	<i>Caryophyllaceae</i>	40	5,42
7	<i>Apiaceae</i>	27	3,66
8	<i>Boraginaceae</i>	24	3,25
9	<i>Ranunculaceae</i>	19	2,57
10	<i>Asparagaceae</i>	19	2,57
11	<i>Amaranthaceae</i>	17	2,30
12	<i>Papaveraceae</i>	17	2,30
13	<i>Plantaginaceae</i>	16	2,17
14	<i>Rosaceae</i>	14	1,89
15	<i>Euphorbiaceae</i>	13	1,76
16	Others	282	38,26
	Total	738	100

In terms of species and subspecies number of taxa, the first order is the order of 19 species and the subspecies taxa and Astragalus. *Allium* (14 spp.), *Salvia* and *Centaurea* (13 spp.), *Alyssum* and *Euphorbia* (12 spp.), *Ornithogalum* (9 spp.), *Convolvulus* and *Silene* (8 spp.), *Achillea*, *Aethionema*, *Medicago*, *Papaver*, *Veronica* (7 spp.), *Bupleurum*, *Crocus*, *Gagea*,

Gypsophila, *Orobanch*, *Scorzonera* (6 spp.), *Anthemis*, *Consolida*, *Dianthus*, *Hypericum*, *Scabiosa*, *Trifolium*, *Verbascum* (5 spp.), 484 species and subspecies were identified as taxa, while *Acantholimon*, *Bromus*, *Colchicum*, *Genista*, *Linaria*, *Nepeta*, *Onobrychis*, *Onosma*, *Poa*, *Ranunculus*, *Rosa*, *Scutellaria*, *Thlaspi*, *Tragopogon* (4 spp.) (Table 2).

Table 2. The richest species in the study area.

No	Genera	Number of Species	Rate (%)
1	<i>Astragalus</i>	19	2,57
2	<i>Allium</i>	14	1,89
3	<i>Centaurea</i> , <i>Salvia</i>	13	1,76
4	<i>Alyssum</i> , <i>Euphorbia</i>	12	1,62
5	<i>Ornithogalum</i>	9	1,22
6	<i>Convolvulus</i> , <i>Silene</i>	8	1,08
7	<i>Achillea</i> , <i>Aethionema</i> , <i>Medicago</i> , <i>Papaver</i> , <i>Veronica</i>	7	0,94
8	<i>Bupleurum</i> , <i>Crocus</i> , <i>Gagea</i> , <i>Gypsophila</i> , <i>Orobanch</i> , <i>Scorzonera</i>	6	0,81
9	<i>Anthemis</i> , <i>Trifolium</i> , <i>Consolida</i> , <i>Verbascum</i> , <i>Dianthus</i> , <i>Hypericum</i> , <i>Scabiosa</i>	5	0,67
10	<i>Acantholimon</i> , <i>Bromus</i> , <i>Colchicum</i> , <i>Genista</i> , <i>Linaria</i> , <i>Nepeta</i> , <i>Onobrychis</i> , <i>Onosma</i> , <i>Poa</i> , <i>Ranunculus</i> , <i>Rosa</i> , <i>Scutellaria</i> , <i>Thlaspi</i> , <i>Tragopogon</i>	4	0,54
	Others	475	64,45
	Total	738	100

Out of the 243 species and subspecies taxa whose phytographic regions are already known, 152 (20,6%) species and subspecies taxa were Iran-Turan phytogeographical area elements, 42 (5,6%) species and subspecies taxa were Mediterranean phytogeographical area elements, 38 (5,1%) species and subspecies taxa were from Europe-Siberia phytogeographical area element, and 478 (64,7%) species and subspecies taxa were unknown phytogeographical areas or were multiareal (Table 3).

Table 3. Distribution of Species and Subalpine Taxa in Research Area by Phytogeographic Region.

Phytogeographic Region	Number of Species	Rate (%)
Iran-Turan	152	20,6
Mediterranean	42	5,6
E. Mediterranean	27	3,6
Euro-Siberian	38	5,1
Multi-Region or Unknown	478	64,7
Total	738	100

Out of the 738 species and subspecies taxa that were detected in our study area, 130 were endemic and the rate of endemism of these species and subspecies taxa was determined as 17.61%.

The distribution of the endemic and non-endemic species according to the danger class specified by the IUCN was determined by using the "Plants of Turkey Red Book" (Ekim et al., 2000). Out of the 137 endemic taxa in the Study Area, 6 were EN, 9 were VU, 4 were CR, 22 were NT and 97 were in LC category.

4. Conclusions and discussion

According to the P. H. Davis's (1965) grid system, a large part of Eskişehir province is located in B3, a smaller part is located in south-east B4, and another smaller part is located in north part in A3 square. From March of 2012 to October of 2015, a total of 56 days' Field Study was conducted in the study area. As a result of the field studies, 1850 samples were collected and 354 genera of 72 families and 738 species and subspecies taxa of these species were identified in the diagnoses. Specified species were compared to those reported in similar studies conducted in the previous years near the study area.

The Asteraceae family ranked the first in terms of the number of taxa it possesses in the study area and in other studies conducted around the study area. Asteraceae family is the world's and Turkey's largest family, and the result is natural. The Brassicaceae, which ranks the second in terms of the taxa it has in the flora of Turkey (Yücel et al., 2010). When the ranks of the other families were examined, it was determined that they show approximately parallel family ranking in the flora of Turkey. The reason why Scrophulariaceae, which is important for the flora of Turkey, was not included in the list was due to the fact that the taxon list was prepared as based on the APG III system.

The taxonomic location of many genera, species and subspecies has changed in the APG III system. These results have caused that some families like Amaranthaceae that were normally not in the list among the first 10 were included in the list. All the previous studies compared in terms of location were in the same phytogeographical region with the study area. Parallel to this, in all studies, the richest phytogeographical region in terms of the number of the taxa is Iran-Turan elements. The Mediterranean Phytogeographical region ranks the second in terms of the number of the taxa; and the Euro-Siberian Phytogeographical region ranks the last in all previous studies.

When *Astragalus* is the first order, *Salvia*, *Silene*, *Centaurea*, *Allium* and *Alyssum* are followed by the most taxa-containing breeds found in the study. Turkey is *Astragalus* first place in the ranking of the Flora family that is in line with the results obtained from this study area. When investigated by other researches, *Salvia* took the first place and *Allium* was in the second place in the research field.

All of the 738 species and subspecies taxa determined in the study area were endemic and the endemism rate was 17.61%. This rate is lower than the 31.82% endemism rate in Turkey. The area that is the richest region in Turkey in terms of the phytogeographical region and the number of the endemic taxa is Iran and Turan phytogeographical area. The Mediterranean and Europe-Siberian phytogeographical area follow this area. In the light of the data received in the study area it is observed that this ranking, which depended on the endemism rate in Turkey, is similar to the findings.

Most of the step areas in the study area are used as agricultural areas especially if they are near the villages. Aside from these, the areas that are not suitable for agriculture and the surrounding areas are left open to grazing. In these unprotected areas, there is a defective vegetation. As a result of the cutting down of the trees (especially of the oaks) in order to burn at homes, forest formations were largely destroyed; and they are replaced by step formations where especially *Astragalus* dominated. There are no plant covers under the *Astragalus* groups, which reveals the extent of intense pressure and damage on the diversity of the species. Erdoğan (2011) and Türe (2002) conducted studies and made syntaxonomic and floristic analyses for the vegetation cover of Sivrihisar Mountains (Eskişehir); and mentioned about gypsicol step vegetation and flora in the area.

With the present study, the relationship between the gypsiferous and marn lands in Eskişehir and the vegetation cover has been determined; and the lack of data in the literature relevant to the vegetation cover and species diversity in this area has been resolved.

References

- Akputat, H. A., Celik, N. (2005). Flora of gypsum areas in Sivas in the eastern part of Cappadocia in Central Anatolia, Turkey. *Journal of Arid Environments*, 61(1), 27-46.
- Akman, Y., Ketenoğlu, O., Kurt, L., Vural, M. (2014). *İç Anadolu step vejetasyonu*. Palme.
- Bolukbasi A., Kurt L, S Palacio. 2016. Unravelling the mechanisms for plant survival on gypsum soils: an analysis of the chemical composition of gypsum plants from Turkey. *Plant Biol*, 18: 271 – 279.
- Davis, P.H. (1965-1985). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 1-9. Edinburgh: Edinburgh Univ. Press.
- Davis, P.H. (ed.), Mill, R.R., Tan, K. (1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands (supple. 1), Vol. 10. Edinburgh: Edinburgh Univ. Press.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., & Adigüzel, N. (2000). Türkiye bitkileri kırmızı kitabı (Egrelti ve Tohumlu Bitkiler).
- Erdoğan, N., Ketenoğlu, O., Bingöl, M. Ü., Geven, F., & Arslan, M. (2011). Sivrihisar Dağları (Eskişehir/Türkiye) Vejetasyon Tiplerinin Floristik Kompozisyonu Üzerine Bir Araştırma. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(2), 1-11.
- Erik, S. (1993). Ankara şehir florasının dünü bugünü. I. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 5-7.
- Eskişehir Provincial Environmental Status Report, 2011.
- Feinbrun-Dothan, N. 1977-1986. Flora Palaestina Vol. III-IV. The Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem.
- García, F., J.P., et al. 2018. A first inventory of gypsum flora in the Palearctic and Australia. *Mediterranean Botany*, Vol 39, No 1, 35-49.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M. T. 2012. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırma Derneği Yayını, İstanbul, 1290s.
- Haston, E., Richardson, J. E., Stevens, P. F., Chase, M. W., Harris, D. J. (2009). The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 128-131.
- Özaydın, B. U., Yücel, E. (2004). Mihalıççık İlçesinin (Eskişehir) Florası.
- Özdeniz E, Bölükbaşı A, Kurt L, Özbey BG. 2016. Jipsofil Bitkilerin Ekolojisi. *Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Dergisi*, 4: 57 – 62.
- Özgişi, K., Yaylacı, Ö., K., Sezer, O., Öztürk, D., Koyuncu, O., Ocaç, A., (2015). Flora of Yunussemre (Eskişehir) and Environs, Süleyman Demirel University Journal of Natural and Applied Sciences, Volume 21, Issue 1, 64-78, 2017.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Leblebici, E., Görk, G., Bekat, L. 2004. Tohumlu Bitkiler Sistematigi. Ege Üniversitesi Fen Fak. Kitaplar Serisi, No.: 116, İzmir, 432s.
- Smith, H. W., Weldon, M. D. (1941). A Comparison of Some Methods for the Determination of Soil Organic Matter1. *Soil Science Society of America Journal*, 5(C), 177-182.
- Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.B.(1964-1981). Flora Europaea. Vol. 1-5. Cambridge: University. Press.
- Türe, C. (2000). Floristic and Ecological Characters of Arayit Mountain and Its Environs (Central Anatolia, Eskişehir-Turkey). *The Scientific and Pedagogical News of Odlar Yurdu University*, 4, 108-132.
- Türe, C. (2002). Sivrihisar dağlarının (Eskişehir) Floristik ve Ekolojik Yönden İncelenmesi.
- Umay, A., & Uğurlu, E. (2010). Beylikova (Eskişehir) ilçesinin florasına katkılar. *Ot Sistematik Botanik Dergisi*, 17(1), 133-150.
- Yeşilyurt, E. B., Latif, K., Akaydın, G. (2008). A Study on Flora of Hacıkadın Valley (Ankara/Turkey), *Biological Diversity and Conservation*, 1 / 2 (2008) 25-52.
- Yücel, E., Güney, F., Yücel, Ş. L. (2010). The wild plants consumed as a food in Mihalıççık district (Eskişehir/Turkey) and consumption forms of these plants. *Biological Diversity and Conservation*, 3(3), 158-75.
- Zohary, M. (1966-1986). Flora Palaestina Vol. 1-4, Israel: Jerusalem Academic Press.

(Received for publication 10 May 2018; The date of publication 15 August 2018)

Makale Yazım Kuralları / *Instructions for Authors*

1. **Yayınlanmak üzere gönderilen makale (yazı) orijinal, daha önce hiçbir yerde yayınlanmamış olmalı veya işlem görüyor olmamalıdır.** Makaleler internet ortamında gönderilmelidir. Makale (yazı) ile ilgili tüm sorumluluk yazar(lar)a aittir.
1. *The original and all reproductions of the manuscripts must be legible. Two copies of the manuscript should be mailed or submitted personally to the relevant field editor. In the case of quotations all responsibility will be on the author(s)*
2. Yazar(lar) makalenin (yazının) telif haklarını dergi sahibine devrettiklerini bildiren "Telif Hakkı Devir Formu/The Copyright Agreement Form" nu imzalar ve bunu "PTT" posta ile dergi adresine gönderir. Islak imzalı "Telif Hakkı Devir Formu/The Copyright Agreement Form" olmayan makale işleme alınmaz.
2. *A Copyright Agreement (Telif Hakkı Devir Formu/The Copyright Agreement Form") will be signed among by the author(s) and it is sent to the journal address by postal service. Non-Copyright articles are not processed.*
3. Gönderilecek eserler, Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma dallarında olmalıdır. Eserler Türkçe veya İngilizce olarak sunulabilir.
3. *The manuscript submitted and written either in English or Turkish should be on Biological Diversity and Conservation*
4. Makale A-4 boyutundaki kağıda bilgisayar 1 aralıklı olarak yazılmalıdır. Sayfa kenar boşlukları 2 cm olmalıdır. Sayfaların üst sağ köşesine sayfa numarası konmalıdır. Font büyüklüğü 10 punto olmalıdır.
4. *Manuscripts should be printed on A4 papers with a minimum of 1 line spacing. Margins on the page should be 2cm. Page numbers must be placed in the upper right corner. Font size should be 10 pt.*
5. Makalenin ilk sayfasında yazının başlığı, yazarların adları ve adresleri, özet ve anahtar kelimeler bulunmalıdır. Yazı başlığı, özet ve anahtar kelimeler, hem Türkçe hem de İngilizce olarak yazılmalıdır. Yazışmaların yapılacağı yazar dipnot ile belirtilmeli ve kendisinin açık posta adresi ve elektronik posta adresi verilmelidir.
5. *First page of the manuscript should include title, authors' names and institutions, an abstract, and keywords. Title, abstract, and keywords must be provided both in English and Turkish. Corresponding author should be indicated by a footnote and besides his/her full mailing address, and an e-mail address should also be provided.*
6. **Özet** 400 kelimeyi geçmeyecek şekilde İngilizce ve Türkçe yazılmalıdır. Önce makalenin İngilizce adı, sonra İngilizce özet yazılmalı. Daha sonra makalenin Türkçe adı yazılmalı ve Türkçe özet yazılmalı.
6. *Abstract for a maximum of 400 words should be placed after the address of the author on one blank line. English name of the article first and then must be written in English abstracts. Later, the Turkish name of the article should be written, after Turkish abstract should be written.*
7. **Anahtar kelimeler** özetten sonra (5 kelime), yabancı dildeki özetten sonra ise o dildeki anahtar kelimeler bir satır boşluk bırakılarak yazılmalıdır.
7. *The English title, abstract and key words should follow the Turkish key words with the same style. Key words (Anahtar Kelimeler) should be written with blank line and should not exceed 5 words.*
8. **Metin** giriş bölümüyle başlamalı ve uygun bölümlere ayrılmalıdır. Bölümler, ardışık olarak numaralandırılmalıdır. Bölüm başlıkları numaralarıyla birlikte sola dayalı olarak küçük harflerle (**1. Giriş, 2. Materyal ve yöntem, 3. Bulgular, 4. Sonuçlar ve tartışma** şeklinde) ve koyu renkli yazılmalıdır. Alt bölümler, her bölüm içinde bölüm numarası da kullanılarak "1.1", "1.2" şeklinde numaralandırılmalı ve sola dayalı olarak yazılmalıdır. Son bölümde **Teşekkür** (varsa), **Kaynakça** ve **Ekler** (varsa) yer almalıdır.
8. *The text should start with the Introduction, and be divided into appropriate sections. Sections must be numbered consecutively. Section headings must be written in lower case with their numbers (as, 1. Introduction, 2. Material and method, 3. Results, 4. Conclusions and discussion) and must be written left justified and bold. Subsections must be numbered as "1.1", "1.2", etc., using the section number and must be written left justified and lower case. The final section must be Acknowledgements, References and Appendices must follow this section.*
9. **Şekiller**, grafikler, fotoğraflar ve çizelgeler metin içerisinde ilgili yere yerleştirilmelidir.
9. *Figures, tables and illustrations should be inserted to the appropriate positions where they are mentioned in the text.*
10. **Tüm çizimler, grafikler, fotoğraflar**, vb. şekil olarak değerlendirilmeli ve ardışık olarak numaralanmalıdır (Şekil 1.).
10. *All drawings, graphics, photographs, etc. should be regarded as figures. Figures should be numbered consecutively (as Figure 1.).*
11. **Tablolar** ardışık olarak "Tablo 1." şeklinde numaralandırılmalıdır.

11. Tables should be numbered as "Table 1." consecutively

12. Metin içinde diğer eserlere yapılan atıflar, yazar soyadı ve yıl kullanılarak "(Yazar, 2008)" veya "Yazar (2008)" şeklinde yapılmalıdır. İki yazarlı eserlerde iki yazarın soyadı da "(Yazar ve Yazar, 2008)" veya "Yazar ve Yazar (2008)" şeklinde kullanılmalıdır. Daha çok yazarlı eserler, yalnızca ilk yazarın soyadı verilerek "Yazar vd., 2008" şeklinde ve yine benzer biçimde yıl yazılarak kullanılmalıdır. Atıfta bulunulan eserler Kaynaklar bölümünde ilk yazarın soyadına göre alfabetik olarak sıralanmalıdır. Kaynaklar'da tüm yazarların soyadları ve diğer adlarının ilk harfleri yer almalıdır. (Yayımlanmamış çalışmalar Kaynakça'da yer alamaz.) İngilizce yazılmış kaynaklarda "(Yazar, 2008)" veya "Yazar (2008)" şeklinde yapılmalıdır. İki yazarlı eserlerde iki yazarın soyadı da "(Yazar and Yazar, 2008)" veya "Yazar and Yazar (2008)" şeklinde kullanılmalıdır. Daha çok yazarlı eserler, yalnızca ilk yazarın soyadı verilerek "Yazar et al., 2008" şeklinde kullanılmalıdır.

Kaynaklar aşağıdaki örneklere uygun olarak yazılmalıdır:

Dergiden kaynak gösterimi/ The journal

Sengün, Y. (2012). **The wild plants consumed as a food in Afyonkarahisar**. Biological Diversity and Conservation, 5(2), 95-105.

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

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

Kitaptan kaynak gösterimi/ Books

Berkes, F. ve Kışlalıoğlu, M. (1990). **Ekoloji ve çevre bilimleri**. İstanbul: Remzi Kitabevi.

Langlais, B., Reckhow, D. A., Brink, D. R. (1991). **Ozone in water treatment**. London: CRC Press.

Çeviri kitaptan kaynak gösterimi/ Translation books

Graham, L., Graham, J. M., Wilcox, L. (2004). **Bitki biyolojisi** (Işık, K., Yıldız, M.). Ankara: Palme Yayınları.

Keeton, W. T., Gould, J. L., Gould, C. G. (2004). **Genel biyoloji** (Demirsoy, A., Türkan, İ., Gündüz, E.). Ankara: Palme Yayıncılık.

Yazarı belli olmayan kaynaktan kaynak gösterimi/ The authors are not certain references

Anonim (1998). **Biyoloji terimleri sözlüğü**. Ankara: Türk Dil Kurumu Yayınları.

İnternette kaynak gösterimi/ Internet

Environment Canada. (2004). **The peregrine falcon survey in Canada**. U. Banasch and G. Holroyd (Eds). (Occasional Paper no. 110). <http://www.cws-scf.ec.gc.ca/publications> (Erişim tarihi: 26.06.2016).

Browning, T. (1993). **A brief historical survey of women writers of science fiction**. <http://www.cwrl.utexas.edu/~tonya/Tonya/sf/history.html> (Erişim tarihi: 26.06.2016).

Anonim (2011). **Ulusal hububat konseyi çeltik raporu**. <http://uhk.org.tr/> (Erişim tarihi: 26.06.2016).

12. Citations to other publications should be mentioned in the text by using surname of the author and year as "(Author, 2008)" or "Author (2008)". For publications with two authors, surnames of both authors should be used as "(Author and Author, 2008)". Publications having more than two authors should be cited by giving only the surname of the first author as "Author et al., 2008", and by typing the year in the aforementioned manner. Cited publications should be listed alphabetically in the References according to the surnames of the first authors. Surnames and initials of all authors must appear in the References. (Unpublished works should not be included in the References.)

References should be written according to the following examples:

Dergiden kaynak gösterimi/ The journal

Sengün, Y. (2012). **The wild plants consumed as a food in Afyonkarahisar**. Biological Diversity and Conservation, 5(2), 95-105.

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

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

Kitaptan kaynak gösterimi/ Books

Berkes, F. ve Kışlalıoğlu, M. (1990). **Ekoloji ve çevre bilimleri**. İstanbul: Remzi Kitabevi.

Langlais, B., Reckhow, D. A., Brink, D. R. (1991). **Ozone in water treatment**. London: CRC Press.

Çeviri kitaptan kaynak gösterimi/ Translation books

Graham, L., Graham, J. M., Wilcox, L. (2004). **Bitki biyolojisi** (Işık, K., Yıldız, M.). Ankara: Palme Yayınları.
Keeton, W. T., Gould, J. L., Gould, C. G. (2004). **Genel biyoloji** (Demirsoy, A., Türkan, İ., Gündüz, E.). Ankara: Palme Yayıncılık.

Yazarı belli olmayan kaynaktan kaynak gösterimi/ The authors are not certain references

Anonim (1998). **Biyoloji terimleri sözlüğü**. Ankara: Türk Dil Kurumu Yayınları.

İnternette kaynak gösterimi/ Internet

Environment Canada. (2004). **The peregrine falcon survey in Canada**. U. Banasch and G. Holroyd (Eds). (Occasional Paper no. 110). <http://www.cws-scf.ec.gc.ca/publications> (Erişim tarihi: 26.06.2016).

Browning, T. (1993). **A brief historical survey of women writers of science fiction**. <http://www.cwrl.utexas.edu/~tonya/Tonya/sf/history.html> (Erişim tarihi: 26.06.2016).

Anonim (2011). **Ulusal hububat konseyi çeltik raporu**. <http://uhk.org.tr/> (Erişim tarihi: 26.06.2016).

13. Yazarlar göndermiş oldukları makaleye hakemlik yapmak üzere, konunun uzmanı olan 5 hakem adı önerir (Adı, Adresi, e-posta adresi).

13. Author(s) should send a list of 5 reviewers names for their (his/her) manuscript(s) (Name, Address, e-mail).

14. Bir yazının yayımlanmasına, editör ve yayın kurulu, hakemlerden gelecek raporları değerlendirerek karar verir.

14. The final decision about the manuscript will be made by the editor and editorial board considering the views of the referees .

15. Dergiye abone olan yazarların makalelerine yayın sırasında öncelik verilir.

15. The authors subscribe to the journal that priority is given to the time of publication of their articles.



Hakem Değerlendirme Formu / Reviewer Evaluation Form

Makale adı / Article Title:

Makale No / Article No:

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

1. Makale orijinal mi? / Is the article original?
 - Evet / Yes
 - Hayır / No
2. Problem uygun şekilde belirlenmiş mi? / Is the problem properly stated?
 - Evet / Yes
 - Hayır / No
3. Problem uygun şekilde ele alınmış mı veya çözülmüş mü? / Is the problem adequately treated or solved?
 - Evet / Yes
 - Değişiklikler veya ekler gerekli / Changes or elaborations required
 - Hayır / No
4. Belgeleme / Documentation:
 - Tablolar / Tables:
 - İyi / Good
 - Zor anlaşılır (Tablo no:) / Unclear (Table no:)
 - Gereksiz (Tablo no:) / Unnecessary (Table no:)
 - Doğru değil (Tablo no:) / Incorrect (Table no:)
 - Grafikler / Graphs:
 - İyi / Good
 - Zor anlaşılır (Şekil no:) / Unclear (Figure no:)
 - Gereksiz (Şekil no:) / Unnecessary (Figure no:)
 - Doğru değil (Şekil no:) / Incorrect (Figure no:)
 - Diğer çizimler / Other illustrations:
 - İyi / Good
 - Değişiklik gerekli (Şekil no:) / Change needed (Figure no:)
 - Gereksiz (Şekil no:) / Unnecessary (Figure no:)
 - Düşük kalitede (Şekil no:) / Poor quality (Figure no:)
 - İstatistikler / Statistics:
 - Uygun / Suitable
 - Uygun değil / Unsuitable
5. Sonuçların yorumu / Interpretation of results:
 - Doğru veya uygun / Correct or appropriate
 - Düzeltilmeli / Should be amended
 - Bulunamadı / Not found
6. Literatür alıntısı / Literature cited:
 - Uygun / Appropriate
 - Çok geniş / Too broad
 - Tam değil / Incomplete
7. Dil ve üslup / Language and style:
 - İyi yazılmış / Well written
 - Daha kısa ve öz olmalı / Should be made more concise
 - Tekrar yazılmalı veya düzenlenmeli / Should be rewritten or edited
8. Makale başlığı / Article title:
 - Uygun / Appropriate
 - Çok uzun / Too long

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

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

Hakemin adı / **Name of reviewer**:

Adres / **Address**:

Tel / Fax no:

e-mail:

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

Telif Hakkı Devir Formu/ *The Copyright Agreement Form*
 Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma/*Biological Diversity and Conservation*
 ISSN 1308-5301 Print; ISSN 1308-8084 Online
 Prof. Dr. Ersin YÜCEL, P.K. 86, PTT Merkez, 26010 Eskişehir / Türkiye

Derginin Adı / *Journal Title*: Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma/*Biological Diversity and Conservation*
 Makalenin Adı / *Manuscript title*:

 Yazarların Adı / *Full Names of All Authers*:

 Yazışmaların Yapılacağı Yazarın Adı ve Adresi / *Name, Adres Of Corresponding Author*:

 TC Kimlik No. / *ID Number*: e-posta:

Yazar(lar) / The Author(s) warrant(s) that:

Sunulan makalenin orijinal olduğunu; makalenin başka bir yerde basılmadığını veya basılmak için sunulmadığını; diğer şahıslara ait telif haklarını ihlal etmediğini taahüt eder. /

The manuscript submitted is his own orijinale work; the manuscript has not been published and is not being submitted or considered for publication elsewhere; the manuscript do not infringre upon any existing copyright.

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

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

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

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

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

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

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

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



www.biodicon.com

ISSN: 1308-8084 Online

Biological Diversity and Conservation

Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma

ISSN: 1308-5301 Print

ABONE FORMU / SUBSCRIPTION FORM

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

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

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

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

Vol. 1/1.....(), Vol. 1/2 ()
 Vol. 2/1(), Vol. 2/2 (), Vol. 2/3..... ()
 Vol 3/1.(), Vol. 3/2..... (), Vol .3/3.....()
 Vol 4/1.(), Vol. 4/2..... (), Vol .4/3.....()
 Vol 5/1.(), Vol. 5/2..... (), Vol .5/3..... ()
 Vol 6/1.(), Vol. 6/2..... (), Vol .6/3..... ()
 Vol 8/1.(), Vol. 8/2..... (), Vol .8/3..... ()
 Vol 9/1.(), Vol. 9/2..... (), Vol .9/3..... ()
 Vol 10/1.(), Vol. 10/2..... (), Vol .10/3..... ()

Abone olmak istiyorum / I would like to have an annual subscription;

..... () 2018.....() 2019

Dergi isteğiniz ile ilgili ücreti “

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

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

Tarih / Date:/...../2018

İmza / Signature:

(Abone formunu Word belgesi olarak gönderiniz/Please send subscription form as a Word document)

Biological Diversity and Conservation

Cilt / Volume **11**, Sayı / Number **2**, Ağustos / August 2018

Contents / İçindekiler

Yayın No./Sayfa No.

01. **1** Age determination of *Heremites vittatus* (Bridled Skink) (Olivier, 1804) using skeletochronology in Sivas population, Turkey
02. **7** The ecological status and macroinvertebrate diversity of the Nerodime River in Kosova
03. **12** Two new records (*Sorbus persica*, *Cotoneaster morulus*) for the Lebanon flora
04. **16** Essential oil characterization of *Cousinia sivasica* Hub.-Mor. (Asteraceae)
05. **22** Removal of a toxic basic dye-malachite green from aqueous solution by *Onopordum turcicum* Danin as natural biosorbent
06. **29** Anatomical and micromorphological investigations on some *Centaurea* (Asteraceae, Cardueae) taxa from NE Anatolia
07. **42** Cytotoxic effects of *Satureja cuneifolia* extract in liver cancer cell line (HepG2)
08. **47** Morphological and anatomical studies on Hayıt fruit (fructus agni-casti) and leafs sold in the market
09. **60** Seed mucilage components in 11 *Alyssum* taxa (Brassicaceae) from Turkey and their taxonomical and ecological significance
10. **65** Relationship between some wild mammalian species and agricultural crops
11. **71** Rare and undercollected liverworts from Turkey – including new province records
12. **76** Effects of boric acid on electrolyte balance and lipid profile against renal ischemia/reperfusion injury
13. **82** Seasonal distribution of epilithic and planktonic algae in estuary zone of Aksu Stream (Isparta, Antalya/Turkey)
14. **93** A new record of a Marasmioid species for Turkish mycobiota
15. **97** Occurrence of the Mediterranean Monk seal (*Monachus monachus*) in Yeşilovacık bay (Mersin, Turkey); a case report for anthropogenic impact assessments
16. **106** Molecular identifications of rhizobial samples isolated from *Phaseolus vulgaris* L. in Eskişehir province of Turkey
17. **115** Production and characterization of α -amylase from lactic acid bacteria isolated with whey
18. **123** Urban vascular flora and ecological characteristics of Mamak District (Ankara/Turkey)
19. **132** Investigation of the antifungal activity of some epiphytic and terricolous lichen extracts
20. **137** Flora of gypsiferous and marl soils in Eskişehir (Turkey)

Dergiyi tarayan veri tabanları / Abstracted-Indexed in: EBSCO; Genamics JournalSeek Database; InfoBaseIndex; International Institute of Organized Research, I2OR; OhioLINK Databases-OPC4-Online-Katalog der Bibliothek der Fachhochschule Anhalt; Online-Katalog der UB Clausthal; Turkey Citation Index; Ulakbim; Thomson Reuters; Zoological Record.

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

Thomson Reuters Impact Factor, 5.00
Türkiye Atf Dizini'ne kayıtlıdır (Turkey Citation Index)

Dergide yayınlanan makalelere” [http:// www.biodicon.com](http://www.biodicon.com)” adresinden ulaşabilir.

This journal is available online at [http:// www.biodicon.com](http://www.biodicon.com)

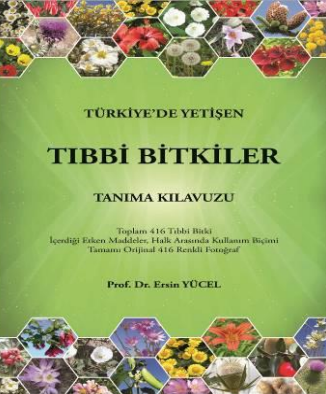
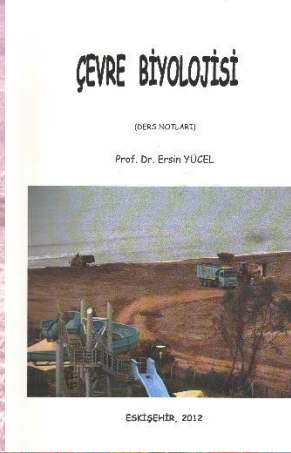
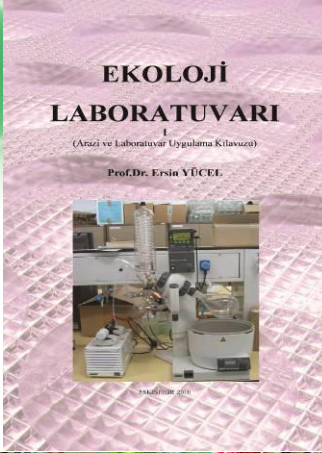
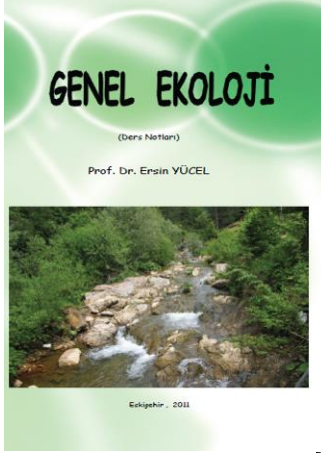
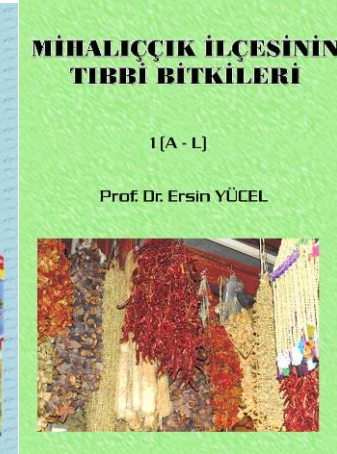
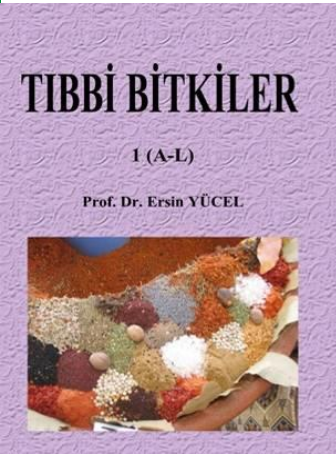
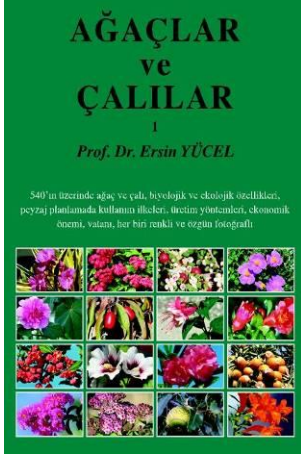
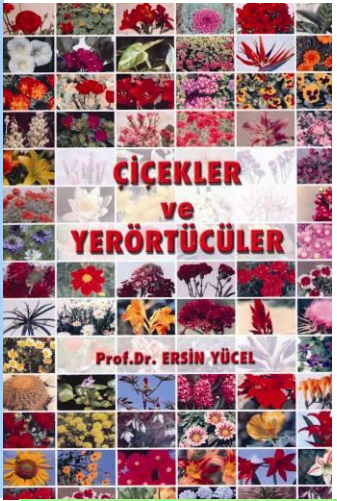
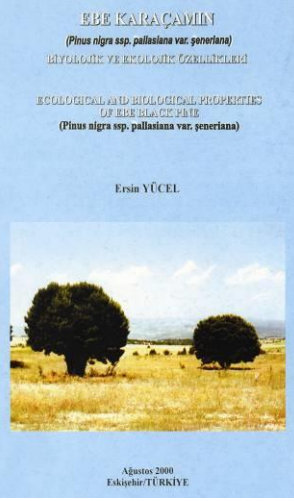
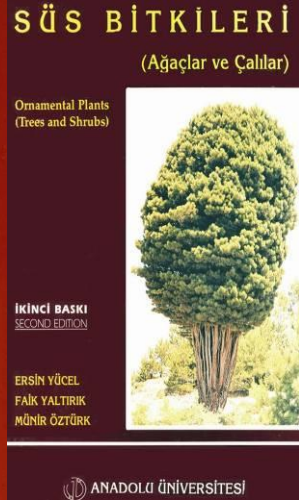
© 2008 Tüm hakları saklıdır/All rights reserved

ISSN 1308-5301 Print / ISSN 1308-8084 Online

ISSN 1308-5301



9 771308 530001



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