

FRONTIERS IN LIFE SCIENCES AND RELATED TECHNOLOGIES



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

AUGUST, 2021, VOLUME 2, ISSUE 2

Contents

Research Articles

- **Novelties in the genus *Cerastium* (Caryophyllaceae) in Turkey**

Mustafa KESKİN

Pages : 35-43

- **A Removal of heavy metals from textile industry wastewater**

Recep TÜRKSOY, Gökhan TERZİOĞLU, İbrahim Ertuğrul YALÇIN, Özlem TÜRKSOY TERZİOĞLU,

Göksel DEMİR

Pages : 44-50

- **Assessment of genetic diversity on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) landraces using SSR molecular markers in Turkey**

Ahmet OKUMUŞ, Şenay DAĞIDIR

Pages : 51-59

- **Tıbbi sterilizasyonun kontrolünde kullanılan biyoindikatör sistemi tasarlanması**
- **Designation of bioindicator system for controlling the medical sterilization**

Nurseli KANYILMAZ, Ahmet KOLUMAN

Pages : 60-67

Review Articles

- **Sentetik tohum**
- **Synthetic seed**

Meltem ERDEM, Huseyin UYSAL

Pages : 68-74

Issue Editorial Board

Assoc. Prof. Dr. Roswanira AB. WAHAB
Institution: Universiti Teknologi Malaysia

Assoc. Prof. Dr. Ilhan DOGAN
Institution: Sakarya University of Applied Sciences

Prof. Dr. Kasim BAJROVIC
Institution: University of Sarajevo

Assoc. Prof. Dr. Nese YILMAZ
Institution: Istanbul University

Prof. Dr. Ali Osman SOLAK
Institution: Ankara University

Dr. Ugur SEN
Institution: Marmara University

Editor

Prof. Dr. Ibrahim Ilker OZYIGIT

Co-Editor

Ibrahim Ertugrul YALCIN



Research article

Novelties in the genus *Cerastium* (Caryophyllaceae) in Turkey

Mustafa Keskin¹ ¹ Marmara University, Institute of Pure and Applied Sciences, Biology Program, 34722, Goztepe, Istanbul, Turkey

Abstract

The novelties of the genus *Cerastium* in Turkey were presented in the study along with the description of three new taxa: *Cerastium comatum* var. *longipedicellatum*, *C. inflatum* var. *longum*, and *C. semidecandrum* var. *delicatum*. So, two new combinations have been made for the first time. Distribution records of all mentioned taxa, along with photographs of the new taxa, were also provided.

Keywords: *Caryophyllaceae*; *Cerastium*; morphology; new taxa; new combinations; taxonomy; Turkey

1. Introduction

Caryophyllaceae Juss. is a large family, more frequent in the temperate regions of Northern Hemisphere (Bittrich 1993). The genus *Cerastium* L. belongs to the subfamily Alsinoideae Fenzl. This genus is represented with about 31 species (Cullen 1968; Davis 1988), and later Keskin (2012) reported 36 species from Turkey.

During a taxonomic revision of the genus *Cerastium* for New Illustrated Turkish Flora, three different taxa were seen in Herbarium of the Faculty of Pharmacy of Istanbul University (ISTE) and Ege University Faculty of Science Herbarium (EGE). The first two taxa are separated from the *C. comatum* L. and *C. inflatum* Link ex Boiss. by their longer pedicels. The third taxon is isolated from *C. semidecandrum* L. by the short stem, short and non-recurved pedicel, etc.

In this article, three new taxa (*Cerastium comatum* var. *longipedisellatum*, *C. inflatum* var. *longum*, and *C. semidecandrum* var. *delicatum*) were introduced to the world of science and two new combinations (*C. ligusticum* var. *dominicii* and *C. dichotomum* var. *saccardoanum*) were made.

2. Materials and methods

The studied materials in ISTE and EGE herbaria were

examined.

The vegetative and reproductive characteristics of specimens were checked by stereomicroscope. Samples were evaluated using several local, and neighboring Floras (Shishkin 1936; Jalas and Whitehead 1964; Cullen 1967; Strid (1997); Moschl 1988), also checked related articles (Grenier, 1841; Keskin and Cirpici 2006).

3. Results

3.1. *Cerastium comatum* Desv. *J. Bot. Agric.* 3(5): 228 (1816)

Annual, 1-12(-20) cm high. Stems more branched from the base and divaricately, covered retrorsely hairy. Nods longer than leaves. Leaves obovate-oblong to spatulate at base; others narrowly obovate to oblong, 5-10 x 2.5-4 mm, oblong-ovate, obovate, thin hairy, somewhat congested at the base. Inflorescences loose with a few flowers. Pedicels 2-13 mm, shorter than sepals or rarely longer than sepal, hairy-like stem. Sepals 4-5 mm, linear-lanceolate, margin without scarious margin or very narrow; hairs longer than sepals. Petals 2.5-4 mm, shorter than sepals, clav glabrous. Filaments glabrous at base. Capsule shorter than sepals, teeth very short. Seeds small and dark brown.

It is a very different taxon with long and mainly patent

* Corresponding author.

E-mail address: trifolium@hotmail.com (M. Keskin).

<https://doi.org/10.51753/flsrt.904030> Author contributions

Received 26 March 2021; Accepted 4 May 2021

Available online 7 May 2021

2718-062X © 2021 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

calyx hairs and pored fruiting capsules due to very small teeth. This taxon, which little known species was introduced to the world of science with a short description (*Cerastium comatum*, Nob. Annuuin, pilosum: caule erecto aut diffuso, piloso: pilis reflexis; foliis ob-ovato-spathulatis; calice piloso-crinato: pilis sub-in-flexis. Habitat in Oriente.) by Desvaux (1814).

It is related to the *C. illyricum* but is easily distinguished by long sepals with wide scarious margin and its hairs not exceeding apex; petals are nearly equaling sepals.

3.1.1. var. *comatum* (Fig. 1. A and B)

Stems more branched from the base and divaricately. Pedicels 2-10 mm, shorter than sepals or rarely longer than sepal. Sepals 4-5 mm, linear-lanceolate, without scarious margin or very narrow. Capsule shorter than sepals.

Examined materials in Turkey:

Balıkesir: Ayvalık, South of Güneş Island, Yumurta island, 16.iv.1998, 5 m, K.Alpınar (ISTE 75011!). Marmara Islands, east of center, -hills above lime quarries- 8.v.1971, A.Baytop, G.Ertem, F.Öktem (ISTE 19633!). Marmara Island, Tops the road from the village of Palaces to the top of the Radar, 1.v.1978, 360 m, E.Tuzlacı (ISTE 39263!). **Denizli:** Babadağ, near to Altındere Village, 3.vi.1980, 800 m, E.Tuzlacı, T.Çelebioğlu (ISTE 44509!). **İstanbul:** Adalar, Burgazada, iv.1910, S.Selinka (ISTF 15!). **Sarıyer,** Rumeli Feneri, Kale District, 29.iv.2003, M. Keskin 2623!. **İzmir:** Dilek Peninsula, 1500 m, 25.v.1995, T.Ekim (GAZI 9437!). Manisa Mount, 13.vi.1986, c.1500 m, A.Baytop, B.Çubukçu, T.Avcıgil (ISTE 9983!). Ödemiş, Keldağ -forest openings-, 31.v.1980, 1200m, E.Tuzlacı, T.Çelebioğlu (ISTE 44370!). Selçuk Way, 10 km to Selçuk, 9.iv.1971, A. and T. Baytop (ISTE 19089!). **Muğla:** Ortaca, Dalyan, Arıktaş Mah. Göktepe, shrubs, limestone land, 19.iv.1991, H.Duman, A.Dönmez, B.Mutlu (GAZI!). **Tekirdağ:** İncelik-7.2 km before Yenice, 18.iv.1992, A.Byfield 15 (ISTE 64841!). Seymen to Çorlu, 22.iv.1970, A.Baytop, F.Öktem (ISTE 17601!).

3.1.2. var. *longipedicellatum* M.Keskin var. nov. (Fig. 1. C and D)

Diagnose: It is easily distinguished from the main taxon by its very long pedicels (alar fruiting pedicels 25-35 mm; other pedicels 8-25 mm).

Description: Annual, 9-13 cm high. Stems single, short and recurved hairy. Leaves spatulate 9-10 mm, obtuse at the apex, and short-hairy. Upper leaves oblong-lanceolate, long hairy. Alar fruiting pedicels 25-35 mm, ascending up. Sepals 5-6 mm, acute, medium scarious at the margin. Other pedicels 8-25 mm. Sepals patent hairy as wide of the sepal. Petals 3-3.5 mm, glabrous. Style 0.7-0.8 mm. Stamens as long as ovary; filaments glabrous at base. Capsule equal to subexserted from the calyx.

Holotypus: Türkiye, Balıkesir, Ayvalık, Maden Adası, 29.iv.1997, 30 m, K. Alpınar ISTE 74000!.

3.2. *Cerastium inflatum* Link ex Boiss., Fl. Orient. 1: 721 (1867)

Annual herbs. Stems 5-15 cm, strict, simple or branched at base; glandular and simple hairy but abundant glandular.

Leaves, pilose at the edge, narrowly ovate to lanceolate, acute at tip; amplexicaul at the middle part. Inflorescences strict, a few flowers. Bracts leaf-like, tiny pilose. Sepal ovate 10-12 mm, widened at the fruiting time; glandular-hairy; membranous at the edge. Petal 8-12 mm, as long as sepal, emarginate at the tip. Stamens 10, filaments hairy at base. Stillus 5. Capsule strict, conical, and longer than sepal. Seeds 0.7-0.9 mm, brownish, tuberculate.

3.2.1. var. *inflatum* (Fig. 2. A and B)

Stems 10-15 mm. Leaves 10-30 x 2-5 mm. Pedicels shorter than sepal and strict.

Examined materials in Turkey:

Adana: Karsantı, Torosan Mountain, Kanlıyalak area, 2160 m, 15.vi.1977, E.Yurdakulol (ANK 1098!). Seyhan, Bozoğlan Mount, 2000 m, Davis 19727 and R.Çetik (ANK!). **Adıyaman:** Gölbaşı, around the village of Yukçöplü, Limestone, vineyard, 37° 45' 843'' K, 37° 43' 039'', 1000 m, 18.iv.2001, A.A.Dönmez 8572 (HUB!). **Antalya:** Elmali, Çıglikara, Kabakçılar area, Alpin, 2100 m, 27.vi.1975, R.Çetik (ANK 1586!). **Diyarbakır:** Merkez, 2 km w. Ambar Stream, field edge, 635 m, 6.v.1976, H.Mısırdalı and H.Malyer (ISTF 29411!). **Elazığ:** Keban, 1000-1200 m, 11.vi.1983, T.Ekim (ANK 7159!). **Erzincan:** Kemaliye, Water mains start, Limestone, *Quercus-Paliurus* opening, 16.iv.2001, A.A.Dönmez 8563 (HUB!). **Kahramanmaraş:** Ahırdağı, around the transmitter station, Ulucak Hill, Bakacak view, oak openings, 1200-1500 m, 21.v.1992, Z.Aytaç et H.Duman (ANK 4596!). Engizek Mountain, Aksu District area, field edge, 1000-1200 m, 24.v.1987, H.Duman 1988 (ANK 2922!). Göksun-Kahramanmaraş, Tekne Mountain, 1600 m, 4.v.1957, Davis 27548 et Hedge (E!). **Konya:** Ermenek, Damlaçal, *Juniperus excelsa*, stony places, 1700 m, 27.v.1979, M.Vural (ANK 1666!). Hadim, Taşkent, Ermenek Road, Feslikan Plateau, limestone rock, 1600-1800 m, 16.v.1984, S.Erik 3634, B.Yıldız (HUB 02754!). **Malatya:** Malatya-Akçadağ, 1000 m, 10.v.1957, Davis 27689 et Hedge (ANK! and E!). Malatya-Kayseri road, 36 km from Malatya, 9.vi.1971, A.Baytop (ISTE 20179!). **Mardin:** Mardin-Diyarbakır, 1000 m, 27.v.1957, Davis 28725 et Hedge (ANK! and E!). **Mardin:** Merkez, 1100 m, 21.v.1957, Davis 28392 et Hedge (ANK!). **Mardin:** Merkez, steep, limestone vineyards, 1100 m, 21.v.1957, Davis 28392 et Hedge (E!). Savur to Midyat, 13 km from Savur, 100 m, 5.v.1966, Davis 42497 (E!). Savur, vi.1888, P.Sintenis 871 (E!). **Mersin:** Mut, Mağras Mountain, summit, limestone rocks and deep pine needle, 1400 m, 11.v.1965, M.J.E.Coode and B.M.G.Jones (E!). **Muş:** Malazgirt, Aktuzla, Kocasuyu Edge, step, 1550 m, 12.v.2001, S.Almanar 1336 (VANF 3668!). **Süirt:** above Şırnak, rocky limestone slopes, 1400-1500 m, 8.v.1966, Davis 42593 (E!). **Sivas:** Divriği, 31.v.1968, T.Baytop (ISTE 12942!). **Sivas:** Divriği, Dumluca mountain, 30.v.1968, T.Baytop (ISTE 12912! and E!). **Van:** Erciş, Yukarı Işıklı Village, Işıklı Hill, 39° 03' 384 ' ' N, 43° 20' 587'' E, 1695 m, 15.v.2006, O.Karabacak (VANF 3673!). **Van:** Gürpınar, Bölmeçalı Village around, step, 2000 m, 10.vii.2002, M.Ünal 7293 (VANF 3670!). **Van:** Gürpınar, Hamurkesen Village, step, 2000 m, 22.v.2002, M.Ünal 6749 (VANF 3669!). Gürpınar, Zerne Dam and Üçgen Village, stream edge, 1700-1900 m, 10.vi.2007, İ.Demir 432 (VANF 3691!).

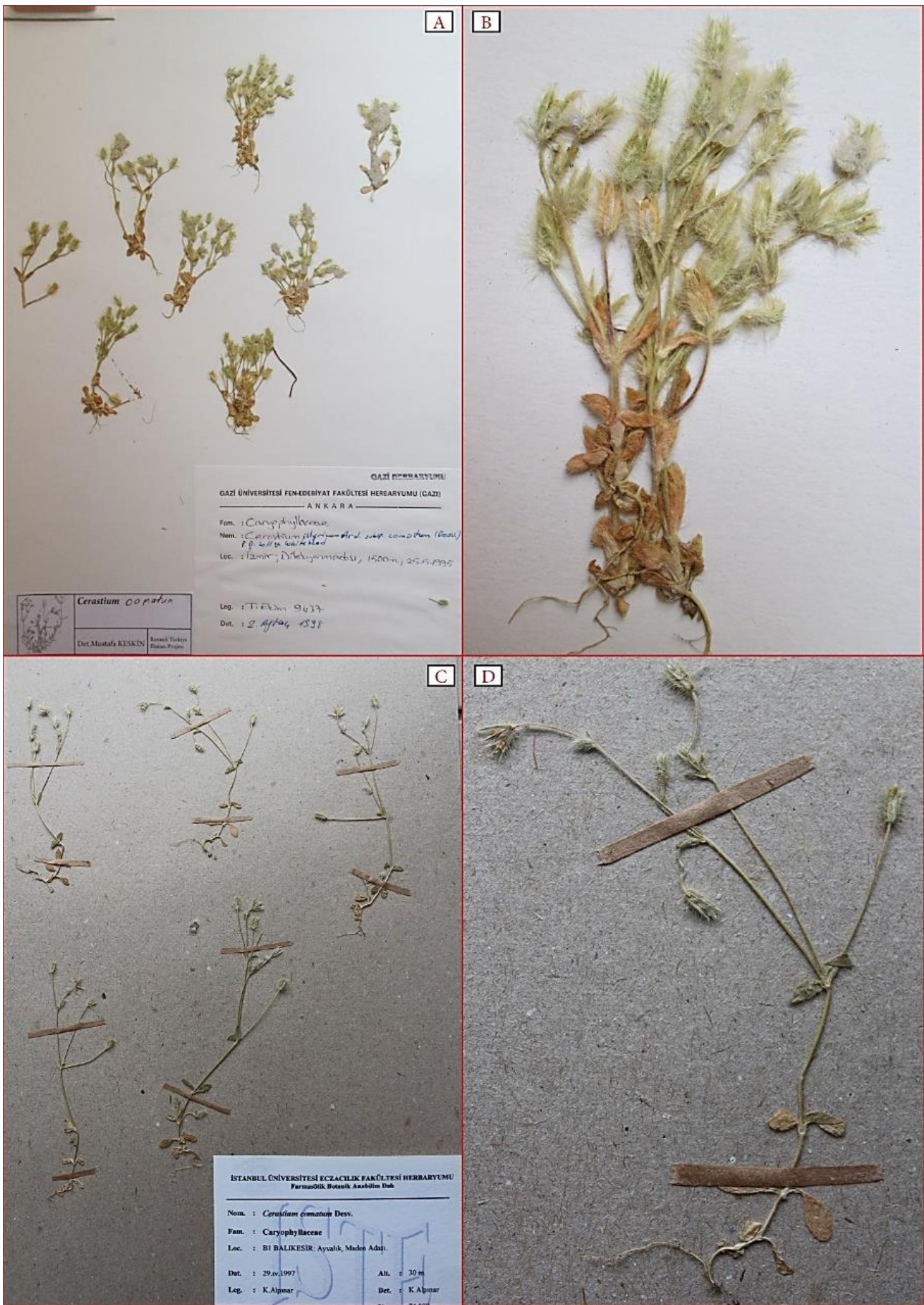


Fig. 1. (A) *Cerastium comatum* var. *comatum* (a herbarium sheet), (B) *C. comatum* var. *comatum* (single plant), (C) *C. comatum* var. *longipedicellatum* (a herbarium sheet), (D) *C. comatum* var. *longipedicellatum* (single plant).



Fig. 2. (A) *Cerastium inflatum* var. *inflatum* (a herbarium sheet), (B) *C. inflatum* var. *inflatum* (close up) (C), *C. inflatum* var. *longum* (a herbarium sheet) (D), *C. inflatum* var. *longum* (single plant).

3.2.2. var. *longum* M.Keskin var. nov. (Fig. 2. C and D)

Diagnose: It is distinguished from the main taxon by its long pedicels, leaves, and stem.

Description: Stem probably 20-40 cm. Leaves 40-55 x 9-13 mm, wide oblong to lanceolate, obviously obtuse at apex. Inflorescences more flowered. Alar pedicels 40-45 mm. Other pedicels 15-30 mm. Bracts leaf-like but very small. Sepals 9-12 mm, narrowly membranous at the edge. Petal shorter than sepal. Capsule 20-25 mm, slightly conical.

Holotypus: Türkiye, Bitlis, Tatvan, Zulül kaya, çayırılık ve kenarı, ca.1850 m, 20.vi.1986, Ö.Seçmen 3489 (EGE 17976!).

3.3. *Cerastium semidecandrum* L., Sp. Pl. 1: 438 (1753)

Annuals. Stem 1-20 cm, thinly; spreading 2-3 celled eglandular with a few minute glandular hairs present, especially at the leaf base. Leaves spatulate at the base, others oblong; hairy on the upper face, glabrous or loosely hairy on the lower face. Inflorescences usually single-flowered. Bracts membranous at tips, sometimes only greenish in the middle, other parts membranous. Pedicels usually equal to sepal or longer than sepals. Sepals ovate-lanceolate, narrowly membranous at the edge and widely membranous and purplish at tip; dense and long hairs with 2-3 cell on edge: usually in a line or very sparsely hairy or absent in the middle; no glandular hairs or few tiny glandular hairs near the pedicel (these are very small and can be seen at high magnification). Petals shorter than sepals, nearly as long as middle part; glabrous, entire or 2-3 irregular parted and sometimes purplish at tip; glabrous. Filaments as long as petals; anthers sphere-like. Style 0.5 mm. Capsule 2-7 mm. Seeds 0.4-0.8 mm, bluntly tuberculate.

3.3.1. var. *semidecandrum* (Fig. 3. A and B)

Examined materials in Turkey:

Antalya: Kemer, Kardalan-Kızder Village, *Pinus brutia* openings, 100-1000 m, 7.vi.1979, H.Peşmen 4366 and A.Güner (HUB 02843!). **Bilecik:** Söğüt-Eskişehir 11 km, before 1 km from Gündüzbey, roadside, 1020 m, 13.vi.1954, H.Demiriz (ISTF 13239!). Söğüt-Eskişehir, 24 km, 2 km after Oluklu, step, hill, 13.vi.1954, H.Demiriz (ISTF 13260!). **Bursa:** above Çekirge, roadside, 19.iv.1952, A.Berk and T.Baytop (ISTE 2531!). **Edirne:** Lalapaşa, Süloğlu Village way, 30.iv.1973, G.Ertem (ISTE 24267!). **Eskişehir:** Sündiken Mountains, Kirazlı Stream, Margı area, Meadows, 1250 m, 24.iii.2006, A.A.Dönmez 12711 and A.Ocak (HUB!). **İstanbul:** Adalar, Burgazada, 13.v.2004, M.Keskin 3257!. Adalar, Heybeliada, 13.v.2004, M.Keskin 3250!. Adalar, Kınalıada, 13.v.2004, M.Keskin 3278!. Bahçelievler, Park, 12.iv.2004, M.Keskin 3105!. Bakırköy, Yeşilköy, around siteler, 12.iv.2004, M.Keskin 3098!. Büyükçekmece, lake area, 17.iv.2004, M.Keskin 3111!. Çatalca, Çatalca mountain summit, 17.iv.2004, M.Keskin 3107!. Eminönü, Ayasofya Mosque, tea garden perimeter, 12.iv.2004, M.Keskin 3092!. Eminönü, Sirkeci train station perimeter, 12.iv.2004, M.Keskin 3090!. Küçükçekmece, lake road, roadside, 17.iv.2004, M.Keskin 3114!. Maltepe, Başbüyük District, Süreyyapaşa Hospital forest, near the pond, 25.iv.2004, M.Keskin 3115!. Sarıyer, Rumeli Feneri, Kale District, 29.iv.2003, M.Keskin 2619!. Tuzla, 29.iv.1962, B.Tözün (ISTF 18366!). Ümraniye, Alemdar, Nişan Hill forest

openings, 24.iv.2004, M.Keskin 3127!. **Kırklareli:** Lüleburgaz, Pınarhisar-Lüleburgaz 16 km, field edge, meadow, 5.v.1974, B.Tütel (ISTF 27685!). **Kütahya:** Gediz, 21 km, Göksuyu right bank, lime rocks, 960 m, 14.vi.1954, H.Demiriz (ISTF 13303!). **Tekirdağ:** Naipköy-Işıklar road, Bin Hill, 30.iv.1967, A.Baytop and T.Baytop (ISTE 10853a!).

3.3.2. var. *delicatum* M.Keskin var. nov. (Fig. 3. D and E)

Diagnose: Allied to *C. semidecandrum* L. but easily distinguished by single-flowered inflorescences; short and non-recurred pedicels; short calyx and capsules; eglandular indumentum.

Description: Stem 1-2.5 cm; spreading 2-3 celled eglandular with a few minute glandular hairs present, especially at the leaf base. Leaves 1-7 mm, spatulate at the base. Inflorescences usually single-flowered. Sepals 1-3 mm, narrowly membranous at the edge and widely membranous and purplish at the tip (1/3-1/4); dense and long hairs with 2-3 cell on edge. Capsule 2 mm.

Holotypus: Turkey, İzmir: Bergama-Kozak, çayırılık, 400 m, 27.ii.1986, G.Görk (EGE 315601!).

3.4. New Combinations

3.4.1. *Cerastium ligusticum* Viv. (Fig. 4. A and B)

The species is growing in a narrow area in Turkey. Its long petals are the most prominent characteristic of this species. *C. dominicii* Favarger was described from Muğla in 1976. Later, it was validated by Tan and Mill in 1988. Both species grow around Muğla. According to my observations, the only difference from *C. ligusticum* is its large seeds.

C. ligusticum Viv. var. *dominicii* (Kit Tan and R.R.Mill) M.Keskin. comb. nov. (Fig. 4. C and D)

3.4.2. *Cerastium dichotomum* L. (Fig. 5. A and B)

This species is common in mainly Central Anatolia. The stem of this species is fork-like branched, and extended conical capsules are quite typical. *C. saccardoanum* Diratz. is published in 1912. This species differs with its capsules as long as the sepal. But this character alone is not enough for the species level.

C. dichotomum L. var. *saccardoanum* (Diratz.) M.Keskin comb. nov. (Fig. 5. C and D)

4. Conclusion

In this article, some observations during the revision of *Cerastium* distributed in Turkey are reported. During the revision study, three interesting taxa were encountered in ISTE and EGE herbarium.

As a result of examining these samples, it was decided that these are new taxa for science. These examples are introduced to the scientific world in this article: *C. comatum* Desv. var. *longipedicellatum* M.Keskin, *C. inflatum* Link ex Boiss. var. *longum* M.Keskin and *C. semidecandrum* L. var. *delicatum* M.Keskin.

Also, two new combinations have been made: *C. ligusticum* Viv. var. *dominicii* (Kit Tan and R.R.Mill) M.Keskin and *C. dichotomum* L. var. *saccardoanum* (Diratz.) M.Keskin.



Fig. 3. (A) *Cerastium semidecandrum* var. *semidecandrum* (a herbarium sheet), (B) *C. semidecandrum* var. *semidecandrum* (single plant), (C) *C. semidecandrum* var. *delicatum* (a herbarium sheet), (D) *C. semidecandrum* var. *delicatum* (single plant).

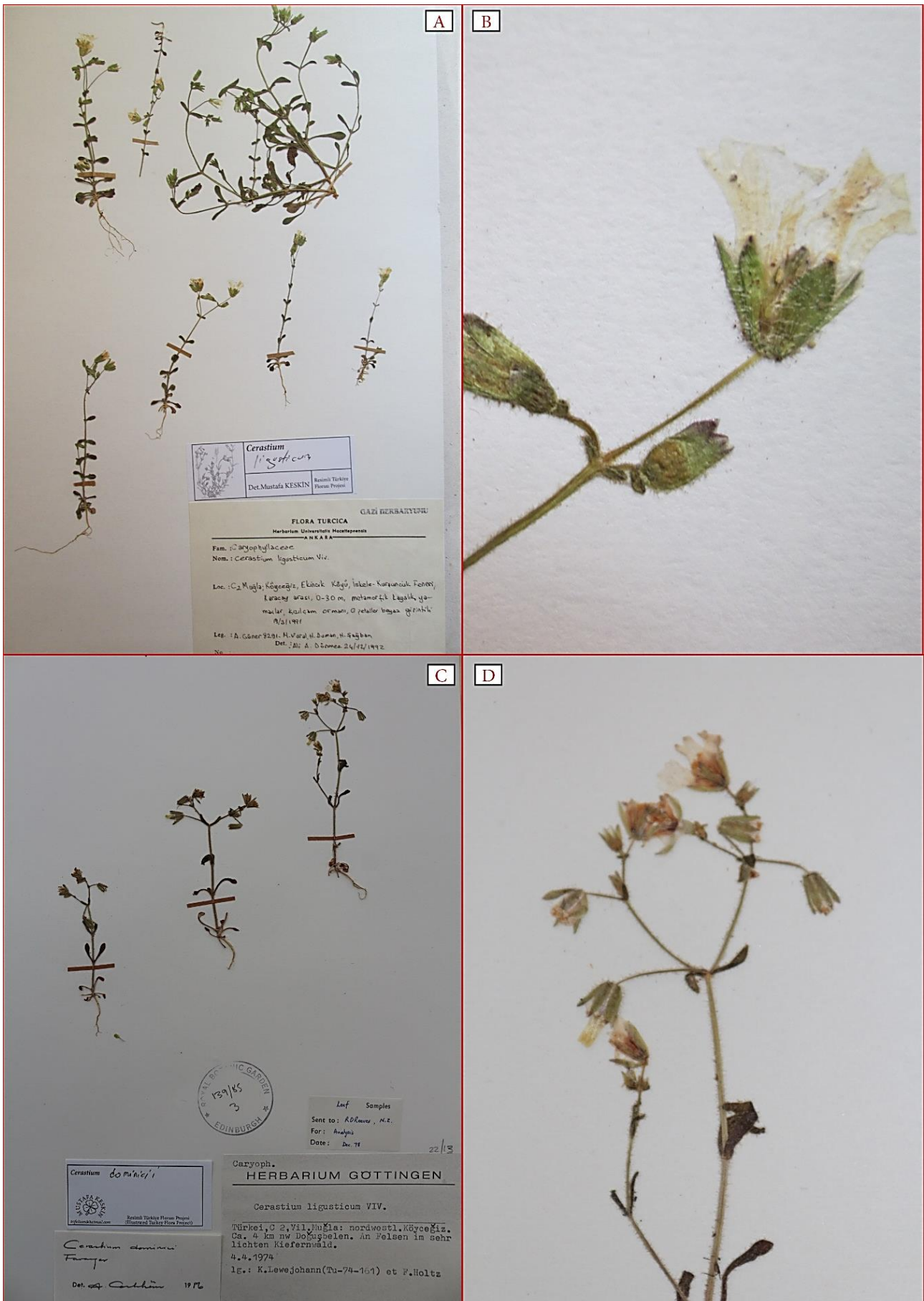


Fig. 4. (A) *Cerastium ligusticum* var. *ligusticum* (a herbarium sheet), (B) *C. ligusticum* var. *ligusticum* (close up), (C) *C. ligusticum* var. *dominicii* (a herbarium sheet), (D) *C. ligusticum* var. *dominicii* (single plant).



Fig. 5. (A) *Cerastium dichotomum* var. *dichotomum* (a herbarium sheet), (B) *C. dichotomum* var. *dichotomum* (close-up), (C) *C. dichotomum* var. *saccardoanum* (a herbarium sheet), (D) *C. dichotomum* var. *saccardoanum* (close-up).

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

Informed consent: This manuscript did not involve human or animal participants; thus informed consent was not collected.

References

- Bittrich, V. (1993). Caryophyllaceae. In: Kubitzki K. (eds) *The Families and Genera of Vascular Plants 2* (pp. 206-236). Springer-Verlag, Berlin.
- Cullen, J. (1967). *Cerastium* L. In: Davis P. H. (ed) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands 2* (pp. 73-85). Edinburgh at the University Press.
- Davis, P. H. (1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* vol. 10 (pp. 69-71). Edinburgh at the University Press.
- Desvaux, N. A. (1814). Examen Critique de Genres Saline (*Arenaria*) et (*Cerastium*). *Journal de Botanique Appliquee A L'Agriculture, A La Pharmacie, A La Médecine et Aux Arts*. Paris. No: III, Ier, vol. 3: 213-228.
- Grenier, C. (1841). *Monographia de Cerastio: Cum tab. 9* vol. 1 (pp. 1-85). Outhenin-Cahlandre.
- Jalas, J., Sell, P. D., & Whitehead, F. H. (1964). *Cerastium* L. In: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. (eds) *Flora Europaea 1* (pp. 136-145). Cambridge at the University Press.
- Keskin, M. (2012). *Cerastium* L. In: Güner A., Aslan S., Ekim T., Vural M., Babaç M. T. (eds) *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)* (pp. 329-333). Nezahat Gökyiğit Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul.
- Keskin, M., & Cırpıcı, A. (2006). İstanbul çevresinin *Cerastium* L. (Caryophyllaceae) türleri üzerinde taksonomik araştırmalar. *OT Sistemik Botanik Dergisi*, 13(1), 71-96.
- Moschl, W. (1988). *Cerastium* L. In: Rechinger K. H. (ed) *Flora Iranica* 163 (pp. 85-108). Akademische Druck-u. Verlagsanstalt, Graz, Austria.
- Shishkin, B. K. (1936). *Cerastium* L. In: Komarov V. L. (ed) *Flora of the U. S. S. R.* 6 (pp.430- 466). Leningrad.
- Strid, A. (1997). *Cerastium* L. In: Strid A., Tan K. (eds) *Flora Hellenica* vol.1 (pp. 198-214). Koeltz Scientific Books, Germany.

Cite as: Keskin, M. (2021). Novelty in the genus *Cerastium* (Caryophyllaceae) in Turkey. *Front Life Sci RT*, 2(2), 35-43.



Research article

Removal of heavy metals from textile industry wastewater

Recep Turksoy¹ , Gokhan Terzioglu² , Ibrahim Ertugrul Yalcin³ ,
Ozlem Turksoy Terzioglu^{*4} , Goksel Demir⁵ 

¹Independent researcher, 34250, Gaziosmanpasa, Istanbul, Turkey

²Independent researcher, 34676, Uskudar, Istanbul, Turkey

³Bahcesehir University, Faculty of Engineering & Natural Sciences, Department of Civil Engineering, 34353, Besiktas, Istanbul, Turkey

⁴University of Health Sciences Turkey, Hamidiye Institute of Health Sciences, Department of Molecular Biology and Genetics, 34668, Uskudar, Istanbul, Turkey

⁵University of Health Sciences Turkey, Hamidiye Faculty of Health Sciences, Department of Occupational Health and Safety, 34668, Uskudar, Istanbul, Turkey

Abstract

Wastewaters of several industries such as textile, leather or dye etc., contain dangerous and toxic compounds, even some of which are potential carcinogenics. Considering the volume and composition, wastewaters of the textile industry have much more polluting characteristics compared to other industries. Although treatment processes must definitely be implemented in point of environment and living organisms, many factories discharge their wastewaters to acceptor media without any treatment because of high costs. This study investigated zeolite and clay with high availability and low cost in wastewater treatment as more economically feasible alternatives to activated carbon. The wastewater treatment adequacy of zeolite-clay mixture was also investigated. We determined the optimum treatment time for heavy metal removal from the dye-containing wastewater samples as 6 hours. The mixture of clay+zeolite+activated carbon provided the highest removal of Cd, Cu, Mn, Pb, and Zn compared to zeolite, clay, activated carbon, activated carbon+clay, activated carbon+zeolite and clay+zeolite.

Keywords: Activated carbon; clay; heavy metal removal; textile dyes; wastewater treatment; zeolite

1. Introduction

Both the growing world population and the changing sense of lifestyle and fashion boost the demand for textile products (Uzal et al., 2005; Mercimek, 2007). The textile industry is considered as the most polluting industry due to the enormous diversity of chemicals used in the production processes. More than 100,000 dyes and 2000 types of chemicals are used in the industry and the annual production of textile dyes is around 500,000 tons (Kapdan and Kargi, 2000; Halimoon and Yin, 2010; Arora, 2014). The wastes resulting from the dyeing of

products such as yarn and fabric has the biggest share in the pollution related to textile wastewaters (Mercimek, 2007). Even very small amounts of dye residues in the wastewaters of the textile industry can cause significant pollution (Sener, 2008).

The colorant wastes colorize the water and thus prevent the sunlight to reach the depths of water bodies and threaten the livestock that lives in the affected rivers, lakes and seas. The oxygen levels also decrease in affected aquatic ecosystems due to decreasing photosynthetic activity as a result of blocking the penetration of sunlight by colorants (Banat et al., 1996; Mercimek, 2007). The other most important hazardous

* Corresponding author.

E-mail address: ozlem.turksoy@sbu.edu.tr (O. Turksoy Terzioglu).

<https://doi.org/10.51753/flsrt.958165> Author contributions

Received 28 June 2021; Accepted 8 August 2021

Available online 30 August 2021

2718-062X © 2021 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

constituents in these wastewaters, that have ecologically negative impacts on aquatic ecosystems and also have deteriorative effects on human health, are heavy metals.

1.1. Numerous heavy metals are used in textile industry

Heavy metals can be found in textiles naturally, or as a result of production and dyeing processes; protective agents used during storage may also lead to penetration of heavy metals into textile fibers. Colour pigments in textile dyes are produced using heavy metals such as chromium (Cr), nickel (Ni), zinc (Zn), lead (Pb), copper (Cu) and cadmium (Cd) (Bhardwaj et al., 2014).

1.2. Heavy metals have numerous negative effects on environment and human health

Heavy metals are commonly defined according to their density; metals with a density higher than 5 g/cm³ are classified as heavy metals (Gu and Lin, 2010; Yalcin et al., 2020). Although heavy metals exist in nature, they are very toxic, especially in high concentrations and can accumulate in the soil, water, and human body (Mathur et al., 2005; Suresh et al., 2015; Ozyigit et al., 2018). Even trace amounts of some heavy metals are a risk for the health of humans and other organisms and cannot be destroyed or degraded by living things. Drinking polluted water, ingesting heavy metal-containing foods via the food chain, or inhaling air containing higher concentrations of heavy metals near sources of emission may lead to heavy metal toxicity (Karnib et al., 2014; Yilmaz et al., 2021).

Cadmium (Cd) is naturally in the environment, but it is also hazardous due to bioaccumulation. Cd is a poisonous substance and even cause cancer and premature death; long-term exposure to Cd leads to systemic toxicity in reproductive, skeletal, cardiovascular, urinary, respiratory, and nervous systems (Rahimzadeh et al., 2017; Hocaoglu-Ozyigit and Genc, 2020). Plants can take this metal from the environment and thus its concentration increases along the food chain (Jaishankar et al., 2014; Dogan et al., 2016).

Lead (Pb) is not only unnecessary for human life but also causes health problems as a toxic heavy metal and especially affects pregnant women, children, and elderly persons. It harms our endocrine, nervous, circulatory, skeletal, and immune systems and can also cause mental retardation in children. It is also very harmful to plants, leads to chlorophyll damage by fastening and related growth retardation (Jaishankar et al., 2014; Ozyigit et al., 2016).

Zinc (Zn) is another heavy metal and it is required for the proper function of the human body, unlike Cd and Pb. Although Zn is an essential element for our bodies, long-term exposure to the excess amount of Zn causes infertility and diminishes immune function, and cholesterol balance (Yasar and Ozyigit, 2009; Zhang et al., 2012). Cd, Pb, and Zn also accumulate in crops and vegetables in fields near polluted areas (Zhang et al., 2012).

Nickel (Ni) is omnipresent, but its function for animal life has not been clearly understood yet. Exposure to Ni can cause lung fibrosis, allergy, kidney diseases, cardiovascular diseases and also lead to cancer and epigenetic changes (Genchi et al., 2020).

Copper (Cu) is another toxic heavy metal, and exposure to excess amounts of Cu causes Wilson's Disease, mucosal irritation, gastrointestinal disorders, toxic effects on the kidneys

and liver, and capillary damages (Shrivastava, 2009).

Aluminum (Al) is also a ubiquitous metal, naturally founds in soil and constitutes 8% of the earth's surface, but it is also toxic. The toxicity level of Al is determined by several factors such as organic content and pH (Dogan et al., 2014; Jaishankar et al., 2014). In acidic soil, it can decrease crop by inhibiting root growth and changing the cellular structure of leaves (Ozyigit et al., 2019). It also negatively affects aquatic organisms such as fishes, seaweeds, and crawfishes in high concentrations (Jaishankar et al., 2014). The toxic effects of Al on human bone marrow, skeletal muscles, heart, liver, and brain are also well defined (Nayak, 2002).

1.3. Adsorbent compounds can be used in wastewater treatment

Wastewater treatment methods differ according to target pollutants (Talarposhti et al., 2001; Mercimek, 2007). Due to the wide variety of chemicals used in the washing, bleaching, and dyeing processes of the fibers used in the textile industry, the compositions of wastewaters vary. As a result, wastewater treatment is a very complicated activity (Pagga and Brown, 1986; Donlon et al., 1997). Classical methods such as coagulation and flocculation are not successful in the removal of the wastes of the dyeing processes. Thus, several methods have been developed for the treatment of the wastewaters of the dye industry, such as adsorption to organic and inorganic matrices, photocatalysis, enzymatic or microbiological separation, chemical oxidation, etc. (Santos and Boaventura, 2008).

The adsorption process via solid adsorbents is considered as one of the most useful methods for the removal and treatment of inorganic and organic pollutants in the he wastewaters of the dye industry. This method has a simple design and ease of use because of its low initial cost and land needs. Researchers recently pay special attention to finding low-cost adsorbents with high pollutant-binding capacity (Rashed, 2013).

1.3.1. Activated Carbon

Adsorption is an important process in the removal of colorants from wastewater. The most commonly used adsorbent is activated carbon because of its high adsorption capacity. Activated carbon consists of 87-97% carbon, and the rest of it may contain hydrogen, oxygen, sulphur, and nitrogen (Tchobanoglous et al., 1991).

Although activated carbon is an efficient adsorbent for numerous organic and inorganic compounds due to its high porosity, high surface reaction affinity and large surface area, the cost is very high (Jaroniec and Choma, 1986; Bolisetty et al., 2019). So researchers have directed their attention to various alternatives, such as agricultural by products, industrial wastes, and natural materials (Sener, 2008).

1.3.2. Zeolite

Zeolites are very cheap, effective adsorbents to adsorb heavy metals from wastewater samples due to their ion exchange capability (Babel and Kurniawan, 2003). Zeolites are hydrated aluminosilicate minerals, and their structure is an anionic tetrahedron of AlO₄ and SiO₄ (Pohl, 2011). They consist of millions of micropores like honeycomb and cage which are 2-10 microns in size and contain varying cations; because cations are bound by weak bonds, zeolites can easily change their ions.

Zeolites are used in various applications, such as ion-exchange, removal of solvents and gas, petrochemical cracking, adsorption, etc., due to their porous structure. Hazardous wastes can be converted into environmentally safe products using zeolites (Shevade and Ford, 2004). There are more than 40 types of zeolites in nature and eight types of them are important in global markets. Clinoptilolite is the most abundant zeolite in nature (Babel and Kurniawan, 2003) and an important type of natural zeolites in Turkey due to its high reserve, formation, homogeneity, and high mineral quality. Although natural types of zeolites exist, they do not have the desired purity and pore diameters, and thus artificial zeolite has extensive usage (Gulen et al., 2012). Synthetic zeolites such as NaPl have markedly bettered ion-exchange ability compared to natural ones such as clinoptilolite. pH is an important determinant to affect ion-exchange adsorption and low pH values decrease adsorption capacity as a result of hydrogen ion competition (Bolisetty et al., 2019).

1.3.3. Clay

Clay is a fine-grained natural soil or rock material and contains one or more clay minerals with traces of organic matter and metal oxides. The composition of clay consists of silica, alumina, water, and also iron, alkalis, or soil alkalis. Some of the minerals such as quartz, calcite, feldspar, and pyrite can be found in some clays, so the composition of all clays is not the same (Toprakezer, 2009).

When clay comes in contact with water, it softens, expands, and gains a plastic structure. Clay is a preferred material in the industry, because of its absorption and adsorption capabilities, small grain size, large surface area, and high plasticity (Isci, 2002; Toprakezer, 2009). It has been shown that the surfaces of clay minerals are negatively charged while their edges and corners are positively charged. This character allows cations and anions in the solution to adhere to the surface and provides adsorptive and absorptive properties (Demir, 2008).

Three essential species of clay are smectites, kaolinite, and micas. Clay is a cheap and plentiful material, and montmorillonite is a smectite, has the highest cation exchange capacity, and 20 times cheaper than active carbon (Babel and Kurniawan, 2003). As they have a great adsorption capacity, they have been utilized for the removal of toxic heavy metals from aqueous solutions for years. Both natural and modified clay forms can effectively remove diverse heavy metals from polluted water samples (Uddin, 2017). Although the heavy metal removal efficacy of clays is lower than zeolites, their high availability and low-cost make them preferable (Babel and Kurniawan, 2003). The environmental risks grow day by day but the most effective method for the removal of heavy metals could not be found yet. In this study, we aimed to find out a substance for developing a more effective and relatively low-cost removal of heavy metals from the wastewaters of dye plants. We investigated the effectiveness of zeolite and clay in wastewater treatment as more abundant and more economical alternatives to widely used activated carbon, the use of zeolite and clay. The effectiveness of zeolite, clay and activated carbon separately and together in wastewater treatment were also analyzed.

2. Materials and methods

0.100 g of Yellow PG (Scientific Name: Direct Yellow 142) (D1), Red BWS (Direct Red 243) (D2), Blue 4BL (Direct

Blue 200) (D3), Rose FR (Direct Red 227) (D4) and WSF 800 1.0 (D5) dyes were separately mixed with 10 ml of purified water, and each of them completed to 1000 ml. 5g of cotton fabric rags were soaked up with 75 ml of the prepared dye samples and then heated.

When the temperature reached 100 °C, 1 g NaCl was added to each sample, and then each sample was boiled for 30 minutes. Thus, the salt acts on the covalent bonds to ensure stable dispersion of the dye into the fabric. After the water had been completely evaporated, it rinsed with 100 ml cold ultra-pure water, and then the fabric was allowed to dry. The rinse water obtained in the same way as the wastewater of the factory. The acid-base values of the prepared dye samples measured by using the pH meter (Hanna-HI 2211).

35 samples were divided into 7 different groups for each dye. Active carbon, natural zeolite, and clay were applied to each sample separately and/or applied after being mixed with another for removing heavy metals. A total of 1 g of each remover or remover mix applied to every 10 ml of each sample. The removers were held for 2, 4, and 8 hours, then filtered with the Whatman filter papers. 500 µL of each filtered sample was placed on the Teflon cells, 5 ml of HNO₃ (Merck) was added on them, and then they were put in the microwave oven (Berghof - MWS2).

The incubation times and temperatures in the microwave oven were 5 minutes at 145 °C, 5 minutes at 165 °C and 20 minutes at 175 °C, respectively; the incineration conducted in this way. After the procedure finished, the Teflon cells were allowed to cool for 20 minutes in the water bath. The lids of the cells carefully opened in the laminar flow, they were filtered using Whatman filters in 50ml conical centrifuge tubes, then completed to 50 ml.

The element analyses (Al, Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn) of the fully dissolved samples were conducted in the ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy) (Perkin Elmer-Optima 7000 DV) in the range obtained by using the standards prepared using the multi-element stock solution (Merck 1000 ppm). Al was analyzed due to its existence in zeolite and the increase in Al concentration when zeolite mixed with the liquid. For statistical analysis, One Way ANOVA with Tukey's HSD Test was used, and $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. The samples had acceptable pH values in terms of reusability

The pH values of the textile dyes were given in Table 1. When the values examined, the lowest pH value was determined as 7.16 for Direct Blue 200, while the highest pH value was determined as 9.88 for Direct Red 243. These values are not acidic, and therefore the remaining water samples of these most commonly used textile dyes can be reused after the wastewater treatment.

Dye	pH
Yellow PG (Direct Yellow 142)	9.57
Red BWS (Direct Red 243)	9.88
Blue 4BL (Direct Blue 200)	7.16
Rose FR (Direct Red 227)	7.25
WSF 800 1.0	7.29

Table 1
pH values for colorants.

*Those in parentheses are the scientific names.

Table 2

Temporal changes in the heavy metal contents of the samples after the treatment with adsorbents (Al, Cd and Cu).

Aluminum Concentration (mg L⁻¹) (mean ± SD) (0th Hour 32.88±5.99)				
Time/Treatment	2th Hour	4th Hour	6th Hour	8th Hour
Carbon	3.31±1.38	2.97±1.42	*2.70±1.40	2.92±1.42
Zeolite	294±59.46	283.29±59.26	273.30±56.70	281.65±54
Clay	15.14±5.14	13.64±5.30	12.23±4.47	13.43±4.60
Carbon+Clay	11.35±4.68	9.91±4.30	8.97±3.90	9.40±4.09
Carbon+Zeolite	237.92±56.95	225.88±53.03	216.47±48.99	224.40±49.48
Clay+Zeolite	254.45±59.48	243.87±57.16	232.60±59.52	240.71±58.16
Carbon+Clay+Zeolite	180.85±71.28	172.17±70.79	165.58±68.53	171.34±69.22
Cadmium Concentration (mg L⁻¹) (mean ± SD) (0th Hour 9.00±3.91)				
Time/Treatment	2th Hour	4th Hour	6th Hour	8th Hour
Carbon	0.77±0.35	0.70±0.35	0.66±0.35	0.68±0.35
Zeolite	0.90±0.37	0.80±0.36	0.73±0.35	0.76±0.35
Clay	5.03±2.37	4.64±2.00	4.25±1.76	4.45±1.86
Carbon+Clay	1.83±0.81	1.60±0.81	1.42±0.68	1.48±0.72
Carbon+Zeolite	0.82±0.33	0.72±0.32	0.65±0.33	0.70±0.33
Clay+Zeolite	2.90±1.63	2.67±1.42	2.53±1.30	2.59±1.35
Carbon+Clay+Zeolite	0.64±0.34	0.56±0.29	*0.50±0.28	0.55±0.29
Copper Concentration (mg L⁻¹) (mean ± SD) (0th Hour 643.74±27.24)				
Time/Treatment	2th Hour	4th Hour	6th Hour	8th Hour
Carbon	17.69±9.83	16.51±9.15	15.05±8.13	15.84±8.77
Zeolite	20.61±11.12	18.94±9.66	16.76±8.47	17.22±8.67
Clay	373.33±22.01	357.36±20.79	344.33±19.72	349.79±18.09
Carbon+Clay	78.10±16.29	72.11±15.57	66.20±13.34	68.74±14.04
Carbon+Zeolite	18.99±10.33	17.58±9.38	15.88±8.29	16.45±8.53
Clay+Zeolite	129.72±31.82	120.49±31.47	110.95±30.92	114.84±32.03
Carbon+Clay+Zeolite	16.54±9.20	15.32±8.65	*14.02±7.67	14.81±8.11

For discharged wastewaters, the maximum limit values for Al, Cd, Cu are 3, 5 and 5 mg L⁻¹, respectively (Filiz, 2007; Kalipci and Ceylan, 2017). The values met in the regulation were written with italics. Asterisk "*" symbol shows the highest removal value for the 6th hour of the treatment for related heavy metals.

3.2. The experimental samples contained harmful heavy metals

The Al, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn contents of the samples before and after the treatment are given in Table 2 and Table 3. Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn were detected in the samples, while Cu and Zn were the most abundant ones. Furthermore, a massive increase in the Al concentration of the samples was observed in the samples treated with zeolite (Table 2 and Table 3).

The high heavy metal content of the samples suggested that the wastewater generated in dye production cannot be directly discharged to the environment or reused without any treatment. Although wastewater treatment procedures bring additional costs to manufacturers, it is necessary to apply them thoroughly and in a controlled manner.

3.3. The maximum removal was achieved at the 6th hour of the treatment

We determined that the efficacy of the removal of heavy metals started to decrease after the 6th hour of the treatment. The adsorption of heavy metals reached a saturation point at the 6th hour of the treatment ($p < 0.05$). The desorption started after the

6th hour, and therefore the concentrations of heavy metals started to re-increase in the samples (Table 1). In other words, adsorbents should be separated from wastewater after the 6th hour of the treatment as a good practice criterion.

3.4. Clay-zeolite-activated carbon mixture provided the best heavy metal removal according to the mean values compared to other groups but differences between the groups are not statistically significant

In this study, zeolite and clay were tested as alternative materials to activated carbon which is the most commonly used material in wastewater treatment, to develop a more cost-effective way. According to the mean values, clay provided much worse results compared to activated carbon while zeolite and active carbon+zeolite treatments also provided nearly the same results with activated carbon treatment (Table 1). However, Chaari et al. (2008) found that clay can have better performance compared to activated carbon in terms of lead adsorption when it is activated with sulphuric acid. This difference is probably due to the lack of clay activation in our study. We also determined that active carbon+zeolite mixture provided better performance compared to active carbon only in

Table 3

Temporal changes in the heavy metal contents of the samples after the treatment with adsorbents (Pb, Ni and Zn).

Lead Concentration (mg L ⁻¹) (mean ± SD) (0th Hour 32.28±5.75)				
Time/Treatment	2th Hour	4th Hour	6th Hour	8th Hour
Carbon	2.48±1.25	2.23±1.26	2.05±1.23	2.19±1.29
Zeolite	2.70±1.88	2.38±1.81	2.17±1.72	2.38±1.79
Clay	19.97±5.92	17.63±5.01	14.85±4.12	16.13±4.73
Carbon+Clay	7.16±2.55	6.12±2.52	5.52±2.53	5.76±2.48
Carbon+Zeolite	2.64±1.56	2.43±1.44	2.23±1.43	2.39±1.47
Clay+Zeolite	11.95±4.20	10.18±3.35	8.87±2.79	9.53±3.15
Carbon+Clay+Zeolite	2.06±1.32	1.87±1.26	*1.68±1.17	1.82±1.24
Nickel Concentration (mg L ⁻¹) (mean ± SD) (0th Hour 95.56±13.05)				
Time/Treatment	2th Hour	4th Hour	6th Hour	8th Hour
Carbon	3.66±1.21	3.18±1.15	2.98±1.15	3.14±1.16
Zeolite	4.57±1.35	4.04±1.30	3.71±1.22	3.92±1.18
Clay	47.54±3.19	41.66±3.06	36.04±3.40	39.19±2.53
Carbon+Clay	16.41±5.37	14.16±4.47	12.18±4.16	12.95±4.41
Carbon+Zeolite	3.91±1.38	3.57±1.27	3.26±1.22	3.45±1.31
Clay+Zeolite	25.59±4.72	22.12±4.02	18.17±2.70	19.80±2.85
Carbon+Clay+Zeolite	3.35±0.85	3.06±0.85	*2.86±0.80	3.01±0.79
Zinc Concentration (mg L ⁻¹) (mean ± SD) (0th Hour 398.71±40.59)				
Time/Treatment	2th Hour	4th Hour	6th Hour	8th Hour
Carbon	12.44±3.18	11.31±2.85	10.06±2.20	10.63±2.56
Zeolite	13.76±4.30	13.31±4.24	11.37±3.37	12.38±3.83
Clay	153.34±39.73	143.90±38.29	133.31±36.70	137.87±35.74
Carbon+Clay	43.68±16.22	39.48±15.55	34.65±14.01	36.33±14.30
Carbon+Zeolite	13.01±3.77	11.52±2.86	10.44±2.35	11.33±2.77
Clay+Zeolite	68.82±24.21	61.47±21.92	55.23±21.08	60.49±22.26
Carbon+Clay+Zeolite	11.24±2.89	9.89±2.28	*8.89±1.64	9.77±2.24

For discharged wastewaters, The maximum limit values for Al, Cd, Cu are 3, 5 and 5 mg L⁻¹, respectively (Filiz, 2007; Kalipci and Ceylan, 2017). The values met in the regulation were written with italics. Asterisk “*” symbol shows the highest removal value for the 6th hour of the treatment for related heavy metals.

terms of cadmium removal (Table 1).

Active carbon+clay+zeolite treatment was the most effective mixture for removing Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn compared to other groups including activated carbon (Table 1). In other words, clay only improved the ability to remove heavy metals when it was combined with both zeolite and activated carbon because clay+carbon treatment and clay+zeolite treatment had lower treatment efficiencies compared to active carbon treatment and zeolite treatment, respectively. Mixtures can behave differently compared to their components, and our findings indicate a positive synergistic effect between clay, activated carbon, and zeolite in terms of the removal of heavy metals. Unfortunately, these findings were not statistically significant, probably due to high standard deviation values. We prepared 5 different samples with 5 different dyes for each of the seven treatment groups and calculated mean and standard deviation values for each group with them. This condition may lead to high standard deviations, and therefore experimental repetitions for each treatment group should be made with samples prepared by using the same dye in further studies.

Some other researchers also studied composite adsorbents such as silica+activated carbon, clay+activated carbon composites for removing heavy metals (Karnib et al., 2014;

Pawar et al., 2018). Karnib et al. (2014) showed that the silica+activated carbon (2:3) composite provided a slightly higher Ni removal rate compared to activated carbon, while activated carbon had a significantly higher Ni removal rate compared to silica. However, we found that activated carbon provided higher Ni removal compared to the zeolite+activated carbon (1:1) mixture; this difference may be as a result of the difference between silicated materials and the ratio of components.

3.5. The addition of zeolite in the samples for heavy metal removal increased the concentration Al as a probable adverse effect of HNO₃ using in the experimental procedure

Al is one of the most abundant metals in all soils, and its levels range between 0.45% to 10% (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). Al cannot be absorbed by plants from the soil as long as the pH of soil does not range between 4-4.5 (Matsumoto, 2000; Vardar et al., 2006). For the aquatic environment, the toxicity of Al is altered by the pH and physicochemical properties of water (Jaishankar et al., 2014). Al can causes growth problems in plants in acidic soil and disturbs the reproductive system, respiratory system, cardiovascular system,

endocrine system, blood, and gill structure of aquatic animals. It also has well-established toxic effects on human bone marrow, skeletal muscles, heart, liver, and brain for excess concentrations (Nayak, 2002). In our study, Al concentration in the samples increased after zeolite or zeolite containing mixtures applied to the samples.

From this point of view, Al should be removed from the wastewater with an additional treatment step before discharge to avoid toxic concentrations of Al when zeolite is used for heavy metal removal. However, this finding is controversial because other studies determined that zeolite only dissolved when the pH drop to below 2.0 and then Al concentration increase in the solution and even some researchers successfully removed Al by using zeolite (Wingenfelder et al., 2005; Abdullah, 2014). Although we found higher Al concentrations in the samples treated with zeolite or zeolite containing mixture, this condition is probably as a result of the addition of HNO₃ during the experimental procedure. For further studies, the experimental procedure should be modified to eliminate this possibility. This condition may also be related to the content of the natural zeolite.

4. Conclusion

Our findings are promising for using clay, zeolite, and activated carbon in combination to obtain better heavy metal removal yield and to minimize wastewater treatment costs. Further studies should be designed for the experimental repetitions with low standard deviation values or conducted with a higher number of samples, and thus statistically significant results may be obtained. The molecular mechanisms under the synergistic interactions between clay, active carbon, and zeolite should be enlightened in terms of heavy metal removal from wastewater. We also found a significant threshold value for the

duration of treatment, and this finding indicates that an optimum treatment duration exists and longer treatment is not better for every time.

4.1. Limitations of the study

Our sample number is limited, only 5 samples were included in the study for each material or mixture used in the treatment, and this low number of samples may be one of the limitations of the study. Another limitation of the study is that we prepared our samples in the laboratory to imitate textile factories' wastewaters. Our samples only contained dye residues, while the real textile industry's wastewaters contain other pollutants, and their contents are more complex. Therefore, our study may only reflect the properties of real wastewater noncomprehensively. Although synthetic zeolites provide better results according to the literature, we used natural zeolite. This condition probably negatively affected our results. In other words, further studies should be designed for synthetic zeolite+activated carbon+clay mixtures to obtain better results. Also, we did not test the active carbon+clay+zeolite mixture for different concentrations of dyes. However, its heavy metal removal performance can be negatively affected by increasing pollutant concentrations. Thus, its heavy metal removal capacity per unit mass of the pollutants cannot be determined in this way when it is tested for only one concentration of heavy metals.

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

Informed consent: This manuscript did not involve human or animal participants; therefore informed consent was not collected.

References

- Abdullah, A. M. (2014). Aluminum pollution removal from water using a natural zeolite. *Journal of Pollution Effects & Control*, 1-4.
- Arora, S. (2014). Textile dyes: it's impact on environment and its treatment. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 5(3), 1.
- Babel, S., & Kurniawan, T. A. (2003). Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review. *Journal of Hazardous Materials*, 97(1-3), 219-243.
- Banat, I. M., Nigam, P., Singh, D., & Marchant, R. (1996). Microbial decolorization of textile-dyecontaining effluents: a review. *Bioresource Technology*, 58(3), 217-227.
- Bhardwaj, V., Kumar, P. & Singhal, G. (2014). Toxicity of heavy metals pollutants in textile mills effluents. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 5(7), 2229-5518.
- Bolisetty, S., Peydayesh, M. & Mezzenga, R. (2019). Sustainable technologies for water purification from heavy metals: review and analysis. *Chemical Society Reviews*, 48(2), 463-487.
- Chaari, I., Fakhfakh, E., Chakroun, S., Bouzid, J., Boujelben, N., Feki, M., & Jamoussi, F. (2008). Lead removal from aqueous solutions by a Tunisian smectitic clay. *Journal of Hazardous Materials*, 156(1-3), 545-551.
- Demir, E. (2008). Isıl işlemin bir bentonitin katyon değişirme kapasitesi, adsorpsiyon, gözenekliliği, yüzey alanı ve yüzey asitliği gibi bazı fizikokimyasal özelliklerine etkisi, Doktora Tezi, (pp. 1-180) Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Dogan, I., Ozyigit, I. I., & Demir, G. (2014). Influence of aluminum on mineral nutrient uptake and accumulation in *Urtica pilulifera* L.. *Journal of Plant Nutrition*, 37(3), 469-481.
- Dogan, I., Ozyigit, I. I., Tombuloglu, G., Sakcali, M. S., & Tombuloglu, H. (2016). Assessment of Cd-induced genotoxic damage in *Urtica pilulifera* L. using RAPD-PCR analysis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(2), 284-291.
- Donlon, B., Razo-Flores, E., Luijten, M., Swarts, H., Lettinga, G., & Field, J. (1997). Detoxification and partial mineralization of the azo dye mordant orange 1 in a continuous upflow anaerobic sludge-blanket reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(1), 83-90.
- Filiz, E. (2007). Doğal kaynaklardan elde edilen adsorbanlarla sulardan ağır metal giderimi, Yüksek Lisans Tezi, (pp. 1-139) İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M. S., & Catalano, A. (2020). Nickel: Human health and environmental toxicology. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3), 679.
- Gu, Q., & Lin, R. L. (2010). Heavy metals zinc, cadmium, and copper stimulate pulmonary sensory neurons via direct activation of TRPA1. *Journal of Applied Physiology*, 108(4), 891-897.
- Gulen, J., Zorbay, F., & Arslan, S. (2012). Zeolitler ve kullanım alanları. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2(1), 63-68.
- Halimoon, N., & Yin, R. G. S. (2010). Removal of heavy metals from textile wastewater using zeolite. *Environment Asia*, 3(2010), 124-130.
- Hocaoglu-Ozyigit, A., & Genc, B. N. (2020). Cadmium in plants, humans and the environment. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, 1(1), 12-21.
- Isci, S. (2002). Bentonit dispersiyonlarına organik ve inorganik katkılarn adsorpsiyonunun reolojik özellikleri üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, (pp.1-61) İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(2), 60.
- Jaroniec, M., & Choma, J. (1986). Characterization of heterogeneity of activated carbons by utilizing the benzene adsorption data. *Materials Chemistry and Physics*, 15(6), 521-536.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (2001). *Trace elements in soils and plants*.

- 3rd ed., (pp. 1-432). CRC Press, Boca Raton New York, Washington, D.C.
- Kalipci, E., & Ceylan, Z. (2017). Konya ana tahliye kanalında ağır metal kirliliğinin izlenmesi. *Dicle Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Dergisi*, 8(3), 649-658.
- Kapdan, I. K., & Kargi, F. (2000). Removal of textile dyestuffs from wastewater by adsorptive biodegradation. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 24(3), 161-170.
- Karnib, M., Kabbani, A., Holail, H., & Olama, Z. (2014). Heavy metals removal using activated carbon, silica and silica activated carbon composite. *Energy Procedia*, 50, 113-120.
- Mathur, H. B., Agarwal, H. C., Johnson, S., & Saikia, N. (2005). Analysis of pesticide residues in blood samples from villages of Punjab. *Centre for Science and Environment, India*, 1-15.
- Matsumoto, H. (2000). Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology*, 1-46.
- Mercimek, H. (2007). *Trametes versicolor*'ın tekstil boyalarının gideriminde kullanım olanakları, Yüksek Lisans Tezi, (pp. 1-74) Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Nayak, P. (2002). Aluminum: impacts and disease. *Environmental Research*, 89(2), 101-115.
- Ozyigit, I. I., Dogan, I., Igdelioglu, S., Filiz, E., Karadeniz, S., & Uzunova, Z. (2016). Screening of damage induced by lead (Pb) in rye (*Secale cereale* L.) a genetic and physiological approach. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(3), 489-496.
- Ozyigit, I. I., Yalcin, B., Turan, S., Saracoglu, I. A., Karadeniz, S., Yalcin, I. E., & Demir, G. (2018). Investigation of heavy metal level and mineral nutrient status in widely used medicinal plants' leaves in Turkey: Insights into health implications. *Biological Trace Element Research*, 182(2), 387-406.
- Ozyigit, I. I., Kaval, A., Cakir, E. A., & Vardar, F. (2019). DNA fingerprinting and assessment of some physiological changes in Al-induced *Bryophyllum daigremontianum* clones. *Molecular Biology Reports*, 46(3), 2703-2711.
- Pagga, U., & Brown, D. (1986). The degradation of dyestuffs: Part II Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere*, 15(4), 479-491.
- Pawar, R. R., Kim, M., Kim, J. G., Hong, S. M., Sawant, S. Y., & Lee, S. M. (2018). Efficient removal of hazardous lead, cadmium, and arsenic from aqueous environment by iron oxide modified clay-activated carbon composite beads. *Applied Clay Science*, 162, 339-350.
- Pohl, W. L. (2011). *Economic geology: principles and practice*. (pp. 1-678). John Wiley & Sons.
- Rahimzadeh, M. R., Rahimzadeh, M. R., Kazemi, S., & Moghadamnia, A. A. (2017). Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 8(3), 135.
- Rashed, M. N. (2013). Adsorption technique for the removal of organic pollutants from water and wastewater. *Organic Pollutants-Monitoring, Risk and Treatment*, 7, 167-194.
- Santos, S. C., & Boaventura, R. A. (2008). Adsorption modelling of textile dyes by sepiolite. *Applied Clay Science*, 42(1-2), 137-145.
- Shevade, S., & Ford, R. G. (2004). Use of synthetic zeolites for arsenate removal from pollutant water. *Water Research*, 38(14-15), 3197-3204.
- Shrivastava, A. K. (2009). A review on copper pollution and its removal from water bodies by pollution control technologies. *Indian Journal of Environmental Protection*, 29(6), 552-560.
- Suresh, G., Ramasamy, V., Sundarajan, M., & Paramasivam, K. (2015). Spatial and vertical distributions of heavy metals and their potential toxicity levels in various beach sediments from high-background-radiation area, Kerala, India. *Marine Pollution Bulletin*, 91(1), 389-400.
- Sener, S. (2008). Use of solid wastes of the soda ash plant as an adsorbent for the removal of anionic dyes: Equilibrium and kinetic studies. *Chemical Engineering Journal*, 138(1-3), 207-214.
- Talarposhti, A. M., Donnelly, T., & Anderson, G. K. (2001). Colour removal from a simulated dye wastewater using a two-phase anaerobic packed bed reactor. *Water Research*, 35(2), 425-432.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L., & Stensel, H. D. (1991). Wastewater engineering. *Management*, 7, 1-4.
- Toprakezer, F. (2009). Nanokompozit sentezinde kullanılacak na-bentonit kilinin saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, (pp. 1-80) Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Uddin, M. K. (2017). A review on the adsorption of heavy metals by clay minerals, with special focus on the past decade. *Chemical Engineering Journal*, 308, 438-462.
- Uzal, N., Yilmaz, L., & Yetis, U. (2005). İndigo boyama atıklarının ön arıtımı: kimyasal çöktürme ön filtrasyon süreçlerinin karşılaştırılması, 6. *Ulusal Çevre Müh. Kongresi*, 429-437.
- Vardar, F., Arican, E., & Gozukirmizi, N. (2006). Effects of aluminum on in vitro root growth and seed germination of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Advances in Food Sciences*, 28(2), 85-88.
- Wingefelder, U., Hansen, C., Furrer, G., & Schulin, R. (2005). Removal of heavy metals from mine waters by natural zeolites. *Environmental Science & Technology*, 39(12), 4606-4613.
- Yalcin, I. E., Ozyigit, I. I., Dogan, I., Demir, G., & Yarci, C. (2020). Using the Turkish red pine tree to monitor heavy metal pollution. *Polish Journal of Environmental Studies*, 29(5), 3881-3889.
- Yasar, U., & Ozyigit, I. I. (2009). Use of human hair as a potential biomonitor for zinc in the Pendik District Istanbul Turkey. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(3), 4474-4481.
- Yilmaz, N., Ozyigit, I. I., Demir, H. H., & Yalcin, I. E. (2021). Assessment on phytoplankton composition and heavy metal pollution in a drinking water resource: Lake Terkos (Istanbul, Turkey), *Desalination and Water Treatment*, 225, 265-274.
- Zhang, X., Yang, L., Li, Y., Li, H., Wang, W., & Ye, B. (2012). Impacts of lead/zinc mining and smelting on the environment and human health in China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(4), 2261-2273.

Cite as: Turksoy, R., Terzioglu, G., Yalcin, I. E., Turksoy Terzioglu, O., & Demir, G. (2021). Removal of heavy metals from textile industry wastewater. *Front Life Sci RT*, 2(2), 44-50.



Research article

Assessment of genetic diversity on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) landraces using SSR molecular markers in Turkey

Ahmet Okumus^{*1} , Senay Dagidir² 

¹Adnan Menderes University, Agriculture Faculty, Agricultural Biotechnology Department, 09010, Aydin, Turkey

²Ondokuz Mayıs University, Science Faculty, Biology Department, 55100, Samsun, Turkey

Abstract

Genetic diversity is getting have been increasingly narrowed by the dense bred cultivar usage for production, on the other hand, genetic variation created by the landraces is known as the raw material of plant breeding. A collection of 21-landrace and three-commercial tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) genotypes were screened for allele profile, genetic definition and genetic similarity with the aim of identifying genetic variability in genetic level with 40 SSR loci. Number of alleles per locus ranged from 3 (SSR50, SSR80, SSR9, LEat002) to 13 (LEat018). Expected and observed heterozygosity values were scored between He: 0.753 and Ho: 0.714 respectively and the mean value of polymorphism information content (PIC) value of these loci was found as 0.694. Considering distribution of alleles at loci, the highest allele frequency was observed from SSR75 with % 62.5 LEat014 with % 58.3 LEga004 with % 50.0 locus, while the lowest was in AI491065 with 16.6% LEta024 locus. UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Means) method was conducted for cluster analysis. The dendrogram was consisted 2 main groups; Group 2 was the largest and contained many sub-groups. The highest genetic similarity level of genotypes from Bafra-Merkez and Sivas-Yukarıkale Village was found as 0.776. The lowest similarity ratio was observed between Sivas-Yıldızeli-Emirler Village and Samsun-Carsamba genotypes with 0.136. The obtained results are indicated that genetic diversity information of landraces with effective SSR loci will help to manage tomato genetic resources for tomato breeding.

Keywords: Genetic diversity; landraces; PIC value; *Solanum lycopersicum* L.; SSR; tomato

1. Introduction

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. $2n = 2 \times = 24$), one of the important species of the *Solanaceae* family that first appeared in the region of Andes Mountains in South America, is one of the most cultivated vegetables in the world. It is known that today, the cultivated tomatoes are developed by using *L. hirsutum*, *L. peruvianum* and *L. pimpinellifolium* (Cox, 2000; Vural et al., 2000). Tomato, which has a 100-year history when it has been taken into culture, has gained a great popularity especially in the last 25 years for food industry. The arrival of tomato varieties to Europe was made by Spanish and Portuguese merchants in the 16th century through seeds (Osma et al., 2012;

Fentik, 2017). Probably the first tomato entered to Europe was yellow. Because it is named as golden apple (pomodoro) in Italy. In Europe, for a long time, tomato has not been given importance due to the belief that it is poisonous. This situation continued until the 18th century and it was used as food after the testimony of botanists and gourmets in England and France (Wien, 1987). Whereas, it was brought to Anatolia almost 150 years ago (in 1900's) and is now widely grown and consumed admirably (Yazgan and Fidan, 1996). Important tomato producers in the world are; China, India, Turkey and the European Union (EU) countries. Turkey is the world's largest tomato producing country after India and China, realizes 7.11% of the world production (Tridge, 2021). Also, it realizes 3.4% of world

* Corresponding author.

E-mail address: ahmet.okumus@adu.edu.tr (A. Okumus).

<https://doi.org/10.51753/flsrt.957055> Author contributions

Received 24 June 2021; Accepted 12 August 2021

Available online 30 August 2021

2718-062X © 2021 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

exports and ranks 8th (World's Top Exports, 2021).

Increasing the yield of tomatoes per unit area in the world goes through the use of productive and disease-resistant varieties in addition to planting and maintenance. Plant genetic resources have played an important role in increasing yield and disease resistance. Breeding studies, in which new varieties are developed, gain importance with the adequate evaluation of plant genetic resources. Plant genetic resources; the village populations defined as local varieties consist of their wild relatives, unused old varieties and genotypes with clearly defined hereditary characteristics. In particular, protection of wild species is extremely important for future plant breeding studies. These valuable resources are in danger of decreasing or even disappearing due to environmental and other pressures in the regions where they are located. Culture varieties have become homogeneous in terms of gene structures and contain much less genetic diversity than primitive forms and their wild relatives. Wild species, on the other hand, are gene stores that have a wide genetic basis and constitute an important resource in solving the problems that may arise in the future of cultivated plants or in gaining new features to the plants (Ozgen et al., 1995; Can et al., 2019; Hocaoglu-Ozyigit et al., 2021).

However, in a study conducted in the Netherlands, it was stated that as a result of today's breeding studies, more diversity occurred compared to the 1950s (Schouten et al., 2019). Due to the increased awareness of the need for genetic diversity in tomatoes and the benefits of vegetables and fruits grown in local resources, more attention has recently been given to the restoration of genetic diversity in tomato species (Henareh et al., 2015; 2016; Castellana et al., 2020). Molecular techniques are the most used technologies in recent years to determine genetic diversity in breeding studies on tomato plants. Especially, with SSR markers genetic variation has been quite informative in order to detect diversity in tomato genome. It has been proved by various researchers that SSR technique can be used in the purity tests of tomato breeding lines in determining genetic relationships, characterizing and identifying varieties (Kaemmer et al., 1995; Tam et al., 2005; Garcia-Martinez et al., 2006).

The Solanacea Genome Project (SGN) is trying to reveal the tomato genome and approximately 40% of the tomato genome is complete (Sol Genomics, 2021). This study will be able to shed light on the future studies of the National Gene Bank by applying the SSR technique, which is used to create a gene bank in the world and collect varieties in a database He et al. (2003), developed and characterized SSR markers, 158 pairs of SSR primers were screened in 19 different tomato set varieties. They obtained 129 pairs of DNA fragments were and 65 of them were found to be polymorphic, and 19 sets of tomato varieties were classified according to their polymorphic SSR loci. Garcia-Martinez et al. (2006), used combinations of 19 SSR markers and 7 AFLP primers to characterize 48 local tomato varieties of south-eastern Spain and reported that SSR and AFLP markers were effective in the identification of local cultivated tomatoes. Tam et al. (2005) used SSAP, AFLP and SSR methods to determine genetic relatedness in commercially important tomatoes and peppers. In SSR method, they used 16 primer sets for tomato and 13 primer sets for pepper. They scored 39 different alleles for tomato and 31 different alleles for pepper. They found that the total number of alleles per primary in tomato as 2.44 and the number of polymorphic alleles as 2.44 (100%). In pepper, the number of alleles per primary by SSR method was 2.385 and the number of polymorphic alleles was 2.385 (100%). They reported that the SSR method is a method reveals the

specific characteristics of the plant. In order to determine genetic diversity in 39 inbred tomato lines, Benor et al. (2008) used 35 types of SSR polymorphic markers collected from China, Japan, South Korea and USA. They determined that these tomato lines, from which 150 alleles were obtained, showed moderate variation, and some varieties gave unique alleles. They reported that the number of alleles per locus was 4.3 and the average polymorphism information content (PIC) was 0.31. They also stated that there is a separate and more distant kinship in the USA variety, which is one of the 39 tomato lines.

Although Turkey it is not included in the center or origin of the Solanaceae family, which tomato is included, has been obtaining seed production by farmers. As a result, it has adapted to different conditions and a natural gene pool containing different types has been formed (Dilbirligi, 2007). In this research, in order to reveal the genetic diversity of the different regions of Turkey, the seeds produced by farmers were selected. It was aimed to make identification at the DNA level, to reveal the genetic relationships (similarities or differences) and to determine some morphological characteristics using 40 SSR primers on a total of 24 tomato varieties.

2. Materials and methods

2.1. Plant materials

This research was carried out in the greenhouse and Agricultural Biotechnology Laboratory of Ondokuz Mayıs University Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology. In the study, 21 local tomato varieties collected from different regions of our country, which are thought to be different from each other, and three commercial tomato varieties were used (Table 1).

Table 1

The genotype codes and their collected regions.

No	Genotype Codes	Collected Regions
1	GRC	GIRESUN-CAVUSLU
2	UNS	UNYE-SOFUTEPESEI
3	UNM	UNYE
4	SMM1	SAMSUN
5	SVYE	SIVAS-YILDIZELI-EMIRLER
6	SVY1	SIVAS-YUKARIKALE
7	SVK	SIVAS-KOYULHISAR
8	SVGK	SIVAS-GEMEREK-KUMEOREN
9	BFM1	BAFRA
10	NDM	NIGDE
11	SVA	SIVAS-AKKUZULU
12	SVY2	SIVAS-YUKARIKALE
13	SVY3	SIVAS-YUKARIKALE
14	KRSB	KARABUK-SAFRANBOLU-BOSTANBUKU
15	AMGS	AMASYA-GUMUSHACIKOY-SALLAR
16	ANKC	ANTALYA-KAS-CAVDIR
17	SME	SAMSUN-ENGIZ
18	SMC	SAMSUN-CARSAMBA
19	MLBM	MUGLA-BODRUM-MUMCULAR
20	SMCI	SAMSUN-CINARLIK
21	AYNP	AYDIN-NAZILLI-PIRLIBEY
22	UCW1	COMMERCIAL
23	UCW2	COMMERCIAL
24	UCW3	COMMERCIAL

While the genotype codes used in the study were prepared, two consonants of the province from which the sample was taken, and the following ones define the district and village (for

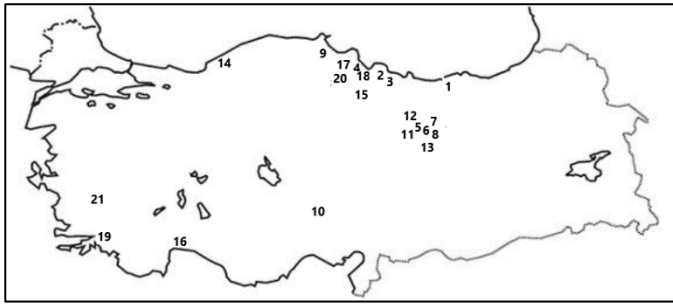


Fig. 1. The localities, where tomato genotypes are collected.

example; GRC: Giresun-Cavuslu), while commercial varieties were coded as UCW1, UCW2, and UCW3. The code numbers of the tomato genotypes used in the experiment and the places where they were collected are given in Fig. 1 and Table 1.

2.2. DNA isolation and PCR

DNA isolation of 24 tomato varieties studied in the study was performed according to the method of CTAB DNA isolation protocol developed by Doyle and Doyle (1991), while DNA quality and quantity measurements were made using 0.8% agarose gel and spectrophotometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany). Thermal Cycle Device (PEQLAB Primus 96 Gradient PCR Thermal Cycler) was used for DNA reproduction and PCR optimization studies. In PCR amplification; a total of 25 µl PCR mix was prepared: 4 µl DNA, 2 µl primer 1, 2 µl primer 2, 8 µl TMastermix, 9 µl water. For DNA amplification, in PCR at 94 °C for 5 min, at 94 °C; 35 cycles 55 °C 1 min, 72 °C 2min, 94 °C 1 min last cycle was 55 °C 1 min and 72 °C 7 min protocol was applied.

2.3. Primers

It was made with primers that were selected from primer sets that showed the most allelic variation previously used in tomato genotypes. The selection of primers was made according to types that show a selective difference between populations with at least 3 alleles, and care was taken to consist of primers that can be used as a standard in seed purity and genetic differences, which will guide further research. Care was taken to distribute the primers as evenly as possible into the genome. The primer set used is given in Table 2. For this purpose, 40 SSR primer sets in tomato genome bank (Sol Genomics, 2021) were used.

2.4. Statistical analysis

The scoring process of gels, the data of the markers were coded in a binary system according to the presence and absence of the bands indicating alleles.

According to this, genetic parameters; number of alleles per locus (n), allele frequency, expected heterozygosity (He), observed heterozygosity (Ho), effective allele number (Ae) and polymorphism information content (PIC) of microsatellite markers used were also calculated. Dendrogram of genotypes was created and visualized with software program NTSYS (version 2.02g, Exeter Software, Setauket, NY). UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic means) method was used for dendrogram. Statistical methods and formulas used to evaluate the data obtained from microsatellite markers that summarized below.

2.4.1. Expected heterozygosity (He)

The most commonly used measure of genetic variation in a population is heterozygosity. For haploid data, the $h = 1 - \sum p_i^2$ formula is used to calculate genetic diversity, while in codominant molecular marker studies, the formula $He = 1 - \sum p_i^2$ is used to calculate the expected heterozygosity (Peakall and Smouse, 2010). The pi value here shows the frequency of the “i” allele in the sample studied (Nei, 1987).

2.4.2. Observed heterozygosity (Ho)

The observed heterozygous value calculated per locus is the ratio between the heterozygous genotypes and the total genotype analyzed.

$Ho = \text{number of heterozygotes at a locus} / \text{total number of genotypes}$

2.4.3. Allele count

Another indicator of genetic variation is the number of alleles per locus (A). This criterion, also known as allelic richness, is affected by the number of samples (Nei, 1987).

$$\text{Average } Na = \sum nai / r$$

nai: number of alleles of locus i, r: number of loci

2.4.4. Effective number of alleles (Ne)

It is a strategic parameter used in measuring diversity in codominant molecular marker studies. This calculation provides meaningful comparisons of allelic diversity between different allele frequency distributions and locus, thus providing an estimate of the ideal allele number (Peakall and Smouse, 2010).

This criterion, developed by Kimura and Crow (1978), is the reciprocal of homozygousness.

$$Ne = 1 / \sum pi^2$$

Ne: effective number of alleles

xi: is the frequency of the i allele.

2.4.5. Polymorphism information content (PIC)

Polymorphism information content is a value that measures the usefulness and informative level of a marker and shows a structure dependent on the number of alleles determined and the frequency distribution of these alleles (Botstein et al., 1980). This value is calculated as $PIC = 1 - \sum pi^2 - \sum pi^2 pj^2$. Where pi and pj are the “i” and “j” alleles, respectively. All these statistical values are shown in Table 3.

2.4.6. Genetic similarity

Genetic distance is the magnitude of gene differences between species (or population) pairs. These values are generally equivalent to geometric distances, so a distance value of “0” indicates no difference.

Similarity (I) and distance (D) values are complementary to each other ($I + D = 1$).

Table 2
The primer sets used in this study.

NO	PRIMERS	REPEATS	SEQUENCES
1	SSR47	(at)14	F: tcc tca aga aat gaa gct ctg a R: cct tgg aga taa caa cca caa
2	LEtc002	(ac)3(tc)6 imp	F: ttc tca cac ctg cac aca cc R: agc ggg atg att aca gaa atg
3	SSR139	(aga)2, (gaa)7	F: tgg gta tgg gat tta cac caa R: aaa cga agg caa caa cga ag
4	Tom236-237	(at)16	F: gtt ttt tca aca tca aag agc t R: gga tag gtt tgg tta gtg aac t
5	SSR572	(tc)11	F: aat tca cct ttc ttc cgt cg R: tgc aaa gaa caa aga cgg tg
6	LEat014	(at)9	F: tgt gtt gcg tca tta cca cta aac R: ccc aac cac caa tac ttt cc
7	SSR50	(tc)6, (ccctc)2	F: ccg tga ccc tct tta caa gc R: ttg ctt tct tct tgg cca tt
8	U81996	(ta)14	F: agg ttg atg aaa gct aaa tct ggc R: caa cca cca atg ttc att aca aga c
9	TMS37	(ga)21(ta)20	F: cct tgc agt tga ggt gaa tt R: tca agc acc tac aat caa tca
10	LEta019	(ta)20	F: tgt aga taa ctt cct agc gac aat c R: acg gac gga tgg aca aat g
11	LEat018	(at)29 imp	F: cgg cgt att caa act ctt gg R: gcg gac ctt tgt ttt ggt aa
12	TMS26	(ga)20	F: ttc ggt tta ttc tgc caa cc R: gcc tgt agg att ttc gcc ta
13	AQ368062	(ta)19	F: tga tcc taa gct ttt tcc gtg agt R: caa gtt cac ctc att tca ccc ct
14	Y08306	(ta)11	F: aac ggt gga aac tat tga aag g R: cac cac caa acc cat cgt c
15	SSR80	(tttcaa)2, (gtacaa)2, (caa)7	F: ggc aaa tgt caa agg att gg R: agg gtc atg ttc ttg att gtc a
16	SSR9	(ata)10	F: ccc ttt gca agt tct tct tca R: ttc atg agc caa cat agg agg
17	SSR75	(aat)9	F: cca tct att atc ttc tct cca aca c R: ggt ccc aac tgg gta cac ac
18	AI773078	(aat)14	F: gat gga cac cct tca att tat ggt R: tcc aag tat cag gca cac cag c
19	AI491065	(at)9	F: act gca ttt cag gta cat act ctc R: ata aac tgg tag acc ata ccc tc
20	Y09371	(at)12	F: tga gaa caa cgt tta gag gag ctg R: cgg gca gaa tct cga act c
21	AI895126	(ta)9	F: gct ctg tcc tta caa atg ata cct cc R: caa tgc tgg gac aga aga ttt aat g
22	LEta017	(ta)5	F: gag cac cca tta att tgg tta cg R: gtg gcg gat cta gaa att taa act g
23	SSR136	(cag)7	F: gaa acc gcc tct ttc act tg R: cag caa tga ttc cag cga ta
24	LEat016	(at)9	F: ccc aaa tgc tat gca ata cac R: agt tca gga ttg gtt taa ggg
25	LEgt001	(at)17(gt)18	F: aga att ttt tca tga aat tgt cc R: tat tgc gtt cca ctc cct ct
26	LEta014	(ta)31(gata)13 imp	F: aca aac tca aga taa gta aga gc R: gtg aat tgt gtt tta aca tgg
27	LEta024	(tg)4(ta)5	F: taa ata caa aag cag gag tgg R: gag ttg aca gat cct tca atg
28	LEtat003	(gt)2(ta)3(tat)6 imp	F: cat ttt atc att tat ttg tgt ctt g R: aca aaa aaa ggt gac gat aca
29	LEtat002	(tat)12	F: acg ctt ggc tgc ctc gga R: aac ttt att att gcc acg tag tca tga
30	LEta023	(ga)24(ta)31 imp	F: att gct cat aca taa ccc cc R: ggg aca aaa tgg taa tcc at
31	LEta021	(ta)11	F: ttc ttc cgt atg agt gag t R: ctc tat tac tta tta tga
32	LEta017	(ta)5	F: gag cac cca tta att tgg tta cg R: gtg gcg gat cta gaa att taa act g
33	LEta016	(ta)14	F: agg ttg atg aaa gct aaa tct ggc R: caa cca cca atg ttc att aca aga c
34	LEta012	(ta)19	F: tga tcc taa gct ttt tcc gtg agt R: caa gtt cac ctc att tca ccc ct
35	LEta007	(ta)20	F: gcc gtt ctt ggt gga tta g R: cct cct ttc gtc tct ttg tc
36	LEgata002	(gata)26	F: ttg gta att tat gtt cgg ga R: ttg agc caa ttg att aat aag tt
37	LEgata001	(gata)45	F: ctc tct caa tgt ttg tct ttc R: gca agg tag gta gct agg ga
38	LEga004	(ga)26 imp	F: agc atg gga aga aga cac gt R: ttg agc aaa aca tgg caa tc
39	AI780156	(ct)12	F: tcc aat ttc agt aag gac ccc tc R: ccg aaa acc ttt gct aca gag tag a
40	LEct004	(ct)3c14(ct)23	F: agc cac cca tca caa aga tt R: gtc gca cta ttc gtc acg ta

Genetic distance is a statistical measure that has been standardized as an evaluation scale in the investigation of genetic differences and provides an evaluation scale. The most commonly used genetic distance value is Nei's Genetic Distance (Nei, 1972). Genetic similarity between the two genotypes (I);

$$I = 2N_{XY} / N_X + N_Y$$

It is calculated by the formula (Nei and Li, 1979). Where N_{xy}; the bands shared by the two genotypes (x and y); N_x and N_y show the individual band numbers of x and y. Nei and Li (1979) reported that genetic distance is the negative (-) natural logarithm of the measure of genetic similarity.

$$D = - \ln (I)$$

D; It means genetic distance.

In terms of 40 microsatellite markers used, the genetic similarity and distance conditions of the 24 studied genotypes were calculated using the NTSYSpc v2.11 program according to the above formulas (Rohlf, 1998).

3. Results and discussion

3.1. Genotypic parameters

Imaging and scoring of the gels was done on the Syngene-Gene Tools (Cambridge, UK) gel documentation device and the molecular sizes of the PCR products in bp were extracted. In the study, for the analysis of 24 tomato genotypes with 40 polymorphic SSR loci, the number of alleles at each locus (n), allele frequency, expected (H_e) and observed heterozygosity (H_o), predicted silent allele (null) frequency (r) and polymorphism information content (PIC) were determined (Table 3). Genetic difference was measured by calculating expected heterozygosity as 1-pi². The pi value here shows the frequency of the "i" allele in the sample studied (Nei, 1987). The observed heterozygosity is the ratio between the heterozygous genotypes and the total genotype analyzed. The estimation of the presence of the null allele was calculated as (H_e-H_o) / (1+ H_e) (Brookfield, 1996). All these statistical values and parameters are shown in Table 3. Accordingly, the number of alleles, one of the components of genetic diversity, varied from 3 to 13, giving an average value of 6.4. The number of effective alleles (Ne)

Table 3
Statistical values and parameters of polymorphism information content.

No	Loci	Na	He	Ho	r	Ne	PIC
1	SSR47	4	0.698	0.584	0.067	3.3	0.600
2	LEttc002	7	0.723	0.719	0.002	3.6	0.718
3	SSR139	8	0.820	0.817	0.001	5.5	0.802
4	Tom236-237	5	0.745	0.671	0.042	3.9	0.640
5	SSR572	5	0.749	0.710	0.022	3.9	0.686
6	LEat014	4	0.546	0.625	-0.051	2.0	0.545
7	SSR50	3	0.605	0.595	0.068	2.5	0.455
8	U81996	10	0.867	0.859	0.004	7.5	0.866
9	TMS37	4	0.691	0.680	0.006	3.2	0.614
10	LEta019	7	0.788	0.666	0.068	4.7	0.708
11	LEat018	13	0.911	0.903	0.004	11.2	0.903
12	TMS26	6	0.747	0.750	-0.001	3.9	0.659
13	AQ368062	6	0.757	0.875	-0.067	4.7	0.745
14	Y08306	5	0.773	0.709	0.036	4.4	0.707
15	SSR80	3	0.653	0.417	0.142	2.8	0.540
16	SSR9	3	0.652	0.333	0.193	2.6	0.539
17	SSR75	4	0.558	0.702	-0.092	2.2	0.340
18	AI773078	4	0.648	0.789	-0.085	2.8	0.512
19	AI491065	10	0.880	0.875	0.002	8.3	0.879
20	Y09371	8	0.846	0.835	0.005	6.5	0.833
21	AI895126	4	0.670	0.626	0.026	3.0	0.554
22	SSR136	10	0.866	0.790	0.040	7.5	0.829
23	LEta017	8	0.852	0.750	0.055	6.7	0.809
24	LEat016	4	0.718	0.625	0.054	3.0	0.674
25	LEgt001	7	0.785	0.682	0.057	4.6	0.745
26	LEta014	9	0.830	0.792	0.020	5.8	0.823
27	LEta024	11	0.880	0.877	0.001	8.3	0.878
28	LEtat003	8	0.809	0.792	0.009	5.2	0.807
29	LEtat002	3	0.600	0.458	0.088	2.5	0.474
30	LEta023	9	0.818	0.824	-0.003	5.5	0.817
31	LEta021	6	0.804	0.755	0.027	5.1	0.735
32	LEata004	4	0.669	0.625	0.026	3.0	0.529
33	LEta012	4	0.679	0.628	0.030	3.1	0.561
34	LEta007	10	0.871	0.844	0.014	7.7	0.863
35	LEgata002	9	0.850	0.837	0.007	6.6	0.848
36	LEgata001	4	0.712	0.625	0.050	3.4	0.651
37	LEga004	5	0.642	0.638	0.002	2.8	0.645
38	AI780156	5	0.732	0.705	0.015	3.7	0.651
39	LEct004	11	0.878	0.874	0.002	8.2	0.870
40	Umc1178	6	0.798	0.709	0.049	4.9	0.736
	Loci	256	-	-	-	-	-
	Mean	6.4	0.753	0.714	-	4.752	0.694

Na: Number of alleles observed in the locus, **He:** Expected heterozygosity rate, **Ho:** Observed heterozygosity rate, **r:** Estimated null allele frequency, **Ne:** Effective allele number, **PIC:** Polymorphism information content.

varied from 11.2 to 2, with an average value of 4.75. While LEat018 locus gave the highest number of alleles, the lowest number of alleles were seen in SSR50, SSR80, SSR9 and LETat002 loci. In addition, these loci were found to have the highest and lowest effective allele values. 11.2 for the LEat018 marker; it was found as 2 for the LEat014 marker. These loci were also found to be the marker loci with the highest and lowest polymorphism information content values. The PIC value for the LEat018 marker was 0.903; PIC values for SSR50, SSR80, SSR9 and LETat002 markers were calculated as 0.455-0.540-0.539-0.474, respectively. The average PIC value of the loci used was found to be as 0.694.

The average expected and observed heterozygosity rates were found to be as 0.753 and 0.714, respectively. The predicted null allele frequency was negative at 6 loci and positive at 34 loci. In a study, PIC value at 37 loci was higher than the value of 0.05 (Sefc et al., 2001). This situation indicates that these selected microsatellite markers are indeed highly polymorphic

in tomato.

Looking at the loci individually, 24 genotypes gave LEat018 loci with 13 alleles at most, and this was LETa024, LEct004, (11 alleles), U81996, AI491065, SSR136, LETa007 (10 alleles), LETa014, LETa023, LEgata002, (9 alleles), SSR139, Y09371, LETa017, LETat003 (8 alleles), LETtc002, LETa019, LEgt001 (7 alleles), TMS26, AQ368062, LETa021, Umc1178 (6 alleles), Tom236-237, SSR572, Y08306, LEga004, AI 580) SSR47, LEat014, TMS37, SSR75, AI773078, AI895126, LEata004, LEat016, LEgata001, LETa012 (4 alleles) followed loci. The least alleles gave SSR50, SSR80, SSR9 and LETat002 as 3 alleles.

Allele numbers and frequencies of 40 loci examined in 24 genotypes are given in Table 3. Accordingly, at the LEat018 locus, 184, 186, and 195 alleles were the most common among genotypes giving 37.5% the highest frequency. In the study, when the loci used for the 24 genotypes were examined one by one, it was determined that the locus with the lowest number of

effective alleles (LEat014) was not among the loci with the lowest allele. Likewise, the most common allele in 24 genotypes were 186 (20.8%) at the LEta017 locus, 284.281 (29.2%) at the SSR572 locus, 237.235 (33.3%) at the TMS26 locus, 274.280 (29.1%) at the LEta019 locus, 288 (33.3%) at the LEgt001 locus, 206.214 (16.6%) at AI491065 locus, 196 (20.8%) at U81996 locus, 338 (33.3%) at LEgata001 locus, 201 (41.6%) at SSR80 locus, 198 (32.2%) at SSR139 locus, At LEata004 locus 184 (45.8%), at LEga004 locus 270 (50.0%), at LEta023 and LEta014 loci 178 (30.4% -29.16%), at LETtc002 locus 157 (45.8%), at LEta024 locus 290-288 (16.6%), at LETat003 locus 102 (29.1%), at Umc1178 locus 183-185 (25.0%), at AQ368062 locus 284 (37.5%), at locus Y08306 198 (29.2%), Tom236-195 (37.5%) at 237 locus, 172 (20.8%) at SSR136, 250 (29.1) at LEta021 locus, 364 (20.8%) at LEct004 locus, 184 (37.5%) at LEat016 locus, LEat014 at the locus 210 (58.3%), at the AI895126 locus 116 (41.6%), at the SSR50 locus 200 (50.0%), at the TMS37 locus 154 (33.3%), at the SSR75 locus 163 (62.5%), 264 (41.6%) at LEta012 locus, 187 (41.7%) at SSR9 locus, 160 (45.8%) at AI773078 locus, 314 (37.6%) at SSR47 locus, 295 (45.6%) at LETat002 locus, There were 312 (20.8%) alleles at the LEta007 locus, 354-349 (20.8%) at the LEgata locus, 175 (25.0%) at the Y09371 locus, and 118-123 (33.3%) at the AI780156 locus. Among the genotypes studied, SSR572 (284.281), TMS26 (237.235), LEta019 (274.280), LEgata001 (338), SSR80 (201), Tom 236-237 (195), LEat016 (184), SSR50 (200), SSR75 (163), Alleles with high rates at LEta012 (264), SSR9 (187), AI773078 (160), LEta007 (312), AI780156 (118-123) and other loci were also seen in commercial genotype varieties, including native genotype varieties. Therefore, we cannot use the expression that these are alleles belonging only to native genotype varieties. However, the most common 184-186 in LEat018 locus are at LEta017 locus, 288 at LEgt001 locus, 206-214 at AI491065 locus, 196 at U81996 locus, 198 at SSR139 locus, 184 at LEata004 locus, 270 at LEga004 locus, 178 at LEta023 and LEta014 locus, LETtc002 locus), 290-288 at LEta024 locus, 102 at LETat003 locus, 183-185 at Umc1178 locus, 284 at AQ368062 loci, 198 at Y08306, 172 at SSR136, 250 at LEta021 locus, 364 at LEct004 locus, 210 at LEat014 locus 154, 116 at SSR37 locus 314 at locus, 295 at LETat002 locus, 175 at Y09371 locus were only seen in native genotype varieties.

The similarity ratio index was found by calculating Genetic Distance $D = 1 - (\text{shared allele ratio})$ (uniqueness ratio, dissimilarity) with NTSYSpc v2.11 (Rhoft, 2000) program. This value was then transformed into similarity ratio. Genetic similarity values of genotypes are given in Table 4.

Accordingly, the highest genetic similarity was found between SVY2 [12] and BFM1 [9] (0.776), SMÇ [18] and AYNP [21] (0.698) and CRSB [14] and ANKÇ [16] (0.604). The shared allele ratio ranged from SVYE [5] to SME [17] with a value of at least 0.211. Genetic similarity value of commercial genotypes were found as UCW1 [22] and UCW2 [23] (0.578), UCW1 [22] and UCW3 [24] (0.498), UCW2 [23] and UCW3 [24] (0.317). Therefore, the result is that these varieties are different.

The greatest genetic similarity with commercial genotypes was found to be UCW1 [22] and SVGK [8] (0.589), UCW2 [23] and GRÇ [1] (0.568) and UCW3 [24] and SVY2 [12] (0.544). The lowest genetic similarity with commercial genotypes was found as UCW3 [24] and KRSB [14] (0.362), UCW2 [23] and BFM1 [14] (0.241) and UCW1 [22] and SMÇ1 [20] (0.217). Dendrogram NTsys of genotypes (version 2.02g. Exeter Soft-

Table 4
Genetic similarity values of tomato genotypes.

1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1	1	.317	.423	.287	1																				
2	.423	1	.392	.574																					
3	.287	.392	1	.408	.423																				
4	.574	.408	.423	1	.377	.377																			
5	.498	.438	.453	.423	.377	.377	1																		
6	.468	.392	.408	.423	.362	.272	.272	1																	
7	.483	.438	.453	.423	.468	.256	.256	.256	1																
8	.468	.438	.453	.423	.468	.453	.287	.302	.302	1															
9	.468	.438	.453	.423	.468	.453	.287	.302	.241	.166	1														
10	.513	.528	.498	.498	.513	.468	.392	.408	.317	.256	.196	1													
11	.483	.513	.559	.528	.528	.453	.362	.377	.317	.776	.241	.256	1												
12	.498	.513	.498	.568	.468	.408	.423	.362	.362	.392	.347	.408	.302	1											
13	.528	.498	.513	.544	.438	.528	.468	.498	.498	.498	.438	.408	.438	.438	1										
14	.559	.528	.528	.559	.377	.574	.483	.498	.498	.498	.498	.408	.438	.362	.332	1									
15	.528	.574	.574	.423	.513	.559	.544	.544	.559	.544	.544	.483	.544	.513	.604	.347	1								
16	.513	.544	.498	.544	.211	.528	.513	.559	.544	.513	.498	.513	.498	.468	.468	.332	.332	1							
17	.528	.513	.544	.574	.544	.559	.528	.528	.528	.574	.559	.544	.513	.528	.392	.256	.392	.256	1						
18	.559	.544	.528	.574	.544	.589	.559	.559	.574	.574	.528	.544	.528	.528	.438	.332	.332	.136	.136	1					
19	.574	.559	.544	.528	.544	.544	.528	.559	.574	.574	.544	.528	.528	.483	.453	.453	.453	.423	.317	.256	1				
20	.574	.559	.513	.574	.513	.589	.528	.544	.544	.544	.559	.528	.513	.483	.453	.468	.468	.468	.302	.226	.226	1			
21	.528	.544	.528	.438	.528	.513	.544	.589	.544	.544	.559	.559	.544	.559	.513	.468	.483	.483	.498	.217	.408	.408	1		
22	.568	.544	.544	.528	.438	.498	.528	.574	.241	.241	.528	.544	.544	.528	.513	.483	.528	.513	.528	.498	.438	.438	.578	1	
23	.272	.438	.513	.513	.513	.528	.528	.528	.483	.498	.513	.544	.544	.483	.362	.408	.513	.528	.513	.513	.483	.408	.498	.423	1
24	.438	.513	.513	.513	.528	.453	.528	.528	.528	.483	.498	.513	.544	.483	.362	.408	.513	.528	.513	.513	.483	.408	.498	.423	1

ware. Setauket. NY created and visualized with software program. UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using arithmetic means) method was applied for cluster analysis.

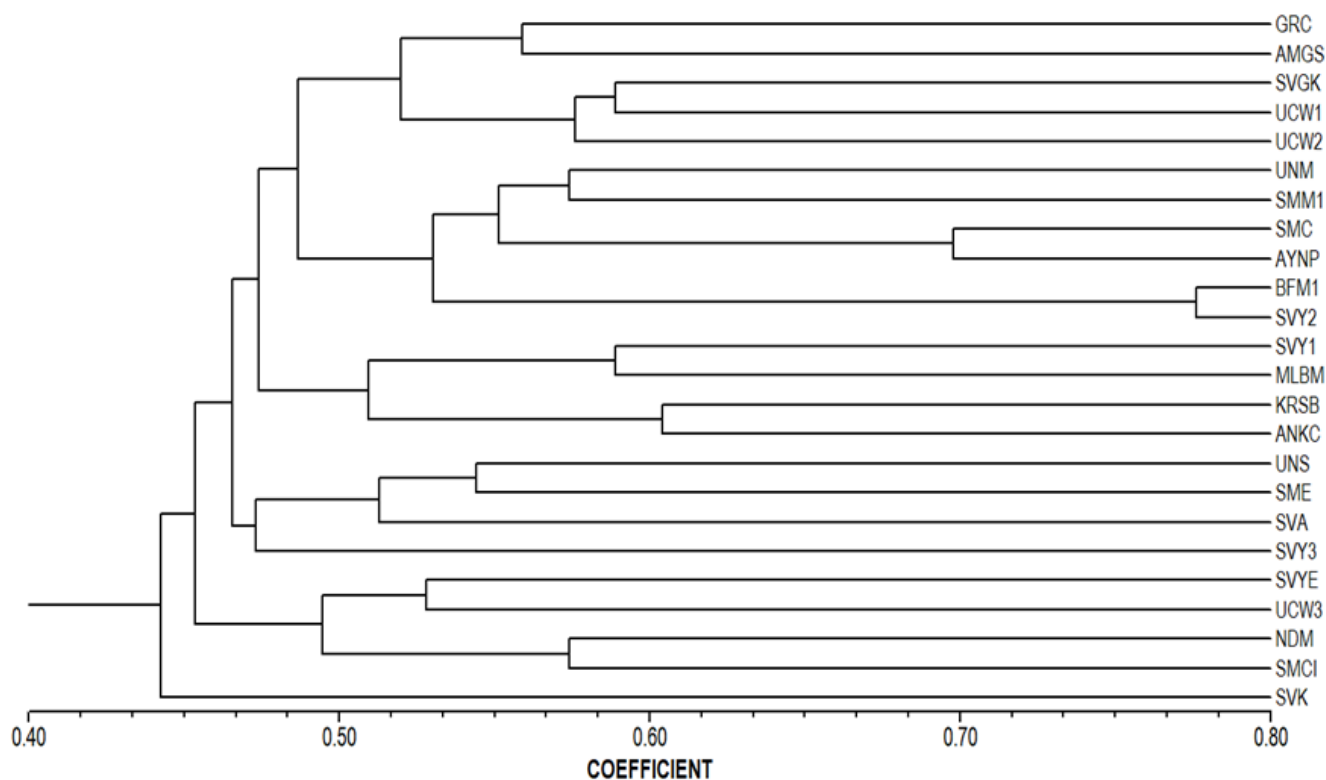


Fig. 2. Genetic diversity dendrogram between tomato genotypes.

Table 5

Morphological characteristics of the tomato genotypes.

Genotype Codes	Plant Type	Fruit Width-Length (mm)	Locule Numbers of Fruit	Maturity Time	Fruit Type
1-GRC	Determinate	12.39-12.92	2	Early	Round
2-ÜNS	Indeterminate	57.02-52.89	3	Medium	Round
3-ÜNM	Determinate	65.74-52.70	6	Late	Slightly Flattened
4-SMM1	Indeterminate	94.43-56.81	11	Late	Flattened
5-SVYE	Indeterminate	81.48-55.50	8	Late	Flattened
6-SVY1	Indeterminate	12.43-19.47	2	Late	Cylindrical
7-SVK	Determinate	65.45-62.79	8	Late	Pear-shaped
8-SVGK	Determinate	25.35-27.09	2	Medium	Round
9-BFM1	Determinate	97.79-60.13	8	Early	Flattened
10-NDM	Determinate	43.70-62.76	2	Early	Oval
11-SVA	Indeterminate	92.13-56.02	11	Medium	Flattened
12-SVY2	Determinate	84.12-72.22	9	Medium	Flattened
13-SVY3	Determinate	11.72-16.23	2	Medium	Oval
14-KRSB	Determinate	51.81-73.90	2	Medium	Oval
15-AMGS	Determinate	92.13-57.26	13	Medium	Flattened
16- ANKÇ	Determinate	49.50-3.83	4	Medium	Oval
17- SME	Determinate	49.81-43.29	2	Medium	Slightly Flattened
18-SMÇ	Determinate	52.60-49.72	3	Medium	Round
19-MLBM	Determinate	51.65-48.82	3	Early	Round
20-SMÇI	Determinate	85.30-70.55	6	Late	Round
21-AYNP	Determinate	72.77-53.26	5	Medium	Slightly Flattened
22-UCW1	Indeterminate	45.35-37.12	2	Early	Slightly Flattened
23-UCW2	Indeterminate	41.54-38.72	2	Early	Round
24-UCW3	Determinate	94.72-57.08	10	Medium	Flattened

Dendrogram of tomato genotypes are given in Fig. 2. When the dendrogram is examined, 2 main groups stand out. There were 5 subgroups within the second (2) group, including the majority of genotypes, and 3 subgroups within the first (1) group. Commercial (22), Commercial (23), Commercial (24) varieties used as commercial varieties have been observed to

form a separate subgroup within the first (1) group. In the dendrogram, the genetic similarities (0.776) of the Bafra-Merkez and Sivas-Yukarıkale Village cultivars assessed by the shared allele ratios are clearly seen. Again, a close genetic similarity value of 0.604 between Samsun-Carsamba and Aydin-Nazilli (0.698), which are genetically close, and Karabuk-

Safranbolu and Antalya-Kas, is also seen in the dendrogram. Sivas-Yildizeli, which is linked to Unye-Merkez and Samsun-Merkez varieties, is also closely linked in the dendrogram due to their genetic proximity to these two varieties.

3.2. Morphological parameters

When the morphological characteristics of the genotypes were examined (Table 5), it was observed that the fruit diameter, number of fruit lobes, harvest times and especially fruit shapes of Bafra-Merkez and Sivas-Yukarikale Village varieties were similar. These similarities are seen with both genetic similarity and genetic relationship dendrogram. The morphological similarities between Samsun-Carsamba and Aydin-Nazilli, which are genetically close, and Karabuk-Safranbolu and Antalya-Kas are also striking. If it is compared the genetic data as dendrogram and morphological data, it seems that there is no grouping due to morphological parameters.

In this study covering the assessment of genetic diversity on tomato landraces, SSR marker analysis gave a great of information about the distinguishing of landraces. However, Nei

and Shannon indexes were not calculated in this study because of the selection effect by individuals and unbalanced pollination on landraces that will not give safe information on population (Hennink and Zeven, 1990). The genetic diversity on tomato landraces in this study is so important that breeders can find any different genotype material carrying desired genes. Morphological data shows that desired genes can be find in these population making pure lines of genotypes for increasing the similarity within bred lines using molecular markers (Okumus, 2007).

Acknowledgements: This Project was funded by Ondokuz Mayıs University with the number of PYO.ZRT.1904.10.032.

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

Informed consent: This manuscript did not involve human or animal participants; therefore informed consent was not collected.

References

- Benor, S., Zhang, M., Wang, Z., & Zhang, H. (2008). Assessment of genetic variation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) inbred lines using SSR molecular markers. *Journal of Genetics and Genomics*, 35(6), 373-379.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314.
- Brookfield, J. F. Y. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5(3), 453-455.
- Can, H., Kal, U., Ozyigit, I. I., Paksoy, M., & Turkmen, O. (2019). Construction, characteristics and high throughput molecular screening methodologies in some special breeding populations: a horticultural perspective. *Journal of Genetics*, 98(3), 86.
- Castellana, S., Ranzino, L., Beritognolo, I., Cherubini, M., Luneia, R., Villani, F., & Mattioni, C. (2020). Genetic characterization and molecular fingerprint of traditional Umbrian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces through SSR markers and application for varietal identification. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67(7), 1807-1820.
- Cox, S. (2000). From discovery to modern commercialism: the complete story behind *Lycopersicon esculentum*, Colorado State, USA. <http://www.landscapeimagery.com/articles.html>, Last accessed on July 18, 2021.
- Dilbirli, E., (2007). Bitkisel biyolojik çeşitlilik ve genetik kaynaklarının sürdürülebilir kullanım stratejilerinin değerlendirilmesi. *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1991). Isolation of plant DNA from fresh tissue plant. *Plant Molecular Biology*, 9, 340-342.
- Fentik, D. A. (2017). Review on genetics and breeding of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Advances in Crop Science and Technology*, 5(5), 1-6.
- He, C., Poysa, V., & Yu, K. (2003). Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(2), 363-373.
- Hennink, S., & Zeven, A. C. (1990). The interpretation of Nei and Shannon-Weaver within population variation indices. *Euphytica*, 51(3), 235-240.
- Henareh, M., Dursun, A., & Mandoulakani, B. A. (2015). Genetic diversity in tomato landraces collected from Turkey and Iran revealed by morphological characters. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 14(2), 87-96.
- Henareh, M., Dursun, A., Abdollahi-Mandoulakani, B., & Haliloğlu, K. (2016). Assessment of genetic diversity in tomato landraces using ISSR markers. *Genetika*, 48(1), 25-35.
- Hocaoglu-Ozyigit, A., Ucar, B., Altay, V., & Ozyigit, I. I. (2020). Genetic diversity and phylogenetic analyses of Turkish cotton (*Gossypium hirsutum* L.) lines using ISSR markers and chloroplast trnL-F regions. *Journal of Natural Fibers*, 1-14.
- Kaemmer, D., Weising, K., Beyermann, B., Borner, T., Eppel, J. T., & Kahlm, G. (1995). Oligonucleotide fingerprinting of tomato DNA. *Plant Breeding*, 114(1), 12-17.
- Garcia-Martinez, S., Andreani, L., Garcia-Gusano, M., Geuna, F., & Ruiz, J. J. (2006). Evaluation of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeats for tomato germplasm fingerprinting: utility for grouping closely related traditional cultivars. *Genome*, 49(6), 648-656.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949), 283-292.
- Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269-5273.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. (pp. 1-512). Columbia University Press, New York.
- Okumus, A. (2007). Genetic variation and relationship between Turkish flint maize landraces by RAPD markers. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 2(2), 49-53.
- Osma, E., Ozyigit, I. I., Leblebici, Z., Demir, G., & Serin, M. (2012). Determination of heavy metal concentrations in tomato (*Lycopersicon esculentum* Miller) grown in different station types. *Romanian Biotechnological Letters*, 17(1), 6962-6974.
- Ozgen, M., Adak, S., Karagoz, A. Ulukan, H. (1995). Bitkisel gen kaynaklarının korunma ve kullanımı. *Türkiye Ziraat Mühendisliği 4. Teknik Kongresi, Ankara, Ziraat Bankası Kültür Yayınları*, 26, 309-343.
- Peakall, R., & Smouse, P. (2010). GenA1Ex 6.4. Appendix 1: Methods and statistics. <http://wenku.baidu.com/view/f483ee3243323968011c927c.html>, Last accessed on July 18, 2021.
- Rohlf, F. J. (1998). NTSyS-p.c. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Version 2.0). Exeter Software Publishers Ltd., Setauket.
- Schouten, H. J., Tikunov, Y., Verkerke, W., Finkers, R., Bovy, A., Bai, Y., & Visser, R. G. (2019). Breeding has increased the diversity of cultivated tomato in The Netherlands. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1606.
- Sefc, K. M., Lefort, F., Grando, M. S., Scott, K. D., Steinkellner, H., & Thomas, M. R. (2001). Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In: Roubelakis-Angelakis, K. A., (eds) *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine* (pp. 433-463). Springer, Dordrecht.
- Sol Genomics, (2021). The Official Website of Sol Genomics Network, https://solgenomics.net/about/tomato_project/nsf_9872617/index.pl,

- Last accessed on July 18, 2021.
- Tam, S. M., Mhiri, C., Vogelaar, A., Kerkveld, M., Pearce, S. R., & Grandbastien, M. A. (2005). Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(5), 819-831.
- Tridge, (2021). The Official Website of Global Sourcing Hub of Food & Agriculture, <https://www.tridge.com/intelligences/tomato/production>, Last accessed on July 18, 2021.
- Vural, H., Esiyok, D., & Duman, I. (2000). *Kültür sebzeleri (sebze yetiştirme)*. (pp. 1-440). Ege Üniv., Ziraat Fak., Bornova, İzmir.
- Wien, H. C. (1987). *The physiology of vegetable crops*. (pp. 1-207). Cornell University, Ithaca N.Y., USA.
- World's Top Exports, (2021). The Official Website of World's Top Exports, <http://www.worldstopexports.com/tomatoes-exports-country>, Last accessed on July 18, 2021.
- Yazgan, A., & Fidan, S. (1996). Tokat koşullarına uygun kiraz domates (*Lycopersicon esculentum* Mill. var. *cerasiforme*) çeşitlerinin belirlenmesi. *GAP I. Sebze Tarimi Sempozyumu, Sanliurfa*, 19-23.

Cite as: Okumus, A., & Dagidir, S. (2021). Assessment of genetic diversity on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) landraces using SSR molecular markers in Turkey. *Front Life Sci RT*, 2(2), 51-59.



Research article / Araştırma makalesi

Tıbbi sterilizasyonun kontrolünde kullanılan biyoindikatör sistemi tasarlanması

Nurseli Kanyılmaz¹ , Ahmet Koluman^{*1} 

¹Pamukkale Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği, 20160, Denizli, Türkiye

Öz

Sterilizasyon, hastane enfeksiyonlarını kontrol etmek için en etkili yöntemlerden biridir ve uluslararası standardizasyon kuruluşunun belirlediği standartlara göre uygulanmaktadır. Sterilizasyon yöntemi, tıbbi malzemenin fiziksel özelliklerine göre seçilmektedir. Bu çalışmada biyolojik indikatörler, işlemin uygulanacağı malzeme ve zaman parametresi değerlendirilerek üretilmiştir. *Geobacillus stearothermophilus* spor formda olup, biyolojik indikatör yapımında yaygın olarak kullanıldığından bu çalışma için seçilmiştir. Vejetatif formda olması ve düşük sıcaklıktaki sterilizasyon yöntemlerine verdiği cevap süresiyle seçilen bir diğer bakteri de *Escherichia coli* olmuştur. Seçilen iki bakteriyle çiftli kontrol yapılmıştır. *G. stearothermophilus* ve *E. coli* bakterilerinin büyümesi için glukoz ve nişasta besin maddesi olarak kullanılmıştır. Arduino Uno ve TCS3200 renk sensörü ile hazırlanan sistemden bakteri ve besin maddelerinden hangisinin daha hızlı sonuç verdiği test edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre iki bakterinin de otoklav biyoindikatörü olarak kullanıma uygun, halk sağlığı çalışmaları açısından yeterli olduğu görülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, elektronik ve optik donanımı sayesinde insan gözünden daha hızlı ve doğru okuyabilen, analitik veriler ile optimize edilip, kayıt altına alınabilen bir cihazla kalite kontrol süreçlerinin daha doğru yapılabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Biyolojik indikatör; hijyen; optik donanım; sterilizasyon

Designation of bioindicator system for controlling the medical sterilization

Abstract

Sterilization is one of the most effective methods to control hospital infections, and is applied according to the standards set by the international standardization organization. The sterilization method is selected according to the physical properties of the medical material. In this study, biological indicators were produced by evaluating the material and time parameters of the process. *Geobacillus stearothermophilus* is in spore form and was chosen for use in this study because it is widely used in making biological indicators. *Escherichia coli* was another bacterium selected for its vegetative form and its response time to low-temperature sterilization methods. Paired control was performed with two selected bacteria. Glucose and starch were used as nutrients for the growth of *G. stearothermophilus* and *E. coli* bacteria. It was tested which of the bacteria and nutrients gave faster results from the system prepared with the Arduino Uno and TCS3200 color sensor. According to the results of the study, it was seen that both bacteria were suitable for use as autoclave bioindicators and were sufficient for studies in terms of public health. The results obtained from this study showed that quality control processes can be done more accurately using a device, which read faster and more accurately than the human eye and be optimized and recorded with analytical data with its electronic and optical equipment.

Keywords: Bioindicators; hygiene; optical devices; sterilization

* Sorumlu yazar.

E-mail: akoluman@pau.edu.tr (A. Koluman).

<https://doi.org/10.51753/flsrt.972920> Yazar katkıları

Geliş tarihi 24 Temmuz 2021; Kabul tarihi 24 Ağustos 2021

Çevrimiçi yayın 30 Ağustos 2021

2718-062X © 2021 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

1. Giriş

Sterilizasyon, tüm mikroorganizmaların ortadan kaldırılması işlemidir (Albert ve ark., 1998). Sterilizasyonun standartlarına uygun adımlar ile tıbbi malzemelerin üretimi ve kullanımında gerekli prosedürler sağlanmaktadır. Tek kullanımlık olmayan tüm tıbbi malzemelere sterilizasyon uygulanır ve sterilizasyon başarısız olduğunda enfeksiyonlara neden olabilir (Panta ve ark., 2019). Sterilizasyon işleminin başarısız olması insan sağlığı açısından risk oluşturduğu için medikal malzemelerin mikroorganizma barındırma olasılığı kontrol edilmektedir (Albert ve ark., 1998; Panta ve ark., 2019).

Hastane enfeksiyonlarının kontrol altına alınmaması, ölüm ve maliyet artışına sebep olmaktadır. Bu nedenle hastane giderlerinin büyük bir bölümü tekrar kullanılabilen malzemelerin sterilizasyonu için ayrılmaktadır (Castillo, 2017). Endüstriyel uygulamalarda sterilizasyon işlemi sonunda kalan mikroorganizma değeri SAL (Sterility Assurance Level) ile tanımlanmaktadır. Sterilizasyon yöntemleri; sterilizasyon işleminin ekonomikliği, mikrobiyal uzaklaştırma mekanizmaları, malzemenin uygunluğu, yasal gereklilikler ve çalışma parametrelerine göre seçilmektedir. Sterilite direkt olarak ölçülmediği için validasyon işlemi biyolojik ve kimyasal indikatörler sayesinde yapılmaktadır. Kontrol sistemi tasarlama aşamasında ilk olarak sterilizasyon şartlarına dirençli bir mikroorganizma seçilmektedir. Steril olması istenen ürün ile sterilizasyon arasındaki etkileşimin başarısı kimyasal indikatör ile, sterilizasyon döngüsüne karşı direnci etkileyen parametrelerin etkisi ise biyolojik indikatör ile belirlenmektedir (Caylan, 2003).

Sterilizasyonun gerçekleştirilmesinde yaygın olarak kullanılan otoklav cihazları; gıda, kimya, mikrobiyoloji, tıp, diş hekimliği, veterinerlik sektörlerinde öne çıkmaktadır. Steril edilecek malzemeye göre seçilen sterilizasyon yöntemi değişmektedir. Yaygın kullanılan buharla sterilizasyon, buharla doymuş bir ortamda 100 °C'den daha yüksek sıcaklık ile yapılan sterilizasyon çeşididir ve 121 °C'de 1,5 atmosfer basınçta 15 dakikada etkin değerini gösterir. Otoklavların sterilize edilecek ortama ve malzemeye bağlı olarak boyutu ve işlevi farklılık göstermektedir. Bir diğer yaygın kullanılan yöntem kuru hava ile sterilizasyonda Pastör fırınları, 175 °C'de 1 saat, 140 °C'de 3 saat işlem sürelerine sahiptir. Sıcaklık, basınç, nem, konsantrasyon verilerinin sensörler aracılığıyla cihaz ekranında görüntülenmesiyle sterilizasyon kontrolünün ilk aşaması gerçekleştirilmektedir. Kimyasal indikatörler, paketin yerleştirildiği yerde maruz kaldığı işlem sonunda kimyasal veya fiziksel değişikliklere uğrayarak renk değişimi sayesinde sterilizasyon işlemi bittiğinde sonuç gösteren indikatörlerdir. Ancak sterilizasyon işlemi hakkında kısıtlı bilgi sağlamaktadır (Black, 1993).

Biyolojik indikatörler, sterilizasyonla ilgili doğrudan bilgi sağlayarak mikroorganizmaların hücre bütünlüğünün bozulmasındaki etkiyi göstermektedir. Yaygın kullanılan otoklav etkinliğinin güvencesi standartlar tarafından belirlenir ve biyolojik indikatörler ile kanıtlanmaktadır. Sterilizasyon sonrası, sterilite güvence düzeyine (SAL) ulaşıldığının ispatlanması için standartta yaygın olarak 10⁶ yükünde spor içeren biyolojik indikatörler kullanılır. Biyolojik indikatörler steril edilecek cihazda; kapak, köşeler ve vakum drenaj çıkışları gibi sterilizasyon işleminin en zor gerçekleştiği bölgelere yerleştirilir. Sterilizasyon işleminde kontamine olmuş malzeme yıkanarak paketlenir, sterilizatöre ve yerleştirilir sterilizasyon işlemi sonunda tekrar kullanılmak üzere depolama alanına

kaldırılır (Rutala ve Weber, 2013).

Kısa zamanda tamamlanan, ameliyathanede kullanılan acil sterilizasyon için "flash sterilizasyon" terimi kullanılır. Bu teknikte aktif sporlarla ilişkili α -glukozidaz enzim aktivitesi ölçülmektedir. Enzim tespitiyle sonuç alınan biyoindikatörlerin ihtiyacı için bu teknik önemli olmuştur. Enzim canlı sporlarda tespit edilebilen normal bir bileşendir. Sterilizasyon sonrası canlı bir spor kalması halinde sterilizasyon başarısızlığı ortamın bulanıklığıyla belirlenir (Vesley ve ark., 1992; Albert ve ark., 1998).

Belli sterilizasyon işlemine direnç sağlayan bakteri sporlarından oluşan biyolojik indikatörler, sterilizasyon esnasındaki işlemde biyolojik ölümün gerçekleştiğini kanıtlar. Biyolojik indikatörler, ilgili sterilizasyon yöntemine göre en dayanıklı bakteri sporları seçilerek üretilmektedir. Geleneksel olarak biyoindikatörler *Bacillus* veya *Geobacillus* içeren bakteri sporlarıdır. Bakteriye sporlar, izleme ve doğrulama döngülerinde vejetatif hücrelere kıyasla çevre stresine karşı dayanıklı olduğu için kullanımı yaygındır. Biyolojik göstergeler bir sterilizatörün rutin parametrelerinin izlenmesi ve yük takibi için de kullanılmaktadır ve bir sterilizasyon döngüsü sırasındaki koşulların tanımlanmış olan mikrobiyal inaktivasyon seviyesine ulaşmak için yeterli olup olmadığını kanıtlamaktadır (Sigwarth ve Moirand, 2000). Bu göstergeler, büyüme ortamı ve sporları tek bir şişede birleştirilerek kontrol sağlar. Sterilizasyon sonrası spor içeren şeritler besiyerine aktararak ya da aynı tüp içindeki besiyeri kırılmasıyla bir araya getirilerek sporun çeşidine ve üremesine uygun sıcaklıkta inkübatöre yerleştirilmektedir. Böylece sterilizasyon işleminin ardından sporların büyüme ortamı ile karışması sağlanır ve spor büyümesine uygun sıcaklıkta inkübe edilir. Büyüme ortamı, test organizmasının canlılığını etkileyebilecek herhangi bir sterilize edici ajan kalıntısını nötralize edebildiğinden emin olmak için valide edilmelidir. Belirtilen kültür koşullarını sağlayacak sıcaklığa ayarlanan böylece sıcaklığın rutin olarak izlenmesi için inkübatör kullanılmaktadır. Belirtilen sürede inkübasyon sonrasında üreme olmaz ise biyolojik ölümün gerçekleştiği doğrulanmaktadır. Sterilizasyon yapılacak malzemede bulunan mikroorganizmalar, sporlardan daha düşük dirençte olduğu için sterilizasyon gerçekleştirilmiş olur. Canlı mikroorganizmanın kullanımı bu sebepten yaygındır. *Geobacillus stearothermophilus* sporları en yüksek sıcaklıklara direnç gösterdiği için sterilizasyon kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır (Shintani, 2011).

Buhar sterilizasyonunda yüksek direnci ve tutarlı inaktivasyon etkinliği ile *G. stearothermophilus* tercih edilmekte iken *Bacillus pumilus* sporları diğer *Bacillus* türlerinden radyasyona daha dirençli olması sebebiyle mikroorganizmaların radyasyon direncini tespit için tutarlı yanıtlar almak ve doz oranını (kGy/zaman) ayarlamak için biyoindikatör olarak kullanılmaktadır (Wallace, 2016; Hansen ve ark., 2020).

Biyolojik indikatörlerin; sterilizatörün tamir gerektiren bir arızasından sonra, vücuda implante edilecek malzemelerin her çevriminde, paket malzemelerinin boyutu değiştiğinde kullanılması zorunludur. Biyolojik indikatörlerin düşük sıcaklıktaki sterilizasyonlarda her çevrimde kullanılması gerekmektedir. Kuru sıcaklık ve buharlı yöntemlerde ise invazif olma durumuna göre değerlendirilerek en az haftada bir kez kullanılmalıdır (Wallace, 2016).

Sterilizasyon işlem koşullarına dayanıklı canlı mikroorganizma içeren biyoindikatörler, kalitatif test sistemleridir. Biyoindikatörler, sterilizasyon işleminde belirlenmiş koşulların sağlanıp sağlanmadığıyla ilgili bilgi

vermektedir. Biyolojik göstergeler, sterilizasyon döngüsüne oldukça dayanıklı bakteri sporları seçilerek işlevini gerçekleştirmektedir (Pflug ve Odlaug, 1986). Bu biyolojik göstergeler, sporları çoğaltarak ve büyüme ortamındaki asit metabolitlerinin üretimini ölçmek için bir pH göstergesine dayanır. Spor emdirilmiş kâğıt şeritler, kendinden besiyerli kapalı sistemler ve enzim bazlı biyolojik indikatörler olarak 3 çeşit biyolojik indikatör üretilmektedir. Biyolojik indikatörlerin ilk çeşidi, zarfların içinde aşılansız kağıt şeritler şeklindedir. Bunlar sterilizasyon işleminden sonra steril kültür ortamına aktarılır ve 7 gün süreyle inkübe edilir. Bu yöntemle, sterilizasyon başarısızlığı büyüme ortamının bulanıklığıyla gözlemlenmektedir (Shintani, 2011). İkinci çeşit biyolojik indikatörler, kullanıma hazır bir pakette geri kazanım için gerekli spor şeridi ve büyüme ortamını içeren bağımsız sistemlerdir. Sporları çoğaltarak ve hücreleri kopyalayarak büyüme ortamındaki asit metabolitlerinin üretimini ölçen biyolojik göstergeler, pH ölçümüne dayanır. Bu sistemle birlikte, birinci olarak açıklanan kağıt şeritlere kıyasla kontaminasyon sorunu ortadan kaldırılır. Ancak hayatta kalan sporların tespiti için 24-168 saat okuma süresi gerekmektedir. Spor içeren kağıt şerit biyoindikatörler, sterilizasyon işleminden sonra yaygın olarak 7 gün süreyle inkübe edilir. Yeni bir sterilizasyon yöntemi için 7 günlük bir referans inkübasyon süresini desteklemek için yeterli veri bulunmadığında, doğrulamanın dayandırılacağı referans inkübasyon süresi olarak en az 14 gün kullanılmaktadır (ISO 14161, 2009; ISO 11140-1, 2014; ISO 13485, 2016; ISO 11138-1, 2017).

Kendinden besiyeri içeren kapalı sistemlerde hayatta kalan sporların tespiti için 24-168 saat okuma süresi gereklidir. Üreme tespit sistemine göre çok farklı zamanlarda sonuç verebilen biyoindikatörler, yaygın olarak 1-48 saatte sonuç verir bununla birlikte referans inkübasyon süresi değişmektedir. Enzim aktivitesi sayesinde daha kısa inkübasyon süreleriyle tespit edilebilen biyolojik kalıntı, enzim tabanlı algılama sistemleri sayesinde tespit edilerek bu süre kısaltılmıştır. Kültür yöntemi ile en az 24 saatte sonuç alınırken, enzim aktivitesi ile bu süre 1-4 saatte yapılabilmektedir. Günümüzde en az 1 saatte sonuç alınan biyoindikatörler üretilmişken, bunlar 4 saatte sonuç alınan indikatörlere göre oldukça pahalıdır (Albert ve ark., 1998; Rutala ve ark., 2001).

Biyolojik indikatörlerin sonuçları; türbidimetrik, florimetrik ve spektrofotometrik olmak üzere 3 farklı yöntemle ölçülebilir. Türbidimetrik yöntemde gözle tespit yapılır negatif sonucu garantilemek için inkübasyon süresi en az 2 saattir. Spektrofotometrik yöntemde renk değiştiren besiyerinin otomatik okuması sağlanmaktadır. Florimetrik yöntemde ise floresan vermeyen maddeyi floresan verir hale getirdiği için α -glukozidaz veya α -galaktozidaz aktivitesi okumayı sağlamaktadır. Bu yöntem, floresans veren substratların kullanıldığı ve floresansın otomatik okuyucu tarafından okunduğu yöntemdir. Biyolojik indikatörlerde sonuç almak için uzun inkübasyon zamanı gerekmektedir. Bu problem, 1 saat gibi kısa sürede floresan vermeyen bir maddeyi floresan verir hale getiren spor enzimlerinden α -glukozidaz ile çözülmüştür. Kısa sürede sonuç elde edilmesinde, sterilizasyonun denetlenmesinde biyolojik indikatörlerin kullanımını yaygınlaştırmıştır (Gillis ve ark., 2010; Dlugokenski ve ark., 2011).

COVID-19 salgını ile kişisel koruyucu ekipmanların kullanımını artmıştır (Genc, 2020). N95 tipi maskelerin kullanımının artması kişisel koruyucu ekipmanı kıtlığına yol açmıştır. Bu maskelerin tek kullanımlık olması amaçlanmıştır ancak sterilizasyon yapılarak tekrar kullanılması eksiklikleri

azaltmada yararlı olacaktır. Hidrojen peroksit sterilizasyon yöntemi kullanılarak, 1.0×10^6 yüklü *G. stearothermophilus* biyoindikatörü ile sterilizasyon doğrulanmaktadır. *G. stearothermophilus* sporları, SARS-CoV-2 gibi zarflı virüslere göre sterilizasyona önemli ölçüde daha dirençlidir. Viral canlılığın doğrudan ölçümü yerine biyoindikatör kullanımı verilerin yorumlanmasında önemli bir örnek teşkil etmektedir (Rutala ve ark., 2001; Cabbari ve ark., 2012).

Bu çalışmada materyal olarak *G. stearothermophilus* ve *Escherichia coli* kullanılmıştır. Sterilizasyon için yaygın olarak kullanılan test organizması, *G. stearothermophilus*'tur. *G. stearothermophilus* sporları buharla, formaldehit ve hidrojen peroksit gibi sterilizasyon metodlarında yüksek direnci ve tutarlı inaktivasyon kinetiği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Sıcaklık, pH, besin ve iyon içeriği gibi sporlanmayı tetikleyen çevresel koşullar, oluşan sporların çeşitli özelliklerini etkilemektedir. Sıcaklık etkili sterilizasyon yöntemlerinde sporulasyon sırasında *G. stearothermophilus* sterilizasyon direnci üzerinde en büyük etkiye sahip olan değişken başlangıç pH'dır. Düşük besin konsantrasyonu ve 8.5 civarında alkali pH uygun kabul edilir. Çalışmada kullanılan *E. coli* ve *G. stearothermophilus* bakterileri ATCC kültür koleksiyonundan elde edilmiştir. *G. stearothermophilus*, yüksek sıcaklığa dayanıklı olması ve hataları erken sonuç olarak vermesi sebebiyle tercih edilmiştir. *E. coli*, *Enterobacteriaceae* familyasından olup gram negatif, çoğunlukla hareketli, fakültatif anaerob, sporsuz, çubuk şeklinde bir bakteri türüdür. Genellikle insan ve hayvan bağırsaklarında olduğu için hastanede üriner sistem işlemlerinde bulaşmaya neden olabilir. *E. coli* glukoz besin maddesinden asit ve gaz yaparak, ekildiği besiyerlerinde kolayca renk değişimi oluşturmaktadır. *E. coli*, vejetatif üremesi sebebiyle düşük sıcaklık sterilizasyonları için tercih edilmiştir (Shintani, 1996; Soylu, 2005; Royalty-Hann, 2007; Guizelini ve ark., 2012; Thill ve Spaltenstein, 2020).

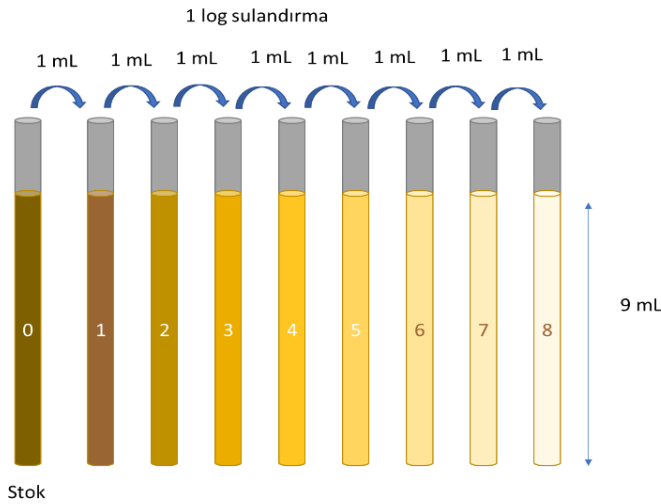
Biyoindikatörlerin kullanımını yaygın ve kalite yönetim sistemlerinde çoğu zaman zorunlu kılınmasına karşılık, sonuçlanma süresinin 24 saat olduğu, bu süre içerisinde olumsuz bir sonucun büyük etkisi olduğu gözlemlenmektedir. Sterilizasyon işleminde kullanılan biyoindikatörler etüvlerde bekletilerek cevap alınması hedeflenmektedir. Bu da mikroorganizmanın üreme süresine göre 18-24 saatlik bir süreyi kapsamaktadır. Bu süreç içerisinde uygun olmayan bir sterilizasyon işlemine ait ürünler dolaşıma çıkarsa, mikrobiyolojik kalite ve halk sağlığı üzerine doğrudan etkili olmaktadır. Yanlış paketleme, gaz konsantrasyon yetersizliği, sterilizasyon zaman ve sıcaklık yetersizliği, yükleme hataları, nem, buhar, basınç parametrelerinde uygunsuzluk gibi etkenler biyolojik indikatörlerin sonucunun pozitif olması halinde değerlendirilmektedir (ISO 14161, 2009; ISO 11140-1, 2014; ISO 13485, 2016; ISO 11138-1, 2017).

Sterilizasyon kontrolünde kullanılan biyolojik indikatörler uzun inkübasyon süreleri nedeniyle dezavantajlı olmaktadır. Geleneksel biyoindikatörler 24 saat içerisinde sonuç verirken, bu çalışmada dizayn edilen sistem ile 4 saat içerisinde sonuç alınmaktadır. Bu çalışmada alınan 4 saatteki sonuçla, sterilizasyonu başarısız olmuş malzemenin hastane içerisindeki kullanımını engellenmiştir. Optik okuma ile okuma hataları ortadan kaldırılarak, kişisel hatalar ortadan kaldırılmıştır.

2. Gereç ve yöntemler

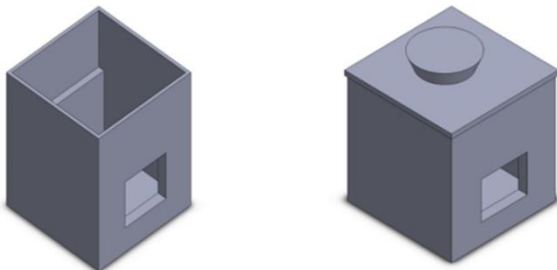
Bu çalışmada, sporlu mikroorganizma olarak *G. stearothermophilus* ve vejetatif formda bulunan mikroorga-

nizma olarak *E. coli* kullanılmıştır. Farklı şeker katkıları ile kullanılan iki bakteri, çiftli kontrol yapabilmek için seçilmiştir. Hazırlanan biyoindikatörler Arduino Uno ve TCS3200 sensör ile test edilmiştir. Çalışmada Brain Heart Infusion Broth içerisinde belirli oranlarda nişasta veya glukoz besin maddeleri, fenol kırmızısı veya brom krezol moru renk indikatörleri eklenmiştir. *G. steorotherophilus* ve *E. coli* üremesinin renk değişimi optik olarak değerlendirilmiştir. Hazırlanan Tryptic Soy Broth 125 mL ölçülerinde dörde ayrılmıştır. Birinci behere 1,2 g nişasta ve 0,16 g fenol kırmızısı, ikincisine 1,2 g glukoz ve 0,16 g fenol kırmızısı, üçüncüsüne 1,2 g nişasta ve 0,16 g brom krezol moru, dördüncüsüne 1,2 g glukoz ve 0,16 g brom krezol moru eklenerek manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Eklenecik bakteri gücü saptanırken seri dilüsyonlar 10 ve güçleri halinde azaltılarak hesap yapılmıştır. 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 ve 10^1 güçlerinde ayarlanan indikatörlerin seyreltme işlemi Şekil 1'de gösterilmiştir. ISO 13485'e göre farklı enerji kaynakları ve renk indikatörleri için düşük, orta, yüksek seviyelerde bulaştırma gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1. Dilüsyon şeması.

Renk değişimi Şekil 2'deki gibi tasarlanan kutunun içinde ölçülmüştür. Üç boyutlu yazıcıdan yazdırılan kutu 70x70x70 cm boyutlarındadır. İçerisine renk tespitini gerçekleştirecek 6,6x6,6 cm boyutlarındaki TCS3200 renk sensörü sabitlenmiştir. Kapak boyu 7,5x7,5 cm ve Eppendorf tüp girişi 1,2 cm olacak şekilde tasarlanmıştır.



Şekil 2. Renk sensörü ve Eppendorf tüpün yerleştirildiği kutu.

Arduino Uno, USB kablosuyla bilgisayara bağlanarak 5V çalışma gerilimiyle renk sensörüne güç sağlamaktadır. Arduino Uno'da 14 adet dijital giriş/çıkış pini bulunur, bunlardan 6'sı PWM çıkışı olarak kullanılabilir. Arduinodaki pinler bilgisayara

bağlanarak kodlanmıştır (Arduino Türkiye, 2021). Renk sensörlerinde yaygın olarak kullanılan RGB (red, green, blue) renk uzayıdır. Görme işlemi ortamdaki ışık sayesinde gerçekleşir. Renk sensörünün ışığı algılamasıyla, görme olayının gerçekleşme prensibi benzerdir. TCS3200 renk sensöründe bulunan 4 adet beyaz LED cisme ışık gönderir, bu ışıklar cisme çarparak geri yansır ve sensör yansıyan ışınları değerlendirerek renk çeşitlerini belirlemektedir. Fotodiyot ve akım frekans dönüştürücü içeren renk sensörü oluşturduğu verileri bilgisayara uygun kodlarla aktarmaktadır. Bir adet çıkış ve dört adet giriş pini bulunmaktadır. Gelen ışığın şiddetiyle doğru orantılı kare dalga üretilir ve bu kare dalgayı kullanarak veri almaktadır. Sensör, fotodiyotların üzerindeki filtreler sayesinde renkleri ayırt etmektedir. Sensörde üzerindeki 8x8 fotodiyotların 16'sı mavi, 16'sı yeşil, 16'sı kırmızı filtredir ve geriye kalan 16 fotodiyotta ise filtre bulunmamaktadır. Renk bilgisini kontrol etmek için fotodiyotların S2 ve S3 pinleri kullanılmıştır. RGB renk uzayında veriler 0 ile 255 aralığında ifade edilmektedir. Örneğin 255-0-0 kırmızı rengi göstermektedir (Robotistan, 2021). Renk sensöründen elde edilecek sonuç için Arduino IDE uygulamasında kodlar yazılmıştır. Çalışmada üretilen biyoindikatörler Eppendorf tüplere aktarıldıktan sonra 37 °C ve 55 °C etüve yerleştirildi. 2 saatte bir etüvden çıkarılarak kutuya yerleştirildi ve okuma sonucu bilgisayar ekranından alındı.

ISO 13485 standardına uygun olacak şekilde düşük, orta ve yüksek seviyede bulaştırma yapılarak cihazın validasyonu gerçekleştirilmiştir. Öncelikle renk indikatörleri cihaza tanıtılarak sarı ve kırmızı renk değişimlerinin tanınması sağlanmıştır. 10 adet mor ve 10 adet kırmızı renk tüp pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 10 adet sarı renk negatif kontrol olarak tanımlandıktan sonra okutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bakteri inokulasyon seviyesine göre 2 saatte bir değişim kontrol edilerek ölçümler kayıt altına alınmıştır. Bir örnek 3 kere okutulmuş ve hepsinde aynı sonuç alınmıştır.

3. Bulgular

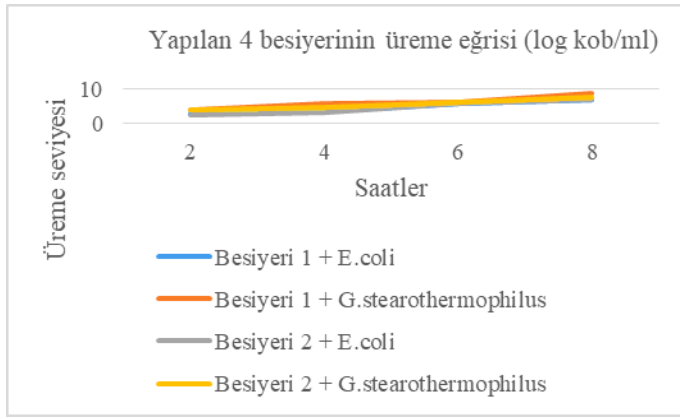
Biyoindikatörlerin sterilizasyon başarısını hızlı şekilde ölçmeye yönelik bir sistem dizayn edilmiştir. *G. steorotherophilus* ve *E. coli* için glukoz veya nişasta eklenen indikatörlerden alınan sonuçlar karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda fenol kırmızısı ve brom krezol moru sonuçları da renk indikatörü veriminde kıyaslanmıştır. Ekimlerden sonra 2, 4, 6, 8. saatlerde ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Üreme grafiği ise Şekil 3'teki gibidir.

Tablo 1

Besiyeri çeşitlerinde bakterilerin saatlik üreme sayıları (log₁₀ kob/mL).

Kontrol Saatleri	Besiyeri 1 + <i>E. coli</i>	Besiyeri 1 + <i>G. steorotherophilus</i>	Besiyeri 2 + <i>E. coli</i>	Besiyeri 2 + <i>G. steorotherophilus</i>
2	2,869232	3,908485	2,491362	3,982271233
4	3,748188	5,78533	3,380211	4,653212514
6	5,819544	6,041393	5,875061	6,322219295
8	6,838849	8,662757832	6,892095	7,838849091

Biyoindikatörde kullanılacak renk indikatör seçimi için yapılan çalışmada kullanılan PR ve BCP arasından hızlı sonuç alan renk indikatörü seçilmiştir. Alınan sonuçlar Tablo 2'de



Şekil 3. Üreme eğrisi.

gösterilmiştir. PR daha hızlı ve etkili olduğu için seçildikten sonra biyoindikatör üretimine başlanmıştır. Bu üretim sonucun da ise tasarlanan deney düzeneğinde biyoindikatörler optik donanıma okutulmuştur. *G. stearothermophilus* için 4. saat itibarıyla glukoz enerji kaynağı pozitif sonuç vermiştir. Buna ait ayrıntılı bilgiler Tablo 3'te gösterilmiştir. 4. saat için *G. stearothermophilus* içeren ve 108, 107 değerinde ekim yapılan indikatörlerde renk değişimi gözlemlenmiştir. *G. stearothermophilus* kullanılan nişasta içerikli biyoindikatör ile 4. saat itibarıyla pozitif sonuç alınmıştır. Tablo 4'te saatlik değişimler gösterilmiştir. *E. coli* ve glukoz içerikli biyoindikatör 4. saatten sonra pozitif sonuç vermiştir ve Tablo 5'te görülmektedir. *E. coli* kullanılan nişasta içerikli biyoindikatör ile 4. saat itibarıyla pozitif sonuç alınmıştır. Buna ait saatlik veriler Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 2

Bakteri cinsi ve enerji kaynağına göre tespit süreleri sonuç özeti.

Bakteri	İndikatör	Enerji Kaynağı	2.saat	4.saat	6.saat	8.saat	24.saat
<i>E. coli</i>	PR	Nişasta	-	+	+	+	+
		Glukoz	-	+	+	+	+
	BCP	Nişasta	-	+	+	+	+
		Glukoz	-	+	+	+	+
<i>G. stearothermophilus</i>	PR	Nişasta	-	+	+	+	+
		Glukoz	-	+	+	+	+
	BCP	Nişasta	-	-	-	-	+
		Glukoz	-	-	-	-	+

PR: Fenol kırmızısı, BCP: Brom krezol moru

Tablo 3

Bakteri cinsi ve enerji kaynağına göre tespit süreleri sonuç özeti.

Saat	Bakteri adı	Enerji kaynağı	Optik donanım okuma sonuçları			
			R	G	B	Değerlendirme
0. saat	<i>G. stearothermophilus</i>	Glukoz	38	31	32	Negatif
2. saat			38	31	33	Negatif
4. saat			30	26	35	Pozitif
6. saat			29	29	38	Pozitif
8. saat			29	31	40	Pozitif
24. saat			29	31	40	Pozitif

R: kırmızı, G: yeşil, B: mavi

Tablo 4

Bakteri cinsi ve enerji kaynağına göre tespit süreleri sonuç özeti.

Saat	Bakteri adı	Enerji kaynağı	Optik donanım okuma sonuçları			
			R	G	B	Değerlendirme
0. saat	<i>G. stearothermophilus</i>	Nişasta	38	30	33	Negatif
2. saat			38	31	33	Negatif
4. saat			32	27	38	Pozitif
6. saat			31	41	41	Pozitif
8. saat			29	31	40	Pozitif
24. saat			30	24	32	Pozitif

R: kırmızı, G: yeşil, B: mavi

Tablo 5

Bakteri cinsi ve enerji kaynağına göre tespit süreleri sonuç özeti.

Saat	Bakteri adı	Enerji kaynağı	Optik donanım okuma sonuçları			
			R	G	B	Değerlendirme
0. saat	<i>E. coli</i>	Glukoz	38	31	32	Negatif
2. saat			38	31	33	Negatif
4. saat			30	26	35	Pozitif
6. saat			29	29	38	Pozitif
8. saat			29	31	40	Pozitif
24. saat			29	31	40	Pozitif

R: kırmızı, G: yeşil, B: mavi

Tablo 6

Bakteri cinsi ve enerji kaynağına göre tespit süreleri sonuç özeti.

Saat	Bakteri adı	Enerji kaynağı	Optik donanım okuma sonuçları			
			R	G	B	Değerlendirme
0. saat	<i>E. coli</i>	Nişasta	40	30	28	Negatif
2. saat			38	31	33	Negatif
4. saat			33	27	39	Pozitif
6. saat			29	29	38	Pozitif
8. saat			29	31	40	Pozitif
24. saat			30	28	36	Pozitif

R: kırmızı, G: yeşil, B: mavi

4. Tartışma

Bu çalışmada *E. coli*, ISO 11138 içerisindeki indikatör mikroorganizmalardan vejetatif grup için; *G. stearothermophilus*, sporlu grup için tercih edilmiştir. *E. coli* 100 °C üzerinde canlılığını kaybeden bir mikroorganizma olduğu için düşük sıcaklıklarda gerçekleşen sterilizasyonun etkisini araştırmada, *G. stearothermophilus* ise 121 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda canlılığını kaybeden sporlu bir mikroorganizma olması sayesinde yüksek sıcaklıklardaki sterilizasyonun etkisini test etmek üzere seçilmiştir. Çalışmanın amacı, geleneksel sistemlerde inkübasyon süresi 24 saat iken tarafımızdan seçilen bakterilerle ve farklı enerji kaynakları ile bu süreyi kısaltmaktır. Renk değişimi gözle ölçülemeyecek seviyede olması halinde optik donanım ile tespit edilerek insan hatası ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır. Otoklav işlemi bir başarısızlık ile sonuçlanması halinde hızlı biçimde tedbir alınarak kullanımda sterilite sağlanmaktadır.

Çalışmada kullanılan *G. stearothermophilus* ve *E. coli* mikroorganizmaları, ekimlerinden sonra 2, 4, 6, 8. saatlerinde alınan ölçümler ile değerlendirilmiştir. Bir başka araştırmada *E. coli*'nin birçok karbon kaynağından enerji elde edebildiği kaydedilmiştir ve bu sebeple çalışmamızda iki farklı şeker kaynağı kullanılmıştır. İki şeker kaynağı katabolik hücrenel hızın aktivitesiyle ilgili olarak farklı zamanlarda sonuç vermiştir (Baev ve ark., 2006). Düşük miktarda enerji kaynağı olarak kullanılan şekerlerin yüksek metabolizma hızı ile üremeyi teşvik ettiği gözlemlenmiştir (Belaich ve Belaich, 1976). Bu veri çalışmamızda eklenen az miktarda glukoz ile hızlı sonuç aldığımız sonuçlarımızla uyumlu olmaktadır. Düşük miktarda enerji kaynağı olarak kullanılan şekerlerin yüksek metabolizma hızı ile üremeyi teşvik ettiği gözlemlenmiştir (Belaich ve Belaich, 1976). Bu veri çalışmamızda eklenen az miktarda glukoz ile hızlı sonuç aldığımız sonuçlarımızla uyumlu olmaktadır.

Okamoto ve ark. (2015), nişastadan bir vinil monomer itakonik asidin fermentatif üretimi üzerine çeşitli çalışmalar yapmıştır. Başka çalışmada *E. coli*'nin şekerleri kullanım metabolizması karşılaştırılarak; glukoz, galaktaz, mannoz, maltoz ribozdan hemen yararlanırken galaktozda büyüme gecikmeli olarak başlamıştır. Bu çalışmalar ile glukozdan hızlı sonuç elde edildiği bir kez daha görülmüştür (Lendenmann ve Eglı 2020).

Minimal ve zengin glukoz ortamında *E. coli* genomunun hücre süreçleri düzenleyicilerinin önü açılmıştır. *E. coli*'nin asetat gibi oluşan metabolit streslerden kendini koruyabildiği bildirilmiştir. Buna bağlı olarak çalışmamızda glukoz ortamında üreme hızının yüksek seviyede olması açıklanabilmiştir (Tao ve ark. 1999).

Smerilli ve ark. (2015), *G. stearothermophilus* ve nişastayı kullanarak biyorafineri için önemli bir kimyasal olan laktik asit

üretimini gerçekleştirmiştir. Mtimet ve ark. (2015), bu alanda ürettikleri sporlar için, 45°C'de sıcaklıktakilerin 57°C sıcaklıktaki üretilenlere göre daha dayanıklı olduğunu kaydetmişlerdir. Yaygın olarak gıda endüstrisinde kullanılan *G. stearothermophilus*, besin kaynağı olarak kullandığımız nişastayı laktik asit üretimiyle göstermiştir.

Laskaris ve Chaney (1969), *B. stearothermophilus* için yaptıkları çalışmalarda son kullanma tarihinden önce ısı direncinde düşüş olduğunu, spor şerit preparatlarında standardizasyon eksikliğini kaydetmiştir. Geleneksel biyoindikatör tasarımı yapılmış ve 24 saatte cevap alınmıştır. Çalışmamızda kullanılan benzer mikroorganizma ile daha kısa sürede cevap alınarak bu sürenin kısaltılmasıyla halk sağlığı için zaman kazanılmıştır.

ISO standartlarına göre biyoindikatör olarak kullanılabilen bakteriler arasında *E. coli* bulunmaktadır. *E. coli* birçok kaynaktan test edilmiştir. Biyogaz tesislerinde patojen azaltma kapasitesi *Enterococcus faecalis* ve *Clostridium perfringens*, sırasıyla 55 °C ve 70 °C sıcaklıklarda gösterge organizmalar olarak kullanılabilirken, 37 °C'de *E. coli* indikatör olarak tercih edilmiştir (Watcharasukarn ve ark. 2009). Hossain ve ark. (2015), otoklavlama ve süper kritik karbon dioksit (SC-CO₂) tekniği ile klinik katı atıklarda bulunan *E. coli* inaktivasyonunu gerçekleştirmiştir. Otoklav sterilizasyonuna tabi tutulan klinik katı atıktaki bakterilerin inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada farklı sterilizasyon yöntemlerinde farklı bakterilerin indikatör olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir. Mikrodalga plazmanın sterilizasyon için kullanılması yeni bir yöntem olup, *E. coli* bu yöntemin sterilizasyon etkilerini araştırmak için kullanılmıştır. Bu çalışmada da geleneksel uygulama dışında *E. coli* kullanımı uygulanarak çalışmamızdaki *E. coli* seçimimizi desteklemiştir.

Spektrofotometre, fizik, gıda mühendisliği, biyoteknoloji alanlarında numunelerin temel ölçüm aracı olarak kullanılmaktadır. Kim ve ark. (2015), LED ve renk sensörünü kullanarak numune konsantrasyonunu ve renk bilgisini veren bir sistem tasarlamıştır. Spektrofotometreyle dalga boyu ve saflık değerlerini elde ederek ekonomik bir sistem kurmuşlardır. Bu veriler çalışmamızda elde edilen LED ve sensör uyumluluğu için destekleyici olmuştur.

Bu çalışmada Türkiye'de otoklav biyoindikatörü üretimini arttırarak ve üretim aşamalarını hızlandırarak toplam kaliteye hizmet etmek hedeflenmiştir. Çalışmamızda yaygın kullanılan biyoindikatörlere ek olarak sterilizasyon başarısının tespit süresi kısaltılmıştır. Bu da şeker kaynaklarının kullanım çeşitliliği sayesinde gerçekleştirilmiştir. Hassasiyet ile ilgili yaptığımız çalışmada, piyasada mevcut ürünlerde 8 log₁₀ kob/mL mikroorganizma mevcutken, yaptığımız şeker desteğine bağlı olarak 4. saat itibarıyla 5 log₁₀ kob/mL seviyesinde renk değişimi gözlemlenmiştir. Böylelikle az mikroorganizma kullanarak hızlı bir şekilde hassasiyet gözlemlenmektedir.

5. Sonuç

Piyasada yaygın olarak kullanılan biyoindikatörlerin sterilizasyon işleminin başarısız olması durumunda 24 saatte sonuç veriyor olması, kontamine tıbbi cihaz parçası veya malzemelerin kullanımı halinde enfeksiyon ve bulaşla sonuçlanabilmektedir. Bu çalışmada, *E. coli* ve *G. stearothermophilus* bakterileri ile farklı şeker katkıları eklenen brotlardan otoklav biyoindikatörleri elde edilmiştir. Hızlı ve hatasız cevap almak için Arduino Uno ve TCS3200 sensör ile ile tasarımı tamamlanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, her iki bakterinin ve her iki şeker katkısının yeterli olduğu belirlenmiştir. Fenol kırmızısı renk indikatörünün ise brom krezol moru renk indikatörüne göre hızlı cevap verdiği görülmüştür. Her iki bakterinin halk sağlığı için kullanıma uygun olduğu kaydedilmiştir. Bu çalışma ile bir otoklav işleminde kullanılan biyolojik indikatörün en kısa 4 saat sonra sterilite uygunluğunun belirlenebileceği tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler ile yerli biyoindikatör üretimine

Kaynaklar

- Albert, H., Davies, D. J. G., Woodson, L. P., & Soper, C. J. (1998). Biological indicators for steam sterilization: characterization of a rapid biological indicator utilizing *Bacillus stearothermophilus* spore-associated alpha-glucosidase enzyme. *Journal of Applied Microbiology*, 85(5), 865-874.
- Arduino Türkiye, (2021). Arduino Uno Resmi Web Sayfası, <http://arduinoturkiye.com/arduino-uno/>, Son erişim 4 Temmuz 2021.
- Baev, M., Baev, D., Radek, A. & Campbell, J. (2006). Growth of *Escherichia coli* MG1655 on LB medium: monitoring utilization of sugars, alcohols, and organic acids with transcriptional microarrays. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 310-316.
- Belaich, A., & Belaich, J. P. (1976). Microcalorimetric study of the anaerobic growth of *Escherichia coli*: measurements of the affinity of whole cells for various energy substrates. *Journal of Bacteriology*, 125(1), 19-24.
- Black, J. (1993). *Microbiology*. (pp. 1-334). Prentice Hall.
- Cabbari, H., Alikhah, H., Alamdari, N., Behzad, M., Mehrabi, E., Borzui, L. & Bakhshian, F. (2012). Developing the use of quality indicators in sterilization practices. *Iranian Journal of Public Health*, 64-69.
- Castillo, R. B. (2017). Establishment of penetration time on medical device product families based on ISO 17665-3 during performance qualification of steam sterilization: a case study. *18th Word Sterilization Congress*, Bonn, Germany, 4-7.
- Caylan, R. (2003). Sterilitenin Kontrolü, <https://www.das.org.tr/kitaplar/kitap2003/05.htm>, Son erişim 4 Temmuz 2021.
- Długokenski, R. E., Sella, S. R., Guizelini, B. P., Vandenberghe, L. P., Woiciechowski, A. L., Soccol, C. R., & Minozzo, J. C. (2011). Use of soybean vinasses as a germinant medium for a *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 sterilization biological indicator. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(2), 713-719.
- Genc, B. N. (2020). Critical management of COVID-19 pandemic in Turkey. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, 1(2), 69-73.
- Gillis, J., Mosley, G., Kowalski, J., Krushefski, G., Nirgenau, P., & McCauley, K. (2010). Understanding biological indicator grow-out times. *Journal of Pharmaceutical Technology*, 34, 1-9.
- Guizelini, B. P., Vandenberghe, L. P., Sella, S. R. B., & Soccol, C. R. (2012). Study of the influence of sporulation conditions on heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* used in the development of biological indicators for steam sterilization. *Archives of Microbiology*, 194(12), 991-999.
- Hansen J., M., Fidopiastis N., Bryans T., Luebke M. & Rymer T. (2020). Radiation sterilization: Dose is dose. *Biomedical Instrumentation Technology*, 54(1), 45-52.
- Hossain, M., Balakrishnan, V., Rahman, N. N. A., Sarker, M., Islam, Z., & Kadir, M. O. A. (2012). Treatment of clinical solid waste using a steam autoclave as a possible alternative technology to incineration. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(3), 855-867.

yönelik bir prototip oluşturulmuş ve bu ürünlerin hazırlanmasında da rehber doküman olarak hizmet etmesi hedeflenmiştir. Optik ve elektronik donanım ile insan hatası olmadan hızlı bir şekilde sonuç alınan bu sistem sayesinde kalite kontrol süreçlerinin daha hızlı ve doğru yapılabileceği kanaati oluşmuştur.

Teşekkür: Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı yüksek lisans programı kapsamında yazılan yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır.

Çıkar çatışması: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Etik beyanı: Bu çalışmada, yazarlar, hiç bir insan ya da hayvan denek kullanılmadığını ve Etik Kurul iznine gerek olmadığını beyan eder.

- International Journal of Environmental Research and Public Health, 9(3), 855-867.
- ISO 11138-1, (2017). Sterilization of health care products - Biological indicators - Part 1: General requirements.
- ISO 11140-1, (2014). Sterilization of health care products - Chemical indicators - Part 1: General requirements.
- ISO 13485, (2016). Medical devices - Quality management systems - Requirements for regulatory purposes.
- ISO 14161, (2009). Sterilization of health care products - Biological indicators - Guidance for the selection, use and interpretation of results.
- Kim, J. S., Kim, A. H., Oh, H. B., Goh, B. J., Lee, E. S., Kim, J. S., ... & Jun, J. H. (2015). Simple LED spectrophotometer for analysis of color information. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 26(s1), 1773-1780.
- Laskaris, T., & Chaney, A. L. (1969). Reliability of biologic autoclave sterilization indicators. *American Journal of Clinical Pathology*, 52(4-ts), 495-500.
- Lendenmann, U., & Egli, T., (1995). Is *Escherichia coli* growing in glucose-limited chemostat culture able to utilize other sugars without lag?, <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/141/1/mic-141-71.pdf?expires=1605721776&id=id&accname=guest&checksum=BF39A4A3CE8AAF93AB4857F5F2336640>, Son erişim 4 Temmuz 2021.
- Mtimet, N., Trunet, C., Mathot, A. G., Venaille, L., Laguerinel, I., Coroller, L., & Couvert, O. (2015). Modeling the behavior of *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 throughout its life cycle as vegetative cells or spores using growth boundaries. *Food Microbiology*, 48, 153-162.
- Okamoto, S., Chin, T., Nagata, K., Takahashi, T., Ohara, H., & Aso, Y. (2015). Production of itaconic acid in *Escherichia coli* expressing recombinant α -amylase using starch as substrate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(5), 548-553.
- Panta, G., Richardson, A. K., Shaw, I. C., Chambers, S., & Coope, P. A. (2019). Effectiveness of steam sterilization of reusable medical devices in primary and secondary care public hospitals in Nepal and factors associated with ineffective sterilization: A nation-wide cross-sectional study. *Plos One*, 14(11), e0225595.
- Pflug, I. J., & Odlag, T. E. (1986). Biological indicators in the pharmaceutical and medical device industry. *Journal of Parenteral Science and Technology*, 40, 242-248.
- Robotistan, (2021). TCS3200 ve Arduino ile Renk Algılama Uygulaması, <https://maker.robotistan.com/tcs3200-ile-renk-algilama-uygulamasi/#Gerekli-Malzemeler>, Son erişim 4 Temmuz 2021.
- Royalty-Hann, W. (2007). Solutions for biological indicator problems from a quality assurance viewpoint. *Biocontrol Science*, 12(2), 77-81.
- Rutala, W. A., & Weber, D. J. (2001). New disinfection and sterilization methods. *Emerging Infectious Diseases*, 7(2), 348-353.
- Rutala, W. A., & Weber, D. J. (2013). Disinfection and sterilization: an

- overview. *American Journal of Infection Control*, 41(5), 2-5.
- Shintani, H. (1996). Factors in the preparation of biological indicators that affect the decimal reduction time. *Biomedical Instrumentation & Technology*, 30(5), 449-453.
- Shintani, H. (2011). Validation of sterilization procedures and usage of biological indicators in the manufacture of healthcare products, *Biocontrol Science*, 1-4.
- Sigwarth, V., & Moirandat, C. (2000). Development and quantification of H₂O₂ decontamination cycles. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 54(4), 286-304.
- Smerilli, M., Neureiter, M., Wurz, S., Haas, C., Frühauf, S., & Fuchs, W. (2015). Direct fermentation of potato starch and potato residues to lactic acid by *Geobacillus stearothermophilus* under non-sterile conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(4), 648-657.
- Soylu, T. (2005). Sterilizasyonun kontrolü. In: Gunaydin, M., Sarnic, A., Gurler, B. (eds). *4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi*, İstanbul, 87-98.
- Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F. R., & Conway, T. (1999). Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6425-6440.
- Thill, S. A., & Spaltenstein, M. (2020). Toward efficient low-temperature ozone gas sterilization of medical devices. *Ozone: Science & Engineering*, 42(5), 386-398.
- Vesley, D., Langholz, A. C., Rohlfing, S. R., & Foltz, W. E. (1992). Fluorimetric detection of a *Bacillus stearothermophilus* spore-bound enzyme, α -d-glucosidase, for rapid indication of flash sterilization failure. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(2), 717-719.
- Wallace, C. A. (2016). New developments in disinfection and sterilization. *American Journal of Infection Control*, 44(5), 23-27.
- Watcharasukarn, M., Kaparaju, P., Steyer, J. P., Krogfelt, K. A., & Angelidaki, I. (2009). Screening *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Clostridium perfringens* as indicator organisms in evaluating pathogen-reducing capacity in biogas plants. *Microbial Ecology*, 58(2), 221-230.

Cite as/Atıf şekli: Kanyilmaz, N., & Koluman, A. (2021). Tıbbi sterilizasyonun kontrolünde kullanılan biyoindikatör sistemi tasarlanması. *Front Life Sci RT*, 2(2), 60-67.



Review article / Derleme

Sentetik tohum

Meltem Erdem^{*1} , Huseyin Uysal¹ ¹Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Agriculture, Agricultural Biotechnology, 09970, Aydın, Türkiye

Öz

Sentetik tohum, besin maddesi ve koruyucu bileşikler içeren özel maddelerle kaplanmış somatik embriyolardır. Sentetik tohum üretimi, canlı tohum üretemeyen bitkiler için elverişlidir. Sentetik tohumdan bitki elde edilmesi, ilk kez doku kültüründen elde edilen somatik embriyodan suyun uzaklaştırılması yoluyla yapılmıştır. Somatik embriyo kaplanmasında sodyum alginat veya alginik asit matrisleri çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitki çoğaltımının kolay olması, uzun süre saklanabilmesi, nesli tükenmekte olan bitkilerin neslinin devam ettirilmesi ve üretimlerinin düşük maliyetle yapılabilmesi gibi birçok avantaj sentetik tohumun bitkilerin gelişimi için önemli ölçüde kullanılabilirliğini göstermektedir. Sentetik tohum teknolojisi tohumla çoğaltım imkanı bulunmayan bitkilerin üretiminde de kullanılabilir olacak çok önemli bir tekniktir. Bu derleme makale, sentetik tohum konusundaki ortaya koyulmuş bilgileri ve yapılmış çalışmaları bir araya getirmek amacıyla yazılmıştır.

Anahtar kelimeler: Bitki rejenerasyonu; *in vitro* kültür; sentetik tohum; somatik embriyo

Synthetic seed

Abstract

Synthetic seeds are somatic embryos coated with special substances containing preservative compounds. Synthetic seed production has been useful for plants that cannot produce viable seeds. Plant formation from synthetic seed was first made by removing water from the somatic embryo obtained from tissue culture. Sodium alginate or alginic acid matrices are commonly used for somatic embryo coating. Many advantages such as easy plant propagation, long-term storage, perpetuation of endangered plants and low cost production show the significant usability of synthetic seed for the development of plants. Synthetic seed technology is a very important technique that can be used in the production of plants that cannot be reproduced by seed. This review article was written to bring together the information and studies on synthetic seed.

Keywords: *In vitro* culture; plant regeneration; somatic embryo; synthetic seed

1. Giriş

Sentetik tohum, besin maddesi ve koruyucu bileşikler içeren özel maddelerle kaplanmış somatik embriyolardır (Kurt, 2015). Özellikle tohumla üretimin sınırlı olduğu bitkiler için son

derece kullanışlı bir teknik olan bu yöntem, üreme organları dışında tohum benzeri yapıların elde edilmesi ile tohumla üretime benzer özellik göstermektedir. Sentetik tohum üretiminde somatik embriyoların kaplanmasında düşük maliyeti, düşük toksisitesi ve jel stabilitesi nedeniyle sodyum

* Sorumlu yazar.

E-mail: mhmeltmerdem@hotmail.com (M. Erdem).

<https://doi.org/10.51753/flsrt.943981> Yazar katkıları

Geliş tarihi 28 Mayıs 2021; Kabul tarihi 7 Ağustos 2021

Çevrimiçi yayın 30 Ağustos 2021

2718-062X © 2021 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

alginat yaygın olarak kullanılmaktadır (Ghosh ve Haque, 2019). Sodyum alginat çözeltisindeki Na^+ ile kalsiyum klorür çözeltisindeki Ca^{2+} arasındaki bir iyon değişim reaksiyonu çözünmeyen bir kalsiyum alginat tabakası oluşturur (Daud ve ark., 2008). Bu sayede somatik embriyo hem önemli ölçüde korunmakta, hem de tohum çimlenme aşamasında somatik embriyoya besin temini sağlanmaktadır. Bu teknik; temel olarak nesli tükenmekte olan türlerin, tıbbi ve ticari bitkilerin korunması ve çoğaltılması için önerilmektedir (Jang ve ark., 2020). Sentetik tohum üretim teknolojisi, mevcut *in vitro* kültür sistemlerine kıyasla eksplantların hayatta kalma oranını önemli ölçüde arttırmakta ve ucuz ve pratik bir doku kültürü üretim tekniği imkanı sunmaktadır (Singh ve ark., 2006; Kumar ve Thomas, 2012). Sentetik tohumu oluşturan biyolojik olarak parçalanabilir matris, eksplantları fiziksel hasarlardan ve dış çevre faktörlerinden etkili bir şekilde korur. Ayrıca erken büyüme için gerekli besinleri de içerdiği için somatik embriyo için bir endosperm görevi görmektedir (Jang ve ark., 2020). Bu derleme makalesinde sentetik tohum oluşumunda embriyo gelişimini sağlayan somatik embriyogenez yöntemi, sentetik tohum ve oluşumu ve bu teknolojiye bazı avantaj ve dezavantajlara değinilmiştir.

2. Bitki doku kültürü ve somatik embriyogenez

Steril şartlar altında ve yapay bir besi ortamında bitki, doku, hücre veya organ gibi bitki kısımlarının kullanılarak yeni bir doku, bitki, organ veya ürünlerin üretilmesi olayına bitki doku kültürü denilmektedir (Sokmen ve Gurel, 2001; Uysal ve ark., 2007). İlk doku kültürü çalışması 1902 yılında gerçekleştirilmiş olup sonraki yıllarda da doku kültüründe çeşitli başarılar sağlanmıştır. Ayrıca 1990 yılında sentetik tohum geliştirilmesiyle birlikte germp plazm korunması çalışmalarına başlanmıştır. Son olarak 1995 yılında ise ilk rekombinant insan gıdası oluşturulmuş ve günümüzde de doku kültüründe çalışmalar başarılı bir şekilde yürütülmektedir (Kurt, 2015). Bitki biyoteknolojisinin önemli bir alanı olup steril koşullar altında ve geliştirilmiş besi ortamlarında kültüre alınarak dokulardan, hücrelerden veya tek bir hücreden *in vitro* koşullarda tam bir bitki oluşturulabilir (Oktem ve Yucel, 2012). Bitki doku kültürüne “Mikro üretim” veya “Aseptik kültür” de denilmektedir (Gonulsen, 1987).

Farklılaşmamış bitki hücreleri, uygun koşullar sağlanmasıyla steril ortamlarda kültüre alındığında yeni bitki/bitkicikler oluşturabilmektedirler (Mohammed ve ark., 2021). Steril koşullar altında bitki oluşumunu sağlayan bu materyallerin sahip oldukları yapısal fonksiyona “totipotensi” denilmektedir. Aslında totipotensinin, bitkisel hücre ve dokuların farklılaşarak yeni bitki meydana getirebilme yeteneği olduğu söylenebilir (Kurt, 2015). Bitki doku kültürü uygulamaları, bitkilerin hızlı bir şekilde klon olarak çoğaltılabilmesi, klasik metotlarla çoğaltımın kolay olmadığı bitkilerde çoğaltımın sağlanabilmesi, hastalık oluşturabilecek çeşitli faktörlerden arındırılmış bitkilerin elde edilmesi, bitki ıslahının etkinliğini arttıracak ve süresini kısaltacak çeşitli çalışmaların gerçekleştirilmesi, somaklonal varyasyonların meydana getirilmesi, haploid yapıda bitkilerin üretimi, bitki gen kaynaklarının muhafaza edilmesi ve sekonder metabolitler gibi biyokimyasal ürünlerin üretilmesi gibi çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (Tekin, 2015). Biyoteknolojik çalışmaların amacı, bitki ıslahının sürecini kısaltarak ıslah sürecine daha geniş bir varyasyon olanağı sağlamak, bu sayede daha kısa sürede daha iyi sonuçlar elde ederek verimin ve kalitenin

arttırılmasıdır (Uysal, 2021). Böylece hem biyotik stres faktörleri etmenlerinden olan bakteri, virüs ve yabancı otlara karşı dayanıklı transgenik bitkiler oluşturulabilirken hem de kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklı transgenik bitkiler gen aktarımıyla geliştirilmiştir (Arvas ve Kocacalıskan, 2020) Bitkinin somatik dokularından kapalı iletim sistemine sahip bipolar bir embriyonun üretilmesini sağlayan aseksüel gelişme süreci, somatik embriyogenez olarak adlandırılır (Ozcan ve ark., 2001; Cardoza, 2008). Somatik embriyogenez, doku kültürü sisteminin en çok kullanılan rejenerasyon yollarından birisidir ve bu teknik somatik hücrelerin embriyogenik gelişimi gerçekleştirebilme yeteneklerine dayanır (Ipekci, 2002). 1950’lerde bitki doku kültüründe kallus yapısından embriyo ve embriyoya benzeyen yapılar oluşsa bile somatik embriyogenez ilk defa 1958 yılında Steward ve arkadaşları tarafından havuçtaki somatik dokulardan gerçekleştirilmiştir. Günümüzde yapay kültür koşulunda ve özellikle bitkisel hormonların kullanımıyla bir bitki dokusu veya organında bulunan somatik hücreden ya direkt olarak ya da kallus yapısının meydana gelmesiyle indirekt olarak embriyo oluşabilmektedir (Babaoglu ve ark., 2001). Somatik doku hücreleri ilk olarak yüksek miktarda oksin (genelde 2,4-D), naftalin asetik asit, pikloram ve dikamba maddelerinin bulunduğu yapay ortamda kültüre alındıktan sonra oksin hormonunun bulunmadığı ikinci bir kültür ortamına aktarıldıklarında embriyo üretebilme yeteneğine sahip olurlar. Oksinlerin somatik bitki hücrelerine embriyo üretimi için yeniden zigotik bir kapasite kazandırdığı belirtilmektedir (Monnier, 1990). Yapılan birçok çalışmada somatik embriyogenez elde etmek için MS (Murashige ve Skoog) kültür ortamının tercih edildiği görülmektedir (Murashige ve Skoog, 1962; Ipekci ve Gozukirmizi, 2003; Hussein ve ark., 2020; Mohammed ve ark., 2021).

Yapılan bazı araştırmalar özetlendiğinde Mikula ve arkadaşları tarafından *Gentiana cruciata* L. ve *G. tibetica* L. ile yapılan bir çalışmada en iyi somatik embriyo oluşumunun gerçekleştiği besi ortamları 1,49 $\mu\text{mol GA}_3$, 4,64 $\mu\text{mol Kinetin}$ (KIN), 434 $\mu\text{mol adenin sülfat hormonları}$ içeren MS besi ortamı olduğunu bildirilmiştir (Mikula ve ark., 2005). Yine *Gentiana cruciata* L., *Gentiana pannonica* L. ve *Gentiana tibetica* L. türlerinde en yüksek miktarda somatik embriyo üretiminin 0,5 mg/l oranlarında gibberellik asit (GA_3) ve naftalen asetik asit (NAA), 1.0 mg/l oranında da Kinetin içeren MS besi ortamı kombinasyonlarında görüldüğü rapor edilmiştir (Mikula ve Rybczyfiski, 2001). *Paulownia elongata* Mill. bitkisinin yaprak ve internod eksplantlarından somatik embriyo ve sentetik tohum elde etmek için yapılan çalışmada somatik embriyo oluşturma frekansının en yüksek 10 mg/l Thidiazuron (TDZ) hormonu içeren MS besi ortamında olduğu belirlenmiştir (Ipekci ve Gozukirmizi, 2003). Yine yonca bitkisinde en yüksek somatik embriyo veriminin 2,4-D oksini içeren MS besi ortamından sağlandığı bildirilmiştir (Sule, 2005). Baltacı ve Arslan tarafından Oğulotu (*Melissa officinalis*) bitkisinde yapılan çalışmada ise somatik embriyo oluşumu amacıyla yine MS besi ortamı tercih edilmiş ve 0,5 mg/l oranında KIN içeren besi ortamında kallusların en iyi oranda somatik embriyo oluşturduğu belirlenmiştir (Baltacı ve Arslan, 2019).

Somatik embriyogenez; eksplant kaynağı, genetik yapı, besi ortamındaki bitkisel hormonlar, azot kaynağı, çevre şartları ve bitkinin fizyolojik durumu gibi durumlardan etkilenmektedir (Tisserat, 1985; Takamura ve ark., 1995; Schwenkel ve Winkelmann, 1998; Ozcan ve ark., 2001; Kocak ve ark., 2014). Somatik embriyo oluşumunun genotipe bağlı olması ve

oluşturulan embriyo yapılarında düşük çimlenme oranı olması bu yöntemin kullanımını kısıtlayan etkenlerdendir (Jalali ve ark., 2012). Ancak bunlara rağmen aynı zamanda somatik embriyogenez; somatik hibridizasyon, partikül tabancası ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile bitkilere gen aktarımı şeklinde önemli kullanım alanlarına sahip olmakla birlikte hızlı çoğaltım, sentetik tohum üretimi ve gen aktarımında oldukça önemli bir potansiyele sahip olmaktadır (Tisserat, 1985; Ozcan ve ark., 2001; Ozyigit ve Yucebilgili Kurtoglu, 2020).

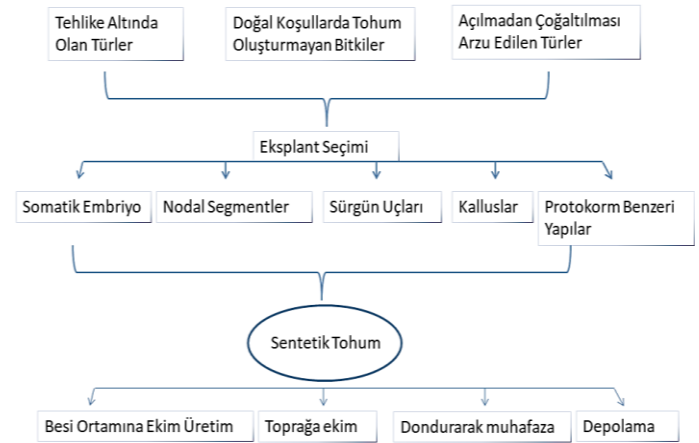
Somatik embriyogenez doğrudan (direkt) ve dolaylı (indirekt) olarak iki şekilde gerçekleşmektedir. Doğrudan somatik embriyogenezde embriyolar eksplant yapılarından (preembriyjenik hücreler) meydana gelip aynı yapıda klon oluşturulur (Nakamura ve ark., 1992; Calheiros ve ark., 1994; Ibrahim ve ark., 2013). Olgunlaşmamış zigotik embriyolar doğrudan somatik embriyogenez gerçekleştirilmede en çok kullanılan eksplantlardır (Finer, 1995). Dolaylı somatik embriyogenezde ise eksplantlar yüksek oranda oksin hormonu içeren besi ortamında kültüre alındığında embriyonik kallus ve bu yapı üzerinde proembriyolar oluşur. Daha sonra kallus yapısı oksin hormonunun bulunmadığı besi ortamına aktarılır ve daha önce oluşan proembriyolardan bipolar embriyoların oluşumunun ardından eğer şartlar elverişliyse bitkicikler meydana getirilir. Dolaylı somatik embriyogenezde genel olarak oksin hormonu olan 2,4-D kullanılmaktadır (Tisserat, 1985).

Çift çenekli (dikotil) yapıda olan bitkiler ve koniferler globular, kalp, torpedo ve kotiledon olmak üzere dört gelişim evresine sahipken tek çenekli (monokotil) bitkiler ise globular, skutellar, koleoptilar embriyo gelişim evrelerini geçirirler (Raven ve ark., 1999). Somatik embriyolar döllenmiş yumurtadan oluşan embriyodaki gibi globular, kalp, torpedo ve kotiledon aşamalarına sahip olmasına rağmen organogenez ile oluşan sürgünlerden farklı olarak gövde-kök eksenine sahip olup, esas doku ile vasküler bağlantıları olmadığından dolayı dokudan kolaylıkla ayrılabilirler (De Jong ve ark., 1993). İlk olarak somatik embriyogenez yöntemiyle bir tür için embriyo oluşturulması ve bitkiye dönüşebilme potansiyeli araştırıldıktan sonra elde edilen embriyo miktarını arttırabilecek bir kültür yöntemi geliştirilir (Redenbaugh, 1990). Burada en çok kullanılan yöntem kontrollü koşullar ışığında biyoreaktörler kullanılarak somatik embriyo üretimidir. Biyoreaktörler; kültür işlemi devam ederken kültür ortamının, pH, O₂ ve diğer gazların ve aynı zamanda sıcaklığın da kontrol edilebildiği düzeneklerden oluşmaktadır. Biyoreaktörler sürekli üretimin gerçekleştirilebildiği, kontaminasyonun en aza indirilebildiği ve aynı zamanda da yüksek oranda homojenizasyonun sağlandığı sistemlerdir (Colgecen ve Toker, 2006). Somatik embriyoların genetik açımlarının olmaması döllenmeyle oluşan zigotik embriyolarla göre en önemli üstünlükleridir. Somatik embriyolar, hem kültüre alınan bitki eksplantının somatik yapıdaki hücrelerinden gelişme gösterirler hem de eksplant alınan bitkinin genetik yapısını taşıdıklarından dolayı da klon oluştururlar (Parrot ve ark., 1991). Buğday (*Triticum aestivum* L.), çeltik (*Oryza sativa* L.), asma (*Vitis vinifera* L.), soya (*Glycine max* (L.) Merrill), yonca (*Medicago sativa* L.) ve bezelye (*Pisum sativum* L.) gibi çeşitli kültür bitkilerinde yüksek miktarlarda somatik embriyo üretiminin gerçekleştirilebildiği birçok farklı yöntem bulunmaktadır (Babaoglu ve ark., 2001). Somatik embriyogenez yoluyla embriyo oluşur ve canlı tohum içerisinde bulunan embriyo ile benzer özellik gösterir. Somatik embriyolar tam bir bitki oluşturabilme potansiyeline sahip oldukları için kaplanmış tohum olarak bitki gelişimlerinde bunlardan yararlanılabilir. Somatik embriyoların koruyucu

bileşikler ve besin maddesi içeren özel maddelerle kaplanmış haline sentetik tohum denilir (Kurt, 2015).

3. Sentetik tohum

Normalde tohum denildiği zaman dişi ve erkek gametlerin birleşmesi neticesinde oluşmuş olan ve embriyo endosperm ve tohum kabuğu kısımlarından oluşan yapı anlaşılır. Normal bir tohumda embriyonun beslenmesi endosperm yapısı tarafından sağlanır. Olgun tohumların genel olarak endospermlili (besi doku) ve endospermsiz (besi doku bulundurmayan) tohumlar olmak üzere iki farklı çeşidi vardır. Birçok doğal bitki ve kültür bitkisinin tohumları gelişip ana bitkiden ayrıldıktan sonra çimlenmesi adına uygun koşullar sağlansa dahi çimlenemeyip uyku haline girerler. Tohum dormansisiyle (uyku hali) uygun olmayan koşulların atlatılabilmesi sağlandığından dolayı bunun bitkiye büyük bir yararı vardır. Tohumların canlılık ve çimlenme yeteneklerini korudukları süre, bitkilere göre farklılık göstermekle birlikte birçok bitki tohumu canlılıklarını 10-25 yıl koruyabilmektedir. Çimlenen tohumların yüzdesi yaşın artmasıyla beraber azalmaya başlar (Colgecen ve Toker, 2006). Tohumda bulunan embriyo yapısından olgun bir bitkinin gelişmesi için ilk adım olarak çimlenme ve çimlenme için de ilk önce tohumun su alması gereklidir. Hidratasyonla fazla suyun tutulmasından dolayı şişme meydana gelir. Çimlenme esnasında solunum hızı artarken bir yandan da tohumda bulunan depo maddeleri hareketlenir. Depo nişastası (polisakkarit) enzimatik yolla ayrışarak basit şekerlere (monosakkaritler) kadar parçalanır ve oluşan bu şekerler de embriyoya taşınıp büyüme ve gelişme için gerekli olan enerjiyi sağlar (Unal, 2013). Sentetik tohumlar ise normal tohumdan farklı olarak sodyum alginat veya alternatif bir bileşenle kaplanmış somatik embriyolarla verilen isimdir (Kiran, 2013) (Şekil 1).



Şekil 1. Sentetik tohum üretim süreçleri ve elde edilen tohumların kullanımı (Saxena ve ark. (2019)'dan değiştirilerek).

Sentetik tohum üretiminde eksplant kaynağını tehlike altında olan türler, tohum oluşturmayan bitkiler ve açılmadan hızlı bir şekilde çoğaltılmak istenen bitkiler gibi bitki kaynakları oluşturmaktadır. Bu kaynaklardan bitkinin yapısına göre somatik embriyolar, nodal bitki segmentleri, sürgün uçları, kalluslar ve protokorm benzeri yapılar tercih edilerek sentetik tohumlar elde edilebilmektedir. Bu yöntemle elde edilen tohumlar kısa sürede üretilebilirken, doğal tohumlar karmaşık üreme sürecinin son ürünüdür ve yetiştiriciler yeni bir çeşidin gelişmesi için uzun süre beklemek zorundadır (Magray ve ark., 2017).

Zigotik embriyo çimlenme esnasında besin kaynağı olarak kullanacağı endosperm-depo kotiledonlarına ve tohum kabuğu yapılarına sahiptir. Ancak somatik embriyonun bunların hiçbirine sahip olmaması, zigotik tohum ile sentetik tohum arasındaki farkı gösterir. Sentetik tohum yapımında somatik embriyolar kullanıldığı için bu embriyoların ekim zamanına kadar hem canlı kalmalarını sağlamak hem de bitki gelişimi sürecinde ihtiyaç duyulan besin maddelerini karşılayabilmek için; somatik embriyoların uygun bir jel ile kaplanması, kaplanan embriyoların kurutulduktan sonra ekimi ve somatik embriyoların sıvı içine ekimi gibi çeşitli yöntemler tercih edilmektedir (Babaoglu ve ark., 2001).

4. Sentetik tohum oluşturulması

Sentetik tohum oluşturulması; bitki seçimi, somatik embriyogenez, somatik embriyoların olgunlaştırılması ve somatik embriyoların uygun jel kapsülüne alınması (yaygın olarak sodyum alginat ve kalsiyum klorür çözeltisi kullanılır) aşamalarından oluşur. İlk defa Murashige tarafından öne sürülen “yapay tohum” terimi “üretilmiş tohum”, “sentetik tohum” ya da “sentezlenmiş tohum” olarak da bilinmektedir (Murashige, 1978).

Klon oluşturmak amacıyla üretilen bitkilerin çoğaltılabilmesi ve klonlanan özelliklerin devamlılığının sağlanabilmesi için sentetik tohum çalışmaları yapılmıştır (Redenbaugh, 1990). 1978 yılında Murashige sentetik tohum geliştirme çalışmaları yapmıştır. Sentetik tohum oluşturulmasının bir aşaması olan kapsülasyon işlemi 1981 yılında Lavrence tarafından geliştirilmiştir. Kapsülasyon işleminin geliştirilmesinin ardından hidrojel ile kaplama işlemi Redenbaugh tarafından 1984 yılında gerçekleştirilmiş olup, 1989 yılında ise Fujii tarafından sentetik tohum ile bitki geliştirilmesi çalışmaları yapılmıştır (Ara ve ark., 2000).

Sentetik tohum üretim maliyeti, araştırma ve geliştirme çalışmalarının basit veya karışık olma durumuna bağlı olarak farklılık gösterir. Örneğin kolay bir şekilde oluşturulabilen bir embriyonun maliyetiyle genetiği düzenli olan bir embriyonun maliyetine bakıldığında aralarında çeşitli farklılıklar bulunmaktadır. Otomasyon sistemlerinin geliştirilmesi, yüksek maliyete rağmen çok miktarlarda üretim yapılması bitki başına maliyeti düşürmektedir. Günümüzde teknolojinin gelişmesiyle birlikte sentetik tohum teknolojisi maliyeti düşmüş ve daha pratik bir teknik haline gelmiştir (Redenbaugh ve ark., 1987; Gray ve Purohit, 1991; Jang ve ark., 2020).

Doku kültüründen elde edilen somatik embriyonun hidrate edilmesiyle ilk olarak sentetik tohumdan bitki oluşturulmuştur. Ancak bu yöntem hem yüksek oranda iş gücü ve maliyet gerektiren, hem de düşük üretim veriminin olduğu bir yöntemdir. Birçok farklı kaplama sistemlerinin denenmesiyle böyle bir sorun aşılmış ve başarılı sonuçlara ulaşılmıştır (Redenbaugh ve ark., 1986; Fujii ve ark., 1989; Fujii ve ark., 1992).

Günümüzde ise sentetik tohumlar, embriyoların hidrojellerle kaplanması ve desikasyon olmak üzere iki farklı yöntemle elde edilebilmektedir. Somatik embriyoların kaplanmasında en yaygın kullanılan madde hidrojel alginattır (Onishi ve ark., 1994). Sentetik tohum çalışmalarında genel olarak daha çok sodyum alginat; uygun vizkosite, hızlı jelleşme, düşük maliyet ve biyolojik olarak uyumluluğu gibi özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir (Saiprasad, 2001; Swamy ve ark., 2009).

Uygun gelişim aşamasındaki embriyolar önce sodyum

alginat ile karıştırılıp daha sonra kalsiyum klorür solüsyonu içine atılırsa 4-6 mm çapında kalsiyum alginat kapsülleri elde edilir (Bornman, 1993). Alginat kapsüllerinin elastik olmaması, sertleşmesi ve oksijen yetersizliği gibi nedenlerle embriyonun çimlenemediği olumsuz durumlar da gözlenmiştir. Bu sorunu gidermek için somatik embriyoların kaplanması amacını gerçek tohumların benzerinin üretilmesi şeklinde açıklanmıştır (Sakamoto ve ark., 1992).

Desikasyon metodunda ise somatik embriyolar ya polietilen glikol (PEG) ve eriyebilir reçine maddeleriyle kaplandıktan sonra, ya da hiçbir madde kaplaması işlemi olmadan direkt olarak kurutulmaktadır. Ancak bu yöntem embriyolar için zararlı olabilmektedir (Bornman, 1993). Sentetik tohum üretim süreci, somatik embriyoların bir kaplama materyaliyle karıştırılmasını kapsar. Embriyolar bu kaplama materyali içinde korunmaktadır (Chawla, 2002). Somatik embriyoların sodyum alginat ve kalsiyum alginat ile kaplanması laboratuvarlar arasında steril materyal transferi ve germplazmaların muhafazası açısından oldukça faydalı olmaktadır (Tsvetkov ve ark., 2006).

Sentetik tohum üretilmesinde ana materyal bitkiden doğal olarak oluşan sürgün tomurcukları ve bitki doku kültürüyle oluşturulan somatik embriyolardır. Ancak kültür ortamında çeşitli kimyasallardan yararlanılarak bu yapılardan bütün bir bitki elde edilebilir (Colgecen ve Toker, 2006). Bundan dolayı somatik embriyolar kaplanmış tohum şeklinde kullanılabilir yeteneklerine sahiptir (Parrot ve ark., 1991).

Sentetik tohum oluşturabilmek için somatik embriyolar dışında; nodal bölgeler, sürgün tomurcukları, *in vitro* çoğaltılmış sürgün yapıları kullanılmakla birlikte protokorm benzeri yapılar ve saçaklı kökler de kullanılabilir (Khor ve Loh, 2005; Colgecen ve Toker, 2006).

Sentetik tohum teknolojisinin esas amacı, somatik embriyoları korumak, saklama ve taşımada kolaylık sağlamaktır (Guerra ve ark., 2001). Ayrıca sentetik tohum teknolojisi, *in vitro* ortamda üretimleri gerçekleştirilen bitkilerin arazi veya sera ortamına aktarımında boyutların küçük olmasından dolayı büyük oranda kolaylık sağlamaktadır (Soneji ve ark., 2002). Sentetik tohumlar normal tohumlar gibi toprak ve besi ortamında çimlendirilip bitki gelişimleri sağlanabilmektedir.

Genelde kurutulmuş ve hidratlanmış (yaş) olarak iki şekilde sentetik tohum üretilmektedir (Rihan ve ark., 2017). Redenbaugh ve arkadaşları, yonca bitkisinde somatik embriyoların bir hidrojel matriksle ile kaplanma işleminin geliştirmiş ve bunun üzerine 1988 yılında patent almışlardır (Redenbaugh ve ark., 1984). Yaş tohum, farklı somatik yapıların sodyum alginat, agar, gelrit ve karragenan gibi çeşitli hidrojel matriksler kullanılarak kapsüle alındığı bir tohum çeşididir. Ancak kapsül oluşturmada en çok kullanılan jel, kalsiyum tuzlarıyla katılaşabilen bir jel matriksi olan sodyum alginattır. Süspansiyon kültüründen elenerek alınan somatik embriyolar sodyum alginat ile karıştırıldıktan ve kalsiyum klorür çözeltisine damlatılır ve daha sonra kalsiyum klorür (CaCl₂) çözeltisi ile birlikte yüzeyde bir kompleks oluşturur. Böylece içerisinde birkaç propagül bulunduran yuvarlak boncuk şeklini alır. Boncuklar çözelti içerisinde 60 veya 90 dakika tutulup, ardından su ile yıkandıktan sonra hava ile kurutulur ve 4°C sıcaklıktaki ortamda tutulur. Alginat matriksiyle bir araya getirilip karıştırılacak olan tomurcuklar mümkün olabilecek en küçük boyuta getirilir. İkinci metotda ise, propaguller, sıcaklıkla sıvılaştıran agar veya gelrit gibi jel matrikslerle karıştırıldıktan sonra kapsüller içine dökülerek soğutulup katılaşması sağlanır (Colgecen ve Toker, 2006).

Kurutulmuş tohumlar ise, ilk defa Kitto ve Janick tarafından havuç embriyolarının kaplanmasıyla kullanılan bir yöntemdir (Kitto ve Janick, 1982; Ara ve ark., 2000). Somatik yapıların polietilen glikolle kaplanmasıyla oluşturulan bir tohum çeşididir. Kaplanmış bitki yapıları steril şartlar altında ve teflon bir yüzeyde saatlerce kurumaya bırakıldıktan bir süre sonra kuruyarak ince bir şekil alan karışım son olarak yapay kültür ortamına alınarak re-hidrate edilir ve embriyoların canlı tutulması sağlanır (Colgecen ve Toker, 2006).

5. Sentetik tohumun avantaj ve dezavantajları

Sentetik tohum genetik benzerlik, hastaliksız bitki elde edilme olanakları, çalışılmasının kolay olması, üretim maliyetinin düşük olması, seçkin ve nesli tükenmekte olan veya soyları tükenmiş bitki türlerinin germplazmalarının muhafaza edilebilmesi, transgenik bitkilerde orijinal genotipe sahip ana bitkinin somatik embriyo şeklinde korunabilmesi, bitki çoğaltımının kolay yapılabilmesi, direkt olarak araziye aktarım yapılması, boyutlarının küçük olmasından dolayı depolama, işleme, nakletme ve dikme işlemlerinde kolaylık sağlaması, tohumla üretimin mümkün olmadığı bitkilerde de alternatif olarak tohumla üretime olanak sağlaması, bütün üretim aşamalarının otomasyona bağlanabilmesi gibi pek çok avantaja sahiptir (Ara ve ark., 2000; Fang ve ark. 2004; Colgecen ve Toker, 2006; Ravi ve Anand, 2012; Kiran, 2013). Yine sentetik tohumların yılın herhangi bir zamanında ve her mevsiminde üretilebiliyor olması da bir diğer avantajıdır (Magray ve ark., 2017). Ayrıca kararsız genotiplere sahip veya enfeksiyona karşı duyarlı olmayıp tohum kısırlığı gösteren hibritlerin üretiminde sentetik tohum teknolojisinin kullanılabilir olması da sentetik tohumun bir diğer avantajını göstermektedir (Sahoo ve ark., 2012). Sentetik tohum teknolojisinin tüm bu avantajlarının yanı sıra mikroçoğaltım için canlı yapıların az olması, somatik embriyoların aynı zamanlarda gelişmemesi, somatik embriyo yapılarında strese tolerans ve dormansi (uyku hali) durumunun eksik olması, uygun olmayan olgunlaşmalar sonucunda kolaylıkla çimlenme ve olgun bitkiye dönüşme kapasitesinin düşük olması gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır (Ara ve ark., 2000; Singh ve ark., 2020).

Kaynaklar

- Ara, H., Jaiswal, U., & Jaiswal, V. S. (2000). Synthetic seed: Prospects and limitations. *Current Science*, 78(12), 1438-1444.
- Arvas, Y. E., & Kocacaliskan, I. (2020). Genetiği değiştirilmiş bitkilerin biyogüvenlik riskleri. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 9(2), 201-210.
- Babaoglu, M., Gurel, E., & Ozcan, S. (2001). *Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları*. (pp. 1-374). Konya Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Baltacı, A., & Arslan, M. (2019). Oğulotu (*Melissa officinalis*) bitkisinde meristem ve somatik embriyo kültürlerinden sentetik tohum elde etme olanakları. *Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 2(1), 1-10.
- Bornman, C. H. (1993). Micropropagation and somatic embryogenesis. In: Hayward M. D., Bosemark N. O., Romagosa I., Cerezo M. (eds) *Plant Breeding: Principles and Prospects* (pp. 246-260). Springer, London.
- Calheiros, M. B. P., Vieira, L. G. E., & Fuentes, S. R. L. (1994). Effects of exogenous polyamines on direct somatic embryogenesis in coffee. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 6(2), 109-114.
- Cardoza V. (2008). Tissue culture: The manipulation of plant development. In: Stewart C.N. (eds) *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques and Applications* (pp. 113-134). John Wiley & Sons, USA.
- Chawla, H. S. (2002). *Introduction to Plant Biotechnology*. (pp. 1-538). Science Publishers.
- Colgecen, H., & Toker, M. C. (2006). Sentetik tohum. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(2), 323-336.
- Daud, N., Taha, R. M., & Hasbullah, N. A. (2008). Artificial seed produc-

6. Sonuç

Somatik embriyoların kaplanmasında en uygun jel matriksi olarak sodyum alginat veya alginik asit tercih edilmektedir. Somatik embriyoların bir jel matriksiyle kaplanmasından oluşan sentetik tohumlar bazı sınırlamalarla karşılaşırsa da birçok avantajlarının bulunmasıyla ticari olarak üretime katkıda bulunabilir. Hızla gelişen teknoloji ile birlikte yakın bir gelecekte sentetik tohumların CRISPR ve diğer gen transferi teknolojileri gibi biyoteknolojik yöntemlerle birleştirilerek henüz tohum aşamasında iken arzu edilen yönde tohumun dizayn edilmesi daha da mümkün hale gelecek bu sayede çok daha kısa sürelerde genetik yapı olarak iyileştirilmiş tohumların eldesi imkân dâhilinde olabilecektir. Tohumla üretilmeyen bitkilerin geliştirilmesinde sentetik tohum teknolojisinden yararlanılarak bu bitkilerin üretimine katkıda bulunabilmekte ancak çalışmaların incelenmesinden yola çıkılarak bazı sıkıntılarla karşılaşılabileceği görülmektedir. Bunun yanında nesli tükenme tehlikesi altında olan bitkilerden elde edilen somatik embriyoların kaplanması yoluyla neslinin devamı sağlanabilmekte ve böylece orijinal genotip yapısı korunup gelecek nesillere aktarılabilir. Sentetik tohum aslında her ne kadar bazı sınırlamaları olan bir teknoloji olsa da mevcut avantajlarından dolayı önemli bir yere sahiptir. Sentetik tohum oluşturma mekanizmalarının daha iyi belirlenmesi, daha düşük maliyetle ve daha kolay bir şekilde uygulanabilmesi bu tür çalışmaların daha seri bir şekilde yapılabilmesine olanak sağlayabilecektir.

Teşekkür: Bu derleme makalesi yüksek lisans tezinin literatür taramasından oluşmaktadır ve tez çalışması Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: ZRF20037).

Çıkar çatışması: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Etik beyanı: Bu çalışmada, yazarlar, hiç bir insan ya da hayvan denek kullanılmadığını ve Etik Kurul iznine gerek olmadığını beyan eder.

- tion from encapsulated micro shoots of *Saintpaulia ionantha* Wendl. (African violet). *Journal of Applied Sciences*, 8(24), 4662-4667.
- De Jong, A. J., Schmidt, E. D. L., & de Vries, S. C. (1993). Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 22, 367-377.
- Fang J., Wetten A., & Hadley P. (2004). Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. *Plant Science*, 166(3), 669-675.
- Finer, J. J. (1995). Direct somatic embryogenesis. In: Gamborg O. L., Philips G. C. (eds) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (pp. 91-102). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Fujii, J. A., Slade, D., & Redenbaugh, K. (1989). Maturation and greenhouse planting of alfalfa artificial seeds. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 25, 1179-1182.
- Fujii, J. A. A., Slade, D., Aguirre-Rascon, J., & Redenbaugh, K. (1992). Field planting of alfalfa artificial seeds. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 28, 73-80.
- Ghosh, B., & Haque, S. M. (2019). Synthetic seeds: An alternative approach for clonal propagation to avoiding the heterozygosity problem of natural botanical seeds. In: Faisal M., Alatar A. A. (eds) *Synthetic Seeds* (pp. 77-112). Springer, Switzerland.
- Gonulsen, N. (1987). *Bitki doku kültürleri, yöntemleri ve uygulama alanları*. (pp. 1-78). T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Menemen-İzmir.
- Gray, D. J., & Purohit, A. (1991). Somatic embriogenesis and development

- of synthetic seed technology. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10, 33-61.
- Guerra, M. P., Vesco, L. L. D., Ducroquet, J. P. H. J., Nodari, R. O., & Reis, M. S. D. (2001). Somatic embryogenesis in *Goiaberia serrana*: Genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(2), 117-128.
- Hussein, N. B. M., Huyop, F., & Kaya, Y. (2020). An easy and reliable method for establishment and maintenance of tissue cultures of *Nicotiana tabacum* cv. TAPM 26. *International Journal of Science Letters*, 2(2), 62-71.
- Ibrahim, M. S. D., Hartatti, R. S., Rubiyono, Purwito, A., & Sudarsono. (2013). Direct and indirect somatic embryogenesis on Arabica coffee (*Coffea arabica*). *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 14(2), 79-86.
- Ipekci, K. Z. (2002). *Paulownia elongata*'nın doku kültürü sistemlerinin optimizasyonu ve sentetik tohum üretimi, Doktora Tezi, (pp. 1-98) İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Ipekci, Z., & Gozukirmizi, N. (2003). Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell Reports*, 22, 16-24.
- Jalali, N., Naderi, R., Shahi-Gharahlar, A., & Teixeira da Silva, J. A. (2012). Tissue culture of *Cyclamen* spp. *Scientia Horticulturae*, 137, 11-19.
- Jang, B. K., Cho, J. S., & Lee, C. H. (2020). Synthetic seed technology development and production studies for storage, transport, and industrialization of bracken spores. *Plants*, 9(9), 1079.
- Khor, E., & Loh, C. S. (2005). Artificial seeds. In: Nedovic V., Willaert R. (eds) *Applications of Cell Immobilization Biotechnology* (pp. 527-537). Springer Netherlands.
- Kiran, R. (2013). *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae)'de somatik embriyogenezis ve sentetik tohum üretimi, Yüksek Lisans Tezi, (pp. 1-85). Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Kitto, S. K., & Janic, J. (1982). Polyox as an artificial seed coat for a sexual embryos. *Horticultural Science*, 17, 488.
- Kocak, M., Izgu, T., Sevindik, B., Tutuncu, M., Curuk, P., Simsek, O., Kacar, Y. A., Teixeira da Silva, J. A., & Yalcin Mendi, Y. (2014). Somatic embryogenesis of Turkish *Cyclamen persicum* Mill.. *Scientia Horticulturae*, 172, 26-33.
- Kumar, G. K. & Thomas, T. D. (2012). High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Clitoria ternatea* Linn.. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110, 141-151.
- Kurt, O. (2015). *Bitki islahı*. (pp. 1-326). Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- Magray, M. M., Wani, K. P., Chatto, M. A. & Ummiyah, H. M. (2017). Synthetic seed technology. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11), 662-674.
- Mikula, A., & Rybczyfiski, J. J. (2001). Somatic embryogenesis of *Gentiana genes* L. The effect of preculture treatment and primary explant origin on somatic embryogenesis of *Gentiana cruciata* L., *G. pannonica* (scop) and *G. tibetica* (King). *Acta Physiologiae Plantarum*, 23(1), 15-25.
- Mikula, A., Rybczynfiski, J. J., Skierski, J., Latkowska, M. J., & Fiuk, A. (2005). Somatic embryogenesis of *Gentiana* genus IV.: Characterisation of *Gentiana cruciata* and *Gentiana tibetica* embryogenic cell suspensions. In: Hvoslef-Eide A. K, Preil W. (eds) *Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation* (pp. 345-358). Springer Netherlands.
- Mohammed, K. T., Javed, M. A., Huyop, F., & Kaya, Y. (2021). Plant tissue culture of *Nicotiana tabacum* cv. TAPM 26 and its minimum inhibition against herbicide-Dalapon. *MANAS Journal of Engineering*, 9(1), 35-42.
- Monnier, M. (1990). Induction of embriyogenezis in callus culture. In: Pollard J. W., Walker J. M. (eds) *Plant Cell and Tissue Culture* (pp. 141-148). Humana Press, New Jersey.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murashige, T. (1978). The impact of plant tissue culture on agriculture. In: Thorpe, T. A. (ed) *Frontiers of Plant Tissue Culture* (pp. 15-26). University of Calgary, Alberta, Canada.
- Nakamura, T., Taniguchi, T., & Maeda, E. (1992). Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. *Japanese Journal of Crop Science*, 61(3), 476-486.
- Onishi, N., Sakamoto, Y., & Hirrosawa, T. (1994). Synthrtic seeds as and application of mass production of somatic embriyos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39, 137-145.
- Oktem, H. A., & Yucel, M. (2012). Bitki gelişiminin yönlendirilmesi. In: Steward N. C., J. R. (ed) *Doku Kültürü* (pp. 113-134). Nobel Basımevi, Ankara.
- Ozcan, S., Babaoglu, M., & Sancak, C. (2001). Somatik embriyogenezis. In: Babaoglu M., Gürel E., Özcan S. (eds) *Bitki Biyoteknolojisi* (pp.71-88). Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Ozyigit, I. I., & Yucebilgili Kurtoglu, K. Y. (2020). Particle bombardment technology and its applications in plants. *Molecular Biology Reports*, 1-17.
- Parrot, W. A., Merkle, S. A., & Williams, E. G. (1991). Somatic embryogenesis: Potential for usein propagation and gene transfer systems. In: Murray D. R. (ed) *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology* (pp. 158-200). 1st ed, CAB International Press UK.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (1999). *Biology of plants*. (pp. 555-569). WH Freeman and Company/Worth Publishers.
- Ravi, D., & Anand, P. (2012). Production and applications of artificial seeds: A review. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(5), 74-78.
- Redenbaugh, K., Nichol, J. W., Kossler, M. E., & Paasch, B. D. (1984). Encapsulation of somatic embryos and for artificial seed production. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 20, 256-257.
- Redenbaugh, K., Paasch, B. D., Nichol J. W., Kossler, M. E., Viss, P. R., & Walker, K. A. (1986). Somatic seeds: Encapsulation of asexual plant embryos. *Bio / Technology*, 4(9), 797-801.
- Redenbaugh, K., Slade, D., Viss, P. R., & Fujii, J. A. A. (1987). Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *Horticultural Science*, 22(5), 803-809.
- Redenbaugh, K. (1990). Application of artificial seed to tropical crops. *Horticultural Science*, 25(3), 251-255.
- Rihan, H. Z., Kareem, F., El-Mahrouk, M. E., & Fuller, M. P. (2017). Artificial seeds (principle, aspects and applications). *Agronomy*, 7(4), 71.
- Sahoo, S. L., Rout, J. R., & Kanungo, S. (2012). Synthetic seeds. In: Sharma H. P., Dogra J. V. V., Misra A. N. (eds) *Plant Tissue Culture: Totipotency to Transgenic* (pp. 101-114). Agrobios, India.
- Saiprasad, G. V. S. (2001). Artificial seeds and their applications. *Resonance*, 6, 39-47.
- Sakamoto, Y., Mashiko, T., Suzuki, A., Kawata, H., & Iwasaki, A. (1992). Development of encapsulating technology for synthetic seeds. *ISHS Acta Horticulturae 319: International Symposium on Transplant Production Systems*, Yokohama, Japan. 71-76.
- Saxena A., Shukla M., & Saxena P. (2019). Synthetic seeds: relevance to endangered germplasm conservation *in vitro*. In: Faisal M., Alatar A. (eds) *Synthetic Seeds* (pp. 21-60). Springer, Cham.
- Schwenkel, H. G., & Winkelmann, T. (1998). Plant regeneration via somatic embryogenesis from ovules of *Cyclamen persicum* Mill.. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 4, 28-34.
- Singh, A. K., Varshney, R., Sharma, M., Agarwal, S. S., & Bansal, K. C. (2006). Regeneration of plants from alginate-encapsulated shoot tips of *Withania somnifera* (L.) Dunal, a medicinally important plant species. *Journal of Plant Physiology*, 163, 220-223.
- Singh, D., Pal, S., & Sinha, A. (2020). Artificial seed/synthetic seed production—brief procedure—advantages and limitations. *Biotica Research Today*, 2(6), 422-424.
- Sokmen, A., & Gurel, E. (2001). Sekonder metabolit üretimi. In: Babaoglu M., Gurel E., Ozcan S. (eds) *Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları* (pp. 211-261). Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Soneji, J. R., Rao, P. S., & Mhatre, M. (2002). Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Plant Cell Reports*, 20, 891-894.
- Sule, R. (2005). Farklı oksin çeşitlerinin Yonca (*Medicago sativa* L.)'da somatik embriyo oluşumuna etkisi üzerine bir araştırma, Yüksek Lisans Tezi, (pp. 1-70). Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya, Türkiye.
- Swamy, M. K., Balasubramanya, S., & Anuradha, M. (2009). Germplasm conservation of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) by encapsulation of *in vitro* derived nodal segments. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 1(8), 224-230.
- Takamura, T., Miyajima, I., & Matsuo, E. (1995). Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. "Anneke" from aseptic seedlings. *Plant Cell Reports*, 15, 22-25.
- Tekin, H. I. (2015). Bitki doku kültürü. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Erdemli-

- Mersin, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/alata/Belgeler/Diger-belgeler/DokuK%C3%BCIt%C3%BCr%C3%BCH.%C4%B0.Tekin.pdf>, Son erişim 18 Temmuz 2021.
- Tisserat, B. (1985). Embryogenesis, organogenesis, and plant regeneration. In: Dixon R. A. (ed) *Plant Cell Culture: A Practical Approach* (pp. 79-106). Information Retrieval Limited Press. Oxford, England.
- Tsvetkov, I., Jouve, L., & Hausman, J. F. (2006). Effect of alginate matrix composition on regrowth of *in vitro*-derived encapsulated apical microcuttings of hybrid apsen. *Biologia Plantarum*, 50 (4), 722-724.
- Unal, M. (2013). *Bitki Angiosperm Embriyolojisi*. (pp. 1-280). Nobel Akademik Yayıncılık.
- Uysal, H., Seyis, F., & Kurt, O. (2007). Tarla bitkilerinde melezleme bariyerlerinin aşılmasında alternatif bir yöntem: embriyo kültürü. *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22(1), 116-122.
- Uysal, H. (2021). *In vitro* propagation of black cumin (*Nigella sativa* L.) plants. *Genetika*, 53(1), 295-303.

Cite as/Atıf şekli: Erdem, M., & Uysal, H. (2021). Sentetik tohum. *Front Life Sci RT*, 2(2), 68-74.