

Volume / Cilt / 14 Issue / Sayı / 3 December / Aralık / 2021

# BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION

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



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

<http://www.biodicon.com>

Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma  
*Biological Diversity and Conservation*

Biyolojik çeşitlilik ve koruma üzerine yayın yapan hakemli uluslararası bir dergidir  
*It is a peer-reviewed international journal that publishes on biological diversity and conservation*  
Cilt / Volume 14, Sayı / Issue 3, Aralık / December 2021

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

**Description**

"Biological Diversity and Conservation" journal is an international, scientific, online and print journal published in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles. This journal is a peer-reviewed international journal that publishes on biodiversity and conservation. "Biological Diversity and Conservation" publishes experimental studies on all aspects of biological diversity, original manuscript, reviews on current topics, case reports, editorial comments and letters to the editor that are prepared in accordance with the ethical guidelines. This journal accepts research on biological diversity, biotechnology, botanic, conservation, ecology, endangered habitats, endangered species, environmental science, ethnobotanical, farming, food, forestry, genetics, medicinal plants, medicine, microorganisms, other organisms, pharmacology, zoology. Descriptive or experimental studies presenting clear research questions are accepted. Manuscripts in English or in Turkish languages are welcome. Printed in Turkey. 'Biological Diversity and Conservation' has been added to the journal list of the Medical Reads (RRS) program together with the "Biology and Medical Journals". This journal is published three times a year.

**Açıklama**

"Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma" dergisi, bağımsız, tarafsız ve çift-kör akran değerlendirme ilkelerine uygun olarak yayın yapan uluslararası, bilimsel, çevrimiçi ve basılı bir dergidir. Bu dergi biyolojik çeşitlilik ve koruma üzerine yayın yapan hakemli uluslararası bir dergidir. "Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma" dergisinde biyolojik çeşitliliğin tüm yönleriyle ilgili deneysel çalışmalar, orijinal makaleler, mevcut konular hakkında inceleme, vaka raporları, editör yorumları ve etik kurallara uygun olarak hazırlanan editöre mektuplar yayınlamaktadır. Bu dergi biyolojik çeşitlilik, biyoteknoloji, botanik, çevre bilimleri, organizmalar, ekoloji, etnobotanik, farmakoloji, genetik, gıda, koruma, mikroorganizmalar, ormancılık, tarım, tehlike altındaki habitatlar, tehlike altındaki türler, tıbbi bitkiler, tıp, zooloji üzerine yapılmış araştırmaları kabul eder. Açıklayıcı araştırma soruları sunan betimsel veya deneysel çalışmalar kabul edilir. Yayınlanma yeri Türkiye'dir. 'Biological Diversity and Conservation' "Biyoloji ve Tıp Dergileri" ile birlikte Medical Reads (RRS) programı dergi listesine eklenmiştir. Bu dergi yılda üç sayı yayınlanır.

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

Web of Science {Zoological Records Indexed} Clavariate Analytic, CiteFactor, Turkey Citation Index, JournalSeek Database, arastirmax, Medical Reads (RRS), CrossRef;10.46309/biodicon.

**Kütüphaneler / Libraries**

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

*"Biological Diversity and Conservation" has been added to the journal list of the Medical Reads (RRS) program together with the "Biology and Medical Journals"*

Web of Science-Clarivate Analytics, Zoological Record

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

Bu dergi CrossRef;10.46309/biodicon. üyesidir. (This journal is a CrossRef;10.46309/biodicon. member)

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

**Yazışma Adresi / Correspondance Adres:** Prof. Ersin YÜCEL, P.K. 86, İki Eylül PTT Merkez, 26000 Eskişehir / Turkey

**E-posta / E-mail** : [biodicon@gmail.com](mailto:biodicon@gmail.com) ;

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

<https://dergipark.org.tr/en/pub/biodicon>

**Baş editör yardımcısı/ Deputy Editor in Chief****İlkin YÜCEL ŞENGÜN**

Ege University, Faculty of Engineering,  
Department of Food Engineering, Izmir, Turkey  
E-mail: ilkinyucel@yahoo.com

**Associate Editors**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Statistical Editor**

**Alper YARGIÇ**; Bilecik Şeyh Edebali  
University, Computer Engineering, Bilecik,  
Turkey  
E-mail: ayargic@gmail.com

**Alan editörleri/ Field Editors**

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

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

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

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

**Ayşe AK**; Erzincan Binali Yıldırım University,  
Engineering Faculty, Biomedical Engineering  
Department, Erzincan, Turkey  
E-mail: a\_ak@hotmail.com

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

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

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

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

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

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

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

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

**Fahrettin AKYÜZ**; Eskişehir Osmangazi  
University, Faculty of Medicine, Medical  
Biochemistry, Eskişehir, Turkey  
E-mail: fakyuz@ogu.edu.tr

**Marjan KOMNENOV**; University of Novi Sad,  
Department of Biology and Ecology, Serbia  
E-mail: mkomenov@gmail.com

**Murat KÜRŞAT**; Bitlis Eren University,  
Faculty of Arts and Sciences Biology, Bitlis,  
Turkey  
E-mail: mkursat@beu.edu.tr

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

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

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

**Atıla OCAK**; Eskişehir Osmangazi University,  
Faculty of Arts and Sciences, Eskişehir, Turkey  
E-mail: atilaocek@gmail.com

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Language Editors**

**Elif ÖZTETİK**; Eskişehir Technical University,  
Faculty of Sciences, Department of Biology,  
Tepebaşı / Eskişehir-Turkey  
E-mail: eoztetik@eskisehir.edu.tr

**Okan SEZER**; Eskişehir Osmangazi Univ,  
Depart. of Biology, Eskişehir/Turkey  
E-mail: okanszr@gmail.com

**Hakemler/ Reviewer**

Abdullah Altunışık, Rize (Turkey)  
 Abdullah Kaya, Ankara (Turkey)  
 Abdullah Soykan, Balıkesir (Turkey)  
 Ahmed Bakrim, Kbouribga (Morocco)  
 Ahmet Aksoy, Antalya (Turkey)  
 Ahmet Mert, Isparta (Turkey)  
 Akın Kırarç, Çanakkale (Turkey)  
 Alaaddin Yuksel, Bingöl (Turkey)  
 Ali Dönmez, Ankara (Turkey)  
 Ali Kandemir, Erzincan (Turkey)  
 Ali Savaş Bülbül, Kahramanmaraş (Turkey)  
 Ali Tarhan, Muğla (Turkey)  
 Alper Dede, Eskişehir (Turkey)  
 Alptekin Karagöz, Aksaray (Turkey)  
 Amed Aarab Azmani, Tangier (Morocco)  
 Anath Bandhu Das Ankara (Turkey)  
 Arif Cemal Özsemir (Bafra) (Turkey)  
 Arif Parmaksız, Şanlıurfa (Turkey)  
 Arkady S. Lelej, Vladivostok (Rusya)  
 Arzu Morkoyunlu Yüce Kocaeli (Turkey)  
 Asiye Uzun, Isparta (Turkey)  
 Atila Ocak, Eskişehir (Turkey)  
 Ayçin Akünal, Konya (Turkey)  
 Ayçin Yılmaz, Konya (Turkey)  
 Ayhan Şenkardeşler, İzmir (Turkey)  
 Ayla Kaya, Eskişehir (Turkey)  
 Aylin Eri Balıkesir (Turkey)  
 Aynur Demir, Aksaray (Turkey)  
 Aysel Bekleyen, Diyarbakır (Turkey)  
 Ayşe Kaplan, Sivas (Turkey)  
 Ayşen Türk, Eskişehir (Turkey)  
 Aziz Gül, Hatay (Turkey)  
 Aziz Türkoğlu, Muğla (Turkey)  
 Azize Demirpolat, Bingöl (Turkey)  
 Bahadır Akman, Iğdır, (Turkey)  
 Bahar Gurdal, İstanbul (Turkey)  
 Baran Yoğurtcuoğlu, Ankara (Turkey)  
 Barış Bani, Kastamonu (Turkey)  
 Barış Özüdoğru, Ankara (Turkey)  
 Betül Gıdık, Bayburt (Turkey)  
 Betül Y. Öztürk, Eskişehir (Turkey)  
 Bilal Şahin, Çankırı (Turkey)  
 Bintuğ Öztürk, İzmir (Turkey)  
 Birgül Yelken, Eskişehir (Turkey)  
 Burak Arıca, Kastamonu (Turkey)  
 Burcu Yılmaz Çıtak, Konya (Turkey)  
 Bülent Turgut, Artvin (Turkey)  
 Cahit Doğan, Ankara (Turkey)  
 Canan Karaalp, İzmir, (Turkey)  
 Canan Veyselova Sezer, Eskişehir (Turkey)  
 Caner Aydın, Eskişehir (Turkey)  
 Carmen Galán Soldevilla, Cordoba (Spain)  
 Celalettin Gözüaçık, Iğdır (Turkey)  
 Cem Dalyan, İstanbul (Turkey)  
 Cemil Ata, İstanbul (Turkey)  
 Cemil İşlek, Niğde (Turkey)  
 Cengiz Acar, Trabzon (Turkey)  
 Cenk Burak Şahin, Hatay (Turkey)  
 Cenk Paşa Balıkesir, (Turkey)  
 Christian Kehlmaier, Dresden (Almanya)  
 Cihangir Kirazlı, Bolu (Turkey)  
 Cüneyt Kaya Rize,, (Turkey)  
 Çiler Meriç, Trakya (Turkey)  
 Dalila Boustta, Taounate (Morocco)  
 Dani Sarsekova, S. Seifullin (Kazakistan)  
 Deniz Ergüden, Iskenderun (Turkey)  
 Deniz İnnal, Burdur (Turkey)  
 Derviş Öztürk Eskişehir (Turkey)  
 Derya Çiçek Polat, Ankara (Turkey)  
 Derya Yıldırım, Isparta (Turkey)  
 Didem Turgut Coşan, Eskişehir (Turkey)

Dilan Çetinavcı, Muğla (Turkey)  
 Dilek Düzgün Ergün, İstanbul (Turkey)  
 Duran Katar, Eskişehir (Turkey)  
 Duygu Nur Çobanoğlu, Bingöl (Turkey)  
 Ebru Ataşlar, Eskişehir (Turkey)  
 Ebru Derici Eker, Mersin (Turkey)  
 Elif Apohan, Elazığ (Turkey)  
 Elif Neyran Soyulu, Giresun (Turkey)  
 Emel Ulupınar, Eskişehir (Turkey)  
 Emel Uslu, Bolu (Turkey)  
 Emin Uğurlu, Eskişehir (Turkey)  
 Emre Aydemir, Antalya (Turkey)  
 Emre Sevidik, Aydın (Turkey)  
 Erdem Seven, Batman (Turkey)  
 Erdi Can Aytar, Samsun (Turkey)  
 Erdoğan Atmış, Bartın (Turkey)  
 Ergin Hamzaoğlu, Ankara (Turkey)  
 Ergün Bacak, İstanbul (Turkey)  
 Erhan Çalışkan, Trabzon (Turkey)  
 Ernaz Altundağ, Düzce (Turkey)  
 Erol Yıldırım, Erzurum (Turkey)  
 Ersan Bektaş, Giresun (Turkey)  
 Ersin Demirel, Antakya (Turkey)  
 Ersin Karabacak, Çanakkale (Turkey)  
 Ersin Yücel, Eskişehir (Turkey)  
 Esat Çetin, Sakarya (Turkey)  
 Esra Martin, Konya (Turkey)  
 Eyüp Mennan Yıldırım, Aydın (Turkey)  
 Ezgi Kar, Çanakkale (Turkey)  
 Fahrettin Tilki, Artvin (Turkey)  
 Faik Ceylan, Düzce (Turkey)  
 Faruk Maraşlıoğlu, Çorum (Turkey)  
 Faruk Selçuk, Kırşehir (Turkey)  
 Fatih Dikmen, İstanbul (Turkey)  
 Fatih Göğör, Eskişehir (Turkey)  
 Fatih Kar, Kırşehir (Turkey)  
 Fatih Satıl, Balıkesir (Turkey)  
 Fatih Temel, Artvin (Turkey)  
 Fatma Güneş, Edirne (Turkey)  
 Fatma Kandemir Çevik, Adana (Turkey)  
 Fatma Koyuncu, Eskişehir (Turkey)  
 Fatma Yıldız, Antalya (Turkey)  
 Fatmagül Geven, Ankara (Turkey)  
 Fazle Subhan, Peshawar, (Pakistan)  
 Ferhat Altunsoy, Eskişehir (Turkey)  
 Fethi Bengil, Girne (KKTC)  
 Fevzi Özgökçe, Van (Turkey)  
 Feyza Candan, Manisa (Turkey)  
 Figen Çalışkan, Eskişehir (Turkey)  
 Filiz Aygün, Bayburt (Turkey)  
 Filiz Savaroğlu, Eskişehir (Turkey)  
 Filiz Yılmaz, Eskişehir (Turkey)  
 Gencay Akgül, Nevşehir, (Turkey)  
 Gökçe Karadağ, Erzurum (Turkey)  
 Gökhan Abay, Rize (Turkey)  
 Gökhan Kuş, Eskişehir (Turkey)  
 Görkem Deniz Sönmez, Adıyaman (Turkey)  
 Gözde-Elgin Cebe, İzmir (Turkey)  
 Gül Nilhan Tuğ, Ankara (Turkey)  
 Gülçin Işık, Eskişehir (Turkey)  
 Gülgün F. Ünal Şengör, İstanbul (Turkey)  
 Gülriz Bayçu, İstanbul (Turkey)  
 Gülsen Kendir, İstanbul (Turkey)  
 Gülşah Çobanoğlu, İstanbul (Turkey)  
 Gülşah Özyiğitoğlu, İstanbul (Turkey)  
 Güngör Yılmaz, Tokat (Turkey)  
 Günsel Bingöl, Ankara (Turkey)  
 Gürkan Semiz, Denizli (Turkey)  
 H. Barış Özel, Bartın (Turkey)  
 H.Askin Akpulat, Erzurum (Turkey)  
 Hacı Halil Biyık,, Aydın (Turkey)  
 Haider Abbas, Karachi (Pakistan)  
 Hakan Çalışkan Eskişehir (Turkey)

Halil İbrahim Güler, Trabzon (Turkey)  
 Halil Koç, Sinop (Turkey)  
 Hamdi Aydın, Kocaeli (Turkey)  
 Handan Ucuun Özel, Bartın (Turkey)  
 Harisha R P, Bangalore (India)  
 Hasan Akan, Şanlıurfa (Turkey)  
 Hasan Akgül, Gaziantep (Turkey)  
 Hasan Baydar, Isparta (Turkey)  
 Hasan Korkmaz, Elazığ (Turkey)  
 Hasan Özçelik, Isparta (Turkey)  
 Hassib Ben Khedher, Erzurum (Turkey)  
 Hatice Demiray, İzmir (Turkey)  
 Hatice Güneş, Muğla (Turkey)  
 Hatice Kiremit Özenoğlu, Aydın (Turkey)  
 Hatice Nurhan Büyükkartal, Ankara (Turkey)  
 Hayri Duman, Ankara (Turkey)  
 Hilal Yıldırım, Giresun (Turkey)  
 Hülya Altuntaş, Eskişehir (Turkey)  
 Hüseyin Dural, Konya (Turkey)  
 Hüseyin Güngör, Düzce (Turkey)  
 İhsan A. Al-Shehbaz, Missouri (USA)  
 İlğaz Akata, Ankara (Turkey)  
 İltif Ullah, Nowshera (Pakistan)  
 İbrahim Ertekin, Hatay (Turkey)  
 İbrahim Ethem Şahin, Düzce (Turkey)  
 İbrahim İlker Özyiğit, İstanbul (Turkey)  
 İbrahim Söğüt, İstanbul (Turkey)  
 İbrahim Turna, Trabzon (Turkey)  
 İbrahim Türkel, Tokat (Turkey)  
 İlker Avan, Eskişehir (Turkey)  
 İlker Büyüyük, Ankara (Turkey)  
 İlkun Bağdatlı Niğde (Turkey)  
 İlkun Dağ, Eskişehir (Turkey)  
 İnci Kravkaz, Kastamonu (Turkey)  
 İrfan Albayrak, Kırkkale (Turkey)  
 İsa Ardahanlı, Bilecik (Turkey)  
 İsa Başköse Ankara (Turkey)  
 İsa Telci, Isparta (Turkey)  
 İsmail Şen, Isparta (Turkey)  
 İsmühan Potoğlu Erarka, Eskişehir (Turkey)  
 Kadriye Uruç Parlak, Ağrı (Turkey)  
 Kamil Koç, Manisa (Turkey)  
 Kâmuran Aktaş, Manisa (Turkey)  
 Kerim Çiçek, İzmir (Turkey)  
 Kesran Akin, Bitlis (Turkey)  
 Khalid M. Khawar, Ankara (Turkey)  
 Kübra Sağlam, İstanbul (Turkey)  
 Kürşad Özkan, Isparta (Turkey)  
 Levent İzci, Isparta (Turkey)  
 Levent Yazıcı, Yozgat (Turkey)  
 M. Ufuk Özbek, Ankara (Turkey)  
 Malik Faisal, İslamabad (Pakistan)  
 Manzoor Ahmad, İslamabad (Pakistan)  
 Marjan Komnenov, Skopje (Macedonia)  
 Maryam Keshavarzi, Tehran (Iran)  
 Mehmet Arslan, Kayseri (Turkey)  
 Mehmet Burçin Mutlu, Eskişehir (Turkey)  
 Mehmet Candan, Eskişehir (Turkey)  
 Mehmet Kaplan, Siirt (Turkey)  
 Mehmet Karaismailoğlu, Siirt (Turkey)  
 Mehmet Kürşat Derici, Kırkkale (Turkey)  
 Mehmet Sağiroğlu, Sakarya (Turkey)  
 Mehmet Sincik, Bursa (Turkey)  
 Mehmet Tekin Sivas (Turkey)  
 Mehmet Yavuz Paksoy, Unceli (Turkey)  
 Mehmet Zülfü Yıldız, İzmir (Turkey)  
 Mehtap Usta, Trabzon (Turkey)  
 Menderes Çenet, Osmaniye (Turkey)  
 Meral Yılmaz Cankılıç, Eskişehir (Turkey)  
 Mert İlhan, Van (Turkey)  
 Merve Kara, Hatay (Turkey)  
 Mesut Kırmacı, Aydın (Turkey)

**Hakemler/ Reviewer**

Metin Armağan, Aydın (Turkey)  
 Mikail Açar, Tunceli (Turkey)  
 Mohammed Merzouki, Fez (Morocco)  
 Muammer Bahşi, Elazığ (Turkey)  
 Muhammad Sarwar, Jam (Pakistan)  
 Muhammad Yasin Ashraf, (Pakistan)  
 Muhammed Mesud, Hürkül Ankara (Turkey)  
 Muhittin Dinç, Konya (Turkey)  
 Murat Alan, Karabük (Turkey)  
 Murat Ardiç, Eskişehir (Turkey)  
 Murat Kurşat, Bitlis (Turkey)  
 Murat Olgun, Eskişehir (Turkey)  
 Murat Tunçtürk, Van (Turkey)  
 Murat Turan, Denizli (Turkey)  
 Murat Ünal, Van (Turkey)  
 Musa Türkmen, Hatay (Turkey)  
 Mustafa Ateş, İzmir (Turkey)  
 Mustafa Cengiz, Siirt (Turkey)  
 Mustafa Korkmaz, Erzincan (Turkey)  
 Mustafa Öz, Aksaray (Turkey)  
 Mustafa Sözen, Zonguldak (Turkey)  
 Mustafa Yamaç, Eskişehir (Turkey)  
 Mutlu Gültepe, Giresun (Turkey)  
 Müge Sayitoğlu, İstanbul (Turkey)  
 Müfit Özüluğ, İstanbul (Turkey)  
 Nagaraja B. C., Bangalore (India)  
 Nalan Yılmaz Sarıöz, Eskişehir (Turkey)  
 Naşit İğci, Nevşehir (Turkey)  
 Nazmi Polat, Samsun (Turkey)  
 Necdet Değermenci, Kastamonu (Turkey)  
 Necmi İşler, Hatay (Turkey)  
 Neriman Özhatay, İstanbul (Turkey)  
 Nesil Ertoran, Eskişehir (Turkey)  
 Nilsun Demir, Ankara (Turkey)  
 Nural Karagözlü, Manisa (Turkey)  
 Nural Pastacı Özsoğacı, İstanbul (Turkey)  
 Nurcan Yiğit, Kastamonu (Turkey)  
 Nurdilek Gülmezoğlu, Eskişehir (Turkey)  
 Nurhayat Dalkıran, Bursa (Turkey)  
 Nur Münevver Pınar, Ankara (Turkey)  
 Nuri Öner, Çankırı (Turkey)  
 Nursel Aşan Baydemir, Kırıkkale (Turkey)  
 Nurten Günel, İstanbul (Turkey)  
 Oğuzhan Kaygusuz, Denizli (Turkey)  
 Olga Sak, Balıkesir (Turkey)  
 Onur Koyuncu, Eskişehir (Turkey)  
 Oya Kaçar, Bursa (Turkey)  
 Ozan Demirözer, (Turkey)

Ömer Çeçen, Karaman (Turkey)  
 Ömer Koray Yaylacı, Eskişehir (Turkey)  
 Ömral Ünsal Özkoç, Samsun (Turkey)  
 Ömür Gençay Çelemlı, Ankara (Turkey)  
 Özdemir Şentürk, Burdur (Turkey)  
 Özfer Yeşilada, Malatya (Turkey)  
 Özgür Emiroğlu, Eskişehir (Turkey)  
 Perihan Kendirci, İzmir (Turkey)  
 Pınar Çam İcık, Sinop (Turkey)  
 Prasanna Kumar, Bangalore (India)  
 Rabia Özbek, Kocaeli (Turkey)  
 Rasime Demirel, Eskişehir (Turkey)  
 Recep Sulhi Özkütük, Eskişehir (Turkey)  
 Rıza Binzet, Mersin (Turkey)  
 Robert Angus, London (England)  
 Sabri Erbaş, Isparta (Turkey)  
 Safa Gümüşok, Ankara (Turkey)  
 Saleem Ahmad, Islamabad (Pakistan)  
 Salim Serkan Güçlü, Isparta, (Turkey)  
 Salman Khan, Uttarkhand (India)  
 Sami Doğanlar, İzmir (Turkey)  
 Saye Nihan Çabuk, Eskişehir (Turkey)  
 Seda Erkan Buğday, Kastamonu (Turkey)  
 Seher Karaman Erkul, Aksaray (Turkey)  
 Selami Selvi, Balıkesir (Turkey)  
 Selen İlgün, Kayseri (Turkey)  
 Selima Khatun, West Bengal (India)  
 Selma Helli, Sakarya (Turkey)  
 Semra Soydam Aydın, Ankara (Turkey)  
 Serap Pulatsü, Ankara (Turkey)  
 Serdar Aslan, Düzce (Turkey)  
 Serdar Gökhan Şenol, İzmir (Turkey)  
 Serdar Makbul, Rize (Turkey)  
 Serkan Gülsoy, Isparta (Turkey)  
 Serkan Saygun, Ordu, (Turkey)  
 Servet Arslan, Antalya (Turkey)  
 Sevda Kırbağ, Elazığ (Turkey)  
 Sevda Turkis, Ordu (Turkey)  
 Sevil Sungur, Nevşehir (Turkey)  
 Sevinç Aydın, Tunceli (Turkey)  
 Seyit Ahmet Sargın, Alanya (Turkey)  
 Seyran Palabaş Uzun, K. Maraş (Turkey)  
 Sezer Okay, Çankırı (Turkey)  
 Sezgin Çelik, İstanbul (Turkey)  
 Sezgin Özden, Çankırı (Turkey)  
 Shyam Singh Yadav, Lae (New Guinea)  
 Sibel Alagöz Ergüden, Adana (Turkey)  
 Sinan Güner, Artvin (Turkey)  
 Snejana Doncheva, Sofia (Bulgaria )  
 Soner Çetinkaya, Isparta (Turkey)

Soner Kazaz, Ankara (Turkey)  
 Sumaira Sahren, Islamabad (Pakistan)  
 Sunil Kumarkhan, Magra, Hooghly (India)  
 Sümer Aras, Ankara (Turkey)  
 Şahane F. Arslanoğlu, Samsun (Turkey)  
 Şebnem Şimşek, İzmir (Turkey)  
 Şengül Aksan, Akseki-Antalya (Turkey)  
 Şeniz Karabıyıklı, Tokat (Turkey)  
 Sulhi Özkütük, Eskişehir (Turkey)  
 Süleyman Doğu, Konya (Turkey)  
 Tahir Atıcı, Ankara (Turkey)  
 Tamer Keçeli, Çankırı (Turkey)  
 Tamer Özcan, Balıkesir (Turkey)  
 Tarkan Yorulmaz, Çankırı (Turkey)  
 Temel Özek, Eskişehir (Turkey)  
 Tuba Bekircan, Trabzon (Turkey)  
 Tuğba Bayrak Özbucak, Ordu (Turkey)  
 Tuğba Ongun Sevindik, Sakarya (Turkey)  
 Tuğrul Öntürk, Eskişehir (Turkey)  
 Turan Arabacı, Malatya (Turkey)  
 Turgay Dindaroğlu, K. Maraş (Turkey)  
 Tülay Ezer, Niğde (Turkey)  
 Ufuk Coşgun, Karabük (Turkey)  
 Ummahan Öz, Manisa (Turkey)  
 Umut Kökbaş, Adana (Turkey)  
 Ümit Subaşı, İzmir (Turkey)  
 Ümit Şirin, Eskişehir (Turkey)  
 Ünal Akkemik, İstanbul (Turkey)  
 Ünal Özelmaz, Eskişehir (Turkey)  
 Volkan Altay, Hatay (Turkey)  
 Yakup Şenyüz, Kütahya (Turkey)  
 Yaşar Kıran, Elazığ (Turkey)  
 Yavuz Bülent Köse, Eskişehir (Turkey)  
 Yeşim Dağlıoğlu, Ordu (Turkey)  
 Yeşim Kara, Denizli (Turkey)  
 Yusuf Arslan, Bolu (Turkey)  
 Yusuf Uzun, Van (Turkey)  
 Yusuf Ziya Aygün, Hatay (Turkey)  
 Zafer Ayaş, Ankara (Turkey)  
 Zafer Ölmez, Artvin (Turkey)  
 Zafer Yücesan, Trabzon (Turkey)  
 Zehra Kaya, Van (Turkey)  
 Zeki Aytaç, Ankara (Turkey)  
 Zeki Severoğlu, İstanbul (Turkey)  
 Zekiye Kocakaya, Yozgat (Turkey)  
 Zeynel Arslangündoğdu, İstanbul (Turkey)  
 Zeynep Şahan, Adıyaman (Turkey)  
 Zia Ullah, Beijing (China)

**Genel Yayın Yönetmeni/Executive Editor:** Ersin YÜCEL, Mine YÜCEL

**Yayın Editörü/ Production Editor:** İlkin YÜCEL ŞENGÜN

**Mizampaj Editörü/Layout Editor:** Dilge YÜCEL

**Yazım ve Dil Editörü:** Mine YÜCEL,

**Veb düzeni/Web Consultant:** Alper YARGIÇ, Didem AYDAN,  
 Gülsultan ÇAVUŞOĞLU

**Teknik Editör/Technical Editor:** Recep Sulhi ÖZKÜTÜK

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

**Abonelik Yöneticisi:** Yasemin YÜCEL,

**Kapak Düzeni/ Cover Layout:** Mine YÜCEL

**Genel Sekreter/Secretary:** Faik CEYLAN

**Baskı/Printing Press:** Cetemenler, Eskişehir/Turkey



## Determination of trophic status of aquatic systems of Ballıkaya nature park (Kocaeli, Turkey)

Arzu Morkoyunlu YÜCE<sup>\*1</sup>, Arif GÖNÜLÖL<sup>2</sup>, Şebnem ERKEBAY<sup>3</sup>  
ORCID: 0000-0002-3678-4930; 0000-0003-2294-9076; 0000-0002-6467-7198

<sup>1</sup> Kocaeli Üniversitesi, Hereke Asım Kocacıyık Meslek Yüksekokulu, 41800 Hereke-Kocaeli, Turkey

<sup>2</sup> Ondokuzmayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, 55200 Atakum-Samsun, Turkey

<sup>3</sup> Kocaeli Üniversitesi, Karamürsel Meslek Yüksekokulu, 41500 Karamürsel-Kocaeli, Turkey

### Abstract

Algae flora and water quality of Ballıkaya creek and pond which near Gebze industrial zone have not been yet investigated. Therefore, to aims was made to determine of the physicochemical structure of the water and its algae flora in the creek and pond. This study, trophic level of the river and the external factors affecting it were determined with the help of various indices due to epilithic diatoms. Between August 2016 and July 2017, water and stone samples were taken seasonally from a total of 5 stations, 3 from the creek and 2 from the pond. The samples were examined according to standard techniques and methods.

In this study, 20 species belonging to Bacillariophyta, 3 to Chlorophyta, 1 to Cyanophyta, 3 to Euglenozoa, 1 to Ochrophyta and 1 to Miozoa were identified. Only Bacillariophyta members were found due to the flow of water in the algal flora of Ballıkaya Creek. Chlorophyta, Cyanophyta, Euglenozoa, Ochrophyta and Miozoa species were detected in the algae flora in the pond due to stagnant water. Physicochemical parameters measured in water were found between respectively pH 7.6-8.2, sulfate 29-25 mg / L, sulfide 0.88-2.44 mg / L, ammonia nitrogen 0.03-0.55 mg / L, nitrite 0.03- 0.04 mg / L and nitrate 1.16-8.28 mg / L. As a result of the research, TDI 57.55, IPS 3.55, IDG 3.33 and TIT 2.75 were determined. When Ballıkaya Creek and pond were evaluated in terms of diatom indexes and water quality values, they were exposed to organic pollution and they were found to be close to water quality class II.

**Keywords:** Algae, national park, trophic index, Turkey

----- \* -----

### Ballıkaya tabiat parkı sucul sistemlerinin trofik durumunun belirlenmesi (Kocaeli, Türkiye)

#### Özet

Gebze sanayi bölgesine yakın olan Ballıkaya deresi ve göleti alg florası ve su kalitesi henüz araştırılmamıştır. Bu nedenle dere ve göletteki suyun fizikokimyasal yapısının ve alg florasının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma, epilithic diatomelere bağlı olarak çeşitli indeksler yardımı ile akarsuyun trofik düzeyini ve etki eden dış faktörleri tespit etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ayrıca epilithic diatomelere bağlı olarak çeşitli indeksler yardımı ile akarsuyun trofik düzeyi ve etki eden dış faktörler tespit edilmiştir. Ağustos 2016 ile Temmuz 2017 arasında, dereden 3 ve göletten 2 istasyon olmak üzere toplam 5 istasyondan mevsimsel olarak su ve taş örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler, standart teknik ve yöntemlere göre incelenmiştir.

Ballıkaya dere ve göletinde, fitoplankton ve epilithic alglerden Bacillariophyta (20), Chlorophyta (3), Euglenozoa (3), Cyanophyta (1), Ochrophyta (1), Miozoa (1) divizyonlarına ait toplam 29 tür tespit edilmiştir. Ballıkaya Deresi alg florasında suyun akışından dolayı sadece Bacillariophyta üyeleri bulunmuştur. Havuzdaki alg florasında ise, durgun sudan dolayı Chlorophyta, Cyanophyta, Euglenozoa, Ochrophyta ve Miozoa türleri belirlenmiştir. Suda ölçülen fizikokimyasal parametreler sırasıyla pH 7,6-8,2; sülfat 29-25 mg / L; sülfid 0,88-2,44 mg / L; amonyak azotu 0,03-0,55 mg / L; nitrit 0,03-0,04 mg / L ve nitrat 1,16-8,28 mg / L arasında bulundu. Araştırma sonucunda TDI 57,55; IPS 3,55;

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902627423290; Fax.: +902627424091; E-mail: arzu.yuce@kocaeli.edu.tr

IDG 3,33 ve TIT değeri 2,75 olarak belirlenmiştir. Ballıkaya Deresi ve göleti, diyatome indeksleri ve su kalitesi değerleri açısından değerlendirildiğinde, organik kirliliğe maruz kaldıkları ve II. Su kalite sınıfına yakın oldukları tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Alg, Milli Park, Trofik indeks, Türkiye

## 1. Giriş

Yaşam için, su kaynaklarının sürdürülebilir olması ve çevresel etkenlerinin birlikte değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Özellikle su kaynaklarında, besin zincirinin önemli halkasını mikro algler oluşturmaktadır. Dünyada oldukça farklı ekosistemlerde yayılış gösteren algler, buldukları ortamın yapısını yansıtan indikatör türleri içermektedir. Ayrıca, iç sularımızda yürütülen tatlı su balıkçılığı faaliyetleri ile besin potansiyelinin daha fazla geliştirilebilmesi için iç sularımızın verimliliğinin korunması gerekmektedir. Bu nedenle alglerin ve bunları etkileyen çevresel faktörlerin belirlenmesi zorunlu hale gelmiştir. Akarsularda yaşayan organizmalar birbirleriyle olan karşılıklı ilişkilerini dengeli bir şekilde sürdürürken aynı zamanda kendilerini kuşatan çevre faktörleri ile bir ekosistem oluştururlar. Fitoplanktondan başlayarak balığa kadar ulaşan bu besin zincirinin devamlılığı sucul ortamların verimliliğinde oldukça önemlidir. Besin zincirindeki organizmaların miktar ve çeşitliliğinin değişikliğe uğraması doğal olarak besin zincirinin üst basamaklarındaki canlı gruplarını etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda algler, su kalitesi, primer produktivite, sistemin zenginliği ve gelecekteki durumun ne olacağını ortaya koyması açısından temel bir parametre olma özelliğini sürdürmektedir [1,2,3].

Akuvatik ortamlarda değişimin etkisi ilk önce fitoplanktonda görüldüğünden, öncelikle iç sularda fitoplanktonun yapı ve mevsimsel değişimi ile bu değişime etki eden çevre faktörlerinin araştırılmasına yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Durgun sularda, fitoplankton çalışmaları ağırlıklı olarak yer alırken akarsularda akış nedeniyle fitoplankton gelişimi sınırlı kaldığından kıyı bölgesi alglerinin belirlendiği çalışmalar ağırlık kazanmıştır. Ülkemiz lotik ve lentik sistemlerinde alg floralarının belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Gerçekleştirilen bu araştırmalarda, özellikle kıyı bölgesinde sedimanlar üzerinde yaşayan ve çoğu hareketli epipelik flora adı verilen topluluk ile, suyun içindeki taş ve bitkilere bağlanarak yaşayan epilitik ve epifitik alg topluluklarının, sucul sistemlerin biyoçeşitliliği ve verimliliği açısından önemli katkılar sağladığı belirlenmiştir [1,2,3,4,5].

Özellikle, bentik algler, akarsularda en önemli besin kaynağını oluştururlar. Bentik alglerin bir grubunu oluşturan diyatome, omurgasızlar ve balık larvaları için besin kaynağı olmakla birlikte, çevresel koşullara karşı hassasiyetlerinden dolayı, sucul sistemler için çok iyi indikatör türler içermektedir. Bu türler, akarsu içinde gelişme zamanına bağlı olarak sucul çevrenin fiziksel, kimyasal ve biyolojik olaylarına da etki ederler [6]. Araştırmalarda akarsuların kirliliği, akarsuda yaşayan indikatör bentik diyatome türleri kullanılarak belirlenmektedir [7]. Diyatome çevresel şartlardaki değişimlere tepki göstermesi ve çok sayıdaki türünün dar tolerans aralığına sahip olmasından dolayı su kalitesini değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. Son yıllarda, Avrupa'nın birçok ülkesinde Su Çerçeve Direktifi doğrultusunda, akarsu kirlilik indikatörü olarak bentik diyatome türleri kullanılmakta ve bu amaçla geliştirilmiş birçok indeks bulunmaktadır [8,6,9,10,11]. Türkiye'de diyatome indekslerinin akarsuların kalitesini belirleme çalışmalarında kullanılması 2000'li yıllarda başlamıştır. Sarıçay (Muğla, Milas)'ın su kalitesi epilitik diyatomelere göre belirlenmiştir [12]. Gürbüz ve Kıvrak, Karasu Nehri (Erzurum)'nin su kalitesini belirlerken ilk kez üç farklı indeks (TDI, SI ve IDG) kullanmıştır [13]. OMNIDIA yazılım programı ise ilk defa Akçay'ın su kalitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır [14]. Solak'ın yaptığı çalışmada, Yukarı Porsuk Çayı'nda indikatör epilitik diyatome türleri ve diyatome indekslerini kullanarak su kalitesini belirlemiştir [15]. Batı Anadolu da yer alan bazı dere ve akarsularda trofik indeks Türkiye (TIT) geliştirilmiş ve bu değerler tespit edilmiştir [16].

Bu çalışmada, Gebze sanayi bölgesinin yanında bulunan turizm açısından önemli ve çeşitli sportif aktivitelerin gerçekleştirildiği Ballıkaya Deresi ve göletinin fitoplanktonu, bentik komünitedeki epilitik algler ile suyun fizikokimyasal özelliği incelenerek su kalitesi, su kalitesi üzerindeki etkin çevresel faktörlerin belirlenmesi ve trofik yapısının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bu nedenle, çalışmada trofik diyatome indeksi (TDI), kirlenme duyarlılık indeksi (IPS), cins diyatome indeksi (IDG), Trofik indeks Türkiye (TIT) değerleri kullanılmıştır. Derenin su kalite sınıfları, Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği'nde verilen değerlere göre belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmanın Türkiye alg florasına katkı sağlaması da amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve yöntem

Kocaeli'nin Gebze ilçesinde bulunan Ballıkaya Tabiat Parkı 40° 49' 30"-40° 54' 00" kuzey enlemleri ile 29° 30' 00"-29° 33' 30" doğu boylamları arasında yer alan I. derece doğal sit alanıdır. Tabiat parkının alanı 1603 Ha'dır. Ballıkaya deresi, uzunluğu 1.5 km. ve genişliği 40-80 m arasında değişen kanyon görünümüne, dar ve derin bir vadi içerisinde bulunur. Dere vadi çıkışından sonra ufak bir göl oluşturur, göl çıkışından sonra Tavşanlı dere adını alarak güneyde Marmara Denizi'ne dökülür. Ballıkayalar Tabiat Parkı, doğa yürüyüşü yapanların ve dağcılarının yanı sıra doğasever ve piknikçilerin de uğrak yeridir [17]. Ballıkaya deresi ve göletinin alg florası ve su kalitesini belirlemek amacıyla dereden 3 ve göletten 2 örnek alma istasyonu olmak üzere toplam 5 istasyondan Ağustos 2016-Temmuz 2017

arasında mevsimsel olarak su ve taş örnekleri alınmıştır. Araştırma alanında seçilen örnek alma istasyonları, Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Araştırma alanında seçilen örnek alma istasyonları

Dereyi temsil etmesi hem de gölete yakın olması nedeniyle 2. istasyondan mevsimsel olarak alınan yüzey suyu örneklerinde, pH örnek alma esnasında arazi tipi YSI marka cihazla ölçülmüştür. Araştırma laboratuvarına getirilen su örneklerinde ayrıca nitrit azotu (NO<sub>2</sub>-N) nitrat azotu (NO<sub>3</sub>-N), amonyum azotu (NH<sub>4</sub>-N), sülfat ve sülfid standart metotlara göre ölçülmüştür [18].

Fitoplanktonun tür kompozisyonunu belirlemek için örnekleme istasyonlarından 2 litrelik ağzı geniş plastik kaplar ile yüzey suyu örnekleri alınmıştır. Araştırma laboratuvarında, homojen dağılım sağlanmak için plastik şişeler çalkalanmış ve por açıklığı 55 µm olan Whatman GF/A süzgeç kağıtlarından su trompu vasıtasıyla süzülerek alglerin süzgeç kağıdı üzerinde toplanması sağlanmıştır. Süzgeç kağıtları hafif sulu vaziyette petri kutularına alınarak buzdolabında muhafaza edilmiştir. Süzgeç kağıdı üzerinde toplanan alglerin kazınarak %10’ luk gliserinle hazırlanan geçici preparatlarında algler teşhis edilmiştir.

Örnek alma istasyonlarından her örnek almada aynı miktarda olmasına dikkat edilerek farklı büyüklükte taş örnekleri geniş ağızlı plastik kaplar içinde laboratuvara getirilmiştir. Taş örnekleri içinde 100 ml saf su bulunan küçük küvetlere boşaltılmış ve sert bir fırçayla fırçalanmıştır. Bu sayede suya geçen algler örnek saklama şişelerine alınarak etiketlenmiştir. Bu örneklerde bulunan diyatome dışındaki algler %40’lık gliserinle hazırlanan geçici preparatlarda teşhis edilmiştir. Diyatome ise daimi preparat haline getirilerek her preparatta en az 400-500 diyatome kabuğu sayılmış ve her türün yüzde bolluk derecesi hesaplanmıştır [19].

Diyatomelerin daimi preparatları yapılırken hücrelerindeki organik maddenin ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Taş yüzeylerinin kazınmasıyla elde edilen su örneklerinden alınıp 25 ml’lik beherlere 20’şer ml konulmuştur. Beherlere 1 er ml, 1/1 oranındaki derişik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve HNO<sub>3</sub> karışımından ilave edilerek karışım 15-20 dakika çeker ocakta 105 °C’ de kaynatılmıştır. Kaynatılan örneklerin asiditesinin giderilmesi için bir hafta günde en az iki defa saf suda yıkanmıştır. Daha sonra üzerindeki su sifonlanarak dipte kalan sulu beyaz tortu saklama kaplarına konulmuştur. Kanada balsamı ortam maddesi kullanılarak daimi preparat haline getirilmiştir [20]. Algler konuyla ilgili kaynaklardan yararlanılarak teşhis edilmiştir [21,22,23,24,25,26]. Teşhis edilen alg türleri algaebase veri tabanından yararlanılarak kontrol edilmiş ve güncellenmiştir [27].

Kirlilik düzeyinin belirlenmesinde kullanılan indekslerden; ötrofikasyonu belirlemek için geliştirilmiş olan trofik diyatome indeksi (TDI) ve ülkemiz, su kütlelerinin ekolojik kalite durumları için kullanılan Trofik indeks Türkiye (TIT) değeri hesaplanmıştır [28]. Akdeniz interkalibrasyon metriği içerisinde yer alan kirlenme duyarlılık indeksi (IPS) ve cins diyatome indeksi (IDG) ise OMNİDİA 6.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır [29].

### 3. Bulgular

Mevsimsel olarak 2. istasyondan alınan su örneklemelerinde yapılan analizlerde en yüksek ve en düşük değerler; pH 8,23-7,62; sülfat 29,01-23,8 mg/L; sülfid 2,44-0,88 mg/L; amonyum azotu 0,55-0,03 mg/L; nitrit azotu 0,08-0,03 mg/L ve nitrat azotu ise 7,45-0,28 mg/L olarak ölçülmüştür. Bazı fizikokimyasal parametre değerlerinin mevsimsel değişimi Tablo 1’ de verilmiştir.



Tablo 1. Ölçülen bazı fizikokimyasal parametre değerlerinin mevsimsel değişimi

Mevsimler/Parametreler ( mg/L)	pH	Sülfat (mg/L)	Sülfit (mg/L)	Amonyum azotu ( mg/L)	Nitrit azotu (mg/L)	Nitrat azotu (mg/L)
İlkbahar	7,74	25,01	2,44	0,03	0,04	0,28
Yaz	8,23	29,01	2,24	0,11	0,06	7,45
Sonbahar	7,62	23,80	1,61	0,55	0,08	6,46
Kış	7,82	22,45	0,88	0,03	0,03	1,16

Ballıkaya göleti ve deresi'nin alg florasını Bacillariophyta (20), Chlorophyta (3), Euglenozoa (3), Cyanophyta (1), Ochrophyta (1) ve Miozoa (1) divizyonlarına ait 29 tür oluşturmuştur. Tespit edilen türlerin listesi Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Ballıkaya Dere ve Gölet'inde tespit edilen taksonlar

Algler	Planktonik	Epilitik
<b>BACILLARIOPHYTA</b>		
<i>Cocconeis pediculus</i> Ehrenb.	+	+
<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenb.	+	+
<i>Craticula cuspidata</i> (Kütz.) D.G.Mann	+	+
<i>Diatoma vulgare</i> Bory	+	+
<i>Encyonema ventricosum</i> (C.Agardh) Grunow	+	+
<i>Gomphonema intricatum</i> Kütz.	+	+
<i>Gomphonema minuta</i> P.Fusey	-	+
<i>Gomphonema olivaceum</i> (Hornem.) Bréb.	+	+
<i>Melosira varians</i> C.Agardh	+	+
<i>Meridion circulare</i> (Greville) C.Agardh	+	+
<i>Navicula cryptocephala</i> Kütz.	-	+
<i>Navicula radiosa</i> Kütz.	+	+
<i>Navicula</i> sp.	+	+
<i>Nitzschia filiformis</i> (W.Sm.) Van Heurck	-	+
<i>Nitzschia linearis</i> W.Sm.	-	+
<i>Nitzschia recta</i> Hantz. ex Rabenh.	-	+
<i>Nitzschia</i> sp.	-	+
<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C.Agardh) Lange-Bert.	-	+
<i>Surirella ovalis</i> Bréb.	-	+

Tablo 2. Devam ediyor

<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) Compère	+	+
<b>CHLOROPHYTA</b>		
<i>Scendesmus dimorphus</i> (Turpin) Kütz.	+	-
<i>Pseudopediastrum boryanum</i> (Turpin) E.Hegewald	+	-
<i>Micractinium pusillum</i> Fresenius	+	-
<b>CYANOBACTERIA = CYANOPHYTA</b>		
<i>Kamptomena formosum</i> (Bory ex Gomont) Strunecký, Komárek & J.Smarda	+	-
<b>EUGLENOZOA</b>		
<i>Lepocinclis acus</i> (O.F.Müller) B.Marin & Melkonian	+	-
<i>Phacus pseudowirenko</i> Prescott	+	-
<i>Trachelomonas abrupta</i> Svirenko [Svirenko]	+	-
<b>OCHROPHYTA</b>		
<i>Dinobryon sertularia</i> Ehrenb.	+	-
<b>MIOZOA</b>		
<i>Peridinium</i> sp.	+	-

Araştırmada elde edilen değerler, Tablo 3'te verilen indeks kriterlerine göre değerlendirilmiştir [16,30].

Tablo 3. Diyatome İndeksleri

İndeks	Kısaltma ve Kalite sınıfı sayısı	İndeks aralığı (Temizden kirliye doğru su kalitesi)
Kirlenme duyarlık indeksi (IPS)	IPS/5	1 (çok kötü) – 5 (çok iyi)
Cins Diyatome indeksi (IDG)	IDG/5	1 (çok kötü) – 5 (çok iyi)
Trofik Diyatome indeksi (TDI)	TDI/100	0 (temiz) – 100 (çok kirli)
Trofik İndeks Türkiye (TIT)	TIT/4	0 (çok iyi) – 4 (çok kötü)

Fitobentoza ait trofik diyatome indeksi (TDI) 57,55; kirlenme duyarlılık indeksi (IPS) 3,55; cins diyatome indeksi (IDG) 3,33 ve trofik indeks Türkiye (TIT değeri) 2,75 olarak belirlenmiştir.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Doğal sucul sistemlerde pH, su kalitesini ve biyolojik çeşitliliği farklı şekillerde etkilemektedir. Bu nedenle pH'nın etkisinin belirlenmesi oldukça zordur. Suyun pH'ı ölçülerek, serbest CO<sub>2</sub> miktarı, ortamın bazik veya asidik olduğu saptanabilir. Sucul ortamlardaki pH'nın 6,4 - 8,6 arasında olması canlı yaşamını olumlu etkilemekle birlikte, alkali sularda verimliliğin yüksek, asidik sularda ise verimliliğin düşük olduğu belirtilmiştir [31]. Ballıkaya sucul sisteminin pH değeri 7,62 ile 8,23 arasında belirlenmiş olup, su hafif alkali özelliindedir. Bakanlığın, Yüzeysel Su Kalitesi Yönetmeliğine göre ise su kalitesi I.ve II. sınıfına girmektedir [32]. Alkalinite, diyatome için sınırlayıcı bir faktör olmakla birlikte, hafif alkali suların, alg türlerinin gelişmesi için daha uygun ortamlar olduğu, diyatomlardan, *Fragilaria* ve *Nitzschia*'nın alkali sularda yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir [3,33]. Ballıkaya Deresi ve Göleti

epilitik alg topluluğunda *Fragilaria* cinsine ait türler tespit edilmemiş, buna karşın *Nitzschia* cinsine ait 4 tür tespit edilmiştir.

Doğal sularda sülfat eksikliği alg gelişimini engellemekte ve bitki büyümesini yavaşlatmaktadır. Çeşitli endüstri atıklarının, tarımsal faaliyetlerin, evsel atıkların ve denizsuyu etkisinin tatlısulara sülfat derişimini arttırdığı vurgulanmaktadır. Doğal durumu korunan nehirlerde sülfat değerinin 3.20- 15.10 mg/L, bozulmuş sularda 3.8-35.5 mg/L arasında değiştiği bildirilmiştir [34]. Kirlenmiş sularda, sülfat değeri 100-200 mg/L arasında değişmektedir [3]. Ballıkaya Deresi ve Göleti'nde sülfat değeri 22,45 – 29,01 mg/L arasında belirlenmiştir. Literatüre göre bozulmuş su kategorisine girmektedir. Bu durumun, Kocaeli bölgesinde, yoğun sanayi alanı olan Dilovası bölgesinin, bu gölet ve dereye yakın olması ve hem endüstriyel hemde evsel atık baskısında olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Azot, canlıların yapısında ve besinlerinde bulunan temel bir elementtir. Sulardaki azotun ana kaynağı nitrattır. Ayrıca azot sularda çözülmüş azot, amonyum, nitrit ve organik azot şekillerinde de bulunmaktadır. Su kalitesi bakımından amonyum azotu, çözülmüş oksijenin ardında ikinci önemli parametreyi oluşturur. Evsel ve endüstriyel atık sular, akarsulardaki amonyum azotu miktarını arttırmaktadır. Oksijeni bol olan temiz sularda çok az miktarda amonyum bulunur. Su ortamlarının yakınındaki tarım arazilerinde organik ve inorganik azotlu gübreleme, evsel ve endüstriyel atık suların deşarjı sularda amonyum miktarını arttırmaktadır [35]. Ballıkaya Deresi ve Göleti'nde amonyum azotu miktarı 0,03 - 0,55 mg/L olarak belirlenmiştir Bu değerler, su kalitesi yönetmeliğine göre II. sınıf su kalitesine girmektedir. Doğada bulunan bazı mineraller, azotlu gübreler ile organik maddeler sucul ortamlarda nitrat ve nitritin kaynağını oluşturmaktadır. Sularda organik maddenin yüksek miktarda bulunması nitrit ve nitrat konsantrasyonunu artırırken, çözülmüş oksijen değerini düşürmektedir. Nitritin genellikle içme sularında bulunmaması istenmektedir. İncelenen yüzey sularında amonyum ve nitritin yüksek konsantrasyonlarda olması daha çok sulardaki organik kirlenmeyi gösterir. Ballıkaya Deresi ve Göleti'nde nitrit azotu miktarı 0,03 - 0,08 mg/L arasında belirlenmiştir. Bu değerler Su Kalitesi Yönetmeliğine göre II., III. ve IV. sınıf su kalitesi özelliklerini yansıtmaktadır. Bu durum, Ballıkaya sucul sistemlerinin, bir çok farklı çevresel etkiler altında olduğunu göstermektedir. Nitrat, yeraltı sularında doğal olarak bulunmakla birlikte, zirai faaliyet ve meteorolojik olaylar sonucu yüzey sularında da önemli artışlar göstermektedir. Temiz sularda, nitrat azotu miktarı çok düşüktür. Akarsularda nitrat azotu miktarı yağışlarla tarım yapılan arazilerde kullanılan nitratlı gübrelerin yıkanmasıyla artabilmektedir. Akarsularda, nitrat azotu miktarının 5 mg/L'den fazla olması çevrede yoğun evlerden veya tarımdan kaynaklanan etkinliklerin olduğunu göstermektedir [35]. Çalışmada, nitrat azotu değeri 0,28 – 7,45 mg/L olarak tespit edilmiştir. Bu değerlerin özellikle yaz dönemi yüksek tespit edilmesi, yoğun ziyaretçi sonucu oluşan evsel atık yüklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu değerler Su Kalitesi Yönetmeliğine göre II. sınıftır.

Ballıkaya sucul sisteminin su kalitesi, diyatome indekslerine göre de değerlendirilmiştir. Çalışmada, TDI 57,55; IPS 3,55; IDG 3,33 ve TIT değeri, 2,75 olarak belirlenmiştir. İndeks sonuçlarına göre, derenin organik kirliliğe maruz kaldığı belirlenmiştir. Ballıkaya Dere ve göletinin piknik alanı, doğa sporlarına açık bir alan olarak kullanılması ve sanayi bölgesine yakın olması, sucul sisteme karışan organik yükü arttırmaktadır.

Ballıkaya Deresi ve Göleti epilitik algleri üzerinde yapılan çalışmada, Bacillariophyta grubu'ndan 20 takson tespit edilmiş olup, Ülkemizde kıyı bölgesi araştırılan diğer akarsularda da Bacillariophyta divizyonu üyelerinin baskın olduğu belirtilmiştir [1,2,3]. Ballıkaya Deresi ve Göleti fitoplankton örneklerinde, diyatomelerden *Melosira*, *Navicula*, *Craticula* ve *Ulnaria* türleri yaygın olarak bulunmuştur. *C. pediculus*, *C. placentula* ve *U. ulna* taksonları gerçek planktonik tür olmamalarına rağmen planktonda tespit edilmiştir. *C. pediculus* kirliliğe hassas olmakla birlikte, *C. placentula* ve *U. ulna* kirliliğe toleranslı taksonlardır. Kıyı bölgesinde bulunan sedimanlar ve taşlar üzerinde bulunan alglerin dalga hareketleri ile kıyı bölgesinden fitoplanktona karışabileceği yapılan birçok çalışmada rapor edilmiştir [1,4,6,7]. Dere fitoplanktonunda diyatome dışı, Chlorophyta' dan *Scenedesmus dimorphus* (Turpin) Kütz., *Pseudopediastrum boryanum* (Turpin) E. Hegewald, *Micractinium pusillum* Fresenius, Euglenozoa'dan *Lepocinclis acus* (O.F. Müller) B. Maria & Melkonian, *Phacus pseudoswirenko* Prescott, *Trachelomonas abrupta* Swirenko, Cyanobacteria'dan *Kamptonema formosum* (Bory ex Gomont) Komarek & J. Smarda, Ochrophyta'dan *Dinobryon sertularia* ve Miozoa'dan *Peridinium* sp., özellikle yaz mevsiminde az sayıda tespit edilmiştir. Bununla birlikte, gölet suyunun durgun ve çok derin olmaması nedeniyle, gelişme ve büyüme imkanı bulan Chlorophyta, Cyanophyta, Euglenozoa, Ochrophyta ve Miozoa'ya ait türler belirlenmiştir. Özellikle, *Dinobryon sertularia* ve *Trachelomonas abrupta* türleri yaz örneklemede çok bol olarak tespit edilmiştir. *Dinobryon* türlerinin, yaygın olarak, oligomezotrofik ılıman göl ve göletlerde, *Trachelomonas* türlerinin de demir ve mangan açısından zengin habitatlarda, kozmopolit olarak yayılış gösterdiği bildirilmiştir [27,36]. Araştırmada belirlenen türlerin Ülkemiz, lotik ve lentik sularında da yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir [37, 38].

Sonuç olarak, Kocaeli Milli park alanında bulunan bu sucul sistemin, çevresel etkenlerden oldukça etkilendiği tespit edilmiştir. Bu amaçla, doğal su kaynağı olan bu alanın verimli ve sürdürülebilir olması için, kapsamlı çevre yönetim modelinin uygulanması gereklidir. Bu kapsamda, ilgili kurum ve kuruluşların iş birliği ve yerel halkın çevre konusunda bilinçlendirilmesi önem taşımaktadır.

**Kaynaklar**

- [1] Gönüloğlu, A. & Arslan, N. (1992). Samsun-İncesu Deresi'nin alg florası üzerinde araştırmalar. *Doğa-Tr J of Botany*. 16: 311-334.
- [2] Tokatlı, C. & Dayıoğlu, H. (2011). Use of Epilithic Diatoms to Evaluate Water Quality of Murat Stream (Sakarya River Basin, Kütahya): Different Saprobity Levels and pH Status. *Journal of Applied Biological Sciences*, 5 (2), 55-60. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/jabs/issue/34916/387262>
- [3] Gönüloğlu, A. (1985). Çubuk-1 Baraj Gölü algleri üzerinde araştırmalar 2- Kıyı bölgesi alglerinin kompozisyonu ve mevsimsel değişimi. *Doğa Bilim Dergisi A2*, 9(2), 253-268.
- [4] Çiçek, N.L (2018). Seasonal distribution of epilithic and planktonic algae in estuary zone of Aksu Stream (Isparta, Antalya/Turkey). *Biological Diversity and Conservation*. 11(2): 82-92.
- [5] Ongun Sevindik, T., Gönüloğlu, A., Önem, B., Tunca, H. & Arabacı, S. (2015). Thirty new records for Turkish freshwater algal flora from Danamandıra Ponds (Silivri, İstanbul) and North Mollaköy Lake (Sakarya). *Biological Diversity and Conservation*. 8 (2): 4-15.
- [6] Stevenson, R.J. & Pan, Y. (1999). Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. In: E.F. Stoermer and J.P. Smol (Eds.), *The Diatoms. Applications for the Environmental and Earth Sciences*, Cambridge, p: 11-40.
- [7] Round, F.E. (1993). A review and methods for the use of epilithic diatoms for detecting and monitoring changes in river water quality. HMSO, London.
- [8] Water Framework Directive (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities L 327*, 22.12.2000, 1-72.
- [9] Ács, É., Szabó, K., Tóth, B. & Kiss, K.T. (2004). Investigation of benthic algal communities, especially diatoms of some Hungarian Streams in connection with reference conditions of the water framework education directives. *Acta Botanica Hungarica*, 46(3-4): 255-277. <https://doi.org/10.1556/ABot.46.2004.3-4.1>
- [10] Ector, L. & Rimet, F. (2005). Using bioindicators to assess rivers in Europe: An Overview. In: *Modelling community structure in freshwater ecosystems* (Eds: S. Lek, M. Scardi, P.F.M. Verdonschot, J.P. Descy, & Y.S. Park): 7-19, Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- [11] Solak, C.N. & Ács, É. (2011). Water quality monitoring in European and Turkish Rivers using diatoms. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11:329-337. <https://doi.org/10.4194/trjfas.2011.0218>
- [12] Barlas, M., Mumcu, F., Dirican, S. & Solak, C. N. (2001). Sarıçay (Muğla-Milas)'da yaşayan epilithic diatomların su kalitesine bağlı olarak incelenmesi. *IV. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi Bildiri Kitabı*, s: 313-322.
- [13] Gürbüz, H. & Kıvrak, E. (2002). Use of epilithic diatom to evaluate water quality in the Karasu River of Turkey. *Journal of Environmental Biology*, 23(3): 239-246.
- [14] Solak, C.N., Barlas, M. & Pabuççu, K. (2007). Akçay'ın (Büyük Menderes-Muğla) Bacillariophyta dışındaki epilithic algleri. *Ekoloji*, 16, 62; 16-22.
- [15] Solak, C.N. (2011). The application of diatom indices in the upper Porsuk creek Kütahya Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11: 31-36. <https://doi.org/10.4194/trjfas.2011.0105>
- [16] Çelekli, A., Toudjani, A.A., Gümüş, Y., Kayhan, S., Lekesiz, H.Ö. & Çetin, T. (2019), Determination of trophic weight and indicator values of diatoms in Turkish runningwaters for water quality assessment, *Turk J Bot*.43: 90-101, <https://doi.org/10.3906/bot-1704-40>.
- [17] Çevre Durum Raporu. (2016). T.C. Kocaeli Valiliği, Çevre ve Şehircilik İl Müdürlüğü, 148s.
- [18] APHA, (1995). *Standart methods for the examination of water and wastewater*, 20th ed., 1268 p., Washington.
- [19] Sladeckova, A. (1962). Limnological investigation methods for the periphyton (Aufwuchs) Community, *Bot. Rev*; 28, 286-350.
- [20] Round, F. E. (1953). An investigation of two benthic algal communities in Malham Tarn, Yorkshire, *J. Ecol*. 41, 97-174.
- [21] Patrick, R. & Reimer, C.W. (1975). *The diatoms of The United States II*. Acad. Sci, Philadelphia, 213p.
- [22] Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. (1991a). Süßwasserflora von Mitteleuropa Bacillariophyceae 3. Teil: Centrales. Fragilariaceae, Eunotiaceae. Gustav Fischer. 576.

- [23] Krammer, K. & Lange-Bertalot H. (1991b). Süßwasserflora von mitteleuropa Bacillariophyceae 4. Teil: Achnanthaceae, Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema Gesamtliteraturverzeichnis Teil 1-4. Gustav Fischer. 437.
- [24] Krammer, K. & Lange-Bertalot H. (1999a). Bacillariophyceae, 1. Teil. Naviculaceae. In Süßwasser ora von Mitteleuropa. Hiedelberg-Berlin. DE: Spectrum Akademischer Verlag.
- [25] Krammer, K. & Lange-Bertalot H. (1999b). Bacillariophyceae, 2. Teil. Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. In Süßwasser ora von Mitteleuropa. Hiedelberg-Berlin. DE: Spectrum Akademischer Verlag.
- [26] John, D.M., Whitton, B.A. & Brook, A. (2003). The Freshwater Algal Flora of The British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae, Cambridge University Press, pp: 702., Cambridge.
- [27] Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2019). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 16 September 2019.
- [28] Toudjani, A.A., Çelekli, A., Gümüş, E.Y., Kayhan, S., Lekesiz, Ö. & Çetin, T. (2017). A new diatom index to assess ecological quality of running waters: A case study of water bodies in western Anatolia. *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* 53, 333–343 DOI: 10.1051/limn/2017012.
- [29] Lecointe, M. & Coste M. (2017). "Omnidia": software. [www.omnidia.fr](http://www.omnidia.fr), France.
- [30] Çetin, T. & Demir, N. (2019). The use of phytobenthos for the ecological status assesment in Upper Sakarya Basin, Turkey, *Applied Ecology And Environmental Research* 17(4):10155-10172.
- [31] Tanyolaç, J. (2000). *Limnoloji (Tatlısu Bilimi)*. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara
- [32] Yüzeysel Su Kalitesi Yönetimi Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. (2015). Resmi Gazete, 15 Nisan 2015, Sayı: 29327.
- [33] Round, F. E. (1984). *The Ecology of Algae*, Cambridge University Press, 653 p., Cambridge.
- [34] Allan, J. D. (1996). *Stream Ecology*. Chapman and Hall, London.
- [35] Egemen, Ö. (2006). Su kalitesi. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yayın no:14, 6. baskı, s: 150, Bornova-İzmir.
- [36] Watson, S.B., Whitton, B.A., Higgins, S.N.; Paerl, H. W., Brooks, B. W. & Wehr, J. D. (2015). "Harmful Algal Blooms". *Freshwater Algae of North America*. pp. 873–920. doi:10.1016/b978-0-12-385876-4.00020-7.
- [37] Gönüloğlu, A., Öztürk, M. & Öztürk, M. (1996) Türkiye tatlısu alglerinin listesi, *Ondokuz Mayıs Üniv., Fen-Edeb. Fen., Fen Dergisi*, 7(1): 46s.
- [38] Aysel V. (2005). Check-list of the freshwater algae of Turkey. *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, 11(1):1-124.



## A new record from the mediterranean temporary wetland habitats, for Flora of Turkey: *Crassula vaillantii*

Duygu BOZYEL<sup>1</sup>, Nazlı Bahar PELİT<sup>1</sup>, Serdar Gökhan ŞENOL<sup>\*1</sup>  
ORCID: 0000-0002-0056-1217; 0000-0002-0320-3247; 0000-0003-4564-2608

<sup>1</sup> Ege University Botanical Garden & Herbarium Research and Application Center 35100 Bornova-İzmir, Türkiye

### Abstract

Mediterranean temporary ponds are priority habitat in Mediterranean basin. This habitat described mostly small and shallow wetlands including annual amphibian plants and unique fauna elements, where seasonal water cycle occurs. In this study, one of the rare but typical species of Mediterranean temporary pool ecosystem, *Crassula vaillantii* (Willdenow) Roth (Damkoruğugiller/ Crassulaceae J.St.-Hil.) has been given as a new species record for Turkey. In the article, description of the species, detailed photographs and distribution are given.

**Key words:** *Crassula*, *Crassulaceae*, new record, flora, Turkey

----- \* -----

## Akdeniz geçici sulak alan habitatlarından, Türkiye Florası için yeni bir tür kaydı: *Crassula vaillantii*

### Özet

Akdeniz geçici sulak alanları, Akdeniz havzası içerisinde korunması öncelikli habitatlar arasında yer almaktadır. Bu habitat, çoğunlukla tek yıllık amfibi bitkiler ile, kendine özgü fauna elemanlarına sahip, mevsimsel su döngüsünün yaşandığı, küçük ve sığ sulak alanlardır. Bu çalışmada da Akdeniz geçici sulak alanlarına özgü nadir türlerden olan *Crassula vaillantii*. (Willdenow) Roth (Damkoruğugiller/ Crassulaceae J.St.-Hil.) türü Türkiye için yeni bir tür kaydı olarak verilmektedir. Makalede türün betimi, ayrıntılı fotoğrafları ve dağılımı verilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Crassula*, *Crassulaceae*, yeni kayıt, flora, Türkiye

### 1. Giriş

Günümüzde Akdeniz havzası küresel ölçekte biyoçeşitliliğe önemli katkılar sunmaktadır (Blondel & Amanson, 1999). Yaklaşık 30 bin bitki türü (Medail ve Quezel, 1997) ile temsil edilen bu havza önemli makro-ekosistemlerin yanı sıra bu ekosistemler kadar dikkat çekmeyen ancak bölgesel ve küresel çeşitliliğe önemli katkıları olan ‘geçici sulak alanlar’ gibi mikro-ekosistemleri de içinde barındırır (Oertli et al.,2002; Williams et al, 2004). Geçici sulak alanlar, çoğunlukla tek yıllık amfibi bitkiler ile karakterize edilen küçük ve sığ sulak alanlardır (Pinto- Cruz et al.,2009). Akdeniz biyoiklim bölgesinin en ilginç habitatlarından kabul edilen bu habitat tipi birçok nadir ve izole takson barındırmaktadır (Braun-Blanquet, 1935; Médail at al, 1998; Médail, 2004; Grillas et al,2004). Birçok ülkede önemli tehlike kategorilerinde yer alan eğrelti türlerinden olan *Pilularia minuta* Durieu. ve bazı *Isoetes* spp. ile *Crassula vaillanti* Roth gibi türler ile karakterize olan bu habitat Natura 2000 Habitat 92/43/AET Direktifi Ek I'e dahil edilmiş, korunması öncelikli habitat tipleri arasında değerlendirilmiştir (Avrupa Komisyonu, 2007). Bu çalışma 2019 yılında Çeşme Yarımadası'na yapılan arazi çalışmaları esnasında, Türkiye için yeni kayıt olarak belirlediğimiz, Akdeniz geçici sulak alanlarına özgü nadir bir tür olan, *Crassula vaillantii* üzerine odaklanmaktadır. Türün ülkemize en yakın yayılım alanı Ege Adaları olarak bildirilmektedir (Flora of Greece web, 2019).

Bu türün bağlı bulunduğu Damkoruğugiller /Crassulaceae J.St.-Hil. familyası üyeleri 35 cins ve 1400'ün üzerinde türle temsil edilir ve geniş bir yayılım alanına sahiptir (Heywood vd, 2017). Güney Afrika, Madagaskar,

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902323884000; Fax.: +902323739049; E-mail: sgsenol@yahoo.com

Himalayalar, Meksika ve Akdeniz Bölgesi familya üyeleri için endemizm merkezi olarak bilinirken nemli tropik bölgeler ile Avustralya (Toelken, 1986) ve Güney Amerika (Thiede, 1995 ) ise tür sayısı bakımından daha fakirdir (Thiede ve Eggl, 2007; Heywood vd, 2007; Ham R.C.H.J., Hart 1998).

Ailenin bazı üyelerinin tıbbi bitkiler olarak kullanılmalarının olduğu bilinmektedir. Ayrıca dünyanın birçok yerinde gıda maddesi, iç ve dış mekan süs bitkileri olarak kullanımları oldukça popülerdir (Plants for a future, 2008; Arnold vd,2002)

Damkoruğugiller familyası çok yıllık otsu, çalı ya da ağaçsı formda olabilen, habitat olarak çoğunlukla sıcak bölgeleri, kurak ya da kayalık alanları tercih eden türlerden oluşur. Ancak familya içerisinde sulak alanlar ile soğuk koşullara uyum sağlamış, *Crassula* cinsi üyelerinin yer alması ise dikkat çekicidir (Heywood vd.2007).

Çoğu cins, tek bir kıtada yayılışa sahipken *Sedum*, *Kalanchoe*, *Rhodiola*, *Hylotelephium* ve yarı-sucul *Crassula* cinsleri kuşlar sayesinde kozmopolit bir yayılışa sahiptirler (Thiede, 1995). *Crassula* cinsi üyeleri Güney Afrika, Madagaskar, Kuzey Amerika, Hindistan ve Avrupa’ da bulunan 300’ün üzerinde türe sahip sub-kozmpolit bir cinstir (Smith ve Estrela 2013). Türkiye’de ise bu cins *Crassula tillaea* Lest.-Garl. adlı tek takson ile temsil edilmektedir. Cinsin Türkiye için ikinci türü olan *Crassula vaillantii* (Willd.) Roth, 1827, ilk kez bu makalede Çeşme (İzmir)’den verilmiştir.

## 2. Materyal ve yöntem

Bu çalışmanın materyalini 2019 yılında Çeşme-Gölobası geçici sulak alanlarında yapılan arazi çalışması esnasında toplanan, *Crassula vaillantii*’ye ait örnekler oluşturmaktadır. Toplanan örnekler Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Davis, 1965-1988; Güner vd., 2000) ve Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler) (Güner vd., 2012) kaynaklarına göre teşhis edilmeye çalışılmış, örneğin aile düzeyinde Crassulaceae ailesine, cins düzeyinde ise *Crassula* cinsi altında yer aldığı belirlenmiştir. Ancak Türkiye’de cinsin tek tür ile temsil edilmesi ve toplanan türün bu türden farklı olduğu ve şimdiye kadar hiçbir kaydının verilmediği belirlenmiştir. Daha sonra komşu ülke floralardaki cinsine ait türler incelenmiş ve Avrupa florası kullanılarak toplanan türün *Crassula vaillantii* (Willd.) Roth, olduğu tespit edilmiştir. Arazi çalışmaları esnasında toplanan örneklerin ayrıntılı fotoğrafları çekilmiş ve Ege Üniversitesi Herbaryumu (EGE) koleksiyonuna dahil edilmiştir. Örnekler laboratuvarında Stereo mikroskop altında incelenmiş ve türün betimi için 10 birey üzerinden ölçümler alınmıştır.

## 3. Bulgular

*Crassula vaillantii* (Willd.) Roth, *Enum.* 1: 992 (1827). *Syn. Bulliarda pedunculata* St.-Lag., *B. rosea* Bubani, *B. vaillantii* (Willd.) DC., *B. vaillantii* var. *subulata* Harv., *Hydrophila vaillantii* (Willd.) House, *Tillaea vaillantii* Willd. *Tillaeastrum vaillantii* (Willd.) Britton (IPNI,2019).

**Türkçe İsmi / Turkish Name:** “*Su Kırasulası*” (Türkiye florası için yeni kayıt olması ve yerel bir ismi olmaması sebebi ile türün Türkçe karşılığı olarak bulunduğuna habitatı atfen ‘Su Kırasulası’ ismi önerilmiştir).

**İncelenen materyaller /Examined materials:** - **Holotype:** *Crassula vaillantii* (Willd.) Roth, S. Africa W. Cape Bei Reitkuil, oberhalb Buffeljadrivier, Zeyher, *Bulliarda vaillantii* var. *subulata* Harv. ( Naturhistoriska Riksmuseet- 634a!). - *Crassula vaillantii* (Willd.) Roth, S. Africa, E. Cape, "Valleyen" dicta in campestribus ad flumen "Zwartkopsrivier" (Uitenhage), [Ecklon&Zeyher], (Naturhistoriska Riksmuseet-1848!). - *Crassula vaillantii* (Willd.) Roth S. Africa, E. Cape Plantae capenses Africa australis, Distr. Uitenhage, im stehenden Wasser am Zwartkopsrivier, 1:e Höhe Ecklon & Zeyher, ( Naturhistoriska Riksmuseet). - İzmir: Çeşme Gölobası mevki, dönemsel sulak alanlar, 38°16'10.95"K, 26°25'57.05"D; 100m., 23.03.2019, leg. Duygu Bozyel, Bahar Pelit, Orsa Yüzbaş, (EGE43223!), (Şekil 2)

**Betim:** Tek yıllık, tüysüz, otsu sukkulentler, yatık-yükselici. Gövde 2-4 cm boyunda. Yapraklar 1-5 mm x 0.6-1.5 mm, linear-oblong, uçta obtus. Çiçek elemanları 4'lü, çiçek durumu düzensiz kimo, çiçekler yaprak koltuklarında 1-2 adet, çiçeksapları yapraklardan uzun 2-7 mm. Sepaller 0.6-1 mm x 0.7-1 mm, sinsepal, uçta üçgenimsi ya da obtus, yeşil, etli. Petaller 0.6-2 mm x 0.6-1 mm, ovat-lanseolat uçta akut, zarımsı, dipte beyaz uçlara doğru pembe. Petaller sepallerden uzun. Anther çapı 0.14 mm, stamen boyu 1 mm. Dişi organ, ayrı karpelli, folikül 4, her folikül 8-12 adet sarımsı tohum içerir (Şekil 1).

**Description:** Annual, glabrous, succulent, ascending to erect. Stems 2-4 cm. Flowers 1-5 mm x 0.6-1.5 mm, linear-oblong, obtuse. Flowers 1-2 in the leaf axils, 4-merous, inflorescence irregular cymes, pedicels longer than the leaves, 2-7 mm. Sepals 1-0.6 mm x 1-0.7 mm, sinsepal, ends triangular or obtuse, green, succulent. Petals, 2-0.6 mm x 1-0.6 mm, ovate-lanceolate ends acute, membranous, white at the bottom and purple-pink towards the ends. Petals longer than the sepals. Anther diameter 0.14 mm, Stamen length 1mm. Includes 4 follicles, Follicles with 8-10 seeds. Seeds are rectangular and yellowish.

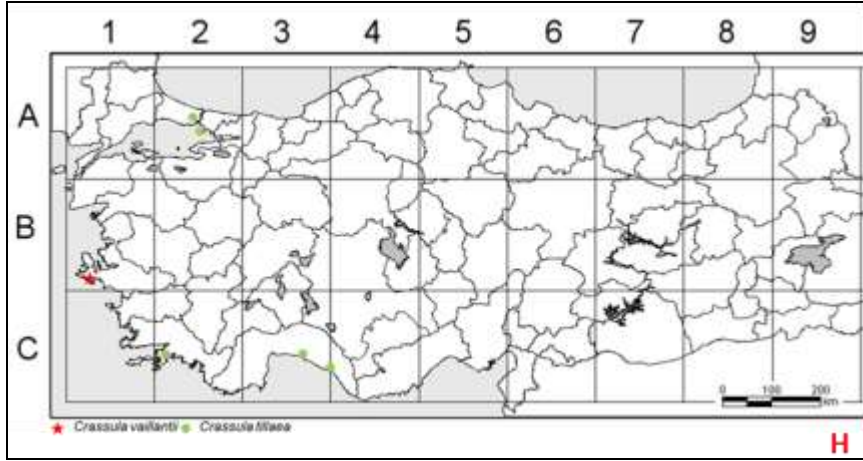
**Habitat:** Akdeniz geçici sulak alanları, frigana, maki içi nemli çayırar.

**Crassula cinsine ait tür teşhis anahtarı:**

1. Petaller sepallerden küçük; foliküller iki tohumlu; yapraklar ovat, subakut; çiçekler sessiz  
**tillaea**
1. Petaller sepallerden uzun; foliküller genellikle ikiden fazla tohumlu, yapraklar obtus; çiçekler kimoz  
**Vaillantii**







Şekil 1. A. Habitat genel görünüşü, B-C-E. Bitkinin genel görünüşü, D-F. Çiçek, G. Tohum, H. Dağılım haritası



Şekil 2. Herbarium örneği EGE43223.

#### 4. Sonuçlar ve tartışma

Ilıman iklim kuşağında yer alan Türkiye, farklı iklim, topografya ve jeolojik özellikleri barındırması nedeniyle biyoçeşitlilik açısından oldukça zengin bir ülke konumundadır. Ayrıca her geçen gün, yeni taksonlar ülke florasına kazandırılmaktadır (Başköse ve Yaprak, 2016; Hamzaoğlu ve Koç, 2018). Çalışma ile Türkiye’de varlığı belirlenen *C. vailantii* türünün yayılış alanına baktığımızda ülkemizin batısında Ege Adaları’nın tamamında yayılışı sahip olduğu görülmektedir (Flora of Greece Web). Türün tercih ettiği habitat ve habitat içerisindeki eşlikçi türler (*Pilularia minuta*, *Isoetes* spp.) değerlendirildiğinde Adalardaki habitatlarla aynı tip habitatlara ülkemiz batı ucunda da rastlanması bir bakıma kaçınılmaz olacaktır. Ancak ülkemizde daha önce bu habitat üzerinde floristik çalışma yapılmamış olması, ayrıca yılın belli dönemlerinde su ile dolup boşalan bu habitatlarda vejetasyon döneminin sadece 2-3 ay sürmesi ve habitatların küçük ve sığ olmaları nedeniyle gözden kaçmasının kolay olması, bu alanlara özgü *Crassula vailantii* gibi birçok amfibik bitki taksonunun daha önce keşfedilememesine neden olmuş olabilir.

Türün fitososyolojik açıdan eşlikçileri değerlendirildiğinde, ülkemiz için 16 yıldır kayıp tür olarak bilinen ve Şenol ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışma ile yeniden keşfedilen, birçok ülkede CR kategorisinde yer alan relik bir sucul eğrelti taksonu olan *Pilularia minuta* ile aynı habitatı paylaştıkları tarafımızca belirlenmiştir. Daoud-Bouattour ve

arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada da *C. vaillantii* ve *P.minuta* türlerinin steno-Akdeniz endemiği ve Akdeniz geçici havuzlarının en sembolik türleri olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışma ile belirlenen *C. vaillantii* türü Türkiye için yeni bir tür kaydı olup, bu tür ile ülkemiz *Crassula* cinsinin tür sayısı ikiye yükselmiştir..

### Teşekkür

Yapılan arazi çalışmasında türün toplanması ve fotoğraflanmasında destek olan Biyolog Orsa Yüzbaş'a teşekkür ederiz.

### Kaynaklar

- [1] Arnold, T.H., Prentice, C.A., Hawker, L.C., Snyman, E.E., Tomalin, M., Crouch, N.R., & Pottas-Bircher, C. (2002). Medicinal and magical plants of southern Africa: an annotated checklist. *Strelitzia 13. National Botanical Institute*, Pretoria: 302 pp.
- [2] Başköse, İ., Yaprak, A.E.(2016). A new record from *Atriplex* L. (Amaranthaceae) genus for the flora of Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 9/1 (2016) 49-54
- [3] Blondel, J., & Aronson, J. (1999). *Biology and Wildlife of the Mediterranean Region*, Oxford University Press, New York.
- [4] Braun-Blanquet, J. (1935). Un joyau floristique et phytosociologique“L’*Isoetion*” mediterraneen. *Bulletin Societe Etude Sciences Natureles Nimes*, 47: 1-23p.
- [5] Daoud-Bouattour, A., Muller, S.D., Ferchichi-Ben Jamaa, H., Ghrabi-Gammar, Z.,Rhazi, L., Gammar, A.M., Karray, M.R., Soulié-Märsche, I., Zouaïdia, H., de Bélaïr,G., Grillas, P., & Ben Saad-Limam, S. (2009). Recent discovery of the small pill-wort (*Pilularia minuta* Durieu, Marsileaceae) in Tunisia: hope for an endangered emblematic species of Mediterranean temporary pools?, *C. R. Biol.*, 332: 886–897p.
- [6] Davis, P.H. (1965- 1988). *Flora of Turkey East Egean Islands*, 1-10, Edinburgh Uni. Press, UK.
- [7] *Flora of Greece Web* (2013). <http://portal.cybertaxonomy.org/flora-greece/content>. Erişim Tarihi: 27.09.2019.
- [8] Grillas, P., Gauthier, P., Yaverkovski, N., & Perennou, C. (2004). *Mediterranean temporary pools: (1) issues relating to conservation, functioning and management*. Arles: Tour du Valat, Le Sambuc.
- [9] Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M.T., (edlr.) (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. Nezahat Gökyigit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul.
- [10] Güner, A., N. Özhatay, T. Ekim., & Baser, K. H. C. (edlr.) (2000). *Flora of Turkey and East Aegean Islands 11*. Edinburgh Univ. Press, Edinburgh.
- [11] Ham, R.C.H.J. van, Hart, H.'t. (1998). Phylogenetic relationships in the Crassulaceae inferred from chloroplast DNA restriction-site variation. *Amer. J. Bot.* 85:123– 134.
- [12] Hamzaoglu, E., Koç, M.(2018). *Dianthus sancarii* (Caryophyllaceae), a new species from eastern Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 11/1 (2018) 30-34.
- [13] Heywood, V.H., Brummit, R.K., Culham, A., & Seberg, O. (2007). *Flowering plant families of the world*. *Royal Botanic Gardens*, Kew: 424 pp.
- [14] *Intenational Plant Name Index (IPNI)* (2008). <https://www.ipni.org>. Erişim tarihi:26.09.2019.
- [15] Médail F. (2004). Biodiversity and conservation issues, *Plant Species*,In *Mediterranean Temporary Pools. Station Biologique de la Tour du Valat* (Vol. 1), Arles, edited by P. Grillas, P. Gauthier, N. Yaverkovski and C. Perennou, 1:18-24p.
- [16] Médail, F., & Quezel, P. (1997). Hot-Spots Analysis for Conservation of Plant Biodiversity in the Mediterranean Basin, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 84, No. 1 (1997), pp. 112-127
- [17] Médail, F., Michaud, H., Molina, J., Paradis, G., & Loisel, R. (1998). Conservation de la flore et de la végétation des mares temporaires dulc aquicoles et oligotrophes de France Méditerranéenne, *Ecologia Mediterranea*, 24(2):119–134p.
- [18] Oertli B., D. Auderset Joye, E. Castella, R. Juge, D. Cambin., & J. B. Lachavanne. (2002).Does size matter? The relationship between pond area and biodiversity. *Biological Conservation* 104: 59–70.
- [19] Pinto-Cruz, C., Molina, J.A., Barbour, M., Silva, V., & Espirito-Santo, M.D. (2009). Plant communities as a tool in temporary ponds conservation in SW Portugal, *Hydrobiologia*, 634: 11–24p.
- [20] *Plants for a Future*. (2008). <http://www.pfaf.org/database>. Accessed September 2019. Erişim tarihi:26.09.2019
- [21] Rhazi, L., Grillas, P., Saber, E., Rhazi, M., Brendonck, L., & Waterkeyn, A. (2012). Vegetation of Mediterranean temporary pools: a fading jewel?, *Hydrobiologia*, 689: 23–36p.

- [22] Senol, S.E., Ogur, E., Bozyel, D., Pelit, B., & Arslan G.E. (2016). *Morphological, Anatomical, Ecological Features of Pilularia minuta and its Distribution in Turkey*. Symposium on EuroAsian Biodiversity. Antalya Turkey, Book of Abstracts: 432. doi:10.13140/RG.2.2.26015.36003.
- [23] Smith G.F., & Figueredo E. (2013). The family Crassulaceae in continental Portugal, *Bradleya*, pages 76-88.
- [24] Thiede, J. & Egli, U. (2007). Crassulaceae. In: Kubitzki, k. (ED.) *The families and genera of vascular plants*, vol. 9, Flowering Plants, Eudicots: 83–118. Springer Verlag, Berlin.
- [25] Thiede, J. (1995). Quantitative phytogeography, species richness, and evolution of American Crassulaceae. In: 't Hart, H. Egli, U. (eds) *Evolution and systematics of the Crassulaceae*. Leiden: Backhuys, pp. 89–123.
- [26] Toelken, H.R. (1986). Crassulaceae. In: Jessop, J.P., Toelken, H.R. (eds) *Flora of South Australia*. Part I. Adelaide: Government Printing Office, pp. 418–428.
- [27] Williams, P., Whitfield, M. J., Biggs, S., Bray, G., Fox, P., & Nicolet, D. (2004). Comparative biodiversity of rivers, streams, ditches and ponds in an agricultural landscape in Southern England, *Biological Conservation*, 115: 329–341p.



## Morphological, anatomical, palynological, and micromorphological study on *Diplotaxis tenuifolia* (Brassicaceae)

Barış YILDIRIM<sup>1</sup>, Hüseyin DURAL<sup>1</sup>, Burcu YILMAZ ÇİTAK<sup>\*1</sup>  
ORCID: 0000-0000-0000-0000; 0000-0000-0000-0000; 0000-0000-0000-0000

<sup>1</sup> Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 42130, Konya, Türkiye

### Abstract

The present study deals with the morphological, anatomical, and palynological properties of *Diplotaxis tenuifolia*. The stem cross-sections had a single-layered epidermis, parenchymatous cortex, vascular bundles, and parenchymatic pith cells. An equifacial mesophyll type was observed in the leaves with multiple-layered palisade tissue, but the spongy parenchyma was reduced. Vascular bundles were small except for the midrib. The cross-sections of the fruit had a single exocarp, 3- or 4-layered mesocarp, and single-layered endocarp. Transverse sections of the seed showed the presence of layers of epidermis, parenchyma, and endosperm.

**Key words:** anatomy, Brassicaceae, *Diplotaxis*, palynology, micromorphology

----- \* -----

### *Diplotaxis tenuifolia* (Brassicaceae) üzerine morfolojik, anatomik, palinolojik ve mikromorfolojik bir araştırma

### Özet

Bu çalışmada *Diplotaxis tenuifolia* türünün morfolojik, anatomik, palinolojik ve mikromorfolojik özellikleri ele alınmaktadır. Gövde enine kesitleri, tek tabakalı epidermis, parankimatik korteks, iletim demetleri ve öz hücrelerini içermektedir. Yapraklarda, çok tabakalı palizat parankimalı ekvifasiyal tip mezofil gözlemlenmiş, fakat sünger parankiması indirgenmiştir. İletim demetleri orta damar hariç küçüktür. Meyve enine kesitleri tek bir ekzokarp, 3 ya da 4 tabakalı mezokarp ve tek tabakalı endokarpa sahiptir. Tohum enine kesitleri, epidermis, parankima ve endosperm tabakalarının varlığını göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** anatomi, Brassicaceae, *Diplotaxis*, palinoloji, mikromorfoloji

### 1. Introduction

Brassicaceae comprises c. 338 genera and c. 3700 species [1], including *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., which has been used as the flowering plant model system [2]. In Turkey, Brassicaceae is represented by c. 571 species, with 65 subspecies, 24 varieties, and c. 660 taxa belonging to 91 genera [3, 4]. When the list of Turkish plants was published, this number was updated by 91 genera and 686 species [5]. The genus, *Diplotaxis* DC. (Brassicaceae, tribe Brassiceae), currently comprises 32 species or 34 [1], plus several additional infraspecific taxa, native to Europe, the Mediterranean Basin, SW Asia (up to the Himalayas), and Macaronesia. The genus *Diplotaxis* is represented by five taxa in Turkey [6, 7].

Turkish *Diplotaxis* species have been the subject of different research areas, such as allergy, germination, and agricultural studies [8, 9]. The vegetative and generative organs and anatomical traits of the genus *Diplotaxis* are not well known [10]. In this study, *D. tenuifolia* was evaluated using its anatomical characteristics, vegetative organs, fruit, and seeds, and palynomorphological characteristics.

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903322232738; Fax.: +903322232738; E-mail: burcuyilmaz@selcuk.edu.tr

## 2. Materials and methods

The plant materials were collected from the Campüs area of Selçuk University and surroundings in Konya Province. The collected materials (B.Çıtak-283-H.Dural) were identified according to the classification of Hedge (1965) and the observations herein. Some of the plant materials were transferred to 70% ethyl alcohol during the field excursion. All of the plant specimens were stored in the KNYA herbarium and the Plant Anatomy Laboratory in the Biology Department.

### 2.1. Methods

#### 2.1.1. Anatomical analysis

Parts of the roots, stems, leaves, petals, fruit, and seeds were cut into small pieces and then the paraffin method was applied, in which they were dehydrated and embedded with paraffin [11]. Paraffin blocks were constructed and the sections were prepared and stained with safranin-fast green. At least, five sections were investigated which were taken from five individuals of species. The best sections were chosen and photographed using a Leica DM 1000 light microscope (Wetzlar, Germany).

#### 2.1.2. Palynological analysis

The methods of both Wodehouse (1935) and Erdtman (1960) were used to investigate the pollen grains [12, 13]. An average of 50 pollen grains were examined and evaluated. The polar and equatorial axes, colpus length and width, apocolpium, exine and intine thickness, and muri width were measured. The pollen grains were directly placed on aluminum stabs and photographed using a Zeiss Jeol Evo LS 10 scanning electron microscope (SEM) (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Germany). The pollen terminology of Punt et al. (2007) was followed [14].

#### 2.1.3. Micromorphological analysis

In the micromorphological investigations, the mature fruit and seeds were selected under a stereomicroscope and stored in paper bag. At least 30 samples of the fruit and seeds were measured with regards to several characteristics, such as the fruit length and width, and seed width and length. Then, the fruit and seeds were transferred to the aluminum stab, covered with gold, and micro photographed using a Zeiss Jeol Evo LS 10 SEM.

## 3. Results

### 3.1. Macro-morphological Results

Perennial, semi-shrubs and herbs up to 120 cm, glabrous or with a few scattered hairs, with a more or less woody base or much branched. Lower leaves linear-oblong or spatulate, entire, coarsely lobed or pinnatifid, up to 10 cm long, petiolate. Upper leaves entire or with linear lobes. Petals lemon-yellow, 2 times longer than sepals, c.  $1.5 \times 1$  mm, broadly obovate. Fruiting pedicels 20–32 mm, erect-spreading. Stamens 10–11 mm, anthers 4 mm. Fruit straight, 20–45  $\times$  1.5–2 mm including a short beak 1–2.5 mm; stipe 1–2 mm; stigma capitate, broader than beak. Seeds smooth, pale brown, numerous. Fl. 3–5. Roadsides and rocky slopes, 100 m a.s.l (Figure 1).



Figure 1. A. The general view of *Diplotaxis tenuifolia* in nature habitat. B. Flowers in close view

### 3.2. Micro-morphological Results

#### 3.2.1. Fruit micromorphology

The fruit were silique,  $30\text{--}40 \times 1.5\text{--}2$  mm, slender, striate in ornamentation. Ovoid at base, carpels were not separated, narrowed and acute in the apex (Figs. 2–3).



Figure 2. The general view of fruits of *Diplotaxis tenuifolia* (LM)

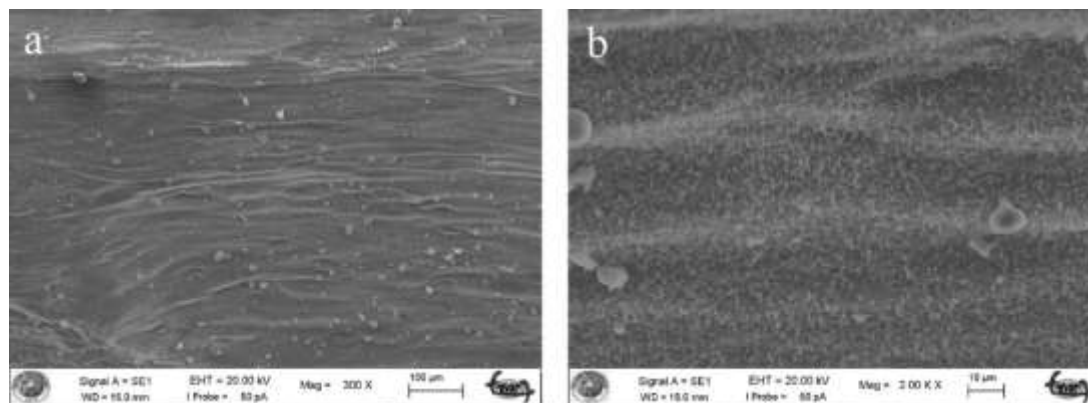


Figure 3. a-b. The ornamentation of fruits of *Diplotaxis tenuifolia* (SEM)

#### 3.2.2. Seed micromorphology

The seeds of *D. tenuifolia* were subglobose, dark-brown and shiny,  $1.21 \times 0.82$  mm, the ratio length-width was 1.47, seed outline was oblong, chalazal pole was roundate, micropylar pole was acute, seed surface type was reticulate, concave, shape of epidermis was tetragonal, seed surface striate, suture was flat,  $23.47\text{--}39.47 \times 15.56\text{--}26.97$  µm (Figure 4).

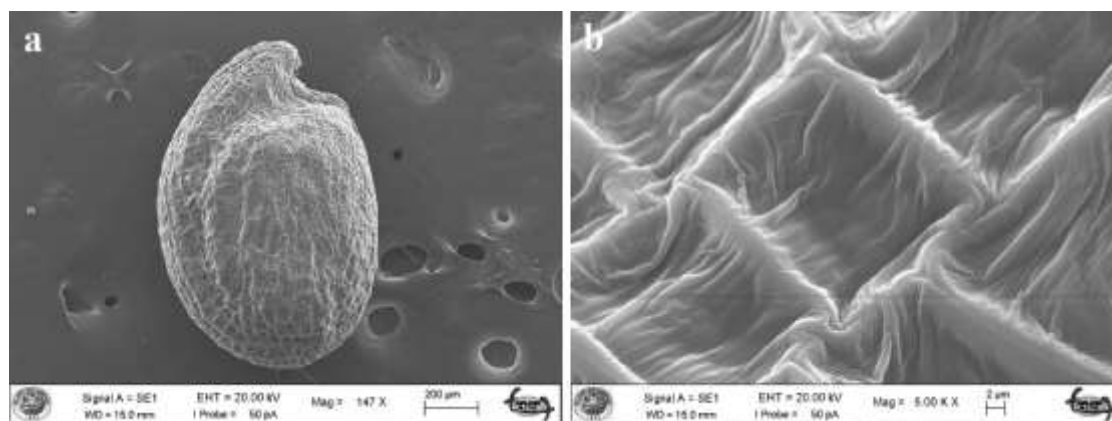


Figure 4. a. General view of the seeds of *D. tenuifolia* (SEM) b. Ornamentation

### 3.3. Anatomical Results

#### 3.3.1. Root anatomy

The peridermis, which was characterized as many layered, partly broken, with phellem cells, was the outermost layer of the roots in *D. tenuifolia* (Figure 5-a). Cortex cells were parenchymatic, their shape was defined as rectangular-oval, and they contained starch grains (Figure 5-b). The vascular tissue, composed of phloem and xylem elements, was well-developed. Trachea cells were measured with a mean value of  $47.16$  µm. The center of the roots contained only sclerenchyma cells (Figure 5-b).

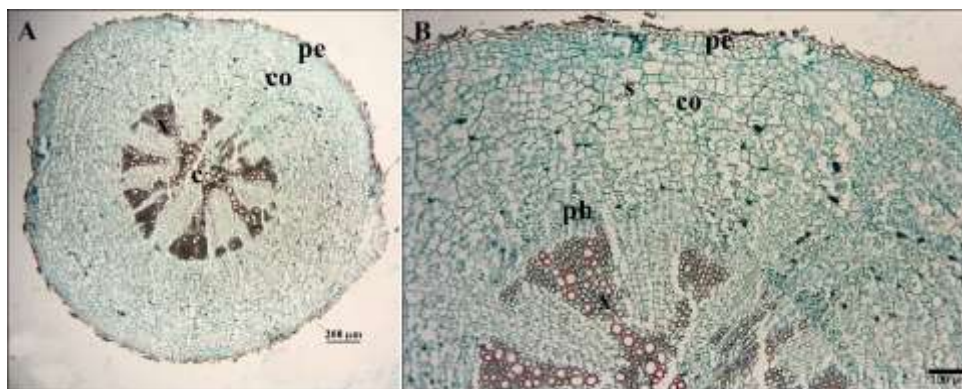


Figure 5. The root cross sections of *D. tenuifolia*. A. General view of roots pe: peridermis, co: cortex, x: xylem, c: center of root. B. the close view of roots s: starch grains, ph: phloem.

### 3.3.2. Herbaceous stem anatomy

The single epidermis layer of the outermost surface of the stem was limited (Figure 6-a,b). The cortex, which was characterized by parenchymatous cells, was oval-shaped with chloroplasts. Sclerenchyma was covered in a small area in the stem. Phloem and xylem were well-developed. The pith was composed of oval-shaped parenchymatous cells (Figure 6-a).

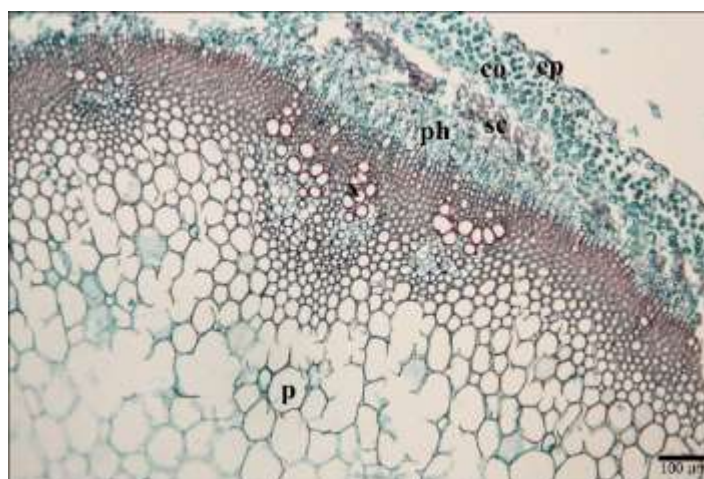


Figure 6. The cross section of herbaceous stem of *D. tenuifolia*. ep: epidermis, co: cortex parenchyma, sc: sclerenchyma, ph: phloem, x: xylem, p: parenchyma cell.

### 3.3.3. Leaf anatomy

The cross-sections of the leaves were clearly composed of 3 main anatomical parts, comprising the epidermis, mesophyll, and vascular tissue (Figure 7). A single-layer epidermis covered the leaf on both surfaces. Stomata occurred on both the upper and lower epidermis. Mesophyll tissue was composed of 2 types of cells, comprising palisade and sponge parenchyma. Central vascular bundle was larger and collateral in type (Figure 7).

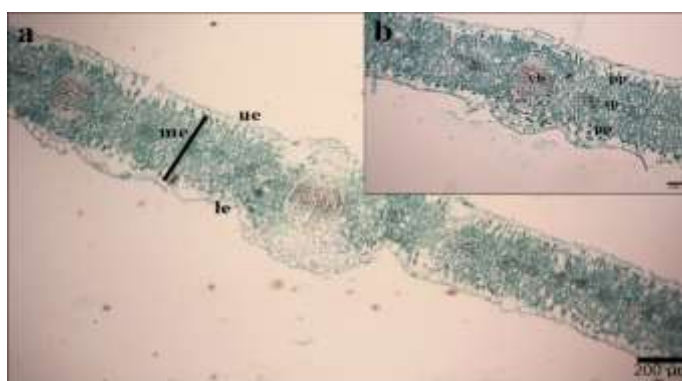


Figure 7. The cross sections of leaves of *D. tenuifolia*. a. General view and midrib of leaf ue: upper epidermis, le: lower epidermis, me: mesophyll. b. Close view of lamina pp: palisade parenchyma, sp: spongy parenchyma, vb: vascular bundle

### 3.3.4. Fruit and seed anatomy

The transverse sections of the fruit were oval-shaped and the pericarp was composed of a lined exocarp, 3 or 4 rows of mesocarp, and a single-layered endocarp. There are septum and replum in cross sections (Figure 8a). The vascular bundle was located in the endocarp layer.

The cross-sections of the seed were used to examine the integuments, endosperm, and embryo. The seed cross-sections showed that there was a single-layered epidermis. Single-layered parenchyma was under the epidermis. The endosperm layer was composed of rectangular–oval-shaped cells.

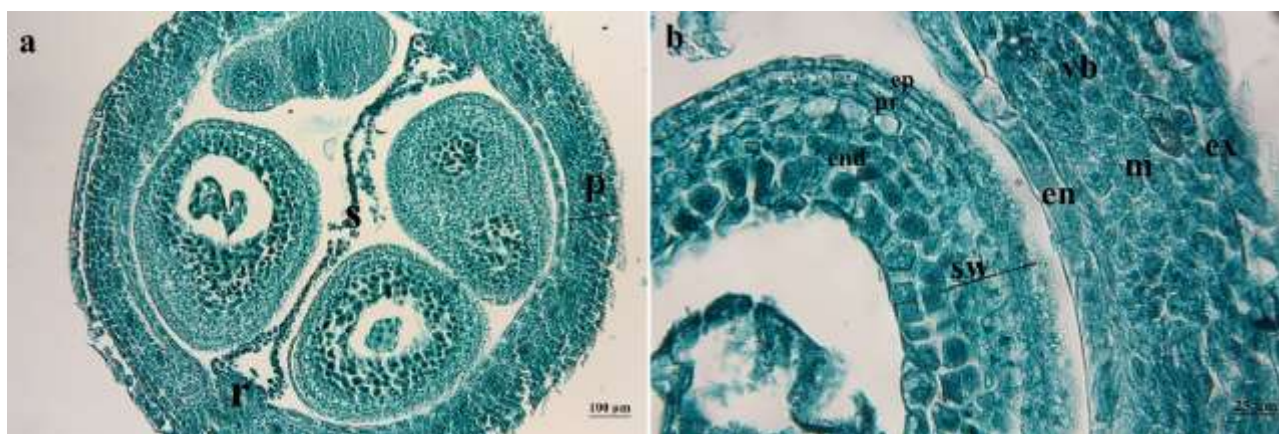


Figure 8. The cross sections of fruit and seed of *D. tenuifolia*. a. General view of fruit cross section p: pericarp, s: septum, r: replum b. Close view of pericarp and seed ex: exocarp, en: endocarp, m: mesocarp, vb: vascular bundle, sw: seed wall, ep: epidermis, pr: parenchyma, end: endosperm.

### 3.4. Palynomorphological Results

The pollen grains of *D. tenuifolia* were monad, tricolpate, and isopolar. The polar axis was measured as 22.69–24.44  $\mu\text{m}$  (mean: 23.77  $\mu\text{m}$ ), the equatorial axis was measured as 24.37–26.33  $\mu\text{m}$  (mean: 25.21  $\mu\text{m}$ ). The P/E ratio was 0.94. Pollen shape was determined as oblate-spheroidal. The length of the colpus was measured as 17.7  $\mu\text{m}$ , while the width of the colpus was measured as 20.07  $\mu\text{m}$ . The exine was semitectate and the sculpture of the exine was determined as reticulate with smooth-walled, isodiametric-shaped muri. The exine was measured as 2.96–4.16  $\mu\text{m}$  (mean 3.37  $\mu\text{m}$ ), intine was 0.6–0.7  $\mu\text{m}$  (mean 0.64  $\mu\text{m}$ ).

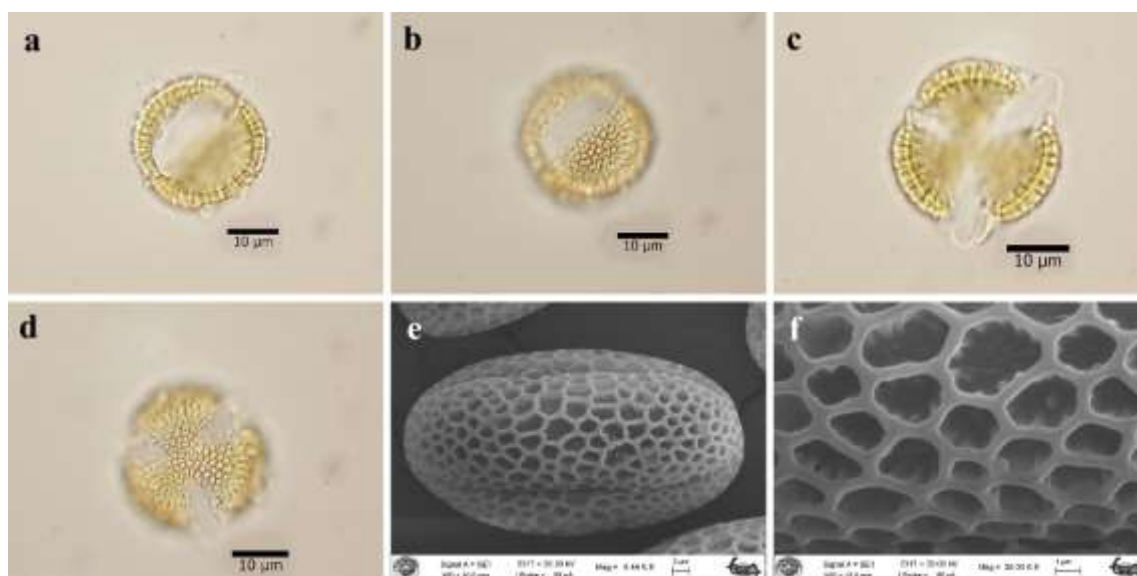


Figure 9. The light microscope (LM) and scanning electron microscope photographs of *D. tenuifolia*. a-d. The general view of pollen e-f. The sculpturing

## 4. Conclusions and discussion

The present study was the first report about the anatomical traits of the vegetative organs, fruit, and seeds of *D. tenuifolia* in the family Brassicaceae. The morphological measurements and observations of *D. tenuifolia* were



congruent with those of the study of Hedge 1965. However, the dimensions and properties of the bracts, ovary, style, stigma, and stamen were presented for the first time herein, as different from those of previous studies.

In the root cross-section, the root center of *D. tenuifolia* was filled with xylem elements. Çitak and Dural (2020) reported that some species of the genus *Iberis* had parenchymatous cells in the root center [15]. The contour of the stem cross-sections was rounded with collenchymatic ridges that were ovoid or polygonal in the family Brassicaceae [15-18], while they were rectangular- and irregular-shaped in *Diplotaxis harra* [10]. The rounded-shaped cross-section of the stem in *D. tenuifolia* was observed with the general characteristics of the primary stem.

In Brassicaceae, unifacial, equifacial, and bifacial mesophyll have been reported by some researchers [15,16,18]. In the genus *Diplotaxis*, equifacial mesophyll was reported [10]. Accordingly, in the current study, *D. tenuifolia* also had equifacial mesophyll in its leaf anatomy, as was also reported in the study of Qader (2018)[10].

For the classification and identification of species in the family Brassicaceae, pollen and seed morphological characteristics can be used. Çitak et al. (2016) reported the measurements and descriptions of the pollen grains of *D. tenuifolia* using only a light microscope [19]. They additionally conducted scanning electron microscopy investigations to gain knowledge of the pollen morphology of *D. tenuifolia*, through which better identification was obtained. *D. tenuifolia* exhibited the general pollen characteristics of the family Brassicaceae. The pollen grains of the studied species were determined as tricolpate, oblate-spheroidal, and reticulate.

The fruit are always siliqua, with considerable variation regarding the position, length, and width, and proportional size of the parts in the genus *Diplotaxis*. The anatomy of the fruit and seeds provides important data about the taxonomy of the family Brassicaceae. In species of Brassicaceae, a living endosperm layer around the embryo plays an essential role in the regulation of the germination and dormancy of the seeds. A single-layered endosperm surrounded the embryo of *D. tenuifolia*, as Lenser et al. (2016) reported in *A. arabicum*, and Dural and Çitak (2020) reported in *Ae. dumanii* [20, 21]. In the genus *Aethionema*, 1- or 2-layered epidermis of the testa were reported by some researchers [21, 22]. Anatomical, micromorphological, and palynological characteristics might be useful in the definition of *D. tenuifolia*. Nevertheless, these characteristics will be more valuable if other species of *Diplotaxis* are also investigated. In conclusion, *D. tenuifolia* was researched in the current work and the anatomical characteristics of the stem, leaves, fruit, and seeds, and fruit and seed micromorphology were determined for the first time herein.

## Acknowledgements

The authors are thankful to the Research Foundation of Selçuk University for their financial support (Project number: 18201044).

## References

- [1] Warwick, S., Francis, A. & Al-Shehbaz, I. (2006). Brassicaceae: species checklist and database on CD-Rom. *Plant Systematics and Evolution* 259 (2-4), 249-258.
- [2] Mühlhausen, A., Lenser, T., Mummenhoff, K. & Theißen, G. (2013). Evidence that an evolutionary transition from dehiscent to indehiscent fruits in *Lepidium* (Brassicaceae) was caused by a change in the control of valve margin identity genes. *The Plant Journal* 73, 824-835. <https://doi.org/10.1111/tpj.12079>
- [3] Al-Shehbaz, I.A., Beilstein, M.A. & Kellogg, E.A. (2006). Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution* 259, 89–120. <https://doi.org/10.1007/s00606-006-0415-z>
- [4] Al-Shehbaz, I.A., Mutlu, B. & Dönmez, A.A. (2007). The Brassicaceae (Cruciferae) of Turkey, Updated. *Turkish Journal of Botany* 31, 327-336.
- [5] Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. & Babaç, M.T. (2012). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gokyigit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul.
- [6] Hedge, I.C. (1965). *Diplotaxis*. Flora of Turkey And The East Aegean Islands, vol. I. Edinburgh Univ. Press.
- [7] Erik, S. (2012). Çok Yönlü Ruderal Bir Tür: *Diplotaxis tenuifolia* (L) DC. *Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi* 4 (1), 27-35.
- [8] Troiano S, Novelli, V, Geatti P, Marangon F, Ceccon L. (2019). Assessment of the sustainability of wild rocket (*Diplotaxis tenuifolia*) production: Application of a multi-criteria method to different farming systems in the province of Udine, *Ecological Indicators*, 97: 301-310.
- [9] Guijarro-Real, C., Prohens, J., Rodríguez-Burruezo, A., & Fita, A. (2019). Potential of wall rocket (*Diplotaxis erucoides*) as a new crop: Influence of the growing conditions on the visual quality of the final product. *Scientia Horticulturae* 258, 108778. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108778>
- [10] Qader, K.O. (2018). Taxonomic Significance of Anatomical Characters in Some Species of Brassicaceae family. *University of Thi-Qar Journal of Science* 6(4), 77-83.
- [11] Johansen, D. A. (1940). Plant microtechnique, McGraw-Hill Book Company, Inc: London; 530p.
- [12] Wodehouse, R.P. (1935). Pollen grains: their structure, identification and significance in science and medicine. McGraw Hill, New York & London, 574 pp.

- [13] Erdtman, G. (1960). The acetolysis method-a revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift* 54, 516-564.
- [14] Punt, W., Hoen, P.P., Blackmore, S., Nilsson, S. & Le Thomas, A. (2007). Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany and Palynology* 143, 1-81. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2006.06.008>
- [15] Çıtak, B.Y. & Dural, H. (2020). The anatomical structures of the genus *Iberis* L. (Brassicaceae) in Turkey. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy* 27(2), 213-224. <https://doi.org/10.3329/bjpt.v27i2.50662>
- [16] Atçeken, M.M., Dural, H. & Çıtak, B.Y. (2016). The morphological, anatomical and palynological investigations on some taxa of Genus *Aethionema* at Waiton (Brassicaceae). *Biological Diversity and Conservation* 9, 55-68.
- [17] Gönen, B., Dural, H. & Çıtak, B.Y. (2019). A Survey of the morphology, anatomy, and palynology of endemic *Bornmuellera kiyakii* and *B. glabrescens* (Brassicaceae) from Turkey. *Gazi University of Journal of Science* 32, 776-790. <https://doi.org/10.35378/gujs.455316>
- [18] Akbar, F. & Begum, K. (2020). A comparative anatomical investigation of three taxa of *Brassica* L. from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy* 27(1), 15-26. <https://doi.org/10.3329/bjpt.v27i1.47566>
- [19] Çıtak, B.Y., Dural, H. & Gönen, B. (2016). Selçuk Üniversitesi Alâeddin Keykubat Kampüsü'nde Yayılış Gösteren Bazı Bitkilerin Polen Morfolojileri. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi* 42(1), 42-56.
- [20] Lenser, T., Graeber, K., Çevik, Ö.S., Adıgüzel, N., Dönmez, A.A., Grosche, C., Kettermann, M., Mayland-Quellhorst, S., Mérai, Z., Mohammadin, S., Nguyen, T., Rümpler, F., Schulze, C., Sperber, K., Steinbrecher, T., Wiegand, N., Strnad, M., Scheid, O.M., Rensing, S.A., Schranz, M.E., Theißen, G., Mummenhoff, K., Leubner-Metzger, G. 2016. Developmental control and plasticity of fruit and seed dimorphism in *Aethionema arabicum*. *Plant Physiology* 172, 1697-1707.
- [21] Dural, H. & Çıtak, B.Y. (2020). The Anatomical Characteristics of Endemic *Aethionema dumanii* Vural & Adıgüzel (Brassicaceae). *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi* 23 (2), 435-440
- [22] Karaismailoğlu, C. (2019). Comparative morphology and anatomy of seeds of some *Aethionema* W.T. Aiton (Brassicaceae) taxa from Turkey. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy* 26, 1-12. <https://doi.org/10.3329/bjpt.v26i1.41911>



## Essential oils compositions and local names of some medicinal and aromatic plants from Lamiaceae family sold in local bazaars of Edremit-Akçay (Balıkesir-Turkey)

Sevim KÜÇÜK<sup>\*1</sup>, Emre KAYALAR<sup>1,2</sup>, Mine KÜRKÇÜOĞLU<sup>3</sup>, İlham ERÖZ POYRAZ<sup>1</sup>  
ORCID: 0000-0002-3594-0364; 0000-0001-5466-3449; 0000-0002-9375-0294; 0000-0003-3170-8354

<sup>1</sup> Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 26470 Eskişehir, Türkiye

<sup>2</sup> İstanbul Aydın Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ortodonti Anabilim Dalı, 34295, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup> Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 26470, Eskişehir, Türkiye

### Abstract

In this study, *Origanum majorana* L., *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare*, *Salvia tomentosa* Mill. and *Sideritis athena* Papan. & Kokkini are sold in local bazaars in Edremit-Akçay (Balıkesir, Turkey) and used as folk medicine. They were investigated for their local names and essential oils. Aerial parts of the plants were subjected to hydrodistillation using a Clevenger type apparatus. Essential oils were analyzed using gas chromatography (GC) and gas chromatography mass spectrometry (GC / MS). The main constituents of *Origanum majorana* were carvacrol (71.8%),  $\gamma$ -terpinen (8.9%) and *p*-simen (8.2%). The major component was identified as carvacrol (76.1%) along with  $\gamma$ -terpinene (6.7%) and *p*-simen (6.4%) in the oil of *Origanum vulgare* subsp. *vulgare*. Camphor (27.3%),  $\alpha$ -pinene (15.3%), 1,8-cineol (12.3%) and  $\beta$ -pinene (7.8%) were found as the major compounds in the oil of *Salvia tomentosa*. Carvacrol (33.0%), epicubebol (10.0%) and  $\beta$ -pinene (7.3%) as the major components in the oil of *Sideritis athena*. Due to the main essential oil compounds, carvacrol, cafur, etc. of these plants have potential use in orthodontics, endodontics, and periodontology in dentistry.

**Key words:** *Lamiaceae*, *Salvia*, *Sideritis*, *Origanum*, essential oil, dentistry

----- \* -----

### Edremit-Akçay (Balıkesir-Türkiye) Semt pazarlarında halk ilacı olarak satılan Lamiaceae familyasına ait bazı tıbbi ve aromatik bitkilerin yöresel isimleri ve uçucu yağ bileşikleri

### Özet

Bu çalışmada Edremit-Akçay (Balıkesir)'da semt pazarlarında satılan ve halk ilacı olarak kullanılan *Origanum majorana* L., *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare*, *Salvia tomentosa* Mill. ve *Sideritis athena* Papan. & Kokkini'nin yöre halkı arasındaki yerel isimleri ve uçucu yağ içerikleri araştırılmıştır. Bitkisel materyallerin toprak üstü kısımlarından su distilasyonu ile uçucu yağlar edilmiştir. Uçucu yağların bileşimi gaz kromatografisi (GC) ve gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC/MS) kullanılarak belirlenmiştir. *Origanum majorana* uçucu yağında karvakrol (71.8%),  $\gamma$ -terpinen (8.9%) ve *p*-simen (8.2%); *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* uçucu yağında karvakrol (76.1%),  $\gamma$ -terpinen (6.7%) ve *p*-simen (6.4%) ana bileşikler olarak belirlenmiştir. *Salvia tomentosa* uçucu yağının ana bileşenleri kafur (% 27.3),  $\alpha$ -pinen (% 15.3), 1,8-sineol (% 12.3) ve  $\beta$ -pinen (% 7.8), *Sideritis athena*'nın ana bileşikleri karvakrol (% 33.0), epikubebol (% 10.0) ve  $\beta$ -pinen (% 7.3) olarak bulunmuştur. Bu bitkiler, karvakrol, kafur vb. uçucu yağ ana bileşenleri nedeni ile diş hekimliğinde ortodonti, endodonti ve periodontoloji dallarında kullanım için önerilebilir.

**Anahtar kelimeler:** *Lamiaceae*, *Salvia*, *Sideritis*, *Origanum*, uçucu yağ, diş hekimliği

## 1. Giriş

Lamiaceae familyası Angiospermlerin altıncı büyük familyası olup, dünyada 245 cins ve 7.886 adet tür ile temsil edilmektedir. Ülkemizde kullanılışı olan, yerli ve kayıtlı aromatik bitki sayısının 120 kadar olduğu ve bunların %40'ının Lamiaceae (Labiatae) familyası içinde yer aldığı bilinmektedir [1]. Familyaya ait taksonlar içerdiği uçucu yağdan dolayı, tıp, diş hekimliği, eczacılık, kimya, gıda (baharat vb.), zirai mücadele, kozmetik, ilaç ve parfümeri sanayiinde kullanılmaktadır. Familya üyeleri antibiyotik kaynaklı kullanışı nedeniyle analjezik ve antiseptik etkisinden dolayı halk ilacı olarak kullanıldığından etnobotanik açıdan da önemli bir yere sahiptir. Ayrıca familyanın birçok türü süs bitkisi olarak kültüre alınmaktadır [1-6].

Bu familyaya ait *Origanum* L. (Mercanköşk, Kekik, Mezüş çiçeği) cinsi ülkemizde 27 türle temsil edilmektedir [7]. Bunlardan bazıları tedavi edici ve baharat olarak kullanılmaktadır. Anadolu'da *Origanum majorana* L. "Mercanköşk, Macuranotu, Mercengüş, Göge kekiği, Guy otu, Kahve otu, Kekik otu, Mercan köşkü Sebzo" isimleri ile; *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* "Karakınık, Güveyotu, Canter, Çanakale kekiği, Güve otu, Kara kekik, Kekik, Kekikotu Keklikotu, Taş kekiği, Taş kekik" isimleri ile bilinmektedir [1, 7, 8]. Türkiye'de ticareti yapılan ve "Kekik yağı ve Kekik suyu" ismi altında satılan yağlar ve hidrosoller *Origanum* türlerinin çiçekli dallarından (özellikle *O. onites* ve *O. vulgare*) elde edilmektedir. Bu yağlar antiseptik fenol bileşikleri (özellikle karvakrol) nedeni ile hakiki kekik yağı yerine, dahilen safra arttırıcı ve kurt düşürücü, haricen ise antiseptik olarak kullanılmaktadır [1]. Kekik ekstrelerinin ağız ve diş rahatsızlıklarında veya hijyeninde ve halitoziste antiseptik-antibakteriyel gargara olarak kullanıldığı da bildirilmiştir [9].

*Origanum majorana* L.'nin kurutulmuş çiçekli dalları (Majoranae herba)'nın yatıştırıcı, midevi, idrar arttırıcı, gaz söktürücü, terletici ve kabız özellikleri vardır [1]. *O. vulgare* Anadolu'da terletici, idrar arttırıcı, gaz söktürücü ve yatıştırıcı olarak, infüzyon halinde kullanılır. Kekik yerine baharat olarak da kullanılmaktadır [1]. Antiseptik, kramp çözücü, göğsü yumuşatıcı, balgam söktürücü, idrar arttırıcı, terletici, mideyi kuvvetlendirici ve hazmettirici özelliklere sahiptir. Mercanköşk, çay olarak hazırlanıp sıcak olarak içilirse diş ağrısı ve baş ağrısına iyi geldiği bildirilmiştir [10]. *O. majorana* ve *O. vulgare* subsp. *vulgare* Akçay semt pazarlarında satılmakta ve çay şeklinde halk ilacı olarak tüketilmektedir.

*Salvia* L. ve *Sideritis* L. türlerinin, toprak üstü veya çiçek durumları çay ve halk ilacı olarak eskiden beri kullanılmaktadır [1, 11]. *Salvia* L. (Adaçayı) cinsi 99 tür ile temsil edilmektedir [12]. Ülkemizde *Salvia* türleri halk arasında genellikle "Adaçayı, Boşaplı, Eşekotu, Pamuklu, Şalba" isimleri ile bilinmekte, toprak üstü veya çiçek durumları çay ve halk ilacı olarak eskiden beri kullanılmaktadır [11]. *Salvia tomentosa* Miller, farklı yörelerde "Büyük çiçekli adaçayı, Adaçayı, Borcağla, Boz ot, Boz şabla, Mezar otu, Moskof çayı, Şabla, Şalba (Balıkesir), Çalba, Hoşafılama, Kurtluca otu, Moşafılama, Moşalpa, Moşapla, Yakı çalbası, Yakı otu" adları ile bilinmektedir [1, 8]. *S. tomentosa*'nın yapraklarının tıbbi adaçayı (*S. officinalis* L.) adaçayı yaprağı (*Salviae officinalis* folium) gibi, gaz söktürücü, boğaz ve burun hastalıklarında antiseptik, kuvvet verici ve uyarıcı etkileri nedeni ile %1-5 infüzyon veya gargara halinde kullanıldığını bildirmiştir [1, 8]. Eskişehir Sarıcakaya ilçesinde yapılan etnobotanik bir çalışmada yöre halkı tarafından bu familyaya ait *Salvia sclarea* L.'nin. "Adaçayı" adı ile nefes darlığına karşı kullanıldığı tespit edilmiştir [13]. Ayrıca bu familyaya ait *Salvia miltiorrhiza*'dan izole edilen bir aktif bileşen olan salvianolik asit B'nin, ortodonti alanında hızlı üst çene genişletmesi tedavisinde yeni kemik oluşumunu hızlandırdığı bildirilmiştir [14].

Türkiye Florası'nda 21 türle temsil edilen *Sideritis* cinsi, halk arasında genellikle "Dağ çayı, Balbaşı, Çay otu" olarak adlandırılmaktadır. Tıbbi olarak kullanılan türler ve bu türlere verilen isimler "Yayla çayı, Eşek çayı, Çay çalbası, Balbaşı, Sivri çayı, Sarıkız çayı, Tilki kuyruğu çayı, Fenerli çayı, Sipil çayı, Kırım çayı, Maden çayı, Amanos çayı" olarak bilinmektedir ve yörelere göre çok değişkenlik göstermektedir [1, 8, 15]. *Sideritis* türlerinin ülkemizde halk arasında çiçek durumları ve yaprakları infüzyon halinde iştah açıcı, midevi, uyarıcı, gaz söktürücü olarak geniş bir geleneksel kullanımı bulunmaktadır [1, 8]. Halk arasında *Sideritis. athena* Papanikolaou & Kokkini, "Dağ çayı, kedi kuyruğu çayı Kandil çayı Kandilli çay" adı ile bilinmekte, yaprak ve çiçek durumları çay şeklinde iştah açıcı ve gaz söktürücü olarak kullanılmaktadır [1, 8, 11].

Bu çalışmada Edremit-Akçay (Balıkesir)'da semt pazarlarında satılan ve halk ilacı olarak kullanılan *Origanum majorana*, *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* *Salvia tomentosa* ve *Sideritis athena* türlerinin yöre halkı tarafından kullanım şekilleri, kullanım amaçları, yöresel isimleri, uçucu yağ bileşikleri araştırılmış ve uçucu yağların karvakrol, kafur gibi temel bileşikleri göz önüne alındığında diş hekimliğinde kullanılabilirliği incelenmiştir.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 1.1. Bitkisel materyal ve uçucu yağ eldesi

Bitkisel materyal Edremit-Akçay semt pazarından temin edilmiştir. Türlerin tayinleri, 'Flora of Turkey and the East Aegean Islands'a göre yapılmıştır [4, 16-18]. Bitkisel materyallerin toprak üstü kısımlarının uçucu yağları, (3 saat, 40-120 gr) Clevenger apareyinde su distilasyonu ile elde edilmiştir. Volumetrik yöntemle bitkisel materyalin içerdiği nem miktarı belirlenmiş ve uçucu yağ verimleri kuru baz üzerinden hesaplanmıştır. Elde edilen uçucu yağlar eş zamanlı olarak GC ve GC/MS sistemi ile değerlendirilmiştir.

### 1.1. Gaz Kromatografisi (GC) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GC/MS) Analizi

#### 1.1.1 Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GC/MS) Analiz Koşulları:

Sistem: Agilent 5975 GC-MSD sistemi  
 Kolon: HP-Innowax Silika kapiler (60 m x 0.25 mm Ø, 0.25 mm film kalınlığı)  
 Enjektör: 250°C  
 Sıcaklık programı: 60°C de 10 dak // 4°C/dak artışla 220°C ye // 220°C de 10 dak // 1°C/dak artışla 240°C ye  
 Taşıyıcı gaz: Helyum (0.8 ml/dak)  
 Kütle aralığı: m/z 35-450  
 Split oranı: 40:1  
 Elektron enerjisi: 70 eV  
 Kütüphane: BAŞER Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi, Wiley ve Adams-LIBR (TP)  
 Kütüphane tarama Yazılımları

#### 1.1.1 Gaz Kromatografisi (GC) Analiz Koşulları:

GC analiz koşulları; eş zamanlı olarak GC/MS sistemindeki madde çıkış zamanları ile aynı olacak şekilde ayarlanmıştır (FID 300°C).

### 3. Bulgular ve Tartışma

Ülkemiz zengin bitki çeşitliliğine sahip olmasına karşın maalesef farklı bölgelerde tüketilen yabancı bitkilerin tanımlanması, kullanım amaçları ve besin değerlerinin belirlenmesine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır [19]. Bu amaçla bu çalışma kapsamında Edremit-Akçay semt pazarına ziyaretler yapılmış, satışı ve geleneksel kullanımı olan bazı bitkilerin kaynak kişilerle görüşülerek, türlerinin bilimsel isimlerini belirlenmesi, bu bitkilerin yöre halkı tarafından kullanım şekilleri, kullanım amaçları yöresel isimleri ve uçucu yağ bileşikleri belirlenmiştir. Ayrıca bu bitkilerin ekstrelerinin ve temel uçucu yağ bileşiklerinin ağız ve diş sağlığı alanındaki kullanım alanları araştırılmıştır.

Yapılan ziyaretler sonucunda; kaynak kişiler ve yöre halkıyla yapılan görüşmelerde *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* “dağ kekiği, deli kekik, yaprak kekik” olarak isimlendirildiği ve Kazdağları’ndan toplanarak baharat olarak mide ağrılarına karşı kullanıldığı, bronşit ve astım belirtilerini hafiflettiği, idrar yolu enfeksiyonu tedavisine yardımcı olduğu, menopoz sonrası belirtileri hafifletici etkisi olduğu; *Origanum majorana*’nın ise yörede “mercanköşk, keklikotu, dağ kekiği ve kekik” olarak isimlendirildiği ve topraküstü kısmının baharat ve çay şeklinde grip, soğuk algınlığında kullanıldığı ve idrar söktürücü özelliğinin olduğu tespit edilmiştir. *Salvia tomentosa*’nın “Muşafı” adı ile bilindiği ve çay olarak mide ağrılarına karşı kullanıldığı bilgisine ulaşılmıştır. *Sideritis athena* türünün “Kazdağı çayı, Adaçayı, Dağ çayı” adları ile bilindiği ve boğaz ve bademcik ağrılarında kaynatılıp, soğutulduktan sonra gargara ya da çay olarak (keskin tadı nedeni ile kısa süreli ya da az demlenerek) kullanıldığı bilgisine ulaşılmıştır. Ayrıca diş eti iltihabına ve ağız kokusuna karşı ağız çalkalama suyu olarak da kullanıldığı bilgisi alınmıştır.

Türlerin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağların, GC ve GC/MS analizleri bulguları Tablo 1- 4’de verilmiştir. Analizler sonucunda, *O. majorana*’da uçucu yağ verimi %4.19, *O. vulgare* subsp. *vulgare*’de %3.8, *Salvia tomentosa*’da %3.1 ve *Sideritis athena*’da %0,1 oranında elde edilmiştir.

Çalışmamızda *S. athena* uçucu yağında 31 bileşik belirlenmiş ve yağın %95.3’ü aydınlatılmıştır. Uçucu yağın major bileşikleri karvakrol (%33.0), epikubebol (%10.0) ve  $\beta$ -pinen (%7.3) olarak belirlenmiştir. *S. athena* uçucu yağının temel bileşikleri önceki bir çalışmada mirsen,  $\beta$ - pinen ve ar-kurkumen olarak bulunmuştur [20].

*Salvia tomentosa* uçucu yağında 35 bileşik belirlenmiş ve yağın % 99.6’sı aydınlatılmıştır. Uçucu yağın temel bileşikleri kafur (% 27.3),  $\alpha$ -pinen (%15.3), 1,8-sineol (%12.3) ve  $\beta$ -pinen (%7.8) olarak belirlenmiştir.

Uçucu yağ içeriklerinin, ışık, sıcaklık gibi fiziksel, edafik, bitki-bitki ve bitki-hayvan etkileşimleri gibi değişkenlerden etkilenmesi nedeni ile fitokimyasal gruplandırma ile uyumlu sistematik gruplandırma yapılması zordur.

Çalışmamızda *O. majorana* uçucu yağında 28 bileşik belirlenmiş ve yağın %100’ü aydınlatılmıştır. Uçucu yağın ana bileşikleri karvakrol (%71,8),  $\gamma$ -terpinen (%8,9) ve *p*-simen (%8.2)’dir. *O. vulgare* subsp. *vulgare* uçucu yağında 30 bileşik belirlenmiş ve yağın %100’ü aydınlatılmıştır. Uçucu yağın da ana bileşikleri karvakrol (%76,1),  $\gamma$ -terpinen (%6,7) ve *p*-simen (%6,4) olarak bulunmuştur.

Mirsen,  $\gamma$ -terpinen,  $\alpha$ -terpinen, *p*-simen, borneol, timol, karvakrol,  $\beta$ -karyofillen, limonen,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, linalool ve sabinen *O. vulgare* ve *O. majorana* uçucu yağlarında bulunan bileşiklerdir [21]. Mısır’da yetişen *O. majorana*’nın uçucu yağı Clevenger tipi apereyi ile 4 saat gerçekleştirilen hidrodistilasyon sonucunda elde edilmiş ve GC/MS ile ana bileşenleri 1,30-dibromotriakantone (%41.07), 11-trikosan (%15.35) ve 1,38-dibromooktatriakanton (%9,77) olarak belirlenmiştir [22]. Cezayir’de yetişen *O. majorana* uçucu yağının hidrodistilasyon ile ve %0,97 verim ile elde edildiği bir çalışmada GC-MS kullanılarak ana bileşenler terpinen-4-diol (%34,1),  $\alpha$ -terpinen (%19.2) ve terpineol (%8,9) olarak elde edilmiştir [23].

Hindistan'da yetişen *O. majorana*'nın açık havada kurutulmuş örnekleri, 4 saat Clevenger tipi aperey le gerçekleştirilmiş hidrodistilasyon sonucunda elde edilen uçucu yağ, GC ve GC/MS ile analiz edilen uçucu yağın ana bileşenleri terpinen-4-ol (%31.15), *cis*-sabinen hidrat (%15.76) ve sabinen (%6.91) olduğu gösterilmiştir [24].

İçel ve Antalya'dan toplanmış *O. majorana* örnekleri kullanılarak yapılmış uçucu yağ çalışmasında Clavenger apereyi kullanılmış ve uçucu yağ verimleri sırası ile %6.5-%7.7 olarak; GC ve GC/MS kullanılarak ana bileşenleri karvakrol (%78.27-%79.46),  $\alpha$ -terpinen (%4.84-%3.72) ve *p*-simen (%4.68-%3.72) olarak elde edilmiştir [25, 26]. Tabanca ve ark. (2004) Balıkesir, Aydın ve İzmir (iki farklı lokaliteden) toplanmış *O. majorana* örneklerini Clevenger tipi aperey ile 3 saat hidrodistilasyona tabi tutmuşlar ve elde ettikleri uçucu yağları GC-MS ile analiz ettikleri çalışmada, dört lokaliteden toplanan örnekler için uçucu yağların ana bileşenlerini *cis*-sabinen hidrat, terpinen-4-ol ve linalil asetat olarak belirlemiş ve Balıkesir örneklerinin sırası ile %40.9, %14.3 ve %9.6 ile diğer lokalitelerden toplanan örnekler göre daha yüksek olarak bu bileşenlere sahip olduğunu belirtmişlerdir [27].

Suudi Arabistan'da yetişen *O. vulgare*'nin kurutulmuş toprak üstü kısımlarına 3 saat hidrodistilasyon uygulanmış ve elde edilen uçucu yağ ile hidrosol uçucu yağları GC/MS ve GC-FID teknikleri kullanılarak analiz edilmiştir. Ana bileşen olan karvakrol, uçucu yağ ve hidrosol için sırası ile %70.2  $\pm$  1.37 ve %92.5  $\pm$  0.97 oranlarında belirlenmiştir [28]. Tunus'ta yetişen *O. vulgare* subsp. *glandulosum* taksonunun üç farklı gelişim evresindeki örneklerin kurutulmuş toprak üstü kısımları 3 saat hidrodistilasyona tabi tutulmuş ve elde edilen uçucu yağların GC ve GC/MS analizi gerçekleştirilmiştir. Uçucu yağ ana bileşenleri, vejetatif gelişimin erken döneminde karvakrol (%61.8), *p*-simen (%9.87) ve  $\gamma$ -terpinen (%6.34); geç gelişim döneminde karvakrol (%67.93), *p*-simen (%5.4) ve  $\gamma$ -terpinen (%4.25) ve çiçeklenme döneminde karvakrol (%83.37),  $\gamma$ -terpinen (%4.13) ve *p*-simen (%3.02) olarak belirlenmiştir [29].

Suudi Arabistan'da yetişen *O. vulgare* bitkisinin yaprak ve gövdesi kullanılarak 3 saat gerçekleştirilen hidrodistilasyon ile uçucu yağları elde edilmiştir. Bu uçucu yağlar GC ve GC-MS kullanılarak analiz edilmiş ve uçucu yağın ana bileşeni karvakrol (gövde: %77.5  $\pm$  0.77, yaprak: %72.8  $\pm$  0.21 oranlarında),  $\gamma$ -terpinen (gövde: %1.9  $\pm$  0.006, yaprak: %6.2  $\pm$  0.07) ve *p*-simen (gövde: %1.4  $\pm$  0.07, yaprak: %3.2  $\pm$  0.0) olarak belirlenmiştir [30].

Ülkemizde yetişen *O. vulgare*'nin Anadolu orjinli alt türleri ile gerçekleştirilmiş çalışmada [31], çiçekli toprak üstü kısımlarının 3 saat hidrodistilasyonu ile uçucu yağları elde edilmiş ve GC ve GC-MS ile analizleri yapılmıştır. *O. vulgare* subsp. *hirtum* karvakrol bakımından en zengin (%70.47) takson olarak belirlenmiştir. *O. vulgare* subsp. *gracile*'nin uçucu yağının ana bileşenleri  $\beta$ -karyofillen (%17.54) ve germakren D (%12.75) olarak; subsp. *viride* uçucu yağının ana bileşenleri terpinen-4-ol +  $\beta$ -karyofillen (%20.94) ve germakren D (%17.80) olarak belirlenmiştir.

*O. majorana*, *O. vulgare* subsp. *vulgare* ve *S. athoa*'nın ana bileşeni olarak saptanan karvakrol, antibakteriyel, antienflamatuar, antifungal, analjezik, antikanserijen, antiplatelet, antioksidan, anti-apoptotik, antidepresan, anti-ülser ve rejenerasyon gibi pek çok özelliğe sahip uçucu bir uçucu yağ bileşenidir [32, 33].

Diş hekimliği alanında gerçekleştirilen bir hayvan deneyinde, karvakrol ve kalkon içeren topikal jel uygulamasının periodontitiste alveoler kemik rezorpsiyonunu azalttığı gösterilmiştir [34]. Diğer bir çalışmada, karvakrol içeren topikal jel uygulamasının alveoler kemik kaybı üzerine olan etkilerinin mikrobiyolojik, histolojik ve atomik kuvvet mikroskopu incelemesinde; karvakrolün alveoler kemik kaybını önlediği, gingival dokuda myeloperoksidaz aktivitesini ve periodonsiyumda mikroorganizma sayısını azalttığı bulunmuştur [35].

*Salvia tomentosa* uçucu yağının temel bileşikleri kafur (%27.3),  $\alpha$ -pinen (%15.3), 1,8-sineol (%12.3) ve  $\beta$ -pinen (%7.8) olarak belirlenmiştir. Tepe ve arkadaşları Osmaniye: Düziçi'nden topladıkları *S. tomentosa* örneklerinin toprak üstü kısımlarından elde ettikleri uçucu yağın ana bileşiklerini  $\beta$ -pinen (%39.7),  $\alpha$ -pinen (%10.9) ve kamfor (%9.7) olarak belirlemişlerdir [36]. Ülkemizde yetişen farklı *Salvia* türlerinin uçucu yağları ile yapılan çalışmalar ve ana/karakteristik bileşikleri;  $\alpha$ - ve  $\beta$ -tuyonlar, 1,8 sineol,  $\alpha$ -pinen (*S. caespitosa* Montbret ex Aucher ex Benth) [37];  $\beta$ -tuyon,  $\alpha$ -tuyon ve 1,8 sineol (*S. pomifera* L.) [38]; 1,8-sineol, kafur, borneol ve bornil asetat (*S. cryptantha* L.) [39]; *trans*-pinokarvil asetat, mirtenil asetat (*S. euphratica* Montbret et Aucher ex Benth var. *euphratica*) [40]; kafur ve 1,8-sineol (*S. aytachii* M. Vural et N. Adigüzel) [41]; germakren D, bisiklogermakren ve  $\alpha$ -pinen (*S. syriaca* L.)'dir [42].

Çalışmamızda *S. tomentosa*'nın ana bileşeni olarak bulunan kafur, aromatik tadı ve keskin kokusu ile karakterize bir siklik ketondur. Bu madde yüzyıllarca topikal kanlandırıcı, antipüriritik, abortus yapıcı ilaç, laktasyonu baskılayıcı, kontraseptif, afrodisiak, soğuk algınlığı ilacı ve antiseptik olarak kullanılmıştır. Günümüzde tıpta en çok topikal antitüssif, anestezi, analjezik ve antipüriritik ajan olarak kullanılmaktadır. Kafur geleneksel diş hekimliğinde endodontik tedavide antiseptik olarak kullanılan klorofenole eklenerek kullanıldığı, klorofenolün etki süresini uzattığı ve daha az kostik olmasını sağladığı tespit edilmiştir [43].

Ayrıca *Salvia* türleri geleneksel tıpta kırık ve yara travmalarında yaygın olarak kullanılan etkili bitkilerdir. Yapılan çalışmalar bazı *Salvia* türlerinin kemik metabolizmasında etkili ajanlar olduğunu bildirmiştir [44, 45]. Ortodonti alanında yapılan güncel bir çalışmada *Salvia* kaynaklı bir bileşenin sıçanlarda hızlı premaxilla genişletmesinde yeni kemik oluşumunu hızlandırdığı, sutural bölgedeki yeni oluşan kemik alanında, inflammatuar hücre yoğunluğunda, osteoblast ve osteoklast sayısında ve ayrıca kapiller sayısında artışa sebep olduğu bildirilmiştir [14].

Tablo 1. *Origanum majorana* uçucu yağının bileşimi

RRI	Bileşikler	%	TY
1032	$\alpha$ -Pinen	1.1	t <sub>R</sub> , MS
1035	$\alpha$ -Tuyen	0.6	MS
1076	Kamfen	0.3	t <sub>R</sub> , MS
1132	Sabinen	0.1	t <sub>R</sub> , MS
1159	$\delta$ -3-Karen	0.1	t <sub>R</sub> , MS
1174	Mirsen	1.6	t <sub>R</sub> , MS
1176	$\alpha$ -Fellandren	0.2	t <sub>R</sub> , MS
1188	$\alpha$ -Terpinen	1.8	t <sub>R</sub> , MS
1203	Limonen	0.3	t <sub>R</sub> , MS
1210	$\beta$ -Fellandren	0.2	MS
1255	$\alpha$ - <b>Terpinen</b>	<b>8.9</b>	t <sub>R</sub> , MS
1266	(E)- $\beta$ -Osimen	0.1	t <sub>R</sub> , MS
1267	3-Oktanon	0.1	t <sub>R</sub> , MS
1280	<b>p-Simen</b>	<b>8.2</b>	t <sub>R</sub> , MS
1290	Terpinolen	0.2	t <sub>R</sub> , MS
1452	1-Okten-3-ol	0.4	t <sub>R</sub> , MS
1474	<i>trans</i> -Sabinen hidrat	0.5	t <sub>R</sub> , MS
1553	Linalol	0.1	t <sub>R</sub> , MS
1556	<i>cis</i> -Sabinen hidrat	0.3	t <sub>R</sub> , MS
1611	Terpinen-4-ol	e	t <sub>R</sub> , MS
1612	$\beta$ -Karyofillen	1.8	t <sub>R</sub> , MS
1614	Karvakrol metil eter	0.2	t <sub>R</sub> , MS
1706	$\alpha$ -Terpineol	0.1	t <sub>R</sub> , MS
1719	Borneol	0.7	t <sub>R</sub> , MS
2181	İzotimol	e	MS
2204	Timol	0.3	t <sub>R</sub> , MS
2228	İzokarvakrol	e	t <sub>R</sub> , MS
2239	<b>Karvakrol</b>	<b>71.8</b>	t <sub>R</sub> , MS

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır; %: FID verilerine göre hesaplanmıştır; e: Eser (< %0.1); TY: tanımlama Yöntemi; t<sub>R</sub>: HP Innowax kolonda standart bileşiklerin analizi ile belirlenen tutunma zamanlarına ve spektrumlarına dayalı tanımlama; MS: Kullanılan kütüphane ve literatürlerdeki indeksler ve mas spektrumları ile karşılaştırmaya dayalı tanımlama.

Tablo 2. *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* uçucu yağının bileşimi

RRI	Bileşikler	%	TY
1032	$\alpha$ -Pinen	0.8	t <sub>R</sub> , MS
1035	$\alpha$ -Tuyen	0.6	MS
1076	Kamfen	0.2	t <sub>R</sub> , MS
1132	Sabinen	0.1	t <sub>R</sub> , MS
1159	$\delta$ -3-Karene	e	t <sub>R</sub> , MS
1174	Mirsen	1.8	t <sub>R</sub> , MS
1176	$\alpha$ -Fellandren	0.3	t <sub>R</sub> , MS
1188	$\alpha$ -Terpinen	1.5	t <sub>R</sub> , MS
1203	Limonen	0.3	t <sub>R</sub> , MS
1210-1218	$\beta$ -Fellandren	0.2	MS
1255	<b><math>\gamma</math>-Terpinen</b>	<b>6.7</b>	t <sub>R</sub> , MS
1266	(E)- $\beta$ -Osimen	0.1	t <sub>R</sub> , MS
1267	3-Oktanon	0.1	t <sub>R</sub> , MS
1280	<b>p-Simen</b>	<b>6.4</b>	t <sub>R</sub> , MS
1290	Terpinolen	0.2	t <sub>R</sub> , MS
1452	1-Okten-3-ol	0.3	t <sub>R</sub> , MS
1474	<i>trans</i> -Sabinen hidrat	0.3	t <sub>R</sub> , MS
1553	Linalool	0.2	t <sub>R</sub> , MS
1556	<i>cis</i> -Sabinen hidrat	0.2	t <sub>R</sub> , MS
1612	$\beta$ -Karyofillen	1.9	t <sub>R</sub> , MS
1614	Karvakrol metil eter (=Metil karvakrol)	0.2	t <sub>R</sub> , MS
1687	$\alpha$ -Humulen	0.1	t <sub>R</sub> , MS
1706	$\alpha$ -Terpineol	0.1	t <sub>R</sub> , MS
1719	Borneol	0.4	t <sub>R</sub> , MS
1737	$\beta$ -Bisabolen	0.2	t <sub>R</sub> , MS
2008	Karyofillen oksid	0.2	t <sub>R</sub> , MS
2181	Isotimol (=2-Isopropyl-4-methyl phenol)	0.1	MS
2204	Timol	0.3	t <sub>R</sub> , MS
2228	Isokarvakrol (=4-Isopropil-2-metil fenol)	0.1	t <sub>R</sub> , MS
2239	<b>Karvakrol</b>	<b>76.1</b>	t <sub>R</sub> , MS

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır; %: FID verilerine göre hesaplanmıştır; e: Eser (< %0.1); TY: tanımlama Yöntemi; t<sub>R</sub>: HP Innowax kolonda standart bileşiklerin analizi ile belirlenen tutunma zamanlarına ve spektrumlarına dayalı tanımlama; MS: Kullanılan kütüphane ve literatürlerdeki indeksler ve mas spektrumları ile karşılaştırmaya dayalı tanımlama.

Tablo 3. *Salvia tomentosa* uçucu yağının-bileşimi

RRI	Bileşikler	%	TY
1032	<b><math>\alpha</math> -Pinen</b>	<b>15.3</b>	$t_R$ , MS
1076	Kamfen	4.4	$t_R$ , MS
1118	$\beta$ -Pinen	7.8	$t_R$ , MS
1174	Mirsen	4.4	$t_R$ , MS
1203	Limonen	3.6	$t_R$ , MS
1213	<b>1,8-Sineol</b>	<b>12.3</b>	$t_R$ , MS
1255	$\square$ -Terpinen	e	$t_R$ , MS
1280	<i>p</i> -Simen	1.8	$t_R$ , MS
1451	$\square$ , <i>p</i> -Dimetilstiren (= <i>p</i> -simenen)	e	MS
1452	1-Okten-3-ol	0.1	$t_R$ , MS
1457	$\beta$ -Tuyen	0.1	MS
1532	<b>Kafur</b>	<b>27.3</b>	$t_R$ , MS
1562	İzopinokamfon	1.0	$t_R$ , MS
1586	Pinokarvon	0.2	MS
1590	Bornil asetat	2.7	$t_R$ , MS
1612	$\beta$ -Karyofillen	4.5	$t_R$ , MS
1628	Aromadenden	0.4	MS
1648	Mirtenal	0.2	MS
1658	<i>trans</i> -Pinokarvil asetat	0.2	$t_R$ , MS
1664	<i>trans</i> -Pinokarveol	0.4	$t_R$ , MS
1687	$\alpha$ -Humulen	0.8	$t_R$ , MS
1704	Mirtenil asetat	0.7	$t_R$ , MS
1706	$\alpha$ -Terpineol	0.3	$t_R$ , MS
1707	$\alpha$ -Terpinil asetat	0.2	$t_R$ , MS
1719	Borneol	4.0	$t_R$ , MS
1797	Mirtenol	1.5	MS
2008	Karyofillen oksit	0.4	$t_R$ , MS
2071	Humulen epoksit-II	0.2	MS
2104	Viridiflorol	0.3	MS
2198	Timol	e	$t_R$ , MS
2239	Karvakrol	2.7	$t_R$ , MS
2324	Karyofilladienol II (Karyofilla-2(12),6(13)- dien-5 $\alpha$ -ol)	0.1	MS
2353	Karyofillenol I (Karyofilla-2(12),6-dien-5 $\alpha$ -ol)	0.4	MS
2392	Karyofillenol II (Karyofilla-2(12),6-dien-5 $\beta$ -ol)	0.3	MS
2676	Manol	1.0	MS

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır; %: FID verilerine göre hesaplanmıştır; e: Eser (< %0.1); TY: tanımlama Yöntemi;  $t_R$ : HP Innowax kolonda standart bileşiklerin analizi ile belirlenen tutunma zamanlarına ve spektrumlarına dayalı tanımlama; MS: Kullanılan kütüphane ve literatürlerdeki indeksler ve mas spektrumları ile karşılaştırmaya dayalı tanımlama.

Tablo 4. *Sideritis athena* uçucu yağının-bileşimi

RRI	Bileşikler	%	TY
1032	$\alpha$ -Pinen	4.1	$t_R$ , MS
1035	$\alpha$ -Tuyen	0.7	MS
1118	<b><math>\beta</math> -Pinen</b>	<b>7.3</b>	$t_R$ , MS
1132	Sabinen	0.9	$t_R$ , MS
1159	$\gamma$ -3-Karen	0.4	$t_R$ , MS
1174	Mirsen	4.4	$t_R$ , MS
1176	$\alpha$ -Fellandren	e	$t_R$ , MS
1188	$\alpha$ -Terpinen	2.6	$t_R$ , MS
1203	Limonen	1.5	$t_R$ , MS
1210	$\beta$ -Fellandren	0.6	MS
1255	$\gamma$ -Terpinen	1.5	$t_R$ , MS
1280	<i>p</i> -Simen	3.2	$t_R$ , MS
1497	$\alpha$ -Kopaen	0.9	MS
1612	$\beta$ -Karyofillen	3.8	$t_R$ , MS
1678	Epi-zonaren	0.4	MS
1690	$\alpha$ -Akoradien	0.9	MS
1704	$\gamma$ -Kurkumen	0.9	MS
1722	Bisikloeskifell andren	0.9	MS
1755	Bisiklogermakr en	0.9	MS
1772	$\delta$ -Kadinen	3.7	$t_R$ , MS
1786	$\alpha$ - <i>p</i> -Kurkumen	4.2	MS
1900	<b>Epikubebol</b>	<b>10.0</b>	MS
1933	Kubebol	4.2	MS
2008	Karyofillen oksit	1.5	$t_R$ , MS
2080	Kubenol	1.1	MS
2088	1-epi-Kubenol	1.7	MS
2131	Hekzahidrofarm esil aseton	0.4	$t_R$ , MS
2144	Spatulenol	0.4	$t_R$ , MS
2170	$\beta$ -Bisabolol	0.8	MS
2209	T-Murolol	1.4	MS
2239	<b>Karvakrol</b>	<b>33.0</b>	$t_R$ , MS

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır; %: FID verilerine göre hesaplanmıştır; e: Eser (< %0.1); TY: tanımlama Yöntemi;  $t_R$ : HP Innowax kolonda standart bileşiklerin analizi ile belirlenen tutunma zamanlarına ve spektrumlarına dayalı tanımlama; MS: Kullanılan kütüphane ve literatürlerdeki indeksler ve mas spektrumları ile karşılaştırmaya dayalı tanımlama.

Bu bitkiler, karvakrol, karfur vb. uçucu yağ ana bileşikleri nedeni ile diş hekimliğinde ortodonti, endodonti ve periodontoloji dallarında kullanım için önerilebilir.

#### Açıklama

Bu çalışma XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı'nda (2016) poster bildiri olarak sunulmuştur.

#### Kaynaklar

- [1] Baytop, T. (1999). *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- [2] Alan, S., & Koca, F. (2007). Eskişehir'de Yetişen *Thymus* L. (Labiatae) Türleri Üzerinde Anatomik Araştırmalar. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 161-180.



- [3] Heywood, V. H. (1978). *Flowering Plants of the World*. London, UK: Oxford Univ. Press.
- [4] Davis, P. H., Mill, R. R., & Tan, K. (1988). *Flora of Turkey and East Aegean Islands*. UK: Edinburgh University Press.
- [5] Seçmen, Ö., Gemici, Y., Leblebici, E., Görk, G., & Bekat, L. (1989). *Tohumlu Bitkiler Sistematigi*. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi.
- [6] Watson, L., & Dallwitz, M. J. (2002). *The Families of Flowering Plants*. Retrieved from <http://biodiversity.uno.edu/delta/angio/www/labiateae.htm>
- [7] Sadıkoğlu, N. (2012). *Origanum* L. In: A. Güner, S. Aslan, T. Ekim, M. Vural, & M.T. Babaç (Eds.), *Türkiye Bitkileri Listesi - Damarlı Bitkiler* (pp. 568-70). İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayınları.
- [8] Tuzlacı, E. (2011). *Türkiye Bitkileri Sözlüğü*. İstanbul: Alfa Yayıncılık.
- [9] Dauqan, E.M.A., & Abdullah, A. (2017). Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 5(2):17-22. <https://doi.org/10.7324/JABB.2017.50203>
- [10] Stay, F.P. (1996). *The complete book of dental remedies*. Michigan, USA: Avery Publishing Group.
- [11] Dirmenci, T., Satıl, F., & Tümen, G. (2007). *Kazdağı Milli Parkı Çiçekli Bitkileri*. Balıkesir: Zeytinli Belediyesi Basımevi.
- [12] Celep, F., & Kahraman, A. (2012). *Salvia* L. In: A. Güner, S. Aslan, T. Ekim, M. Vural, & M.T. Babaç (Eds.), *Türkiye Bitkileri Listesi - Damarlı Bitkiler* (pp. 580). İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayınları.
- [13] Küçük, S. Eröz, Poyraz, İlham (2020). Ethnobotanical Aspect of Sarıcakaya (Eskişehir-Turkey) Villages. *Fresenius Environmental Bulletin (FEB)*, 29(07A), 5808-5814.
- [14] Kayalar, E., Taş Deynek, G., Tok, O.E., & Küçük, S. (2021). Effect of salvianolic acid B on new bone formation in the orthopedically expanded suture: A histological and immunohistochemical study. *The Angle Orthodontist*, 91(2), 248-258. <https://doi.org/10.2319/042620-360.1>
- [15] Duman, H. (2012). *Sideritis* L. In: A. Güner, S. Aslan, T. Ekim, M. Vural, & M.T. Babaç (Eds.), *Türkiye Bitkileri Listesi - Damarlı Bitkiler* (pp. 585). İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayınları.
- [16] Hedge, I.C. (1982). *Salvia* L. In: P.H. Davis (Eds.), *Flora of Turkey and the east Aegean Islands* (7th ed., pp. 400-461). Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.
- [17] Huber-Morath, A. (1982). *Sideritis* L. In: P.H. Davis (Eds.), *Flora of Turkey and the east Aegean Islands* (7th ed., pp. 178-199). Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.
- [18] Ietswaart, J. H. (1982). *Origanum* L. In: P.H. Davis (Eds.), *Flora of Turkey and the east Aegean Islands* (7th ed., pp. 297-313). Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.
- [19] Yücel, E., Şengün, İ. Y., & Çoban, Z. (2012). The wild plants consumed as a food in Afyonkarahisar/Turkey and consumption forms of these plants, *Biological Diversity and Conservation*, 5(2), 95-105.
- [20] Özek, T., Başer, K. H. C., & Tümen, G. (1993) The essential oil of *Sideritis athoa* Papanikolaou et Kokkini, *Journal of Essential Oil Research*, 5, 669-670.
- [21] Oliveira, J. L. T. M. D., Diniz, M. D. F. M., Lima, E. D. O., Souza, E. L. D., Trajano, V. N., & Santos, B. H. C. (2009). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 45-50. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000100006>
- [22] Selim, S. A., Aziz, M. H. A., Mashait, M. S., & Warrad, M. F. (2013). Antibacterial activities, chemical constituents and acute toxicity of Egyptian *Origanum majorana* L., *Peganum harmala* L. and *Salvia officinalis* L. essential oils. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(13), 725-735.
- [23] Amor, G., Caputo, L., La Stora, A., De Feo, V., Mauriello, G., & Fechtali, T. (2019). Chemical composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba-alba* and *Origanum majorana* essential oils from Morocco. *Molecules*, 24(22), 4021. doi: 10.3390/molecules24224021
- [24] Raina, A. P., & Negi, K. S. (2012). Essential oil composition of *Origanum majorana* and *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* growing in India. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(6), 1015-1017. DOI:10.1007/s10600-012-0133-4
- [25] Baser, K. H. C., Kirimer, N., & Tümen, G. (1993). Composition of the essential oil of *Origanum majorana* L. from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 5(5), 577-579 DOI: 10.1080/10412905.1993.9698283
- [26] Baser, K. H. C., Özek, T., Tümen, G., & Sezik, E. (1993). Composition of the essential oils of Turkish *Origanum* species with commercial importance. *Journal of Essential Oil Research*, 5(6), 619-623. <https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698294>
- [27] Tabanca, N., Özek, T., Baser, K. H. C., & Tümen, G., (2004) Comparison of the Essential Oils of *Origanum majorana* L. and *Origanum x majoricum* Cambess. *Journal of Essential Oil Research*, 16:3, 248-252, DOI: 10.1080/10412905.2004.9698713.
- [28] Khan, M., Khan, S. T., Khan, N. A., Mahmood, A., Al-Kedhairi, A. A., & Alkhatlan, H. Z. (2018). The composition of the essential oil and aqueous distillate of *Origanum vulgare* L. growing in Saudi Arabia and

- evaluation of their antibacterial activity. *Arabian journal of chemistry*, 11(8), 1189-1200 <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.02.008>
- [29] Béjaoui, A., Chaabane, H., Jemli, M., Boulila, A., & Boussaid, M. (2013). Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at different phenological stages. *Journal of Medicinal Food*, 16(12), 1115-1120. doi: 10.1089/jmf.2013.0079
- [30] Khan, M., Khan, S. T., Khan, M., Mousa, A. A., Mahmood, A., & Alkathlan, H. Z. (2019). Chemical diversity in leaf and stem essential oils of *Origanum vulgare* L. and their effects on microbicidal activities. *AMB Express*, 9(1), 1-15 <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0893-3>
- [31] Sezik, E., Tümen, G., Kırimer, N., Özek, T., & Başer, K. H. C. (1993). Essential Oil Composition of Four *Origanum vulgare* Subspecies of Anatolian Origin. *Journal of Essential Oil Research*, 5(4),425-431. DOI: 10.1080/10412905.1993.9698253.
- [32] Kulisic, T., Krisko, A., Dragovic-Uzelac, V., Milos, M., & Pifat, G. (2007). The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58, 87-93. <https://doi:10.1080/09637480601108307>
- [33] Silva, F.V., Guimaraes, A. G., Silva, E. R., Sousa-Neto, B. P., Machado, F. D., QuintansJunior, L. J., & Oliveira, R. C. (2012). Anti-inflammatory and antiulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. *Journal of Medicinal Food*. 15, 984-991. <https://doi:10.1089/jmf.2012.0102>
- [34] Botelho, M. A., Rao, V. S., Montenegro, D., Bandeira, M. A., Fonseca, S. G., Nogueira, N. A., & Brito, G. A. (2008). Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. *Phytotherapy Research*, 22, 442-449. <https://doi:10.1002/ptr.2325>.



## The existence of *Anoplotrupes stercorosus* (Scriba, 1791) (Coleoptera: Geotrupidae) for Turkey is validated from Gölcük Natural Park in Isparta Province

Serdar BİLGİNTURAN \*<sup>1</sup>  
ORCID: 0000-0001-8898-0506

<sup>1</sup> Independent Researcher, Çünür District, 5467 Street, 8D/12, Isparta, Türkiye

### Abstract

Recent trip in the forest lands of Gölcük Natural Park revealed a new earth-boring dung beetle record for Isparta province: *Anoplotrupes stercorosus*. Comparative analysis of partial cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) displayed with UPGMA dendrogram confirmed genus *Anoplotrupes*.

**Key words:** Geotrupidae, *Anoplotrupes stercorosus*, new record, UPGMA, Isparta

----- \* -----

### *Anoplotrupes stercorosus* (Scriba, 1791) (Coleoptera: Geotrupidae) Türünün Türkiye'deki varlığı, Isparta İli Gölcük Tabiat Parkı'ndan doğrulanmıştır

### Özet

Gölcük Tabiat Parkı'nın ormanlık alanlarına yapılan bir gezi sonrasında, Isparta ili için yeni bir bok böceği kaydı *Anoplotrupes stercorosus* gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırmalı kısmi sitokrom oksidaz altüniteli (CO1) analizi *Anoplotrupes* cinsinin doğruluğunu teyit etmiştir. Aynı sonuçlar UPGMA dendrogramıyla da ortaya konulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Geotrupidae, *Anoplotrupes stercorosus*, yeni kayıt, UPGMA, Isparta

### 1. Introduction

This paper treats a new record from Isparta, Türkiye in the Coleopteran family Geotrupidae, *A. stercorosus*. The family members of Geotrupidae, earth-boring scarab beetles, as their common name implies, are burrowers in soil and they accommodate the burrows for their larvae with dung, fungi, humus [1]. Family is moderate-sized about 45 genera and 600 species, including those commonly called “dor beetles”. They are round or slightly elongate, very convex, and glabrous or hairy. Their coloration is usually brown or black, more or less metallic, and is occasionally patterned. Body length is from 6 to 30 mm [2]. Dung beetles mainly feed on mammals excrement. By doing so, they decompose dung, enrich the soil and effectively mix and aerate soil through tunneling in this way favoring both to pasture and animal health. Dung beetle activity is crucial in nutrient cycles. They compete with some of the flies and nematodes [3], [4]. Adults dig vertical burrows that are up to 3 m in depth. Adults of many species are nocturnal and are saprophagous, coprophagous, mycetophagous, or do not feed as adults [1].

The optimal habitat type of the *A. stercorosus* is reported as fresh forest habitats [5] similar to Gölcük Natural Park habitat which is a conserved hotspot, as described in [6].

### 2. Materials and methods

The examined materials of *A. stercorosus* were either collected by author from Isparta Gölcük Natural Park in 2021 or deposited in Entomological Museum of Isparta, Turkey (EMIT). The classification and nomenclature [7] was followed in here to identify species. Female and male genitalia drawings (Figure 1 and 2) of species were adopted from [7]. Leica EZ4 binocular stereo microscope was used to examine samples.

For BLAST [8] analysis, partial cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) nucleotide sequences were gathered from NCBI database, aligned and visualized by CLUSTAL X v. 2.1 [9] programme.

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905464044844; Fax.: +905464044844; E-mail: smallpire@gmail.com

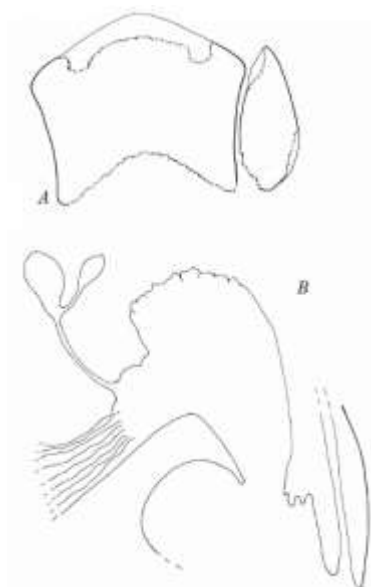


Figure 1. Female genitalia of *A. stercorosus* (Scriba) A: Dorsal view of 9<sup>th</sup> tergite and pleurite, B: Sagittal drawing of spermatheca [7].

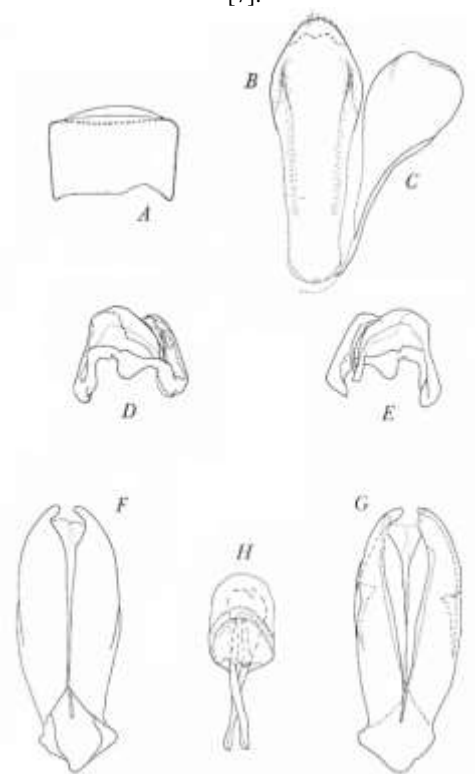


Figure 2. Male genitalia of *A. stercorosus* (Scriba), A: Tergite of the genital segment, B: Sternite, C: Pleurotergite, D: Dorsal view of paramer, E: Ventral view of paramer, F: Dorsal view of fallobase, G: Ventral view of fallobase, H: Median lobe and appandages, [7].

**Materials examined:** 1 ♂ Gölcük Natural Park, 28.III.2021 Leg-Det: S. Bilginturan; 3 specimen Eğirdir\Isparta 02.VII. 2011 Leg Özge O.; 11 specimen Tr Isparta Gölcük 15.X.2009-24.IX.2009 Leg G. Japoshvili.

**General Distribution:** Albania, Andorra, Austria, Belarus, Belgium, Bosnia and Herzegovina, Britain, Bulgaria, Corsica, Croatia, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Italy, Kazakhstan, Latvia, Liechtenstein, Lithuania, Luxembourg, Macedonia, Moldavia, Norway, Poland, Portugal, Romania, Russia, Sicily, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, Switzerland, The Netherlands, Turkey, Ukraine, Yugoslavia [10]

**Distribution in Turkey:** Kahramanmaraş [11].

### 3. Results and discussion

The forest dung beetle *A. stercorosus* (Scriba, 1791) (Figure 3) is a common species encountered in Europe, Caucasus and Western Siberia [5]; [12]. However, no reliable record of the existence of this species has been found in taxonomic studies and ecological studies on the scarabeidae fauna of our country; [13], [14], [15], [16], [17]; [18], [19].



Figure 3. From left to right, dorsal and ventral view of *A. stercorosus* (Photo: Eduard Yakovlevich Berlov [25])

The authors [20] studied 625 Turkish scarab beetles including *A. stercorosus* from various types of literature, updated the checklist of the Turkish Scarabaeoidea, but authors didn't provide locality and reference data. Later, [21], [22] provided bibliographic references on the knowledge of Turkish Scarabaeoidea. Lately, occurrence of *A. stercorosus* was recorded in Kahramanmaraş province for the first time [11]. However, the author didn't give any information about where the species were preserved.

In Isparta, [23] determined the coleopteran biodiversity, found one Geotrupidae species; [24] determined the insect fauna of Kovada Lake National Park and found 2 geotrupid species; [6] studied Gölcük Natural Park Coleoptera diversity, found *A. stercorosus* but deposited it in EMIT as "Geotrupidae sp."

Thus, the first recording of the species from Isparta was realized as a result of this study.

The reason for the complexity in the distinction of *G. stercorarius* (Linnaeus, 1758) and *A. stercorosus* (Scriba, 1791) is that they have very similar morphological structures. However, some morphological structures can be used as a tool to determine the difference of the species such as ridges out side of the posterior tibia - *A. stercorosus* have two complete, transverse ridges including the apical edge of the tibia, while *G. stercorarius* have posterior tibiae each with three complete, sharp-edged, transverse ridges on the outer sides (Figure 4).



Figure 4. Two complete, transverse ridges of *A. stercorosus* (Photo: Dariusz Kowalczyk [26])

Definitely, BLAST analysis of partial CO1 nucleotide sequences of *G. stercorarius* (GB Accession HQ954132) *G. spiniger* (GB Accession KU918910) *A. stercorosus* (GB Accession KU910154) and *Lethrus apterus* (GB Accession MW402935) gathered from NCBI database clearly demonstrated the taxonomic status of species mentioned. Identity rates of nucleotide sequences were as follows; *G. stercorarius* and *G. spiniger* (93%); *G. stercorarius* and *A. stercorosus* (88%). Nucleotide sequence of *L. apterus* was used as outgroup in UPGMA dendrogram (Figure 5) created by CLUSTAL X v. 2.1.

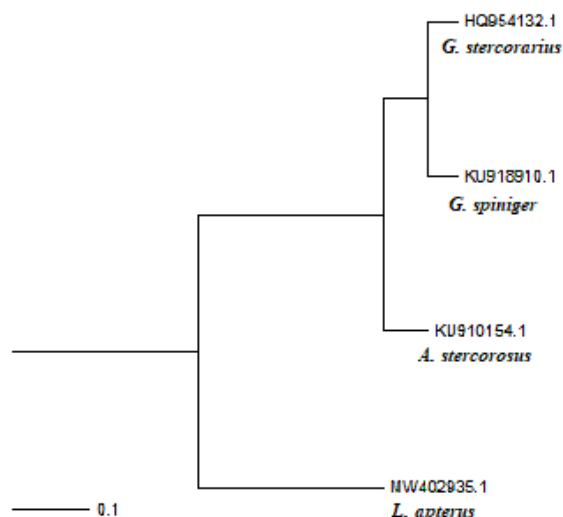


Figure 5. UPGMA dendrogram of CO1 nucleotide sequences of species

As a result of the BLAST analysis, nucleotide arrangements of *G. stercorarius* and *G. spiniger* were closely related but arrangement of *A. stercorosus* was highly differentiated. For this reason, it is appropriate to evaluate the current taxonomic status of genus *Anoplotrupes* separately.

#### Acknowledgements

I would like to thank Dr. Ali Kemal BİRĞÜCÜ for permitting to examine the materials in the museum “EMIT”.

#### References

- [1] Jameson, M. L. (2002). 29. GEOTRUPIDAE Latreille 1802. *American Beetles, Volume II: Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea*, 2, 23.
- [2] Booth, R. G., Cox, M. L., & Madge, R. B. (1990). *IIE guides to insects of importance to man. 3. Coleoptera*. CAB International.
- [3] Bertone, M. A. (2004). Dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae and Geotrupidae) of North Carolina cattle pastures and their implications for pasture improvement.
- [4] Bertone, M., Green, J., Washburn, S., Poore, M., Sorenson, C., & Watson, D. W. (2005). Seasonal activity and species composition of dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae and Geotrupidae) inhabiting cattle pastures in North Carolina. *Annals of the Entomological Society of America*, 98(3), 309-321.
- [5] Byk, A., & Semkiw, P. (2010). Habitat preferences of the forest dung beetle *Anoplotrupes stercorosus* (Scriba, 1791)(Coleoptera: Geotrupidae) in the Białowieża Forest. *Acta Scientiarum Polonorum Silvarum Colendarum Ratio et Industria Lignaria*, 9(3-4), 17-28.
- [6] Japoshvili, G., Kaya, M., Aslan, B., & Karaca, I. (2009). Coleoptera diversity and abundance in Golcuk Natural Park, in Isparta, Turkey. *Entomologia Hellenica*, 18, 47-55.
- [7] Zunino, M. (1984). Sistematica generica dei Geotrupinae (Coleoptera, Scarabaeoidea: Geotrupidae), filogenesi della famiglia e considerazioni biogeografiche. *Boll Mus Reg Sci Nat Torino*, 2, 9-162.
- [8] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- [9] Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- [10] de Jong, Y., Verbeek, M., & Michelsen, V. (2014). Per de Place Bjørn, Los W, Steeman F, et al. Fauna Europaea—all European animal species on the web. *Biodivers Data Journal*, 2, e4034.
- [11] Gömlek, E. (2018). *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (Avşar) kampüsünde Coleoptera faunası üzerine bir çalışma*. (Yayımlanmamış Master Tezi). Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- [12] Burakowski, B., Mroczkowski, M., & Stefańska, J. (1983). Chrzyszczce – Coleoptera. Scarabaeoidea, Dascilloidea, Byrrhoidea i Parnoidea [Beetles – Coleoptera. Scarabaeoidea, Dascilloidea, Byrrhoidea and Parnoidea]. *Katal. Faun. Pol.*, 23, 9.
- [13] Zümreoğlu, Gül, S. (1972). İzmir Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, Böcek ve Genel Zararlılar Kataloğu. 1928–1969 (I.Kısım). T.C.tarım Bakanlığı, Zir. Müc. Zir. Kar. Gen. Müd. Mesleki Kitaplar Ser. İzmir Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü. 119 s.
- [14] Tuatay, N., Kalkandelen, A., & Çağatay, N. 1972. Nebat Koruma Müzesi Böcek Kataloğu (1961-1971). Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları Mesleki Kitaplar Serisi, Ankara. 119 s.
- [15] Lodos, N., Önder, F., Pehlivan, E., Atalay, R., Erkin, E., Karsavuran, Y., Tezcan, S., & Aksoy, S. (1999). *Faunistic Studies on Scarabaeoidea (Aphodiidae, Cetoniidae, Dynastidae, Geotrupidae, Glaphyridae, Hybosoridae, Melolonthidae,*

- Ochodaeidae, Rutelidae, Scarabaeidae*(Coleoptera) of Western Black Sea, Central Anatolia and Mediterranean Regions of Turkey. Ege Üniversitesi Basımevi. Bornova, İzmir, 64 pp.
- [16] Şenyüz, Y., & Şahin, Y. (2009). Faunistic studies on Cetoniinae, Dynastinae, Melolonthinae, Rutelinae (Coleoptera: Scarabaeidae) Geotrupinae (Geotrupidae) of Kütahya province, Turkey. *Munis Entomology & Zoology*, 4(2), 536-541.
- [17] Polat, A., Ziani, S., & Yıldırım, E. (2018). A contribution to the knowledge of the Geotrupidae, Trogidae, and Hybosoridae fauna of Turkey (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Entomofauna*, 39 (2), 591-596.
- [18] Pehlivan, E. (1992). Türkiye Scarabaeoidea faunası üzerinde genel bir değerlendirme. Türkiye II.Entomoloji Kongresi Bildirileri. Adana, 595-605.
- [19] Anlaş, S., Keith, D., & Tezcan, S. (2011). Notes on the seasonal dynamics of some coprophagous Scarabaeoidea (Coleoptera) species in Manisa province, western Anatolia. *Türk. entomol. derg*, 35(3), 447-460.
- [20] Carpaneto, G. M., Piattella, E., & Pittino, R. (2000). The scarab beetles of Turkey: an updated checklist and chorotype analysis (Coleoptera, Scarabaeoidea). *Biogeographia–The Journal of Integrative Biogeography*, 21(1), 217-240.
- [21] Löbl, I., & Smetana, A. (2006). Catalogue of Palaearctic Coleoptera. Volume 3. *Scarabaeoidea - Scirtoidea - Dascilloidea - Buprestoidea - Byrrhoidea*. Stenstrup, Denmark: Apollo Books.
- [22] Keith, D. (2008). Observations sur quelques Scarabaeoidea de Turquie. *Biocosme Méditerranéen*, 25(2), 63-69.
- [23] Karaca, İ., Karsavuran, Y., Avcı, M., Demirözer, O., Aslan, B., Sökeli, E., & Bulut, H. S. (2006). Faunistic studies on Coleoptera species of Isparta province (Turkey). *Süleyman Demirel University, Journal of Science and Technology Institute*, 10, 180-184.
- [24] Aslan, B., & Karaca, I. (2012). Insect fauna of Kovada Lake National Park Basin (Isparta, Turkey). *Türk. entomol. derg*, 36(4), 473-489.
- [25] Zoological Institute of Russian Academy of Sciences. (2021). *Anoplotrupes stercorosus* Retrieved from *Anoplotrupes stercorosus* (Hartm. in Scriba, 1791) (Geotrupidae) - атлас жуков-землероев России (zin.ru)
- [26] Wikipedia contributors. (2021, January 1). *Anoplotrupes stercorosus*. In Wikipedia, The Free Encyclopedia. Retrieved from [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Anoplotrupes\\_stercorosus&oldid=997576842](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Anoplotrupes_stercorosus&oldid=997576842)



## Determination of the foraging plants of *Bombus terrestris* (L.1758) (Hymenoptera: Apidae) through the pollen grains found in their nest materials

Çiğdem ÖZENİRLER \*<sup>1</sup>  
ORCID: 0000-0003-0390-2416

<sup>1</sup> Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Uygulamalı Biyoloji A.B.D. 06800 Ankara, Türkiye

### Abstract

*Bombus terrestris* (L. 1758) is the most common bumblebee species in the Palearctic region. This taxon is classified in the subgenus *Bombus* (s.str.). This species is from short-tongued bumblebees and their food preferences are relatively shallow corolla plants. It is categorized as a highly polylectic species collected from hundreds of different plants. However, there is relatively little data about Turkey. Within the scope of the study, the nest of *Bombus terrestris* species detected in Hacettepe University -Beytepe Campus was examined entomopalynologically. In order to reveal the plant-pollinator relationship network, the nest material was brought to the laboratory after the excavation was carried out close to the end of the bee activity and stored at +4 °C. Microscopic slides were prepared using Wodehouse method from the nest material to determine the plants used as protein source during the season and investigations were made. Pollens belonging to the *Diplotaxis* spp., Brassicaceae, *Carduus* spp., *Centaurea* spp., *Cichorium* spp., *Eryngium* spp., *Isatis* spp., *Linaria* spp., *Lotus* spp. *Onobrychis* spp., *Plantago* spp. and *Trifolium* spp. taxa were detected. Knowing the biology and food preferences of pollinator insects will help us both in the protection of ecosystem diversity and in agricultural activities. In this context, it is recommended to conduct more detailed studies on the foraging plants of insects.

**Keywords:** *Bombus terrestris*, entomopalynology, systematic

----- \* -----

### *Bombus terrestris* (L. 1758) (Hymenoptera: Apidae) türünün beslendiği bitkilerin yuva materyallerinde bulunan polenler aracılığıyla tespit edilmesi

### Özet

*Bombus terrestris* (L. 1758), bombus arılarının Palearktik bölgede en çok yayılış gösteren türüdür. *Bombus* (s.str.) altcinsi içerisinde sınıflandırılan bu tür, kısa dilli bombus arılarından olup besin tercihleri de görece sığ korollalı bitkilerdir. *Bombus terrestris* yüksek polilektik bir tür olarak kategorize edilmektedir. Bugüne kadar yapılan sistematik çalışmalarında çok sayıda farklı bitki üzerinden toplandığına dair kayıtlar mevcuttur. Ancak Türkiye’de yapılan çalışmalar incelendiğinde, türün besin tercihleri hakkında görece az veri bulunduğu görülmektedir. Çalışma kapsamında Hacettepe Üniversitesi Beytepe Yerleşkesi içerisinde tespit edilen *Bombus terrestris* türüne ait yuva entomopalinolojik olarak incelenmiştir. Bitki-polinatör ilişki ağının ortaya konulabilmesi adına arıların yuvalarında depoladıkları polenler incelenmiştir. Arı aktivitesinin bitimine yakın zamanda- geç sonbaharda gerçekleştirilen kazı işlemi sonrası, yuva materyali laboratuvara getirilerek +4 °C’de saklanmıştır. Sezon boyunca besin olarak kullanılan bitkilerin tespiti için yuva materyalinden Wodehouse yöntemi ile preparatlar hazırlanarak incelemeler yapılmıştır. Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde *Diplotaxis* spp., Brassicaceae, *Carduus* spp. , *Centaurea* spp., *Cichorium* spp., *Eryngium* spp., *Isatis* spp. , *Linaria* spp., *Lotus* spp *Onobrychis* spp., *Plantago* spp. ve *Trifolium* spp. taksonlarına ait polenler tespit edilmiştir. Tozlaştırıcı canlıların biyolojilerinin ve besin tercihlerinin bilinmesi, bizlere hem ekosistem çeşitliliğinin korunmasında hem de tarım faaliyetlerinde yardımcı olacaktır. Bu kapsamda polinatör böceklerin beslenme davranışlarına ilişkin daha ayrıntılı çalışmaların yapılması önerilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Bombus terrestris*, entomopalinoloji, sistematik

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903122978055; Fax: +903122992028; E-mail: cozenir@hacettepe.edu.tr



## 1. Giriş

Dünyada 250'nin üzerinde tür ile temsil edilen *Bombus* cinsi [1], Palaearktik, Nearktik, Oriental ve Neotropik bölgelerin özellikle alpin, subalpin ve arktik kuşaklarında yayılış gösterir [2]. Türkiye'nin de içinde bulunduğu Batı Palaearktik bölgede 121, Türkiye'de ise 45 tür saptanmıştır [3]. Bu tür çeşitliliği ile Batı Palaearktik'te tür sayısı bakımından en zengin ülke konumundadır [4].

*Bombus* cinsi sistematik olarak 15 altcinsine ayrılmıştır [5]. *Bombus* (s.str.) altcinsi, Dünya'da 17 tür [6], Türkiye'de ise *Bombus terrestris* (L., 1758), *B. lucorum* (L., 1761) ve *B. cryptarum* (Fabricius, 1775) olmak üzere üç tür ile temsil edilmektedir [7]. *Bombus* (s. str.) taksonundaki bombus arıları kısa dilli olup, yayılış gösterdikleri habitatlar dağlık ovalar, orman açıklıkları ve step çayırları gibi geniş bir spektrumu kapsamaktadır [1].

*B. terrestris* türü dünyada en geniş yayılış alanına sahip bombus arısıdır. Yüksek polilektik bir tür olarak da kategorize edilmektedir. Kitlesel üretiminin görece kolaylığı ve kolonideki birey sayısının yoğunluğu bombus arıları içinde yetiştiriciliği en fazla yapılan ve polinasyonda en çok kullanılan tür olmasına sebep olmuştur [8-9].

*Bombus terrestris* (L., 1758) ve *B. lucorum* (L., 1761) türleri toprak altında daha önceden var olan - genellikle de önceden kemirgen yuvası olarak kullanmış alanları yuva alanı olarak tercih ederler [10]. Primitif eusosyal biçimde yaşayan böceklerdir. İlkbaharda kış uykusundan uyanan kraliçe yeni bir koloni oluşturur. Koloniler, genellikle, bir yıllıktır ve yalnızca kraliçe döllenmiş halde kışı geçirir. Uygun yuvayı bulan kraliçe bu yuvaların içerisi sap, saman, yaprak ve benzeri maddelerle kaplar ve küçük bir koloni kurar. Tarlacı bireylerin topladığı nektar ve polen, gelişmekte olan koloninin larva ve genç bireyleri için besin kaynağıdır. Yuvaya taşınan besin, potlar içerisinde depolanır [10].

Entomofilik bitkilerin çiçeklenme dönemleri süresince tozlaştırıcı arılarla olan etkileşimlerinin gözlenmesi, tozlaştırıcı arıların ilgili bitki üzerindeki beslenme davranışlarının ortaya konması bitki-polinatör ilişkisinin ortaya konulabilmesi açısından önemlidir.

*Bombus* arılarının hangi bitkiler üzerinden beslendiğine dair bilgiler genel anlamda anlık veriler içermektedir. Yapılan faunistik çalışmaların çoğunda, arının bitki üzerinde beslenirken görülmesi, arı ile birlikte bitkinin de örneklenmesi ve müze materyali haline getirilen örneklemin etiket bilgisi içeriğine hangi bitki üzerinden toplandığının da eklenmesiyle oluşmuş bir bilgi birikimi söz konusudur [3,11, 12, 13, 14].

Yapılan çalışma kapsamında farklı bir yol izlenerek, yuva materyali sezon sonunda incelenmiş ve koloninin belirli bir alan içerisinde- bir jenerasyon süresince besin tercihleri ortaya konulmuştur.

## 2. Materyal ve yöntem

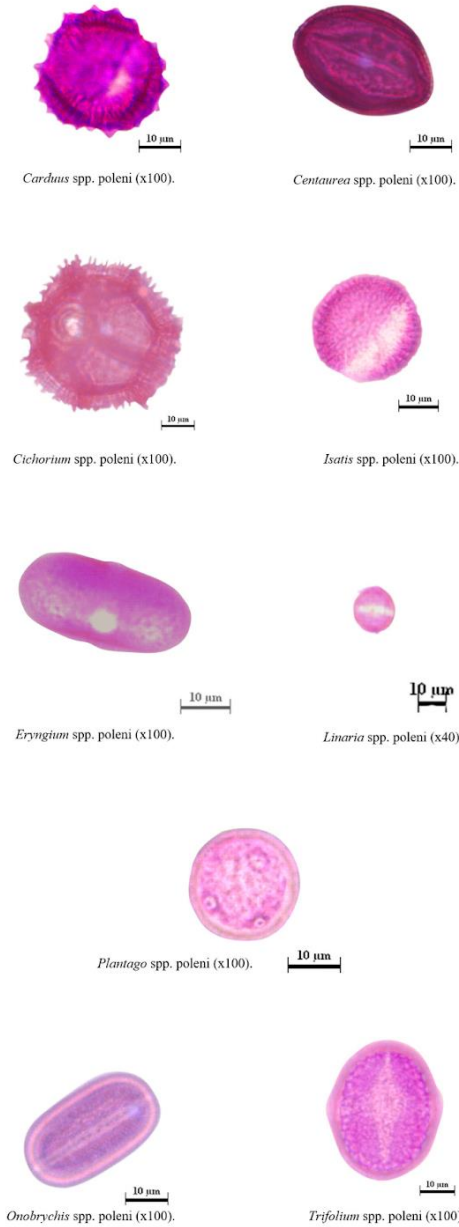
Çalışma kapsamında Beytepe Yerleşkesi içerisinde tespit edilen *Bombus terrestris* türüne ait yuva (39°87'209''K, 032°73'590''D; 1030 m) incelenmiştir. Erken sonbahar döneminde tarlacı bireylerin giriş-çıkışları takip edilerek yuva yeri tespit edilmiştir. Yuvaya gelen bireylerin birden fazla giriş deliği kullandıkları saptanmıştır. Tespit edilen yuva giriş deliklerinden koloni tarafından en yoğun olarak kullanılanı üzerinden yuva içi materyaline ulaşılmaya çalışılmıştır. Kazı sırasında yuva dağıldığından toprak ve yuva içi materyali birlikte alınarak incelemeler için Hacettepe Üniversitesi Arı Ürünleri ve Palinoloji Laboratuvarı'na getirilmiş ve +4 °C'de saklanmıştır.

Kurutma kağıdı üzerine ince bir tabaka olarak yayılan materyal üzerinden 10 farklı alan rastgele seçilmiş ve iğne ucuna alınan bazık fuksinli gliserin jelatinin bu alanlara teması sağlanarak her bir alan için üçer preparat hazırlanmıştır.

Her örnek Wodehouse yöntemi ile preparat haline getirilmiştir [15]. Preparatlar, oluşturulan kodlama sistemi çerçevesinde verilen kod numaraları ile etiketlenmiştir. Polenlerin teşhisleri Nikon Eclipse E400 model mikroskop ile çeşitli polen teşhis anahtarları kullanılarak yapılmıştır [16, 17, 18]. Polenler, Olympus marka BX70 model mikroskoba bağlı görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmıştır.

## 3. Bulgular

Yuva içi materyali üzerinden alınan polen örneklerinin bitkisel orijin tespiti sonucunda Asteraceae familyasından *Carduus* spp., *Centaurea* spp., *Cichorium* spp., Brassicaceae familyasından *Isatis* spp., Apiaceae familyasından *Eryngium* spp., Plantaginaceae familyasından *Linaria* spp., *Plantago* spp., Fabaceae familyasından *Onobrychis* spp., *Trifolium* spp. taksonları bulunmuştur (Şekil.1).



Şekil 1. Yuva materyali içerisinde tespit edilen polenler

#### 4. Sonuçlar ve tartışma

Türkiye özelinde, *Bombus terrestris* türünün bitki tercihleri ile ilgili kayıtlar incelendiğinde *Vitex agnus-castus* L., *Arbutus unedo* L., *Eriobotrya japonica* Thunb., *Lupinus varius* L., *Clematis cirrhosa* L., *Pyrus elaeagrifolia* Pallas, *Lotus corniculatus* L., *Anchusa azurea* Miller, *Echium angustifolium* Miller, *Echium italicum* L., *Arbutus andrachne* L., *Coronilla emerus* L., *Quercus* spp., *Ptilostemon chamaepeuce* (L.) Less, *Salvia fruticosa* Miller, *Carduus nutans* L., *Alcea pallida* Waldst.& Kit., *Salvia virgata* Jacq., *Hypericum scabrum* L., *Cephalaria dipsacoides* Boiss.& Balansa, *Gonocytisus angulatus* L., *Delphinium peregrinum* L., *Echinops ritro* (Boiss.) Hall., *Anagyris foetida* L., *Rosa canina* L., *Jasminium fruticans* L., *Fumaria officinalis* L., *Vicia sativa* L., *Coronilla varia* L., *Pterocephalus plumosus* (L.) Coulter, *Astragalus tmoleus* Boiss., *Salvia tomentosa* Miller, *Medicago sativa* L., *Sideritis pisidica* Boiss.& Heldr. Apud Bentham, *Clematis cirrhosa* L., *Acer sempervirens* L., *Styrax officinalis* L., *Potentilla recta* L., *Malva sylvestris*

L., *Lotus corniculatus* L., *Convolvulus scammonia* L., *Rubus sanctus* Schreber, *Umbilicus erectus* DC., *Opopanax hispidus* (Friv.) Gris., *Rhus coriaria* L., *Melissa officinalis* L., *Centaurea solstitialis* L., *Clematis flammula* L., *Althaea cannabina* L. [11]; *Symphytum asperum* Lepechin, *Anchusa officinalis* L., *Echinops orientalis* Trautv. [3,18] olarak bir veri setine ulaşılmaktadır.

*Bombus terrestris* ile yürütülmüş kontrollü polinasyon çalışmaları kapsamında ticari kolonilerin besin tercihlerinin ortaya konabilmesi için yapılan entomopalinolojik çalışmalar bulunmaktadır. Bu kapsamda yürütülen çalışmalarda yuvaya dönen tarlacı arıların yakalanması, canlı arıdan polen yüklerinin alınması-serbest bırakılması [20] ve çiçeklenme sonrasında yuva içindeki polen depolarının incelenmesi [21] ile polen toplanan bitkilerin tespiti gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda hedef bitki olan *Prunus avium* ve *Lycopersicon esculentum* polenleri tespit edilmiştir.

BeYTEPE Yerleşkesi'nde gerçekleştirilen çalışma kapsamında türün yuva materyali sezon sonunda incelenmiş ve belirli bir alan içerisindeki besin tercihleri ortaya konulmuştur. Bu kapsamda Asteraceae familyasından *Carduus* spp., *Centaurea* spp., *Cichorium* spp., Brassicaceae familyasından *Isatis* spp., Apiaceae familyasından *Eryngium* spp., Plantaginaceae familyasından *Linaria* spp., *Plantago* spp., Fabaceae familyasından *Onobrychis* spp., *Trifolium* spp. taksonları bulunmuştur.

BeYTEPE Yerleşkesi sınırları içerisindeki flora, doğal olarak yayılış gösteren bitkilerden 56 familyaya ait 329 taksa ve peyzaj bitkisi olarak kullanılan 76 taksadan oluşmaktadır [22]. Tür özelinde yapılan gözlemler ve araştırmalarda, *Bombus terrestris*'in yuva yakınındaki bitkisel kaynaklardan (yaklaşık 50 metre çapında) beslendiği, kaynak yetersizliğinde ise 3000 metre çapında yayılış gösterebildiği belirtilmiştir [10]. Çalışma sonucunda yuva içinde tespit edilen polenler ile yuva etrafında yakın çevrede yayılış gösteren bitkilerin uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Yüksek polilektik bir takson olan *Bombus terrestris* türünün ülkemizdeki geniş yayılış alanı da göz önünde bulundurulduğunda besin tercihleri ile ilgili olarak daha farklı bitki türleri ile de karşılaşılacağı aşikârdır. Bu bağlamda literatür verisinde bulunmayan *Cichorium* spp., *Isatis* spp., *Eryngium* spp. ve *Linaria* spp. ve *Plantago* spp. türlerine ait yeni kayıtların çalışma alanının da içinde bulunduğu İran-Turan fitocoğrafik bölgesinde tür ile yapılan görece az sayıda çalışma bulunması ile ilişkilendirilebilir.

Tozlaştırıcı canlıların biyolojilerinin ve besin tercihlerinin bilinmesi, bizlere hem ekosistem çeşitliliğinin korunmasında hem de tarımsal faaliyetlerde yardımcı olacaktır [23]. Bu kapsamda *Bombus terrestris* gibi polen depolama davranışları olan polinatör böceklerin beslenme davranışlarına ilişkin, yalnızca anlık verilere değil yuvaları ile ilgili daha ayrıntılı çalışmalara yönelmek sistematik anlamında fayda sağlayacaktır.

## Teşekkür

Yuva alanında yapılan çalışmalarda yardımcı olan arkadaşlarıma, Hacettepe Üniversitesi Yapı İşleri ve Teknik Daire Başkanlığı'na (BeYTEPE), Alp Yiğit Özdemir ve Deniz Altunyurt'a teşekkür ederim.

## Kaynaklar

- [1] Wang, L. H., Liu, S., Tang, Y. J., Chen, Y. P., Wu, J., & Li, J. L. (2020). Using the combined gene approach and multiple analytical methods to improve the phylogeny and classification of *Bombus* (Hymenoptera, Apidae) in China. *ZooKeys*, 1007, 1.
- [2] Cameron, S. A., & Williams, P. H. (2003). Phylogeny of bumble bees in the New World subgenus *Fervidobombus* (Hymenoptera: Apidae): congruence of molecular and morphological data. *Molecular phylogenetics and evolution*, 28(3), 552-563.
- [3] Rasmont, P., & Iserbyt, I. (2010-2014). Atlas of the European Bees: genus *Bombus*. 3<sup>rd</sup> Edition. STEP Project, *Atlas Hymenoptera*, Mons, Gembloux.
- [4] Aytekin, M. A., Terzo, M., Rasmont, P., & Çağatay, N. (2007). Landmark based geometric morphometric analysis of wing shape in *Sibiricobombus* Vogt (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* Latreille). *Annales de la Société Entomologique de France*, (Vol. 43, No. 1, pp. 95-102). Taylor & Francis Group.
- [5] Williams, P. H., Cameron, S. A., Hines, H. M., Cederberg, B., & Rasmont, P. (2008). A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). *Apidologie*, 39(1), 46-74.
- [6] Rasmont, P., Coppée, A., Michez, D., & De Meulemeester, T. (2008). An overview of the *Bombus terrestris* (L. 1758) subspecies (Hymenoptera: Apidae). *Annales de la Société entomologique de France*, 44(2), 243-250.
- [7] Rasmont P., Aytekin A.M., Kaftanoğlu O. & Flagotherier D., (2009). *The bumblebees of Turkey*. Atlas Hymenoptera, Université de Mons, Gembloux Agro-Biotech, Mons, Gembloux, <http://www.atlashymenoptera.net/page.aspx?ID=103>.
- [8] Velthuis, H. H. (2002). The historical background of the domestication of the bumble-bee, *Bombus terrestris*, and its introduction in agriculture. *Pollinating Bees-The conservation link between agriculture and nature*. Ministry of Environment, Sao Paulo, Brasil, 177-184.
- [9] Velthuis, H. H., & Van Doorn, A. (2006). A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, 37(4), 421-451.
- [10] Goulson, D. (2010). *Bumblebees: behaviour, ecology, and conservation*. Oxford University Press on Demand.

- [11] Gürel, F., Gösterit, A. Y. H. A. N., & Eren, Ö. (2008). Life-cycle and foraging patterns of native *Bombus terrestris* (L.)(Hymenoptera, Apidae) in the Mediterranean region. *Insectes Sociaux*, 55(2), 123-128.
- [12] Barkan, N. P., & Aytekin, A. M. (2013). Systematical studies on the species of the subgenus *Bombus* (*Thoracobombus*)(Hymenoptera: Apidae, *Bombus* Latreille) in Turkey. *Zootaxa*, 3737(2), 167-183.
- [13] Koyuncu, K. (2014). Türkiye *Bombus* Altıncısı (Hymenoptera: Apidae, *Bombus* Latreille, S. Str.) Türleri Üzerinde Sistemik Araştırmalar ve Bunların Tozlaştırıcı Etkileri Üzerine Çalışmalar.
- [14] Özgişi, B. D., & Dikmen, F. (2020). Contributions to *Bombus* Latreille (Hymenoptera: Apoidea: Apidae) Fauna of Eskişehir Province of Turkey. *Mellifera*, 20(2), 77-88.
- [15] Woodhouse, R. P. (1935). Pollen grains, their structure, identification and significance in science and medicine.
- [16] Ricciardelli d'Albore, G. (1997). Textbook of melissopalynology. *Apimondia, Bucharest*.
- [17] Sorkun, K. (2008). *Türkiye'nin nektarlı bitkileri, polenleri ve balları*. Palme Yayıncılık.
- [18] Moore, P. D., Webb, J. A., & Collison, M. E. (1991). *Pollen analysis*. Blackwell scientific publications.
- [19] Özbek, H. (1997). Türkiye'nin bambuları faunası ve türlerin dağılım haritaları [Hymenoptera: Apidae: Bombinae] Kısım 1: *Alpigenobombus* Skortkov, *Bombus* Robertson ve *Bombus* Latreille. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 21(1).
- [20] Özenirler Ç., & Aytekin A. M. (2010). Bumblebee (*Bombus terrestris* L. 1758) pollination of cherry (*Prunus avium* L.) fields in Afyonkarahisar and Ankara, Turkey. *EurBee4. 4<sup>th</sup> European Conference of Apidology*. Ankara. 7-9 Sept. 2010. p. 138.
- [21] Dabak, T., & Özenirler, Ç. (2018). Using Commercial Bumblebees in The Pollination of Field Grown Tomatoes A Case Study:“Caged Tomatoes in Open Fields”. *Mellifera*, 18(1), 15-21.
- [22] Akaydın, G. (2011). *Beytepe bitkileri*. Hacettepe Üniversitesi Basımevi.
- [23] Suhail, A. , Sabir, A. M., Asghar, M. , Rafi, M. A. & Qadir, A. (2009). Geographic distributional patterns of the genus *Bombus* Bombini, Apidae: Hymenoptera in northern Pakistan . *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma* , 2 (1) , 1-9.



## Endemic *Verbascum deterrente* Boiss. & Heldr.'s (Scrophulariaceae) Anatomical Features

Sevim Küçük<sup>\*1</sup>, Akın Elmaskaya<sup>1</sup>, Ramazan Süleyman Göktürk<sup>2</sup>  
ORCID: 0000-0002-3594-0364; 0000-0003-3744-7562; 0000-0002-1959-7578

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, 26470 Eskişehir, Turkey

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Akdeniz University, Antalya, Turkey

### Abstract

*Verbascum deterrente* Boiss. & Heldr is a member of the *Verbascum* L. (Scrophulariaceae) genus known as "Sığırkuyruğu". It is an endemic species that grows in Turkey which is a center of endemism for *Verbascum* species. Some *Verbascum* species are used in folk medicine to relieve menstrual pain, rheumatism, ear pain, and to treat hemorrhoids, arteriosclerosis, lung, diabetes and animal wounds. Today, it is grown for tea, tincture and natural medicine production. It has been reported to be used against bronchitis, cough, hoarseness, toothache, cramps and diarrhea in the past. In this study, the anatomical structure of the endemic *V. deterrente* species, which is called "zinemit" and used as a folk medicine in Anatolia, was illuminated with cross sections taken from the root, stem and leaves.

**Key words:** *Scrophulariaceae*, *Verbascum deterrente*, anatomy, endemic

----- \* -----

### Endemik *Verbascum deterrente* Boiss. & Heldr.'nin (Scrophulariaceae) anatomik özellikleri

#### Özet

"Sığır kuyruğu" olarak bilinen *Verbascum* L. (Scrophulariaceae) cinsi içinde yer alan *Verbascum deterrente* Boiss. & Heldr. türü ülkemiz için endemik bir türdür. Türkiye, *Verbascum* cinsi için bir endemizm merkezidir. Bazı *Verbascum* türleri halk arasında adet sancısını, romatizma ve kulak ağrılarını gidermede, hemoroide karşı, akciğer ve şeker hastalığının tedavisinde, damar sertliğine karşı ve hayvan yaralarını tedavi etmekte kullanıldığı, günümüzde çay, tentür ve doğal ilaç imalatı için özel olarak yetiştirildiği; geçmişte bronşit, öksürük, ses kısılması, diş ağrısı, kramplar ve ishale karşı kullanıldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada Anadolu'da "zinemit" olarak adlandırılan ve halk ilacı olarak kullanılan endemik *V. deterrente* türünün kök, gövde ve yapraklarından alınan enine kesitlerle anatomik yapısı aydınlatılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Scrophulariaceae*, *Verbascum deterrente*, anatomi, endemik

#### 1. Giriş

*Verbascum* L. (Sığırkuyruğu) cinsi, Scrophulariaceae (Sıracotugiller) dünya'da yaklaşık 360 tür, Türkiye'de ise 130'u hibrit, 13 grup altında toplam 341 tür içermektedir. Endemik tür sayısı yaklaşık 200, endemizm oranı %80'dir [1-3]. Cins ülkemiz için gen ve endemizm merkezi olup, genel olarak Doğu, Güney ve İç Anadolu'da yayılış göstermektedir. İran-Turan fitocoğrafik bölgesi türlerin genel yayılış alanıdır [4]. *Verbascum* cinsi geniş yayılış alanına ve fazla tür sayısına sahiptir. Bu nedenle taksonomik problemleri olan büyük bir cinstir. *Verbascum* cinsi için 13 farklı yapay grup oluşturulmuştur. Türkiye'de yayılış gösteren *Verbascum* cinsi ile ilgili çalışmalar Huber-Morath [5, 6] ve Karavelioğulları ve Aytaç [7] tarafından yapılmış ve 10'dan fazla tür ve 6 melez tür tanımlanmıştır [8, 9].

Tarihsel süreçte Mısırlılar ve Romalılar tarafından kullanıldığı ve öksürüğe, diş ağrısına, kramplara, bronşite, ishale ve ses kısılmasına karşı etkili olduğu kayıtlıdır. Günümüzde çay, tentür ve doğal ilaç imalatı için yetiştirildiği bilinmektedir. Halk arasında haricen doku yumuşatıcı ve hafif ağrı kesici, adet sancısını, romatizma, kulak ağrıları ve

hemoroit, akciğer, diyabet, damar sertliğini önleyici ve hayvan yaralarını iyi edici olarak kullanıldığı, dahilen balgam söktürücü ve göğüs yumuşatıcı olarak kullanıldığı kaydedilmiştir [10, 11].

Trakya’da yayılış gösteren *V. densiflorum* Bertol., Kuzey Anadolu’da yayılış gösteren *V. thapsus* L. ve Kuzeybatı ve Kuzeydoğu Anadolu’da yayılışı olan *V. phlomoides* L. türlerinin Avrupa’da da geniş kullanımı bulunmaktadır. Ayrıca bu türler, Fransız ve Türk kodeksinde kayıtlı olup, kullanılan kısımları çiçek ve yapraklardır. Temmuz-Eylül aylarında toplanıp, hava akımının olduğu gölgede kurutulan çiçeklerden “Flores Verbasci” ve yapraklardan elde edilen “Folium Verbasci” drogları saponin, müsilaj, rezin ve acı maddeler içerir [12]. Yapılan farmakolojik ve biyolojik aktivite çalışmalarında ise, bazı *Verbascum* türlerinin antihistaminik, antimikrobiyal, sitotoksik ve antioksidan etkili olduğu bildirilmektedir [13-15].

*Verbascum deterrentum* Boiss. & Heldr. türü ülkemizde “zinemit” ismi ile bilinmektedir ve Doğu Akdeniz elementidir [6,1].

*Verbascum* cinsi içerdiği çok sayıda tür sayısı ve çok farklı coğrafik bölümlerde yayılış göstermesi ve genel olarak teşhis ve taksonomisindeki sorunlardan dolayı cinse ait türlerin morfolojik, anatomik yapılarının aydınlatılması türün taksonomisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu amaçla bu çalışmada ülkemiz için endemik olan ve halk ilacı olarak kullanılan *V. deterrentum*’nin anatomik özellikleri aydınlatılmaya çalışılmıştır.

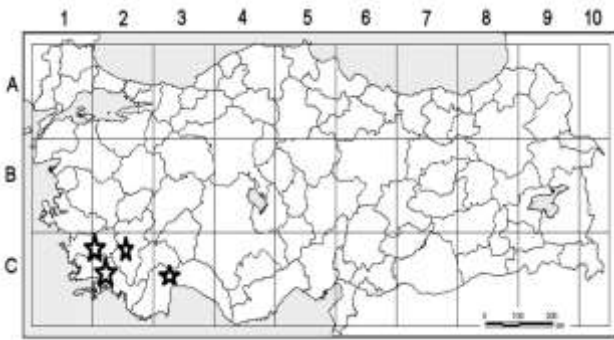
## 2. Materyal ve yöntem

### 2.1. Bitkisel Materyal

Araştırma materyali, 13.05.2008 tarihinde, C3 Antalya: Kemer’den Çıralı-Maden arası (360 25’ 20’’ N, 300 28’ 72’’E), kızılçam ormanları ve serpantin kayalardan, 50 m’den toplanmıştır. Bitkiler numaralandırılıp herbiye örneği haline getirilerek Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (ESSE 15085) ve Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbarium’unda (AKDU Göktürk 6902) saklanılmaktadır.

### 2.2. Anatomik

%70’lik alkole alınan çiçekli bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından elle enine kesitler alınmıştır. Bu kesitler Sartur Reaktifli ile boyanıp, gliserin- jelatin ile sabitlenmiştir. Kesitlerin fotoğrafları Olympus BX 51 trinokuler dijital kameralı mikroskopta çekilmiştir.



Şekil 1. *V. deterrentum* yayılış haritası

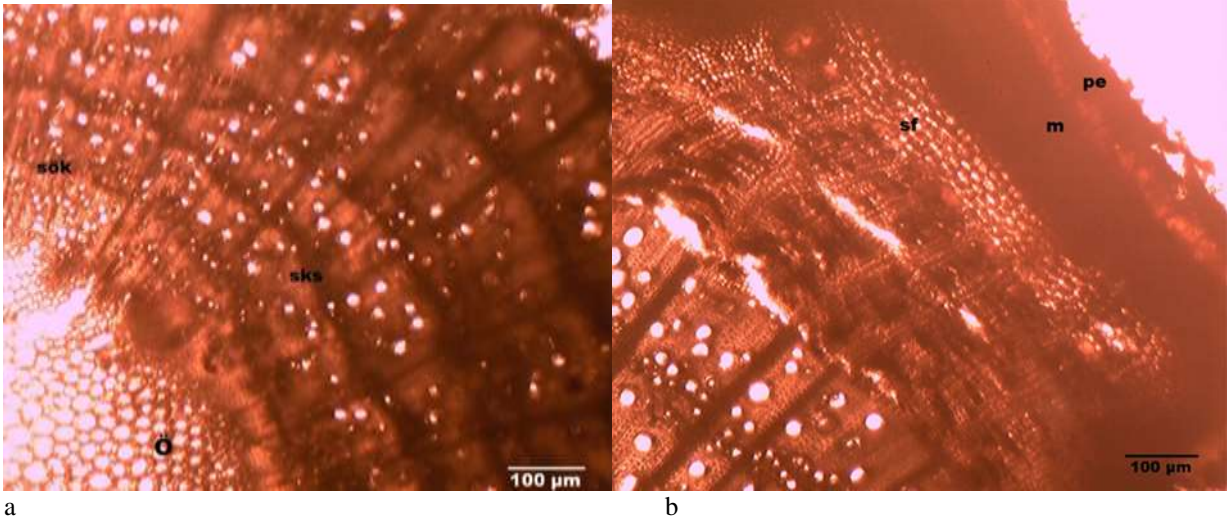


Şekil 2. *V. deterrentum* habit (Foto: R.S. Göktürk)

## 3. Bulgular

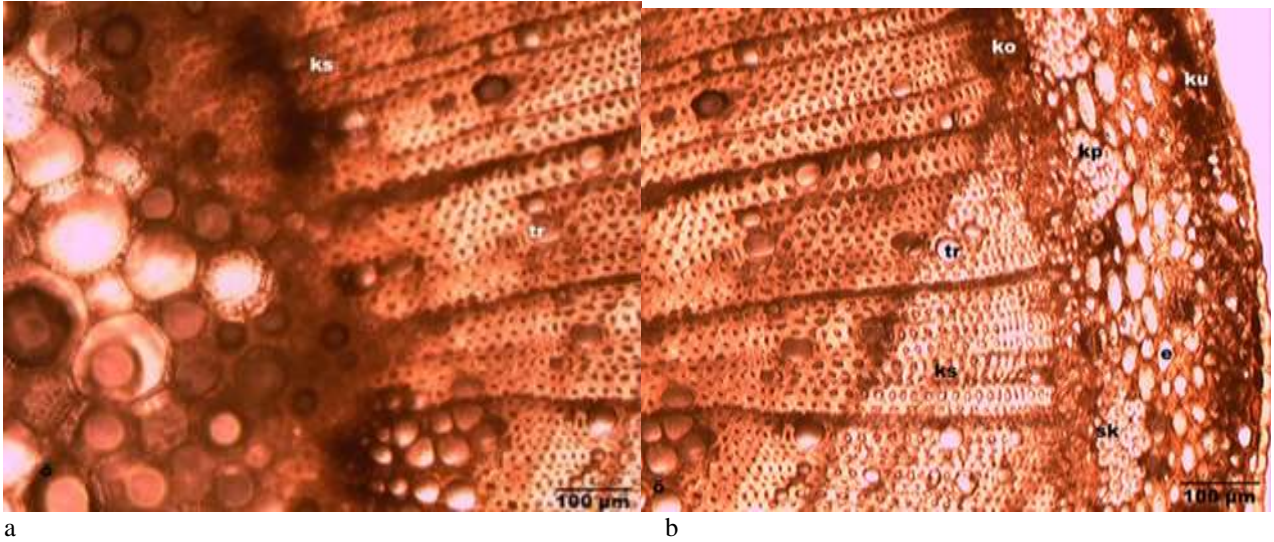
### 3.1. Kök

Sekonder gelişme gösteren kök’te, periderma, 5-9 sıra düzensiz hücreli mantar doku ile 4-8 sıra felloderma hücrelerinden meydana gelmiştir. Mantar hücreleri parçalanmış veya üzerinde yer yer ezilmiş primer kortekse ait doku kalıntılarını içermektedir. Sekonder floem peridermanın altında 4-9 sıra, düzensiz sıralı, halka şeklinde oval şekilsiz hücrelerden oluşmuştur. Kambiyum belirsizdir. Sklerankimatik doku içinde geniş bir alanı kaplayan sekonder ksilem trakeal elemanları kapsamaktadır. Öz ışınları 2-3 sıralıdır. Öz bölgesi parenkimatiktir (Şekil 3a, b).

Şekil 3 a,b. *V. deterrent* kök

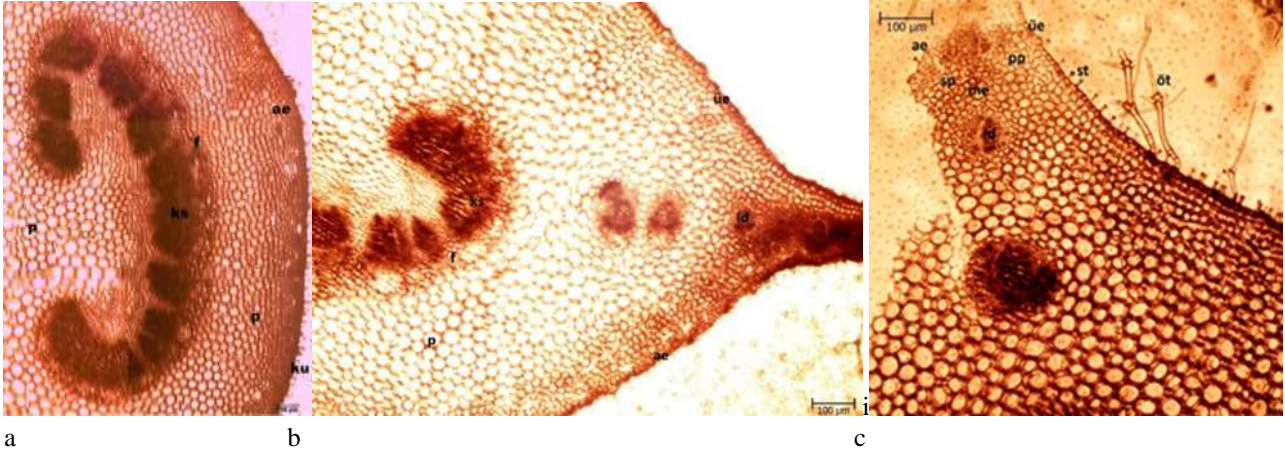
### 3.2. Gövde

Epiderma tek sıra, kalın çeperli yuvarlak- oval hücrelerden oluşmuş, üzeri ince bir kutikula ile örtülüdür. Alt ve üst çeperleri kalın, yan çeperleri incedir. Eglandular tüyler dallanmış çok hücreli şamdan tüylü, glandular tüyler 3 tip olmak üzere; sap 1 baş 1, sap 2 baş 1, sap 2 baş 2 hücrelidir. Parenkimatik korteks 8-10 hücre sırasından oluşmaktadır. Primer korteks kollenkima hücreleri ile kloroplast ve druz kristalleri içeren oval şekilli parenkima hücrelerinden oluşmaktadır. Endoderma'yı oluşturan hücreler basık ve korteks parenkimasından zor ayırt edilmektedir. Kambiyum belirsiz, floemin üzerinde 4-6 sıralı sklerankima demetleri gözlenmiştir. Floem 3-8 sıra, dar halka, ksilem'deki sklerankima hücreleri radyal yöneltide düzenli sıralanmış geniş bir halka halindedir. Öz ışınları 1-2 sıradır. Öz, çeperleri odunlaşmış, druz kristalleri taşıyan parenkima hücrelerinden oluşmuştur (Şekil 4a, Şekil 4b).

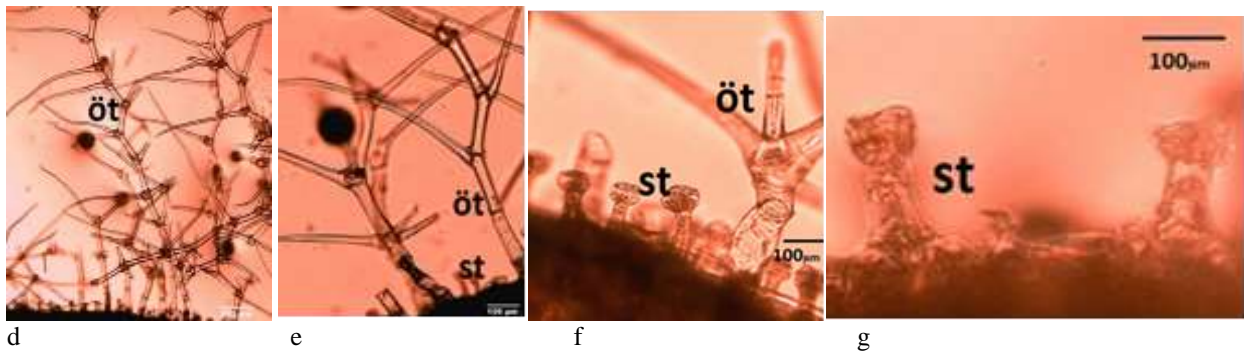
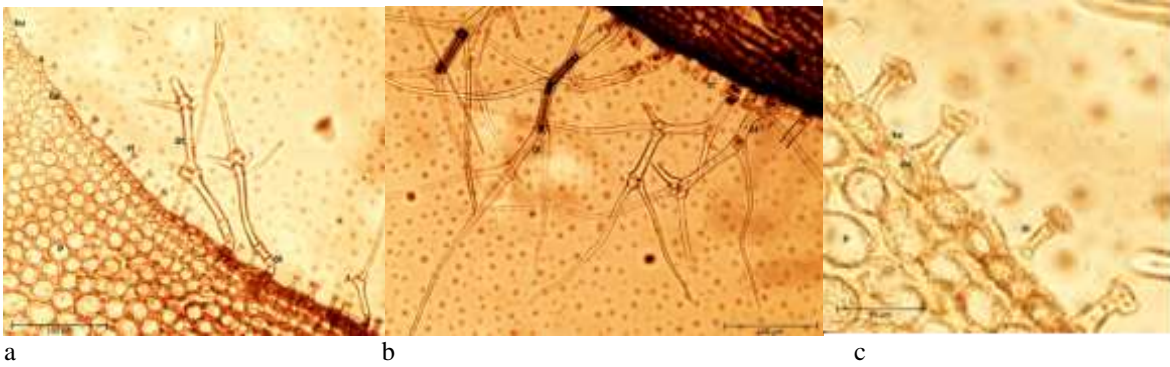
Şekil 4a,b. *V. deterrent* gövde

### 3.3. Yaprak

Üst ve alt epiderma üzeri kutikulalı, tek sıra basık, yuvarlak veya oval hücreli olup indumentum gövde ile aynıdır. Amarillis tipi stomalar, yaprağın her iki yüzünde bulunmakla birlikte alt yüzde daha yoğundur (amfistomatik), epiderma hücrelerinden daha yukarı seviyededir (higromorf stoma). Mezofil, 2-3 sıralı palizat ve 3-5 hücre sıralı sünger parenkimalıdır (bifasial yaprak). Kolateral iletim demetleri iyi gelişmiş olup, içe doğru kıvrık hilal şeklindedir. Üst epiderma ile iletim dokusu arasında 1-2 sıra kollenkima ve 12-15 sıra parenkima hücreleri, floem ile alt epiderma arasında ise 10-20 sıra parenkimatik dokusu bulunmaktadır. Üst epidermaya bakan yönde bulunan ksilem ışınal olarak dizilmiş trakeal elemanlardan oluşmuştur. Floem ksilemin altında yer alır ve alt epidermaya bakan yöndedir. (Şekil 5a, Şekil 5b).

Şekil 5a-c. *V. deterrent* yaprak

ae: alt epiderma, e: epiderma, f: floem, fe: felloderma, ko: kollenkima, kp: korteks parenkiması, ks: ksilem, ku: kutikula, m: mantar, me: mesofil, ö: öz, ö: örtü tüyü, p: parenkima, pe: periderma, pp: palizat parenkiması, s: stoma, sf: sekonder floem, sök: sekonder öz kolu, sk: sklerankima, sks: sekonder ksilem, sp: sünger parenkiması, st: salgı tüyü, tk: trakeid, tr: trake, ue: üst epiderma.

Şekil 6 a-g. *V. deterrent* örtü ve salgı tüyleri (Gövde, Yaprak)

ae: alt epiderma, e: epiderma, f: floem, fe: felloderma, ko: kollenkima, kp: korteks parenkiması, ks: ksilem, ku: kutikula, m: mantar, me: mesofil, ö: öz, ö: örtü tüyü, p: parenkima, pe: periderma, pp: palizat parenkiması, s: stoma, sf: sekonder floem, sök: sekonder öz kolu, sk: sklerankima, sks: sekonder ksilem, sp: sünger parenkiması, st: salgı tüyü, tk: trakeid, tr: trake, ue: üst epiderma.

#### 4. Sonuçlar ve tartışma

Anatomik yapısı bu çalışmada aydınlatılan endemik *V. deterrent*'nin kök anatomik yapısının sekonder gelişme gösterdiği ve koruyucu doku peridermanın, ışınal sırası bazı bölgelerde bozulmuş mantar doku ile fellodermadan oluştuğu gözlenmiştir. Öz bölgesi parenkimatiktir. Gövdede floem ve ksilem ise silindir şeklinde devamlı dokular halindedir. Yapraklar tüm taksonlarda dorsiventral ve amfistomatiktir. Yaprak amfistomatik özellik taşımaktadır. Yüzeysel kesitte; alt ve üst epiderma üzerindeki stoma hücreleri çoğunlukla 3-4 epiderma hücresi tarafından kuşatılmıştır. Mezofil tüm üst epidermanın altında yer alan 2-3 sıra halinde dizilmiş, bol kloroplastlı palizat parenkiması ile onun altında yer alan 3-5 sıra sünger parenkimasından oluşmuştur (bifasial yaprak). İletim demetleri kolateraldir. İyi gelişmiş olup, içe doğru kıvrılan hilal şeklindedir. Orta damarın her iki yanında kalın yan damarlar ayanın kenarına kadar sıralanmış olup, orta damar belirgin olarak dışa doğru derin bir çıkıntı yapmıştır. Örtü ve salgı



tüyleri gövdedeki gibi olup, her iki epidermada da gözlenmiştir. Örtü tüyleri dallanmış çok hücreli şamdan tüyledir. Salgı tüyleri 3 tiptir. Bunlar sapı 1 başı 1 hücreli, sapı 2 başı 1 hücreli, sapı 2 başı 2 hücreli salgı tüyledir.

Türe ait anatomik özellikler Lersten ve Curtis [16], Metcalfe ve Chalk [17] 'in cins üzerinde belirtilen bulgularıyla ve daha önce yapılmış çalışmalarla [13, 18-23] türlerin anatomik yapısının genel olarak uyumlu olduğu, bu türlerden *V. davisianum*'da örtü tüylerinde sadece yıldız tüy olması, 3 tip (sapı 2 başı 1, sapı 2 başı 2, sapı 3 başı 2 hücreli) salgı tüyü ve gövde parenkima hücrelerinde druz gözlenmesi, *V. pycnostachyum* türünde ise kökün öz bölgesinin parenkimatik hücrelerden oluşması 1 tip (sapı 2 başı 3) salgı tüyü ve druzların gözlenmesi, gövdede kollanmanın köşelerde daha belirgin gelişmiş olması, ayrıca *V. bellum* ve *V. davisianum* türlerinde kökün öz bölgesinin sklerankimatik olması dışında cinse ait diğer türlerle aralarında belirgin fark olmadığı gözlemlenmiştir.

Tablo 1'de bazı türlerin anatomik özellikleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Ullah ve arkadaşlarının [23] *V. thapsus* türüne ait yaprak epiderma anatomisi ile ilgili yaptıkları bir çalışmada örtü ve salgı tüylerinin dendroid çok tüylü olduğu belirtilmiştir.

*Verbascum* cinsi içerdiği çok sayıdaki tür sayısı ve çok farklı coğrafik bölümlerde yayılış göstermesi bakımından genel olarak teşhis ve taksonomisinde çeşitli sorunların olduğu bilinen en büyük cinslerden biridir. Bu bakımdan cinse ait türlerin morfolojik, anatomik yapılarının aydınlatılması türün taksonomisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Endemik bir tür olan *V. detersile* üzerinde yapılmış yapısı ile ilgili bir çalışmanın olmayışı, yapılan araştırmayı türün sistematik yönden tanıtılması ve anatomik özelliklerinin de teşhis anahtarına katkıda bulunması bakımından önemli kılacaktır.

Tablo 1. *Verbascum* türlerinin örtü ve salgı tüylerinin karşılaştırılması

	<b>Örtü tüyleri (Gövde ve Yaprak)</b>	<b>Salgı Tüyleri (Gövde ve Yaprak)</b>	<b>Kaynak</b>
<i>V. detersile</i>	Dallanmış, çok hücreli şamdan tüylü	Baş 1 sapı 1 Baş 1 sapı 2 Baş 2 sapı 2 hücreli	
<i>V. mucronatum</i>	Dallanmış, çok hücreli şamdan tüylü	Baş 1 sapı 2 Baş 2 sapı 2 Baş 3 sapı 2 Baş 1 sapı 3 Baş 2 sapı 3 hücreli, Şeffaf salgı tüylü	13
<i>V. davisianum</i>	Dallanmış, çok hücreli şamdan tüylü	Baş 1 sapı 2 Baş 2 sapı 2-3 hücreli; Şeffaf salgı tüylü	13
<i>V. leptocladum</i>	Dallanmış, çok hücreli yıldız tüylü	Baş 1 sapı 1,2,3 Baş 2 sapı 1,2,3 Baş 3 sapı 2 hücreli	13
<i>V. pestalozae</i>	Dallanmış, çok hücreli şamdan ve yıldız tüylü	Baş 1 sapı 2 Baş 2 sapı 1 Baş 3 sapı 2 Baş 1 sapı 3 Baş 2 sapı 3 hücreli Şeffaf salgı bezli	22
<i>V. pycnostachyum</i>	Dallanmış, Çok hücreli şamdan ve yıldız tüylü	Baş 1 sapı 1 Baş 2 sapı 1 Baş 3 sapı 2 hücreli (yoğun)	22
<i>V. bellum</i>	Dallanmış, çok hücreli şamdan ve yıldız tüylü	Baş 2 sapı 1, Baş 1 sapı 2, Baş 2 sapı 2, Baş 3 sapı 2 Baş 1 sapı 3 hücreli	21
<i>V. thapsus</i>	Dendroid çok hücreli	Dendroid çok hücreli	23

**Kaynaklar**

- [1] Karavelioğulları, F. A. *Verbascum* L. In: Güner, A. Aslan, S. Ekim, T. Vural, M. ve Babaç, M. T. (eds.). (2012). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul, pp. 850-870.
- [2] Karavelioğulları, F.A. Yüce, E., & Başer, B. (2014). *Verbascum duzgunbabadagensis* (Scrophulariaceae), a new species from eastern Anatolia, Turkey. *Phytotaxa* 181(1), 047-053.
- [3] Karavelioğulları, F.A. Vural, M. Şahin, B., & Aslan, S. (2014). İç Anadolu Bölgesi'nden (Türkiye) yeni bir tür: *Verbascum aydogdui* (Scrophulariaceae). *Bağbahçe Bilim dergisi*, 1(3), 63-71.
- [4] Davis, P. H. Mill, R. R. & Tan, K. (Eds), (1988). Flora of Turkey and The East Aegean Islands (Supplement), Vol.10, University Press, Edinburgh, pp.190-192.
- [5] Huber-Morath, A. (1971). Die Türkischen Verbasceen. Kommissionsverlag von Gebrüder Fretz AG, Zürich.
- [6] Huber-Morath, A. (1978). [*Verbascum* L.] In: Davis, P.H. (Ed.) Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 6. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- [7] Karavelioğulları, F. A., & Aytaç, Z. (2008). Revision of the Genus *Verbascum* L. (Group A) in Turkey. *Botany Research Journal*, 1(1), 9-32.
- [8] Karavelioğulları, F.A. (2015a). *Verbascum ibrahim-belenlii* (Scrophulariaceae), a new species from East Anatolia, Turkey. *Phytotaxa* 212(3), 246-248. DOI: 10.11646/phytotaxa.212.3.8.
- [9] Karavelioğulları, F.A. (2015b). *Verbascum misirdalianum* (Scrophulariaceae), a new species from central Anatolia, Turkey. *Phytotaxa* 217(1), 96-99. DOI: 10.11646/phytotaxa.217.1.10.
- [10] Baytop, T. (1999). Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün), 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- [11] Sinmez, Ç., & Yaşar, A. (2010). Sığırkuyruğu Bitkisinin (*Verbascum lasianthum*) Hayvanlardaki Çeşitli Deri Hastalıklarındaki Folklorik Kullanımı. *Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi*, 10, 133-139.
- [12] Çakır, T., & Bağcı, E. (2006). *Verbascum euphraticum* Bentham ve *V. melitenense* Boiss (*Scrophulariaceae*) Türleri Üzerinde Taksonomik Bir Çalışma. *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi Science and Eng. J. of Fırat Univ.* 18(4), 445-458.
- [13] Alan, S. Saltan, F. Z. Göktürk, R. S., & Sökmen, M. (2009). Taxonomical Properties of Three *Verbascum* L. Species Growing In Turkey and Their Antioxidant Activities. *Asian Journal of Chemistry*, Vol. 21.
- [14] Küçük, S. Özdemir, F. İşcan, G., & İncesu, Z. (2016). Determination of Cytotoxic and Anticandidal Activities of Three *Verbascum* L. Species from Turkey *V. cheiranthifolium* Boiss. var. *asperulum* Boiss. Murb Monorg *V. pycnostachyum* Boiss. Heldr. and *V. orgyale* Boiss. Heldr.. *Turk. J. Pharm. Sci.*, 13(3), 318-322.
- [15] Abougazar, H. Bedir, E. Khan, I. A., & Çalış, I. (2003). Wiedemannioside A-E: New Phenylethanoid Glycosides from the Roots of *Verbascum wiedemannianum*. *Planta Medica* 69(9), 814-819.
- [16] Lersten, N. R., & Curtis, J. D. (1997). Anatomy and Distribution of Foliar Idioblasts in *Scrophularia* and *Verbascum* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* 84(12), 1638-1645.
- [17] Metcalfe, G.R. & Chalk, L. (1979). Anatomy of the Dicotyledons, 1, Oxford Üniv. Press, Second edition, London.
- [18] Coşkunçelebi, K. İnceer., H., & Beyazoğlu, O. (1999). *Verbascum varians* Freyn & Sint. var. *trapezunticum* Murb. (Scrophulariaceae)'un Morfolojik, Anatomik ve Sitolojik Yönden İncelenmesi. *Ot Sistematik Bot. Dergisi*, 6(2),25-34.
- [19] Çakır, T., & Bağcı, E. (2003). *Verbascum diversifolium* Hub.-Mor. ve *V. birandianum* (Hocst. (Scrophulariaceae) Türlerinin Taksonomik Yönden Karşılaştırılması. *Ot Sistematik Dergisi*, 10(2), 107-127.
- [20] Çakır, T., & Bağcı, E. (2005). *Verbascum anatolicum* (Fisch. & Mey.) Hub.-Mor. (Scrophulariaceae)'a ait Taksonomik Karakterler Üzerinde Gözlemler. *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi*, 17 (1), 151-153.
- [21] Küçük, S. (2017). Endemik *Verbascum bellum* Hub. and Mor. (Scrophulariaceae) Türünün Anatomik Özellikleri. *Anadolu University Journal of Science and Technology C- Life Sciences and Biotechnology*, 6 (1), 22-30.
- [22] Küçük, S., Gökçe, M. B., & Göktürk, R. S. (2018). Anatomic Studies on *Verbascum pestalozzae* Boiss. and *Verbascum pycnostachyum* Boiss. & Heldr. *Turk. J. Pharm. Sci.*, 15(3),347-353.
- [23] Ullah, F., Ayaz, A., Saqib, S., Parmar, G., Bahadur, S., & Zaman, W. (2021). Taxonomic implication of leaf epidermal anatomy of selected taxa of Scrophulariaceae from Pakistan. *Microscopy Research and Technique*, 84, 521–530.



## A survey of heavy metal pollution in Ayvalık Saltern (Balıkesir-Turkey)

Güngör AY<sup>1</sup>, Murat KILIÇ<sup>\*1</sup>, Fatma KOÇBAŞ<sup>1</sup>, Fatma MUNGAN KILIÇ<sup>2</sup>

ORCID: 0000-0002-3292-4932; 0000-0002-6408-9660; 0000-0002-1053-3455; 0000-0001-6858-3458

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Celal Bayar University, Muradiye, 45140Manisa, Turkey.

<sup>2</sup> Department of Crops and Animal Production, Kızıltepe Vocational Training High School, Mardin Artuklu University, Artuklu, 4700Mardin, Turkey

### Abstract

In this study was determined concentration of Pb, Zn, Cu, Cd, Ni in *Salicornia europaea* L. and its growing soil which is naturally distributed in Ayvalık Saltern. Analyses were performed using by Flame Atomic Absorption Spectrophotometer (FAAS). Sampling took place between the June 2009 and May 2010 intervals on 8 stations that were determined on the soil barrier surrounding the Saltern. Root, stem and leaves parts of the plant and soil samples collected from the where plant samples were taken regularly from the each station for 12 months. In the *S. europaea*, Pb and Zn accumulation increased depending on the distance from the road, and a clear relationship was not obtained between Cd, Cu and Ni accumulation.

**Key words:** Ayvalık Saltern, heavy metal, pollution, *Salicornia europaea*, Turkey

----- \* -----

## Ayvalık Tuzlasında ağır metal kirliliği araştırması (Balıkesir-Türkiye)

### Özet

Bu çalışmada, Ayvalık Tuzlası'nda doğal olarak yayılış gösteren *Salicornia europaea* L. türünün ve onun yetiştirme toprağındaki Pb, Zn, Cu, Cd, Ni konsantrasyonları belirlenmiştir. Analizler Alev Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (FAAS) kullanılarak yapılmıştır. Örnekleme, Tuzla'yı çevreleyen toprak bariyeri üzerinde belirlenen 8 istasyonda Haziran 2009 ile Mayıs 2010 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Bitki örneklerinin 12 ay boyunca her istasyondan düzenli olarak alındığı bitki örneklerinin kök, gövde ve yaprak kısımları ile toprak örnekleri alınmıştır. *S. europaea*'da yoldan uzaklığa bağlı olarak Pb ve Zn birikimi artmış, Cd, Cu ve Ni birikimi arasında net bir ilişki elde edilememiştir.

**Anahtar kelimeler:** Ayvalık Tuzlası, kirlilik, ağır metal, *Salicornia europaea*, Türkiye

### 1. Introduction

*Salicornia*, also commonly and variably known as pickleweed, glasswort, seabean, sea asparagus, crow's foot greens, and samphire is a halophyte, belonging to Amaranthaceae family [1]. The name *Salicornia* has originated from the Latin word meaning "salt". Studies report that some species, for example *S. europaea* show tolerance towards salinity as high as 3 % NaCl [2]. This fleshy plant is found at the edges of wetlands, marshes, sea shores, and mudflats actually on most alkaline flats [3].

*Salicornia* is widely distributed in different geographies such as North America, Asia, Africa and Europe. This wide distribution contributed to the use of the plant as food. A number of functional nutrients such as fibers, polyphenols and flavonoids have been identified in *Salicornia*. These foods caused *Salicornia* to be used as a "sea

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905364191581; Fax.: +905364191581; E-mail: xxxxxxxx

vegetable”. In addition, medicinal properties such as immunomodulator, lipid-lowering, antiproliferative, osteoprotective and hypoglycemic have made this saline plant important [4].

The seeds of *Salicornia* species contain 26-33% crude oil and 30-33% crude protein. The oil obtained from *Salicornia* seeds is of good quality compared to other oil plants, unsaturated fatty acid is between 87-88% and saturated fatty acid is between 12-13% [5].

Halophytic plants contain highly unsaturated fatty acids, carotenoids, vitamins, sterols, essential oils (terpenes), polysaccharides, glycosides and phenolic compounds. These compounds have medicinal properties such as antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and anti-tumor activities used in the treatment of various diseases (cancer, chronic inflammation, atherosclerosis and cardiovascular disorders, etc.) and aging processes [6].

*Salicornia europaea* as a halophyte and an accumulator plant [7] was used in this study. Heavy metals differ from other chemical pollutants because they can be formed from different sources, cause pollution, are resistant to environmental conditions, affect biological systems and accumulate in the food chain by increasing intensively [8]. The genus *Salicornia* (Chenopodiaceae order) is a halophyte, which is common in the saline, coastal habitats of Europe, North Africa, and near East and Central Asia [7].

Industrial activities, exhaust gases of motor vehicles, mineral deposits and operations, volcanic activities, fertilizers and pesticides used in agriculture and urban wastes are some of the factors that cause the spread of heavy metals to the environment [9]. Motor vehicles are responsible for most of the environmental pollution [10]. 60% of Pb and Ni are added to the gasoline [11]. They also stated that Zn and Cd were released into the atmosphere from exhaust gases and car tires [12]. Cu has been released into the atmosphere from wear and corrosion in brake pads and engine alloys [13].

Heavy metals significantly pollute air, soil, plants and water. Thus, it causes great harm to human health through respiration, food chain and skin contact. Elements such as Mn, Fe, Cu, Zn and Ni are important trace elements for the metabolic activities of plants [14]. Plants vary from heavy metals, amount of pollutant, distance from source, exposure time and weather conditions [15]. Plants take heavy metals with their roots and store them in other organs as well as stomata [16]. When heavy metal accumulation is high in plant tissues, many events such as mineral nutrient uptake, photosynthesis, enzyme activity, chlorophyll biosynthesis and germination are adversely affected. Physiological events such as damage to membranes, degradation of hormone balance and alteration of water balance may also be added to these [17]. In addition, accumulation of heavy metals in plants, with or without micronutrient elements, causes physiological stress, reduction in growth and development [18]. Heavy metals also affect the enzyme levels of plants depending on the type and concentration of heavy metals [19].

*S. europaea*, a local name of “deniz börülcesi”, halophytic, perennial, evergreen. Stems up to 15-20 cm, succulent and that is edible by the local people and sold in markets and bazaars (Fig. 1). Studies have been done on heavy metal levels and about the application areas of *S. europaeae* [4, 6, 20], in our country, studies have been carried out on the pollution of Ayvalık Saltern [21, 22]. Ayvalık Saltern is the second largest saltern after Çamaltı Saltern (İzmir) in terms of salt production, located adjacent to İzmir-Çanakkale highway. Approximately 20,000 tons of salt are produced annually. The salt produced is used in industrial and food industries and snow cleaning works. In the soil dam, surrounding the saltern, *S. europaea*, *Halimione portulacoides* L. Aellen and *Suaeda prostrata* subsp. *prostrata* Pall. such as halophytic plants are spreading abundantly. The Pb, Zn, Cu, Cd and Ni levels of Ayvalık Saltern were determined by using *S. europaea* and the soil in which it growth. Furthermore, it is aimed to determine the level of heavy metal this plant, whether used as food can be safely consumed.



Figure 1. General view of *S. europaea* (source: the Biolib.)

## 2. Materials and methods

The Ayvalık Saltern, which was established in 1980 on an area of 930,000 m<sup>2</sup>, is located near the İzmir-Çanakkale highway at a distance of 11 km from the district of Ayvalık in Balıkesir, Turkey. The highway passed between the sea and the saltern. The saltern is surrounded by a soil barrier of approximately 1 m of height and a water-filled drainage trench of 2-3 m of width that restricts it (Fig. 2). The materials of our study consisted *S. europaea* (Glasswort) that is abundantly spread on the soil barrier and the soils they grew in. Sampling was carried out on a monthly intervals from 8 stations on the soil barrier surrounding the saltern between June 2009 and May 2010 (Fig. 2). The plants were collected without using metal tools, brought to the laboratory and dried for 16 hours in a stove set at 105°C. Each of the dried samples was turned into a powder in a porcelain mortar, 1 gr of the sample was collected by weighing on a precision scale and put in 250-ml beakers. HCl: HNO<sub>3</sub> (3: 1) added onto the samples. The samples were subjected to a burning process in a fume hood for 2 hours at 150-200°C until approximately 1 ml of white-colored plant melt remained on the hot plate. After the melt was filtered through blue-grade filter paper, it was filled up to 50 ml with distilled water. The analysis were carried out by a Perkin Elmer Analyst 700 Model Flame Atomic Absorption Spectrophotometer (FAAS).

The soil samples were also collected without using metal tools from a depth of approximately 20 cm by extracting cores for 0,5-kg samples. The soils that were put into plastic bags were brought to the laboratory in iceboxes and stored at -21°C until the analysis. The soils that were put in a certain amount on petri dishes before the analysis were dried for 16 hours in a stove set at 105 °C. Each dried sample was turned into powder in a porcelain mortar, homogenized and filtered through a 160 μ sieve. The sieved soil samples were weighed as 0.5 gr on a precision scale, and HCl: HNO<sub>3</sub> (3: 1) was added. They were then subjected to a burning process under a fume hood for 2 hours at 150-200°C until a white-colored melt remained. After the melt was filtered through blue-grade filter paper, the samples were completed to 25 ml with distilled water [23]. The analysis were carried out by a Perkin Elmer Analyst 700 Model Flame Atomic Absorption Spectrophotometer (FAAS).

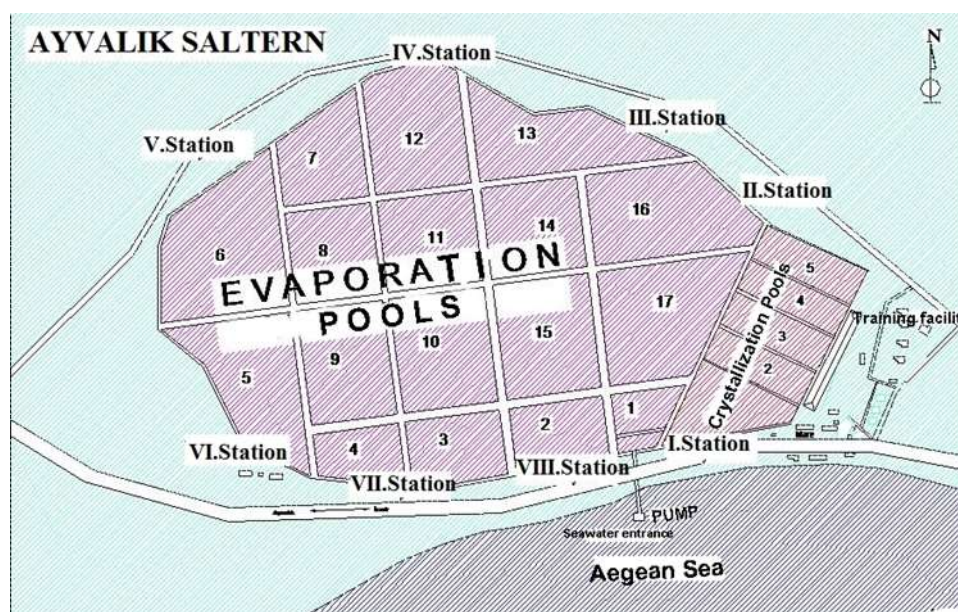


Figure 2. Ayvalık Saltern and sampling stations

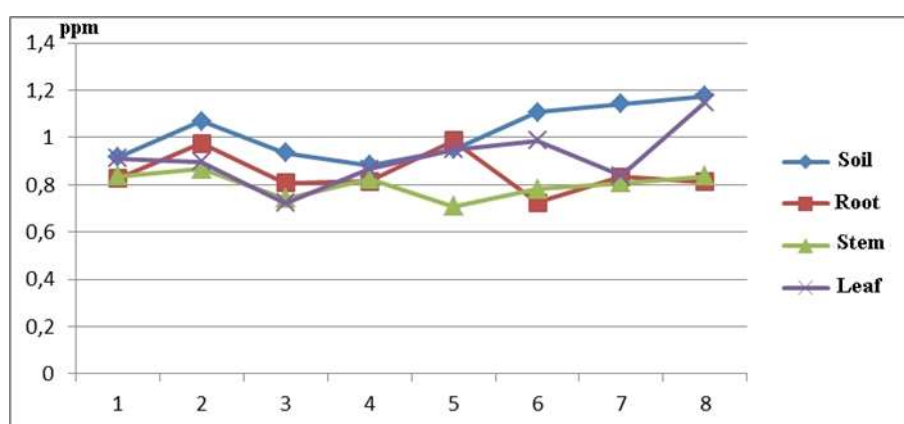
## 3. Results

Pb, Zn, Cu, Cd and Ni concentrations in *S. europaea* and growing soil were well below the limit values. Concentration of metals in soils follows the decreasing trend of Pb> Cu> Zn> Ni>Cd, accumulation levels of heavy metals in *S. europaea* respectively Pb> Zn> Cu> Ni> Cd. (Table 1,2,3,4,5).

According to the 12-month average values of each station, the lowest Pb concentrations were found as;  $0.883 \pm 0.23$  ppm in the soil (station 4),  $0.724 \pm 0.29$  ppm in the root (station 6),  $0.709 \pm 0.28$  ppm in the stem (5th station) and  $0.722 \pm 0.35$  ppm in the leaves (station 3). Based on the same values, the highest Pb concentrations were found as;  $1.176 \pm 0.11$  ppm in the soil (station 8),  $0.987 \pm 0.49$  ppm in the root (station 5),  $0.866 \pm 0.27$  ppm in the stem (station 2) and  $1.150 \pm 0.26$  ppm in the leaves (station 8) (Table 1, Fig. 3).

Table 1. 12-month average Pb concentration values for all stations in *S. europaea* and its growth soil (dry weight)

Station No	Pb ppm	Soil	Root	Stem	Leaf
1	Mean/SD	0.917±0.14	0.826±0.32	0.836±0.35	0.912±0.31
	Min-Max	0.725-1.119	0.413-1.557	0.172-1.338	0.512-1.580
2	Mean/SD	1.069±0.15	0.976±0.47	0.866±0.27	0.897±0.27
	Min-Max	0.818-1.278	0.109-1.882	0.245-1.390	0.226-1.366
3	Mean/SD	0.934±0.23	0.807±0.41	0.742±0.40	0.722±0.35
	Min-Max	0.523-1.400	0.074-1.438	0.097-1.484	0.115-1.245
4	Mean/SD	0.883±0.23	0.815±0.34	0.824±0.30	0.866±0.27
	Min-Max	0.602-1.276	0.439-1.543	0.481-1.362	0.526-1.471
5	Mean/SD	0.949±0.31	0.987±0.49	0.709±0.28	0.949±0.52
	Min-Max	0.552-1.599	0.187-1.567	0.172-1.161	0.181-1.633
6	Mean/SD	1.106±0.15	0.724±0.29	0.781±0.25	0.987±0.29
	Min-Max	0.959-1.385	0.192-1.140	0.273-1.281	0.312-1.330
7	Mean/SD	1.142±0.19	0.833±0.40	0.808±0.38	0.839±0.27
	Min-Max	0.903-1.440	0.305-1.566	0.455-1.684	0.512-1.399
8	Mean/SD	1.176±0.11	0.812±0.36	0.837±0.14	1.150±0.26
	Min-Max	0.980-1.352	0.216-1.331	0.555-1.048	0.696-1.580

Figure 3. 12-month average Pb concentration values for all stations in *S. europaea* and its growth soil (dry weight)

According to the 12-month average values of each station, the lowest Zn concentrations were found as;  $0.383 \pm 0.12$  ppm in the soil (5th station),  $0.244 \pm 0.07$  ppm in the root (3rd station),  $0.220 \pm 0.06$  ppm in the stem (4th station) and  $0.242 \pm 0.10$  ppm in the leaves (station 3). Based on the same values, the highest Zn concentrations were found as;  $0.640 \pm 0.25$  ppm in the soil (station 8),  $0.350 \pm 0.13$  ppm in the root (station 7),  $0.296 \pm 0.12$  ppm in the stem (station 5) and  $0.426 \pm 0.42$  ppm in the leaves (station 7) (Table 2, Fig. 4).

Table 2. 12-month average Zn concentration values for all stations in *S. europaea* and its growth soil (dry weight)

Station No	Zn ppm	Soil	Root	Stem	Leaf
1	Mean/SD	0.564±0.27	0.306±0.12	0.255±0.06	0.288±0.09
	Min-Max	0.143-1.182	0.037-0.523	0.118-0.367	0.126-0.485
2	Mean/SD	0.459±0.21	0.286±0.06	0.257±0.07	0.400±0.40
	Min-Max	0.249-0.959	0.218-0.388	0.151-0.353	0.186-1.637
3	Mean/SD	0.406±0.13	0.244±0.07	0.234±0.06	0.242±0.10
	Min-Max	0.241-0.651	0.147-0.356	0.139-0.364	0.115-0.489
4	Mean/SD	0.507±0.15	0.326±0.34	0.220±0.06	0.286±0.11
	Min-Max	0.278-0.668	0.175-1.392	0.143-0.304	0.203-0.636
5	Mean/SD	0.383±0.12	0.275±0.09	0.296±0.12	0.411±0.37
	Min-Max	0.229-0.614	0.161-0.492	0.127-0.543	0.166-1.573
6	Mean/SD	0.452±0.11	0.264±0.09	0.267±0.10	0.301±0.10
	Min-Max	0.225-0.584	0.110-0.391	0.162-0.486	0.170-0.499
7	Mean/SD	0.633±0.27	0.350±0.13	0.274±0.10	0.426±0.42
	Min-Max	0.391-1.236	0.211-0.608	0.170-0.487	0.203-1.742
8	Mean/SD	0.640±0.25	0.313±0.12	0.268±0.05	0.272±0.05
	Min-Max	0.327-1.248	0.136-0.618	0.183-0.352	0.204-0.365

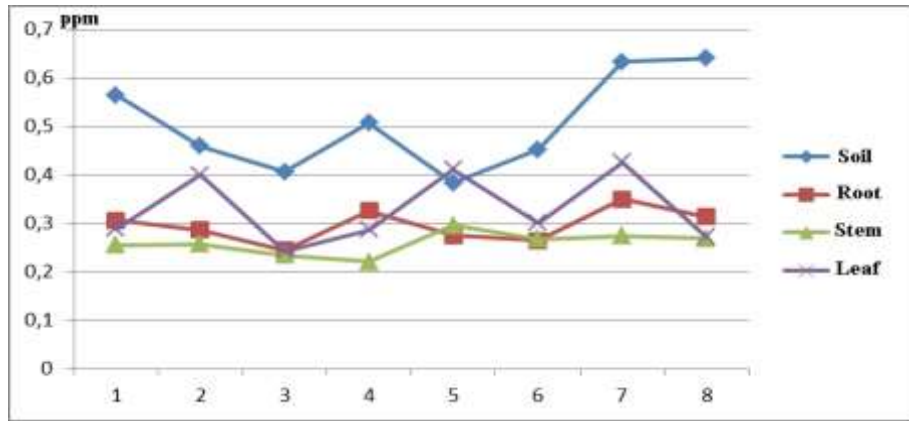


Figure 4. 12-month average Zn concentration values for all stations in *S. europaea* and its growth soil (dry weight)

According to the 12-month average values of each station, the lowest Cu concentrations were found as;  $0.917 \pm 0.04$  ppm in the soil (station 2),  $0.876 \pm 0.04$  ppm in the root (station 7),  $0.852 \pm 0.01$  ppm in the stem (station 4) and  $0.860 \pm 0.01$  ppm in the leaves (station 6). Based on the same values, the highest Cu concentrations were found as;  $0.986 \pm 0.07$  ppm in the soil (station 8),  $0.903 \pm 0.05$  ppm in the root (station 3),  $0.882 \pm 0.02$  ppm in the stem (5th station) and  $0.963 \pm 0.22$  ppm in the leaves (5th station) (Table 3, Fig. 5).

Table 3. 12-month average Cu concentration values for all stations in *S. europaea* and its growth soil (dry weight)

Station No	Cu ppm	Soil	Root	Stem	Leaf
1	Mean/SD	0.953±0.04	0.898±0.05	0.869±0.02	0.920±0.05
	Min-Max	0.890-1.057	0.848-1.002	0.849-0.906	0.852-1.020
2	Mean/SD	0.917±0.04	0.889±0.04	0.874±0.02	0.891±0.03
	Min-Max	0.858-0.989	0.846-0.995	0.850-0.901	0.850-0.956
3	Mean/SD	0.944±0.03	0.903±0.05	0.873±0.03	0.881±0.03
	Min-Max	0.862-0.995	0.852-1.040	0.847-0.950	0.842-0.956
4	Mean/SD	0.924±0.03	0.879±0.02	0.852±0.01	0.870±0.02
	Min-Max	0.872-0.982	0.853-0.943	0.828-0.876	0.849-0.903
5	Mean/SD	0.928±0.03	0.896±0.06	0.882±0.02	0.963±0.22
	Min-Max	0.872-0.984	0.852-1.073	0.849-0.935	0.823-1.670
6	Mean/SD	0.947±0.04	0.883±0.03	0.881±0.03	0.860±0.01
	Min-Max	0.898-1.055	0.839-0.980	0.843-0.932	0.832-0.896
7	Mean/SD	0.948±0.03	0.876±0.04	0.877±0.03	0.872±0.03
	Min-Max	0.913-1.022	0.842-0.980	0.843-0.928	0.842-0.936
8	Mean/SD	0.986±0.07	0.877±0.06	0.880±0.03	0.889±0.05
	Min-Max	0.900-1.111	0.846-1.047	0.848-0.978	0.852-1.050

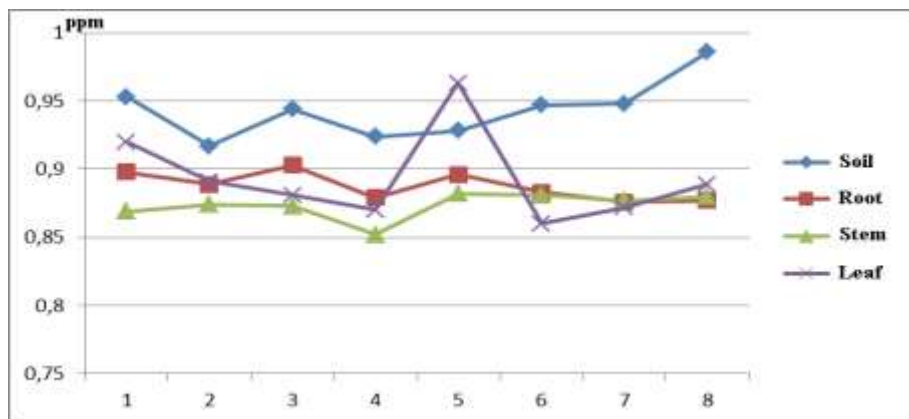


Figure 5. 12-month average Cu concentration values for all stations in *S. europaea* and its growth soil (dry weight)

According to the 12-month average values of each station, the lowest Cd concentrations were found as; in the soil  $0.072 \pm 0.042$  ppm (station 8), in the root  $0.046 \pm 0.021$  ppm (station 3), in the stem  $0.029 \pm 0.013$  ppm (station 1)

and in the leaves  $0.033 \pm 0.013$  ppm (station 2), Based on the same values, the highest Cd concentrations were found as;  $0.107 \pm 0.132$  ppm in the soil (station 6),  $0.055 \pm 0.029$  ppm in the root (station 7),  $0.075 \pm 0.059$  ppm in the stem (5th station) and  $0.071 \pm 0.020$  ppm in the leaves (5th station) (Table 4, Fig. 6).

Table 4. 12-month average Cd concentration values for all stations in *S. europaea* and its growth soil (dry weight)

Station No	Cd ppm	Soil	Root	Stem	Leaf
1	Mean/SD	0.099±0.110	0.047±0.019	0.029±0.013	0.054±0.021
	Min-Max	0.018-0.432	0.015-0.078	0.016-0.056	0.026-0.095
2	Mean/SD	0.080±0.043	0.049±0.028	0.041±0.017	0.033±0.013
	Min-Max	0.013-0.151	0.009-0.108	0.012-0.078	0.016-0.050
3	Mean/SD	0.077±0.045	0.046±0.021	0.051±0.027	0.045±0.018
	Min-Max	0.017-0.148	0.015-0.095	0.016-0.113	0.012-0.075
4	Mean/SD	0.092±0.077	0.055±0.031	0.052±0.027	0.036±0.024
	Min-Max	0.006-0.298	0.015-0.093	0.011-0.100	0.008-0.085
5	Mean/SD	0.078±0.037	0.052±0.018	0.075±0.059	0.071±0.020
	Min-Max	0.017-0.129	0.035-0.091	0.010-0.221	0.040-0.102
6	Mean/SD	0.107±0.132	0.047±0.017	0.047±0.026	0.050±0.024
	Min-Max	0.012-0.505	0.017-0.082	0.008-0.091	0.012-0.084
7	Mean/SD	0.076±0.030	0.055±0.029	0.052±0.025	0.055±0.032
	Min-Max	0.029-0.130	0.008-0.106	0.008-0.086	0.013-0.133
8	Mean/SD	0.072±0.042	0.053±0.019	0.063±0.028	0.054±0.017
	Min-Max	0.016-0.143	0.026-0.087	0.010-0.108	0.025-0.082

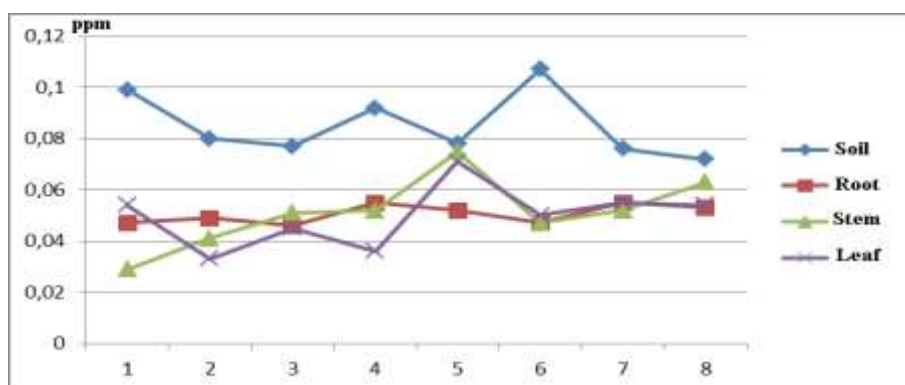


Figure 6. 12-month average Cd concentration values for all stations in *S. europaea* and its growth soil (dry weight)

According to the 12-month average values of each station, the lowest Ni concentrations were found as;  $0.329 \pm 0.22$  ppm in the soil (station 5),  $0.271 \pm 0.12$  ppm in the root (station 4),  $0.258 \pm 0.14$  ppm in the stem (station 3) and  $0.342 \pm 0.16$  ppm in the leaves (station 3). Based on the same values, the highest Ni concentrations were found as;  $0.620 \pm 0.29$  ppm in the soil (station 1),  $0.361 \pm 0.17$  ppm in the root (station 7),  $0.355 \pm 0.08$  ppm in the stem (station 4) and  $0.484 \pm 0.29$  ppm in the leaves (station 4) (Table 5, Fig. 7).

Table 5. 12-month average Ni concentration values for all stations in *S. europaea* and its growth soil (dry weight)

Station No	Ni ppm	Soil	Root	Stem	Leaf
1	Mean/SD	0.620±0.29	0.316±0.19	0.273±0.15	0.380±0.35
	Min-Max	0.132-1.057	0.048-0.528	0.099-0.568	0.115-1.123
2	Mean/SD	0.399±0.13	0.279±0.19	0.308±0.11	0.430±0.26
	Min-Max	0.043-1.098	0.047-0.653	0.123-0.461	0.136-0.915
3	Mean/SD	0.389±0.27	0.339±0.20	0.258±0.14	0.342±0.16
	Min-Max	0.129-0.788	0.075-0.677	0.043-0.559	0.096-0.604
4	Mean/SD	0.543±0.27	0.271±0.12	0.355±0.08	0.484±0.29
	Min-Max	0.145-1.094	0.055-0.406	0.222-0.454	0.180-1.145
5	Mean/SD	0.329±0.22	0.283±0.14	0.297±0.09	0.389±0.14
	Min-Max	0.112-0.764	0.102-0.601	0.158-0.466	0.212-0.651
6	Mean/SD	0.491±0.23	0.321±0.18	0.299±0.13	0.456±0.232
	Min-Max	0.167-0.816	0.026-0.619	0.068-0.441	0.112-0.931
7	Mean/SD	0.562±0.05	0.361±0.17	0.285±0.19	0.436±0.23
	Min-Max	0.425-0.639	0.046-0.648	0.065-0.510	0.096-0.868
8	Mean/SD	0.567±0.06	0.292±0.13	0.348±0.10	0.469±0.21
	Min-Max	0.436-0.691	0.035-0.479	0.167-0.532	0.156-0.875



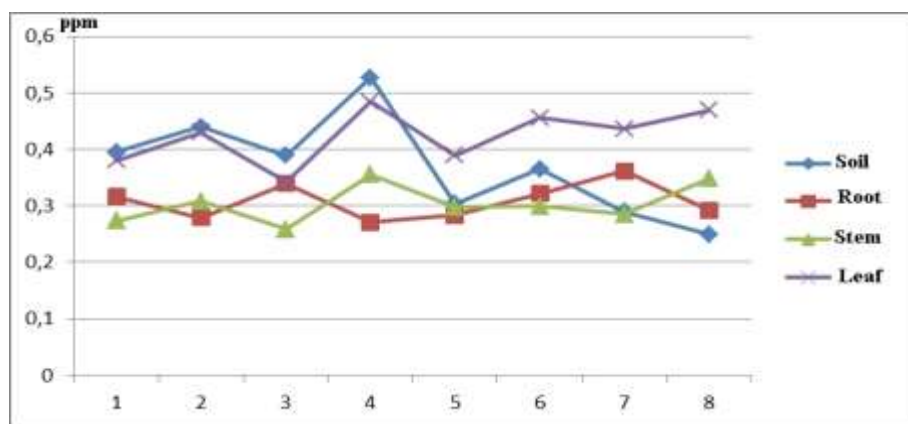


Figure 7. 12-month average Ni concentration values for all stations in *S. europaea* and its growth soil (dry weight)

#### 4. Conclusions and discussion

If heavy metal concentrations in the *S. europaea* and its growing soil compare with the other studies carried out as follows;

Pb accumulation; leaf > root > stem

Allen [24], stated that Pb concentrations of 0.05-3.0 ppm were present in the plants in the uncontaminated environment. In their study, Başkaya and Teksoy [25], found that the Pb value accumulated on the leaves of the roadside plants was much higher than the limit values accepted by the World Health Organization (10 ppm in dry plant material). Dürüst et al. [26], reported that Pb is not absolutely necessary for plants, can be found in the soil at a dose of 15-40 ppm, it would not pose a danger to human and plant health unless the Pb concentration in the soil exceeds 150 ppm, but would potentially threaten human health if it exceeds 300 ppm. In this study; Pb levels were found to be range from 0.074-1.882 ppm in the *S. europaea*, and 0.523-1.599 ppm in the soil. Considering that Haşimoğlu et al. [12], stated that lead was released into the atmosphere from exhaust gases; the highest Pb concentration in the leaf at the 8th station, which is the closest to İzmir-Çanakkale highway, supports this situation. Looking at the 12-month average values of each station in the Table 1, it will be seen that the highest Pb in the leaf is 1,150 ppm (8th station) and the lowest is 0.722 ppm. Türkan [27], Haktanır et al. [28], stated that the Pb concentration will decrease as you move away from the road, showing a parallel result with our study.

Zn accumulation; leaf > root > stem

Özbek et al. [29], stated that the total concentration of Zn in the soil is between 10-300 ppm and the concentration of Zn that can be taken by plants varies between 3.6-5.5 ppm, and that the concentration of Zn in plants is normally between 5-100 ppm, but the toxicities usually start after 400 ppm. In this study; Zn level was found to be range from 0.037-1.742 ppm in the plant, and 0.143-1.248 ppm in the soil. Considering that Haşimoğlu et al. [12], stated that lead was released into the atmosphere from exhaust gases; the highest Zn concentration in the leaf at the 7th station, which is the closest to İzmir-Çanakkale highway, supports this situation. Looking at the 12-month average values of each station in the Table 2, it will be seen that the highest Pb in the leaf is  $0.426 \pm 0.42$  ppm (7th station) and the lowest is  $0.242 \pm 0.10$  ppm (3rd station). Türkan [27], Haktanır et al. [28], stated that the Zn concentration will decrease as you move away from the road, showing a parallel result with our study.

Cu accumulation; leaf > root > stem

Chang et al. [30], stated that the maximum limit of 40 ppm in the plant dry matter of the toxic limit of Cu. Sossé et al. [31], Cu in soil 100 ppm, plant dry matter is reported to be more than 15-30 ppm if toxic effects. In this study; Cu levels found to be range from 0.823-1.670 ppm in the plant, and 0.858-1.111 ppm in the soil. It will be seen that the highest Cu concentration in the leaf is  $0.963 \pm 0.22$  ppm (5th station) and the lowest is  $0.860 \pm 0.01$  ppm (6th station). Accordingly, there is no clear correlation between the distance to the road and the Cu levels of both soil and plant parts.

Cd accumulation; stem > leaf > root

Allen [24], the Cd value of the plants grown in the uncontaminated environment was found to be 0.01-0.3 ppm. Özbek et al. [29], Cd 3 ppm in soil, dry plant sample is reported to be toxic when more than 1 ppm. Ece et al. [32] the maximum amount of Cd in uncontaminated agricultural areas is 1.0 ppm level, in general, this value indicates that around 0.3 ppm. In this study; Cd levels found to be range from 0.008-0.221 ppm in the plant, and 0.006-0.505 ppm in the soil. It will be seen that the highest Cd concentration in the leaf is  $0.071 \pm 0.020$  ppm (5th station) and the lowest is  $0.033 \pm 0.013$  ppm (2nd station). Accordingly, it is seen that the Cd level does not show a clear correlation with the distance to the road.

Ni accumulation; leaf > root > stem

Vergnano and Hunter [33], noted that the Ni value in the range from 0.1 to 5 ppm of dry matter were noted in plants is normal, some plants that grow on serpentine soils may have level of Ni over 200 ppm, Nickel at this level may

be toxic to plants that have not adapted to the soils. Mattigod and Page [34], are reported that in the soil, concentration of Ni is 10-100 ppm to be within normal levels. In this study; Ni levels found to be range from 0.026-1.145 ppm in the plant and 0.112-1.094 ppm in the soil. It will be seen that the highest Ni concentration in the leaf is  $0.484 \pm 0.29$  ppm (4th station) and the lowest is  $0.342 \pm 0.16$  ppm (3rd station). Accordingly, there is a not clear correlation between the distance to the road and Ni levels of both soil and plant parts.

When the heavy metal levels in the plant parts were examined, it was seen that the highest accumulation was in the plant leaves (except Cd) in the stations near the highway. Indeed, Çelik et al. [35], reported that there was a significant relationship between the distance to the road and heavy metal levels in the plant leaves.

In addition, accumulation levels of heavy metals in *S. europaea* respectively  $Pb > Zn > Cu > Ni > Cd$ .

All heavy metal levels are below the limit values, it shows that Ayvalık Saltern is located in a very clean area. Salts production in saltern, using significantly in the food industry and where naturally grown plants such as *S. europaea* and *H. portulacoides* are also consumed as food, this uncontaminated position of the Saltern should be preserve. It is determined that *S. europaea* is not a danger in terms of heavy metal content and can be consumed as a safe food. Therefore, it is important that secondary construction and industrialization should not be allowed in the vicinity of Saltern.

The study will make an important contribution to the literature as the first heavy metal study on *S. europaea* in this region.

### Acknowledgments

We wish to thank Scientific Investigation Project to Coordinate of Manisa Celal Bayar University (Project No. FEF 2009-035) for financial support.

### References

- [1] Singh, D. Buhmann, A. K., Flowers, T. J., Seal, C. E. & Papenbrock, J. (2014). *Salicornia* as a crop plant in temperate regions: selection of genetically characterized ecotypes and optimization of their cultivation conditions. *AoB Plants*, 10, 6.
- [2] Yamamoto, K., Oguri, S., Chiba, S. & Momonoki, Y. S. (2009). Molecular cloning of acetylcholinesterase gene from *Salicornia europaea* L. *Plant. Plant Signaling & Behavior*, 4, 361-366.
- [3] Smillie, C. (2015). *Salicornia* spp. as a biomonitor of Cu and Zn in salt marsh sediments. *Ecological Indicators*, 56, 70-78.
- [4] Patel, S. (2016). *Salicornia*: evaluating the halophytic extremophile as a food and a pharmaceutical candidate. *3Biotech*, 6,104.
- [5] Örcen, N., Çelen, A. E., Nazarian, G. R. & Karaman, H. (2015). Deniz börülcesi (*Salicornia europaea*)'nin köklendirilmesi üzerine NAA etkisinin belirlenmesi. XI. *Tarla Bitkileri Kongresi Bildiriler Kitabı-1 Cilt II*, P, 602-605.
- [6] Gunning, D. (2016). *Cultivating Salicornia europaea (Marsh Samphire)*. (Ed. Lucy Watson) BIM. Board lascaigh Mhara, Irish Sea Fisheries Board, University College Cork, Ireland, pp. 1-92.
- [7] Ferreira, D., Isca, V. M. S., Leal P., Seca, A. M. L., Silva, H., Pereira, M. de L., Silva, A. M. S. & Pinto, D. C. G. A. (2018). *Salicornia ramosissima*: secondary metabolites and protective effect against acute testicular toxicity. *Arabian Journal Chemistry*, 11, 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.04.012>.
- [8] Engel, D. W., Sunda, W. G. & Fowler, B. A. (1981). Factors Affecting Trace Metal Uptake And Toxicity To Estuarine Organisms. I. Environmental Parameters. *Biological Monitoring of Marine Pollutants*, 127-144.
- [9] Zengin, F. K. & Munzuroğlu, Ö. (2005). Fasulye Fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L. Strike) klorofil ve karotenoid miktarı üzerine bazı ağır metallerin (Ni<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Cr<sup>+3</sup>, Zn<sup>+2</sup>) etkileri. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17, 164-172.
- [10] Messenger, M. L., Davies, Ian P., & Levin, P. S. (2021). Low-cost biomonitoring and high-resolution, scalable models of urban metal pollution. *Science of The Total Environment*, 767, 144280. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144280>.
- [11] Röderer, G. (1984). On the toxic effects of tetraethyl lead and its derivatives on the chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis*-V. Electron microscopical studies. *Environmental and Experimental Botany*, 24(1), 17-30.
- [12] Haşımoğlu, C., İçingür, Y. & Öğüt, Y. (2002). Dizel Motorlarında Egzoz Gazları Resirkülasyonunun Motor Performansı ve Egzoz Emisyonlarına Etkisinin Deneysel Analizi. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 26, 127-135.
- [13] Novotny, V. & Chesters, G. (1981). *Sources of Roadside Pollution*. Handbook of Nonpoint Pollution: Sources and Management. Van Nostrand Reinhold Environmental Engineering Series, Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- [14] Nedelkoska, T. & Doran, P. (2000). Characteristics of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation and phytomining. *Minerals Engineering*, 13(5), 549-561.

- [15] Öztürk, M. & Türkan, İ. (1993). *Heavy metal accumulation by plants alongside the motor roads*. A case study from Turkey (Ed. B. Markert) *Plants as biomonitors*, Weinheim: VCH Publisher, pp. 640-650.
- [16] Motto, H. L., Danies, R. P. & Motto, C. K. (1970). Lead in soils and plants; its relationship so traffic volume and proximity so highways. *Environmental Science & Technology*, 4, 231-237.
- [17] Zengin, F. K. & Munzuroğlu, Ö. (2004). Effects of Cadmium (Cd<sup>++</sup>) and Mercury (Hg<sup>++</sup>) on the Growth of Root, Shoot and Leaf of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seedlings. *Gazi University Journal of Science*, 17, 1-10.
- [18] Phalsson, A. B. (1989). Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water, Air, and Soil Pollution*, 47(3-4), 287-319.
- [19] Ak, A. & Yücel, E. (2011). Ecotoxicological effects of heavy metal stress on antioxidant enzyme levels of *Triticum aestivum* cv Alpu. *Biological Diversity and Conservation*, 4, 19-24.
- [20] Milić, D., Luković, J., Ninkov, J., Zeremski-Škorić, T., Zorić, L., Vasin, J. & Milić, S. (2012). Heavy metal content in halophytic plants from inland and maritime saline areas. *Central European Journal of Biology*, 7(2), 307-317.
- [21] Kiliç, M., Ay, G., Koçbaşı, F., Mungan, F., Kula, İ. & Karabaş, M. (2014). Heavy Metal Accumulation Of *Suaeda prostrata* subsp. *prostrata* Pall. Which Spread In Ayvalık Saltern. *Iğdır University Journal of the Institute of Science and Technology*, 4(4), 9-18.
- [22] Kiliç, M., Ay, G., Koçbaşı, F. & Mungan Kiliç, F. (2019). Determination level of heavy metal in Ayvalik Saltern using *Halimione portulacoides* (L.) plant. *Biological Diversity and Conservation*, 12(1), 100-106. <http://dx.doi.org/10.5505/biodicon.2019.57966>
- [23] UNEP. (1984). Sampling of selected marine organisms and sample preparation for trace metal analysis. *Reference Methods for Marine Pollution Studies*, 7(2), 15.
- [24] Allen, S. E. (1989). *Chemical analysis of ecological materials*. Oxford, England: Blackwell Scientific Publications.
- [25] Başkaya, H. S. & Teksoy, A. (1991). Topraklarda ağır metaller ve ağır metal kirliliği. I. *Uludağ Çevre Mühendisliği Sempozyumu Bildiri Kitabı*, P, 763-771.
- [26] Dürüst, N., Dürüst, Y., Tuğrul, D. & Zengin, M. (2004). Heavy Metal Contents of *Pinus radiata* Trees of İzmit (Turkey). *Asian Journal of Chemistry*, 16(2), 1129-1134.
- [27] Türkan, İ. (1986). İzmir İl Merkezi ve Çevre Yolları Kenarında Yetişen Bitkilerde Kurşun (Pb), Çinko (Zn) ve Kadmiyum (Cd) Kirlenmesinin Araştırılması. *Doğa Türk Biyoloji Dergisi*, 10(1), 116-120.
- [28] Haktanır, K., Arcak, S., Erpul, G. & Tan, A. (1995). Accumulation of The Vehicle-Generated Heavy Metals on the Roadside Soils. *Turkish Journal of Engineering & Environmental Sciences*, 19(6), 423-431.
- [29] Özbek, H., Kaya, Z., Gök, M. & Kaptan, H. (1995). *Toprak Bilimi*. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Genel Yayın No: 73, Ders Kitapları Yayın No:16, Adana.
- [30] Chang, C. C., Mallie, R. J. V. & Garvey, J. S. (1980). A radioimmunoassay for human metallothionein. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 55(1), 94-102.
- [31] Alaoui-Sossé, B., Genet, P., Vinit-Dunand, F., Toussaint, M. L., Epron, D. & Badot, P. M. (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science*, 166, 1213-1218.
- [32] Ece, A., Çağlarırnak, N. & Camcı-Çetin, S. (2001). Çevre Kirliliğinden Etkilenen ve Yaygın Olarak Yetiştirilen Sebzelere Kurşun (Pb) ve Kadmiyum (Cd) Miktarının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. IV. *Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi*, P, 429-434.
- [33] Vergnano, O. & Hunter, J. G. (1952). Nickel and cobalt toxicities in oat plants. *Annals of Botany*, 17, 317-328.
- [34] Mattigod, S. V. & Page, A. L. (1983). *Assessment of metal pollution in soil*. Applied environmental geochemistry (Ed. Thornton, I.) London: Academic Press, pp. 355-394.
- [35] Çelik, A., Kartal, A. A., Akdoğan, A. & Kaska, Y. (2005). Determining the heavy metal pollution in Denizli (Turkey) by using *Robinio pseudo-acacia* L. *Environment International*, 31, 105-112.



## Leaf anatomy of *Quercus macranthera* subsp. *sypirensis* (K.Koch) Menitsky

Muhammed Mesud HÜRKÜL<sup>\*1</sup>, Şeyda YAYLA<sup>1</sup>  
ORCID: 0000-0002-9241-2496; 0000-0002-3678-6506

<sup>1</sup> Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, 06560 Ankara, Turkey

### Abstract

The genus *Quercus* L. (Fagaceae) is represented by 461 species worldwide. Its distribution ranges from the temperate northern hemisphere to Malaysia and Colombia. *Quercus* bark is rich in tannins and is used as an astringent. *Quercus macranthera* subsp. *sypirensis* (K.Koch) Menitsky is endemic to Turkey and is known as "ispir meşesi". The plant is a small deciduous tree up to 7 m tall. Leaves obovate with 5-9 short lobes, stipules filiform, primary veins 6-10 and petiole 5-20 mm.

The plant material was collected from Kastamonu-Araç (Turkey). A voucher specimen was deposited in the Ankara University Faculty of Pharmacy Herbarium (AEF). The samples for anatomical studies were protected in 70% alcohol. The transverse and surface sections were cut by hand with razor blade into microscopic preparat form. The Sartur solution was used in microscopic examinations. Leica DM 4000B microscope was used for anatomical analysis and micro photographing.

According to the results of the anatomical study, the leaf is bifacial. Numerous stellate hairs are found on the upper and lower epidermis. Stomata are located only on the lower epidermis. The leaf and petiole contain solitary crystals. The petiole is characterized by a numerous stellate hairs. The sclerenchymatous tissue surrounds the vascular bundles in the form of a ring.

**Keywords:** *Quercus macranthera* subsp. *sypirensis*, Fagaceae, leaf, anatomy, endemic

----- \* -----

### *Quercus macranthera* subsp. *sypirensis* (K.Koch) Menitsky'in yaprak anatomisi

### Özet

*Quercus* L. (Fagaceae) cinsi dünya genelinde 461 tür ile temsil edilir. Yayılış alanları ılıman kuzey yarımküreden Malezya ve Kolombiya'ya kadardır. *Quercus* gövde kabukları tanen bakımından zengindir ve astrenjan olarak kullanılır. *Quercus macranthera* subsp. *sypirensis* (K.Koch) Menitsky Türkiye için endemik olup "ispir meşesi" olarak bilinir. Bitki 7 m boylanan, yaprak dökken küçük ağaçtır. Yapraklar 5-9 kısa loblu, obovat, filiform stipulalı, 6-10 primer damarlı ve 5-20 mm uzunluğunda yaprak saplıdır.

Bitki materyali Kastamonu-Araç (Türkiye)'tan toplandı. Bir örneği Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbariyumu (AEF)'na kaydedildi. Anatomik çalışmalar için numuneler %70 alkolde korundu. Enine ve yüzey kesitleri el ile jilet kullanılarak mikroskopik preparat haline getirildi. Mikroskopik incelemelerde Sartur solüsyonu kullanıldı. Anatomik analiz ve mikro fotoğraflama için Leica DM 4000B mikroskobu kullanıldı.

Anatomik çalışma sonucuna göre, yaprak bifasiyaldir. Üst ve alt epidermada çok sayıda yıldız tüy bulunur. Stomalar sadece alt epidermada yer alır. Yaprak ve yaprak sapı kristaller içerir. Yaprak sapı çok sayıda yıldız tüy ile karakterizedir. İletim demetlerini sklerenkimatik doku halka şeklinde sarmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Quercus macranthera* subsp. *sypirensis*, Fagaceae, yaprak, anatomi, endemik

### 1. Introduction

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: +905305917304; Fax.: +903122131081; E-mail: huerkulmm@gmail.com

Fagaceae Dumort. is a family of evergreen or deciduous trees or shrubs [1]. The family includes 8 accepted genera (*Castanea* Mill., *Castanopsis* (D.Don) Spach, *Chrysolepis* Hjelmq., *Fagus* L., *Lithocarpus* Blume, *Notholithocarpus* Manos, Cannon & S.H.Oh, *Quercus* L., *Trigonobalanus* Forman) [2]. The genus *Quercus* is represented by 461 species worldwide, its distribution ranges from the temperate northern hemisphere to Malaysia and Colombia [2]. *Quercus* genus consists of deciduous or evergreen trees, rarely shrubs; the leaves are arranged sessile or petiolate, penninerved, serrate, dentate, pinnatifid or lobed; fruit a nut (acorn), subglobose to oblong or cylindrical, surrounded at base by cupule; pericarp thin or thick, endocarp glabrous or pubescent [1].

Oak bark is rich in tannins and is used as an astringent [3]. *Quercus* species also known to contain (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (+)-catechin, (+)-gallocatechin, gallic acid, caffeic acid, ferulic acid, ellagic acid [4-9] and used traditionally in the treatment of dermatitis, burns, hemorrhoids, abscesses, ulcers and toothache [10-14]. *Quercus* species are medically important and show antibacterial, anticancer, gastroprotective, antiviral, cardioprotective and hepatoprotective activity [15-24]. In Turkey, *Quercus* species are traditionally used in the treatment of diabetes, wounds, respiratory diseases, diarrhea, obesity and fungus [25-33].

32 *Quercus* taxa (5 endemic) grow naturally in Turkey, *Quercus macranthera* subsp. *sypirensis* (K.Koch) Menitsky is endemic to Turkey and is known as "ispir meşesi" [34]. The plant is a small deciduous tree up to 7 m tall; leaves obovate with 5-9 short lobes, stipules filiform, primary veins 6-10 and petiole 5-20 mm [1]. Revealing the anatomical features and differences of organs is of great importance in taxonomically distinguishing species from each other. There is no comprehensive anatomical study on the *Q. macranthera* subsp. *sypirensis* until now. In this study, the anatomical features of *Q. macranthera* subsp. *sypirensis* leaf and petiole were examined in detail.

## 2. Materials and methods

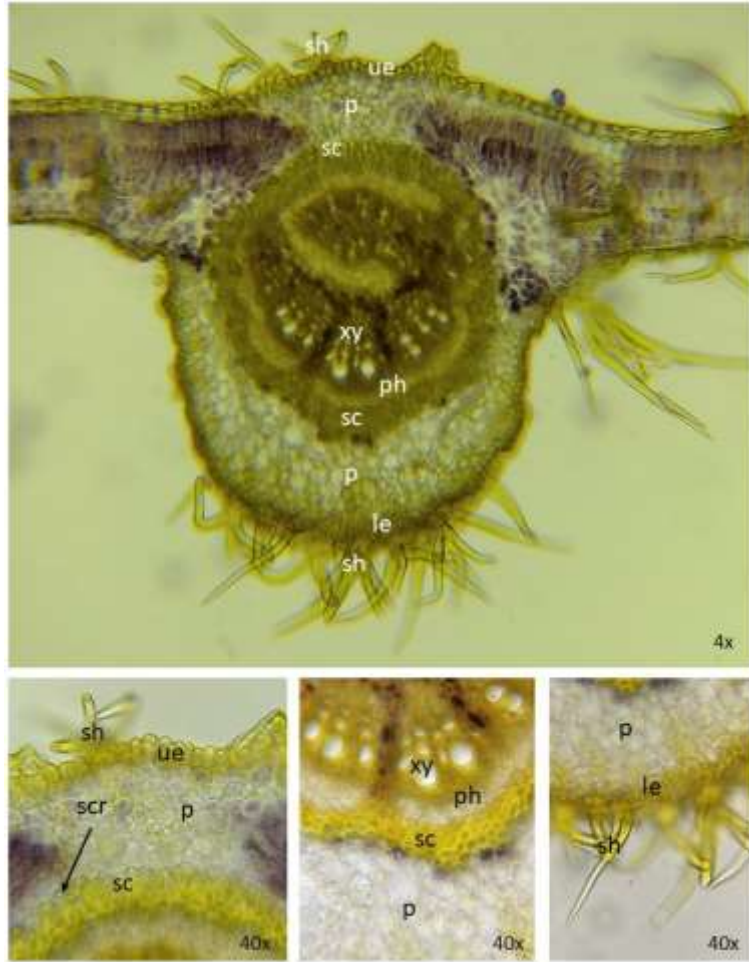
The plant material was collected from Araç (Kastamonu/Turkey) in 2020 and described by M. Mesud Hürkul. A voucher specimen was deposited in the Ankara University Faculty of Pharmacy Herbarium (AEF 30737) in Turkey. The samples for anatomical studies were protected in 70% alcohol. The transverse and surface sections were cut by hand with razor blade into microscopic preparation form. The Sartur solution [35] was used in microscopic examinations. Leica DM 4000B microscope was used for anatomical analysis and micro photographing.

## 3. Results

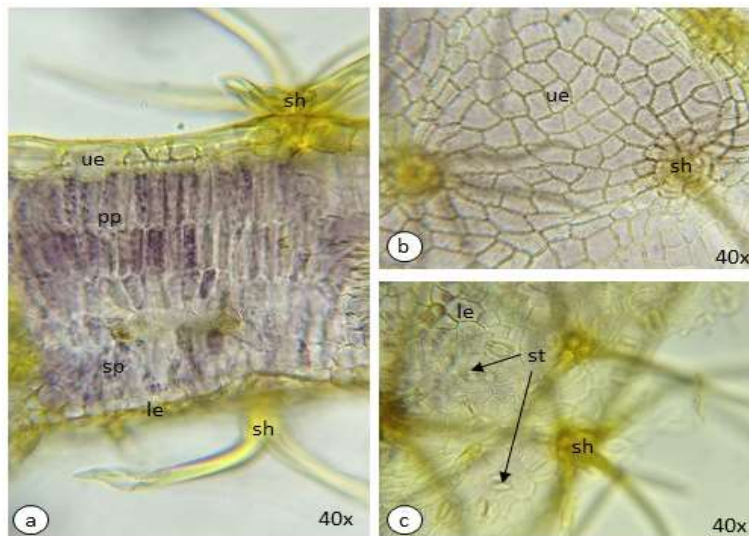
In the transverse section of the leaf, the midrib is highly domed in the abaxial side. The upper epidermis layer consists of square-oval cells and is surrounded by a thick cuticle layer. The outer walls of upper epidermal cells are sinuous. The base of the epidermis layer is filled with 5-10 rows of parenchymatous cells. In the midrib, the vascular bundle is completely surrounded by sclerenchymatous cells in a ring. The xylem and phloem is arc-type arranged but tend to a circle form. The abaxial side of vascular bundle in the midrib is filled with 8-15 rows of parenchymatous cells. The lower epidermal cells are oval-square shaped, crushed and smaller than the upper epidermal cells. The lower epidermis is covered with a thick cuticle. Both the upper and lower epidermis include numerous stellate hairs. The midrib contains sparse solitary crystals (Figure 1).

The transverse section of leaf lamina showed that the leaf was bifacial. The upper epidermis layer consists of a single layered of square-rectangular epidermal cells. The epidermis layer covered with thick cuticle and many stellate hairs. The mesophyll is characterized by 3 rows of longitudinal elongated, starch containing palisade parenchyma and 3-8 rows of spongy parenchyma. The lower epidermis layer consists of square cells and the lower epidermal cells are much smaller than the upper cells. The lower epidermis layer covered by thick cuticle layer and numerous stellate hairs. The mesophyll contains sparse solitary crystals (Figure 2-a). The leaf surface sections showed stomata only in the lower epidermis. The stomata is surrounded by 5 subsidiary epidermal cells. Both upper and lower epidermis covered with numerous stellate hairs (Figure 2-b,2-c).

The transverse section of the petiole is a disc shape. Numerous stellate hairs cover the surface. The epidermis consists of a single layer, oval cells and is covered by a thick cuticle. The vascular bundle, surrounded by sclerenchymatous tissue, contains xylem and phloem in a ring form. Between the epidermis and the vascular bundle, 8-15 rows of parenchymatous tissue are included. The parenchymatous tissue contains numerous solitary crystals (Figure 3).



**Figure 1.** The transverse section of the midrib (le: lower epidermis, p: parenchyma, ph: phloem, sc: sclerenchyma, scr: solitary crystal, sh: stellate hair, ue: upper epidermis, xy: xylem)



**Figure 2.** The anatomical features of leaf lamina (a: transverse section of lamina, b: surface section of upper epidermis, c: surface section of lower epidermis, le: lower epidermis, pp: palisade parenchyma, sh: stellate hair, sp: spongy parenchyma, st: stomata, ue: upper epidermis)



**Figure 3.** The transverse section of petiole (e: epidermis, p: parenchyma, ph: phloem, sc: sclerenchyma, scr: solitary crystal, sh: stellate hair, xy: xylem)

#### 4. Conclusions and discussion

*Quercus* species are traditionally used in folk medicine [10-14, 25-33]. The correctly describe and determine of plants is very important, which are herbal medicine candidates and continue to be used in traditional folk medicine. Microscopic analysis of the anatomical structures of plants could provide useful information for the taxonomic classification. Light microscopy analysis is a common and effective method for the identification of medicinal plants [36].

In this study, leaf and petiole anatomy of *Quercus macranthera* subsp. *sypirensis* was studied in detail. In the leaf transverse section, the midrib is domed abaxially, the epidermal layer is covered with a thick cuticle and numerous stellate hairs. The vascular bundle is arc-shape arranged, mostly tend to ring shape and confined by sclerenchymatous tissue. The parenchymatous tissue covers between the epidermis tissue and the vascular bundle. The parenchyma includes sparse solitary crystals. In the lamina transverse section, the upper epidermis cells are clearly larger than the lower epidermal cells. The epidermis layer is covered with a thick cuticle and carries many stellate hairs. The mesophyll is characterized by 3 rows of palisade parenchyma and 3-8 rows of spongy parenchyma, additionally contains abundant starch grains. In the leaf surface sections, the stomata are located in the lower epidermis with 5 subsidiary cells. The upper epidermis is free of the stomata. Numerous stellate hairs were observed on both surfaces. The petiole is disc-shaped in the transverse section. The monolayer epidermis is surrounded by a thick cuticle and contains numerous stellate hairs. The vascular bundle surrounded by sclerenchyma is embedded in parenchymatous cells. The petiole contains relatively denser solitary crystals than leaf.

According to the previous study [37] on the anatomical structures of the Fagaceae family, *Quercus* leaves include a variety of hair types, such as simple-unicellular, stellate hairs; in several species of *Quercus* has uniseriate and/or capitate glands; epidermis composed of cells with straight or sinuous anticlinal walls, sometimes tend to be papillose on the lower surface; the stomata located on the lower surface as ranunculaceous; the vascular bundle is surrounded by arcs of sclerenchyma; the vascular system is consisting of a continuous or dissected cylinder. In our study, stellate hairs were densely detected both on the leaf and on the petiole, and stomata were observed in the lower epidermis. Simple-unicellular hairs and glandular hairs, noted in the previous study [37], were not observed. The

epidermal cells with papilla not detected in our study. According to our study, the sclerenchymatous tissue surrounding the vascular bundles is not in the form of an arc, but in the form of a ring.

\* This study was presented as an oral presentation at “Adiyaman 1. Uluslararası Fen ve Uygulamalı Bilimler Kongresi [Adiyaman 1st International Sciences and Applied Sciences Congress] (13-14 July 2021, Gölbashi, Adiyaman, Turkey)”.

## References

- [1] Davis, P. H. (1982). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.
- [2] POWO (2021). "Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org> (Accessed 10.07.2021).
- [3] Evans, W. (2002). *Trease and Evans pharmacognosy* (15th ed.). WB Saunders.
- [4] Buche, G., Colas, C., Fougère, L., Giordanengo, T., & Destandau, E. (2020). Untargeted UHPLC-Q-TOF-HRMS based determination of discriminating compounds for oak species *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl. identification. *Phytochemical Analysis*. <https://doi.org/10.1002/pca.3013>
- [5] Marinov, M. G., Dimitrova, E. D., & Puech, J. L. (1997). Kinetics of ellagitannin extraction from oak wood using white wine. *Journal of Wine Research*, 8(1), 29-40. <https://doi.org/10.1080/09571269708718095>
- [6] Perez, A. J., Pecio, L., Kowalczyk, M., Kontek, R., Gajek, G., Stopinsek, L., ... & Stochmal, A. (2017). Triterpenoid components from oak heartwood (*Quercus robur*) and their potential health benefits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(23), 4611-4623. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01396>
- [7] Ricci, A., Parpinello, G. P., Palma, A. S., Teslić, N., Brillì, C., Pizzi, A., & Versari, A. (2017). Analytical profiling of food-grade extracts from grape (*Vitis vinifera* sp.) seeds and skins, green tea (*Camellia sinensis*) leaves and Limousin oak (*Quercus robur*) heartwood using MALDI-TOF-MS, ICP-MS and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.014>
- [8] Şöhretöğlü, D., Sakar, M. K. (2004). Polyphenolic constituents and biological activities of *Quercus* species. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 33(3), 183–215.
- [9] Vivas, N., Nonier, M. F., de Gaulejac, N. V., & de Boissel, I. P. (2004). Occurrence and partial characterization of polymeric ellagitannins in *Quercus petraea* Liebl. and *Q. robur* L. wood. *Comptes Rendus Chimie*, 7(8-9), 945-954. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2004.06.004>
- [10] Carrió, E., & Vallès, J. (2012). Ethnobotany of medicinal plants used in eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea). *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), 1021-1040. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.049>
- [11] Gilca, M., Tiplica, G. S., & Salavastru, C. M. (2018). Traditional and ethnobotanical dermatology practices in Romania and other Eastern European countries. *Clinics in dermatology*, 36(3), 338-352. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2018.03.008>
- [12] Leporatti, M. L., & Ivancheva, S. (2003). Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *Journal of ethnopharmacology*, 87(2-3), 123-142. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00047-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00047-3)
- [13] Sõukand, R., & Pieroni, A. (2016). The importance of a border: medical, veterinary, and wild food ethnobotany of the Hutsuls living on the Romanian and Ukrainian sides of Bukovina. *Journal of ethnopharmacology*, 185, 17-40. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.009>
- [14] Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V., & Saukel, J. (2010). Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(1), 33-55. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.061>
- [15] Alkofahi, A., & Atta, A. H. (1999). Pharmacological screening of the anti-ulcerogenic effects of some Jordanian medicinal plants in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 67(3), 341-345. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00126-3)
- [16] Andrenšek, S., Simonovska, B., Vovk, I., Fyhrquist, P., Vuorela, H., & Vuorela, P. (2004). Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (*Quercus robur*) bark by rotation planar extraction using ExtraChrom®. *International Journal of Food Microbiology*, 92(2), 181-187. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.09.009>
- [17] Berahou, A., Auhmani, A., Fdil, N., Benharref, A., Jana, M., & Gadhi, C. A. (2007). Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), 426-429. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.032>
- [18] Deryabin, D. G., & Tolmacheva, A. A. (2015). Antibacterial and anti-quorum sensing molecular composition derived from *Quercus cortex* (Oak bark) extract. *Molecules*, 20(9), 17093-17108. <https://doi.org/10.3390/molecules200917093>
- [19] Frédéricich, M., Marcowycz, A., Ciekiewicz, E., Mégalizzi, V., Angenot, L., & Kiss, R. (2009). In vitro anticancer potential of tree extracts from the Walloon Region forest. *Planta medica*, 75(15), 1634-1637. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185867>



- [20] Gharzouli, K., Khennouf, S., Amira, S., & Gharzouli, A. (1999). Effects of aqueous extracts from *Quercus ilex* L. root bark, *Punica granatum* L. fruit peel and *Artemisia herba-alba* Asso leaves on ethanol-induced gastric damage in rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 13(1), 42-45. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199902\)13:1<42::AID-PTR383>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199902)13:1<42::AID-PTR383>3.0.CO;2-2)
- [21] Güllüce, M., Adıgüzel, A., Öğütçü, H., Şengül, M., Karaman, I., & Şahin, F. (2004). Antimicrobial effects of *Quercus ilex* L. extract. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(3), 208-211. <https://doi.org/10.1002/ptr.1419>
- [22] Jassim, S. A. A., & Naji, M. A. (2003). Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of applied microbiology*, 95(3), 412-427. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02026.x>
- [23] Khennouf, S., Benabdallah, H., Gharzouli, K., Amira, S., Ito, H., Kim, T. H., ... & Gharzouli, A. (2003). Effect of tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(5), 1469-1473. <https://doi.org/10.1021/jf020808y>
- [24] Panchal, S. K., & Brown, L. (2013). Cardioprotective and hepatoprotective effects of ellagitannins from European oak bark (*Quercus petraea* L.) extract in rats. *European journal of nutrition*, 52(1), 397-408. <https://doi.org/10.1007/s00394-011-0277-1>
- [25] Bulut, G., Haznedaroğlu, M. Z., Doğan, A., Koyu, H., & Tuzlacı, E. (2017). An ethnobotanical study of medicinal plants in Acipayam (Denizli-Turkey). *Journal of Herbal Medicine*, 10, 64-81. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.08.001>
- [26] Cakilcioglu, U., & Turkoglu, I. (2010). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 165-175. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.08.017>
- [27] Senkardes, I., & Tuzlaci, E. (2014). Some Ethnobotanical Notes from Gundogmus District (Antalya/Turkey). *Clinical and Experimental Health Sciences*, 4(2), 63.
- [28] Sargin, S. A. (2021). Plants used against obesity in Turkish folk medicine: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113841. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113841>
- [29] Sargin, S. A., Akçicek, E., & Selvi, S. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alaşehir (Manisa) in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), 860-874. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.040>
- [30] Polat, R., Cakilcioglu, U., & Satıl, F. (2013). Traditional uses of medicinal plants in Solhan (Bingöl-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 148(3), 951-963. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.05.050>
- [31] Sargin, S. A., Selvi, S., & Büyükcengiz, M. (2015). Ethnomedicinal plants of Aydıncık district of Mersin, Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 200-216. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.008>
- [32] Kültür, Ş. (2007). Medicinal plants used in Kırklareli province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2), 341-364. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.035>
- [33] Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., & Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in central Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2-3), 95-115. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00399-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00399-8)
- [34] Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M. T. (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. Nezahat Gökyigit Botanik Bahçesi Yayınları, Flora Dizisi I.
- [35] Türk Farmakopesi (2017). *Türk Farmakopesi, genel monograflar I*. Ankara, Türkiye: T.C. Sağlık Bakanlığı.
- [36] Alamgir, A. N. M. (2017). Pharmacognostical Botany: Classification of medicinal and aromatic plants (MAPs), botanical taxonomy, morphology, and anatomy of drug plants. In K. D., Rainsford (Eds.), *Therapeutic use of medicinal plants and their extracts* (Vol. 1, pp.177-293). Springer International Publishing AG.
- [37] Metcalfe, C. R., & Chalk, L. (1965). *Anatomy of dicotyledones*. (Vol. 2). Oxford, UK: Clarendon Press.



## Comparative morphology and morphometric analysis of some Histeridae (Insecta: Coleoptera) species

Cansu KILIÇ<sup>1</sup>, Ferhat ALTUNSOY<sup>1\*</sup>  
ORCID: 0000-0002-7969-7394; 0000-0002-4446-323X

<sup>1</sup> Eskişehir Technical University, Faculty of Science, Department of Biology, 26000, Eskişehir, Turkey

### Abstract

Histeridae (Coleoptera) is a worldwide group of about 400 genera and 4500 species. Many family members are predators of eggs, larvae, and adults of Diptera (Insecta) species. On the other hand, rotting corpses have great precaution in forensic studies due to their feeding and colonization. The taxonomic characters used in the classification of Histeridae species are based on morphology. However, the variations in morphological characters cause difficulties in the determinations that lead to significant errors in the diagnostic process. In this study, seasonal variations of some Histeridae species used to determine the minimum time of death (PMI) in forensic investigations are evaluated with geometrical morphometry and the references given for the prevention of errors for identifying species.

**Keywords:** Histeridae, morphometry, Taxonomic character, Coleoptera, PMI

----- \* -----

### Bazı Histeridae (Insecta: Coleoptera) türlerinin karşılaştırmalı morfolojisi ve morfometrik analizi

### Özet

Histeridae (Coleoptera) dünya çapında yaklaşık 400 cins ve 4500 tür ile temsil edilen bir gruptur. Birçok Familya üyesi Diptera (Insecta) türlerinin yumurta, larva ve erginleri üzerinde predatördür. Diğer taraftan çürüyen cesetler üzerinde beslenmeleri ve kolonizasyonları sayesinde adli çalışmalarda büyük öneme sahiptir. Histeridae türlerinin sınıflandırılmasında kullanılan taksonomik karakterler morfoloji temellidir. Ancak morfolojik karakterlerdeki varyasyonlar teşhis aşamasında önemli hatalara neden olduğundan tاینlerde zorluk çıkarmaktadır. Bu çalışmada adli araştırmalarda minimum ölüm zamanının (PMI) belirlenmesi amacıyla kullanılan bazı Histeridae türlerinin ceset üzerindeki mevsimsel süksiyonuna bağlı olarak ortaya çıkan varyasyonları, geometrik morfometrik analizlerle ortaya koyulmuş ve türlerin teşhisinde yapılabilecek hataların önlenmesi için referans veriler sunulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Histeridae, morfometri, Taksonomik karakter, Coleoptera, PMI

### 1. Introduction

Histeridae (Clown beetles) belong to the Coleoptera order, including 400 genera and 4500 species [1, 2, 3, 4]. The majority of the Histerids are predators by feeding on the adult, larvae, and eggs of the Diptera species. The species of the Histeridae are also used as control agents on some of the other insect groups that are both harmful to agriculture and livestock [5, 6]. It was observed that the many Histerid adults and larvae are necrophilous and play a significant role in forensic investigations by feeding other Diptera larvae during the active decay and early advanced decay stages [7, 8, 9], also stated that Histerids are the most abundant Coleoptera species attracting to carcass after Staphylinidae.

Identification of the species accurately is crucial in forensic investigations. In previous studies, it has been studied on the forensically essential species of the Histeridae [10, 9]. The main problem in these studies was the specific identification of species, especially of the genus *Saprinus*. Considering the identification keys, taxonomic characters can not clearly distinguish the morphological structures of the species [11, 12]. According to Krikken &

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902223213550/4710; Fax.: +902223204910; E-mail: tabanidae@msn.com

Huijbregts, [13], the reason for intensive use of other necrophilous insects in forensic practices rather than Coleoptera is probably because of their taxonomic inconvenience. In consequence of variations on the specimens depending on seasonal and periodical impact, the area on which they were fed on the corpse, and the altitude, the characters presented in the keys were often referred to by using the terms 'less-than' or by comparing them to one another [12, 14]. These variations probably cause differences in the morphological characters and complicate to use of identification keys. This study aims to evaluate the variations with morphometric analyses and contribute to the keys for diagnosing the species. For this purpose variations in the morphological characters of the four species of *Saprinus* genus, *Saprinus caerulescens*, *S. semistiratus*, *S. planiusculus*, and *S. Subnitescens*, have been determined by statistical methods, for allowing accurate identifying of the species.

## 2. Materials and methods

This study examined the four species belonging to the Histeridae family, the *Saprinus* genus: *Saprinus caerulescens*, *S. semistiratus*, *S. planiusculus*, and *S. subnitescens*. Adult specimens were collected on the pig carcasses in Tandır Village, Eskişehir province, Turkey (Lat.: 39,92159°, Long.: 30,69099°, Elev.: 1280 meter) and were transferred to the laboratory. This area has been specially selected because it remains between the Sakarya valley, which is seen as a Mediterranean climate, and the land climates. Specimens were identified according to keys by Secchi, [12] and Lackner, [11]. Twenty male specimens, known to have variations, were selected. First of all, for morphological comparing genitalia Six biometric characters determined by Ohara, [15], APW width between anterior angles of pronotum; EL length of elytron along the sutural line; EW maximal width between outer margins of elytra; PEL length between anterior angles of pronotum and apices of elytra; PPW width between posterior angles of pronotum and PW maximal width of propygidium were selected and compared as morphologically and morphometrically. Photographs of these six characters were taken with Canon D90 (Canon Zoom Lens EF 55-200mm) and measurements acquired by the ImageJ. The measurements were then evaluated with SPSS (IBM SPSS statistic 24). ANOVA tests were applied to assessments for displaying variations.

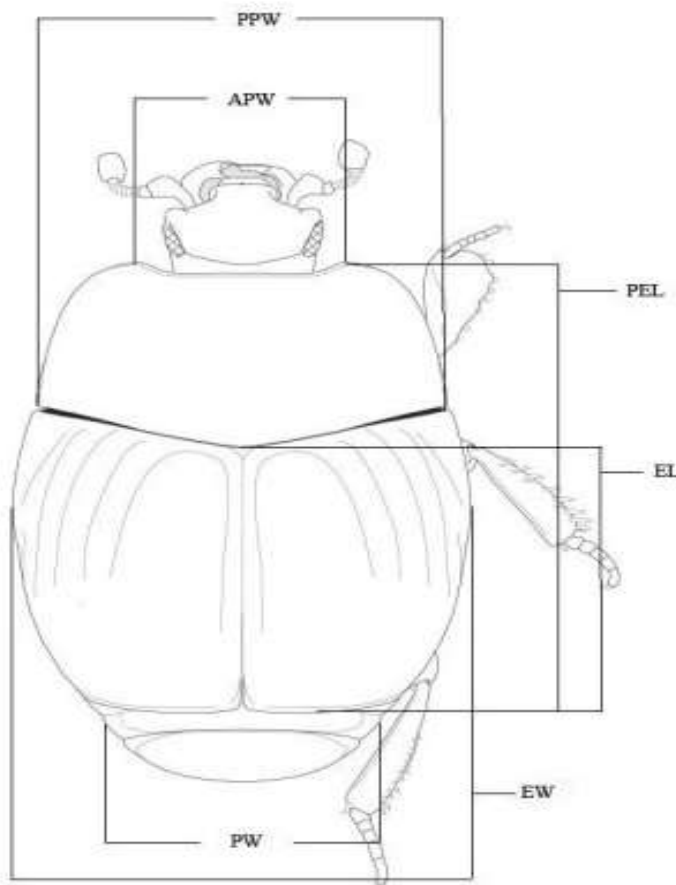


Figure 1. Biometric characters of *Saprinus*: APW width between anterior angles of pronotum; EL length of elytron along the sutural line; EW maximal width between outer margins of elytra; PEL length between anterior angles of pronotum and apices of elytra; PPW width between posterior angles of pronotum and PW maximal width of propygidium

### 3. Results and discussion

The statistical analyses achieved after the morphometric measurements of the six characters show that the method we used can be used reliably to identify the species. Remarkably, the six characters, whose measurements were made, within each species were examined. According to the ANOVA test, statistical differences were found between the measurements of these biometric characters for all species ( $P < 0,05$ ) (Table 1).

Table 1. Statistical comparison of morphometric analyzes of six characters for each species						
ANOVA						
Species		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b><i>Saprinus (Saprinus) caerulescens</i></b>						
APW	Between Groups	,555	3	,185	3,993	,015
	Within Groups	1,667	36	,046		
	Total	2,222	39			
PPW	Between Groups	2,838	3	,946	4,204	,012
	Within Groups	8,101	36	,225		
	Total	10,939	39			
PEL	Between Groups	6,388	3	2,129	7,817	,000
	Within Groups	9,807	36	,272		
	Total	16,195	39			
EL	Between Groups	4,193	3	1,398	7,090	,001
	Within Groups	7,098	36	,197		
	Total	11,291	39			
EW	Between Groups	2,134	3	,711	3,191	,035
	Within Groups	8,024	36	,223		
	Total	10,158	39			
PW	Between Groups	1,998	3	,666	4,050	,014
	Within Groups	5,920	36	,164		
	Total	7,918	39			
<b><i>Saprinus (Saprinus) planiusculus (Hoffmann 1803)</i></b>						
APW	Between Groups	,339	3	,113	4,430	,009
	Within Groups	,919	36	,026		
	Total	1,259	39			
PPW	Between Groups	1,173	3	,391	4,715	,007
	Within Groups	2,984	36	,083		
	Total	4,157	39			
PEL	Between Groups	1,053	3	,351	2,171	,050
	Within Groups	5,824	36	,162		
	Total	6,877	39			
EL	Between Groups	,395	3	,132	2,788	,044
	Within Groups	1,699	36	,047		
	Total	2,093	39			
EW	Between Groups	1,800	3	,600	8,148	,000
	Within Groups	2,650	36	,074		
	Total	4,450	39			
PW	Between Groups	,569	3	,190	3,099	,039
	Within Groups	2,202	36	,061		
	Total	2,771	39			
<b><i>Saprinus (Saprinus) semistriatus (Scriba, 1790)</i></b>						
APW	Between Groups	,510	3	,170	3,026	,042
	Within Groups	2,023	36	,056		
	Total	2,534	39			
PPW	Between Groups	,706	3	,235	3,024	,042
	Within Groups	2,802	36	,078		
	Total	3,508	39			
PEL	Between Groups	1,268	3	,423	2,856	,031

Table 1. Continued

	Within Groups	5,329	36	,148		
	Total	6,597	39			
EL	Between Groups	,503	3	,168	2,794	,044
	Within Groups	2,162	36	,060		
	Total	2,666	39			
EW	Between Groups	,952	3	,317	2,430	,041
	Within Groups	4,702	36	,131		
	Total	5,654	39			
PW	Between Groups	1,022	3	,341	3,340	,030
	Within Groups	3,671	36	,102		
	Total	4,692	39			
<b><i>Saprinus subnitescens</i> Bickhardt, 1909</b>						
APW	Between Groups	,282	3	,094	3,387	,028
	Within Groups	,999	36	,028		
	Total	1,281	39			
PPW	Between Groups	1,458	3	,486	4,897	,006
	Within Groups	3,573	36	,099		
	Total	5,030	39			
PEL	Between Groups	1,288	3	,429	2,653	,063
	Within Groups	5,826	36	,162		
	Total	7,114	39			
EL	Between Groups	,533	3	,178	3,149	,037
	Within Groups	2,030	36	,056		
	Total	2,563	39			
EW	Between Groups	1,422	3	,474	3,870	,017
	Within Groups	4,410	36	,123		
	Total	5,833	39			
PW	Between Groups	1,900	3	,633	9,609	,000
	Within Groups	2,373	36	,066		
	Total	4,273	39			

\* According to the data obtained, there is a significant difference between all biometric characters. (P<0,05)

The measurements of each biometric character on twenty individuals were analyzed with the Tukey test (Table 2). Statistically significant differences were found between the results. In this case, it was also determined that the length of each biometric character differs between species and therefore these analyzes can be used safely in species identification.

Table 2. Interspecies comparison of the lengths of biometric parameters

Biometrical Parameters	Lengths (mm)			
	Mean ± SE*			
	<i>Saprinus caeruleus</i>	<i>Saprinus planiusculus</i>	<i>Saprinus semistriatus</i>	<i>Saprinus subnitescens</i>
APW**	1,64 ± 0,03 a	1,20 ± 0,02 b	0,95 ± 0,03 c	0,99 ± 0,02 d
PPW**	4,55 ± 0,03 a	3,53 ± 0,04 b	3,03 ± 0,03 c	2,89 ± 0,04 d
PEL**	5,73 ± 0,06 a	4,41 ± 0,04 b	3,80 ± 0,03 c	3,73 ± 0,02 d
EL**	3,19 ± 0,02 a	2,56 ± 0,02 b	2,12 ± 0,03 c	2,76 ± 0,06 d
EW**	5,00 ± 0,03 a	3,98 ± 0,03 b	3,40 ± 0,03 c	3,19 ± 0,04 d
PW**	3,27 ± 0,03 a	2,49 ± 0,03 b	2,10 ± 0,03 c	1,88 ± 0,02 d

\* Mean and Standard error values

\*\* There is a statistically significant difference between the biological parameter data of the species shown with different letters (a-d) in the same row. (Anova, Tukey).

F(APW)= 3,993 F(PPW)=4,204 F(PEL)=7,817 F(EL)=7,090 F(EW)=3,191 F(PW)=4,050 df=3,76 P<0,05

Statistically, significant differences were confirmed with the analyzes made between the species. The analyses of each species on the same morphometric character, which is the study's supporting element, is given below (Table 3).

According to the table; D8, D9, D10, and D11, which are the abbreviations of the sample material, are given as equivalent to June, July, August, and September, respectively, since monthly sampling is done on domestic pigs. Analysis results in the same column in the table include measurements of different species. As shown in Table 3, *Saprinus* species collected from the same pig sample were statistically different when evaluated in terms of each biometric character.

Table 3. Comparison of measurements of biometric characters within the same species found in different months

APW		MATERIALS			
		D8	D9	D10	D11
SPECIES	<i>Saprinus caerulescens</i>	1,76 ± 0,20a	1,64 ± 0,21a	1,76 ± 0,23a	1,47 ± 0,21a
	<i>Saprinus planiusculus</i>	1,30 ± 0,11b	1,26 ± 0,15b	1,05 ± 0,16bc	1,18 ± 0,20b
	<i>Saprinus semistriatus</i>	0,96 ± 0,19c	1,02 ± 0,10c	0,85 ± 0,16b	0,97 ± 0,18bc
	<i>Saprinus subnitescens</i>	1,03 ± 0,26c	0,89 ± 0,09c	1,09 ± 0,13c	0,90 ± 0,14c
F (apwd8)=1,748 F (apwd9)=1,595 F(apwd10)=0,858 F(apwd11)=0,844 df=3,76 p<0,05					
PPW					
SPECIES	<i>Saprinus caerulescens</i>	5,08 ± 0,26a	4,58 ± 0,33a	4,73 ± 0,47a	4,35 ± 0,60a
	<i>Saprinus planiusculus</i>	3,63 ± 0,31b	3,82 ± 0,46b	3,28 ± 0,29b	3,57 ± 0,27b
	<i>Saprinus semistriatus</i>	2,97 ± 0,34c	3,25 ± 0,32c	3,08 ± 0,28b	3,04 ± 0,64bc
	<i>Saprinus subnitescens</i>	3,22 ± 0,47bc	2,83 ± 0,17d	2,98 ± 0,28b	2,79 ± 0,24c
F (ppwd8)= 1,470 F (ppwd9)= 2,031 F(ppwd10)=1,178 F(ppwd11)= 4,177 df=3,76 p<0,05					
PEL					
SPECIES	<i>Saprinus caerulescens</i>	6,28 ± 0,38a	5,88 ± 0,40a	5,87 ± 0,67a	5,17 ± 0,58a
	<i>Saprinus planiusculus</i>	4,43 ± 0,22b	4,60 ± 0,43b	4,17 ± 0,46b	4,45 ± 0,43b
	<i>Saprinus semistriatus</i>	3,61 ± 0,36c	4,10 ± 0,43c	3,68 ± 0,32b	3,82 ± 0,56c
	<i>Saprinus subnitescens</i>	4,07 ± 0,58bc	3,66 ± 0,26c	3,84 ± 0,34b	3,61 ± 0,35c
F (peld8)= 2,337 F (peld9)= 1,055 F(peld10)= 2,734 F(peld11)= 0,600 df=3,76 p<0,05					
EL					
SPECIES	<i>Saprinus caerulescens</i>	3,72 ± 0,67a	3,10 ± 0,23a	3,06 ± 0,39a	2,86 ± 0,37a
	<i>Saprinus planiusculus</i>	2,52 ± 0,16b	2,71 ± 0,29b	2,44 ± 0,24a	2,56 ± 0,15a
	<i>Saprinus semistriatus</i>	2,08 ± 0,22b	2,14 ± 0,24c	2,18 ± 0,15a	2,09 ± 0,36b
	<i>Saprinus subnitescens</i>	2,24 ± 0,33b	1,99 ± 0,17c	5,00 ± 0,47a	1,94 ± 0,17b
F (eld8)= 1,574 F (eld9)= 0,835 F(eld10)= 4,677 F(eld11)= 3,245 df=3,76 p<0,05					
EW					
SPECIES	<i>Saprinus caerulescens</i>	5,36 ± 0,33a	3,77 ± 0,16a	3,28 ± 0,32a	3,54 ± 0,55a
	<i>Saprinus planiusculus</i>	5,0 ± 0,32b	4,09 ± 0,39b	3,52 ± 0,33b	3,13 ± 0,18b
	<i>Saprinus semistriatus</i>	5,0 ± 0,59c	4,0 ± 0,1,0c	3,5 ± 0,29bc	3,2 ± 0,18bc
	<i>Saprinus subnitescens</i>	4,7 ± 0,57bc	4,11 ± 0,26d	3,34 ± 0,62c	3,04 ± 0,24c

Table 2. Continued

PW		F (ewd8)= 2,875 F(ewd9)= 1,694 F(ewd10)= 1,239 F(ewd11)= 3,970 df=3,76 p<0,05			
SPECIES	<i>Saprinus caerulescens</i>	3,57 ± 0,35a	3,22 ± 0,32a	3,15 ± 0,52a	2,95 ± 0,41a
	<i>Saprinus planiusculus</i>	2,53 ± 0,18b	2,66 ± 0,35b	2,33 ± 0,16b	2,47 ± 0,25b
	<i>Saprinus semistriatus</i>	2,03 ± 0,25c	2,18 ± 0,30c	2,13 ± 0,21bc	2,05 ± 0,45c
	<i>Saprinus subnitescens</i>	2,31 ± 0,40bc	1,78 ± 0,14d	1,81 ± 0,22c	1,84 ± 0,19c

F (pwd8)= 2,104 F (pwd9)= 1,880 F(pwd10)= 1,531 F(pwd11)= 3,014 df=3,76 p<0,0

\*\*  
There is a statistically significant difference between

the biological parameter data of the species shown with different letters (a-d) in the same column. (Anova, Tukey).

The four *Saprinus* species were evaluated inter-specific and intra-specific differences. The analyses of variance (ANOVA) showed a significant difference. Statistical comparisons of morphometric analyzes of six characters for each species display that all characters differ each except *Saprinus subnitescens* Bickhardt, 1909 of PEL (P: 0,063). Interspecies comparison of the lengths of biometric parameters also shows significant differences which is the most important data, supported the present study. All data varies between species and this is the a fortiori analysis for our work (P<0.05) and F values followed by F(APW)= 3,993 F(PPW)=4,204 F(PEL)=7,817 F(EL)=7,090 F(EW)=3,191 F(PW)=4,050 df=3,76. Measurement of the biometric characters within the same species found in different months was also compared. However, APW of only D10 is different in all species while D8, D9, and D11 of *Saprinus semistriatus* and *Saprinus subnitescens* do not Show any differences. PPW shows differences in only D9 and for *Saprinus semistriatus* and *Saprinus subnitescens*, there was no significant D8, D10, and D11. *Saprinus caerulescens* was the only different species with measurements of PEL. For EL; *Saprinus caerulescens* in D8 show a great variability within the species while D10 does not include any differences. The EW measurements of the species were statistically different in D9. The biological parameter data of PW in D9 displays an important variation between other measurements in species.

Biometrical characters of four different species of necrophilous beetles (Histeridae) were successfully measured and analyzed by their morphological characters. In our study, the statistical differences were obtained as a result of the study; In fact, it reveals the importance of biometric morphometric analyses in preventing errors that may arise in species identification. Consistent with the literature, this research found that participants who reported using geometric morphometry also. Zhang et al. [16]; found significant morphological differences in the pronotum or elytron between any two Lucanidae subfamilies based on geometric morphometric analysis. Their study provides insights into the morphological variations and evolutionary history of the pronotum and elytron in four subfamilies of stag beetles. Our results corroborate a great deal of the previous work in Iran; geometric morphometric study of the genus *Erodiontes* (Coleoptera: Tenebrionidae) populations of *E. pfaundleri* showed significant differences in pronotum size whereas it was similar in size in populations of *E. aelleni* [17]. In another study, while dealing with the morphological effects of geographic distance on different populations [18]. Li et al. [19] studied six different biotypes of 4th instar nymphs in a Hemiptera species, based on the length differences and weights in their taxonomic characters. Increased attention to geometric morphometry contributes reliability to species identification so that this study corroborates these earlier findings.

*Saprinus* is the necrophilous genus that is the colonizer on the corpses and is helpful to calculate time after death [10]. The four species belonging to the *Saprinus* genus studied are the most heavily colonized individuals on the corpse in forensic studies and the most intensively colonized periodically [8, 9, 10]. These colonizers are using to determine the time of death according to their correct identification. The species may be affected by longitude, latitude, climate condition, and geographical environment of different provinces. The taxonomic characters used on the members of the Histeridae family guide by comparing the individuals in the identification keys. When differentiating between the two species in the identification keys, it was seen that individuals could not be considered individually, and they were diagnosed by comparing them with other species. The taxonomic characters used to differ the species in the keys by using 'more or less', 'usually', 'may be' [14]. However, the taxonomic characters used vary according to age, environmental conditions, and feeding environments. Therefore, our study supported other studies that the difficulties seen in the identification keys of the studied family can be solved by using morphometric methods. The taxonomic characters used to distinguish between species may differ according to age and environment, and these taxonomic characters cause problems in identification keys. Polat & Öcal [20] indicated that some species can be defined as the

same or inaccurate if they are identified by using conventional methods. As a result of the study, it has been proven that the biometric characters can be used in the identification keys via conventional methods.

## Acknowledgements

This study was supported by Anadolu University Project Office (Project number: 1204F072).

## References

- [1] Mazur, S. (2011). *A Concise catalogue of the Histeridae (Insecta: Coleoptera)*. Warsaw: Warsaw University of Life Sciences, SGGW Press.
- [2] Caterino, M. S., & Tishenchkin, A. K. (2014). New genera and species of Neotropical Exosternini (Coleoptera: Histeridae). *ZooKeys*(381), 11-78.
- [3] Lackner, T. (2015). Coleoptera: Sphaeritidae, Histeridae. *Folia Heyrovskyana, Series B*(23), 1-33.
- [4] Zhou, Y. L., Caterino, M. S., Ren, D., & Slipinski, A. (2020). Phylogeny and evolution of Mesozoic and extant lineages of Histeridae (Coleoptera), with discovery of a new subfamily Antigracilinae from the Lower Cretaceous. *Cladistics*, 36(5), 521-539.
- [5] Fincher, G. T. (1995). Predation on the horn fly by Hister Bruchi. *Southwestern Entomologist*, 20(4), 423-427.
- [6] Summerlin, J. W., Roth, J. P., & Fincher, G. T. (1991). Predation by two species of Histerid Beetles on the Horn Fly. *Southwestern Entomologist*, 16(1), 45-49.
- [7] Caneparo, M. C., Fischer, M. L., & Almeida, L. M. (2017). Effect of temperature on the life cycle of *Euspilotus azureus* (Coleoptera: Histeridae), a predator of forensic importance. *Florida Entomologist*, 100(4), 795-801.
- [8] Szelecz, I., Feddern, N., Seppely, C. W., Amendt, J., & Mitchell, E. D. (2018). The importance of *Saprinus semistriatus* (Coleoptera: Histeridae) for estimating the minimum post-mortem interval. *Legal Medicine*(30), 21-27.
- [9] Özdemir, S., & Sert, O. (2009). Determination of Coleoptera fauna on carcasses in Ankara province, Turkey. *Forensic Science International*(183), 24-32.
- [10] Altunsoy, F., Turan, Y., Firat, S., & Sert, O. (2017). Differences in succession of Coleoptera species attracted to pig carcasses in rural and urban habitats in Eskişehir Province, Turkey. *Turkish Journal of Entomology*, 41(2), 177-195.
- [11] Lackner, T. (2010). Review of the Palaearctic genera of Saprininae (Coleoptera: Histeridae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, 50(1), 1-254.
- [12] Secchi, F. (2002, February 18). July 2021 tarihinde [http://www.insecte.org/photos/archives/histeridae\\_Secchi.pdf](http://www.insecte.org/photos/archives/histeridae_Secchi.pdf) adresinden alındı
- [13] Krikken, J., & Huijbregts, J. (2001). Insects as forensic informants: the Dutch experience and procedure. *Entomologia Experimentalis et Applicata*(12), 159-164.
- [14] Salman, S., Garrouste, R., Nel, A., & Azar, D. (2018). The community succession of arthropods on a pig carcass in Lebanon: different taxonomic level approaches with faunistic notes. *Annales de la Société entomologique de France*, 54(5), 417-433.
- [15] Ohara, M. (1994). A revision of the superfamily Histeroidea of Japan (Coleoptera). *Insecta Matsumurana*(51), 1-238.
- [16] Zhang, M., Ruan, Y., Wan, X., Tong, Y., Yang, X., & Bai, M. (2019). Geometric morphometric analysis of the pronotum and elytron in stag beetles: insight into its diversity and evolution. *ZooKeys*(833), 21-40.
- [17] Taratavi, S., Darvish, J., & Mirshamsi, O. (2009). Geometric morphometric study of two species of the psammophilous genus *Erodiontes* (Coleoptera: Tenebrionidae) from the Lute desert, Central Iran. *Iranian Journal of Animal Biosystematics*, 5(2), 81-89.
- [18] Albert, P., Moureau, B., Dommergues, J. L., & David, B. (2001). Differentiation at a microgeographical scale within two species of ground beetle, *Carabus auronitens* and *C. nemoralis* (Coleoptera, Carabidae): a geometrical morphometric approach. *Zoologica Scripta*(30), 299-311.
- [19] Li, J., Bai, R., Li, X., Jiang, J., & Yan, F. (2013). Comparative Morphology and Morphometry of Six Biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) from China. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(5), 846-852.
- Polat, F., & Çorak Öcal, İ. (2021). Phylogenetic analysis of *Euscorpium phrygius* Bonacina, 1980 (Scorpiones: Euscorpidae) distributed in Turkey. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 14(2), 214-219.





## Investigation of *Erodium hoefftianum* (Geraniaceae) production by tissue culture methods

Mustafa CÜCE \*<sup>1</sup>

ORCID: 0000-0001-7406-171X

<sup>1</sup> Department of Food Technology, Şebinkarahisar School of Applied Sciences, Giresun Univ., 28400 Giresun, Turkey

### Abstract

This current and novel approach was designed to occur the production method of *Erodium hoefftianum* via direct organogenesis. Lateral meristems obtained from seeds germinated in Murashige and Skoog (MS) basal medium were preferred as explants. Then, MS medium supplemented with individually 1.0/0.1 mg/L zeatin (ZEA)/indole-3-butyric acid (IBA), 1.0/0.1 mg/L kinetin (KIN)/IBA, 1.0/0.1 mg/L N6-[2-isopentenil]adenine (2iP)/IBA, 1.0/0.1 mg/L 6-Benzyladenine (6-BA)/IBA, 1.0/0.1 mg/L thidiazuron (TDZ)/IBA and without plant growth regulators (PGRs) were investigated for the effective shoot multiplication. 1.0/0.1 mg/L 6-BA/ IBA combination was found to be the most appropriate PGRs in all cases except shoot length. Zeatin/IBA combination was determined to be most ideal for shoot length with 37.28 mm. The rooting capability was also studied by using MS with IBA, indole-3-butyric acid (IAA), and 1-naphthaleneacetic acid, (NAA) (0.5 mg/L) or without auxin (control). The control group has the highest values in all cases with the rooting percentage at 100%. Well rooted and healthy plantlets were transplanted into rich peat: perlite (2:1) substrates and subsequently acclimatized carefully under climate room conditions and transfer to the botanical garden conditions.

**Keywords:** *Erodium hoefftianum*, acclimatization, *ex situ*, *in vitro*, micropropagation, PGR

----- \* -----

### *Erodium hoefftianum* (Geraniaceae)'un doku kültürü yöntemleriyle üretiminin araştırılması

### Özet

Bu yeni yaklaşım, doğrudan organogenesis yoluyla *Erodium hoefftianum*'un üretim yöntemini belirlemek için tasarlanmıştır. Eksplant olarak Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında çimlenen tohumlardan elde edilen yan meristemler kullanılmıştır. Daha sonra, ayrı ayrı 1.0/0.1 mg/L zeatin (ZEA)/indol-3-bütirik asit (IBA), 1.0/0.1 mg/L kinetin (KIN)/IBA, 1.0/0.1 mg/L N6-[2-isopentenil]adenin (2iP)/IBA, 1.0/0.1 mg/L 6-Benziladenin (6-BA)/IBA, 1.0/0.1 mg/L thidiazuron (TDZ)/IBA ve bitki büyüme düzenleyicisi olmadan desteklenen MS besin ortamı etkin sürgün çoğalması için araştırılmıştır. 1.0/0.1 mg/L 6-BA/IBA kombinasyonu sürgün uzunluğu hariç tüm durumlarda en uygun bitki büyüme düzenleyicileri olarak bulundu. Zeatin/IBA kombinasyonu 37.28 mm ile sürgün uzunluğu için en ideal olarak belirlendi. Köklenme kabiliyeti ayrıca IBA, indol-3-bütirik asit (IAA) ve 1-naftalen asetik asit (NAA) (0,5 mg/L) veya oksinsiz (kontrol) ile MS kullanılarak da incelenmiştir. Kontrol grubu, %100 köklenme yüzdesi ile tüm durumlarda en yüksek değerlere sahiptir. Turba: perlit (2:1) ortamlarına nakledilen köklü bitkicikler daha sonra iklim odası koşulları altında iklimlendirildi ve botanik bahçesi koşullarına transfer edildi.

**Anahtar kelimeler:** *Erodium hoefftianum*, iklimlendirme, *ex situ*, *in vitro*, mikroçoğaltma, PGR

### 1. Introduction

This current and novel approach was designed to occur the production method of *Erodium hoefftianum* via direct organogenesis. Lateral meristems obtained from seeds germinated in Murashige and Skoog (MS) basal medium were preferred as explants. Then, MS medium supplemented with individually 1.0/0.1 mg/L zeatin (ZEA)/indole-3-

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905373468681; Fax.: +904543101717; E-mail: mustafacuce@windowslive.com

butyric acid (IBA), 1.0/0.1 mg/L kinetin (KIN)/IBA, 1.0/0.1 mg/L N6-[2-isopentenil]adenine (2iP)/IBA, 1.0/0.1 mg/L 6- Benzyladenine (6-BA)/IBA, 1.0/0.1 mg/L thidiazuron (TDZ)/IBA and without plant growth regulators (PGRs) were investigated for the effective shoot multiplication. 1.0/0.1 mg/L 6-BA/ IBA combination was found to be the most appropriate PGRs in all cases except shoot length. Zeatin/IBA combination was determined to be most ideal for shoot length with 37.28 mm. The rooting capability was also studied by using MS with IBA, indole-3- butyric acid (IAA), and 1-naphthaleneacetic acid, (NAA) (0.5 mg/L) or without auxin (control). The control group has the highest values in all cases with the rooting percentage at 100%. Well rooted and healthy plantlets were transplanted into rich peat: perlite (2:1) substrates and subsequently acclimatized carefully under climate room conditions and transfer to the botanical garden conditions.

**Keywords:** *Erodium hoefftianum*, acclimatization, *ex situ*, *in vitro*, micropropagation, PGR

----- \* -----

### *Erodium hoefftianum* (Geraniaceae)'un Doku Kültürü Yöntemleriyle Üretiminin Araştırılması

#### Özet

Bu yeni yaklaşım, doğrudan organogenesis yoluyla *Erodium hoefftianum*'un üretim yöntemini belirlemek için tasarlanmıştır. Eksplant olarak Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında çimlenen tohumlardan elde edilen yan meristemler kullanılmıştır. Daha sonra, ayrı ayrı 1.0/0.1 mg/L zeatin (ZEA)/indol-3- bütirik asit (IBA), 1.0/0.1 mg/L kinetin (KIN)/IBA, 1.0/0.1 mg/L N6-[2-isopentenil]adenin (2iP)/IBA, 1.0/0.1 mg/L 6- Benziladenin (6-BA)/IBA, 1.0/0.1 mg/L thidiazuron (TDZ)/IBA ve bitki büyüme düzenleyicisi olmadan desteklenen MS besin ortamı etkin sürgün çoğalması için araştırılmıştır. 1.0/0.1 mg/L 6-BA/IBA kombinasyonu sürgün uzunluğu hariç tüm durumlarda en uygun bitki büyüme düzenleyicileri olarak bulundu. Zeatin/IBA kombinasyonu 37.28 mm ile sürgün uzunluğu için en ideal olarak belirlendi. Köklenme kabiliyeti ayrıca IBA, indol-3-bütirik asit (IAA) ve 1-naftalen asetik asit (NAA) (0,5 mg/L) veya oksinsiz (kontrol) ile MS kullanılarak da incelenmiştir. Kontrol grubu, %100 köklenme yüzdesi ile tüm durumlarda en yüksek değerlere sahiptir. Turba: perlit (2:1) ortamlarına nakledilen köklü bitkicikler daha sonra iklim odası koşulları altında iklimlendirildi ve botanik bahçesi koşullarına transfer edildi.

**Anahtar kelimeler:** *Erodium hoefftianum*, iklimlendirme, *ex situ*, *in vitro*, mikroçoğaltma, PGR

#### 2. Introduction

Plants are natural resources and attract the attention of people all over the world, so phytochemicals in their structures are frequently used in modern medicine or alternative medicine applications. Studies at the point of reaching these phytochemicals by collecting them from nature accelerate the endangerment of plants. *Erodium* L'Herit, one of the six genera belonging to the Geraniaceae family, spreads all over the world and is represented by 74 species [1-3]. The biggest share in this diversity is the Mediterranean region with 63 species. Other species are distributed in America (1), South America (1), Australia (5) and Asia (4) [4, 5]. Turkey occupies a large place in this diversity with 30 taxa, 16 of which are endemic [6-8]. *Erodium hoefftianum* C. A. Mey. is one of these taxa. Phytochemicals that are heavily involved in *Erodium* species have generally been reported as quinones, tannins, saponins, alkaloids, flavanoids, coumarins, anthracenosides, mucilages, sterols, triterpenes and phenolic derivatives [9, 10]. Antioxidant, antiviral, antimicrobial, anticancer, anti-allergic, anti-inflammatory, antitumor, antimutagen, anti-gout, insecticidal, antifeedant, antibiotic and fungicidal effects of these valuable chemicals have been revealed before in modern medicine [11-16]. In alternative medicine, it is known that species belonging to this genus are used in many applications such as wound healing, urinary tract infections, eczema, diabetes and skin diseases [17-20].

All endemic taxa are endangered according to the Red Book of Plants of Turkey. Others are predicted to be endangered in the near future [8, 21]. The Red List extinction data of species are directly related to lower competitiveness and anthropogenic factors such as uncontrolled collection, overgrazing, big fires, trampling and fragmentation, as well as other climatic changes created by anthropogenic effects in recent years. It is predicted that the world will pass into the age of fire due to the great fires experienced especially in our country and all over the world in recent years. Therefore, populations of many plant species will face extinction in the near future if *in situ* and/or *ex situ* conservation strategies are not activated as soon as possible.

One of the most popular *ex situ* preservation methods in recent years in tissue culture studies because of the several advantages such as controlled environment, faster production of difficult growing species, growing disease-free plants, enabling effective clonal propagation, and shortening the growth cycle as well as rapid mass production of high-quality planting material [22]. In addition to enabling the production of many new plants similar to the ancestral characters of medicinally and aromatically valuable plants, tissue culture applications come to the fore as an alternative application, as it allows the production of biologically active phytochemicals in these plants. Because of all these factors, this study supports our country's goals of producing its own pharmaceutical raw materials from natural resources with alternative methods and bringing them into the country's economy. The aim of the present study is to

develop an efficient *in vitro* micropropagation protocol for *E. hoefftianum* and occur *ex situ* collections. The absence of any study on tissue cultures of this species in the literature makes the study original and innovative.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

*E. hoefftianum* seeds were collected from indigenous populations of Yağmurdere-Gümüşhane (40° 35' 09" N, 39° 52' 1" E; 1744 m), and followed by storage in darkness at 4 °C until use. Before surface sterilization, seeds were washed with tap water nearly 30 min, followed by treated with 70% ethanol (EtOH) for 30 seconds. After the removal of methanol, seeds were disinfected with 20% commercial bleach (Domestos®, Unilever, Istanbul, Turkey), for 10, 11, 12, 13, 14, and 15 min. Disinfected seeds were washed with sterile distilled deionized water 3 times for nearly 15 min in sterile cabinet (Biohazard SafeFAST Permium 212, Ferrara, Italy) to thoroughly remove chemical residue. Finally, all sterile seeds cultured on approximately 35 mL nutrient basal media in 98.5 × 59 mm glass containers (Magenta, Sigma-Aldrich Ltd., St Louis, MI, USA). Cultured seeds were stored in growth chamber until germination.

### 2.2. Experimental

#### 2.2.1. Seed germination

Murashige and Skoog basal medium (MS, Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands) [23] individually supplemented with two different GA<sub>3</sub> concentrations (1.0 and 3.0 mg/L) and without PGR (control) were tested to determine the most ideal culture conditions for seed germination. To support these two different GA<sub>3</sub> concentrations in the same medium, 1.0 mg/L activated charcoal (AC) was individually added to each medium. The cultivated seeds were stored in the climate chamber for 30 days. The most ideal germination medium was determined by calculating the germinated seed number and shoot length data in the culture medium. Germinated seeds were subcultured and made ready for shoot propagation studies.

#### 2.2.2. Shoot proliferation

Nodal segments were excised from the shoots of seedlings and placed on MS basal medium containing 2% (w/v) sucrose (Duchefa), 0.8% (w/v) phyto agar (Duchefa) supplemented with individually different plant growth regulators (PGRs), including 1.0 mg/L zeatin (ZEA), 1.0 mg/L 6- Benzyladenine (6-BA), 1.0 mg/L N6-[2-isopentenil]adenine (2iP), 1.0 mg/L kinetin (KIN), and 1.0 mg/L thidiazuron (TDZ) in combination with 0.1 mg/L indole-3- butyric acid (IBA). All PGRs used in this study were sourced from Sigma-Aldrich Ltd., St Louis, MI, USA and were filter-sterilized with 0.22 µm filters and added to the cooled media after autoclaving. For these media, the sucrose ratio was 2% (w/v, Duchefa) and the agar ratio was 0.8% (w/v, (Duchefa). Stock solution of 1 N HCl or 1 N NaOH was used to adjust the pH of the media to 5.8 before sterilization process. All cultures were maintained in growth room at 24 ± 2 °C under a 16 h photoperiod at a photosynthetic flux density of 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, provided by cool daylight fluorescent lamps (Philips HO 49W/840, Poland). The subcultures were carried out at 4-week intervals. After one month, the samples in the trial sets were evaluated in terms of evaluating the number of shoots per explant (fold), length of shoots (mm), number of leaves (fold), callus (%), and biomass yield based on fresh and dry weight (g) on each shoot.

#### 2.2.3. Root induction

MS media, each individually supplemented with IBA, Indole-3- acetic acid (IAA) and 1-naphthaleneacetic acid, (NAA) at a concentration of 0.5 mg/mL and without growth regulators (control), was again selected for root induction studies. The well-developed healthy and sufficiently elongated shoots (≥ 20 mm) were preferred for rooting studies. At the end of the four weeks, rooting parameters, which are rooting rate (%), root number (fold), root length (mm), secondary root number (fold), were calculated to evaluate the rooting success of *E. hoefftianum*. Each rooting treatment contained a total of 16 healthy wvll-developed shoots and each experiment was carried out in triplicate.

#### 2.2.4. Acclimatization

The roots of the plantlets were gently treated with running tap water for a while to remove any media residue. Then these microshoots were transferred in 72 mesh plastic containers containing peat: perlite (2: 1) mixture. These microshoots transferred to peat: perlite (2:1) (v/v) mixture in 72 mesh plastic containers. The plants were subjected to the first acclimatization process for four weeks in climate room conditions by gradually decreasing the humidity. All plantlets were held on at 24 ± 2 °C under a 16-h photoperiod at a photosynthetic flux density of 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, provided by cool daylight fluorescent lamps (Philips HO 49W/840, Poland). The survival rates of the plants were determined at the end of the 4th week and transferred to botanical garden conditions. The healthy plants were kept in the botanical garden among 30 days, and then they were transfer to a field next to the botanical garden. The survival successes of the plants were calculated individually in both the botanical garden and field conditions.

### 2.3. Statistical analysis

For all germination experiments, five achenes were placed into each Magenta glass containers, and six vessels were prepared per treatment. For all shoot proliferation experiments, four nodal explants were cultured into each magenta glass containers and again six vessels were preferred for each treatment. Each rooting treatment contained a total of 16 healthy shoots. All data were analyzed using SPSS 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). For shoot multiplication, mean shoot length, mean number of shoots, mean number of leaves, callus percentage rate, mean number of fresh and dry weight were analyzed using Duncan's multiple range test from one-way analysis of variance (ANOVA). Data in tables were given as mean  $\pm$  standard deviations (SD). Each treatment was performed in triplicate.

Shoot-forming capacity (SFC) [24] and root-forming capacity (RFC) [25] were also calculated to determine the percentage of shoots regeneration and root induction as follows:

$$\text{SFC index} = (\text{average number of shoots per regenerating explant}) \times (\% \text{ of regenerating explant})/100.$$

$$\text{RFC index} = (\text{average number of roots per shoot}) \times (\% \text{ of multiplying roots})/100.d.$$

## 3. Results

### 3.1. Seed Germination

In seed germination studies, significant data were obtained only in 12, 13 and 14 min sterilization applications in MS basal medium supplemented with 3.0/1.0 mg/L GA<sub>3</sub>/AC at the end of the 30th day. The highest germination percentage was obtained from MS medium supplemented with 3.0/1.0 mg/L GA<sub>3</sub>/AC at 13 min sterilization time with 55.57%. Germinated shoots obtained from this culture medium and sterilization time had an average shoot length of 14.19 mm and appeared healthy for shoot multiplication studies. These percentages were determined as 34.43% and 17.78% in MS medium supplemented with 3.0/1.0 mg/L GA<sub>3</sub>/AC at 12 and 14 min sterilization time, respectively. Although the germination percentage was high in the sterilization time of 12 min, the average length of the germinated seeds was shorter (10.08 mm), and the stem thickness was weaker compared to the 14 min application. No significant germination data could be obtained in any of the other sterilization time and germination media.

### 3.2. Shoot Proliferation

Among the tested five different PGRs; namely ZEA, 6-BA, 2iP, KIN, and TDZ were individually combination with 0.1 mg/L IBA and compared with basal medium without PGR (control) for this purpose, 1.0/0.1 mg/L ZEA/IBA and 1.0/0.1 mg/L 6-BA/IBA were detected more convenient for shoot proliferation of this species (Table 1, Figure 1A-G). Among these two PGRs, 1.0/0.1 mg/L ZEA/IBA was more effective than 1.0/0.1 mg/L 6-BA/IBA only in terms of shoot length with  $37.28 \pm 2.87$  mm. While this efficacy of ZEA was valid for other PGRs, there was no statistical difference between itself and the control group with an average shoots length of  $36.52 \pm 4.07$  mm ( $P < 0.05$ ). The lowest data in terms of shoot length was calculated as 19.53 mm, from media containing 1.0/0.1 mg/L TDZ/IBA. The most effective shoot number was determined in MS medium supplemented with 6-BA as mentioned above, and this yield was  $3.0 \pm 0.59$  per shoot. While this data statistically differentiated 6-BA from other PGRs and control group, the closest value to 1.0/0.1 mg/L 6-BA/IBA was obtained from MS medium supplemented with 1.0/0.1 mg/L ZEA/IBA, with an average of 2.5 shoots per shoot (Table 1). Culture media containing 2iP and the control group were less effective than other PGRs for this parameter with a  $1.71 \pm 0.46$  mean shoot number.

The highest leaf number was  $13.58 \pm 1.25$  in MS containing 1.0/0.1 mg/L 6-BA/IBA. Among the other all tested PGRs, 1.0/0.1 mg/L TDZ/IBA gave the other effective mean leaf number per shoot with  $11.5 \pm 1.53$ . Although this result creates a statistical difference with 6-BA and other PGRs, the weak leaves of the obtained plantlets do not make TDZ stand out in terms of healthy leaves ( $P < 0.05$ ). Table 1 shows that 1.0/0.1 mg/L 2iP/IBA also has a lower effect on the number of leaves per shoot with  $5.71 \pm 0.69$ . In terms of fresh and dry weight, which is especially important at the point of secondary metabolite production, 1.0/0.1 mg/L 6-BA/IBA gave the highest values with an average of  $1.514 \pm 0.039$  and  $0.086 \pm 0.002$ , respectively. There were significant statistical differences between 6-BA and other PGRs and control group in terms of both fresh and dry weight values ( $P < 0.05$ ). However, the dry weight per fresh weight of the shoots obtained from MS medium supplemented with this cytokinin was the lowest with 5.68%. The highest dry weight per fresh weight was obtained from the control media with 12.65%. Among the PGRs tested, more callus formation occurred in MS media fortified 1.0/0.1 mg/L TDZ/IBA with 77.8%. Control group did not give a significant result in terms of this parameter. Based on all these data, it was inevitable that 1.0/0.1 mg/L 6-BA/IBA would be more effective than other cytokinins and control in terms of shoot forming capacity, and this was achieved with 2.875 (Table 1).

Table 1. The effects of different cytokinin in the presence of IBA (0.1 mg/L) combination and control group on shoot proliferation of *E. hoefftianum*

Cytokinin/Auxin (mg/L)	Shoot Number/Explant	Shoot Length/Explant (mm)	Leaf Number/Explant	Fresh Weight/Explant (g)	Dry Weight/Explant (g)	Callus (%)	Shoot Forming Capacity (SFC)
CONTROL (0.0/0.0)	1.71 ± 0.46d	36.52 ± 4.07a	8.31 ± 1.0d	0.332 ± 0.034cd	0.042 ± 0.004c	nd	0.854
ZEA/IBA (1.0/0.1)	2.5 ± 0.51b	37.28 ± 2.87a	9.29 ± 0.95c	0.292 ± 0.022d	0.030 ± 0.002d	50 ± 0.0b	1.875
KIN/IBA (1.0/0.1)	1.83 ± 0.38bd	29.95 ± 2.48b	7.5 ± 0.83e	0.303 ± 0.021d	0.028 ± 0.002c	18.1 ± 2.4d	1.451
2iP/IBA (1.0/0.1)	1.71 ± 0.46d	31.21 ± 2.95b	5.71 ± 0.69f	0.354 ± 0.034c	0.028 ± 0.003d	50 ± 0.0b	0.996
6-BA/IBA (1.0/0.1)	3.0 ± 0.59a	21.88 ± 1.67c	13.58 ± 1.25a	1.514 ± 0.039a	0.086 ± 0.002a	27.8 ± 2.4c	2.875
TDZ/IBA (1.0/0.1)	2.13 ± 0.34c	19.53 ± 1.71d	11.5 ± 1.53b	1.144 ± 0.166b	0.071 ± 0.010b	77.8 ± 2.4a	1.682

Data were recorded 4 weeks after the culture and represents a total of 24 explants per treatment on MS. Each experiment was performed in triplicates. Values having the same letter(s) in the same column are not significantly different according to Duncan's multiple range test at  $P < 0.05$ . nd = Not detected, ZEA = Zeatin, 6-BA = 6-Benzyladenine, 2iP = N6-[2-isopentenil]adenin, KIN = Kinetin, TDZ = Thidiazuron, IBA = Indole-3- butyric acid.

### 3.3. Root Induction

Enough elongated shoots ( $> 20$  mm) were excised and carefully transferred to MS media individually supplemented with 0.5 mg/L IBA, IAA, NAA, and without auxin (control). MS basal media without auxin stimulated the rooting more efficiently than fortified above mentioned auxins at the end of the four weeks with 100% (Figure 1H). The first root induction was seen on the 17th day in the control medium. The fact that the first root formation was earlier in the control group compared to the applied auxins encouraged higher root number, root length, secondary root number and root forming capacity values at the end of the 4 weeks application period. These values were calculated as  $4.75 \pm 0.68$ ,  $105.02 \pm 7.49$  mm,  $6.5 \pm 0.63$  and 4.8 per shoot, respectively. Among the tested auxin groups, the order of efficiency of root induction rates was IBA (91.7%)  $>$  IAA (81.3%)  $>$  NAA (77.1%) (Figure 1I-L). The only parameter that differed during the effect of auxin applications was the number of root. This result was negatively reflected in the root forming capacity of the MS medium supplemented with IBA with 3.54. MS media supplemented with IBA reached a lower root number value of  $3.86 \pm 0.50$  per shoot than MS media containing IAA or NAA (Table 2). Root numbers were calculated as  $4.54 \pm 0.46$  and  $4.50 \pm 0.58$ , respectively, in MS fortified with IAA or NAA, and there were no statistically differences between them and the control group ( $P < 0.05$ ). In terms of the second highest root length, the efficiency of IBA came to the fore with  $69.43 \pm 4.49$  mm. The lowest root length success was determined in MS medium containing NAA with  $11.31 \pm 1.26$  mm, and this created a significant statistical difference with the other test groups ( $P < 0.05$ ). The efficiency of IBA among the auxin groups did not change in terms of the number of secondary roots, and this value was calculated as  $4.93 \pm 0.57$  per shoot (Table 2).

Table 2. The effects of different auxin types (0.5 mg/L) on *in vitro* rooting of *Erodium hoefftianum* shoots

PGRs (mg/L)	Rooting rate (%)	Root Number (No/Plant)	Root Length (mm)	Secondary Root Number (No/Plant)	Root Forming Capacity (RFC)
CONTROL	100 ± 0.0a	4.75 ± 0.68a	105.02 ± 7.49a	6.5 ± 0.63a	4.8
IBA	91.7 ± 3.6b	3.86 ± 0.50b	69.43 ± 4.49b	4.93 ± 0.57b	3.54
IAA	81.3 ± 0.0c	4.54 ± 0.46a	64.99 ± 3.18c	4.46 ± 0.64c	3.69
NAA	77.1 ± 3.6c	4.50 ± 0.58a	11.31 ± 1.26d	2.00 ± 0.37d	3.47

Data were recorded on the four weeks after the culture and represent a total of three replicates of 16 plants per treatment for root induction. Values having the same letter(s) in the same column are not significantly different according to Duncan's multiple range test at  $P < 0.05$ . PGRs = Plant Growth Regulators, IBA = Indole-3- butyric acid, IAA = indole-3- acetic acid, NAA = 1-naphthaleneacetic acid

### 3.4. Acclimatization and ex situ collection

The well developed and seen healthy *in vitro* rooting plantlets were transferred in plastic containers containing peat: perlite (2: 1) and covered with plastic bags to provide necessary humidity. These pots were transferred firstly in climate room conditions to increase the viability of *in vitro* rooting plantlets in *ex vitro* (Figure 1M and N). By opening the mouths of the plastic containers intermittently, the humidity rate was reduced, the plantlets were not rotted and their

adaptation to the *ex vitro* condition was facilitated. The viability percentages of seedlings were determined as 90% in climate room conditions.

At the end of the 4 weeks, acclimatized, well developed, and healthy plants were transferred again in botanical garden conditions and were obtained about 86.7% survival percentage. After a month, these plants produced fresh leaves and developed considerably (Figure 1O). All plants formed buds, bloomed, and produced seeds within the first season. The *ex situ* collection of *E. hoefftianum* has been established at the end of the spring 2020 and completed in the same summer of the same year.

#### 4. Conclusions and discussion

*Ex situ* conservation strategies are particularly important for small plant populations or plant populations with low seed yield and/or low seed viability. *In vitro* techniques are among the most successful *ex situ* conservation methods because of the above mention many advantages and used for the reproduction and preservation of such taxa [24, 25]. From this perspective, the production of plants with medicinal, aromatic, and economic value by *in vitro* techniques has accelerated [28-31]. A limited number of studies have been carried out on the production of *Erodium* taxa, which are valuable in the field of modern and alternative medicine, by tissue cultures [32-34]. But, there is no comprehensive *in vitro* production report about *E. hoefftianum*. Therefore, it is notable to study micropropagation and *ex situ* conservation of this species.

In tissue culture studies on *Erodium* taxa, researchers generally preferred commercial bleach or sodium hypochlorite (NaOCl) as a sterilization agent. The application that differs in these studies is the chemical agent used for the pre-sterilization process, the sterilization time, the concentration of the sterilization agent, and explant type [33, 34]. In the study carried out on *Erodium somanum* H. Peşmen, the researchers applied 5% commercial bleach on the seeds for 5 min and achieved a 70% germination success at the end of the second week [33].



**Figure 1.** *In vitro* micropropagation of *E. hoefftianum* (A) Shoot proliferation after 4 weeks; (B) on culture medium from nodal explant on MS free-medium, (C) supplemented with 1.0/0.1 mg/L ZEA/IBA, (D) with 1.0/0.1 mg/L KIN/IBA, (E) with 1.0/0.1 mg/L 2iP/IBA. (F) with 1.0/0.1 mg/L 6-BA/IBA. (H) with 1.0/0.1 mg/L TDZ/IBA. (H) Root induction after 4 weeks; (I) MS free-medium, (J) 0.5 mg/L IBA, (K) 0.5 mg/L IAA, (L) 0.5 mg/L NAA, (M) flower form, (N) Climate room conditions, (O) Botanical garden conditions, Bars: B, C, D, E, F and G = 1.47 cm, I, J, K and L = 5.65 cm

In another study, researchers this time 0.5%, 1%, and 2% concentrations of NaOCl were tested on *Erodium sibthorpiatum* Boiss. subsp. *sibthorpiatum* seeds for 10 min and determined that 1% NaOCl application was the most ideal [32]. These researchers achieved germination success between 67% and 28% in their studies. These results show that species within the same genus differ in terms of sterilization processes and germination percentage in tissue culture studies. The fact that the highest germination percentage we obtained from the seeds of *E. hoefftianum* was 55.57 % with a optimum sterilization time of 13 min is a comparative proof of these results.

Although all PGRs mentioned in our study were used in tissue culture studies of different plant species [30, 35], researchers generally tried different concentrations of 6-BA or KIN, either alone or in combination with any auxin or GA<sub>3</sub>, in MS medium for shoot propagation studies of *Erodium* taxa [32-34]. Researchers have reported that high 6-BA and low NAA combinations can be effective in their shoot propagation studies on *Erodium* species [32]. However, in cytokinins combined with IAA or NAA, it was determined that *E. hoefftianum* did not form healthy shoots. The shoots remained weak and did not grow sufficiently. These findings reveal the differences with our study. Another weak indicator of the difference with our study is that the same researchers obtained an average of  $11.33 \pm 0.44$  shoots per explant depending on the species difference in these media. On the other hand, the obtained highest mean number of shoots per explant from *Erodium olympicum* was  $1.42 \pm 1.54$ . This result showed the strength of our study. When the shoot length data obtained from our study were compared with *E. sibthorpiatum* subsp. *sibthorpiatum*, it was determined that close results supported each other. The highest shoot length was found in MS medium absence of PGRs with  $35.97 \pm 0.55$  [32]. The highest shoot length was found in MS medium absence of PGRs with  $35.97 \pm 0.55$  [32]. This result was 3.64% lower than the highest shoot length obtained from *E. hoefftianum*. The maximum average shoot length of  $2.06 \pm 0.04$  mm in micropropagation studies on *Pelargonium graveolens* L. belonging to the *Geranium* genus supports the low shoot length of these family members in culture studies [36]. The shoot length, leaf number, fresh and dry weight parameters were not evaluated in other tissue culture studies on *Erodium* taxa. These data obtained from our study enrich the content of tissue culture studies on these taxa and shed light on future studies on this genus.

Researchers tested IBA at a concentration of 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 mg/L in MS medium for root induction of *E. olympicum*. The most effective results were obtained from MS medium supplemented with 0.5 mg/L IBA with 29.91% [34]. While our preference for 0.5 mg/L auxin concentration is supported by this study, the fact that we achieved 70% more rooting success according to the researchers reveals the strength of our study. The lower results of IAA compared to other tested auxins in the reported study were consistent with our study. Various concentrations of IBA and IAA (0, 0.5, 1, 1.5, and 2 mg/L) in MS medium and various concentrations of NAA (0, 0.1, 0.5, 1, and 2 mg/L) in modified MS medium (ModMS) have been tested for root induction of *E. sibthorpiatum* subsp. *sibthorpiatum*. The most influential rooting percentage has been obtained in ModMS media containing 0.1 or 0.5 mg/L NAA with 100%. When compared in terms of the highest root number and root length, the same researchers reported the average values of  $21.17 \pm 0.43$  and  $44.03 \pm 0.58$  mm per shoot, respectively [32]. Calculation of these values as  $4.75 \pm 0.68$  and  $105.02 \pm 7.49$  mm per shoot in our study revealed the strengths and weaknesses of our findings in this study. These differences can be caused by many factors such as explant source, explant type, explant collection time, environmental conditions of the explant, media types and culture time, number of subcultures, culture conditions in tissue culture studies [29, 37].

As a result, this *in vitro* protocol can be used as an effective protocol in future *ex situ* conservation studies for the restoration of plant populations.

## References

- [1] Takhtajan, A. (1997). *Diversity and classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press.
- [2] Aldasoro, J. J., Navarro, C., Vargas, P., Sa'ez, L. L. & Aedo, C. C. (2002). A new genus of Geraniaceae endemic to the Southwest of North America. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 59, 209-216. [https://doi: 10.3989/ajbm.2001.v](https://doi.org/10.3989/ajbm.2001.v)
- [3] Fiz, O., Vargas, P., Alarcon, M. L. & Aldasoro, J. J. (2006). Phylogenetic relationships and evolution in *Erodium* (Geraniaceae) based on trnL-trnF sequences. *Systematic Botany*, 31, 739-763. [https://doi: 10.1600/036364406779695906](https://doi.org/10.1600/036364406779695906)
- [4] Messing, S. & Byrne, R. (1998). Premission invasion of *Erodium cicutarium* in California. *Journal of Biogeography*, 25, 757-762. [https://doi: 10.1046/j.1365-2699.1998.2540757.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.1998.2540757.x)
- [5] Fiz-Palacios, O., Vargas, P., Vila, R., Papadopulos, A. S. & Aldasoro, J. J. (2010). The uneven phylogeny and biogeography of *Erodium* (Geraniaceae): radiations in the Mediterranean and recent recurrent intercontinental colonization. *Annals of Botany*, 106(6), 871-884. [https://doi: 10.1093/aob/mcq184](https://doi.org/10.1093/aob/mcq184)
- [6] Davis, P.H. 1988. *Flora of Turkey and East Egean Islands*. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press, 10, 105-106.
- [7] Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. & Başer, K. H. C. (2000). *Flora of Turkey and East Egean Islands*. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press, 11, 74-75.
- [8] Yıldırım, Ş. & Doğru-Koca, A. (2004). A new species from Turkey, *Erodium aytaçii* Yıldırım & A. Doğru-Koca (Geraniaceae). *Ot Sistemik Botanik Dergisi*, 11, 1-6.

- [9] Radhia, A., Hanen, N., Abdelkarim, B. A. & Mohamed, N. (2018). Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial activities of *Erodium glaucophyllum* (L.) L'Hérit. *Journal of Biomedical Sciences*, 7(4). [https://doi: 10.4172/2254-609X.100092](https://doi.org/10.4172/2254-609X.100092)
- [10] Bilić, V. L., Gašić, U., Milojković-Opsenica, D., Nemet, I., Rončević, S., Kosalec, I. & Rodriguez, J. V. (2020). First Extensive Polyphenolic Profile of *Erodium cicutarium* with Novel Insights to Elemental Composition and Antioxidant Activity. *Chemistry & Biodiversity*, 17(9), e2000280. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000280>
- [11] Yıldırım, H., Bekircan, Ç. & Bektaş, E. (2019). Antifeedant effects of essential oil of *Mentha longifolia* subsp. *longifolia* L. HUDSON (Lamiaceae) on *Subcoccinella vigintiquatuorpuntata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Diversity and Conservation*, 12(2), 103-108. [https://doi: 10.5505/biodicon.2019.27928](https://doi.org/10.5505/biodicon.2019.27928)
- [12] Edenharter, R. & Tang, X. (1997). Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 35(3-4), 357-372. [https://doi: 10.1016/S0278-6915\(97\)00125-7](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00125-7)
- [13] Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, M. R. & Krishna, D. R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*, 33(1), 2-16.
- [14] Seyoum, A., Asres, K. & El-Fiky, F. K. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67(18), 2058-2070.
- [15] Middleton, E., Kandaswami, C. & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
- [16] Kekilli, E. B., Orhan, I. E., Deniz, F. S. S., Eren, G., Emerce, E., Kahraman, A., & Aysal, I. A. (2021). *Erodium birandianum* Ilarslan & Yurdak. shows anti-gout effect through xanthine oxidase inhibition: Combination of *in vitro* and *in silico* techniques and profiling of main components by LC-Q-ToF-MS. *Phytochemistry Letters*, 43, 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.phyto.2021.03.010>
- [17] Molaes, S. & Ladio, A. (2009). Ethnobotanical review of the Mapuche medicinal flora: use patterns on a regional scale. *Journal of ethnopharmacology*, 122(2), 251-260. [https://doi: 10.1016/j.jep.2009.01.003](https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.01.003)
- [18] Munekata, P. E., Alcántara, C., Collado, M. C., Garcia-Perez, J. V., Saraiva, J. A., Lopes, R. P., Barba, F. J., Silva, L. P., Sant'Ana, A. S., Fierro, E. M. & Lorenzo, J. M. (2019). Ethnopharmacology, phytochemistry and biological activity of *Erodium* species: A review. *Food research international*, 126, 108659. [https://doi: 10.1016/j.foodres.2019.108659](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108659)
- [19] Mosaddegh, M., Naghibi, F., Moazzeni, H., Pirani, A. & Esmaeili, S. (2012). Ethnobotanical survey of herbal remedies traditionally used in Kohghiluyeh va Boyer Ahmad province of Iran. *Journal of ethnopharmacology*, 141(1), 80-95. [https://doi: 10.1016/j.jep.2012.02.004](https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.02.004)
- [20] Rehman, K., Khan, M. A., Ullah, Z. & Chaudhary, H. J. (2015). An ethno botanical perspective of traditional medicinal plants from the Khattak tribe of Chonthra Karak, Pakistan. *Journal of ethnopharmacology*, 165, 251-259. [https://doi: 10.1016/j.jep.2015.02.035](https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.035)
- [21] Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. & Adıgüzel, N. (2000). *Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı*. Ankara: Türkiye Tabiatını Koruma Derneği.
- [22] Ostrolucká, M. G., Libiaková, G., Ondrušková, E. & Gajdošová, A. (2004). *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis*, 676, 207-212.
- [23] Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497. [https://doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)
- [24] Lambardi, M., Sharma, K. K. & Thorpe, T. A. (1993). Optimization of *in vitro* bud induction and plantlet formation from mature embryos of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 29, 189-199.
- [25] Koc, M., Hamzaoglu, E. & Özhatay, F. N. (2014). *Arenaria microcalyx* (Caryophyllaceae), a new species from Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 38(4), 653-657. [https://doi: 10.3906/bot-1311-27](https://doi.org/10.3906/bot-1311-27)
- [26] Corral, P., Mallon, R., Oubina-Rodriguez, J. & Gonzalez, M. L. (2011). Multiple shoot induction and plant regeneration of the endangered species *Crepis novoana*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 105, 211-217. [https://doi: 10.1007/s11240-010-9854-x](https://doi.org/10.1007/s11240-010-9854-x)
- [27] Lemay, M., De Vriendt, L., Pellerin, S. & Poulin, M. (2015). *Ex situ* germination as a method for seed viability assessment in a peatland orchid, *Plantanthera blephariglottis*. *American Journal of Botany*, 102, 390-395. [https://doi: 10.3732/ajb.1400441](https://doi.org/10.3732/ajb.1400441)
- [28] Zhang, T., Cao, Z. Y. & Wang, X. Y. (2005). Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of *Eruca sativa* Mill. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(5), 655-657. [https://doi: 10.1079/IVP2005653](https://doi.org/10.1079/IVP2005653)
- [29] Cüce, M. & Sökmen, A. (2017). *In vitro* production protocol of *Vaccinium uliginosum* L. (bog bilberry) growing in the Turkish flora. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 41, 294-304. [https://doi: 10.3906/tar-1704-19](https://doi.org/10.3906/tar-1704-19)
- [30] Bekircan, T., Yaşar, A., Yıldırım, S., Sökmen, M. & Sökmen, A. (2018). Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication, volatiles composition and rosmarinic acid content of *Thymus leucotrichus* Hal. shoots. *3 Biotech*, 8(3), 180. [https://doi: 10.1007/s13205-018-1206-2](https://doi.org/10.1007/s13205-018-1206-2)



- [31] Cüce, M., Bekircan, T., Laghari, A. H., Sökmen, M., Sökmen, A., Önay Uçar, E. & Kılıç, A. O. (2019). Phenolic profiles, antimicrobial and cytotoxic properties of both micropropagated and naturally growing plantlets of *Calamintha sylvatica* subsp. *sylvatica* Bromf. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(4), 1145-1152. [https://doi: 10.15835/nbha47411474](https://doi.org/10.15835/nbha47411474)
- [32] Akın, B., Kocaçalışkan, İ. & Gülerüz, G. (2014). Micropropagation of *Erodium sibthorpiatum* subsp. *sibthorpiatum*, an endemic threatened species of Uludağ Mountain (Bursa-Turkey). *Turkish Journal of Botany*, 38(1), 148-155. [https://doi: 10.3906/bot-1304-24](https://doi.org/10.3906/bot-1304-24)
- [33] Çetin, B., Eren, H., Oskay, D. & Bingöl, N. (2016). *In vitro* micropropagation of critically endangered (cr) endemic *Erodium somanum*. *Celal Bayar University Journal of Science*, 12(1), 115-120. [https://doi: 10.18466/cbujos.10321](https://doi.org/10.18466/cbujos.10321)
- [34] Sevindik, B., Tutuncu, M., Izgu, T., Tagipur, E. M., Curuk, P., Yilmaz, O., Kaynak, G. & Mendi, Y. Y. (2017). Micropropagation of *Erodium olympicum* endemic to Turkey. *American Journal of Plant Biology*, 2(3-1), 24-27. [https://doi: 10.11648/j.ajpb.s.2017020501.14](https://doi.org/10.11648/j.ajpb.s.2017020501.14)
- [35] Cüce, M., Bekircan, T., Laghari, A.H., Sökmen, M., Sökmen, A., Önay Uçar, E. & Kılıç, A.O. (2017). Antioxidant phenolic constituents, antimicrobial and cytotoxic properties of *Stachys annua* L. from both natural resources and micropropagated plantlets. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 16(3), 407-416.
- [36] Rabuma, T. (2015). *In vitro* propagation of geranium (*Pelargonium graveolens* L.) from nodal culture. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 4(2), 23-34.
- [37] Ružić, D., Vujović, T., Libiakova, G., Cerović, R. & Gajdošova, A. (2012). Micropropagation *in vitro* of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Berry Research*, 2, 97-103. [https://doi: 10.3233/JBR-2012-0](https://doi.org/10.3233/JBR-2012-0)



## Investigation of industrially important enzyme activities of thermophilic and thermotolerant filamentous fungi

Derya BERİKTEN <sup>\*1</sup>, Merih KIVANÇ<sup>2</sup>  
ORCID: 0000-0002-8672-4813; 0000-0002-8647-3428

<sup>1</sup> Kutahya Health Sciences University, Training and Research Center, 43100, Kutahya, Turkey

<sup>2</sup> Eskisehir Technical University, Faculty of Science, Department of Biology, 26470, Eskisehir, Turkey

### Abstract

Fungi are widely used in the production of many enzymes of industrial importance, mainly because they can grow on low-cost substrates and secrete large amounts of enzymes extracellularly. The most important reason for choosing thermostable enzymes in industrial applications is their stability, which provides low activity losses against high temperatures applied during the pretreatment of raw materials. In this study, industrially important lipase, amylase, cellulase, phytase and protease enzyme activities were investigated on 6 thermophilic and 57 thermotolerant fungi species. Screening of fungi producing extracellular lipase, amylase, cellulase, phytase, protease was carried out in petri dishes or tubes using special nutrient media for different enzymes. As a result, 63 cultures consisting of *Humicola insolens*, *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizomucor pusillus*, *Melanocarpus albomyces*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* species were determined to produce 5 different enzymes, and those with positive results from these cultures were determined: 18 for phytase (28,5%), 63 (100%) for protease, 14 (22%) for amylase, 63 (100%) for lipase, 57 (90%) for cellulase. As a result of enzyme screening studies, the best phytase producer species *R. pusillus* and *A. terreus*, protease producer species *A. fumigatus*, amylase producer species *A. terreus*, *L. corymbifera* and *R. pusillus*, lipase producer species *A. fumigatus*, cellulase producer species *A. fumigatus* has been determined. We believe that the determination of the thermophilic and thermotolerant fungi used in the study that are capable of producing thermostable enzymes such as lipase, amylase, cellulase, protease and phytase, which have industrial importance, will shed light on the evaluation of these fungi and their enzymes in future studies.

**Key words:** Thermophilic, thermotolerant, filamentous fungi, enzyme, thermostable

----- \* -----

### Termofilik ve termotolerant filamentli fungus türlerinin endüstriyel öneme sahip enzim aktivitelerinin incelenmesi

#### Özet

Funguslar, temel olarak düşük maliyetli substratlarda büyüyebildikleri ve hücre dışı olarak büyük miktarda enzim salgıladıkları için endüstriyel öneme sahip birçok enzimin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Termotabil enzimlerin endüstriyel uygulamalarda seçilmesinin en önemli sebebi ham maddelerin ön işlemleri sırasında uygulanan yüksek sıcaklıklara karşı düşük aktivite kayıplarını sağlayan stabiliteledir. Bu çalışmada 6 termofilik ve 57 termotolerant fungus türü üzerinde endüstriyel öneme sahip olan lipaz, amilaz, selüloz, fitaz ve proteaz enzim aktiviteleri araştırılmıştır. Hücre dışı lipaz, amilaz, selüloz, fitaz, proteaz üreten fungusların taranması, farklı enzimler için özel besin ortamları kullanılarak petri kaplarında veya tüplerinde gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, *Humicola insolens*, *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizomucor pusillus*, *Melanocarpus albomyces*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* türlerinden oluşan 63 adet kültürün 5 farklı enzimi üretme potansiyelleri belirlenmiştir ve bu kültürlerden pozitif sonuç verenler: fitaz için 18 (%28,5), proteaz için 63 (%100), amilaz için 14 (%22), lipaz için 63 (%100), selüloz için 57 (%90) olarak belirlenmiştir. Enzim tarama çalışmaları sonucunda en iyi fitaz üreticisi türler *R. pusillus* ve *A. terreus*, proteaz üreticisi tür *A. fumigatus*, amilaz üreticisi türler *A. terreus*, *L. corymbifera* ve *R. pusillus*, lipaz üreticisi tür *A. fumigatus*, selüloz üreticisi tür *A. fumigatus* olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan termofilik ve termotolerant funguslar arasından lipaz, amilaz, selüloz, proteaz ve fitaz gibi endüstriyel öneme sahip olan termotabil enzimleri üretme yeteneğine sahip olanların belirlenmesi bu fungusların ve enzimlerinin ileriki çalışmalarda değerlendirilmesine ışık tutacağı kanaatindeyiz.

**Anahtar kelimeler:** Termofilik, termotolerant, filamentli fungus, enzim, termotabil

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902742600043; Fax.: +902742652285; E-mail: derya.berikten@ksbu.edu.tr

## 1. Giriş

Termofilik funguslar minimum 20 °C ya da üzeri ve maksimum 61,5 °C büyüme sıcaklığına sahipken, termotolerant formların 20 °C'nin altından yaklaşık 55 °C'ye kadar olan geniş bir büyüme sıcaklık aralığı vardır [1,2]. Termofilik ve termotolerant funguslar biyolojik dönüşüm prosesinde görev alırlar ve enzimlerin de dahil olduğu endüstriyel olarak önemli pek çok metaboliti sentezleme yeteneğine sahiptirler [3].

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörler olarak tanımlanırlar [4]. Enzim bazlı endüstriyel teknolojiler, minimum atık üretimi ile veya hiç atık üretimi olmadan hammaddelerin verimli kullanılmasını vaat ederken, toksik kimyasalların kullanılmasını da önlemektedir. Endüstrilerdeki geleneksel kimyasal temelli üretim süreçleri çok fazla hammadde, enerji gerektirmekte ve çevre üzerinde oldukça fazla baskı yaratmaktadır. Geleneksel yöntemlerin daha temiz ve daha güvenli enzim bazlı yöntemlerle değiştirilmesi, yalnızca işlem süresi, işletim maliyeti ve enerji tüketiminden tasarruf sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda çevre üzerinde de en az tehlikeli etkiyi oluşturmaktadır [5]. Günümüzde, çeşitli biyolojik üretim süreçlerinin pek çoğu yüksek sıcaklıklarda stabil kalabilen termostabil enzimleri içermektedir [6]. Termostabil enzimlerin biyoproseslerde sağladığı avantajlar; yüksek sıcaklıklara tolerans, geniş pH stabilitesi, yüksek spesifik aktivite, organik çözücüler, deterjanlar, katyonlar gibi çeşitli potansiyel enzim inhibitörlerine dayanma yeteneği, oda koşullarında uzun süre saklanma, düşük kontaminasyon riski, kolay karışma, yüksek substrat çözünürlüğü olarak sayılabilir [5,6].

Fungusların pek çok endüstriyel öneme sahip enzimlerin kaynağı olduğu ve yüksek miktarlarda ekstraselüler (hücre dışı) enzimleri sentezleme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Çok çeşitli endüstri dallarında mikrobiyal proteaz, amilaz, selülaz ve lipazlar kullanılmaktadır [7]. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen amilaz, selülaz, proteaz ve lipazlar tekstil, kağıt ve deterjan endüstrilerinde yaygın şekilde kullanıldıkları ortaya konulmuştur [8,9]. Son zamanlarda, çamaşır deterjanı ürünlerindeki proteazlar, amilazlar, selülazlar ve lipazların dahil olduğu enzim kokteylleri özel bir ivme kazanmıştır [5].

Termofilik kaynaklardan elde edilen amilazlar, proteaz ve lipaz ile bağlantılı olarak tekstil, bira, deterjan endüstrisinde kullanımının yanı sıra biyoyakıt üretimi, fermantasyon endüstrilerinde nişastanın fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmesi, gıda endüstrisinde tatlı şurupların hazırlanması, unun diastaz içeriğinin artırılması, jöle üretiminde nişastanın uzaklaştırılması ve bebekler için yiyeceklerin modifikasyonu gibi çeşitli endüstriyel işlemlerde çok yönlü uygulama potansiyeli bulmaktadır [10]. *Aspergillus* cinsinin çok farklı türleri endüstriyel amilazlar için kaynak teşkil ettiği ve nişasta endüstrisinde kullanılan en yaygın termostabil enzimin amilazlar olduğu vurgulanmıştır [7]. Proteazlar ise toplam enzim pazarının yaklaşık %60'ını oluşturan ve fizyolojik ve endüstriyel alanlarda bir dizi farklı uygulamaya sahip olan en yaygın hidrolitik enzimlerden biridir [8]. Fitik asidin defosforilasyonunu sağlayan fitazlar, özellikle beslenme, çevresel sürdürülebilirlik ve insan sağlığı açısından önem kazanmışlardır. Termostabil fitazlar, yem üretimi, gıda işleme, kağıt yapımı ve bunlar gibi bir çok endüstriyel proseste gereksinim duyulan enzimler haline gelmiştir [11]. Selülazların yenilenebilir enerji kaynakları için büyük potansiyele sahip oldukları bilinmektedir. Selülazlar, proteazlardan sonra dünyanın endüstriyel enzim pazarında ikinci sırada yer almaktadır. Bununla birlikte, termostabil selülazlar, yüksek sıcaklıklardaki aktiviteleri ile deterjan endüstrisinde renk parlatma ve yumuşatmada, biyoetanol üretimi için lignoselülozik biyokütlenin kullanımı ve kağıt endüstrisinde kağıt geri dönüşümüne yardımcı olarak kullanılmaktadırlar [12]. Termostabil lipazlar, gıda, deterjan, kozmetik, kağıt, ilaç, deri, biyodizel üretimi vb. gibi çeşitli endüstrilerin ön koşuludur [13]. Fungal lipazlar süt endüstrisi, yağ imalatı, sürfektanların üretimi ve saf farmasotiklerin hazırlanmasındaki biyoteknolojik uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir [7].

Yeni ve özgün enzim oluşturmada mikrobiyal taramalarla rasyonel protein mühendisliğinin birlikte kullanılması gerekmektedir. Dünyada çeşitli endüstriyel alanlarda enzimlerin kullanımının gün geçtikçe artması nedeniyle enzimler bilim ve teknolojinin oldukça ilgilendiği bir alan olmuştur. Bu bağlamda iyi enzim üreticisi fungusların belirlenmesini ve enzimlerinin taranarak ortaya konmasını içeren çalışmalar oldukça önem arz etmektedir.

Kullanışlı enzimleri üretme yeteneğine sahip pek çok patojenik olmayan mikroorganizma arasında filamentli funguslar, kolay kültüre edilebilmeleri, endüstriyel öneme sahip ekstraselüler enzimleri yüksek miktarlarda üretebilmeleri nedenleri ile ön plana çıkmaktadırlar. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, endüstriyel enzimlere yönelik biyoteknolojik araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Bu nedenle endüstriyel enzimleri üretme açısından elverişli olan bu fungusların belirlenmesi ve enzimlerinin taranarak ortaya konmasını bilimsel olarak ön plana çıkarmıştır. Yaptığımız çalışmada, çeşitli sıcak su kaynaklarından izole edilmiş olan termotolerant ve termofilik fungusların endüstriyel açıdan oldukça önemli olan termostabil lipaz, amilaz, selülaz, proteaz ve fitaz enzimlerini üretme yeteneklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve yöntem

### 2.1. Mikroorganizmalar

Çeşitli sıcak su kaynaklarından izolasyonları yapılarak termofilik ve termotolerant oldukları daha önceden belirlenmiş ve laboratuvarımızda stoklanmış halde bulunan 51 straini *A. fumigatus*, 5 straini *A. terreus*, 1 straini *A. flavus*, 2 straini *R. pusillus*, 1 straini *L. corymbifera*, 1 straini *M. albomyces* ve 2 tanesi de *H. insolens* dan oluşan 63 mikrofungus çalışmada kullanılmıştır.

Enzim tarama çalışmalarında kullanılmak üzere mikrofungusların aktifleştirilmesi +4°C'de stoklanmış olan kültürlerinin Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (ME063, Himedia) ve Yeast Potato Soluble Starch Agar'a (YPSSA) (Maya ekstraktı 4g/L, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0,5 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L, Çözünebilir nişasta 15 g/L, Agar 20 g/L, Ampisilin 0,2 g/L, Rose bengal 0,06 g/L) [14] ekilerek 37°C'de inkübe edilmeleri ile gerçekleştirilmiştir.

### 2.2. Enzim üreten türlerin kültürel ortamlarda belirlenmesi

#### 2.2.1. Fitaz üretiminin belirlenmesi

Mikrofunguslar, karbon kaynağı olarak kalsiyum fitat içeren fitaz tarama ortamı (PSM) (D-glikoz 15g/L, Kalsiyum fitat 5g/L, (NH<sub>4</sub>)NO<sub>3</sub> 5g/L, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0,5g/L, KCL 0,5 g/L, FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0,01 g/L, MnSO<sub>4</sub>-4H<sub>2</sub>O 0,01g/L, pH 5,5) fitaz üretimi açısından taranmıştır. Bu taramalar yapılırken funguslar PSM ortamına steril koşullarda tek nokta şeklinde ekilmiş ve 45 °C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrasında fitaz enzimi üreten funguslar, kalsiyum fitatı parçalamaları sonucu besiyerindeki beyaz rengin kaybolması ile oluşan kolonileri etrafındaki şeffaf zon ile ayırt edilmişlerdir [15,16].

#### 2.2.2. α-Amilaz üretiminin belirlenmesi

Mikrofunguslar, amilaz tarama ortamına [Çözünebilir mısır nişastası %2, Czapek Dox Agar (105460, Merck) 48.0 g/L] tek nokta şeklinde ekimi yapıp 37 °C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonucunda gelişen fungus kolonisi uzaklaştırılarak, lügol çözeltisi ile kültür ortamları boyanmıştır. Amilaz enzimine sahip türler besiyerindeki nişastayı parçalamaktadır. Lügol çözeltisi nişasta ile birleştiğinde mavi-mor bir renk oluşmaktadır. Bu nedenle, boyama sonrası enzim üretimini gerçekleştiren koloniler renksiz diğer yerlerin mavi-mor renkte boyanması ile amilaz üretimi ayırt edilmiştir [17,7].

#### 2.2.3. Lipaz üretiminin belirlenmesi

Lipaz üretiminin belirlenmesi için, tüplerde hazırlanmış olan lipaz tarama ortamı [Maya ekstraktı 3g/L, Pepton 5g/L, Tribütirin %1, Agar 10g/L [18]] üzerinde, YpSSA ortamında geliştirilen 7 günlük küf kolonilerinden 6 mm çapında kesilerek çıkartılmış agar diskleri yerleştirilmiştir. Tüpler 37 °C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. Lipaz üretimi, geliştirilen fungus kolonilerinin lipaz üretim düzeylerine bağlı olarak besiyerindeki tribütirini parçalaması ile tüp içerisinde oluşturdukları şeffaf zonlar ile ayırt edilmiştir [19].

#### 2.2.4. Proteaz üretiminin belirlenmesi

İzole edilen fungusların proteaz aktiviteleri, proteaz tarama besiyerinde (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5g/L, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0,25 g/L, KCL 0,25 g/L, Yağsız süt tozu %15, Agar 1,5 g/L) belirlenmiştir. Tüplerde hazırlanmış olan proteaz tarama ortamı üzerinde, YpSSA ortamında geliştirilen 7 günlük küf kolonilerinden 6 mm çapında kesilerek çıkartılmış agar diskleri yerleştirilerek 37 °C'de bir hafta inkübe edilmiştir. Gelişen funguslardan tüp içerisinde şeffaf zon oluşturanlar proteaz üreticisi olarak belirlenmiştir ve zon çapları proteaz üretimi açısından fungusları karşılaştırmak amacı ile kaydedilmiştir [20].

#### 2.2.5. Selüloz üretiminin belirlenmesi

İzolatlar, karbon kaynağı olarak üst tabaka halinde selüloz-azur içeren selüloz tarama ortamında (Selüloz-azur 0,5g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1g/L, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0,02g/L, Agar 1,5 g/L) selüloz üretimi açısından taranmıştır. Bu taramalar yapılırken, YpSSA ortamında geliştirilen 7 günlük küf kolonilerinden 6 mm çapında kesilerek çıkartılmış agar diskleri selüloz-azur içeren tüpler üzerine yerleştirilmiştir. Tüpler 37 °C'de bir hafta inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra selüloz üretme özelliğine sahip türler selülozu parçalayarak ona bağlı olan azur boyasını serbest bırakmaktadır. Fungusların selüloz enzimini üretme yeteneğine bağlı olarak oluşan mavi rengin şiddeti 1'den 10'a kadar derecelendirilerek selüloz üretimi değerlendirilmiştir [21].

## 3. Bulgular

Çalışmada fitaz, proteaz, amilaz, lipaz ve selüloz aktivitesi açısından 57'si termotolerant, 6'sı termofilik olmak üzere 63 adet kültür ayrı ayrı taranmıştır. Bu taramalar sonucunda, elde edilen sonuçlar değerlendirilerek Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Enzim tarama çalışması sonuçları

Tür	Fitaz *	Proteaz (cm)	Amilaz*	Lipaz (cm)	Selülaz#
<i>Rhizomucor pusillus</i> 1	+++	0,4	+++	1,5	0
<i>Aspergillus terreus</i> 1	++	2	++	1,9	4
<i>Aspergillus terreus</i> 2	+++	2	++	1,8	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 1	+	1,7	-	2,6	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 2	-	2,3	-	1,6	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 3	-	2,1	-	2,6	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 4	-	2	-	3	4
<i>Aspergillus terreus</i> 3	+++	2,3	+++	2,5	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 5	+	2,3	-	2	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 6	-	2,3	+	1,3	0
<i>Aspergillus fumigatus</i> 7	+	2,3	-	3,2	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 8	++	3	-	1,5	0
<i>Aspergillus fumigatus</i> 9	+	2,2	-	2,1	7
<i>Aspergillus fumigatus</i> 10	-	2,1	-	3,2	5
<i>Aspergillus fumigatus</i> 11	-	2	-	1,3	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 12	+	2	+	3,3	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 13	+	1,9	-	2,7	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 14	-	2	-	1,7	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 15	-	2,9	-	2,7	5
<i>Aspergillus terreus</i> 4	++	2,2	++	2,2	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 16	-	2,4	-	1,4	0
<i>Melanocarpus albomyces</i>	-	0,8	++	1,6	0
<i>Humicola insolens</i> 1	-	1	-	2	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 17	++	1,8	-	2,8	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 18	-	2,4	-	2,5	1
<i>Aspergillus fumigatus</i> 19	-	1,5	-	2,4	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 20	-	2	-	1,7	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 21	-	1,8	-	2	6
<i>Aspergillus fumigatus</i> 22	-	1,7	-	1,8	2
<i>Humicola insolens</i> 2	-	0,8	-	1,8	5
<i>Aspergillus fumigatus</i> 23	-	1,7	-	3,5	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 24	-	2	-	2,7	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 25	-	1,2	-	1,8	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 26	-	2,3	-	2	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 27	-	2,1	-	1,5	7
<i>Aspergillus fumigatus</i> 28	-	1,7	-	2	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 29	-	1,8	-	2,5	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 30	-	2,2	-	2,3	6
<i>Aspergillus fumigatus</i> 31	-	1,7	-	2	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 32	-	1,9	-	2,5	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 33	-	1,7	-	1,8	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 34	-	1,8	-	2,5	6
<i>Aspergillus fumigatus</i> 35	+	1,8	-	2,7	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 36	-	1,9	-	1	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 37	-	2	-	1,7	5
<i>Aspergillus fumigatus</i> 38	-	2,1	-	1,6	7
<i>Aspergillus fumigatus</i> 39	-	1,8	-	3,8	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 40	-	1,9	-	1,5	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 41	-	2	-	1,5	5
<i>Aspergillus fumigatus</i> 42	-	2	-	1,7	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 43	-	1,9	-	1,7	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 44	-	2,2	-	1,7	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 45	-	2,1	-	2,5	6
<i>Aspergillus fumigatus</i> 46	+	2,2	-	2,4	3
<i>Aspergillus flavus</i>	-	2,5	+	2	0
<i>Aspergillus fumigatus</i> 47	-	2,2	-	1,6	2
<i>Aspergillus terreus</i> 5	++	2,2	++	2	3
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	-	0,2	+++	2	4
<i>Rhizomucor pusillus</i> 2	+++	0,3	+++	1,6	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 48	-	1,7	+	1,8	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 49	-	2,2	+	3	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 50	+	1,9	-	1,5	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 51	-	1,9	-	2,8	7

\*[(-): zon yok, (+): şeffâf zon<0,3 cm, (++) : 0,3<şeffâf zon<0,5, (+++): 0,5<şeffâf zon] # [10. günde difüze olan azure renk şiddeti]

Taraması gerçekleştirilen her enzime özel besiyeri ortamlarında yapılan incelemeler sonucunda, kültürlerin %28,5'inin fitaz (Şekil 1), az veya çok seviyede olmak üzere bütün kültürlerin proteaz (Şekil 3), %22'sinin amilaz (Şekil 2), yine az veya çok seviyede olmak üzere bütün kültürlerin lipaz (Şekil 3) ve 6 izolat hariç diğer tüm kültürlerin ise selülaz (Şekil 4) ürettiği belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada ağırlıklı olarak *Aspergillus fumigatus*'tan oluşan 57 termotolerant tür kullanılmış ve bunun sonucunda fitaz testi için 16 (%28) tanesi, amilaz testi için 10 (%17,5) tanesi, selülaz testi için 53 (%93) tanesi ve proteaz ile lipaz testleri içinse tüm örnekler pozitif sonuç vermiştir. Çalışılan 6 termofilik türden fitaz testi için 2 (□ %33) tanesi, amilaz testi için 4 (□ %66) tanesi, selülaz için 4 (□ %66) tanesi ve proteaz ve lipaz testleri içinse tüm örnekler pozitif sonuç vermiştir.



Şekil 1. PSM'de fitaz enzimi tarama sonucu görünüşü



Şekil 3. Proteaz ve lipaz tarama besiyerinde proteaz (sağda) ve lipaz (solda) enzimi tarama sonucu görünüşü



Şekil 2. Amilaz tarama besiyerinde amilaz enzimi tarama sonucu görünüşü



Şekil 4. Selülaz tarama besiyerinde selülaz enzimi tarama sonucu (sağdan sola renk şiddetleri: kontrol, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)

#### 4. Sonuçlar ve tartışma

Funguslar GRAS (Generally Regarded As Safe) yani çoğunlukla güvenli kabul edildiğinden dolayı, enzim üreticisi olarak kullanılmaları oldukça güvenlidir [22]. Ayrıca ürettikleri enzimlerin genellikle ekstraselüler olması ve böylece fermantasyon ortamından daha kolay bir şekilde geri kazanılması göz önünde bulundurulduğunda funguslar enzim üretiminde pek çok avantaja sahiptirler. Endüstriyel uygulamalarda termofiller, termotolerantlar ve bu fungusların ürettiği termostabil enzimler yüksek termostabilite gösterdikleri için oldukça önemlidirler [6].

Farklı mikroorganizmaların lipaz, amilaz, selülaz, proteaz ve fitaz enzimlerinin taramalarının gerçekleştirildiği birçok çalışma mevcuttur ancak hem termofilik hem de termotolerant fungusları içeren sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Çalışmamıza benzer olarak Afyonkarahisar topraklarından izole edilen *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* ve *Penicillium* cinsinden 4 mikrofungusa ait 515 örnek test edilmiştir. Bu izolatlardan %25'inde amilaz, %26'sında proteaz ve %22'sinde lipaz aktiviteleri pozitif olarak bildirilmiştir. Araştırmacılar *Aspergillus* cinsinin %75'inin amilaz aktivitesi için pozitif sonuç verirken hiçbirinin proteaz ve lipaz aktiviteleri için olumlu sonuç vermemiştir [23]. Çalışma sonuçlarımızda *Aspergillus* izolatlarının tamamı az veya çok proteaz ve lipaz için pozitif sonuç verirken amilaz için negatif sonuç vermiştir. Çalışmamızın aksine *Aspergillus* izolatlarının lipaz için negatif sonuç verdiğini

bildirmişlerdir. Bu farklılığın tür farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Araştırmacılar tür düzeyinde tanımlama bildirmemişlerdir.

Zirai topraklardan izole edilen 1558 fungusun amilaz, proteaz ve lipaz aktivitesinin incelendiği bir çalışmada, amilaz için izolatların %41'nin, proteaz için %69'nun ve lipaz için %46'sının pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir. Çalışmada kullanılan *Aspergillus* türlerinin amilaz, proteaz ve lipaz aktivitesine sahip olduğu ortaya konulmuştur [20]. Çalışmamıza benzer şekilde *A. fumigatus* türlerinin amilaz aktivitesine sahip olmadığını bildirmişlerdir. Proteaz aktivitesi açısından baktığımızda ise bulgularımıza benzer sonuçlar bildirilmiştir.

Sanayi atıklarından izole edilen fungusların enzimlerinin taranması üzerine yapılan çalışmada, incelenen genuslar içerisinde *Aspergillus flavus*'un amilaz, lipaz, proteaz ve selüloz enzimlerinin tamamını iyi derecede sentezlediğini bildirmişlerdir [24]. Bizim çalışmamızda ise bu çalışmanın aksine izole ettiğimiz *A. flavus* türü selüloz üretmemekte ve amilaz enzimini ise minimum düzeyde üretmektedir. Bu farklılık izolasyon ortamlarının değişik olmasından dolayı ortaya çıkan suş farklılığından kaynaklanabilmektedir. Yine aynı çalışmada *Aspergillus* genusu üyelerinin amilaz yeteneğine sahip olduğu bulunmuşken bizim çalışmamızda tam tersi bir sonuç elde edilmiştir.

Çeşitli kaynaklardan izole edilen termotolerant ve mezofilik fungusların endüstriyel olarak önemli enzimlerinin taranması üzerine yapılmış olan bir çalışmada, başta *Aspergillus caespitosus* ve *A. niger* olmak üzere *Aspergillus* genusu üyelerinin fitaz üretimi açısından olumlu sonuçlar verdikleri ortaya koymuştur [25]. Bizim çalışmamızda ise *Aspergillus* türlerinden *Aspergillus terreus* 2 ve *A. terreus* 3'ün fitaz enzimi taramalarında belirgin bir üretim sergilediği saptanmıştır. Bu durum bir genus içerisindeki türlerin enzim üretimi açısından farklı profiller sergilediklerini doğrulamaktadır. Yine aynı çalışmada *Rhizomucor* cinsinin farklı türleri fitaz üretimi açısından başarılı sonuçlar vermiştir. *Rhizomucor pusillus* 1 ve *R. pusillus* 2'nin çalışmamızda en yüksek fitaz aktivitesi gösteren türlerden olması Guimaraes ve ark. [25] çalışmasını destekler niteliktedir. *Myceliophthora thermophila* [26], *Sporotrichum thermophile* [27], *Thermomyces lanuginosus* [28] and *Thermoascus aurantiacus* [29] gibi çeşitli termofilik funguslarla yapılmış olan çalışmalarda fitaz enzimi varlığı gösterilmiştir ancak *R. pusillus* için sınırlı sayıda veri bulunmasından dolayı çalışmamız ileriki çalışmalara yol gösterici niteliktedir.

Bazı termofilik fungusların amilaz aktivitelerinin tarandığı çalışmada *R. pusillus* amilaz üreticisi olarak belirlenmiştir ve enzim üretiminin 6. gününde maksimum seviyede üretim yaptığı, enzim üretiminin inkübasyon süresi ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur [30]. Gerçekleştirdiğimiz amilaz tarama çalışmasında da zon çapına göre en yüksek aktivite gösteren türler arasında *R. pusillus* 1 ve *R. pusillus* 2 yer almaktadır. 51 pirinç tanesi örneğinden izole edilen *A. terreus* ve *Lichtheimia corymbifera*'nın da aralarında bulunduğu 62 fungal izolat amilaz aktivitesi açısından taranmıştır. Çalışma sonucunda *A. terreus*'un çok ve *Lichtheimia corymbifera*'nın ise sınırlı miktarda amilaz üretimine sahip olduğu belirlenmiştir [31]. Bizim çalışmamızda ise hem *A. terreus*'un hem de *Lichtheimia corymbifera*'nın amilaz üretiminin diğer izolatlara göre yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda yapılan selüloz taramaları sonucunda en yüksek aktivite gösteren türler *A. fumigatus* 9, *A. fumigatus* 27, *A. fumigatus* 38 ve *A. fumigatus* 51 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar ile uyumlu olarak termofilik fungusların lignin selüloz enzimlerinin tarandığı bir çalışmada en yüksek selüloz aktivitesi gösteren türlerden bir tanesi *A. fumigatus* olmuştur [32]. Yine başka bir çalışmada da selüloz enzim aktivitesi yönünden en etkin türlerin *Aspergillus* genusunda olduğu belirlenmiştir [33].

Çeşitli yağlı tohumlardan *Aspergillus sp.* türleri izole edildikten sonra lipaz aktivitelerinin araştırılması sonucunda enzim aktivitesi açısından en etkili türlerden bir tanesi *A. fumigatus* olarak bulunmuştur [34]. Bu çalışma ile paralellik gösterecek şekilde bulgularımızda en yüksek lipaz aktivitesi gösteren tür *A. fumigatus* 39 olarak belirlenmiştir.

Funguslar pek çok açıdan öneme sahip organizmalardır. Gıda sektörü, ilaç yapımı, değerli enzimlerin ve organik maddelerin üretimi gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar. Dünyada çeşitli endüstriyel alanlarda enzimlerin kullanımının gün geçtikçe artması nedeniyle enzimler bilim ve teknolojinin oldukça ilgilendiği bir alan olmuştur. Endüstriyel süreçlerde uygulanan yüksek sıcaklıklarda aktivitesini koruyan termotabil enzimlerin elde edilebildiği funguslar da dolayısıyla büyük önem taşımaktadır. Ayrıca termotabilite özelliğinin yanında termofilik ve termotolerant fungusların ürettikleri enzimler geniş pH aralığı, yüksek spesifik aktivite gibi özelliklerinden dolayı da ön plana çıkmaktadır. Bu fungusların belirlenmesini ve enzimlerinin taranarak ortaya konmasını içeren çalışmalar oldukça önem arz etmektedir. Bu çalışma sonucunda, 57'si termotolerant, 6'sı termofilik olmak üzere 63 adet fungusun fitaz, proteaz, amilaz, lipaz ve selüloz enzim üretme yetenekleri ortaya konmuştur. Termofilik ve termotolerant fungusların lipaz, amilaz, selüloz, proteaz ve fitaz enzimlerini üretme yeteneğine sahip olanlarının belirlenmesi, bu fungusların ve enzimlerinin ileriki çalışmalarda değerlendirilmesi açısından referans bilgi niteliği taşımaktadır. Bu anlamda çalışmamız kullanılan funguslar açısından enzim profillerinin çıkarılmasını sağladığı için önem taşımaktadır.

## Teşekkür

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından "1101F022" numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

**Kaynaklar**

- [1] Rajasekaran, A.K. & Maheshwari, R. (1993). Thermophilic fungi: an assesment of their potential for growth in Soil. *J. Biosci.* 18, 345-354.
- [2] Maheshwari, R., Bharadwaj, G. & Bhat, M.K. (2000). Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (3), 461-488.
- [3] Mouchacca, J. (2007). Heat tolerant fungi and applied research: Addition to the previously treated group of strictly thermotolerant species. *World J Microbiol Biotechnol*, 23, 1755-1770.
- [4] Wiseman, A. (1985), *Handbook of Enzymes Biotechnology* (2nd ed.) Ellis Horwood and John Wiley & Sons
- [5] Sharma, S., Vaid, S., Bhat, B., Singh, S., & Bajaj, B.K. (2019). Thermostable enzymes for industrial biotechnology. *Advances in Enzyme Technology, Biomass, Biofuels, Biochemicals*, 469-495. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00017-0>
- [6] Turner, P., Mamo, G. & Karlsson, E.N. (2007). Potential and Utilization of Thermophiles and Thermostable enzymes in Biorefining. *Microbial Cell Factories*, 6(9), 1-23.
- [7] Prabhakaran, M., Thennarasu, V., Mangala, R.A., Bharathidasan, R., Chandrakala, N., & Mohan, N. (2009). Comparative studies on the enzyme activities of wild and mutant fungal strains isolated from sugarcane field. *Indian Journal of Science and Technology*, 2(11), 46-49.
- [8] Bajaj, B.K., & Sharma, P. (2011). An alkali-thermotolerant extracellular protease from a newly isolated *Streptomyces* sp. DP2, *New Biotechnol.* 28, 725-732.
- [9] Ortakaya, V., & Ağuloğlu Fincan, S. (2019). Amylase production of *Bacillus subtilis* isolated from soil by SmF method. *Biological Diversity and Conservation*, 12(3), 57-64. <https://doi.org/10.5505/biodicon.2019.70288>
- [10] Saini, R., Saini, H.S., & Dahiya, A. (2017). Amylases: characteristics and industrial applications. *J. Pharmacogn. Phytother*, 6, 1865-1871.
- [11] Corrêa, T.L.R., & Araújo, E.F. (2020). Fungal phytases: from genes to applications. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 1009-1020. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00289-y>
- [12] Sharma, M., & Bajaj, B.K. (2014). Cellulase production from *Bacillus subtilis* MS 54 and its potential for saccharification of biphasic-acid-pretreated rice straw. *J. Biobased Mater. Bioenergy*, 8, 449-456.
- [13] Bakir, Z.B., & Metin, K. (2016). Purification and characterization of an alkali-thermostable lipase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1087-1097.
- [14] Choi, Y., Hyde, K.D., & Ho, W.W.H. (1999). Single spor isolation of fungi. *Fungal Diversity*, 3, 29-38.
- [15] Gulati, H.K., Chadha, B.S., & Saini, H.S. (2007). Production, purification and characterization of thermostable phytase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* TL-7. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 54 (2), 121-138.
- [16] Chen, J.C. (1998). Novel screening method for extracellular phytase-producing microorganisms. *Biotechnology Techniques*, 12, 759-761.
- [17] Balkan, B. (2008). *Katı substrat fermentasyonu ile ham nişastayı parçalayan yeni bir fungal amilaz üretimi saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi*, Doktora tezi, Danışman Yrd.Doç.Dr. Figen Ertan, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji AB.D.
- [18] Rapp, P., & Backhaus, S. (1992). Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeast and bacteria. *Enzyme Microb Technol*, 14, 938-943.
- [19] Colen G. Junqueira R.G. & Moraes-Santos T. (2006). Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World J Microbiol Biotechnol*, 22, 881-885.
- [20] Topal, Ş., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M., & Çeltik, Ö. (2000). Türkiye'nin tarımsal mikoflorasının endüstriyel öneme sahip bazı enzimatik aktivitelerinin incelenmesi-1: amilaz, proteaz, lipaz, *Turk J Biol.*, 24, 79–93.
- [21] Tan, T.K., Yeoh, H.H., Tan, M.L., & Koh, S.K. (1987). Cellulolytic activities of some filamentous fungi. *Journal of The Singapore National Academy of Science*, 16, 11-16.
- [22] Mitra P., Chakraverty, R., & Chandra, A. (1996). Productions of proteolytic enzymes by solid state fermentation. *J Sci Ind Res*, 55, 439-42.
- [23] Korcan E., Özkara A., Akyıl D., Ciğerci, İ.H., & Konuk M. (2007). Farklı fungus cinslerinde endüstriyel öneme sahip bazı enzim aktivitelerinin incelenmesi. *AKÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 7(1), 279-286.
- [24] Tan T.K., & Leong W.F. (1986). Screening for extracellular enzymes of fungi from manufacturing wastes. *Mircen journal of applied microbiology and biotechnology*, 2, 445-452.
- [25] Guimaraes, L.H.S., Peixoto-Nogueira, S.C., Michelin, M., Rizzatti, A.C.S., Sandrim, V.C., Zanoelo, F.F., Aquino, A.C.M.M., Junior, A.B., & Polizeli, M.L.T.M. (2006). Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 474-480.
- [26] Mitchell D.B., Vogel K., Weimann B.J., Pasamontes L., & van Loon A.P.G.M. (1997). The phytase subfamily of histidine acid phosphatase; isolation of genes for two novel phytases from the *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology*, 143, 245-252.



- [27] Singh, B., & Satyanarayana, T. (2012). Production of phytate-hydrolyzing enzymes by thermophilic moulds. *African Journal of Biotechnology*, 11(59), 12314-12324.
- [28] Berikten, D., & Kivanc, M. (2014). Optimization of solid state fermentation for phytase production by *Thermomyces lanuginosus* using response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44, 834–848, <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.868357>
- [29] Nampoothiri K.M., Tomes G.J., Roopesh K., Szakacs G., Nagy V., Soccol C.R., & Pandey A. (2004). Thermostable phytase production by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, 118(1-3), 205-214.
- [30] Olagoke O.A. (2014). Amylase activities of some thermophilic fungi isolated from municipal solid wastes and palm-kernel stack. *American Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1(2), 64-70.
- [31] Idres, M.M.M., Moharram, A.M., Ahmed, M.S., Omar O., Marzouk M.E., & Yasser, M.M. (2021).  $\alpha$ -Amylase, L-asparaginase and arginase enzymes production by fungi isolated from rice stored under environmental condition in middle egypt. *International Journal on Emerging Technologie*, 12(1), 48-58.
- [32] Saroj, P., Manasa P., & Narasimhulu, K. (2018) Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. *Bioresour Bioprocess*, 5, 31. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0216-6>
- [33] Khokhar I., Haider M.S., Mushtaq S., & Mukhtar I. (2012). Isolation and screening of highly cellulolytic filamentous fungi. *J Appl Sci Environ Manag*, 16, 223-226.
- [34] Hamada, T.A., Abdulkreem, R.S., & Younus, H.M. (2020). Efficiency of *Aspergillus* Species to Produce the Lipase Enzyme from Various Types of Oil Seeds. *Medico-legal Update*, 20(1), 809-813.



## Phylogenetic analysis for endemic *Fritillaria baskilensis* Behçet (Liliaceae): Evidence from cpDNA “trn” sequences

Pelin YILMAZ SANCAR<sup>\*1</sup>, İrmak İCEN TASKİN<sup>2</sup>, Murat KURSAT<sup>3</sup> and Omer MUNZUROĞLU<sup>4</sup>  
ORCID: 0000-0002-6134-622X; 0000-0002-1612-0563; 0000-0002-0861-4213; 0000-0002-6134-622X

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Firat University, 23119, Elazığ, Turkey

<sup>2</sup> Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, Inonu University, 44280, Malatya, Turkey

<sup>3</sup> Department of Biology, Faculty of Arts and Science, Bitlis Eren University, 13000, Bitlis, Turkey

<sup>4</sup> Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Firat University, 23119, Elazığ, Turkey

### Abstract

*Fritillaria baskilensis* Behçet., which was first collected from Elazığ - Baskil district in 1998 and introduced to the scientific world as a new species, is one of Turkey's endemic inverted tulip species. This study aims to determine the systematic relationships between *Fritillaria baskilensis* and other *Fritillaria* species using molecular techniques. Also; As a result of this study, we tried to determine for the first time in which subgenus the endemic species in question will take place.

After the DNA isolation with the CTAB method, the *trnT-trnL3'* region of 5 samples was amplified by using *trna* and *trnd* primers, and a total of 27 *Fritillaria* species were analyzed together with 2 outgroups in the MEGA program, together with other sequence information obtained from NCBI. While our analyzes are consistent with the literature, the fact that *Fritillaria baskilensis* is in the same branch as members of the subgenus *Fritillaria* suggests that *F. baskilensis* is included in this subgenus.

This study is very important as it is the first molecular-based study using sequence information from *Fritillaria baskilensis* populations, and the new “trn” gene region haplotypes of the mentioned species were determined by us for the first time and added to the GenBank database.

**Key words:** *Fritillaria*, endemic, Turkey, cpDNA, *trnT-trnL3'*

----- \* -----

### Endemik *Fritillaria baskilensis* Behçet (Liliaceae) için filogenetik analiz: cpDNA “trn” dizilerinden kanıtlarla

#### Özet

İlk defa 1998 yılında Elazığ'ın Baskil ilçesinden toplanan ve bilim dünyasına yeni tür olarak kazandırılan *Fritillaria baskilensis* Behçet Türkiye'nin endemik ters lale türlerinden biridir. Bu çalışmanın amacı *Fritillaria baskilensis*' in diğer *Fritillaria* türleri ile aralarındaki sistematik ilişkilerin moleküler teknikler kullanılarak belirlenmesidir. Ayrıca; söz konusu endemik türün hangi altcinste yer alacağı da bu çalışmanın sonucu olarak ilk defa tarafımızca tespit edilmeye çalışılmıştır.

CTAB metodu ile manuel olarak gerçekleştirilen DNA izolasyonu sonrası *trna* ve *trnd* primerleri kullanılarak 5 örneğe ait *trnT-trnL3'* bölgesi çoğaltılmış, NCBI' dan elde edilen diğer sekans bilgileri ile birlikte toplam 27 *Fritillaria* türü 2 dış grup ile birlikte MEGA programında analiz edilmiştir. Analizlerimiz literatürle uyumluluk gösterirken, *F. baskilensis*' in *Fritillaria* altcinsi üyeleri ile aynı kolda yer alması *F. baskilensis*'in bu altcinste yer aldığı fikrini düşündürmektedir.

Bu çalışma *F. baskilensis* popülasyonlarına ait sekans bilgileri kullanılarak yapılmış ilk moleküler tabanlı çalışma olması açısından oldukça önemlidir ve sözkonusu türe ait yeni “trn” gen bölgesi haplotipleri ilk defa tarafımızca tespit edilerek GenBank veritabanına kazandırılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Fritillaria*, endemik, Türkiye, cpDNA, *trnT-trnL3'*

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +904242370000; Fax.: +904242370000; E-mail:peyilmaz@firat.edu.tr

## 1. Introduction

Liliaceae is an important family of mostly geophytic plants represented by about 250 genera and 3500 species in the world [1]. The Liliaceae family, which has 44 genera and 426 species in Turkey, is cosmopolitan and shows natural distribution mostly in tropical and temperate regions [2]. Medicinal species from Liliaceae include important ornamental plants and some species are used as foodstuffs. Liliaceae is a family with a high endemism rate [3]. In our country (Turkey), 227 species of the family are endemic. Liliaceae family members can be used as ornamental plants (tulips, hyacinths, lilies, and inverted tulips) and vegetables (onions, leeks, and garlic), as well as medicinal plants due to the chemicals they contain [4].

Species belonging to the genus *Fritillaria* are found in very different habitats such as limestone rocks, stony areas, in-field, field edges, stony fields, meadows, wet meadows, roadsides, *Pinus* L., *Juniperus* L., *Cedrus* Link. forests, deciduous *Quercus* L. forests, forest clearings, *Quercus coccifera* L. scrubs, thickets, mountainous steppe, Umbelliferae and *Astragalus* L. steppes, serpentine areas, rocky and sandy areas near the sea, places where snow has just melted away, and loose slopes. They adapt very well to similar cultural areas. It spreads from sea level to 3500 m. and flowering time is between February and July [5].

The *Fritillaria* genus, which is expressed in a total of 165 taxa, 7 subgenus, and 2 sections in the world, spreads in Europe, the Middle East, Central Asia, and the west of North America [6]. The genus *Fritillaria* is represented by 48 taxa in Turkey, 27 of these taxa are endemic and the endemism rate is 36.53%. This high rate shows that the Flora of Turkey may be the center of the genetic diversity of this genus. The species belonging to the genus *Fritillaria* are of high agricultural and economic importance [7, 8]. Species belonging to the genus *Fritillaria* show a wide variation in terms of their morphological features and physiological adaptation to the environment, and as a result of this variation, they are widely used as ornamental bulbous plants [9]. Only 2 species of *Fritillaria*, *F. imperialis* and *F. persica* are allowed to trade in Turkey, and their commercial value is quite high [10]. In addition, some *Fritillaria* species are used as antitussives and expectorants in traditional Chinese medicine [11].

Plants belonging to the genus *Fritillaria* spread between 1200-2000 m altitudes. *Fritillaria baskilensis*, which was first collected from Elazığ - Baskil district in 1998 and introduced as a new species to the scientific world, is one of Turkey's endemic inverted tulip species [12]. This is the only known habitat for the type sample from this population so far. No other records have been found until today. The plant forms natural populations only in the lower parts of two hills in Selil Mountain in Kuluşağı village of Baskil district Elazığ province in Turkey, and a single or several individuals naturally grow together in an area of 20 decares in total [13].

This study aims to determine the systematic relationships between Endemic *Fritillaria baskilensis* (Liliaceae) and other *Fritillaria* species using molecular techniques. Also; As a result of this study, we will try to determine for the first time, which subgenus the endemic species in question will be. This study is very important as it is the first molecular-based study to be conducted using sequence information from endemic *Fritillaria baskilensis* populations, and the new “trn” gene region haplotypes of the mentioned species were determined by us for the first time and added to the GenBank database.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

In this study, the Turkish endemic populations belonging to *Fritillaria baskilensis*, which grows only in the Baskil district of Elazığ, were used. Plant samples were collected from their natural habitats by Kursat and Munzuroğlu during their vegetative period between March and May 2015 [13]. The localities where the samples were collected are given in Table 1. In addition, the flowering state and general view of the plant are shown in Figure 1.



Figure 1: *Fritillaria baskilensis* general view (A. Flowering view B. Fruity view)

Table 1. The examined individuals of the *F. baskilensis* used in the study and detailed localities information

Taxon name	Detailed localities of populations
<i>Fritillaria baskilensis</i> 1	B7 Elazığ: Baskil, Kuluşağı 2 population
<i>Fritillaria baskilensis</i> 2	B7 Elazığ: Baskil, Şahindere village, Aliğa hamlet (Marh and Munzuroğlu populations)
<i>Fritillaria baskilensis</i> 3	B7 Elazığ: Baskil, Hasan Mountain (Haroğlu) population
<i>Fritillaria baskilensis</i> 4	B7 Elazığ: Baskil, Kuluşağı 1 population (The first identified population of the species)
<i>Fritillaria baskilensis</i> 5	B7 Elazığ: Harput, Göllübağ population

## 2.2. DNA isolation, PCR, and Sequence analysis

For DNA isolation, leaf tissue that was collected from the field and kept at -20°C for molecular studies was used. DNA isolation was performed manually, using a modified CTAB method [14]. The concentrations of the isolated DNAs were adjusted to 20 ng/µl by measuring with a nanodrop spectrophotometer. Stock DNA was stored at -20°C.

In the PCR stage, 2 consecutive regions were amplified with a single primer pair to be used in phylogenetic analysis. The sequence of the primer set for the *trnT-trnL3'*(*trna-trnd*) region is given in Table 2. [15]. For PCR studies 10 µL of buffer, 3 µL of MgCl<sub>2</sub>, 1 µL of dNTP, from each primer 0.50 µL (forward and reverse), 0.50 µL Taq polymerase, approximately 6 ng (2.70 µL) template DNA was mixed with dH<sub>2</sub>O and the final concentration was adjusted to 50 µL, and the PCR device was repeated for 30 cycles. The content of the PCR cycle was adjusted as follows; Initial denaturation at 95°C for 2 minutes, denaturation at 95°C for 1 minute, annealing at 55°C for 40 seconds (*trnT-trnL3'* region), extension at 72°C for 1 minute, and final extension at 72°C for 5 minutes. The resulting PCR products were observed on 1% agarose gel.

Table 2: The base sequences of the primers used [15]

Primers	Sequence (5'-3')
<i>trna</i> (Forward):	5' CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT 3'
<i>trnd</i> (Reverse):	5' GGG GAT AGA GGA CTT GAA C 3'

The PCR products obtained for sequence analysis were sent to Macrogen. Purification and sequencing were done by Macrogen. Two-way scanning was performed for each sample. Chromatogram data including sequence results were evaluated using Finch TV version 1.4.

Values such as intra- and inter-species variable regions, genetic distance, nucleotide diversity, molecular diversity parameters for each dataset were calculated using the MEGA program Version X, and phylogenetic analyzes were performed [16]. GenBank Accession numbers were obtained by registering with NCBI (Table 3).

## 3. Results

In this study, the Turkish endemic populations belonging to *Fritillaria baskilensis*, which grows only in the Baskil district of Elazığ, were used. Sequence information of two different “*trn*” regions of chloroplast DNA, which are the continuation of each other, in all individuals examined from populations of *Fritillaria baskilensis* were used to determine the systematic relationship of this species. Among the two-way reading sequences sent from Macrogen, the best quality ones were selected using Version 1 of the Finch TV program. Then, the sequences were aligned using the “Multiple Alignment Blast System” of Automatic sequencing systems in the MEGA program. Noticeable differences are fixed manually. As a result of the scans made on NCBI, 12 different species belonging to the genus *Fritillaria* were included in our analyzes and the phylogenetic relationship between 29 species, including outgroups, was examined [17-21]. The GenBank accession numbers of the individuals examined and the samples included in our analysis from NCBI are given in Table 3.

DNA sequences of *trn* regions of 29 individuals (2 outgroup) belonging to the genus *Fritillaria* were statistically analyzed. By evaluating the sequences of *trn* regions of the individuals studied, both separately and together, conserved regions (C), regions with variation (V), parsimony-informative regions (Pi), single base pairs (S), nucleotide composition, homologous base pairs (ii), transitional base pairs (si), transverse base pairs (sv) and R-value (si / sv) were calculated and the obtained values are given in Table 4. These parameters determine the distribution of individuals in the phylogenetic tree and thus give us information about their phylogenetic relationships.

Table 3. GenBank accession numbers of the individuals examined and the samples included in our analysis from NCBI [17-21]

Taxa of the genus <i>Fritillaria</i>	GenBank Accession Numbers
<i>F. baskilensis</i> 1	MZ327256
<i>F. baskilensis</i> 2	MZ327257
<i>F. baskilensis</i> 3	MZ327258
<i>F. baskilensis</i> 4	MZ327259
<i>F. baskilensis</i> 5	MZ327260
<i>F. aurea</i>	JQ289553
<i>F. caucasica</i>	JQ289557
<i>F. imperialis</i> 1	JQ327135
<i>F. imperialis</i> 2	JQ289551
<i>F. imperialis</i> 3	KM435201
<i>F. crassifolia</i> ssp. <i>kurdica</i>	JQ289552.1
<i>F. crassifolia</i> ssp. <i>kurdica</i> 2	JQ289552.2
<i>F. latifolia</i>	JQ289555
<i>F. michailovskyi</i> 1	JQ289554
<i>F. michailovskyi</i> 2	JQ327136
<i>F. michailovskyi</i> 3	JQ327137
<i>F. minuta</i>	JQ289556
<i>F. karelinii</i>	MG211821
<i>F. cirrhosa</i>	MH593346
<i>F. usuriensis</i>	MH593369
<i>F. thunbergii</i>	MH593362
<i>F. tortifolia</i>	NC037214
<i>F. verticillata</i>	NC037217
<i>F. meleagroides</i>	MF947710
<i>F. davidii</i>	NC045895
<i>F. maximowiczii</i>	NC045894
<i>Lilium lancifolium</i> (outgroup)	MH177880
<i>Lilium davidii</i> (outgroup)	EU597205

Table 4. Molecular diversity parameters obtained from sequences of the “trn” regions of examined individuals.

Parameters of Molecular Diversity	trnT-trnL3' Region
Total individuals	29
Total band Length	~ 570
The ratio of G-C base pair (%)	33.6
Conserved regions (C)	547
Variation regions (V)	22
Single parts (S)	2
Parsimony informative regions (Pi)	20
Homologous base pairs (ii)	552
Transitional base pairs (si)	2
Transversional base pairs (sv)	2
R value (si/sv)	0.7

When Table 4 is examined, it is seen that individuals are not very different in terms of the ratio of T, C, A, and G bases. At the same time, when the average values of the base content of the individuals were calculated, it was seen that the A-T ratio was 66.4% and the G-C ratio was 33.6%, that is, the A-T base pair was richer than the G-C base pair.

To determine the phylogenetic relationships between both the *F. baskilensis* species we studied and the individuals belonging to other *Fritillaria* taxa whose sequences we obtained from NCBI, a total of 29 individuals, 2 of which were outgroups, were examined in the Mega program.

Then, using the Best DNA / Protein step in the Models menu of this program, the methods that can best express the phylogenetic relationship between individuals were determined, and the lowest BIC (Bayesian Information Criterion) value in the given list of methods was found in the K2 + G (Kimura-3-parameter) method. According to K2+G, it was determined that phylogenetic trees can be drawn using any of the methods such as Maximum Parsimony, Neighbor-Joining, UPGMA, and Maximum Likelihood to see phylogenetic relationships between individuals.

Maximum Likelihood, Neighbor-Joining, UPGMA, and Maximum Parsimony methods were applied separately, but it was decided that the Maximum Parsimony method was the method that best showed the evolutionary and

phylogenetic relationships between the individuals studied. In the phylogenetic tree drawing, the *trn* region of the chloroplast genome was evaluated together using the X version of the Mega program [16]. In the Maximum Parsimony method, 100 bootstrap values were entered and phylogenetic trees were obtained for 29 individuals in total, and comments were made according to the most useful tree (Figure 2).

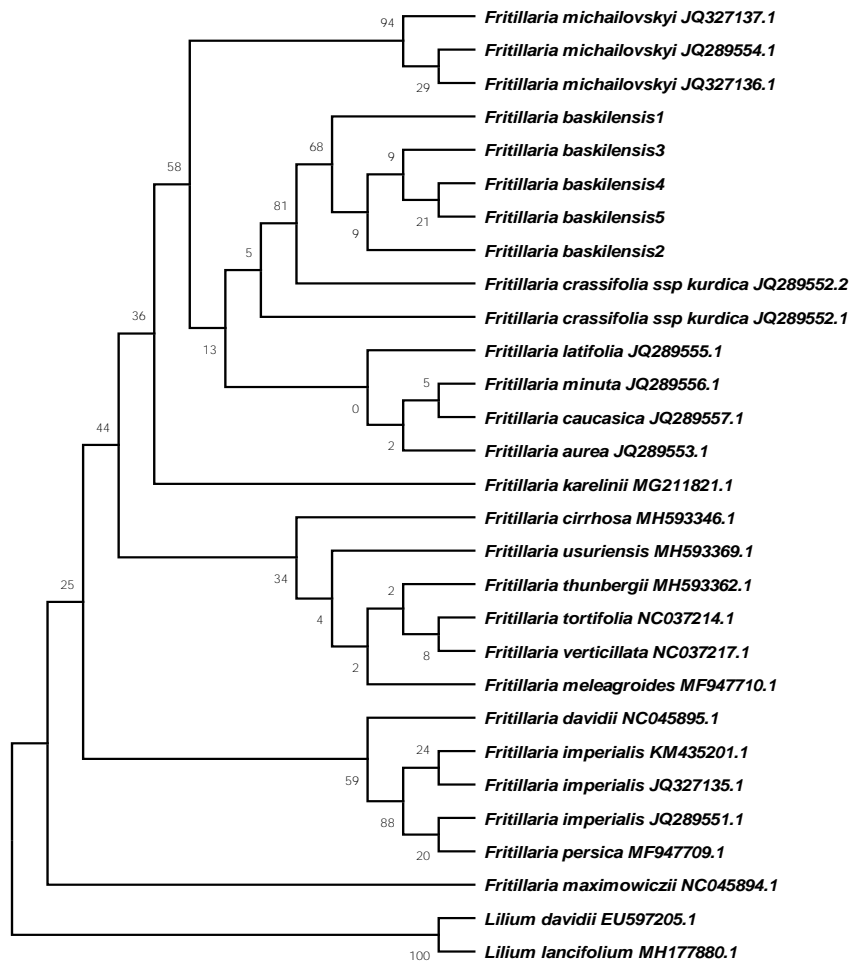


Figure 2: Maximum Parsimony tree obtained from the sequences of the “*trn*” region

#### 4. Discussion

The genus *Fritillaria* is considered to be a monophyletic genus, the sister group of *Lilium* and the largest member of this tribe, in the tribe Liliae [22,23]. The most accepted classification of the *Fritillaria* genus, which has been subjected to many different classifications until today, is the classification made by Rix. Rix conducted extensive studies on *Fritillaria* in 1975 and 1979 [24,25]. In the list of *Fritillaria* species, *Fritillaria* is classified into subgenus, sections, and series [6]. Describing 8 subgenera in total, Rix used sections to further group the subgenus. Rix reorganized both *Rhinopetalum* and *Korolkowia* as subgenus, renamed *Eufritillaria* as *Fritillaria*, and added the subgenus *Davidii* and *Japonica*. The largest subgenus of the *Fritillaria* genus, which is characterized by a total of 8 subgenera, is *Fritillaria*, while *Theresia*, *Korolkowia*, and *Davidii* are defined as monotypic as they contain only one species. The subgenus, which has the most species in our country, is the *Fritillaria* subgenus, and the species belonging to the *Rhinopetalum*, *Liliorhiza*, *Korolkowia*, *Davidii*, and *Japonica* subgenus are not found in our country [6-22].

This study aims to try to determine the systematic position of *F. baskilensis*, which is an endemic species and whose subgenus has not yet been determined, by making a phylogenetic analysis. In addition, molecular data about this endemic taxon will be brought to the literature by us for the first time. There are few studies at the molecular level on *Fritillaria* species that grow naturally in Turkey. In this study, phylogenetic analysis of 29 *Fritillaria* taxa (2 outgroup) based on the cpDNA *trn* region, (6 of which was by us), was performed. By adding the obtained new sequence data to the GenBank database, the chloroplast DNA *trnT-trnL3'* region of *F. baskilensis* was clarified by us.

Because of the reproducibility of the results, DNA sequencing-based strategies are widely used in identifying species and resolving phylogenetic relationships [26]. Therefore, both forward and reverse sequencing of our samples was performed, and the resulting data successfully confirmed each other. To clarify the systematic limits of this species,

the obtained sequences were compared with the closely related sequences in the database to obtain information about the phylogenetic position of the endemic taxon we studied. As a result of the scans made by NCBI, the cpDNA regions of many species could not be included in our research because parallel studies were not conducted with our studies. However, samples from every subgenus were included in the study as much as possible.

Our phylogenetic analysis revealed that the 27 *Fritillaria* taxa were divided into 2 main classes. The first class mostly includes species of the subgenus *Fritillaria*, which is the largest subgenus of the genus. The phylogenetic tree we obtained showed a separation, supporting the previous studies of the genus and its phylogeny. According to the phylogenetic tree, *F. maximowiczii*, a species belonging to the subgenus *Liliorhiza*, divided the tree into 2 (Figure 2.). In the literature, the North American origin *Liliorhiza* subgenus is separated from all other Eurasia origin subgenus (Figure 3.) [22].

Subgenus *Petilium* (*F. imperialis*) is in the same branch as the monotypic *Theresia* (*F. persica*), supporting the idea that the two subgenera are very close to each other. Subgenus *Davidii* with a group of subgenus *Fritillaria* members, on the other hand, is separated from the other group by being in the same arm with these two subgenera. Taxa belonging to Subgenus *Fritillaria* showed grouping among themselves, while one group appeared close to *Petilium*, *Theresia*, *Davidii*, and the other group were in the same branch with *Rhinopetalum*.

The taxa belonging to the genus *F. baskilensis*, which is the subject of this study, are in the same branches together with the *Fritillaria* taxa grouped with the *Rhinopetalum* subgenus. This gave us the idea that *F. baskilensis* may belong to the subgenus *Fritillaria*. High bootstrap values also supported our idea.

The development of molecular phylogenetic and cladistic analysis has allowed a better understanding of the infrageneric relationships of *Fritillaria* species. Early studies showed that the major infrageneric division is divided into two classes, North America (class A) and Eurasia (class B) based on biogeographic region. Class A overlapped most closely with the subgenus *Liliorhiza* [19].

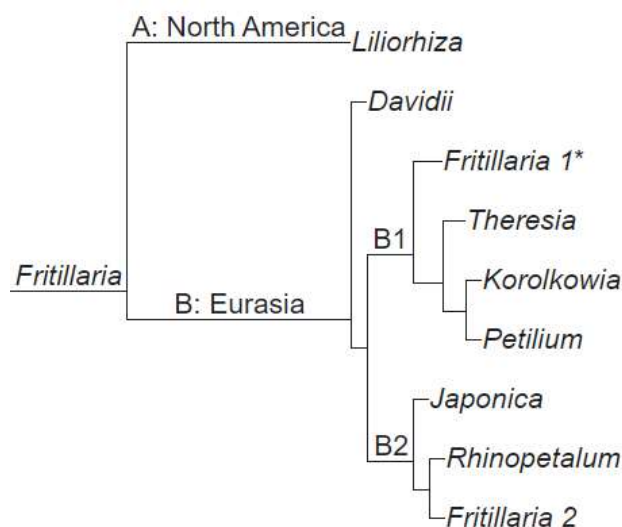


Figure 3: General classification of the subgenus *Fritillaria* [22]

Rønsted et al. (2005) conducted a study using an expanded pool of taxa of 37 species, including all subgenus and divisions classified by Rix and extensively analyzed the sequences of the *matK* gene, *rpl16* plastid gene, *trnK*, and nuclear ribosomal ITS. Their results confirmed the first division of *Fritillaria* taxa based on geography (Figure 3.) [22]. Class A corresponds to the California-based subgenus *Liliorhiza*, but some species are found in Western Asia. These Asian species form a clad with true North American species, suggesting redistribution after an Asian origin [22]. The taxa belonging to *Fritillaria*, the largest subgenus of class B, are divided into two groups and spread to different branches, suggesting that this subgenus is polyphyletic [15]. The phylogenetic tree we obtained showed a parallel split, confirming this study.

In addition, the 5S rDNA region sequences of 4 *Fritillaria* taxa were patented by Sucher et al. [28]. Türktaş et al. (2012) performed a phylogenetic analysis based on the cpDNA *trnL-F* region of 11 different *Fritillaria* species collected from their natural habitats. Their results showed that 11 *Fritillaria* taxa were grouped in 2 branches, strongly supporting the separation of *Fritillaria* subgenus from *Petilium* and *Theresia* subgenus, while the resolution within *Fritillaria* subgenus was not clear [8]. They argued that the phylogeny of the genus *Fritillaria* should be reanalyzed using more advanced techniques. In addition, Türktaş et al. stated that new hybrid species can be produced from *Fritillaria*, an ornamental plant, with DNA-based studies [8].

Metin et al. (2013) studied the genetic relationships of 12 *Fritillaria* taxa collected from different regions of Turkey with the AFLP method in their research on *Fritillaria*. Their results supported the classical classification of *Fritillaria* [29].

As a result of this study, original data were obtained for use in new scientific molecular studies, and new *trnT-trnL3'* region haplotypes of endemic *F. baskilensis* were provided for GenBank. In the phylogenetic evolutionary family tree we created, it is observed that the taxon *F. baskilensis* is very close to Subgenus *Fritillaria*, while the polyphyletic nature of this subgenus brings about the fact that further studies are needed to solve the systematic problems in between.

### Acknowledgment

This study was financed within the scope of the “Baskil reverse tulip species protection action plan implementation activities project” supported by the Turkish Ministry of Forestry and Water Affairs, General Directorate of Nature Conservation and National Parks.

### References

- [1] Satil, F. & Akan, H. (2006). Anatomical Studies on Some Endemic and Rare Geophytes of Liliaceae Family. *Ekoloji*, 58, 21-27.
- [2] Erik, S. & Tarıkahya, B. (2004). Türkiye Florası Üzerine. *Kebikeç*, 17, 139-163.
- [3] Davis, P.H. (1965). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. *Edinburgh University Press*, Edinburgh 11, 243-558.
- [4] Heywood, V.D. (1978). Flowering Plants of the World. *Oxford University Press*, London.
- [5] Kıran, Y. & Gedik, O. (2014). Karyological Study on Turkish Endemic *Fritillaria baskilensis* Behçet. (Liliaceae). *Turkish Journal of Science & Technology*, 9(2), 105-108.
- [6] Rix, M., Frank, E., Webster, G. & Alpine Garden Society (Great Britain). (2001). *Fritillaria*: A revised classification : together with an updated list of species. England: *Fritillaria* Group of the Alpine Garden Society.
- [7] Tekşen, M. & Zeki, A. (2008). *Fritillaria mughlae* (Liliaceae), a New Species from Turkey. *In Annales Botanici Fennici*, 45(2),141-147.
- [8] Türkteş, M., Aslay, M., Kaya, E. & Ertuğrul, F. (2012). Molecular characterization of phylogenetic relationships in *Fritillaria* species inferred from chloroplast *trnL-trnF* sequences. *Turkish Journal of Biology*, 36, 552-560. <https://doi:10.3906/biy-1201-30>.
- [9] Tekşen, M. & Zeki, A. (2011). The revision of the genus *Fritillaria* L.(Liliaceae) in the Mediterranean region (Turkey). *Turkish Journal of Botany*, 35, 447-478. <https://doi:10.3906/bot-0812-9>.
- [10] Demir, A. (2019). Türkiye’de *Fritillaria imperialis*’in Ekonomik Değer Analizi. *Biological Diversity and Conservation*, 12(3), 103-110.
- [11] Shujun, W., Wenyuan, G., Wei, J. & Peigen, X. (2006). Crystallography, morphology and thermal properties of starches from four different medicinal plants of *Fritillaria* species. *Food Chemistry*, 96, 591-596. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2005.03.014>.
- [12] Behçet, L. (1998). A new species of *Fritillaria* L.(Liliaceae) from east anatolia Turkey. *Bulletin of Pure and Applied Sciences*, 17,1-2.
- [13] Kursad, M. (2017). Baskil ters lalesi tür koruma eylem planı uygulama faaliyetleri projesi. *T.C. Orman ve Su işleri bakanlığı, Doğa koruma ve milli parklar genel müdürlüğü*.
- [14] Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). A Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 19, 11-15. [https://doi: 10.1007/978-3-642-83962-7\\_18](https://doi: 10.1007/978-3-642-83962-7_18).
- [15] Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. (1991). Universal primers amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17(5), 1105-1109. <https://dx.doi.org/10.1007/BF00037152>.
- [16] Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549. <https://doi: 10.1093/molbev/msy096>.
- [17] Do, H. & Kim, J.H. (2019). The implication of plastid transcriptome analysis in petaloid monocotyledons: A case study of *Lilium lancifolium* (Liliaceae, Liliales). *Scientific Reports*, 9,6662. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43259-7>.
- [18] Bi, Y., Zhang, M.F., Xue, J., Dong, R., Du, Y.P. & Zhang, X.H. (2018). Chloroplast genomic resources for phylogeny and DNA barcoding: a case study on *Fritillaria*. *Scientific Reports*, 8(1), 1184. <https://doi: 10.1038/s41598-018-19591-9>.
- [19] Chen, Q., Wu, X. & Zhang, D. (2020). Comparison of the abilities of universal, super, and specific DNA barcodes to discriminate among the original species of *Fritillariae cirrhosae* bulbous and its adulterants. *Plos One*, 15(2), e0229181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229181>.
- [20] Yan, Li., Zhirong, Z. & Guanghui, L.V. (2017). The complete chloroplast genome of *Fritillaria yuminensis*, a rare and endangered species endemic to China. *Mitochondrial DNA, Part B*, 2(2), 913-914. <https://doi: 10.1080/23802359.2017.1413315>.



- [21] Huang, J., Yu, Y., Liu, Y.M., Xie, D.F., He, X.J. & Zhou, S.D. (2020). Comparative Chloroplast Genomics of *Fritillaria* (Liliaceae), Inferences for Phylogenetic Relationships between *Fritillaria* and *Lilium* and Plastome Evolution. *Plants (Basel)*, 9(2), 133. <https://doi:10.3390/plants9020133>.
- [22] Rønsted, N., Law, S., Thornton, H., Fay, M.F. & Chase, M.W. (2005). Molecular phylogenetic evidence for the monophyly of *Fritillaria* and *Lilium* (Liliaceae) and the infrageneric classification of *Fritillaria*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 35(3), 509–527. <https://doi.10.1.1.574.7908>.
- [23] Peruzzi, L., Innangi, M., Tatino, F. & Santangelo, A. (2017). *Fritillaria messanensis* subsp. *gracilis* (Liliaceae), a new record for the Italian Flora (S Italy). *Phytotaxa*, 307(2), 167. <https://doi:10.11646/phytotaxa.307.2.11>.
- [24] Rix, E.M. (1975). Notes on *Fritillaria* (Liliaceae) in the Eastern Mediterranean Region, III. *Kew Bulletin: Kew Bulletin*, 30(1), 153-162. <https://doi.org/10.2307/4102882>.
- [25] Rix, EM. (1979). Notes on *Fritillaria* (Liliaceae) in the Eastern Mediterranean Region: IV. *Kew Bulletin*: 33(4), 585-600. <https://doi.org/10.2307/4109803>.
- [26] Khan, I.A. & Azim, M.K. (2011). Variations in intergenic spacer *rpl20-rps12* of mango (*Mangifera indica*) chloroplast DNA: implications for cultivar identification and phylogenetic analysis. *Plant Systematics and Evolution*, 292, 249-255. <https://doi.org/10.1007/s00606-011-0424-4>.
- [27] Fay, M.F. & Chase, M.W. (2000). Modern concepts of Liliaceae with a focus on the relationships of *Fritillaria*. *Curtis's Botanical Magazine*, 17(3), 146-149.
- [28] Sucher, N.J., Tsim, K.W. & Ip, N.Y. (2003). *Fritillaria* species identification. US Patent 6.569.625. Washington, DC: US Patent and Trademark Office.
- [29] Karakas M. O., Turktas, M., Aslay, M. & Kaya, E. (2013). Evaluation of the genetic relationship between *Fritillaria* species from Turkey's flora using fluorescent-based AFLP. *Turkish Journal of Biology*, 37, 273-279. <https://doi:10.3906/biy-1207-62>.



## Biosystematic studies on some *Fumana* taxa which naturally distributed in Eskişehir/ Türkiye

Murat ARDIÇ <sup>\*1</sup>, Mücahit Samet ŞAHİN <sup>1</sup>  
ORCID: 0000-0001-8734-3038; 0000-0001-7837-9151

<sup>1</sup> Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Science and Letters, Department of Biology, TR-26040, Eskişehir, Türkiye

### Abstract

In this study, *Fumana aciphylla*, *F. laevis*, *F. procumbens*, *F. thymifolia* and *F. paphlagonica* which naturally distributed in Eskişehir and its surroundings, were examined biosystematically. *Fumana*, one of the important genera of the Cistaceae family, contains perennial shrubs and xeric plant taxa. The most distinctive features of the *Fumana* taxa are woody root and stem, alternate, convoluted stem leaves and 5-lobed yellow petals. Flowering begins in the spring and the vegetation period lasts until the end of summer. *Fumana* taxa, which are generally known for their high adaptation to hot and arid climates, are especially grown in regions where the Mediterranean climate is dominant, but there are also taxa that can adapt to warmer and colder climates. In this study, 5 *Fumana* taxa (*F. aciphylla*, *F. laevis*, *F. procumbens*, *F. thymifolia*), 1 of which is endemic (*F. paphlagonica*), distributed in Eskişehir and its environs, were examined comparatively in terms of morpho-anatomical and palynology for the first time. The aim of this study is to comparatively reveal the taxonomic, anatomical and palynomorphological features of the naturally distributed *Fumana* taxa in Eskişehir/Turkey.

**Keywords:** *Fumana*, morphology, systematics, taxonomy, palynology

----- \* -----

## Eskişehir'de doğal yayılış gösteren bazı *Fumana* taksonları üzerinde biyosistemantik çalışmalar

### Özet

Bu çalışmada Eskişehir ve çevresinde doğal yayılış gösteren *Fumana aciphylla*, *F. laevis*, *F. procumbens*, *F. thymifolia* ve *F. paphlagonica* taksonları biyosistemantik açıdan incelenmiştir. Cistaceae familyasının önemli cinslerinden birisi olan *Fumana* çok yıllık çalı formu ve kurakçıl bitki taksonlarını bünyesinde barındırmaktadır. Bu cins taksonlarının en ayırt edici özellikleri odunsu kök ve gövdesi, içe kıvrık alternat gövde yaprakları ve sarı renkli 5 loblu petalleridir. Çiçeklenme bahar aylarında başlayıp, vejetasyon dönemi yaz sonuna kadar sürmektedir. Genelde sıcak ve kurak iklimlere olan yüksek adaptasyonu ile bilinen *Fumana* taksonları özellikle Akdeniz ikliminin hâkim olduğu bölgelerde yetişmekle birlikte daha sıcak ve daha soğuk iklimlere uyum sağlayabilmiş taksonların varlığı da bilinmektedir. Eskişehir ve çevresinde yayılış gösterdiği bilinen 1'i endemik (*F. paphlagonica*) 5 *Fumana* (*F. aciphylla*, *F. laevis*, *F. procumbens*, *F. thymifolia*) taksonu morfo-anatomik ve palinolojik açıdan karşılaştırmalı olarak ilk kez bu çalışmada incelenmiştir. Bu çalışmanın amacı Eskişehir'de doğal yayılış gösteren *Fumana* taksonlarının taksonomik, anatomik ve palinomorfolojik özelliklerini karşılaştırmalı olarak ortaya koymaktır.

**Anahtar kelimeler:** *Fumana*, morfoloji, sistematik, taksonomi, palinoloji

### 1. Giriş

Cistaceae, bitkiler aleminin, tohumlu bitkiler şubesinin, çift çenekliler sınıfının, gülgiller takımında yer alan bitki grubudur. Cistacea familyasını, bulunduğu gruptaki bitkilerden ayıran en temel özelliklerin başında serbest

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905323332753; Fax.: +905323332753; E-mail: mardic@ogu.edu.tr

stamenler ve bütün üyelerinde görülen 5 petal gelmektedir. Bu familya içerisindeki bitkiler, genellikle kurakçıl ya da yarı kurakçıl bitkilerdir. Cistaceae familyasının 200'e yakın taksonu içerisinde hemen hemen bütün üyeleri Akdeniz çevresinde yayılış gösterirken, Kuzey ve Güney Doğu ABD'de nadir yayılış gösteren örnekleri bulunmaktadır [1]. Bu familya, yaprak dökken çalılardan, yarı çalılardan tek yıllık ve çok yıllık otlardan meydana gelmektedir [2].

*Fumana*, çok yıllık, genelde çalı formulu, odunsu köke bazen de otsu ya da odunsu gövdeye sahip, drenajı yüksek topraklarda yetişen, kurakçıl bir bitkidir. Akdeniz ve çevresinde doğal yayılışa sahip *Fumana* (Dunal) Spac, Akdeniz florasında, yaklaşık 25 tür ile temsil edilmektedir [3, 4, 5, 6]. *Fumana* taksonlarının birçoğu, kayalık, çorak, taşlı veya kumlu toprak yapısına sahip olan bölgelerde yetişmektedir. Batı Avrupa ve Doğu Akdeniz olarak iki türleşme merkezine ayrılmıştır [7]. Akdeniz ve çevresinde son yıllarda yapılan sistematik çalışmaların artışından dolayı, *Fumana* cinsine ait taksonlar oldukça iyi bilinmektedir [8]. Batı Akdeniz'de toplam 13 tür ile birlikte İber yarımadası, *Fumana* bakımından en zengin bölgelerdir. Yaygın olarak dağılım gösteren türler arasında 4 tür endemiktir. Sarı petalleri, içe kıvrık hemen hemen eşit boyda gövde yaprakları ve tüylü gövdesi ile *Fumana* bulunduğu vejetasyondaki bitkilerden daha farklıdır. Yakın akrabası *Helianthemum* ile ortak pek çok özellik gösterse de temelde bariz farkları vardır. Anter bulundurmamayan stamenler ve gövde yapraklarının pozisyonları en dikkat çekici farklarıdır. Yapılan çalışmalar, *Fumana* taksonlarının başta Akdeniz ve çevresi olmak üzere, Orta Doğu'dan Anadolu'ya, hatta Kuzey Avrupa'da bulunan belirli bölgelere kadar, günümüzde yayılış gösterebildiği tespit edilmiştir. *Fumana* için yapılan moleküler tahminleme ve atalara ait analizler, bu taksonun Kuzeybatı Akdeniz'de Miyosen dönemindeki çeşitliliğine dair kalıntılara rastlanmıştır [9]. *Fumana* üzerine Anadolu bölgesine ait yapılan ilk revizyon çalışmaları, Davis vd. tarafından 1964 yıllarında, Flora of Turkey eserinde ele alınmıştır. Belirlenen 21 türün 10 tanesi Türkiye'de doğal yayılış göstermekte ve yayılış gösteren taksonların 3'ü ülkemize endemiktir (*F. grandiflora*, *F. paphlagonica*, *F. trisperma*) [6, 8].

Eskişehir ve çevresinde yetiştiği belirlenmiş olan ve çalışmada yer verilen *Fumana* taksonlarına ait literatürde herhangi bir biyosistemik çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle literatür taramaları sonucunda belirlenen bu konu, çeşitli morfolojik verilerden yararlanarak seçilen bitki türlerinin yetiştiği bölgedeki sistematik durumlarına açıklık getirmeyi amaçlamaktadır. Eskişehir çevresinde yayılış gösteren *Fumana* taksonlarının, yaprak, gövde, kök, çiçek, tohum, tüy, stoma morfolojileri ile birlikte, palinolojik verileri elde edilerek, sistematik durumuna açıklık getirmektedir.

## 2. Materyal ve Yöntem

Çalışmada kullanılan materyal, 2020 yılı vejetasyon dönemlerinde (bahar, yaz ve sonbahar) yapılan 3 bitki toplama gezilerindeki örneklerden oluşmaktadır. Toplanan 5 bitki grubu sistematik kurallara uygun bir şekilde herbarium materyali haline getirilmiş ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde inceleme materyali olarak toplanmıştır. Aşağıda bitki toplanan lokaliteler ve enlem-boylam ve rakımları ile birlikte verilmiştir aynı zamanda harita üzerinde işaretlemeleri yapılmıştır (Tablo 2.1. ve Şekil 2.1.).

Tablo 2.1. Çalışma kapsamında incelenen *Fumana* taksonlarının lokaliteleri.

Takson	Lokalite
<i>F. thymifolia</i>	Enlem: 39°44'53.41"K – Boylam: 30°28'44.30"D. Rakım: 831m. Eskişehir: Odunpazarı Kütahya Karayolu.
<i>F. aciphylla</i>	Enlem 39°21'53.58 "N – Boylam: 31°30'8.3 "E. Rakım: 829m. Eskişehir: Sivrihisar Aşağıkepen Afyon Karayolu.
<i>F. laevis</i>	Enlem 39°15'25.16"N – Boylam: 31°30'44.91"E. Rakım: 829m. Eskişehir: Sivrihisar Yeşilköy.
<i>F. paphlagonica</i>	Enlem: 39°17'30.07"N – Boylam: 31°29'5.52"E. Rakım: 829m. Eskişehir: Sivrihisar Yeşilköy.
<i>F. procumbens</i>	Enlem 39°47'45.72"K – Boylam: 31° 4'55.34"D. Rakım: 835m. Eskişehir: Alpu Bozan Yolu Sol Stepler.



Şekil 2.1. Eskişehir bölgesinden toplanan *Fumana* taksonuna ait lokaliteler (sarı: *F. thymifolia*; mavi: *F. procumbens*; yeşil: *F. paphlagonica*; pembe *F. laevis*; kırmızı: *F. aciphylla*)

### 2.1. Morfolojik yöntem

*Fumana* taksonlarında teşhis edilebilmesinde steril anterler, alternat yaprak konumları ve vejetatif organa doğru gelişen tüylenme anahtar özellikler olduğu için, dış morfolojik gözlemler sadece bu kısımlara bakılarak yapılmıştır. Örneklerin dış morfoloji çalışmaları kök, gövde, yaprak, çiçek, tohum organlarının boyutlarının belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Bitkilerin dış morfolojik çalışmalarında, Olympos CHK2-F-GS marka stereo mikroskop kullanılarak ölçümleri alınmıştır. Organların makro ölçümleri alınırken cetvel, kumpas gibi ölçüm aletlerinden yararlanılmıştır. Makro ölçümlerin fotoğraflanmasında Nikon D5100 fotoğraf makinası kullanılmıştır.

Bitkilerin iç morfolojik çalışmaları için belirlenen *Fumana* taksonlarının hepsinde kök, yaprak ve gövde kısımlarından enine kesit preparatlar hazırlanmıştır. *Fumana* taksonları için ortaya konulması istenen iç morfolojik görüntüleri elde etmek adına jiletle alınan kesitler, lügol ile boyanarak, Nikon eclipse 80i mikroskobu altında x20, x10, objektifler kullanılarak incelenmiş ve uygun görüntüler fotoğraflanmıştır.

İç morfolojik çalışmaların belirlenmesinde, Nikon eclipse 80i Mikroskobu kameram 21 renkli dijital mikroskopi programı ile birlikte yapılmıştır. Taksonların yaprak, kök ve gövdelerinden enine kesit alınarak, polenlerinden ise daimî preparatlar hazırlanmıştır.

### 2.2. Palinolojik yöntem

Steril laboratuvar ortamında titiz bir şekilde pens ile alınan *Fumana* polenleri, karşılaştırılmak üzere Erdtman (1960) ve Woodhouse (1959) preparat hazırlama teknikleri kullanılarak çok sayıda daimî preparat hazırlanmıştır [10, 11]. Hazırlanan preparatlar, Nikon eclipse 80i Mikroskobu kullanılarak fotoğrafları x100 objektif kullanılarak çekilmiş, ölçümleri yapılmıştır. Ölçüm yapılırken, farklı popülasyonlarda yer alan örnekler dikkate alınmıştır.

## 3. Bulgular

### 3.1. Morfolojik bulgular

#### 3.1.1. *Fumana procumbens* (Dun.) Gren. & Godr.

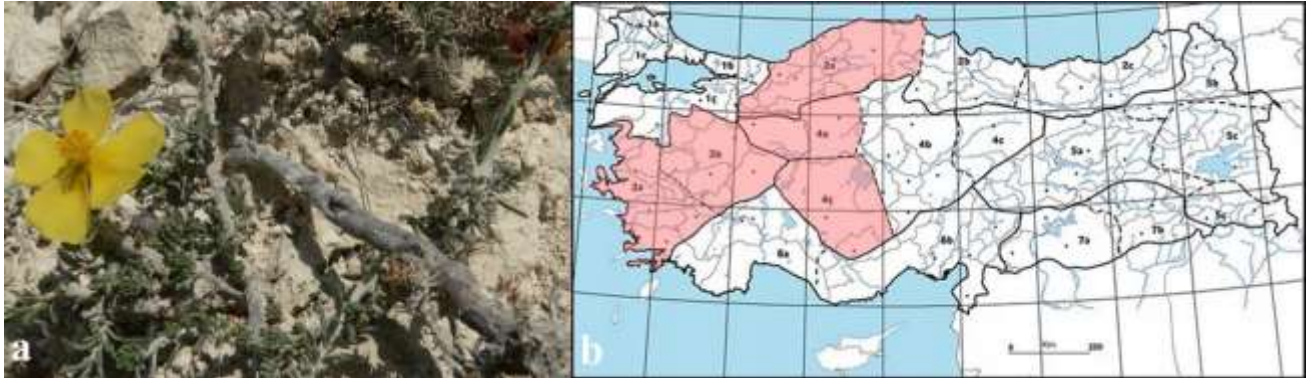
*Fumana procumbens*, bodur çalı formu bir bitkidir. Çiçek sapları tüylüdür ve gövde yaprakları stipul bulundurmeyen alternat konumlu doğrusal yapraklardır. Yapraklar çiçeğin altına doğru 2,54 cm de 10-16 yaprak olacak şekilde ve dal uçlarına doğru azalan içe kıvrık yapıya sahiptir. Çiçekler birbirinden uzak 10-20mm çapında çiçek sapı yapraklı saplardan daha uzundur ve tohum taslağı çiçek tabanında bulunur. Kapsüller 8-12 arası tohum bulundurur ve 5-6 mm uzunluktadır. Son olarak kapsül içinde tutulan tohumlar, kaliks ve çiçek sapı ile birlikte dökülür (Şekil 3.1a.). *F. procumbens* ülkemizde Adana, Bolu, İstanbul, Kastamonu, Ankara, Artvin, Burdur, Denizli, Kayseri, Konya, Kütahya, Trabzon, Kırıkkale illerinde yayılışı vardır (Şekil 3.1b.).



Şekil 3.1. *F. procumbens* a) arazi fotoğrafı, b) Türkiye haritasındaki dağılımı [12]

### 3.1.2. *Fumana paphlagonica* Bornm. & Janchen.

Sadece çalı formunda, bodur, kaliks yoğun bir şekilde tüylüdür. Yapraklar stipul bulundurmeyen, alternat dizilişte ve doğrusal yapıdadır. Yapraklar çiçeğin altına doğru 2,54 cm de yaklaşık 9 ila 11 yaprak olacak mesafede çiçeğe yaklaştıkça azalacak şekilde sıralı. Çiçekler seyrek, yanal ve tek çiçekli ya da yapraklı terminal çiçek grubu oluşturacak şekilde çiçeklenme vardır. 3 kapsül bulundurur, kapsül başına 6-8 tohum bulundurur ve kapsüllerin ağzı açıktır (Şekil 3.2a.). *F. paphlagonica* ülkemizde Çankırı, Karabük, Kastamonu, Afyonkarahisar, Ankara, Denizli, Eskişehir, Konya illerinde yayılışı vardır (Şekil 3.2b.).



Şekil 3.2. *F. paphlagonica* a) arazi fotoğrafı, b) Türkiye haritasındaki dağılımı [12].

### 3.1.3. *Fumana thymifolia* (L.) Verlot.

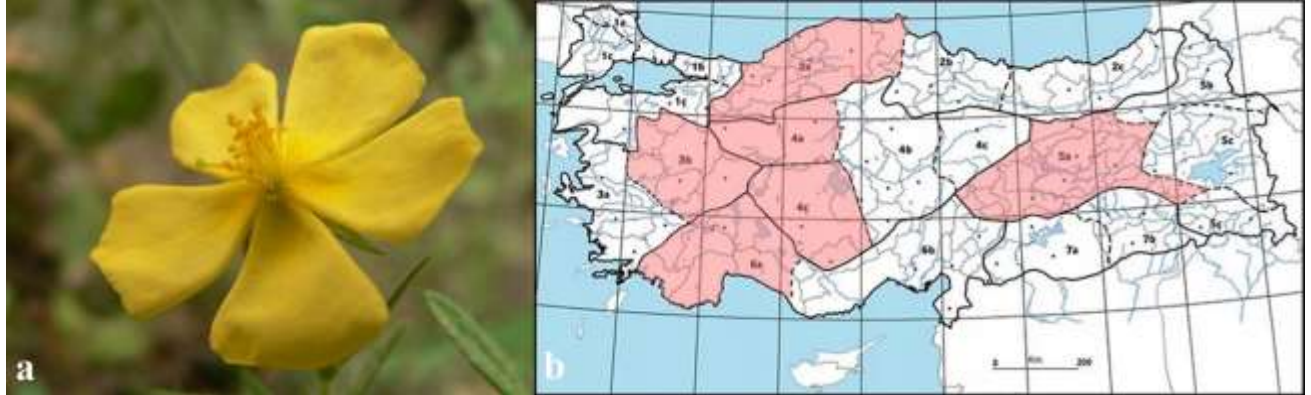
Dik dalları olan 15-20cm boya kadar yükselen çalı formundadır. Yapraklar stipul bulundurur ve alternat pozisyonundadır. Ancak aşağıya doğru opposit pozisyonda yer alır. Doğrusal ve oblong yapıda olan yaprakların kenarları, genelde bariz bir şekilde kıvrıktır. Yapraklar, çiçeğe yaklaştıkça küçülür. Çiçekler, uzun çiçek saplarında 3-8 adet bulunur. Çiçek 3 kapsül bulundurur ve her kapsülde 4-6 tohum bulunur. Kapsül açıldıktan sonra tohum kapsülde kalır (Şekil 3.3a.). *F. Thymifolia*'nın ülkemizde Karabük, Antalya, Bilecik, Çanakkale, Hatay, İzmir, Kocaeli, Sakarya illerinde yayılışı vardır (Şekil 3.3b.).



Şekil 3.3. *F. thymifolia* a) arazi fotoğrafı, b) Türkiye haritasındaki dağılımı [12].

### 3.1.4. *Fumana aciphylla* Boiss.

Odunsu gövdeye sahip, 30cm kadar uzayabilen, çok yıllık çiçek sapsız, dik ve esnek yapıdadır. Yaprakları stipul bulundurmeyen alternat konumlu, doğrusal sivri yapıdadır. Yaprakların kenarları tüylü tipte ve yukarıdaki yapraklarda daha az belirgin. Üst kısımda kalan yapraklar daha küçük brakt yapraklara kadar yaklaştıkça küçülür. Çiçeklenme, kök üzerinden uzanan bir dal üzerinde 3-5 çiçek şeklinde oluşur. Her kapsülde 3 tohum bulunur. Tohumlar küt ve döllemeden sonra çiçek dökülene kadar olgunlaşmaya devam eden, fazla gelişmiş tohumlardır. Tohumların yüzeylerinde yoğun olarak çukursu yapılar görülür. Sepaller zarımsıdır (Şekil 3.4a.). *F. aciphylla* ülkemizde Çankırı, Ankara, Burdur, Erzincan, Eskişehir, Konya, Kütahya, Malatya, Kahramanmaraş, Muğla illerinde yayılışı vardır (Şekil 3.4b.).



Şekil 3.4. *F. aciphylla* a) arazi fotoğrafı, b) Türkiye haritasındaki dağılımı [12]

### 3.1.5. *Fumana laevis* (Cav.) Pau.

Çok yıllık odunsu gövdeye sahip çalı formundadır. Gövdeden uzanan dalların boyutu 25- 30 cm kadar ve tüysüzdür. Yapraklar, 8-12 mm boyunda, 0,5-1mm eninde, doğrusal, sivri ve sap bulundurmeyen, içe hafifçe kıvrık yapıda tüysüzdür. Ancak yaprak kenarlarında seyrek tüyler mevcuttur. Yapraklar, çiçek sapında opposit dizilişte ve 2.54cm de 6-8 yaprak olacak mesafede çiçeğe yakın yapraklarda stipul yok ve çiçeğe yaklaştıkça, yapraklar daha seyrek olur. Köke yaklaştıkça yapraklar daha sıklaşır, alternat konuma gelir, yaprak boyları kısalmış ve stipul oluşur. Çiçeklenme merkezi bir daldan çıkan paralel çiçek sapsız üzerinde, 4-6 çiçek olacak şekilde, 5 adet sarı petal yaprak bulundurur. Kapsül, 4-5mm uzunluğunda kaliks çiçek sapının uç kısmında ve çiçek ile birlikte dökülür. Tohumlar kahverengidir ve her kapsülde yaklaşık 6 tohum bulunur (Şekil 3.5a.). *F. laevis* ülkemizde Çankırı, Bursa, Ankara, Burdur, Erzincan, Eskişehir, Konya, Kütahya, Malatya, Kahramanmaraş, Muğla illerinde yayılışı vardır (Şekil 3.5b.).



Şekil 3.5. *F. laevis* a) arazi fotoğrafı, b) Türkiye haritasındaki dağılımı [12]

## 3.2. Anatomik bulgular

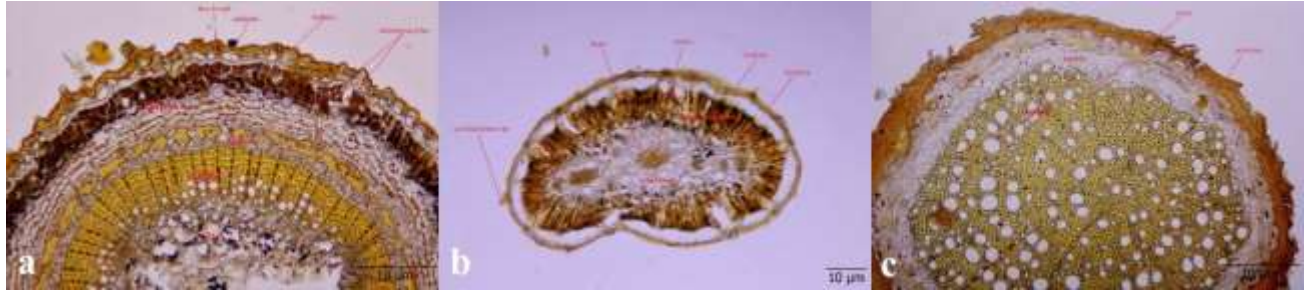
### 3.2.1. *Fumana procumbens* (Dun.) Gren. & Godr.

Gövde, dış kısımda tek sıralı 15.95x18.15 µm boyutlarında genel olarak oval şekle sahip, epiderm hücrelerinden meydana gelmektedir ve üzeri kutikula tabakası ile örtülmüştür. Endoderm 14.19x8.74 µm boyutundaki yoğun kloroplast içeren hücrelerden meydana gelmektedir. Korteks, enine yassılaştırmış hücrelerden meydana gelmektedir ve boyutları 8.57x20.03 µm dir. Sklerenkima lifleri korteks ve floem arasına gömülü 5.79x9.28 µm boyutlarındaki sklerenkima hücrelerinden meydana gelmektedir. Floem hücreleri 3.51x3.86 µm boyutlarında ve daha küçük hücrelerdir. Floem ile birlikte gövdeyi çepeçevre saran vasküler kambiyum hücreleri, en küçük boyuta sahip hücrelerdir. Kambiyum tabakasından hemen sonra 6.29x7.82 µm boyutlarındaki ksilem hücrelerinin meydana getirdiği

tabaka bulunur. Öz bölgesinin tamamı  $16.52 \times 18.57 \mu\text{m}$  boyutlarındaki parankimatik hücrelerden meydana gelmektedir (Şekil 3.6a.).

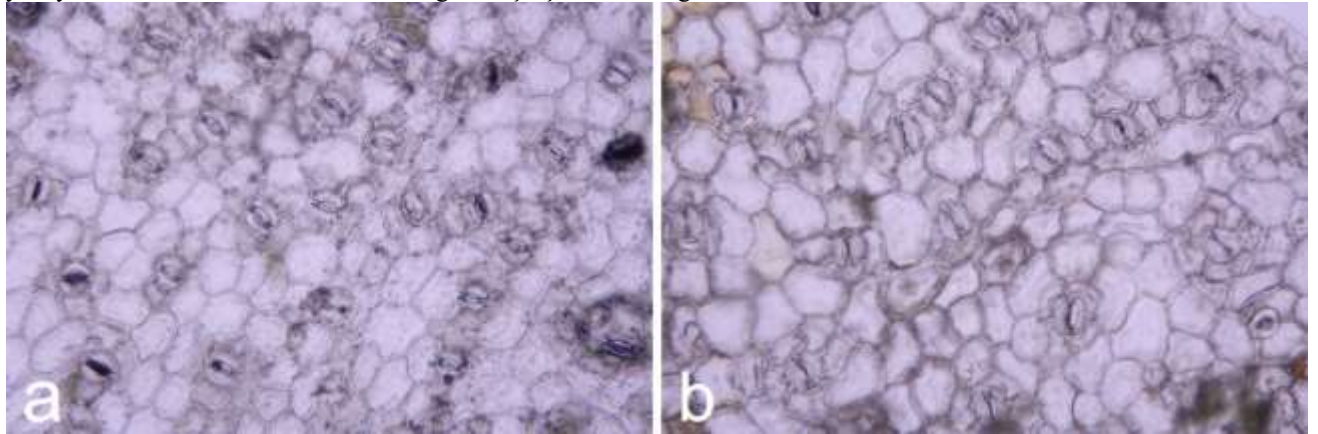
Yaprak en dışta üzerinde kutikula bulunduran, tek sıralı, içerisine stoma hücreleri gömülü epidermis tabakasından meydana gelmektedir. Epidermis hücreleri  $12.24 \times 13.34 \mu\text{m}$  boyutlarındadır. Hemen altında bol miktarda kloroplast içeren  $12.47 \times 6.12 \mu\text{m}$  boyutlarındaki silindirik yapılı hücrelerden meydana gelen palizat parankiması yer almaktadır. Stoma hücrelerinin altında denk gelen kısımdaki parankima hücreleri, daha içe doğru boşluklar oluşturmaktadır. Daha iç kısımda yaprağın alt yüzeyine doğru yoğunlaşan kloroplast içeren  $7.60 \times 8.30 \mu\text{m}$  boylarındaki sünger parankiması hücreleri vardır. Parankima hücreleri  $8.17 \times 11.85 \mu\text{m}$  boyutlarında, içersinde ksilem ve floem hücrelerini barındırmaktadır. Ksilem hücreleri  $2.44 \times 2.33 \mu\text{m}$  boyutlarında yaprağın üst yüzeyine dönük gelecek konumda, Floem hücreleri ise  $1.99 \times 2.18 \mu\text{m}$  boyutlarında ve yaprağın alt yüzeyine dönük konumda yer almaktadır (Şekil 3.6b.).

Kök, en dışta tamamen yassılaştırmış  $5.88 \times 15.74 \mu\text{m}$  boyutlarındaki periderma hücrelerinden meydana gelmektedir. Periderma'nın hemen altında korteks hücreleri bulunur. Bu hücreler  $7.31 \times 9.25 \mu\text{m}$  boyutlara sahip yassılaştırmış oval hücrelerdir. Sklerenkima lifleri, korteks tabakasına gömülü haldeki sklerenkima hücrelerinden meydana gelmektedir. Bu hücreler seyrek bir tabaka halinde bulunur ve boyutları  $6.61 \times 9.40 \mu\text{m}$  dir. Floem tabakası, vasküler kambiyum tabakasının hemen üstünde ve kökü çepeçevre sarmaktadır.  $4.81 \times 5.10 \mu\text{m}$  boyutlarında olan floem hücreleri, vasküler kambiyum hücrelerinden biraz daha büyük olması ile kolaylıkla ayırt edilir. Vasküler kambiyum hücreleri, ksileme yapışık halde ince bir tabaka halinde, hücreyi çepeçevre sarmaktadır. Vasküler kambiyum tabakasından sonra çok sayıda hücreden meydana gelen ve öz bölgesini tamamen kaplayan ksilem hücreleri gelmektedir, ksilem hücreleri  $9.10 \times 6.32 \mu\text{m}$  boyutlarındadır (Şekil 3.6c.).



Şekil 3.6. *F. procumbens* a) gövde enine kesit, b) yaprak enine kesit, c) kök enine kesit.

*F. procumbens* yaprak alt ve üst yüzeylerinden alınan kesitler sonucunda, yaprağın iki yüzeyinde de stoma bulunmasından dolayı, yapraklarda amfistomatik yaprak özelliği görülmektedir. Stomalar anomositik tiptedir. Yaprak yüzeyinden alınan kesitlerde stomaların görünüşü Şekil 3.7'da görülmektedir.



Şekil 3.7. *F. procumbens* yaprak alt ve üst yüzey kesitlerinde stomaların görünüşü (a: üst yüzey, b: alt yüzey).

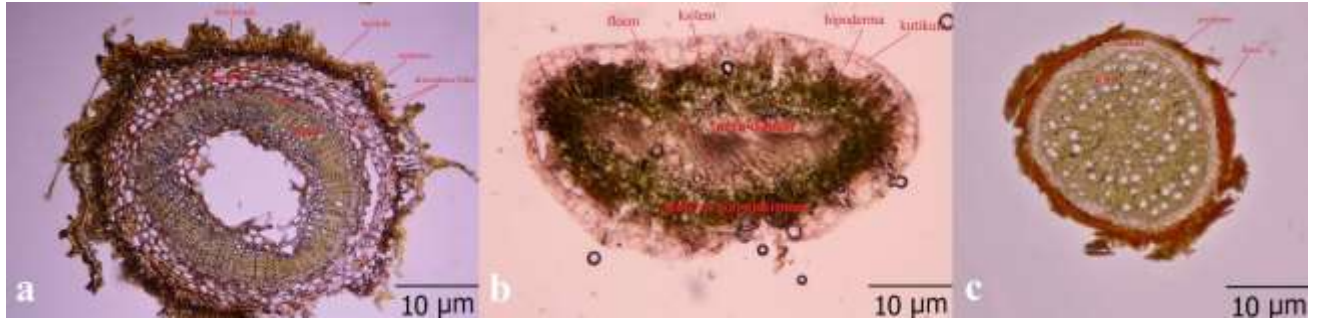
### 3.2.2. *Fumana paphlagonica* Bornm. & Janchen.

Gövde, dış kısımda tek sıralı  $7.59 \times 10.42 \mu\text{m}$  boyutlarında genel olarak yassılaştırmış epidermis hücrelerinden meydana gelmektedir ve üzeri kutikula tabakası ile örtülmüştür. Endoderm,  $4.67 \times 8.41 \mu\text{m}$  boyutlarındaki bol miktarda kloroplast içeren yine yassılaştırmış hücrelerden meydana gelmektedir. Korteks, yer yer kloroplast görülen yine yassılaştırmış hücrelerden meydana gelmektedir ve boyutları  $5.77 \times 6.21 \mu\text{m}$  dir. Korteks ve floem arasına gömülü halde,  $2.31 \times 3.69 \mu\text{m}$  boyutlarında hücrelerden oluşan sklerenkima lifleri bulunmaktadır. Floem hücreleri  $2.00 \times 2.24 \mu\text{m}$  boyutlarında daha küçük hücrelerden meydana gelmektedir. Floem ile birlikte gövdeyi çepeçevre saran vasküler kambiyum hücreleri en küçük yapılı hücrelerdir. Kambiyum tabakasından hemen sonra  $3.23 \times 3.64 \mu\text{m}$  boyutlardaki

ksilem hücrelerinin meydana getirdiği tabaka bulunur. Öz bölgesi ise  $5.06 \times 10.06 \mu\text{m}$  boyutlarındaki yassılaştırılmış ve ksilem dokusuna yapışmış haldeki parankimatik hücrelerden meydana gelmektedir (Şekil 3.8a.).

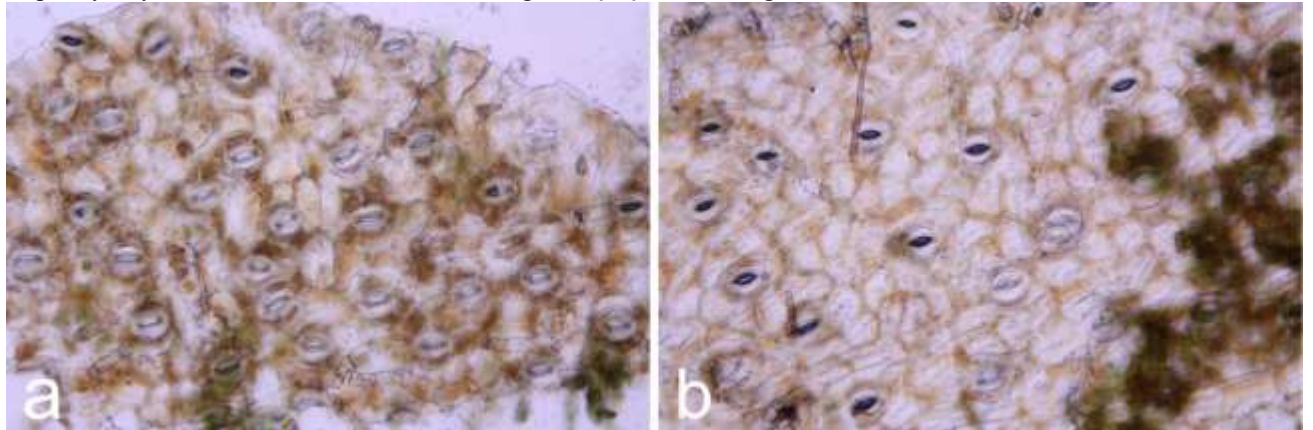
Yaprak, en dışta üzerinde kutikula bulunduran tek sıralı, içerisine stoma hücreleri gömülü, epidermis tabakasından meydana gelmektedir. Epidermis hücreleri  $6.02 \times 5.82 \mu\text{m}$  boyutlarındadır. Hemen altında bol miktarda kloroplast içeren ve dikey silindirik yapıya sahip  $5.31 \times 6.55 \mu\text{m}$  boyutlarındaki hücrelerden meydana gelen palizat parankiması yer almaktadır. Stoma hücrelerinin altında denk gelen kısımdaki parankima hücreleri, içe doğru boşluklar oluşturmaktadır. Daha iç kısımda yaprağın alt yüzeyine doğru yoğunlaşan ve kloroplast içeren  $3.89 \times 4.58 \mu\text{m}$  boylarındaki sünger parankiması hücreleri vardır. Parankima hücreleri  $5.04 \times 6.38 \mu\text{m}$  boyutlarında, içersinde ksilem ve floem hücrelerini barındırmaktadır. Ksilem hücreleri  $2.28 \times 2.74 \mu\text{m}$  boyutlarında yaprağın üst yüzeyine dönük gelecek konumda, Floem hücreleri ise  $1.56 \times 1.71 \mu\text{m}$  boyutlarında ve yaprağın alt yüzeyine dönük konumda yer almaktadır (Şekil 3.8b.).

Kök, en dışta tamamen yassılaştırılmış olan  $2.08 \times 4.96 \mu\text{m}$  boyutlarındaki hücrelerden oluşan periderma tabakası bulunur. Periderma, hemen altında korteks hücreleri bulunur. Bu hücreler  $2.74 \times 3.55 \mu\text{m}$  boyutlara sahip, yassılaştırılmış hücrelerden meydana gelmektedir. Sklerenkima lifleri, korteks tabakasına gömülü halde seyrek bir tabaka halinde bulunur ve boyutları  $2.96 \times 2.80 \mu\text{m}$  dir. Floem tabakası vasküler kambiyum tabakasının hemen üstünde ve kökü çepeçevre sarmaktadır.  $1.48 \times 1.90 \mu\text{m}$  boyutlarında olan floem hücreleri vasküler kambiyum hücrelerinden biraz daha büyük olması ile kolaylıkla ayırt edilir. Vasküler kambiyum hücreleri, ksileme yapışık halde ince bir tabaka olarak, hücreyi çepeçevre sarmaktadır. Vasküler kambiyum tabakasından sonra çok sayıda hücreden meydana gelen ve öz bölgesini tamamen kaplayan  $2.47 \times 2.56 \mu\text{m}$  boyutlarındaki ksilem hücreleri gelmektedir (Şekil 3.8c.).



Şekil 3.8. *F. paphlagonica* a) gövde enine kesit, b) yaprak enine kesit, c) kök enine kesit.

*F. paphlagonica*, yaprak alt ve üst yüzeylerinden alınan kesitler sonucunda, yaprağın iki yüzeyinde de stoma bulunmasından dolayı yapraklarda amfistomatik yaprak özelliği görülmektedir. Stomalar anomositik tiptedir. Yaprak yüzeyinden alınan kesitlerde stomaların görünüşü Şekil 3.9'de görülmektedir.



Şekil 3.9. *F. paphlagonica* yaprak alt ve üst yüzey kesitlerinde stomaların görünüşü (a: üst yüzey, b: alt yüzey).

### 3.2.3. *Fumana thymifolia* (L.) Verlot.

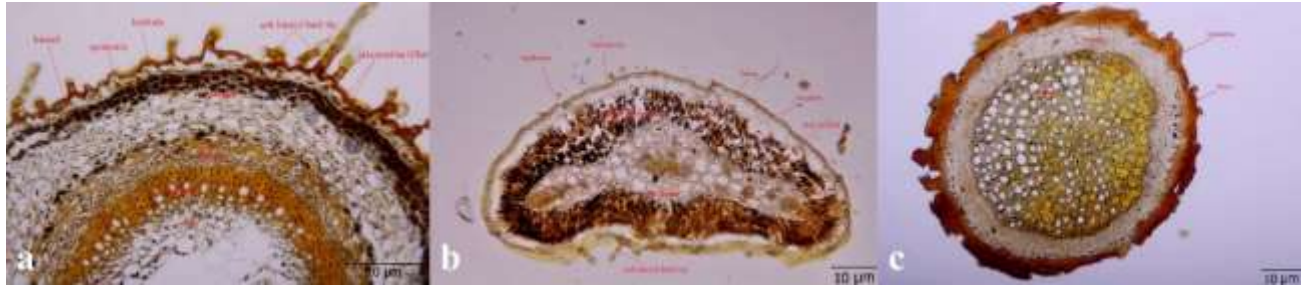
Gövde, dış kısımda tek sıralı  $13.67 \times 15.35 \mu\text{m}$  boyutlarında genel şekilleri oval epidermis hücrelerinden meydana gelmektedir ve üzeri kutikula yapısı ile örtülmüştür. Farklılaşan epidermis hücreleri gövde yüzeyindeki tüyleri oluşturmaktadır. Tüyler  $43.47 \times 12.80 \mu\text{m}$  boyutlarında ve tüm gövde boyunca sık aralıklarla görülür. Endoderm,  $7.88 \times 9.91 \mu\text{m}$  boyutlarındaki bol miktarda kloroplast içeren hücrelerden meydana gelmektedir. Korteks, düzgün oval biçimli az miktarda kloroplast içeren  $10.07 \times 15.68 \mu\text{m}$  boyutlarındaki hücrelerden meydana gelmektedir. Korteks ve floem arasına gömülü halde bulunan sklerenkima lifleri  $6.84 \times 7.75 \mu\text{m}$  boyutlarındaki hücrelerden meydana gelmektedir. Floem hücreleri  $4.85 \times 7.90 \mu\text{m}$  boyutlarında daha küçük hücrelerden meydana gelmektedir. Gövdeyi çepeçevre saran vasküler kambiyum hücreleri en küçük hücrelerdir. Vasküler kambiyum tabakasından hemen sonra



8.07x9.25 µm boyutlardaki ksilem hücrelerinin meydana getirdiği tabaka bulunur. Öz bölgesi ise 13.55x13.21 µm boyutlarındaki parankimatik hücrelerden meydana gelmektedir (Şekil 3.10a.).

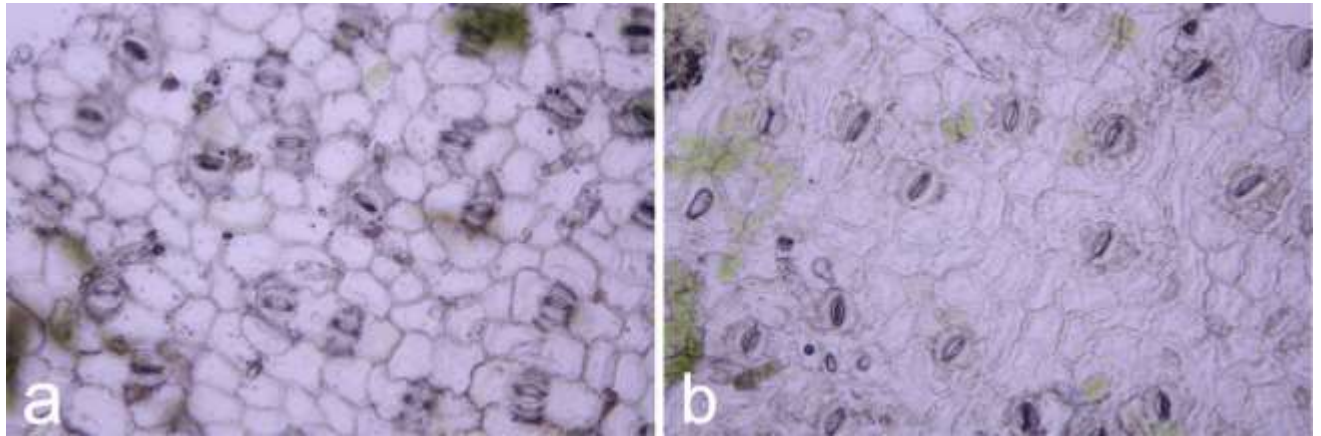
Yaprak, en dışta üzerinde kutikula bulunduran tek sıralı içerisine stoma hücreleri gömülü halde bulunan epidermis tabakasından meydana gelmektedir. Epidermis hücreleri 12.60x12.20 µm boyutlarındadır ve bu hücrelerin farklılaşması ile oluşan tüylerin boyutları 30.09x11.49 µm dir. Epidermisin hemen altında 12.57x4.80 µm boyutlarındaki bol miktarda kloroplast içeren ve silindirik yapılı hücrelerden meydana gelen palizat parankimasi yer almaktadır. Daha iç kısımda yaprağın alt yüzeyine doğru yoğunlaşan ve kloroplast içeren 6.91x6.17 µm boyutlarındaki sünger parankimasi hücreleri vardır. Parankima hücreleri 12.50x12.39 µm boyutlarında içerisinde ksilem ve floem hücrelerini barındırmaktadır. Ksilem hücreleri 3.05x2.67 µm boyutlarında yaprağın üst yüzeyine dönük gelecek konumda, Floem hücreleri ise 2.01x2.48 µm boyutlarında ve yaprağın alt yüzeyine dönük konumda yer almaktadır (Şekil 3.10b.).

Kök en dışta tamamen yassılaştırmış olan, 2.91x8.07 µm boyutlarındaki hücrelerden oluşan periderma tabakası bulunur. Periderma hemen altında korteks hücreleri bulunur. Bu hücreler 5.88x8.69 µm boyutlara sahip yassılaştırmış hücrelerden meydana gelmektedir. Sklerenkima, lifleri korteks tabakasına gömülü halde seyrek bir tabaka halinde bulunur ve boyutları 3.35x3.88 µm dir. Floem tabakası, vasküler kambiyum tabakasının hemen üstünde ve kökü çepeçevre sarmaktadır 2.25x3.73 µm boyutlarında olan floem hücreleri vasküler kambiyum hücrelerinden biraz daha büyük olması ile kolaylıkla ayırt edilir ve ksileme yapışık halde ince bir tabaka olarak kökü, çepeçevre sarmaktadır. Vasküler kambiyum tabakasından sonra çok sayıda hücreden meydana gelen ve öz bölgesini tamamen kaplayan 3.98x4.90 µm boyutlarındaki ksilem hücreleri gelmektedir (Şekil 3.10c.).



Şekil 3.10. *F. thymifolia* a) gövde enine kesit, b) yaprak enine kesit, c) kök enine kesit.

*F. thymifolia*, yaprak alt ve üst yüzeylerinden alınan kesitler sonucunda yaprağın iki yüzeyinde de stoma bulunmasından dolayı, yapraklarda amfistomatik yaprak özelliği görülmektedir. Stomalar, anomositik tiptedir. Yaprak yüzeyinden alınan kesitlerde stomaların görünüşü Şekil 3.11’de görülmektedir.



Şekil 3.11. *F. thymifolia* yaprak alt ve üst yüzey kesitlerinde stomaların görünüşü (a: üst yüzey, b: alt yüzey).

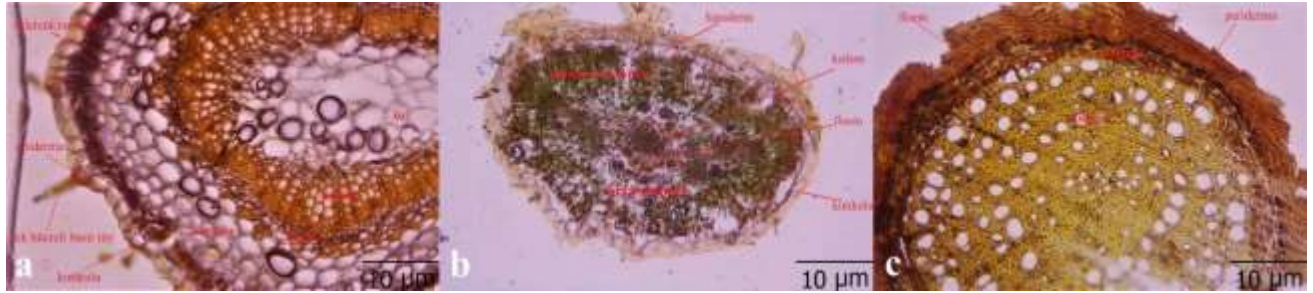
#### 3.2.4. *Fumana aciphylla* Boiss.

Gövde dış kısmında tek sıralı 11.64x11.84 µm boyutlarında genel olarak yassılaştırmış epidermis hücrelerinden meydana gelmektedir ve üzeri kutikula tabakası ile örtülüdür. Farklılaşan epidermis hücreleri gövde yüzeyindeki tüyleri oluşturmaktadır. Tüyler 19.15x6.43 µm boyutlarında ve tüm gövde boyunca seyrek aralıklarla görülür. Endoderm 7.24x6.51 µm boyutlarındaki kloroplast içeren hücrelerden meydana gelmektedir. Korteks genişlemiş 10.95x14.76 µm boyutundaki oval yapılı hücrelerden oluşmaktadır. Korteks ve floem arasında gömülü halde bulunan sklerenkima lifleri 4.04x5.82 µm boyutlarındaki hücrelerden meydana gelmektedir. Floem hücreleri 4.02x3.42 µm boyutlarında daha küçük hücrelerden meydana gelmektedir. Gövdeyi çepeçevre saran vasküler kambiyum hücreleri en küçük hücrelerdir. Kambiyum tabakasından hemen sonra 6.53x5.34 µm boyutlardaki ksilem

hücrelerinin meydana getirdiği tabaka bulunur. Öz bölgesi ise 13.03x15.14 µm boyutlarındaki parankimatik hücrelerden meydana gelmektedir (Şekil 3.12a.).

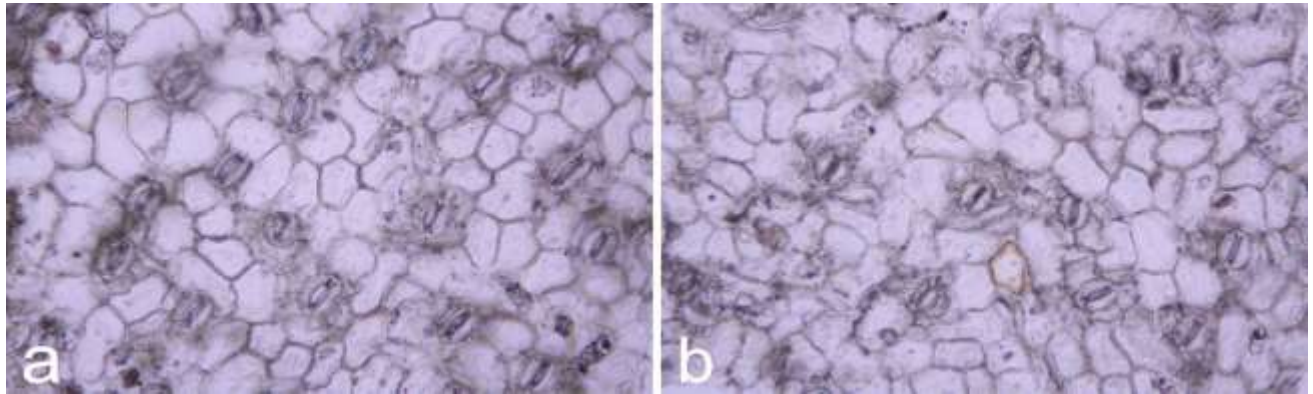
Yaprak en dışta üzerinde kutikula bulunduran tek sıralı içerisine stoma hücreleri gömülü epidermis tabakasından meydana gelmektedir epidermis hücreleri 8.20x10.52 µm boyutlarındadır. Hemen altında bol miktarda kloroplast içeren ve dikey silindirik yapıya sahip 10.54x4.46 µm boyutlarındaki hücrelerden meydana gelen palizat parankiması yer almaktadır. Stoma hücrelerinin altında denk gelen kısımdaki parankima hücreleri içe doğru boşluklar oluşturmaktadır. Daha iç kısımda yaprağın alt yüzeyine doğru yoğunlaşan ve kloroplast içeren 4.70x4.42 µm boylarındaki sünger parankiması hücreleri vardır. Parankima hücreleri 4.60x4.46 µm boyutlarında içersinde ksilem ve floem hücrelerini barındırmaktadır. Ksilem hücreleri 2.01x2.38 µm boyutlarında yaprağın üst yüzeyine dönük gelecek konumda, Floem hücreleri ise 1.81x1.99 µm boyutlarında ve yaprağın alt yüzeyine dönük konumda yer almaktadır (Şekil 3.12b.).

Kök en dışta tamamen yassılaştırmış olan 2.89x9.77 µm boyutlarındaki hücrelerden oluşan periderma tabakası bulunur. Periderma hemen altında korteks hücreleri bulunur bu hücreler 2.64x6.07 µm boyutlara sahip yassılaştırmış hücrelerden meydana gelmektedir. Sklerenkima lifleri korteks tabakasına gömülü halde seyrek bir tabaka halinde bulunur ve boyutları 2.93x3.93 µm dir. Floem tabakası vasküler kambiyum tabakasının hemen üstünde ve kökü çepeçevre sarmaktadır 2.36x2.86 µm boyutlarında olan floem hücreleri vasküler kambiyum hücrelerinden biraz daha büyük olması ile kolaylıkla ayırt edilir. Vasküler kambiyum hücreleri ksileme yapışık halde ince bir tabaka olarak kökü çepeçevre sarmaktadır. Vasküler kambiyum tabakasından sonra çok sayıda hücreden meydana gelen ve öz bölgesini tamamen kaplayan 8.62x8.71 µm boyutlarındaki ksilem hücreleri gelmektedir (Şekil 3.12c.).



Şekil 3.12. *F. aciphylla* a) gövde enine kesit, b) yaprak enine kesit, c) kök enine kesit

*F. aciphylla* yaprak alt ve üst yüzeylerinden alınan kesitler sonucunda yaprağın iki yüzeyinde de stoma bulunmasından dolayı yapraklarda amfistomatik yaprak özelliği görülmektedir. Stomalar anomositik tiptedir. Yaprak yüzeyinden alınan kesitlerde stomaların görünüşü Şekil 3.13'de görülmektedir.



Şekil 3.13. *F. aciphylla* yaprak alt ve üst yüzey kesitlerinde stomaların görünüşü (a: üst yüzey, b: alt yüzey)

### 3.2.5. *Fumana laevis* (Cav.) Pau.

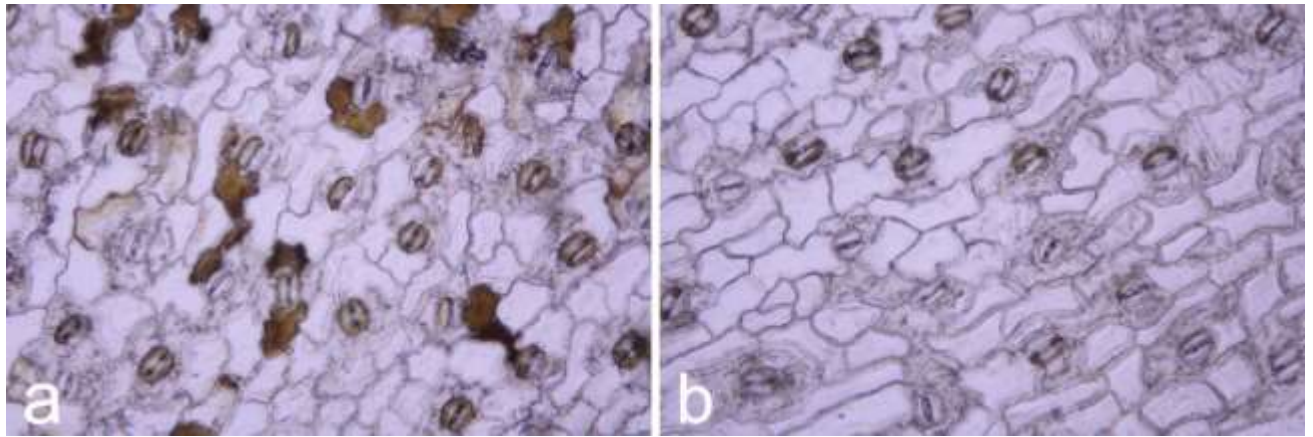
Gövde dış kısmında tek sıralı 14.60x15.33 µm boyutlarında genel olarak oval şekle sahip epiderm hücrelerinden meydana gelmektedir ve üzeri kutikula tabakası ile örtülüdür. Endoderm 10.28x9.02 µm boyutundaki yoğun kloroplast içeren hücrelerden meydana gelmektedir. Korteks 12.09x19.46 µm boyutundaki oval ve karemsi hücrelerden meydana gelmektedir. Sklerenkima lifleri korteks ve floem arasına gömülü 7.21x10.70 µm boyutlarındaki sklerenkima hücrelerinden meydana gelmektedir. Floem hücreleri 4.39x5.07 µm boyutlarında ve daha küçük hücrelerdir. Floem ile birlikte gövdeyi çepeçevre saran vasküler kambiyum hücreleri en küçük boyuta sahip hücrelerdir. Kambiyum tabakasından hemen sonra 8.94x8.27 µm boyutlardaki ksilem hücrelerinin meydana getirdiği tabaka bulunur. Öz bölgesinin tamamı 23.05x23.75 µm boyutlarındaki parankimatik hücrelerden meydana gelmektedir (Şekil 3.14a.).

Yaprak en dışta üzerinde kutikula bulunduran tek sıralı içerisine stoma hücreleri gömülü epidermis tabakasından meydana gelmektedir epidermis hücreleri 16.06x13.20 µm boyutlarındadır. Hemen altında bol miktarda kloroplast içeren ve dikey silindirik yapıya sahip 24.32x6.81 µm boyutlarındaki hücrelerden meydana gelen palizat parankiması yer almaktadır. Stoma hücrelerinin altında denk gelen kısımdaki parankima hücreleri içe doğru boşluklar oluşturmaktadır. Daha iç kısımda yaprağın alt yüzeyine doğru yoğunlaşan ve kloroplast içeren 7.90x9.20 µm boylarındaki sünger parankiması hücreleri vardır. Parankima hücreleri 5.17x7.59 µm boyutlarında içersinde ksilem ve floem hücrelerini barındırmaktadır. Ksilem hücreleri 2.37x2.55 µm boyutlarında yaprağın üst yüzeyine dönük gelecek konumda, Floem hücreleri ise 2.88x4.19 µm boyutlarında ve yaprağın alt yüzeyine dönük konumda yer almaktadır (Şekil 3.14b.).

Kök en dışta tamamen yassılaştırmış olan 1.42x4.80 µm boyutlarındaki hücrelerden oluşan periderma tabakası bulunur. Periderma hemen altında korteks hücreleri bulunur bu hücreler 2.13x2.75 µm boyutlara sahip yassılaştırmış hücrelerden meydana gelmektedir. Sklerenkima lifleri korteks tabakasına gömülü halde seyrek bir tabaka halinde bulunur ve boyutları 1.92x2.42 µm dir. Floem tabakası vasküler kambiyum tabakasının hemen üstünde ve kökü çepeçevre sarmaktadır 1.46x1.73 µm boyutlarında olan floem hücreleri vasküler kambiyum hücrelerinden biraz daha büyük olması ile kolaylıkla ayırt edilir. Vasküler kambiyum hücreleri ksileme yapışık halde ince bir tabaka olarak kökü, çepeçevre sarmaktadır. Vasküler kambiyum tabakasından sonra çok sayıda hücreden meydana gelen ve öz bölgesini tamamen kaplayan 3.39x2.41 µm boyutlarındaki ksilem hücreleri gelmektedir (Şekil 3.14c.). *F. laevis* yaprak alt ve üst yüzeylerinden alınan kesitler sonucunda yaprağın iki yüzeyinde de stoma bulunmasından dolayı yapraklarda amfistomatik yaprak özelliği görülmektedir. Stomalar anomositik tiptedir. Yaprak yüzeyinden alınan kesitlerde stomaların görünüşü Şekil 3.15'de görülmektedir



Şekil 3.14. *F. laevis* a) gövde enine kesit, b) yaprak enine kesit, c) kök enine kesit.



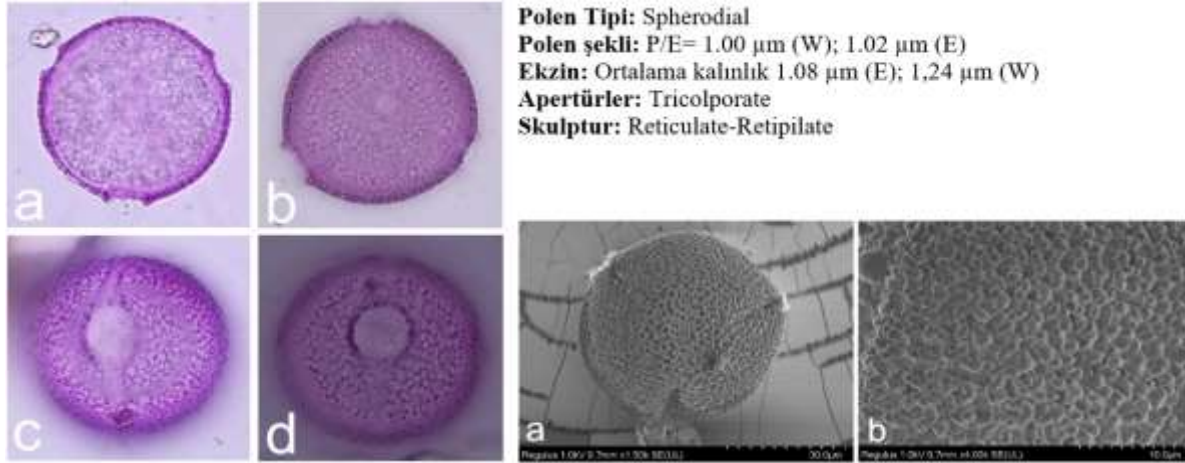
Şekil 3.15. *F. laevis* yaprak alt ve üst yüzey kesitlerinde stomaların görünüşü (a: üst yüzey, b: alt yüzey).

### 3.3. Palinolojik bulgular

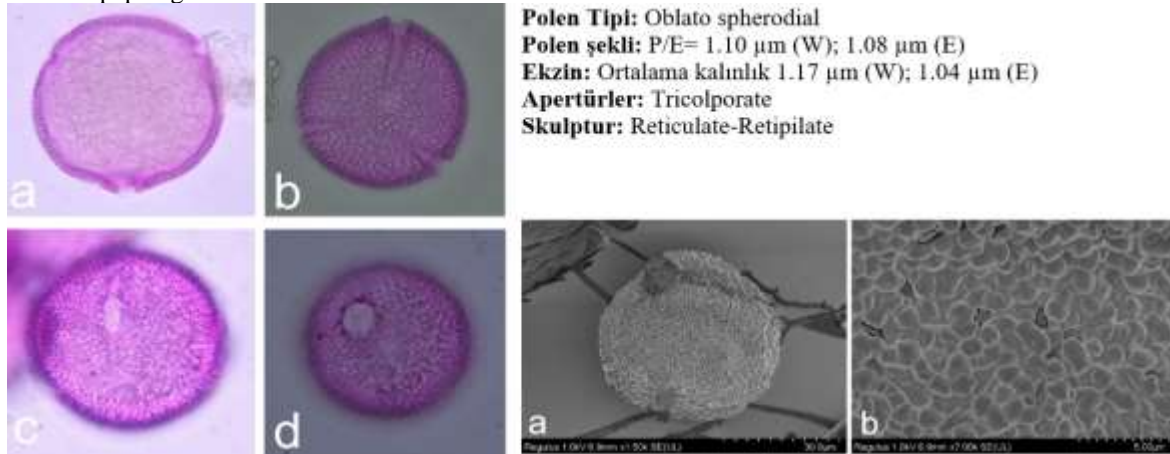
Işık ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) sonuçlarına göre, incelenen taksonların polenleri radyal simetrik ve tricolporate özellik göstermektedir. Polen boyutları en büyük *F. aciphylla* P (33,75w-33,05e), E (31,12w-31,60e), polen boyutları en küçük *F. laevis* P (27.82-26.92), E (25.33- 24.79e) olarak tespit edilmiştir.

Çalışmada ele alınan taksonların polenleri Tricolporate özellik göstermektedir. Colpus ekvatorda geniş kutuplara yaklaştıkça daralmaktadır. En uzun Colpus(24.98-25.13 µm) *F. procumbens* ve en geniş (5.10-5.30 µm) *F. laevis* ve en kısa (21.10-20.51 µm) *F. laevis*, en dar (3.19-3.06 µm) ile *F. paphlagonica* taksonunda Colpus uzunluğu tespit edilmiştir.

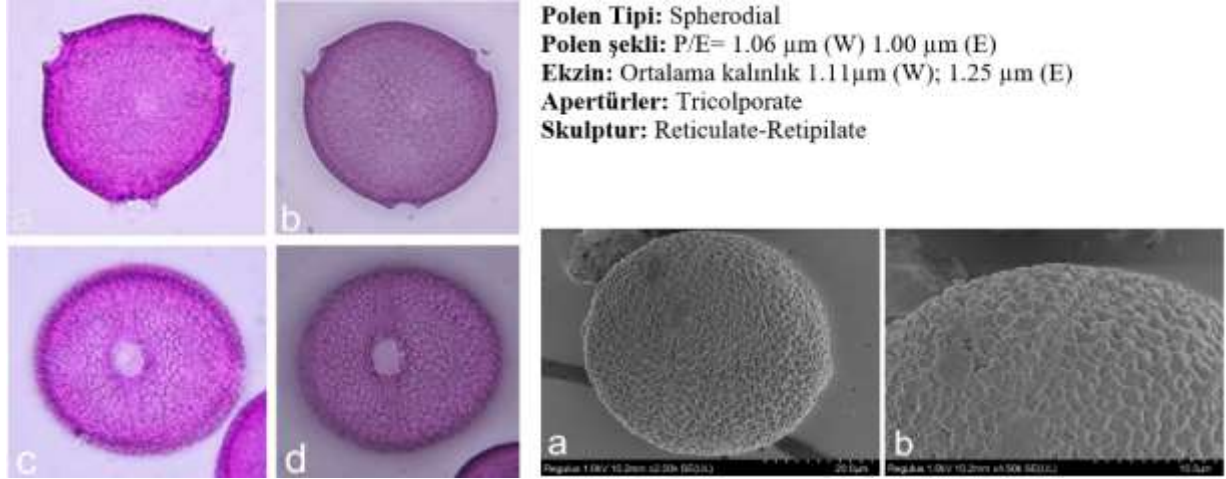
Por özelliğine göre bakıldığında en büyük por *F. thymifolia* taksonunda (4.70-4.50 µm), en küçük por *F. paphlagonica* taksonunda (2.08-1.99) olarak tespit edilmiştir.

3.3.1. *Fumana procumbens* (Dun.) Gren. & Godr.Şekil 3.16. *F. procumbens*, ışık mikroskobu polen fotoğrafları a) polar (W), b) polar (E), c) ekvatorial (W), d) ekvatorial görünüşleri (E); *F. procumbens* SEM’de ornamentasyonu a) ekvatorial, b) yakındanTablo 3.1. *F. procumbens* türüne ait polen ölçümleri

	Woodehouse Yöntemi		Erdtman Yöntemi	
	M	S	M	S
<b>P</b>	29.93 $\mu\text{m}$	$\pm 0.66 \mu\text{m}$	27.66 $\mu\text{m}$	$\pm 0.65 \mu\text{m}$
<b>E</b>	29.91 $\mu\text{m}$	$\pm 0.48 \mu\text{m}$	27.66 $\mu\text{m}$	$\pm 0.40 \mu\text{m}$
<b>P/E</b>	1,00 $\mu\text{m}$		1,00 $\mu\text{m}$	
<b>clg</b>	24.98 $\mu\text{m}$	$\pm 0.48 \mu\text{m}$	23.41 $\mu\text{m}$	$\pm 0.43 \mu\text{m}$
<b>clt</b>	4.00 $\mu\text{m}$	$\pm 0.33 \mu\text{m}$	3.06 $\mu\text{m}$	$\pm 0.23 \mu\text{m}$
<b>plg</b>	2.79 $\mu\text{m}$	$\pm 0.29 \mu\text{m}$	1.48 $\mu\text{m}$	$\pm 0.25 \mu\text{m}$
<b>plt</b>	3.12 $\mu\text{m}$	$\pm 0.33 \mu\text{m}$	1.99 $\mu\text{m}$	$\pm 0.20 \mu\text{m}$
<b>Ex</b>	1.08 $\mu\text{m}$	$\pm 0.12 \mu\text{m}$	1.17 $\mu\text{m}$	$\pm 0.23 \mu\text{m}$

3.3.2. *Fumana paphlagonica* Bornm. & JanchenŞekil 3.17. *F. paphlagonica*, ışık mikroskobu polen fotoğrafları a) polar (W), b) polar (E), c) ekvatorial (W), d) ekvatorial görünüşleri (E); *F. paphlagonica* SEM’de ornamentasyonu a) ekvatorial, b) yakından.Tablo 3.2. *F. paphlagonica* türüne ait polen ölçümleri

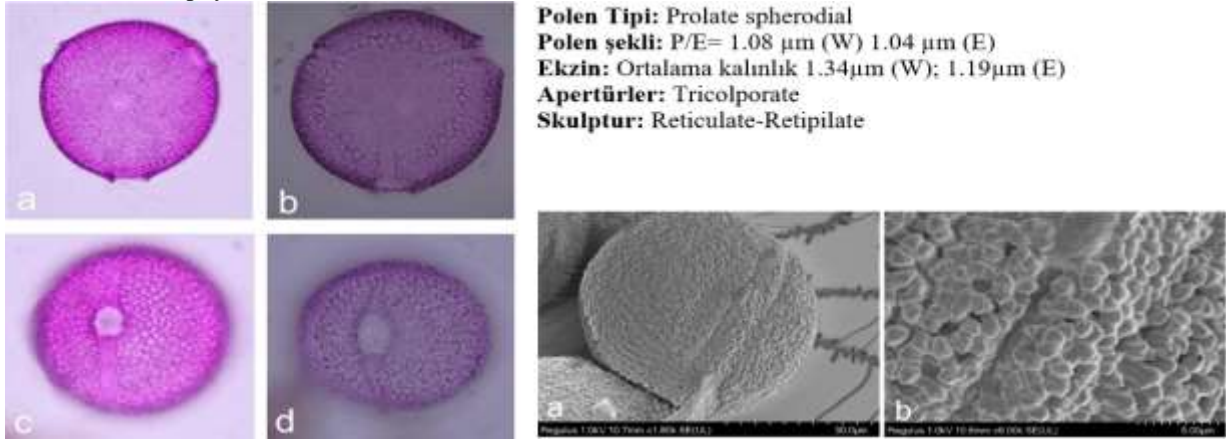
	Woodehouse Yöntemi		Erdtman Yöntemi	
	M	S	M	S
<b>P</b>	27.95 $\mu\text{m}$	$\pm 0.66 \mu\text{m}$	27.66 $\mu\text{m}$	$\pm 0.65 \mu\text{m}$
<b>E</b>	28.36 $\mu\text{m}$	$\pm 0.48 \mu\text{m}$	27.66 $\mu\text{m}$	$\pm 0.40 \mu\text{m}$
<b>P/E</b>	0.98 $\mu\text{m}$		1.00 $\mu\text{m}$	
<b>clg</b>	23.55 $\mu\text{m}$	$\pm 0.48 \mu\text{m}$	23.41 $\mu\text{m}$	$\pm 0.43 \mu\text{m}$
<b>clt</b>	3.19 $\mu\text{m}$	$\pm 0.33 \mu\text{m}$	3.06 $\mu\text{m}$	$\pm 0.23 \mu\text{m}$
<b>plg</b>	1.68 $\mu\text{m}$	$\pm 0.29 \mu\text{m}$	1.48 $\mu\text{m}$	$\pm 0.25 \mu\text{m}$
<b>plt</b>	2.08 $\mu\text{m}$	$\pm 0.33 \mu\text{m}$	1.99 $\mu\text{m}$	$\pm 0.20 \mu\text{m}$
<b>Ex</b>	1.04 $\mu\text{m}$	$\pm 0.12 \mu\text{m}$	1.17 $\mu\text{m}$	$\pm 0.23 \mu\text{m}$
<b>i</b>	1.03 $\mu\text{m}$	$\pm 0.11 \mu\text{m}$	-	-

3.3.3. *Fumana thymifolia* (L.) Verlot.

Şekil 3.18. *F. thymifolia*, ışık mikroskobu polen fotoğrafları a) polar (W), b) polar (E), c) ekvatorial (W), d) ekvatorial görünüşleri (E); *F. thymifolia* SEM'de ornamentasyonu a) ekvatorial, b) yakından

Tablo 3.3. *F. thymifolia* türüne ait polen ölçümleri

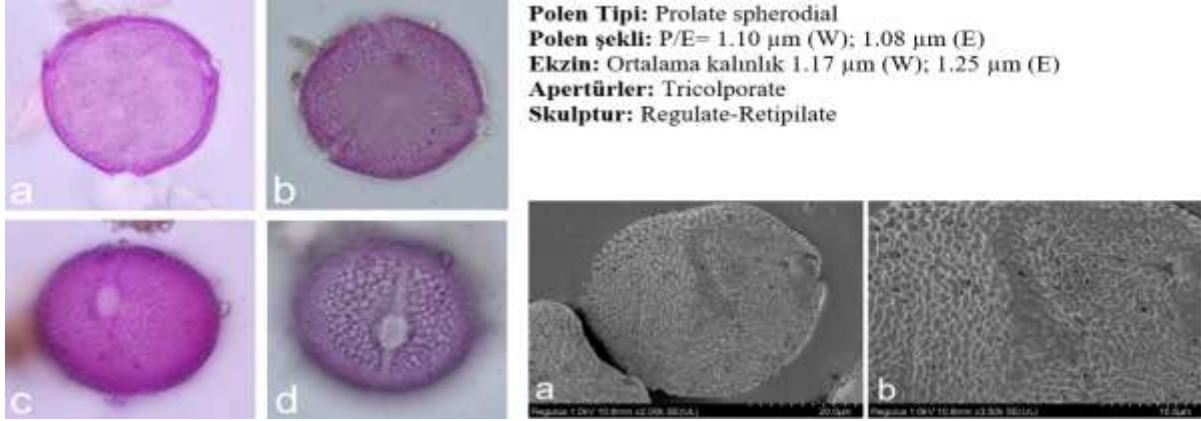
	Woodehouse Yöntemi		Erdtman Yöntemi	
	M	S	M	S
P	30.20 µm	± 1.67 µm	28.95 µm	± 0.71 µm
E	28.43 µm	± 1.23 µm	28.86 µm	± 0.77 µm
P/E	1.06 µm		1.00 µm	
clg	24.17 µm	± 1.33 µm	24.25 µm	± 0.83 µm
clt	5.11 µm	± 0.53 µm	4.54 µm	± 0.42 µm
plg	3.50 µm	± 0.34 µm	4.70 µm	± 0.61 µm
plt	4.70 µm	± 0.73 µm	4.50 µm	± 0.51 µm
Ex	1.11 µm	± 0.17 µm	1.25 µm	± 0.14 µm
i	1.15 µm	± 0.12 µm	-	-

3.3.4. *Fumana aciphylla* Boiss.

Şekil 3.19. *F. aciphylla*, ışık mikroskobu polen fotoğrafları a) polar (W), b) polar (E), c) ekvatorial (W), d) ekvatorial görünüşleri (E); *F. aciphylla* SEM'de ornamentasyonu a) ekvatorial, b) yakından

Tablo 3.4. *F. aciphylla* türüne ait polen ölçümleri

	Woodehouse Yöntemi		Erdtman Yöntemi	
	M	S	M	S
P	33.75 µm	± 0.87 µm	33.05 µm	± 0.46 µm
E	31.12 µm	± 0.54 µm	31.60 µm	± 0.63 µm
P/E	0.6 3µm		1.04 µm	
clg	22.89 µm	± 0.50 µm	23.51 µm	± 0.62 µm
clt	4.02 µm	± 0.56 µm	4.45 µm	± 0.37 µm
plg	2.78 µm	± 0.21 µm	3.10 µm	± 0.29 µm
plt	3.95 µm	± 0.49 µm	3.94 µm	± 0.44 µm
Ex	1.34 µm	± 0.30 µm	1.19 µm	± 0.26 µm
i	1.24 µm	± 0.20 µm	-	-

3.3.5. *Fumana laevis* (Cav.) Pau

Şekil 3.20. *F. laevis*, ışık mikroskobu polen fotoğrafları a) polar (W), b) polar (E), c) ekvatorial (W), d) ekvatorial görünüşleri (E); *F. laevis* SEM’de ornamentasyonu a) ekvatorial, b) yakından

Tablo 3.5. *F. laevis* türüne ait polen ölçümleri

	Woodehouse Yöntemi		Erdtman Yöntemi	
	M	S	M	S
<b>P</b>	27.82 µm	± 0.58 µm	26.92 µm	± 0.85 µm
<b>E</b>	25.33 µm	± 1.17 µm	24.79 µm	± 1.45 µm
<b>P/E</b>	1.10 µm		1.08 µm	
<b>clg</b>	21.01 µm	± 1.02 µm	20.51 µm	± 1.42 µm
<b>clt</b>	5.10 µm	± 0.50 µm	5.30 µm	± 0.51 µm
<b>plg</b>	3.14 µm	± 0.48 µm	3.06 µm	± 0.50 µm
<b>plt</b>	2.69 µm	± 0.57 µm	4.02 µm	± 0.50 µm
<b>Ex</b>	1.17 µm	± 0.14 µm	1.25 µm	± 0.15 µm
<b>i</b>	1.17 µm	± 0.17 µm	-	-

## 4. Sonuçlar ve tartışma

Türkiye bulunduğu konum, bünyesinde barındırdığı coğrafi şekiller ve farklı birçok etmenin de etkisi ile çeşitli makro-mikro iklim türlerine ev sahipliği yapmaktadır. Bu durum canlı çeşitliliğinde özellikle iklime bağımlı canlılar olan bitkilerin çeşitliliğinde önemli rol oynamaktadır.

Eskişehir ortalama 792 m yüksekliğe sahip yeryüzü şekillerinin büyük bir bölümü dağlar ve ovalardan meydana gelen bir bölgedir. Eskişehir etrafını çevreleyen coğrafi yapıların etkisi ve bölgedeki çeşitli iklimlerin bir araya gelmesi sonucunda karasal iklimin hâkim olduğu bir bölgede haline gelmektedir. Bitki örtüsünün büyük çoğunluğunu bozkır ve steplerin oluşturduğu Eskişehir yaklaşık olarak 1300 bitki türüne ev sahipliği yapmaktadır. Bu çeşitlenmede coğrafi yapıların ve iklimsel koşulların etkisi oldukça yüksektir.

Cistaceae familyası yoğun olarak sıcak iklim kuşaklarında yayılış gösteren bünyesinde 8 cins barındıran bir familyadır. Familyanın en belirgin morfolojik özelliği petal sanısının 5 ve yıldız şekilde konumlanmasıdır. Cistaceae üyeleri özellikle etnobotanik özellikleri kullanılan bir bitki olup halk arasında çeşitli taksonları bilinmektedir.

Genelde jipsti ve kumlu drenajı yüksek topraklarda ve özellikle sıcak-kurak iklimlerde yetişme eğilimi gösteren çok yıllık çalı formunda, odunsu nadiren otsu kısımlara sahip bir bitkidir. Yetiştigi toprak ve iklim göz önünde bulundurulduğunda kuraklık sıcaklık ve su streslerine karşı dayanıklı olduğu söylenebilir. *Fumana* cinsi Cistaceae familyasının bir üyesidir ve dünya üzerinde 21 takson ile temsil edilir. Bu 21 türün 10 tanesi Türkiye’de doğal yayılış göstermekte ve yayılış gösteren taksonların 3’ü ülkemize endemiktir [13].

Eskişehir coğrafi yapısı, jeolojik ve iklimsel özellikleri sonucunda bitki örtüsünün büyük bir kısmını bozkırlar oluşturmaktadır bu durum *Fumana* taksonları açısından elverişli bir bölge olmasını sağlamaktadır. Eskişehir ve çevresinde 1’i endemik olmak üzere toplamda 6 tür *Fumana* yetişmektedir. Bahar ve yaz ayları arasında devam eden vejetasyon boyunca Geniş açıklıklarda bozkırlarda ve kayalık bölgelerde bu 6 *Fumana* taksonlarına rastlamak mümkündür.

Yapılan morfolojik ve anatomik incelemeler sonucunda Eskişehir çevresinde yetişen *Fumana*lar hakkında yaprak, kök, gövde, stoma, tüy ve polen gibi kısımlar hakkında elde edilen veriler göstermektedir ki; anatomik ölçümler sonucunda yaprak kalınlığının en fazla olduğu tür *F. laevis* iken ne ince yaprak *F. aciphylla* da görülmektedir. Kök kalınlığı en fazla *F. procumbens* de görülürken en ince kök *F. laevis* türünde görülmektedir. Gövde kalınlığı en fazla *F. laevis* de görülürken en ince gövde *F. paphlagonica* türünde görülmektedir.

Habitat özellikleri ve diğer morfolojik özellikler açısından kıyaslandığında en belirgin farklılık aynı türe ait *Fumana* yetiştiği farklı bölgelerde cm başına düşen yaprak sayısının büyük oranda artış gösterdiği yönündedir gövde ve yaprak tüylerindeki azalma, yaprak eninde görülen artış, stoma sıklığı Eskişehir ve çevresindeki iklim ve ekolojik faktörlerin etkisinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

Palinolojik karakterler, Cistaceae'deki generik ve infragenerik sınırlandırma için taksonomik önemini göstermektedir [2, 14, 15].

Adriyatik havzasında bulunan *Fumana* taksonlarının taksonomisi ve kronolojisi hiçbir zaman sistematik olarak çalışılmamıştır. Adriyatik adları Hırvat kıyılarında Kapsamlı bir saha araştırması ve herbaryum örneklerinin gözden geçirilmesi sırasında, gözden kaçan ve yeterince bilinmeyen iki *Fumana* türüne ait farklı kayıtlar ortaya çıkmıştır.

Walker'a (1974) göre Tektattan (ağsı granüller, buruşuk, çizgili) semitektata (ağsı) uzanan olası bir filogenik polen dizisi bulunmaktadır. Buna rağmen, bitkilere ait genel morfolojiler buna paralel değildir, örneğin çok yıllık bitkilerde ağsı polen (daha gelişmiş) bulunurken, Tek yıllık bitkilerde ruguloz poleni görülür. Tek yıllık ruguloz polenine bulunan cins içinde incelenirken diğer türlerdeki polenler mikroretikulat eğilimi gösterir [16].

Mevcut sonuçlara göre polen boyutunun, şeklinin, açıklığının ve ekzin ornamentasyonunun değerli karakter olduğunu göstermiştir. Örneğin exine süsleme incelenen taksonlar arasında üç polen tipinin tanınmasında yararlı olmuştur. Mevcut sonuçlara göre Ukraintseva'nın (1993) bir bütün olarak Cistaceae ailesi için sonuçlara büyük ölçüde uymaktadır [2]. Mısır'daki *Fumana* taksonları iki tür ile temsil edilmektedir *F. thymifolia* (tip 1) ve *F. arabica* (alt tip 2B). Bu iki tür, ekzin ornamentasyonunun türüne göre ayırt edildi; İlk tür, retipilate ornamentasyonuna sahiptir, ancak ikincisi ağsı-düzdür. Ek olarak, mezokolpiyum çapı *F. arabica* (36-38 µm) ve *F. thymifolia* (28.0-31.5 µm) arasında ayırt edici bir karakter olarak kullanılabilir. *F. arabica*, suboblate tanelerinde sahip olmasıyla incelenen diğer taksonlardan farklıdır. Mevcut sonuçlara göre, *Fumana* cinsinin üyeleri heterojeniktir ve bu Rivas (1979) tarafından sunulan polen verileriyle uyumludur [14].

Ekzin ornamentasyonu, *Fumana*'nın taksonları arasında ayırım yapmak açısından taksonomik değer taşımaktadır. Colpus ve porus karakterleri de taksonları ayırt etmede yararlıdır. Bu çalışma ile iki tip polen yapısının varlığı ortaya konulmuştur. Bu durum taksonların ayırımında oldukça önem arz etmektedir.

Yapılan bu çalışma bize göstermektedir ki Eskişehir çevresinde doğal yayılış gösteren *Fumana* taksonu üyeleri yetiştiği iklim koşullarına yüksek adaptasyon sağlamıştır. Bu sebeple *Fumana*'nın yalnızca sistematik değil ilerleyen zamanlarda diğer çalışmalarında örnek çalışma materyali olabileceği düşünülmektedir.

## Teşekkür

Bu çalışma Mücahit Samet ŞAHİN'in Doç. Dr. Murat ARDIÇ danışmanlığında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Botanik Bilim Dalında 2021 yılında tamamladığı "Eskişehir'de Doğal Yayılış Gösteren Bazı *Fumana* Taksonları Üzerinde Biyosistemik Çalışmalar" isimli yüksek lisans tezinden türetilmiştir.

## Kaynaklar

- [1] Nandi, O. I. (1998). Ovule and seed anatomy of Cistaceae and related Malvaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 209(3), 239-264.
- [2] Ukraintseva, V. V. (1993). Pollen morphology of the family Cistaceae in relation to its taxonomy. *Grana*, 32(S2), 33-36.
- [3] Heywood, V. H. (1968). *Fumana* (Dunal) Spach. In T. G. Tutin (Ed), *Flora Europaea* 2 (pp. 291-292). Cambridge University Press.
- [4] Pignatti, S., Guarino, R., & La Rosa, M. (2017). *Flora d'Italia* (Vol. 1).
- [5] Greuter, W. (1980). Med-checklist notulae, 1. *Willdenowia*, 13-21.
- [6] Güemes, J., & Molero, J. (1993). *Fumana* (Dunal) Spach. *Flora iberica*, 3, 422-436.
- [7] Güemes, J., & Boscaiu, M. (2001). The breeding system of *Fumana ericifolia*: first evidence of autogamy in woody Cistaceae. *Nordic Journal of Botany*, 21(5), 467-474.
- [8] Davis, P. H. (1972). *Flora of the Turkey and the East Aegean Islands*. Vol.1. Edinburgh University Press: London.
- [9] Carrió, E., Engelbrecht, M., García-Fayos, P., & Güemes, J. (2020). Phylogeny, biogeography, and morphological ancestral character reconstruction in the Mediterranean genus *Fumana* (Cistaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 58(3), 201-220.
- [10] Erdtman, G. (1960). The acetolysis method, a revised description. *Svensk Bot Tidskr*, 54, 561-564.
- [11] Wodehouse, R. P. (1959). *Pollen grains. Their structure, identification and significance in science and medicine*. New York: Hafner.
- [12] <https://www.bizimbitkiler.org.tr/v2/hiyerarsi.php?c=Fumana> (accessed in 12/08/2021)
- [13] Öztürk, D., Sezer, O., Koyuncu, O., & Atila, O. (2008). Eskişehir'deki jipsli ve marnlı toprakların florası. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 11(2), 137-151.
- [14] Güemes, J. (1999). A new species of *Fumana* (Cistaceae) from Rif, Morocco. *Folia Geobotanica*, 34(3), 363-372.
- [15] Rivas, C. S. D. (1979). Pollen morphology of spanish Cistaceae. *Grana*, 18(2), 91-98.
- [16] Walker, J. W. (1974). Aperture evolution in the pollen of primitive angiosperms. *American Journal of Botany*, 61(10), 1112-1137.



## Contributions to the Cercopidae Leach, 1815 (Hemiptera: Auchenorrhyncha) fauna of the Bolkar Mountains

Ersin DEMİREL<sup>\*1</sup>, Abdullah HASBENLİ<sup>2</sup>  
ORCID: 0000-0001-7699-3166; 0000-0002-2919-7594

<sup>1</sup> Hatay Mustafa Kemal University, Tayfur Sökmen Campus, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, 31060 Antakya, Hatay, Turkey

<sup>2</sup> Gazi University, Science Faculty, Department of Biology, 06500, Teknikokullar, Ankara, Turkey

### Abstract

In this study, 780 Cercopidae specimens collected from the Bolkar Mountains between 2005–2007 were evaluated. As a result of the evaluation, five species belonging to two genera of this family were determined. Dorsal habitus photographs of the identified species and new distribution maps were prepared according to the current data. In addition, an identification key of these species distributed in the study area was given.

**Keywords:** *Cercopis distincta*, *C. intermedia*, *C. sanguinolenta*, *C. septemmaculata*, *Triecphorella geniculata*,

----- \* -----

### Bolkar Dağları'nın Cercopidae Leach, 1815 (Hemiptera: Auchenorrhyncha) faunasına katkılar

### Özet

Bu çalışmada 2005–2007 yılları arasında Bolkar Dağları'ndan toplanan 780 adet Cercopidae örneği değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda bu familyanın iki cinsine ait beş tür tespit edilmiştir. Tespit edilen türlerin dorsal habitus fotoğrafları ve güncel verilere göre yeni yerel dağılım haritaları hazırlanmıştır. Ayrıca araştırma bölgesinde yayılış gösteren bu türlere ait bir teşhis anahtarı verilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Cercopidae, *Cercopis distincta*, *C. intermedia*, *C. sanguinolenta*, *C. septemmaculata*, *Triecphorella geniculata*, Türkiye

### 1. Giriş

Cercopoidea Leach, 1815, dünyadaki en büyük ksilem özsu emici böcek grubunu oluşturur [1]. Çok çeşitli bitkilerde oligofag ya da polifag olsalar da büyük çoğunluğu otsu monokotlardan aktif olarak bitki özsuunu emerek beslenme eğilimindedir [1]. Yaşam döngüleri mevsimsel yağış modellerine bağlı olarak univoltine olarak gerçekleşir [1]. Her türün erkek ve dişi aynı yöne bakacak şekilde yan yana gelerek çiftleşirler [1]. Cercopidler, yumurtalarını toprağa, ölü bitki örtüsüne ve gövde yüzeylerine bırakırlar. Hemimetabol başkalaşıma sahip olan bu grubun nimflerinin erginliğe geçişteki son deri değişimi, anormal derecede büyük ve kuru kabarcıklarla çevrilmiş bir hava cebinde (oda) gerçekleşir [1]. Bu cepler kanatların genişlemesine ve integümentin kurumasına izin verir [1]. Yumurtadan yeni çıkan nimfler, uygun bir sulu beslenme yeri bulana kadar konukçu bitki üzerinde dolaşırlar [1]. Gelişme süresi türlere ve iklime göre 4-9 hafta arasında değişir. Erişkin fazın süresi ise 1-3 hafta arasında değişmektedir [1]. Cercopoidlerin, yaşamının farklı dönemlerinde etkili olan doğal düşmanları bulunmaktadır. Hymenoptera'nın Eulophidae, Mymaridae ve Trichogrammatidae familyaları, nematodlar, karıncalar, *Drosophila* larvası, Pipunculidae ve bir syrphid sineği olan *Salpingogaster nigra* gibi yırtıcılar yumurta parazitleri arasında yer alır [1]. Erginlerin popülasyonu ise soyguncu sinekler tarafından (Asilidae) avlanarak ya da mantar entomopatojenlerine bağlı gerçekleşen ölümler ile baskılır [1]. Bununla birlikte erginler ve nimfler avcılarından korunmaya yönelik farklı adaptasyonlar sergiledikleri bilinmektedir.



Cercopoidea üst ailesinin (Hemiptera: Auchenorrhyncha) en geniş ailesi olan Cercopidae, parlak siyah-kırmızı renkler ve desenlerle karakterize edilir ve büyük miktarda koruyucu köpük ürettikleri için köpük böceği ya da salya (tükürük) böceği (spittlebugs, froghopper) olarak adlandırılırlar [1]. Çok sayıda Cercopidae türü, kırmızı, turuncu ve sarı ile siyahın bir arada olduğu desenlere sahiptir [2]. Cercopidlerin çoğu aposematik olarak renklidir ve birçoğu refleks kanaması sergiler [3]. Cercopidae, Cicadomorpha Evans, 1946'nın (Hemiptera: Auchenorrhyncha) ailelerinden biri olup, dünyada 173 cins ve yaklaşık 1500 tür ile temsil edilmektedir [2, 4]. Paleartik'te ise şimdiye kadar sadece 20 cins ve yaklaşık 100 türü kaydedilmiştir [2, 5, 6]. Bazı şüpheli yerel kayıtlara rağmen, önceki çalışmalar bu familyanın Türkiye'de yedi türle temsil edildiğini göstermektedir [5, 7, 8, 9, 10].

Türkiye'den Cercopidae familyasına ait ilk kayıtların yabancı araştırmacılar tarafından verildiği görülmektedir. Bu eserlerin büyük çoğunluğu grubun morfolojileri, biyolojileri ve ekolojileri [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21] hakkında bilgi veren çalışmalar olmakla birlikte, aralarında katalog ve kontrol listelerine [5, 6, 22, 23, 24, 25] ya da az sayıda faunistik [26, 27, 28] esere de rastlamak mümkündür. Yerli araştırmacıların doğrudan bu grupla ilgili yaptığı çalışma sayısı, yabancıların yaptıkları ile kıyaslandığında yok denecek kadar azdır. Mevcut çalışmaların bir bölümü olarak sunulan Cercopidlere ait veriler bu çalışmada faunistik bilgiler şeklinde yer almaktadır [7, 8, 9, 29, 30, 31, 32, 33]. Şimdiye kadar sadece bu taksonun taksonomisi ve morfolojisi ile ilişkili üç çalışmaya rastlanılmıştır [10, 34, 35].

Bolkar Dağları'ndan toplanan Cercopidae örneklerinin değerlendirildiği bu çalışma ile hem Türkiye'de bu alanda yapılan faunistik bilgi birikimini artıran çalışmalara bir yenisini eklemek hem de Türkiye ve yerel faunaya katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

## 2. Materyal ve yöntem

Bu araştırma, 2005–2007 yıllarının Nisan–Temmuz aylarında Adana, İçel, Karaman, Konya ve Niğde İl sınırları içerisinde yer alan Bolkar Dağları'ndan toplanan 780 Cercopidae örneğine dayanmaktadır.

Araziden toplanan örnekler %70 etanol içeren kavanozlarda öldürülmüş ve daha sonra laboratuvarında iğnelenerek kurutulmuş örnekler halinde böcek dolaplarında muhafaza edilmiştir. Morfolojik incelemesi tamamlanan erkek örneklerin genital yapıları disekte edilmeden önce iğnelenmiş kuru örnekler nemlendirilmiş, daha sonra genital kapsülleri Boeco BSZ-405 model stereo mikroskop altında çıkarılarak benmari yöntemi ile 15 dakika %10 KOH ile muamele edilmiştir.

Toplanan örneklerin teşhislerinde ve teyitlerinde Nast (1933), Lallemand (1949), Holzinger ve ark. (2003) ile Demirel ve Dinç (2021)'den faydalanılmıştır. Bu türler bulgular bölümünde alfabetik sıraya göre verilmiştir.

Magellan Explorist model GPS (Global Positioning System)'den alınan koordinat bilgilerinin ArcView v3.3 yazılımında derlenmesi ile yerel, önceki çalışmalardan toplanan verilerin [5, 6, 7, 8, 9, 21] yine aynı yazılımla derlenmesi ile türlerin Türkiye ve Paleartik yayılış haritaları oluşturulmuştur. Teşhis edilen türlerin habitus fotoğrafları Nikon AF-S VR Micro-NIKKOR 105mm f/2.8G IF-ED lensli Nikon D750 fotoğraf makinesi ile çekilmiş ve GIMP (GNU Image Manipulation Program) yazılımı kullanılarak yayın için son düzenlemeleri yapılmıştır. Teşhis edilen örnekler Gazi Üniversitesi Prof. Dr. Metin Aktaş Zooloji Müzesi'nde (ZMGU) muhafaza edilmektedir.

## 3. Bulgular

Çalışma alanından toplanan Cercopidae örneklerinin değerlendirilmesi sonucu, bölgede beş türün yayılış gösterdiği tespit edilmiştir. Aşağıda bu türlerin erkek bireylerine ait teşhis anahtarına yer verilmiştir.

### Bolkar Dağları'nın Cercopidae teşhis anahtarı

1. Tegminanın anterioründe kırmızı benek yok ve 7.5 mm'den küçük örneklerdir..... *Triecphorella geniculata*  
– Tegminanın anteriorü iki kırmızı benekli ve 7.5 mm'den büyük örneklerdir .....2
2. Bacakların tüm segmentleri siyahtır.....3  
– Femur ve tibiaların yaklaşık yarıları, diz bölümleri ile beraber kırmızıdır .....4
3. Abdomen ventral plaka konneksivalarının ortaları siyah beneklidir ..... *Cercopis sanguinolenta*  
– Abdomen ventral plaka konneksivaları tümüyle kırmızıdır.....*Cercopis distincta*
4. Tegminanın posteriorunda yer alan kırmızı şerit üç parçalıdır.....*Cercopis septemmaculata*  
– Tegminanın posteriorunda yer alan kırmızı şerit tamdır.....*Cercopis intermedia*

**Sistematikleri****Süperfamilya:** Cercopoidea Leach, 1815**Familya:** Cercopidae Leach, 1815**Subfamilya:** Cercopinae Leach, 1815**Tribe:** Cercopini Leach, 1815**Genus:** *Cercopis* Fabricius, 1775Type: *Cicada sanguinolenta* Scopoli, 1763***Cercopis distincta* (Melichar, 1896) (Şekil 1b)***Triecphora distincta* Melichar, 1896**İncelenen Materyal:**

Toplam örnek sayısı: 43♂♂, 37♀♀

7♂♂, 2♀♀, Mersin, Merkez, Gözne–Aslanköy arası, Kerimler yol ayrımı, 36° 54' N, 34° 32' E, 648m, 23 Nisan 2006; 6♂♂, 7♀♀, Mersin, Merkez, Pelitkoyağı Köyü, 36° 46' N, 34° 25' E, 366m, 19 Mayıs 2007; 6♂♂, 3♀♀, Mersin, Erdemli, Karayakup Köyü sonrası, 36° 44' N, 34° 19' E, 354m, 19 Mayıs 2007; 6♂♂, 3♀♀, Mersin, Erdemli, Çamlı Köyü, 36° 44' N, 34° 11' E, 723m, 20 Mayıs 2007; 6♂♂, 3♀♀, Mersin, Merkez, Fındıkpınarı–Çağlarca Yolu, Çağlarca Köyü, 36° 59' N, 34° 26' E, 1200m, 14 Haziran 2007; 5♂♂, 3♀♀, Mersin, Çamlıyayla, Sebil girişi, 37° 7' N, 34° 31' E, 640m, 17 Haziran 2005; 5♂♂, 6♀♀, Mersin, Merkez, Doğusandal Köyü girişi, 36° 45' N, 34° 23' E, 166m, 19 Mayıs 2007; 2♂♂, 2♀♀, Mersin, Merkez, Doğusandal Köyü, 36° 45' N, 34° 24' E, 234m, 19 Mayıs 2007; 3♀♀, Mersin, Çamlıyayla, Sebil–Cehennem Deresi arası, 37° 12' N, 34° 34' E, 1741m, 10 Haziran 2007; 4♀♀, Mersin, Çamlıyayla, Cehennem Deresi, 37° 7' N, 34° 31' E, 756m, 10 Haziran 2007 (Şekil 2a).

**Palearktik Yayılışı:**

Türkiye (Şekil 2e) [5, 7, 12, 15].

**Türkiye Yayılışı:**

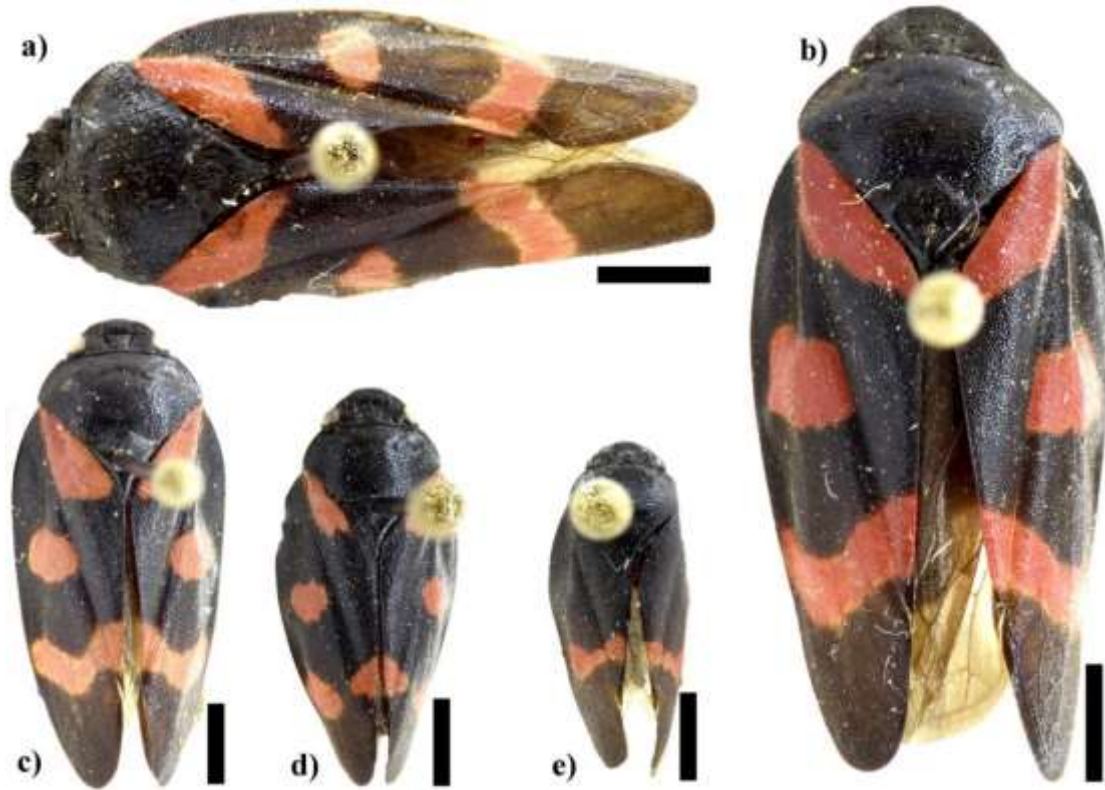
Hatay [10].

***Cercopis intermedia* Kirschbaum, 1868 (Şekil 1c)***Cercopis oblitterata* Kirschbaum, 1868.*Triecphora intermedia nigra* Royer, 1906.*Triecphora intermedia simulans* Peneau, 1912.*Cercopis sanguinolenta turkestanica* Lindberg, 1923.*Cercopis sanguinolenta intermedia bipunctata* Ribaut, 1946.*Cercopis sanguinolenta intermedia quadrimaculata* Ribaut, 1946.*Cercopis sanguinolenta intermedia septempunctata* Ribaut, 1946.*Cercopis sanguinolenta intermedia sexmaculata* Ribaut, 1946.**İncelenen Materyal:**

Toplam örnek sayısı: 178♂♂, 362♀♀

4♂♂, 8♀♀, Mersin, Silifke, Kirobası, 36° 43' N, 33° 51' E, 1400m, 21 Mayıs 2005; 7♂♂, 6♀♀, Niğde, Ulukışla, Darboğaz Köyü girişi, 37° 28' N, 34° 34' E, 1610m, 15 Haziran 2005; 6♂♂, 5♀♀, Mersin, Merkez, Fındıkpınarı Yolu, 36° 57' N, 34° 20' E, 1708m, 20 Mayıs 2005; 3♂♂, 5♀♀, Niğde, Ulukışla, Darboğaz Köyü, 37° 28' N, 34° 35' E, 1631m, 1 Temmuz 2005; 2♂♂, 10♀♀, Niğde, Ulukışla, Darboğaz–Emirler köyleri arası, 37° 28' N, 34° 32' E, 1597m, 15 Haziran 2005; 2♂♂, 6♀♀, Karaman, Ayrancı, Çatköy–Akpınar köyleri yol ayrımı, Akpınar yolu, 37° 12' N, 33° 51' E, 1486m, 15 Haziran 2005; 2♂♂, 8♀♀, Karaman, Ayrancı, Akpınar–Kayaönü köyleri arası, 37° 8' N, 33° 47' E, 1654m, 15 Haziran 2005; 2♂♂, 6♀♀, Mersin, Çamlıyayla, Sebil girişi, 37° 7' N, 34° 31' E, 640m, 17 Haziran 2005; 4♂♂, 21♀♀, Adana, Pozantı, Akçatekir, Karboğazi, Çamçukuru, 37° 20' N, 34° 42' E, 1885m, 27 Haziran 2007; 3♂♂, 11♀♀, Niğde, Ulukışla, Emirler Köyü çıkışı, 37° 28' N, 34° 32' E, 1556m, 26 Haziran 2007; 5♂♂, 10♀♀, Adana, Pozantı, Akçatekir, Karboğazi, 37° 20' N, 34° 41' E, 1561m, 14 Haziran 2007; 4♂♂, 6♀♀, Adana, Pozantı, Akçatekir, Karboğazi, Sumaklı Dağı, 37° 20' N, 34° 41' E, 1559m, 9 Haziran 2007; 3♂♂, 7♀♀, Niğde, Ulukışla, Darboğazi Köyü, 37° 30' N, 34° 34' E, 1275m, 8 Haziran 2007; 3♂♂, 6♀♀, Mersin, Merkez, Atlılar Köyü, 37° 5' N, 34° 25' E, 1452m, 11 Haziran 2007; 3♂♂, 6♀♀, Mersin, Merkez, Atlılar–Aslanköy yol ayrımına 2 km, 37° 3' N, 34° 25' E, 1388m, 11 Haziran 2007; 5♂♂, 5♀♀, Niğde, Ulukışla, Darboğaz–Maden köye 4 km kala, 37° 27' N, 34° 37' E, 1972m, 26 Haziran 2007; 3♂♂, 8♀♀, Niğde, Ulukışla, Maden Köy, 37° 27' N, 34° 38' E, 1637m, 26 Haziran 2007; 5♂♂, 8♀♀, Niğde, Ulukışla, Niğde–Kayseri Yolu, 37° 35' N, 34° 32' E, 1611m, 8 Haziran 2007; 8♂♂, 12♀♀, Mersin, Silifke, Kirobası, 36° 43' N, 33° 51' E, 1399m, 13 Haziran 2007; 2♂♂, 13♀♀, Adana, Pozantı Akçatekir, Karboğazi, Sumaklı Dağı, 37° 20' N, 34° 41' E, 1564m, 9 Haziran 2007; 2♂♂, 7♀♀, Niğde, Ulukışla, Maden Köy, 37° 30' N, 34° 35' E, 1280m, 9 Haziran 2007; 2♂♂, 15♀♀, Mersin, Merkez, Aslanköy, Çatak–Fındıkpınarı arası, 36° 57' N, 34° 17' E, 1871m, 28 Haziran 2007; 2♂♂, 6♀♀, Niğde, Ulukışla, Darboğaz–Pozantı yol ayrımı, 37° 30' N, 34° 34' E, 1281m, 26 Haziran 2007; 2♂♂, 7♀♀, Adana, Pozantı, Akçatekir, Karboğazi, Çamçukuru, 37° 20' N, 34° 43' E, 1611m, 27 Haziran 2007;

2♂♂, 6♀♀, Mersin, Erdemli, Fındıkpınarı üstü, 36° 56' N, 34° 20' E, 1525m, 28 Haziran 2007; 8♀♀, Niğde, Ulukışla, Emirler Köyü Göleti üzeri, 37° 27' N, 34° 29' E, 1627m, 26 Haziran 2007; 6♀♀, Mersin, Merkez, Alanyalı–Atlılar Köyü Yolu, 37° 5' N, 34° 25' E, 1457m, 14 Haziran 2007; 6♀♀, Niğde, Ulukışla, Emirler Köyü girişi, 37° 29' N, 34° 31' E, 1599m, 26 Haziran 2007; 7♀♀, Mersin, Mut, Çömelek Deresi Köprüsü, 36° 43' N, 33° 40' E, 1114m, 13 Haziran 2007; 16♂♂, Niğde, Ulukışla, Maden Köyü, 37° 26' N, 34° 37' E, 1712m, 6 Haziran 2006; 2♂♂, 8♀♀, Mersin, Merkez, Çatak–Fındıkpınarı arası, 36° 57' N, 34° 17' E, 1903m, 2 Temmuz 2006; 19♂♂, 15♀♀, Niğde, Ulukışla, Darboğaz Köyü, 37° 28' N, 34° 35' E, 1721m, 6 Haziran 2006; 1♂, Niğde, Ulukışla, Darboğaz Köyü, 37° 28' N, 34° 34' E, 1662m, 5 Haziran 2006; 1♂, Adana, Pozantı, Akçatekir, 37° 22' N, 34° 49' E, 938m, 6 Haziran 2006; 1♂, 10♀♀, Niğde, Ulukışla, Darboğaz Köyü, 37° 27' N, 34° 35' E, 1652m, 29 Haziran 2006; 3♂♂, 3♀♀, Niğde, Ulukışla, Maden Köyü çıkışı, 37° 27' N, 34° 39' E, 1526m, 6 Haziran 2006; 1♂, 7♀♀, Mersin, Merkez, Atlılar Köyü, 37° 5' N, 34° 25' E, 1450m, 8 Haziran 2006; 5♂♂, 12♀♀, Mersin, Silifke, Kirobaşı, 36° 43' N, 33° 51' E, 1398m, 10 Haziran 2006; 3♂♂, 19♀♀, Niğde, Ulukışla, Darboğaz–Gümüş köyleri arası, 37° 28' N, 34° 35' E, 1716m, 30 Haziran 2006; 2♀♀, Adana, Pozantı, Akçatekir, Karboğazı, 37° 19' N, 34° 41' E, 1536m, 30 Haziran 2006; 1♂, Niğde, Ulukışla, Emirler Köyü Göleti, 37° 27' N, 34° 29' E, 1633m, 22 Temmuz 2006; 1♀, Mersin, Erdemli, Güzeloluk, Yağda Köyü, 36° 45' N, 34° 2' E, 1364m, 10 Haziran 2006; 1♀, Konya, Halkapınar, Körlü Köyü, 37° 24' N, 34° 16' E, 1296m, 22 Temmuz 2006; 1♀, Niğde, Ulukışla, Niğde Yolu 3. km, 37° 35' N, 34° 32' E, 1582m, 30 Haziran 2006; 1♂, Mersin, Merkez, Gözne–Fatih Belediyesi, 37° 1' N, 34° 34' E, 1131m, 19 Mayıs 2006; 1♂, Mersin, Merkez, Fındıkpınarı, 36° 57' N, 34° 23' E, 1268m, 19 Mayıs 2006; 1♂, Mersin, Merkez, Fındıkpınarı, Kocayer, Zeybekler–Tepeköy ayırımı, 36° 52' N, 34° 21' E, 1298m, 23 Nisan 2006; 29♂♂, 18♀♀, Mersin, Silifke, Kirobaşı, 36° 43' N, 33° 51' E, 1403m, 18 Mayıs 2006; 2♂♂, 2♀♀, Niğde, Ulukışla, Darboğaz Köyü, 37° 28' N, 34° 34' E, 1614m, 10 Temmuz 2007; 4♂♂, Niğde, Ulukışla, Madenköy, Meydan Yaylası, 37° 25' N, 34° 33' E, 2311m, 10 Temmuz 2007; 1♀, Niğde, Ulukışla, Niğde–Kayseri Yolu, 37° 35' N, 34° 32' E, 1581m, 1 Temmuz 2007; 1♀, Adana, Pozantı, Akçatekir, Karboğazı, Çamçukuru, 37° 20' N, 34° 43' E, 1609m, 11 Temmuz 2007; 1♀, Adana, Pozantı, Akçatekir, Karboğazı, Sumaklı Dağı, 37° 20' N, 34° 41' E, 1567m, 11 Temmuz 2007; 1♀, Niğde, Ulukışla, Emirler Köyü çıkışı, 37° 28' N, 34° 32' E, 1557m, 10 Temmuz 2007; 1♀, Mersin, Silifke, Kirobaşı, Oğru köyü, 36° 51' N, 33° 43' E, 1785m, 9 Temmuz 2005; 2♀♀, Mersin, Merkez, Çatak–Fındıkpınarı arası, 36° 57' N, 34° 18' E, 1927m, 8 Temmuz 2005; 2♀♀, Adana, Pozantı, Akçatekir, 37° 21' N, 34° 41' E, 1768m, 6 Temmuz 2005; 1♀, Niğde, Ulukışla, Aktoprak Köyü, 37° 31' N, 34° 28' E, 1620m, 13 Temmuz 2005; 2♀♀, Mersin, Erdemli, Güzeloluk, Hacıalanı Yaylası, 36° 49' N, 34° 14' E, 1632m, 9 Temmuz 2005; 1♀, Mersin, Merkez, Güzelyayla, Atlılar Köyü, 37° 6' N, 34° 25' E, 1452m, 8 Temmuz 2005; 3♀♀, Mersin, Tarsus, Dörtler, 37° 7' N, 34° 52' E, 372m, 22 Nisan 2006; 1♀, Mersin, Silifke, İmamlı Köyü, 36° 27' N, 33° 57' E, 613m, 18 Mayıs 2006 (Şekil 2a).



Şekil 1. Araştırma alanından tespit edilen türlerin dorsal habitusları, a) *Cercopis sanguinolenta*; b) *C. distincta*; c) *C. intermedia*; d) *C. septemmaculata*; e) *Triecphorella geniculata* (ölçekler=2mm)

**Palearktik Yayılışı:**

Almanya, Arnavutluk, Bulgaristan, Cezayir, Ermenistan, Fas, Fransa, Gürcistan, İran, İspanya, İsrail, İsviçre, İtalya, Lübnan, Özbekistan, Portekiz, Rusya (Dağıstan), Suriye, Türkiye, Türkmenistan, Ukrayna, Yunanistan (Şekil 2c) [5, 6, 21].

**Türkiye Yayılışı:**

Adıyaman, Aksaray, Amasya, Ankara, Antalya, Artvin, Balıkesir, Çanakkale, Çorum, Diyarbakır, Elâzığ, Eskişehir, Gaziantep, Giresun, Gümüşhane, Hakkâri, Hatay, Isparta, İzmir, Kahramanmaraş, Kayseri, Kırıkkale, Kırklareli, Konya, Kütahya, Mardin, Rize, Samsun, Siirt, Şanlıurfa, Tokat, Uşak [7, 9, 10, 28, 29, 30, 32, 33, 34].

***Cercopis sanguinolenta* (Scopoli,1763) (Şekil 1a)**

*Cicada sanguinolenta* Scopoli, 1763.

*Cercopis mactata* Germar, 1821.

*Cercopis panzeri* Le Peletier et Serville, 1825.

*Cercopis distinguenda* Kirschbaum, 1868.

*Triecphora mactata basalis* Dominique, 1892.

*Triecphora mactata basalis* Melichar, 1896.

*Triecphora vulnerata quadripunctata* Sabransky, 1912.

*Triecphora sanguinolenta reducta* Melichar, 1913.

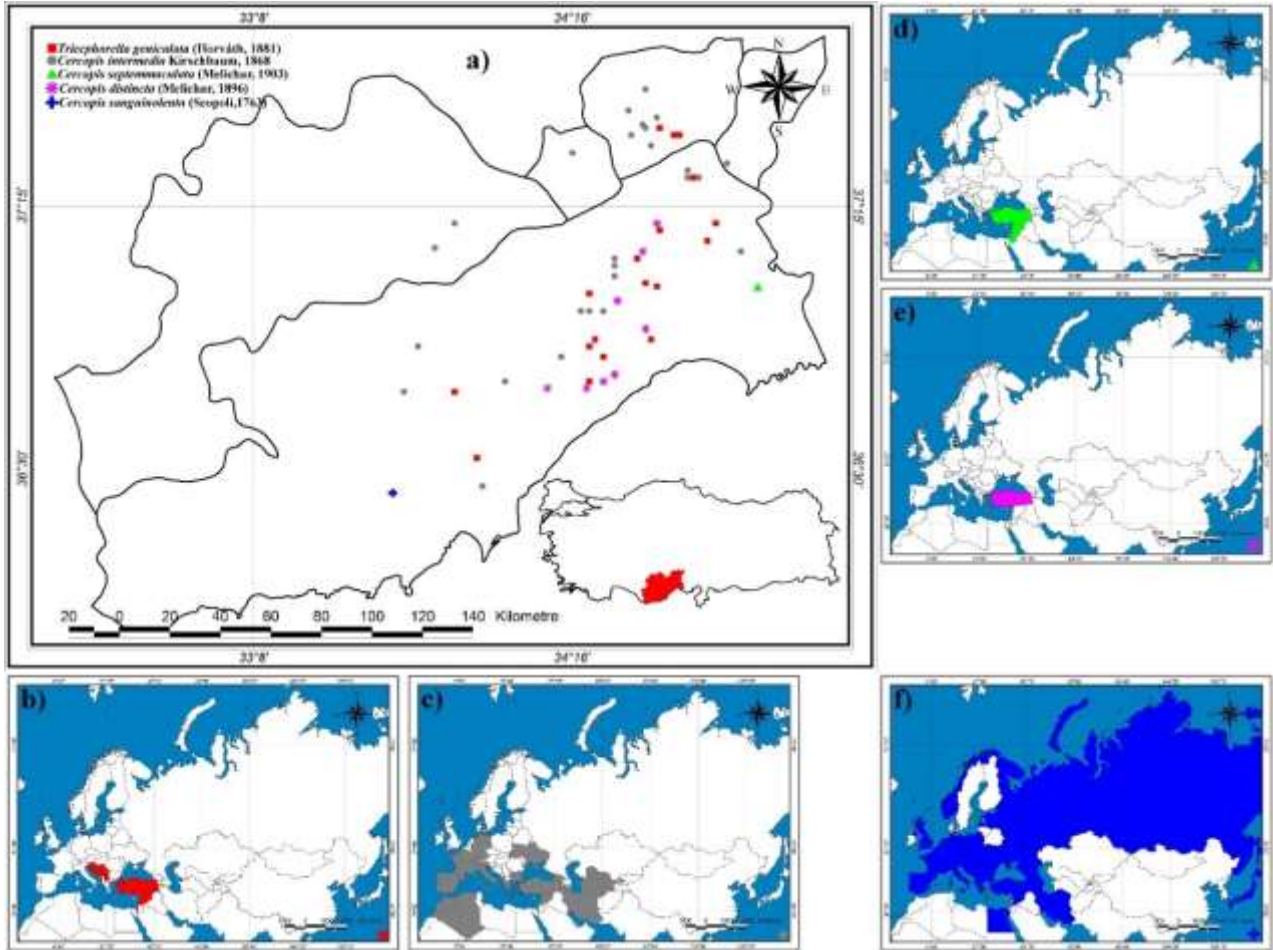
*Triecphora mactata egestosa* Haupt, 1917.

**İncelenen Materyal:**

Toplam örnek sayısı: 6♂♂, 4♀♀

6♂♂, 4♀♀, Mersin, Silifke, Kargıcak, Köyü (Göksu Nehri üzeri), 36° 26' N, 33° 38' E, 63m, 20 Mayıs 2007

(Şekil 2a).



Şekil 2. Tespit edilen türlerin araştırma alanında ve palearktik bölgede yayılışları, a) Türlerin çalışma alanındaki yayılışı, b) *Triecphorella geniculata*; c) *Cercopis intermedia*; d) *C. septemmaculata*; e) *C. distincta*; f) *C. sanguinolenta*

**Palearktik Yayılışı:**

Almanya, Arnavutluk, Avusturya, Azerbaycan, Belçika, Bulgaristan, Çek Cumhuriyeti, Ermenistan, Estonya, Filistin, Fransa, Gürcistan, Hollanda, Hırvatistan, İngiltere, İran, İspanya, İsviçre, İtalya, Japonya, Letonya, Macaristan, Makedonya, Moldavya, Norveç, Polonya, Portekiz, Romanya, Rus Kafkas Cumhuriyetleri, Rusya, Sırbistan, Sicilya, Sina Yarımadası (Mısır), Slovakya, Slovenya, Suriye, Türkiye, Ukrayna, Yugoslavya, Yunanistan (**Şekil 2f**) [5, 6, 25].

**Türkiye Yayılışı:**

Batman, Bursa, Çanakkale, Diyarbakır, Eskişehir, Gaziantep, Giresun, Hakkâri, İstanbul, İzmir, Kahramanmaraş, Kilis, Kocaeli, Manisa, Mardin, Siirt, Tokat, Şanlıurfa [7].

***Cercopis septemmaculata* (Melichar, 1903) (Şekil 1d)**

*Triumphora septemmaculata* Melichar, 1903.

**İncelenen Materyal:**

Toplam örnek sayısı: 21♂♂, 15♀♀

21♂♂, 15♀♀, Mersin, Tarsus, Kurbanlı Köyü yol ayrımı, Tarsus'a 15 km, 37° 1' N, 34° 56' E, 157m, 22 Nisan 2006 (**Şekil 2a**).

**Palearktik Yayılışı:**

İsrail, Lübnan, Suriye, Türkiye, Ürdün (**Şekil 2d**) [5, 10].

**Türkiye Yayılışı:**

Adana, Hatay, Mardin, Siirt [7, 10].

**Sistematikleri**

**Süperfamilya:** Cercopoidea Leach, 1815

**Familya:** Cercopidae Leach, 1815

**Subfamilya:** Cercopinae Leach, 1815

**Tribe:** Cercopini Leach, 1815

**Genus:** *Triumphorella* Nast, 1933

**Type:** *Cercopis fasciata* Kirschbaum, 1868

***Triumphorella geniculata* (Horváth, 1881) (Şekil 1e)**

*Triumphora fasciata geniculata* Horvath, 1881.

*Cercopis fasciata* Kirschbaum, 1868.

*Cercopis (Triumphora) fasciata punctum* Lindberg, 1923.

*Triumphorella kirschbaumi* Metcalf, 1955.

**İncelenen Materyal:**

Toplam örnek sayısı: 29♂♂, 85♀♀

3♂♂, 4♀♀, Mersin, Merkez, Gözne–Aslanköy arası, Kerimler yol ayrımı, 36° 54' N, 34° 32' E, 648m, 23 Nisan 2006; 2♂♂, 3♀♀, Mersin, Merkez, Fındıkpınarı, Kocayer, Zeybekler–Tepeköy ayrımı, 36° 52' N, 34° 21' E, 1298m, 23 Nisan 2006; 3♂♂, 4♀♀, Mersin, Merkez, Gözne–Fatih Belediyesi, 37° 1' N, 34° 34' E, 1131m, 19 Mayıs 2006; 2♂♂, 2♀♀, Mersin, Merkez, Yüksekölük Köyü, 36° 59' N, 34° 26' E, 1210m, 19 Mayıs 2006; 3♂♂, 2♀♀, Niğde, Ulukışla, Darboğaz Köyü, 37° 28' N, 34° 35' E, 1721m, 6 Haziran 2006; 2♂♂, 2♀♀, Niğde, Ulukışla, Maden Köyü çıkışı, 37° 27' N, 34° 39' E, 1526m, 6 Haziran 2006; 3♂♂, 2♀♀, Mersin, Çamlıyayla, Saydibi Yayla Yolu, 37° 11' N, 34° 35' E, 1576m, 10 Haziran 2007; 3♂♂, 3♀♀, Mersin, Çamlıyayla, Sebil–Cehennem Deresi arası, 37° 12' N, 34° 34' E, 1741m, 10 Haziran 2007; 2♂♂, 10♀♀, Mersin, Merkez, Cehennem Deresi–Alanyalı Yolu arası, 37° 6' N, 34° 30' E, 1197m, 11 Haziran 2007; 2♂♂, 10♀♀, Adana, Pozantı, Akçatekir, Karboğazi, Çamçukuru, 37° 20' N, 34° 42' E, 1885m, 27 Haziran 2007; 2♂♂, 2♀♀, Mersin, Merkez, Arslanköy Yolu, Kavaklıpınar Köyü, 37° 0' N, 34° 20' E, 1203m, 20 Mayıs 2005; 2♂♂, 2♀♀, Mersin, Erdemli, Kuzucu, Kocayer Yolu, Üzümlü yol ayrımı, 36° 49' N, 34° 23' E, 682m, 20 Mayıs 2005; 2♀♀, Mersin, Çamlıyayla, Sebil girişi, 37° 7' N, 34° 31' E, 640m, 17 Haziran 2005; 3♀♀, Niğde, Ulukışla, Darboğaz Köyü, 37° 28' N, 34° 35' E, 1631m, 1 Temmuz 2005; 2♀♀, Mersin, Tarsus, Gülek, Ardıçlı Köyü, 37° 12' N, 34° 47' E, 739m, 22 Nisan 2006; 2♀♀, Mersin, Tarsus, Kurbanlı Köyü yol ayrımı, Tarsus'a 15 km, 37° 1' N, 34° 56' E, 157m, 22 Nisan 2006; 3♀♀, Mersin, Merkez, Gözne yolu 10. km, Isık tepe, 36° 52' N, 34° 33' E, 281m, 22 Nisan 2006; 1♀, Mersin, Erdemli, Üzümlü Köyü, 36° 51' N, 34° 20' E, 588m, 23 Nisan 2006; 6♀♀, Mersin, Merkez, Gözne–Fatih Belediyesi, Böğrüeğri yol ayrımı, 37° 2' N, 34° 32' E, 838m, 19 Mayıs 2006; 2♀♀, Mersin, Tarsus, Çamalan–Ayrıvalı Odun Deposu, 37° 12' N, 34° 47' E, 769m, 6 Haziran 2006; 8♀♀, Mersin, Merkez, Alanyalı Köyü, 37° 6' N, 34° 30' E, 1211m, 8 Haziran 2006; 1♀, Mersin, Silifke, Uzuncaburç Mesire Alanı, 36° 32' N, 33° 56' E, 1051m, 10 Haziran 2006; 2♀♀, Mersin, Tarsus, Kurtçukuru (Çamalan–Çamlıyayla Yolu), 37° 9' N, 34° 45' E, 626m, 10 Haziran 2007; 1♀, Mersin, Silifke, Kirobası, 36° 43' N, 33° 51' E, 1399m, 13 Haziran 2007; 1♀, Niğde, Ulukışla, Maden Köy, 37° 27' N, 34° 38' E, 1637m, 26 Haziran 2007; 3♀♀, Mersin, Merkez, Alanyalı Köyü, Cehennem Deresi

üstü, 37° 6' N, 34° 30' E, 1158m, 28 Haziran 2007; 2♀♀, Mersin, Erdemli, Sıraç köyü, 36° 45' N, 34° 20' E, 731m, 19 Mayıs 2007 (**Şekil 2a**).

**Palearktik Yayılışı:**

İsrail, Lübnan, Suriye, Türkiye, Yugoslavya (**Şekil 2b**) [5].

**Türkiye Yayılışı:**

Adana, Antalya, Balıkesir, Kahramanmaraş, Konya, Samsun [7, 31, 32, 34].

#### 4. Sonuçlar ve tartışma

Bolkar Dağları'nda yürütülen bu çalışma ile bölgeden Cercopidae familyası için *Cercopis distincta*, *C. intermedia*, *C. sanguinolenta*, *C. septemmaculata* ve *T. geniculata* olmak üzere iki cinse ait toplam beş tür belirlenmiştir. Bu türlerden *C. intermedia* bölgede en yaygın ve aynı zamanda en fazla örneğin de toplandığı tür olup, bu türü sırasıyla; *T. geniculata*, *C. distincta*, *C. septemmaculata* ve *C. sanguinolenta* takip etmektedir.

Türkiye Cercopidae faunasında yer alan bazı türlerin, elde edilen yeni verilerle yayılış alanları genişletilmiş bulunmaktadır. Araştırma alanından tespit edilen türlerin hepsi, İçel İli için ilk kez kaydedilmiştir. Bunun dışında, *C. intermedia* ve *T. geniculata* Niğde ve *C. intermedia* türü ise Adana ve Karaman İlleri için yine ilk kez kayıtları verilen türlerdir. Çalışma alanının nispeten küçük bir bölümünün Konya İl sınırları içerisinde yer alması nedeniyle, bu ilden sadece *C. intermedia*'nin kaydı verilebilmiştir.

Türkiye'ye endemik olan *Cercopis distincta* ile *C. septemmaculata* türleri tam lokalite verileriyle ikinci kez kaydedilmiştir. Orjinal tanımından ancak 124 yıl sonra yakın zamanda Hatay'dan tespit edilen *C. distincta* ile *C. septemmaculata* türlerinin yayılış alanları, bu çalışma ile İçel'e doğru genişletilmiştir.

*C. septemmaculata* çalışma alanının en doğu, *C. sanguinolenta* ise en batı noktasında nispeten ayrık ve tek bir lokasyonda yayılış gösterirlerken, mevcut verilerden anlaşıldığı kadarı ile *C. distincta*, *C. intermedia* ve *Triecphorella geniculata* popülasyonları simpatrik görünümündedirler. Öyleki *C. intermedia*'nin yayılış noktalarından altı tanesi *T. geniculata* ile, bir tanesi ise *C. distincta* ile tam olarak çakışmaktadır. Benzer şekilde *T. geniculata*'nın dört noktasının da, yine *C. distincta*'nın yayılış alanı ile ortak olduğu anlaşılmaktadır. Ancak bu türlerin zoocoğrafik yayılışları hakkında kesin bir yargıya varabilmek için daha geniş ölçekte değerlendirilmesi gerekmektedir.

#### Bildirim

Bu çalışma sorumlu yazarın 2010 yılında tamamladığı ve Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi tarafından 05/2006-11 kodu ile desteklenen Doktora Tezinin bir bölümünden üretilmiştir.

#### Teşekkür

Doktora tezim süresince birlikte arazi çalışmaları yaptığım Dr. Öğr. Üyesi Üzeyir Çağlar, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Cemal ÇİFTÇİ, Araş. Gör. Dr. Neslihan BAL, Dr. Kadir BAŞAR, Dr. Fatma AÇIKGÖZ ve Dr. Neslihan ALPAY'a teşekkür ederim.

#### Kaynaklar

- [1] Carvalho, G. S. & Webb, M. D. (2005). Cercopid Spittle Bugs of the New World (Hemiptera Auchenorrhyncha, Cercopidae). Sofia: Pensoft Series Faunistica.
- [2] Bartlett, C. R., Dietz, L. L., Dmitriev, D. A., Sanborn, A. F., Soulier-Perkins A. & Wallace, M. S. (2018). The Diversity of the True Hoppers (Hemiptera: Auchenorrhyncha). In R. G. Foottit & P. H. Adler (Eds.), *Insect Biodiversity: Science and Society Volume II* (pp. 501–590). Chichester, England: Wiley Blackwell.
- [3] Peck, D. C. (2000). Reflex bleeding in froghoppers (Homoptera: Cercopidae): variation in behaviour and taxonomic distribution. *Annals of the Entomological Society of America*, 93(5), 1186–1194. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2000\)093\[1186:RBIFHC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2000)093[1186:RBIFHC]2.0.CO;2)
- [4] Soulier-Perkins, A. (2021). Cercopoidea organised on line (COOL). (Web page: <http://hemiptera-databases.org/cool>), Son Erişim Tarihi: 13.10.2021.
- [5] Nast, J. (1972). Palaeartic Auchenorrhyncha (Homoptera). An Annotated Check List. Warszawa: Polish Scientific Publishers.
- [6] Nast, J. (1987). The Auchenorrhyncha (Homoptera) of Europe. *Annales Zoologici Warszawa*, 40(15), 535–661.
- [7] Lodos, N., and Kalkandelen, A. (1981). Preliminary list of Auchenorrhyncha with notes on distribution and importance of species in Turkey VI. families Cercopidae and Membracidae. *Türkiye Bitki Koruma Dergisi*, 5(3), 133–149.
- [8] Lodos, N. & Kalkandelen, A. (1988). Preliminary List of Auchenorrhyncha with notes on distribution and importance of species in Turkey (addenda and corrigenda). *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 12(1), 11–22.
- [9] Önder, F., Tezcan, S., Karsavuran, Y. & Zeybekoğlu, Ü. (2011). Türkiye Cicadomorpha, Fulgoromorpha ve Sternorrhyncha (Insecta: Hemiptera) Kataloğu. İzmir: Meta Basım.

- [10] Demirel, E. & Dinç, H. (2021). *Cercopis sanguinolenta* (Scopoli, 1763) (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cercopidae) dilemma and redescription of rare *Cercopis* Fabricius, 1775 species from Turkey. *Turkish Journal of Entomology*, 45(1), 99–114. <https://doi.org/10.16970/entoted.816903>
- [11] Puton, A. (1881). Énumération des hémiptères recoltés en Syrie par M. Abeille de Perrin avec la description de espèces nouvelles. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, 6(3), 119–129.
- [12] Melichar, L. (1896). Einige neue Homoptera-arten und varietäten. *Verhandlungen der Kaiserlich-Königlichen Zoologisch-botanischen Gesellschaft in Wien*, 46(1), 176–180.
- [13] Kirkaldy, G. W. (1907). Current notes (New series). *The Entomologist (an Illustrated Journal of Entomology)*, 40(533), 230–243.
- [14] Lallemand, V. (1912). Homoptera fam. Cercopidae. *Genera Insectorum*, 143(1), 1–167.
- [15] Lallemand, V. (1949). Revision des Cercopinae (Hemiptera Homoptera) première partie. *Mémoires de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique*, 32(1), 1–193.
- [16] Péneau, J. (1912). Notules hémiptérologiques (4). *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles de l'Ouest de la France*, 2(1), 91–99.
- [17] Haupt, H. (1919). Die europäischen Cercopidae Leach. (Blutröpfchen und schaumzikaden). *Entomologisches Jahrbuch*, 28(1), 152–172.
- [18] Haupt, H. (1922). Biologie und systematik der europäischen schaumzikaden. *Aus der Heimat*, 35(1/2), 1–28.
- [19] Nast, J. (1933). Beiträge zur Morphologie und geographischen Verbreitung der mitteleuropäischen und mediterranen Arten aus der Subfamilie Cercopinae (Homoptera, Cercopidae). *Annales Musei Zoologici Polonici*, 10(2), 7–32. <https://doi.org/10.3161/15053970FF1936.2.34.483>
- [20] Ossiannilsson, F., Russell, L. M. & Weber, H. (1970). 27. Homoptera. In S. L. Tuxen (Ed.), *Taxonomist's Glossary of Genitalia in Insects* (pp. 179–190). Copenhagen: J. Jorgensen & Co.
- [21] Holzinger, W. E., Kammerlander, I. & Nickel, H. (2003). The Auchenorrhyncha of Central Europe – Die Zikaden Mitteleuropas. Fulgoromorpha, Cicadomorpha excl. Cicadellidae. Leiden, Netherlands: Brill Publishers.
- [22] Fieber, F. X. (1872). Katalog der Europäischen Cicadinen, nach Originalien mit Benützung der Neuesten Literatur. Wien: Druck und Verlag von Carl Gerold's Sohn.
- [23] Cavanna, G. (1882). Hemiptera in catalogo degli animali raccolti al vulture, al pollino ed in altri luoghi dell'Italia meridionale e centrale. *Bollettino della Società Entomologica Italiana*, 14(1/2), 31–87.
- [24] Royer, M. (1906). Synonymie du *Trieiphora sanguinolenta* Scop. (Hém. Hom.) et de deux espèces voisines. *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 11(20), 297–298.
- [25] Metcalf, Z. P. (1961). General Catalogue of the Homoptera. Fascicle VII. Cercopoidea. Part 2. Cercopidae. Baltimore: Waverly Press.
- [26] Oshanin, V. T. (1910). Verzeichnis der palaearktischen hemipteren mit besonder berücksichtigung ihrer verteilung im russischen reiche, III. band, nachträge und verbesserungen zum I und II. bande. *Annuaire du Musée Zoologique de l'Académie Impériale des Sciences de St.-Petersbourg*, 15(1–16), 1–218.
- [27] Dlabola, J. (1965). Jordanische Zikaden (Homoptera Auchenorrhyncha). (Bearbeitung der von J. Klapperich im Jahre 1956–9 in Jordanien, Libanon und Syrien gesammelten Ausbeute). *Sborník entomologického oddelení Národního Musea v Praze*, 36(1), 419–450.
- [28] Dlabola, J. (1971). Taxonomische und chronologische ergänzungen zikadenfauna von Anatolien, Iran, Afghanistan, und Pakistan (Homoptera Auchenorrhyncha). *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, 68(6), 377–396.
- [29] Demir, E. (2008). The Fulgoromorpha and Cicadomorpha of Turkey. Part I: Mediterranean Region (Hemiptera). *Munis Entomology & Zoology*, 3(1), 447–522.
- [30] Demir, E. (2019). Biodiversity and zoogeography of Cicadomorpha (excl. Deltocephalinae) species from Southwestern Turkey (Insecta: Hemiptera). *Munis Entomology & Zoology*, 14(1), 236–243.
- [31] Demir, E. (2007). Contributions to the knowledge of Turkish Auchenorrhyncha (Homoptera, Fulgoromorpha and Cicadomorpha, excl. Cicadellidae) with a new record, *Setapius klapperichianus* Dlabola, 1988. *Munis Entomology & Zoology*, 2(1), 39–58.
- [32] Demir, E. (2006a). Preliminary report on the Auchenorrhyncha (Hemiptera) fauna of Kazdağı National Park with two new records for Turkey. *Acta Entomologica Slovenica*, 14(1), 89–102.
- [33] Demir, E. (2006b). Contributions to the knowledge of Turkish Auchenorrhyncha (Homoptera) with a new record, *Pentastiridius nanus* (Ivanoff, 1885). *Munis Entomology & Zoology*, 1(1), 97–122.
- [34] Kartal, V., Zeybekoğlu, Ü. & Özdemir, G. (1994). Samsun çevresinde Cercopidae (Hom., Auchenorrhyncha) familyası türleri üzerine taksonomik bir araştırma. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Dergisi*, 5(1), 147–157.
- [35] Tanyeri, R. & Zeybekoğlu, Ü. (2020). Color/ Pattern Variation of *Cercopis vulnerata* Rossi, 1807 (Auchenorrhyncha: Cercopidae) Populations of Northwestern Turkey. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 10(2), 266–273. <https://doi.org/10.31466/kfbd.724626>



## The effect of phosphorus doses on cotton growth under full and deficit irrigation conditions

Yusuf Ziya AYGÜN<sup>\*1</sup>, Mehmet MERT<sup>1</sup>  
ORCID: 0000-0001-9842-006X; 0000-0002-0457-0532

<sup>1</sup> Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops, 31060 Hatay, Turkey

### Abstract

Water shortages and harmful effects of excessive fertilizer use are present in cotton production areas. This study was carried out in three replications in greenhouse conditions according to split plots in randomized parcels to examine some growth parameters (plant height, number of leaf, amount of chlorophyll, fresh weight and dry weight) of different phosphorus doses in cotton under full and restricted irrigation conditions. Flash cultivar of *Gossypium hirsutum* L. species was used as plant material. Phosphorus dose of 16, 24, 32 and 40 mg kg<sup>-1</sup> was applied to the plants under 100%, 66% and 33% irrigation conditions. As a result, irrigation levels had a statistically significant effect on all parameters, whereas phosphorus doses had a statistically significant effect on all parameters except amount of chlorophyll. In terms of irrigation, it was determined that 33% water shortage did not cause significant decreases in plant height, number of leaves, chlorophyll amount, dry weight. In addition, it has been determined that irrigation levels are effective in phosphorus uptake and, water shortage conditions decrease the fresh and dry weights of cotton after P24 phosphorus level, and full irrigation conditions tend to increase these properties, albeit slightly.

**Key words:** cotton, restricted irrigation, phosphorus, drought stress, plant growth

----- \* -----

## Tam ve kısıntılı sulama koşullarında fosfor dozlarının pamuk gelişimine etkisi

### Özet

Pamuk üretim alanlarında, su sıkıntısı ve aşırı gübre kullanımının zararlı etkileri söz konusudur. Bu çalışma, 2012 yılında, tam ve kısıntılı sulama koşullarında farklı fosfor dozlarının pamukta bazı gelişim parametrelerini (bitki boyu, yaprak sayısı, klorofil miktarı, yaş ağırlık ve kuru ağırlık) incelemek üzere tesadüf parsellerinde bölünmüş parseller deneme desenine göre sera koşullarında üç tekerrürlü yürütülmüştür. Bitki materyali olarak *Gossypium hirsutum* L. türüne ait Flash çeşidi kullanılmıştır. Bitkilere tam sulama ile %66 ve %33 su kısıtı koşullarında; 16, 24, 32 ve 40 mg kg<sup>-1</sup> dozlarında fosfor uygulanmıştır. Araştırma sonucunda, sulama düzeylerinin tüm parametreler, fosfor dozlarının ise klorofil miktarı hariç incelenen diğer parametreler üzerinde istatistiki önemli olduğu gözlemlenmiştir. Sulama yönünden hafif su kısıtının (% 33) bitki boyu, yaprak sayısı, klorofil miktarı ve kuru ağırlıkta önemli oranda azalışlara neden olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca sulama düzeylerinin fosfor alımında etkili olduğu, su kısıtı koşullarının P24 fosfor düzeyinden sonra pamuğun yaş ve kuru ağırlıklarını azalttığı, tam sulama koşullarının ise bu özellikleri az da olsa artırma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** pamuk, kısıntılı sulama, fosfor, kuraklık stresi, bitki gelişimi

### 1. Introduction

Cotton is the most important fiber plant produced as a textile raw material source in the world. Cotton widely grown in the world between latitudes 37 ° North and 35 ° South; has been used in textiles and also the manufacture of a



number of products such as fishing net, sewing thread, rope, twine, automobile interior upholstery, explosives, plastic and photographic film with its fiber [1]. In addition, it is an important raw material of the oil industry with its seeds and the feed industry with its pulp [2]. Nowadays, cotton, which is widely produced in the world and is among the most important agricultural products, with its wide usage area and the added value it provides, is expected to maintain its importance in future predictions. Therefore, it is necessary to understand the factors that will hinder sustainability in cotton production and perhaps put it in a bottleneck.

There are various biotic and abiotic stress factors in plants especially cotton that slow or stop growth and development [1, 3, 4, 5, 6]. One of the most important of these factors is water restriction. Cotton is very sensitive to soil moisture. In order to make an economical production, a suitable prepared irrigation program and adequate irrigation should be performed at appropriate intervals in cotton cultivation. Components such as the climate of the region, soil conditions of the production area, and root depth, appearance and growing stage of plants are factors that should be considered in irrigation programs [7]. Optimum irrigation is completely normal conditions; plants are irrigated in a way that there is no decrease in yield and irrigation water is applied to increase the amount of moisture in the soil up to the field capacity. In case of limited water supply; considering the water-yield relationships of the plants, restricted irrigation is required according to the growing periods in which the plants need water the most [8]. Water stress in plants occurs especially during these periods. Cotton is very sensitive to water shortage during germination, pre-flowering and post-boll stages [1]. In restricted irrigation, instead of reaching maximum yield in crop production, it is possible to reduce irrigation water by considering a slight decrease in yield. In this way, it is possible to irrigate more areas with the same amount of water and to get more income from unit water.

Considering the probable water scarcity for East Mediterranean and the whole world at the present time and especially in the future, more economical irrigation conditions have been forced. For this reason, researches on limited irrigation levels and different irrigation methods are carried out in order to keep yield loss in agricultural products to a minimum. Water restriction of around 30% does not cause a significant decrease in cotton yield [9]. In a study conducted at Nazilli Cotton Research Institute, two times irrigation at 30-day intervals between the beginning of flowering and the formation of the boll in Nazilli 84 cultivar resulted in 11% yield reduction compared to normal irrigation [10]. [11] reported that [12] obtained the highest yield by irrigating 3 times (6 weeks after planting + flowering + boll formation) for NIAB-78 cotton cultivar and 2 times (6 weeks after planting + flowering period) for NIAB-86 cultivar. If irrigation can be made only once, it should be at the beginning of flowering [10].

Fertilization plays an important role in the development and productivity of the cotton plant as well as economically benefiting from irrigation water. However, especially the harmful effects of excessive fertilization should be avoided. It has been observed in studies that nitrogen, phosphorus and potassium, which are fundamental fertilizers [13], increase cotton productivity by 20-50% [2]. However, chemical inputs used in agricultural fields causes a significant environmental and health troubles [14]. Soil and water pollution are at the forefront of these problems, and industrial wastes, pesticide use and rapid urbanization also cause it [15]. Phosphorus, one of the main nutrients, is the building block of the cell nucleus and plays a considerable role in cell division and the development of meristematic tissues, thus increasing the number of flowers and bolls [16]. In addition, phosphorus plays a vital role in photosynthesis and respiration and is important for plant nutrition in the pre-ripening period in cotton. As the plant matures, phosphorus is transported from the leaves to the bolls [2]. Seed cotton contains 0.60% phosphorus on average and 52-62% of total phosphorus is accumulated in seeds. [17], observed that the amount of phosphorus in cotton with restricted irrigation varied between 0.15% and 0.22%. Cotton takes advantage of the phosphorus in the soil solution depending on the moisture.

All over the world, there are harmful effects of water shortage and excessive fertilizer use. The aim of this study was to determine the phosphorus utilization of cotton plants to be grown under restricted irrigation conditions and the effect of this situation on plant growth.

## 2. Material and method

The experiment was laid out according to the split plots in randomized parcels under greenhouse conditions with three replications in 2012. Greenhouse was located in Hatay Mustafa Kemal University. During the growing period, cotton was grown in 36 pots of 40 liters with a diameter of 44 cm and a height of 36 cm. Irrigation levels were placed in main plots and phosphorus levels were placed in sub plots. Flash cotton cultivar (*Gossypium hirsutum* L.) was used as the plant material. This early maturing, smooth leaf cultivar has broad adaptability to a wide range of soil types [18]. Cotton seeds were sown in pots in seedbed method in April 15. The test plots were irrigated when 60% of the available moisture capacity was consumed in the soil. The irrigation levels used in the experiment were given below:

IL100: irrigation water requirement fulfilled

IL66: Slight water restriction, 66% of irrigation water fulfilled

IL33: Severe water restriction, 33% of irrigation water fulfilled

Irrigation times for all treatments was determined according to [19].

Triple super phosphate was used as a phosphorus source. Phosphorus doses were arranged to be 16, 24, 32 and 40 mg kg<sup>-1</sup> (P16, P24, P32 and P40). Phosphorus treatments was applied at pre-sowing time.

The soil material used in the experiment was taken from the first 30 cm layer of the land, one of the most common samples of the Amik Plain [20], by filling in sacks and brought to the laboratory. After the said soils were dried in room conditions, they were blended and filled with 10 kg for each pot. In addition, physical properties of soil such as field capacity, wilting point and bulk density were determined. Fertilizers needed by the plant were given to pot soil at once at the beginning of the trial. To determine the field capacity; 100 grams of air dry soil was taken into a 50 ml glass cylinder, and then 10 ml of pure water was poured on it and closed so that it could not get air, and after 24 hours the amount of wetted soil was proportioned to the amount of dry soil. After calculating the field capacity, the wilting point was determined by proportionality over the field capacity value depending on the soil structure. Bulk density was calculated by the method of proportioning the air dry weights of the soils with a certain volume to the oven dry weights. The amount of chlorophyll was measured in the boll formation period, a few days before the harvest, with the chlorophyll meter separately from the lower and upper leaves. After boll formation, the plants were harvested 1 cm above the soil level. The cotton bolls were not waited to grow and mature, as main goal of this research was to examine overall biomass growth rather than fiber yield. Plant samples were harvested, washed with distilled water and dried in a drying cabinet at 65 ° C for 48 hours.

The results obtained from the study were evaluated in a computer program called IBM SPSS Statistics 24 [21] for statistical analysis and subjected to variance analysis. The means of the parameters were grouped by Tukey's multiple comparison test [22].

### 3. Results

The effect of different irrigation and phosphorus levels on plant height, leaf number and chlorophyll amount were given in Table 1. As a result of the research, the differences among the irrigation levels in terms of all three characteristics did not change according to the phosphorus doses. In other words, no interaction of irrigation levels x phosphorus doses was found (Table 1).

Table 1. Mean values for plant height, leaf number and chlorophyll content at different irrigation and phosphorus levels

Irrigation Levels	Plant Height (cm)	Leaf Number (per plant)	Chlorophyll Content (cci)
IL 33	78.00±1.50b	10.92±0.23b	45.75±0.59b
IL 66	82.83±2.03a	12.00±0.37a	47.00±0.64ab
IL 100	85.75±2.13a	12.42±0.31a	49.17±0.46a
P Levels			
P16	72.78±1.12b	11.56±0.34ab	46.22±0.81
P24	87.44±2.21a	12.22±0.46a	46.89±0.77
P32	83.67±1.08a	12.56±0.29a	47.56±0.67
P40	84.89±1.44a	10.78±0.28b	48.56±0.84
% CV	8.74	10.37	5.05
F <sub>IL</sub>	26.32**	25.90**	15.19*
F <sub>P</sub>	41.04***	9.524***	2.02 <sup>ns</sup>
F <sub>IL x P</sub>	2.01 <sup>ns</sup>	2.238 <sup>ns</sup>	0.40 <sup>ns</sup>

Positive effects of both different irrigation levels and phosphorus levels were observed in terms of plant height (Table 1). When the effect of irrigation levels on plant height was examined, the highest value was achieved in irrigation conditions with full irrigation (IL100) with 85.75 cm and slight water restriction (IL66) with 82.83 cm, while the lowest (78.00 cm) was obtained from plants with severe water restriction. As the water restriction increased, the plant height decreased (Table 1). It was reported that different irrigation levels were effective on average plant height in Adana [23] and Aydın conditions [24]. Moreover, the highest plant height was obtained from plants without water restriction [24]. When the effect of phosphorus applications on plant height was investigated, the highest value was recorded in P24 (87.44 cm), in addition P40 (84.89 cm) and P32 (83.67 cm) were included in the same statistical group. The shortest plants were measured in P16 (72.78 cm) application (Table 1). This result was consistent with the studies that report stunting [25], slowing growth and development [26] in plants in phosphorus deficiency.

Significant effects of different irrigation levels and phosphorus doses on leaf number were observed. When examined in terms of the effect of irrigation levels, the highest number of leaves was recorded in IL100 (12.42 per plant) and the lowest in IL33 (10.92 per plant) applications (Table 1). However, the number of leaves in full irrigation (IL100) and slight water restriction conditions (IL66) were in the same statistical group. When the effect of phosphorus levels was examined, the highest value was obtained from P32 (12.56 per plant) application, while the increase in phosphorus doses up to this point had an increasing effect in terms of leaf number. P32 and P24 did not show a statistically significant difference. The lowest number of leaves was found with 10.78 per plant in P40. Subsequently, the lowest value was obtained from P16 (11.56 per plant), that is the lowest phosphorus application. Consistent with previous studies, the number of leaves decreased in plants as a result of phosphorus deficiency [27, 28]. The effect of

phosphorus levels applied to cotton on the number of leaves may vary depending on the genotype [28].

In terms of chlorophyll amount, only the effect of irrigation levels was found to be statistically significant. As the water shortage increased, the amount of chlorophyll decreased. There is an inverse proportion between the water shortage and the amount of chlorophyll. The highest amount of chlorophyll was found in full irrigation (49.17 cci), similarly in plant height and leaf number, while the lowest result (45.75 cci) was found under severe water restriction (IL33). The amount of chlorophyll increased linearly with irrigation. This result indicated that photosynthesis slows down in plants under drought stress and there is a decline in the transport of photosynthesis products. [29] found amount of chlorophyll 38.9-50.1 in cotton. [30] reported the same results. The increase in phosphorus levels had an increasing effect on the amount of chlorophyll, but this increase was found to be statistically insignificant. However, in plants with phosphorus deficiency, the amount of chlorophyll may increase in some conditions, and in phosphorus deficiency, the regression of chlorophyll production occurs earlier unlike most other nutrient deficiencies [31].

The effects of different irrigation levels and phosphorus application on fresh weight and dry weight in cotton were given in Table 2. The fresh weight values of cotton at different irrigation levels were divided into three groups, while dry weight values were the lowest at the severe water restriction level, and the highest at the slight water restriction and the full irrigation level. This situation showed that the slight water restriction does not cause a significant decrease in dry weight. In terms of phosphorus levels, it was observed that fresh and dry weight values increased up to P24 level and then decreased.

Table 2. Mean values for fresh weight and dry weight at different irrigation and phosphorus levels

Irrigation Levels	Fresh Weight (g)	Dry Weight (g)
IL 33	35.55±3.16 c	23.51±0.91 b
IL 66	41.13±1.63 b	25.49±0.48 a
IL 100	48.49±1.69 a	25.78±0.52 a
P Levels		
P16	34.11±2.19 c	23.71±0.66 b
P24	48.62±2.06 a	26.73±0.68 a
P32	42.97±2.53 ab	25.79±0.77 a
P40	41.19±3.69 b	23.47±0.71 b
% CV	22.40	9.86
F <sub>IL</sub>	50.85**	11.86*
F <sub>P</sub>	12.90***	9.44***
F <sub>IL x P</sub>	3.80*	3.73*

The effects of phosphorus applications at different irrigation levels on fresh weight and dry weight were found to be statistically significant (Table 3).

Table 3. Interaction of irrigation and phosphorus levels on fresh weight and dry weight

		Irrigation Levels (%)				
		IL33	IL66	IL100	P Levels Avg±SE	
Fresh Weight	P Levels (mg kg <sup>-1</sup> )	P16	28.27±1.39 Cc	32.57±0.42 Bb	41.50±3.13 Ab	34.11±2.19
		P24	51.00±5.47 Aa	44.77±1.88 Ba	50.10±2.48 Aa	48.62±2.06
		P32	34.70±3.40 Cb	43.73±1.12 Ba	50.47±1.13 Aa	42.97±2.53
		P40	28.22±1.78 Cc	43.47±2.02 Ba	51.90±3.49 Aa	41.19±3.69
	IL Avg±SE	35.55±3.16	41.13±1.63	48.49±1.69		
Dry Weight	P Levels (mg kg <sup>-1</sup> )	P16	21.97±0.68 Bc	23.17±0.38 Bb	26.00±0.53 Ab	23.71±0.66
		P24	27.40±1.74 Aa	27.20±0.65 Aa	25.60±1.04 Bb	26.73±0.68
		P32	23.60±1.54 Cb	25.90±0.36 Ba	27.87±0.18 Aa	25.79±0.77
		P40	21.07±0.69 Cc	25.67±0.45 Aa	23.67±0.26 Bc	23.47±0.71
	IL Avg±SE	23.51±0.91	25.49±0.48	25.78±0.52		

Capital letters represent irrigation levels for each dose of phosphorus, lowercase letters represent phosphorus doses for each irrigation level. While the highest fresh weight value was determined at P24 phosphorus level in severe water restriction, it was observed that fresh weights decreased in other high dose phosphorus applications (P32 and P40). Also under slight water restriction conditions, the highest fresh weight was detected at the P24 dose, but the downward trend after this dose was observed to be less than in severe water restriction conditions. Under full irrigation conditions, at higher doses compared to P16 dose, there was a linear increase in fresh weight, albeit slightly, with the increase in phosphorus dose (Figure 1). The same situation appeared in terms of dry weight, although it was not obvious. This results indicated that irrigation levels were effective in phosphorus intake. This effect may also vary depending on the genotype [28].

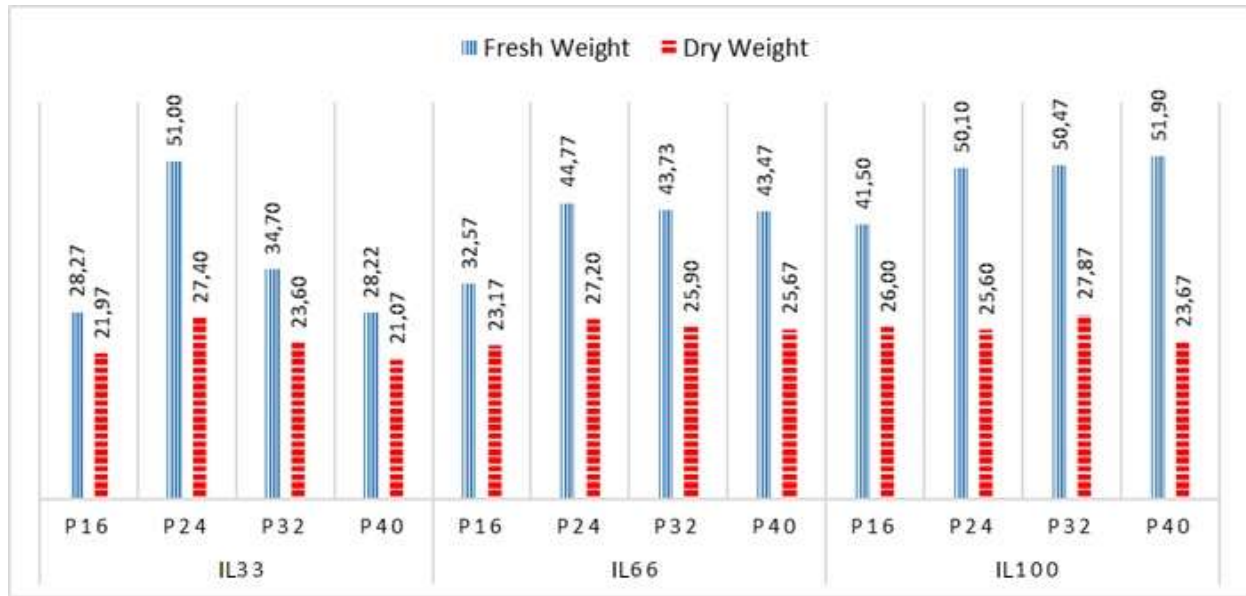


Figure 1. Effects of phosphorus applications at different irrigation levels on fresh weight and dry weight

#### 4. Conclusion and discussion

In this research which the effects of different phosphorus doses on cotton growth under full and restricted irrigation conditions, it has been observed that irrigation levels had statistically significant effects on plant height, leaf number, chlorophyll amount, fresh weight and dry weight. On the other hand, phosphorus doses had an effect on parameters other than chlorophyll content, while the interaction of the two factors in terms of dry weight and fresh weight was found to be statistically significant.

In terms of plant height, number of leaves and chlorophyll amount, the values obtained when 66% of the plant water need was met, showed statistically similarity with the results obtained under full irrigation conditions. When the irrigation level was reduced to 33%, the values obtained from these parameters, contained a significant difference considering other irrigation levels. Decrease in the water amount of the soil reduces the efficiency of phosphorus use [26].

While P16 application gave the lowest plant height result, a difference among the phosphorus doses higher than P16 was not detected. The lowest result in terms of the number of leaves was achieved in the P40 application.

It has been clearly demonstrated that cotton is highly sensitive to water stress and phosphorus doses up to boll formation. It has been reported that cotton is susceptible to water stress before flowering [32] and during the boll formation period [33]. However, according to [33], the effects of this stress vary according to the genotype of the plant.

When all these results were evaluated, determination and development of cultivars that are tolerant to water restriction in cotton, especially in early phenological periods; it is deemed necessary to carry out researches in order to reduce drought stress in plants in a sustainable way in limited irrigation conditions.

It should be taken into consideration that the results may represent similar soil and climatic conditions, because the research was conducted in greenhouse conditions with the soil taken from Amik Plain and Flash cotton cultivar.

#### Acknowledgment

This study was supported by the Hatay Mustafa Kemal University Coordinatorship of Scientific Research Projects with the project number 1105 Y 0137.

#### References

- [1] Mert, M. (2020). *Lif Bitkileri*. NOBEL Yayınları No: 1734, Üçüncü Baskı. Ankara.
- [2] Mert, M. (2011). *Pamuk Tarımının Temelleri*, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Teknik Yayınlar Dizisi, No:7, İkinci Baskı, Hatay.
- [3] Ertekin, İ., Yılmaz, Ş., Atak, M., Can, E., Çeliktaş, N. (2017). Tuz Stresinin Bazı Yaygın Fiğ (*Vicia sativa* L.) Çeşitlerinin Çimlenmesi Üzerine Etkileri. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22(2), 10-18.
- [4] Ertekin, İ., Yılmaz, Ş., Atak, M., Can, E. (2018). Effects of Different Salt Concentrations on the Germination Properties of Hungarian Vetch (*Vicia pannonica* Crantz.) Cultivars. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Science*, 5(2), 175-179.
- [5] Ertekin, İ., Atış, İ., Yılmaz, Ş. (2020). Bazı fiğ türlerinin yem verim ve kalitesi üzerine farklı organik gübrelerin

- etkileri. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 25(2), 243-255.
- [6] Aygün, Y.Z., Mert, M. (2020). Toprak düzenleyicileri ve azot uygulamalarının pamukta (*Gossypium hirsutum* L.) verim ve lif teknolojik özelliklere etkisi. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 13 (3) , 290-297.
- [7] Tekinel, O., Kanber, R. (1989). *Pamuk Sulamasının Genel İlkeleri*. Ç.Ü. Zir. Fak. Yardımcı Ders Kitapları Yay. No: 18, Adana.
- [8] Günel, E., Mert, M. (1998). Pamuk Tarımında Kuraklığa Karşı Alınması Gereken Önlemler ve Kuraklığa Karşı Dayanıklı Pamuk Çeşitlerinin Geliştirilmesi, *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3(1), 99-114.
- [9] Tekinel, O., Kanber, R. (1979). Çukurova Koşullarında Kısıntılı Su Kullanma Durumunda Pamuğun Su Tüketimi ve Verimi. Tarsus Bölge Topraksu Araştırma Enstitüsü Yayın no:98, rapor no: 48, Tarsus.
- [10] Şahin, A., Ekşi, I., Kıvılcım, M.N., Özbek, N. (2000). Melezleme Islahı ile Kuraklığa Dayanıklı pamuk Çeşitlerinin Geliştirilmesi. Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü Müd. Yayın no: 56, Nazilli.
- [11] Yar, A., Iqbal, M.S., Ali, A., Akram, H.M., Saeed, M., Sahi, K.A. (2003). Optimum Time of Last Irrigation for Cotton Cultivars FH-634 and CIM-443. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2(4), 365-367.
- [12] Shah, S.H., Kiani, M.S., Malik, M.A. (1999). Growth and Yield Response of Two Cotton Cultivars to Irrigation Frequency. *J Agri and Plant Sci*, 9: 61-64.
- [13] Aygün, C., Kara, İ., Sever, A.L., Erdoğan, İ., Atalay, A.K., Özyayın, K.A., ... & Bozkurt, M. (2017). Eskişehir İli Meralarının Azotlu ve Fosforlu Gübre Gereksinimlerinin Belirlenmesi. *Toprak Su Dergisi*, 6(1), 44-51.
- [14] Ertekin, E.N., Ertekin, İ., Bilgen, M. (2020). Effects of Some Heavy Metals on Germination and Seedling Growth of Sorghum. *KSU Journal of Agriculture and Nature*, 23(6), 1608-1615.
- [15] Yücel, E., Edirnelioğlu, E., Soydam, S., Çelik, S., & Çolak, G. (2009). Porsuk çayında ağır metal kirlilik düzeylerinin *Myriophyllum spicatum* Başaklı Sucivanperçemi bitkisi ile biyomonitörlenmesi. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 3(2), 133-144.
- [16] Russell, E.W. (1973). *Soil Condition and Plant Growth*. The English Language Book Society and Longman, London.
- [17] Ektiren, Y., Değirmenci, H. (2018). Kısıntılı Sulama Uygulamalarının Pamukta (*Gossypium hirsutum* L.) Yaprak Bitki Besin Elementlerine Etkisi. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg*, 21(5), 691-698.
- [18] Anonymous. (2021). ProGen Seed. <https://www.progenseed.com/progen/20/cotton-seed-flash.html> (Date of access 11.08.2021).
- [19] Hake, S.J., Grimes, D.W., Hake, K.D., Kerby, T.A., Munier, D.J., Zelinski, L.J. (1996). Irrigation scheduling. In Hake SJ, Kerby TA and Hake KD (eds.) Cotton production manual. P. 228-247. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Publication, 3352.
- [20] Kılıç, Ş., Ağca, N., Karanlık, S., Şenol, S., Aydın, M., Yalçın, M., ... Çullu, M.A. (2008). "Amik Ovasının Detaylı Toprak Etütleri, Verimlilik Çalışması ve Arazi Kullanım Planlaması" Devlet Planlama Teşkilatı (DPT) Projesi, Proje no: DPT2002K120480, Hatay.
- [21] IBM Corp. Released. (2016). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- [22] Tukey, J.W. (1953). The Problem of Multiple Comparisons. Unpublished Manuscript, Princeton University, Princeton, NJ.
- [23] Kaçar, M.M. (2007). Farklı Su ve Gübre Sistemlerinin Pamuk Bitkisinde Su Stres İndeksinin Değişiminin İncelenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsa Yapılar Ve Sulama Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 45 sy.
- [24] Dağdelen, N., Sezgin, F., Gürbüz, T., Yılmaz, E., Akçay, S. (2009). Farklı Sulama Aralığı ve Sulama Düzeylerinin Pamukta Bazı Verim Özellikleri ve Lif Kalitesi Üzerine Etkisi. *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6(1), 53-61.
- [25] Özen, H.Ç., Onay, A. (2013). Bitki Fizyolojisi. Nobel Yayınları No:578. İkinci Baskı, Ankara.
- [26] Kaçar, B. (2020). Sürdürülebilir Tarımda İnsanda ve Hayvanlarda Fosfor, NOBEL Yayınları No: 2588, 1. Baskı, Ankara.
- [27] Lynch, J., Lauchli, A., Epstein, E. (1991). Vegetative Growth of the Common Bean in Response to Phosphorus Nutrition. *Crop Sci*, 31, 380-387.
- [28] Iqbal, A., Gui, H., Zhang, H., Wang, X., Pang, N., Dong, Q., ... Song, M. (2019). Genotypic Variation in Cotton Genotypes for Phosphorus-Use Efficiency. *Agronomy*, 9(11), 689.
- [29] Yazdıç, M., Değirmenci, H. (2018). Pamukta Farklı Sulama Seviyelerinin Yaprak Su Potansiyeli ve Klorofil Değerine Etkisi. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg*, 21(4), 511-519
- [30] Brevedan, E.R., Hodges, H.F. (1973). Effects of Moisture Deficits on 14C Translocation in Corn (*Zea mays* L.). *Plant Physiology*, 52(5), 436-439.
- [31] Rao, I.M., Terry, N. (1989). Leaf Phosphate Status, Photosynthesis, and Carbon Partitioning in Sugar Beet. I. Changes in Growth, Gas Exchange, and Calvin Cycle Enzymes. *Plant Physiol*, 90, 814-819.
- [32] Loka, D.A. (2012). Effect of Water-Deficit Stress on Cotton During Reproductive Development. PhD Thesis, University of Arkansas, Fayetteville.
- [33] Loka, D.A., Oosterhuis, D. (2012). Water Stress and Reproductive Development in Cotton. Department of Crop, Soil, and Environmental Sciences University of Arkansas, Fayetteville, AR 72704, Chapter 5.



## Assessment the *Promachus leoninus* Loew 1848 (Diptera: Asilidae) Species, with COI and NADH<sub>2</sub> gene regions, with new locality records in Anatolia

Ebru Ceren FİDAN \*<sup>1</sup>, Hakan ÇALIŞKAN<sup>2</sup>, Adem ARSLAN<sup>3</sup>, Davut Ümit ŞİRİN<sup>4</sup>

ORCID IDs: 0000-0002-6121-4585, 0000-0001-7879-6449, 0000-0003-2269-9417, 0000-0001-7327-4043

<sup>1,2,4</sup> Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Science and Letters, Biology Department, Eskisehir, Turkey

<sup>3</sup> Eskisehir Osmangazi University, Mahmudiye, Horse Breeding Vocational School, Eskisehir, Turkey

### Abstract

*Promachus leoninus* Loew 1848 is known to be distributed just in the western part of Anatolia for a very long time. In the present study additional information is given about the distribution of this species with a new and previous localities map. Assessment of new populations evaluated phylogenetically with the COI and NADH<sub>2</sub> gene regions. As a result of this analysis the new populations are grouped into 3 different diverging populations. Genital features and habitus of the male specimen are photographed.

**Keywords:** Asilidae, phylogeny, new locality, COI, NADH<sub>2</sub> Turkey

## *Promachus leoninus* Loew 1848 (Diptera: Asilidae) Türünün COI ve NADH<sub>2</sub> gen bölgeleri ile değerlendirilmesi ve Anadolu'da yeni lokalite kayıtları

### Özet

*Promachus leoninus* Loew 1848'un çok uzun zamandan beri Anadolu'nun sadece batısında yayılış gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada, yeni ve eski yerleşim haritası ile bu türün yayılışları hakkında ek bilgi verilmektedir. Elde edilen yeni popülasyonlar COI ve NADH<sub>2</sub> gen bölgeleri ile birlikte filogenetik olarak değerlendirilmiştir. Analizler sonucunda yeni popülasyonların birbirinden farklılaşmakta olan 3 popülasyon şeklinde gruplandığı görülmüştür. Erkek bireyin genital özellikleri ve habitusu fotoğraflanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Asilidae, filogeni, yeni lokalite, COI, NADH<sub>2</sub> Türkiye

### 1. Introduction

Ecological balance is known as a state of dynamic equilibrium within a community of organisms. The balance should be in the number of each species in an ecosystem. Predator groups are very important because of their stabilize feature on the specimen number in a community.

Asilidae is one of the essential groups of these predators, in controlling numerous insect groups many of which are harmful. This family represents 7104 described species and 776 genera in the world [1], 1688 species in Palearctic and nearly 241 species and 9 subspecies are reported from Anatolia [2].

There are many taxonomical and ecological studies about Turkish robber flies (e.g. [3; 4; 5]). However, despite the increasing number of phylogenetic studies about Asilidae in the world ([6; 7; 8; 9]) there is no study in Anatolia about the phylogeny of this group. Therefore, it is important to study the phylogeny of taxa belonging to Asilidae in our country.

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: Tel.: +902222393750; Fax.: +902222291418; E-mail: ebruceren@ogu.edu.tr

*Promachus* genus, which has 223 species worldwide, is infrequent for Turkish Asilidae fauna since five species of this genus are known from Anatolia; *Promachus canus canus* (Wiedemann, 1818), *Promachus canus leontochlaenus* Loew, 1871, *Promachus leoninus* Loew, 1848, *Promachus microlabis* Loew, 1857, *Promachus mustela* Loew, 1854 [1]. Among these the *Promachus leoninus* is distributed in Azerbaijan, Bosnia-Herzegovina, Croatia, Greece, India, Iran, Israel, Myanmar (Burma), Romania, Russia, Slovenia, Turkey on Palearctic ([10; 11; 12]). The species is known to be distributed in the western part of Anatolia on following provinces; Balıkesir, Aydın, Muğla, Ankara, Adana, Adıyaman, Afyon, Antalya, Denizli, Isparta, Mersin, Çanakkale, Eskişehir [13].

So, in the present study we aimed; (i) to provide a new data about the distribution of *P. leoninus*. (ii) to present illustration of its morphological and genital features (iii) make phylogenetic assessment with COI and NADH<sub>2</sub> gene regions (iv) Enter the gene bank first gene region records from Anatolia about the Asilidae.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sampling and identification

This study is based on 21 specimens collected from 12 localities of 6 provinces in June and July on 2018 (Table 1; Figure 1). The specimens are identified with the [14] literature. Habitus and genital features were photographed with Leica DFC 490 camera, attached to a Leica MZ 16 microscope. Specimens are deposited in the Entomology collection, Department of Biology, Eskişehir Osmangazi University.

Table 1. Study site information of *P. leoninus* specimens

Study site	Province	Locality	Date	Coordinate		Altitude
				Latitude (N)	Longitude (E)	
1	Amasya	Yeşilöz	26.06.2018	40°33'0.06"	36°8'56.31"	855 m
2	Erzurum	Gelinalan village	29.06.2018	40° 7'59.29"	42°33'26.62"	1472 m
3	Erzurum	Horasan	29.06.2018	40° 1'56.84"	42° 7'41.07"	1560 m
4	Erzurum	Mercimekli	30.06.2018	40° 3'26.58"	41°49'33.04"	1860 m
5	Erzurum	Samikale village	30.06.2018	40°23'32.36"	41°55'58.66"	1506 m
6	Erzurum	Oltu village	30.06.2018	40°31'0.99"	41°57'49.70"	1322 m
7	Erzurum	Oltu village 2	30.06.2018	40°34'26.56"	42° 1'9.94"	1244 m
8	Erzurum	Korucuk village	30.06.2018	40°30'29.18"	41°49'53.91"	1538 m
9	Sivas	Tödürge village	03.07.2018	39°51'46.09"	37°36'56.01"	1338 m
10	Yozgat	Alicik village	03.07.2018	39°47'8.77"	35°58'35.92"	1302 m
11	Bitlis	Süphan mountain/Kıskıllı village	24.07.2018	38°54'55.59"	42°54'38.71"	2250
12	Edirne	Ashhanlar Village	19.06.2018	41°25'0.54"	26°47'53.96"	73 m



Figure 1. General view of collecting site

## 2.2. Molecular taxonomy

In this study we studied the two gene regions of mitochondrial DNA; Cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene region and NADH subunit 2 (NADH<sub>2</sub>) (Table-2). Total DNA was extracted with the Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification kit. The primer sequencing was gathered from [15].

COI: 1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'-

3014:5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'.

NADH<sub>2</sub>: N2L-J210: 5'-AATTAAGCTAATGGGTTTCATACCC-3'-

TW-N1284: 5' AYAGCTTTGAARGYTATTAGTTT-3'

Table 2. Phylogenetic study information of specimens

Locality	Province	Date	COI codes	Accession codes-COI	NADH <sub>2</sub> codes	Accession codes-NADH <sub>2</sub>
Yeşilöz	Amasya	26.06.2018	1CamayesPrI	OL415109	1NamayesPrI	OL462856
Gelinalan village	Erzurum	29.06.2018			3NerzgelPrI	OL462855
Gelinalan village	Erzurum	29.06.2018	4CerzgelPrI	OL415106	4NerzgelPrI	OL462854
Gelinalan village	Erzurum	29.06.2018			5NerzgelPrI	OL462853
Horasan	Erzurum	29.06.2018	6CerzhorPrI	OL415105	6NerzhorPrI	OL462852
Horasan	Erzurum	29.06.2018			7NerzhorPrI	OL462851
Mercimekli	Erzurum	30.06.2018	8CerzmerPrI	OL415104	8NerzmerPrI	OL462850
Samikale village	Erzurum	30.06.2018	9CerzsamPrI	OL415103	9NerzsamPrI	OL462849
Samikale village	Erzurum	30.06.2018	10CerzsamPrI	OL415102	10NerzsamPrI	OL462848
Oltu village	Erzurum	30.06.2018	11CerzolPrI	OL415101	11NerzolPrI	OL462847
Oltu village	Erzurum	30.06.2018	12CerzolPrI	OL415100	12NerzolPrI	OL462846
Oltu village 2	Erzurum	30.06.2018	13CerzolPrI	OL415099	13NerzolPrI	OL462845
Oltu village 2	Erzurum	30.06.2018			14NerzolPrI	OL462844
Küçük Korucuk	Erzurum	30.06.2018	15CerzkucPrI	OL415098	15NerzkucPrI	OL462843
Tödürge village	Sivas	03.07.2018			16NsivtodPrI	OL462842



Alicik village	Yozgat	03.07.2018	17CyozaliPr1	OL415097	17NyozaliPr1	OL462841
Aslıhanlar village	Edirne	19.06.2018	20CedasPr1	OL415096	20NedasPr1	OL462840
Aslıhanlar village	Edirne	19.06.2018	21CedasPr1	OL415095	21NedasPr1	OL462839

Polymerase chain reaction (PCR) was made in 50 µl volume; 0,2 µl from primers (100 pm), 1 µl dNTP mix (10 mM), 4 µl 150 mM MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 5 ml Standard Taq reaction Buffer 10X [containing 10 mM Tris–HCl (pH 8.3), 50 mM KCl], 0.25 TaqDNA polymerase (New England Bio labs), and 3 µl of sample DNA. PCR cycling parameters; denaturation at 95°C for 30 sec, 35 cycles of 95°C for 20 sec., annealing at 41°C for 30 sec, elongation 72°C for 1min 40 sec. and final extension 72°C 5 min. Results were viewed with agarose gel electrophoresis by running 3 µl of PCR product. DNA purification step and Sanger sequence analysis were carried out by Macrogen Europe (Amsterdam, the Netherlands).

### 2.3. Data analysis

We used 13 COI and 18 NADH<sub>2</sub> sequences of *Promachus leoninus* for analyses. Two outgroups are used for COI dataset; *Leptogaster cylindrica* (Accession code: OL415107) and *Dysmachus bifurcus* (Accession code: OL415108) (our own samples) and one outgroup is gathered from NCBI for NADH<sub>2</sub> dataset (Accession code: EF216223.1) *Drosophila guanche*. All of the sequences were checked manually with SEQUENCER v. 4.1 (Gene Codes Corporation). The alignment was made with MEGA v.7 [15] and the program was used for calculating the conservative, variable and parsimony-informative sites. Haplotypes and their frequency were determined with DnaSP v.5 [17]. Sequences are deposited in the Genbank database (accession number can be seen at Table 2). The best fit evolutionary model for the data matrix was estimated by jModelTest v.0.1.1 [18].

Sequences were analyzed with three different phylogenetic methods; (i) Maximum parsimony (MP) by PAUP Version 4.0b10 [19], with 100 random additions, with nearest neighbor interchange (NNI) algorithm and heuristic search approach. (ii) Maximum Likelihood (ML) with raxmlGUIversion 1.5 [20] with ML-rapid 1000 bootstrap option. (iii) Bayesian phylogenetic inference (BI) analyses with MrBayes v.3.1.2 [21] program, four simulations of Markov chains, 10 M generations and sampling every 100<sup>th</sup> generations and with the program the 1000 trees were discarded as burn-in.

We applied to the COI matrix two different analyses to test species limits. DNA sequence-based analysis TCS [22] and Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) programs were applied to the dataset to make species delimitation test.

## 3. Results

### 3.1. Plot summary of morphology

Body; slender with a dense hair, the color of the body is dark metallic which is bright to pale, with yellow to orange bands, with these colors the species reminds bees. Thorax; pronotum with hairs. Wings are transparent and clear (Figure 2b), legs are strong and also covered with striped with black and yellow dense hair (Figure 2a). Head; typically slender with big black dichoptic eyes (varies to green blue), antenna's 3rd segment is elongated thinning at the end (Figure 2c). Mouthparts are black and very strong. The aedeagus is conspicuously long and can be seen at the end of the abdomen (Figure 2d-f). Gonocoxites are not fused. Dististylus broad, curved with a pointed end and with setae at the ventral margin. Hypandrium short, with rounded sides and laterally short setae.

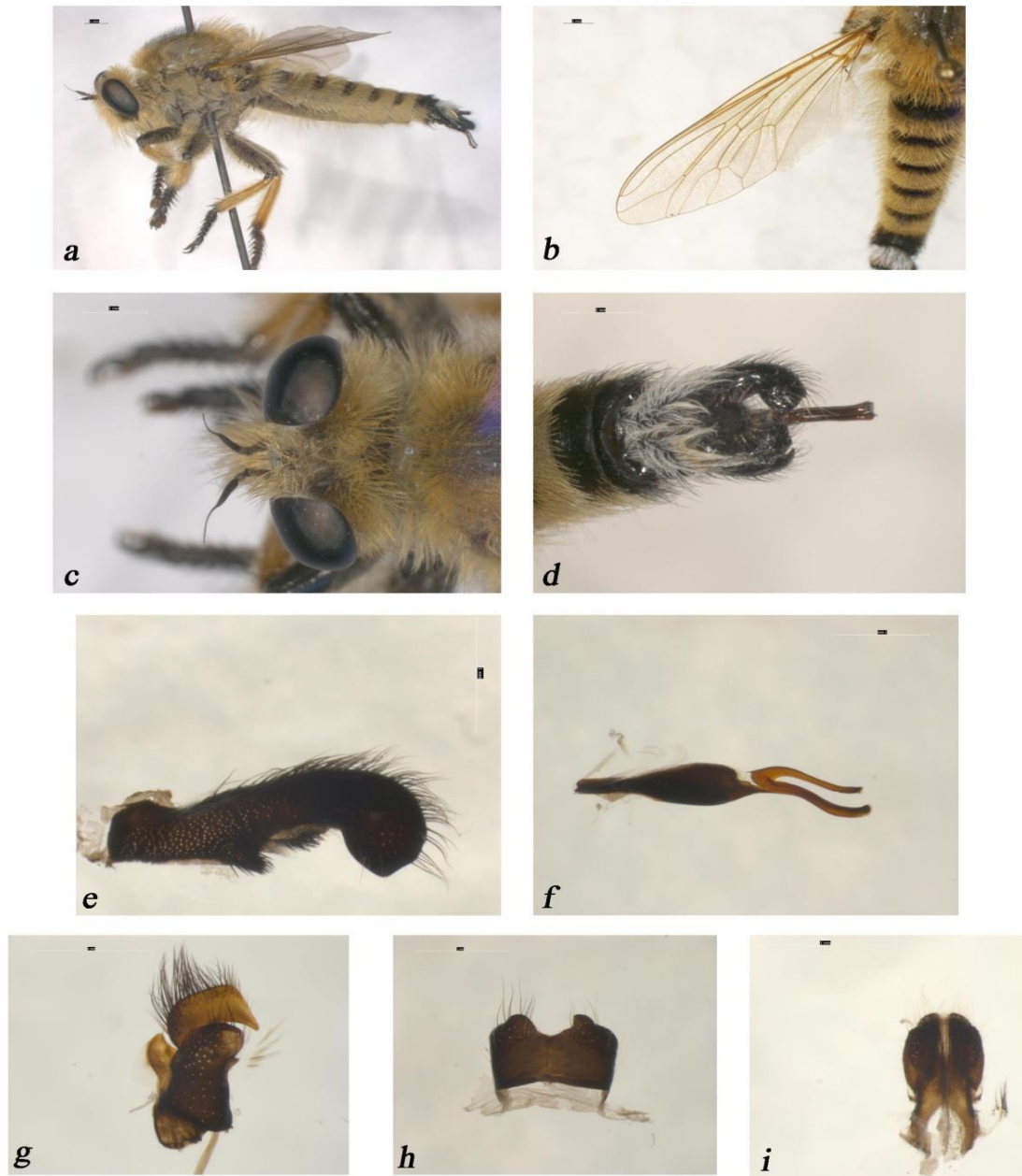


Figure 2. a-i. A male *Promachus leoninus* Loew 1848. a-lateral view of specimen b-wing c-dorsal sight of the head with antennae d-last abdominal segment with aedeagus e-epandrium f-lateral view of aedeagus g-gonocoxite and dististylus h-hypandrium i- proctiger

### 3.2. Molecular assessment with mtDNA gene regions

The sequences of *Promachus leoninus* (13 COI and 18 NADH<sub>2</sub>) were checked with BLAST program after alignment. Data set for COI with 15 sequences (with two outgroups) and 1222 base pairs and for NADH<sub>2</sub> with 19 sequences (with one outgroup) and 1001 base pairs were obtained. The tables can be checked for detailed information (Table-3 about data sets and Table-4 for haplotypes for two gene regions).

Table 3. Sequence and haplotype informations of COI and NADH<sub>2</sub> gene regions

	Number of Sequence	Total Number of Sites	Conserved	Variable	Pars-inf	Number of Haplotypes	Haplotype Diversity
COI	15	1222	901	321	117	13	0,9810
NADH <sub>2</sub>	19	1001	715	286	31	10	0,7836

Table 4. Detailed information about Haplotypes

COI gene region		NADH <sub>2</sub> gene region	
Number of haplotypes	h: 13	Number of haplotypes	h:10
Haplotype diversity	Hd: 0,9810	Haplotype diversity	Hd: 0,7836
Hap_1: 1	21CedasPr1	Hap_1: 1	21NedasPr1
Hap_2: 1	20CedasPr1	Hap_2: 1	20NedasPr1
Hap_3: 1	17CyozaliPr1	Hap_3: 1	17NyozaliPr1
Hap_4: 2	15CerzkucPr1 13CerzolPr1	Hap_4: 1	16NsivtodPr1
Hap_5: 1	12CerzolPr1	Hap_5: 9	15NerzkucPr1 13NerzolPr1 9NerzsamPr1 8NerzmerPr1 7NerzhorPr1 6NerzhorPr1 5NerzgelPr1 4NerzgelPr1 3NerzgelPr1
Hap_6: 1	11CerzolPr1	Hap_6: 2	14NerzolPr1 11NerzolPr1
Hap_7: 1	10CerzsamPr1	Hap_7: 1	12NerzolPr1
Hap_8: 2	9CerzsamPr1 6CerzhorPr1	Hap_8: 1	EF216223.1_Drosophil <i>Outgroup</i>
Hap_9: 1	8CerzmerPr1	Hap_9: 1	10NerzsamPr1
Hap_10: 1	4CerzgelPr1	Hap_10: 1	1NamayesPr1
Hap_11: 1	1lckirder <i>Outgroup</i>		
Hap_12: 1	1dbkirkof <i>Outgroup</i>		
Hap_13: 1	1CamayesPr1		

### 3.3. COI gene region results

The dataset file was converted into different formats with Mesquite and Alter programs for use in phylogenetic analysis. Haplotype diversity was calculated as 0,9810 for COI with DnaSP v.5. There is no haplotype sharing; all the haplotypes are unique sequences except haplotypes 4 and 8 (Table-4). The jModelTest v.0.1.1 suggested the evolutionary model as GTR+G according to AIC (Akaike Information Criterion), with p-inv = 0.2571 gamma shape = 0.4450.

Maximum likelihood, Maximum parsimony, Bayesian Phylogenetic inference analyses are result in a resembling tree topology, therefore all results are shown on BI tree (Figure 3). Haplotypes of individuals were grouped (with strong branch node values) according to population structure as expected. The Edirne, Erzurum and Yozgat-Amasya populations are branched as ingroups. The network analysis is also consistent with the phylogenetic analysis results (Figure 4). We can also observe same the population ingroups in this analysis. TCS (%90) Species delimitation test suggested two different species while TCS (%95) test suggested three populations as three different species, but morphological differences were not observed among the individuals of the population. Also, ABGD test is suggesting that all of the haplotypes belong to single species. Therefore, these populations can be considered as diverging populations and not as separate species.

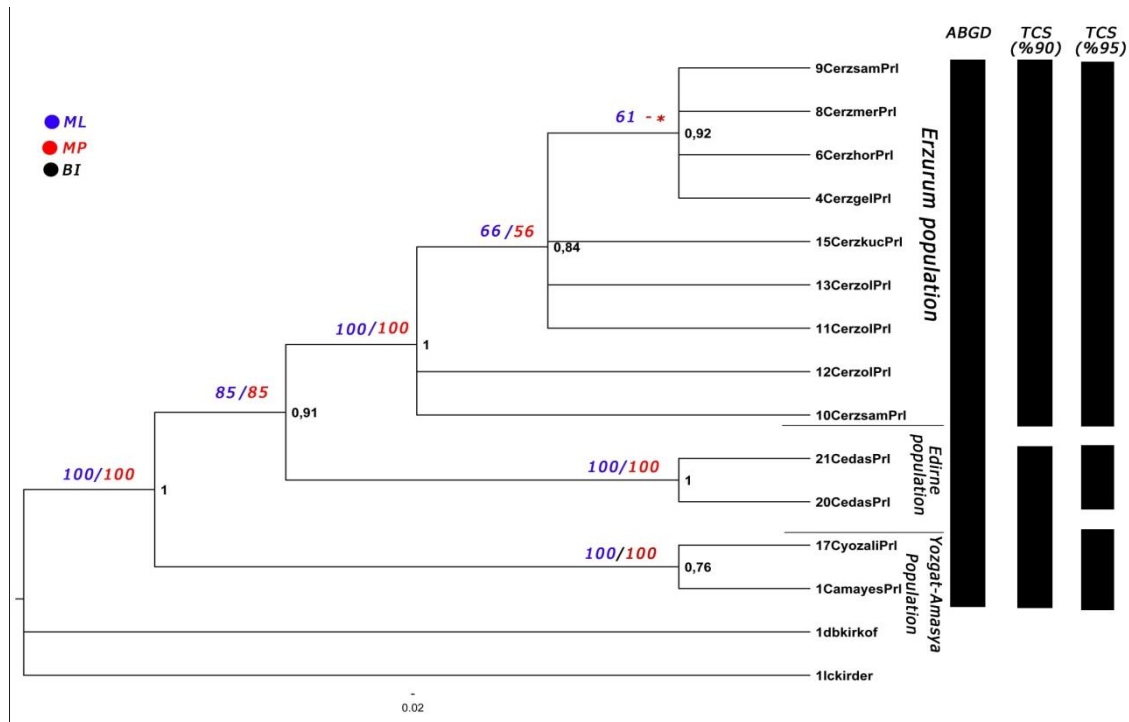


Figure 3. ML, MP, BI analyses results of COI gene region. Bootstrap values (MP-ML) and posterior probability values (BI) are shown. Respectively; Black is for BI, red is for MP and blue is for ML. (\*) indicates 50% and below values or not supported by the respective analyses. ABGD and TCS Species delimitation tests are mapped on the tree.

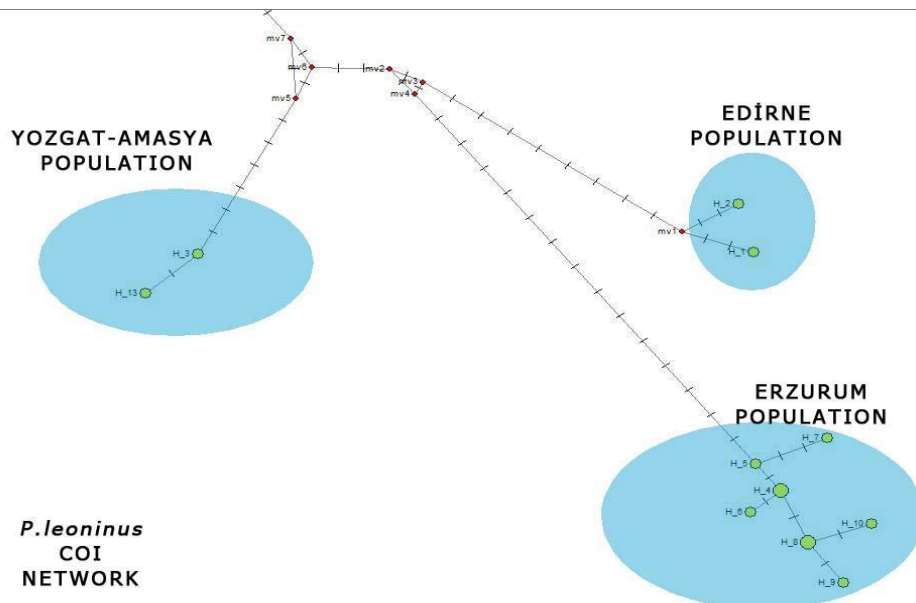


Figure 4. Network analysis results of COI gene region

### 3.4. NADH<sub>2</sub> gene region results

Haplotype diversity was calculated as 0, 7836 for NADH<sub>2</sub> with DnaSP v.5. There is no haplotype sharing; all the haplotypes are unique sequences except haplotype 8 (Table-4). The jModelTest v.0.1.1 suggested the evolutionary model as GTR+G according to AIC (Akaike Information Criterion), with p-inv = 0.5140 gamma shape = 100.0000.

All the analyses (ML, MP and BI) are resulted in the same tree topology, shown on MP tree (Figure 5). As seen in the phylogenetic analyses made with the COI gene region, the haplotypes are branched according to the populations, but the branch support values are lower. The branch support value (BI: >50, ML: 54, MP: 70) at the branch node of the Edirne and Yozgat-Amasya populations seems to be quite low (Figure 5). We can observe the same result on network analysis. Network analyses resulted in same way as in phylogenetic analyses. We can see the haplotypes are grouped in three different populations (Yozgat-Amasya population, Edirne population and Erzurum population) (Figure 6).

TCS (%95) Species delimitation test suggested two different species but morphological differences were not observed among the individuals of the population. All of the haplotypes are belong to single species according to TCS (%90) and ABGD tests.

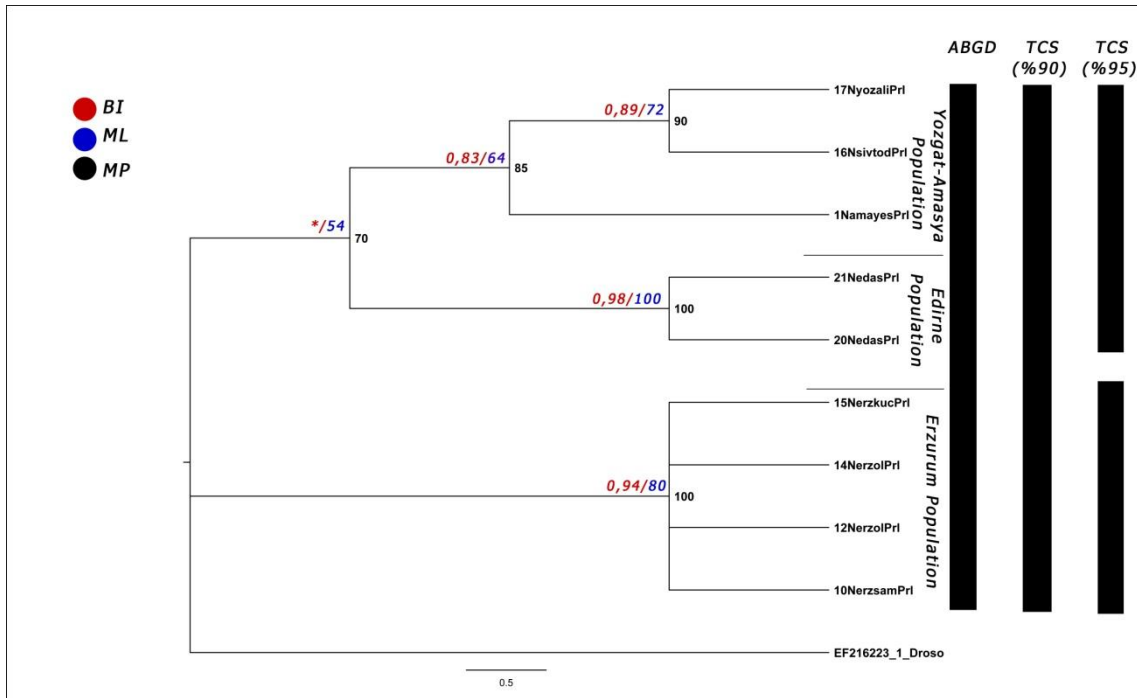


Figure 5. ML, MP, BI analyses results of NADH<sub>2</sub> gene region. Bootstrap values (MP-ML) and posterior probability values (BI) are shown. Respectively; Black is for BI, red is for MP and blue is for ML. (\*) indicates 50% and below values or not supported by the respective analyses. ABGD and TCS Species delimitation tests are mapped on the tree.

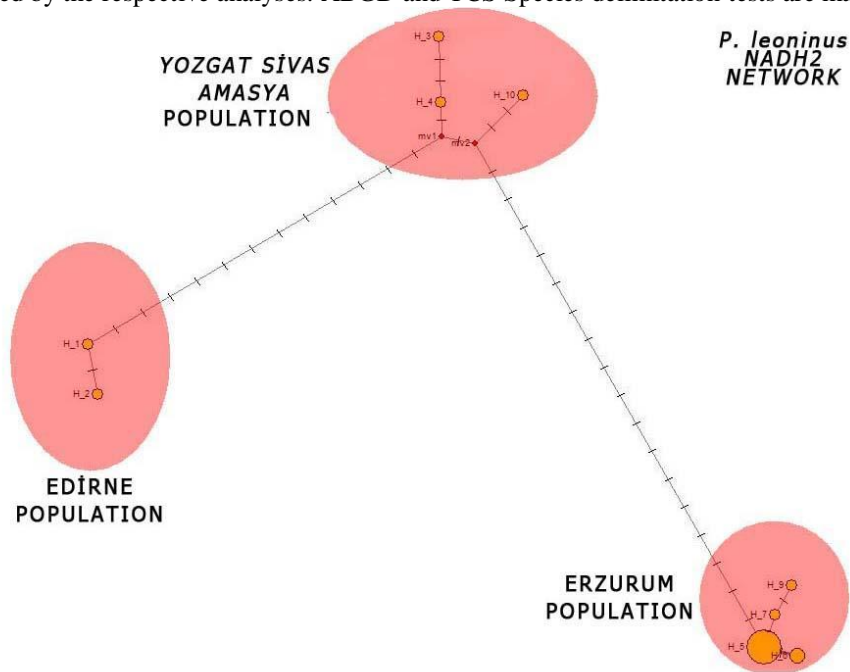


Figure 6. Network analysis results of NADH<sub>2</sub> gene region

#### 4. Conclusions and discussions

The distributional area of *P. leoninus* was known from South and West part of Anatolia. 21 specimens (14 male and 7 female) are collected from east part of Anatolia, Middle Black Sea and the Trace region (Figure 7). The specimens examined here present a new distribution record for *P. leoninus*, which is considerably enlarging the distributional area to east part of Anatolia and the Trace region.

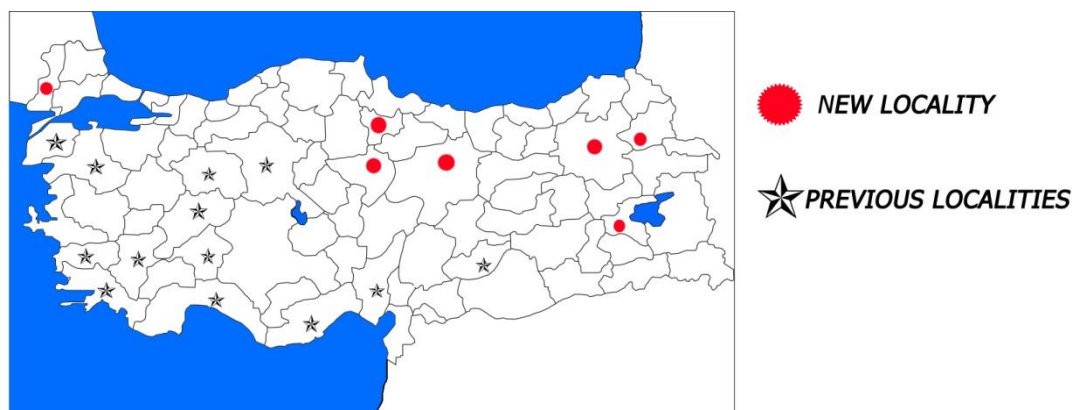


Figure 7. Previous and new locality records of *Promachus leoninus*

Therefore, there is known from our records that these species are active at 10:00 am in the morning to 8:00 pm on the sunset. The optimal temperature for their activity is between 21- 37 °C degrees, based on our observations. Further studies are needed to do for determining the host preference of *P. leoninus*.

This is the first study conducted in our country on the phylogeny of this group. The new distribution regions of *P. leoninus* are grouped into 3 different populations. Phylogenetic analyses were carried out with the COI and NADH<sub>2</sub> gene regions. The analyses performed similar results in both gene regions. Haplotypes belonging to the same populations branched together in the phylogenetic trees. While this branching in the COI gene region is supported by high branch support values, it has been observed that these values are lower in NADH<sub>2</sub>.

Similar results were obtained in the haplotype Network analysis as in the phylogenetic analyses for both gene regions. In some of the species delimitation tests; populations were proposed as different species. However, individuals belonging to these populations were morphologically examined once again and it was seen that all individuals share the same morphological characters, herewith we can use the term “diverging populations” instead of “different species”.

In order to reveal the systematic and phylogenetic status of the species more clearly, a broader evaluation with the Balkan and Caucasian populations is required. More gene regions or next generation sequencing methods can be studied.

## References

- [1] Geller-Grimm, F. (2015). Robber flies (Asilidae) database, Retrieved from <http://www.geller-grimm.de/catalog/species.htm> (11.08.2021)
- [2] Çalışkan, H., şirin, D.Ü., Aslan, A., Fidan, E.C., & şahin, Y. (2020). Five new records for Turkish robber flies (Diptera: Asilidae) fauna. *Journal of the Entomological Research Society*, 22(3), 239-254.
- [3] Çalışkan, H. (2019). Contributions to the records of *Dysmachus praemorsus* (Loew, 1854) (Diptera, Asilidae) in Turkey and some notes on its seasonal activity. *Biological Diversity and Conservation*, 12(3), 20-27. DOI: 10.5505/biodicon.2019.48658
- [4] Bayraktar, F. & Suludere, Z. (2020). Egg morphology of *Dioctria* (Insecta: Diptera: Asilidae) species known in Turkey. *Journal of Entomological Society of Iran*, 40 (2), 151-166. DOI: 10.22117/jesi.2020.342373.1370
- [5] Hasbenli, A., Çiftçi, D., & Çağlar, Ü. (2020). *Tanap*, a new robber fly genus from Turkey (Diptera: Asilidae: Dioctriinae). *Zootaxa*, 48822(1), 113-120. DOI: 10.11646/ZOOTAXA.4822.1.6
- [6] Bybee, S. M., Taylor, S.D., Riley Nelson, C., & Whiting, M.F. (2004). A phylogeny of robber flies (Diptera: Asilidae) at the subfamilial level: molecular evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30 (3), 789-797. DOI: 10.1016/S1055-7903(03)00253-7.
- [7] Dikow, T. (2009). A phylogenetic hypothesis for Asilidae based on a total evidence analysis of morphological and DNA sequence data (Insecta: Diptera: Brachycera: Asiloidea). *Organisms, Diversity and Evolution*, 9, 165-188.
- [8] Dikow, R.B., Frandsen, P.B., Turcatel, M., & Dikow, T. (2017). Genomic and transcriptomic resources for assassin flies including the complete genome sequence of *Proctacanthus coquilletti* (Insecta: Diptera: Asilidae) and 16 representative transcriptomes. *PeerJ- Life and Environment*, 5:e2951. <https://doi.org/10.7717/peerj.2951>
- [9] McKnight, T.A., & Cannings, R.A. (2020). Molecular phylogeny of the genus *Lasiopogon* (Diptera: Asilidae) and a taxonomic revision of the *bivittatus* section, *Zootaxa*, 4835 (1), 001-115. DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4835.1.1>
- [10] Ghahari, H., Hayat, R., Lehr, P.A., Lavigne, R., & Ostovan, H. (2007). Robber Flies (Diptera: Asilidae) of Iranian Rice Fields and Surrounding Grasslands. *Linzer Biologische Beitrage*, 39(2), 919-928.
- [11] Saghaei, N., Ostovan, H., Shojaei, M., & Hayat, R. (2009). Introduction to the Asilidae Fauna (Insecta: Diptera) of Fars Province, Iran. *Turkish Journal of Zoology*, 33, 187-200.

- [12] Mohammadi, R., Khaghaninia, S., & Astakhov, D. (2017). Study of the robber flies (Diptera: Asilidae) in East and West Azerbaijan provinces of Iran, with two new species records for the country. *Journal of Insect Biodiversity and Systematics*, 3 (3), 247-255.
- [13] Çalışkan, H. (2002). Investigations on the Asilidae (Diptera) fauna of Eskisehir province. *Anadolu University Journal of Science and Technology*, 3(2), 317-328.
- [14] Theodor, O., (1980). Diptera: Asilidae of Palaestina, Insecta II. Jerusalem, Israel Academy of Sciences and Humanities Publisher.
- [15] Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., & Liu, H. (1994). Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Entomological Society of America*, 87 (6), 651-701.
- [16] Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-4.
- [17] Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data, *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- [18] Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging, *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253-1256.
- [19] Swofford, D.L. (2002). PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods) 4.0 beta. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- [20] Silvestro, D., & Michalak, I. (2012). raxmlGUI, a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution* 12: 335-337.
- [21] Ronquist, F., & Huelsenbeck, J.P. (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models, *Bioinformatics*, 19 (12), 1572-1574.
- [22] Clement, M., Posada, D., & Crandall, K.A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9 (10), 1657-1660.



## Investigation of cool climate cereals yield and some technological features

Esra VARELCİ<sup>1</sup>, Asuman KAN<sup>\*1</sup>  
ORCID: 0000-0001-8129-2516; 0000-0003-0907-0665

<sup>1</sup> Konya Technical University, Vocational of Technical Sciences, Food Technology, 42100, Konya, Turkey

### Abstract

This study was carried out in 2016 in Selçuk University at the Faculty of Agriculture Greenhouse and Laboratory Research and Application for the determination of the agronomic characteristics of cool climates cereals in order to investigate the yield and some technological properties of cool climate cereal grass water. In this paper, registered seeds of four different genus of grains were used as material which obtained from Bahri Dağdas International Agricultural Research Institute from Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forest and Department of Field Crops from Selçuk University at Faculty of Agriculture. The lawn was harvested in grass period as were grown varieties of four different cereal genus (Konya-2002, Aslım-95, Larende and Seydişehir) in controlled greenhouse conditions. The amount of wet grass water was accounted thanks to these seed used. The highest value of fresh grass were produced by a total of 770g weight barley and 200g the lowest rye. Moreover, grass water yield was obtained the highest volume of 590g barley and the lowest point of 150g rye. Oat chlorophyll-a 4.96 mg/L and chlorophyll-b 8.25 mg /L content were emerged tremendously in grass waters. In contrast wheat, chlorophyll-a amount 1.83 mg / L and chlorophyll-b amount 3.25 mg /L as were found to be the lowest value detected. Indeed, in the crude protein ratio, the highest ratio was obtained from rye 0.56% the genus whereas the lowest crude protein ratio is if 0.51% detected. The total amount of flavonoids in grass water, wheat grass water with 17.21 mg/g reached the highest value, while the lowest value of rye grass water was determined as 0.22 mg/g. Total amount of flavonoids in wheat grass water was found to be highest with 17.21mg/g as opposed to rye grass water has the lowest value with 0.22 mg/g. In terms of the total amount of phenol, rye grass water has the highest value of 34.79mg/g but barley and wheat grass waters were found to be equal to 15.70mg/g and as well the lowest amount. As regards antioxidant activity rye grass water (12.75 mg /g) was found to be the highest value.

**Keywords:** Grass, grass water, cool climate grains, chlorophyl, antioxidant activity

### Serin iklim tahılları çim sularının verim ve bazı teknolojik özelliklerin araştırılması

### Özet

Bu çalışma, serin iklim tahılları çim sularının verim ve bazı teknolojik özelliklerin araştırılması amacıyla 2016 yılında Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Serası ve laboratuvarlarında yürütülmüştür. Bu çalışmada materyal olarak dört farklı tahıl cinsine ait tescilli çeşitli tohumlar kullanılmıştır. Bu materyaller, Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü ile T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünden temin edilmiştir. Kontrollü sera koşullarında dört farklı tahıl cinsine ait; buğday (Konya-2002), çavdar (Aslım-95), arpa (Larende) ve yulaf (Seydişehir) çeşitleri yetiştirilerek üretilen çim sularında agronomik çalışmalar yürütülmüştür. Tahıl çeşitlerine ait en yüksek taze çim ağırlığı arpadan (toplam 770 g) ve en düşük çavdardan (200 g) elde edilmiştir. En yüksek çim suyu verimi ise arpa çeşidinden 590 g ve en düşük 150g çavdar çeşidinden elde edilmiştir. Çim sularından yulaf çeşidinin klorofil-a ve klorofil-b içeriği (sırasıyla 4,96 mg/L ve 8,25 mg/L) içeriği bakımından en yüksek miktarda bulunmuştur. Buğday çeşidinin klorofil-a ve klorofil b içeriği (sırasıyla 1.83 mg/L ve 3.25 mg/L) olarak en düşük miktarda bulunmuştur. Ham protein miktarında ise en yüksek oran %0.56 ile çavdar çeşidinden elde edilmiştir. En düşük ham protein oranı ise %0.51 ile arpa çeşidinden elde edilmiştir.

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903322232349; Fax:03322410185; E-mail: akan@ktun.edu.tr



Çim sularındaki toplam flavonoid miktarı, buğday çim suyunda 17.21 mg/g ile en yüksek miktarda elde edilirken, en düşük miktar çavdar çim suyunda 0.22 mg/g olarak tespit edilmiştir. Tahıllarda çim suyu ekstraktları toplam fenolik madde miktarı bakımından çavdar çim suyu ekstresi 34.79 mg/g ile en yüksek miktarda tespit edilmiştir. Arpa ve buğday çim suları ise 15.70 mg/g ile eşit ve düşük miktarlarda bulunmuştur. Antioksidan aktivitesi yönünden ise çavdar çim suyu (12.75 mg/g) en yüksek miktarda bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Çim, çim suyu, serin iklim tahılları, klorofil, antioksidan aktivite

## 1. Giriş

Günümüzde tüketicilerinin sağlık konusundaki duyarlılığı artması ile tüketim eğilimlerinde büyük oranda değişime sebep olmuştur. Sağlıklı beslenme, hastalıkların tedavisi ve birçok alanda önemli bir yere sahip olmasından dolayı tahıl ve tahıl ürünleri vazgeçilmez bir yere sahiptir. Tahıl ürünlerinin yoğun olarak tüketildiği ülkemizde tahıllardan çim suyu ve ekstraktlarının üretimi ve tüketimi kolay, ticari potansiyeli yüksek olması ve çeşitli konularda sağlığa faydaları yönüyle birçok yönden avantajlı gıdalardır. Tahıllardan hareketle yeni teknolojik fonksiyonel ürün geliştirilmesi bakımından çim suyu önemli bir yere sahiptir. İnsanların günlük enerji ihtiyaçlarını karşılamak için fonksiyonel gıda kaynaklarına ihtiyaç bulunmaktadır. Bu besin ihtiyacının karşılanmasında tahılların önemli yeri bulunmaktadır. Türkiye bir tahıl ülkesi olmasına rağmen, tahılların ekme, makarna, bulgur ve diğer unlu mamuller formundaki gibi kullanımlarının dışında kullanımları yeterince yaygınlaşmamıştır. Tahılların danelerin dışında kalan yaprak, sap gibi organlarının da besin kaynağı olarak kullanımları söz konusudur. Farklı serin iklim tahıllarından elde edilen çimlerden hareketle geliştirilecek farklı içerikli çim sularının fonksiyonel gıda olarak kullanım değerleri yüksek ürünlerdir. Tahıl çimlerinin insan sağlığına faydalı özellikleri nedeni ile gıda olarak kullanım düşüncesi yeni değildir. Buğday, arpa, pirinç, yulaf gibi tahıl çimleri 1930 'lu yıllardan beri gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır [1]. Tahıl danelerinin çimlendirilmesi ile içerisinde yer alan antioksidan özellikli fenolik bileşiklerin miktarının arttığı ve bu fenolik bileşiklerin vücutta oluşan serbest radikalleri dışarı atmada rol oynadığı yapılan çalışmalarda tespit edildiği belirtilmiştir [2]. Çim suyu; içermiş olduğu klorofil, protein, fenolik ve flavonoidler gibi fitokimyasal etkili bileşiklerin miktarlarına bağlı olarak bazı önemli antioksidan aktiviteleri, hastalıkların oluşumunu önleyen ve bağışık sistemini güçlendirici etkiye sahiptir. Çim suyunun bu güçlü etkisi aynı zamanda içerisindeki E ve C vitaminleri ve biyoaktif bileşikler bakımından zengin olmasından dolayıdır [1]. İnsanların günlük beslenme programı içerisinde, klorofil kaynağı yeşil yapraklı bitkilerin yer alması dengeli besin maddesi alımına yardımcı olan önemli destek ürünüdür. Arpa, buğday, çavdar ve yulaf gibi tahıl çimlerinin yaprakları antioksidan bakımından zengin olmaları nedeni ile oldukça sağlıklıdır. Bu sebeple son zamanlarda doğal ilaç hammaddesi olarak dünyada oldukça fazla ilgi görmektedirler [3].

Türkiye, Poaceae (Buğdaygiller) familyası üyelerini de içine alan oldukça geniş bir bitki türü zenginliği göstermektedir. Buğdaygiller familyasından buğday (*Triticum* spp.), arpa (*Hordeum* spp.) yulaf (*Avena* spp.) ve çavdar (*Secale* spp.), ülkemizin geniş alanlarda yetiştirilen, tek yıllık otsu ve serin iklim tahıl bitkileridir. Buğday; ülkemizde yaygın olarak un, yem gibi temel bir besin kaynağı olarak kullanılan bir hammaddedir. Buğday bitkisinin yaygın olarak kullanılan kısımları, kuru dane ve saplarıdır. Bununla birlikte buğday bitkisinin yeşil aksam kullanımı Türkiye'de yaygın olmayıp, dünyada bazı Avrupa ülkelerinde son yıllarda sağlıklı fonksiyonel insan gıdası olarak kullanımı dikkat çekmektedir. Buğday çimi "bütün besin maddelerini bünyesinde bulunduran tam gıda" olarak tanımlanmaktadır. Buğday çim suyu protein, vitamin A, C, E kaynağı olması yanı sıra, özellikle B grubu vitaminler bakımından da çok zengindir. İnsan vücudunun temel metabolizma faaliyetleri, beyin ve kemik gelişimi için bu vitaminlerin önemli katkısı söz konusudur. Buğday çiminin içerdiği;  $\beta$  karoten, ferulik asit ve valinik asit oranları çimlenme süresi ile birlikte konsantrasyonları artar [4]. Buğday çim suyu önemli biyoaktif bileşiklerden klorofili %70 civarında içermektedir. Klorofil ise vücuttaki kan basıncının ayarlanmasından, kanda demir bağlamaya kadar çok önemli metabolik fonksiyonları olan bir pigmenttir. Buğday çimi, buğday danelerine oranla daha yüksek vitamin içerir. Buna ilaveten daha fazla fenolik madde miktarı, aromatik aminoasitler, çoklu doymamış yağ asitleri içermektedir [5].

Arpa; besin lifi olarak kullanılan  $\beta$ -glukon içeriğine sahiptir. İçeriğinde yüksek miktarda protein bulunduran arpa bunun yanı sıra malt ve çim suyu olarak kullanılmaktadır [6]. Arpa son yıllarda bazı gelişmiş ülkelerde çimlendirilerek filiz halinde veya suyu çıkarılarak besin takviyesi olarak tüketilmeye başlanmıştır. Arpada çimlenme ile birlikte kuru maddedeki trigliserit ve enerji miktarı azalmakta; kül, ham lif, diğlisit, bazı aminoasit ve mineral madde miktarları ise artmaktadır [7]. Arpa çimi buğday çiminde olduğu gibi içermiş olduğu önemli biyoaktif maddelerden dolayı önemli antioksidan kaynağıdır. Dünyanın farklı ülkelerinde yürütülen araştırmalarda arpa çimlerinden elde edilen ekstraktları; obezite, diyabet, kan dolaşım sistemi bozuklukları, anemi, eklem iltihabı, yüksek kolesterol seviyesi, böbrek hastalıkları ve kanser gibi birçok hastalığın tedavisinde yararlı olduğu ispatlanmıştır [8].

Yulaf danesindeki avenin maddesi nedeniyle beslenmede önemli bir yeri vardır [9]. Yulaf tanesi çimlenme ile birlikte bileşenleri değişikliğe uğrar. Bu değişimlerden biriside  $\beta$ -glukanaz enziminin artmasıyla,  $\beta$ -glukan oranında ciddi derecede artış olmaktadır [5].

Çavdar Asya ülkelerinde insan tüketimi için tohum filizleri yüzyıllarca yemeklerde değerlendirilmektedir [10].

Bu araştırmada; ülkemizde özellikle İç Anadolu bölgesinde yetiştirilen serin iklim tahıllarından; buğday "Konya -2002", Arpa "Larende", çavdar "Aslım-95" ve yulaf olarak yetiştirilen "Seydişehir" çeşitlerinin elde edilen çim sularının verimleri ve bazı önemli kimyasal içerikleri ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve yöntem

Bu araştırmada serin iklim tahıllarının cinslere ait Buğday (*Triticuma aestivum* L.)'un Konya -2002 çeşidi, Arpa (*Hordeum vulgare* L.)'in Larende çeşidi, Çavdar (*Secale cereale* L.)'in Aslım-95 çeşidi, Yulaf (*Avena sativa* L.)'in Seydişehir çeşidi kullanılmıştır. Çeşitler Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü ile T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünden temin edilmiştir.

Bu araştırmada kullanılan yöntemler; tohum materyalinden çim ve çim suyu üretilmesi, çim suları ekstraktının elde edilmesi, çim suları ile çim suları ekstraktının analizleri ve biyoaktivite deneyinde kullanılan yöntemler olmak üzere dört ana başlıkta toplanmıştır. Çimlendirme kabı olarak 30×50×7 cm çapındaki plastik küvetler kullanılmıştır. Araştırma tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Çim yetiştirme süresi boyunca düzenli olarak günlük sulama ve diğerk bakım işlemleri yapılmıştır. 4 farklı tahıla ait tohumlar yetiştirilip hasat olgunluğuna gelmesiyle hasat edilen çimlerden çim suyu sıkma makinası ile çim suları elde edilmiştir. Çim sularının muhafazası için ise cam kavanozlar kullanılmıştır. Serin iklim tahıllarından elde edilen çim sularından liyofilizasyon yöntemiyle toz ekstraktları elde edilmiştir [11].

Çim verimi; kök bölgesinden 1 cm yükseklikte hasat edilen çimler hassas terazide tartılarak elde edilen miktar yetiştirme alanına oranlanarak hesaplanmıştır. Çim suyu verimi; hasat edilen çimler çim suyu sıkma makinesinden sıkılarak elde edilen çim suyu hassas terazide tartılarak, çim suyu verimleri hesaplanmıştır [12].

### 2.1. Klorofil Analizi(mg/L)

Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Toprak Bölümü Araştırma Laboratuvarındaki spektrofotometre cihazında yapılmıştır. Klorofil içerikleri analiz için UV-VIS spektrofotometre kullanılmıştır. Klorofil a için 663 nm dalga boyunda, klorofil-b için 645 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Fotosentetik pigmentlerin miktarları da mg/L olarak verilmiştir.

Klorofil a, klorofil b ve klorofil (a+b) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Klorofil a (mg/L)} = (12,7 \times 663\text{nm}) - (2,7 \times 645\text{nm}), \text{Klorofil b (mg/L)} = (22,9 \times 645\text{nm}) - (4,7 \times 663\text{nm})$$

### 2.2. Ham Protein Miktarı (%)

Kjeldahl yöntemine göre yapılmıştır. Ham protein sonucunu hesaplanması için kullanılan formül ise; % N =  $(\text{ml} \times 1,4 \times 0,08) / 0,05 \times 6,25$  dir.

### 2.3. Çim Suyu Ekstrelerinde Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini ile Antioksidan aktivite tayini gerçeleştirilmiştir. Ekstrelerin ve saf maddelerin DPPH serbest radikal süpürücü aktivitesi, 2,2-difenil-1,2-pikril hidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Almanya) radikaline karşı, koyu-viyole renkten açık-sarı renge dönüşümün UV/görünür bölgede 517 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tayin edilmiştir. Örneklerin DPPH serbest radikaline karşı % inhibisyonları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 paralelin ortalama % süpürücü etkisi şeklinde standart sapma hesaplanarak verilmiştir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A1 - A2) / A1] \times 100$$

A1 = DPPH stok çözeltisinin 517 nm dalga boyundaki absorbansı

A2 = Örnek çözeltilerinin 517 nm dalga boyundaki absorbansı

### 2.4. Ekstrelerde Toplam Flavonoid Miktar Tayini(mg/g)

Toplam flavonoid miktarını tayin etmek için Woisky ve Salatino (1998), geliştirdiği alüminyum klorür (AlCl<sub>3</sub>) kolorimetrik yöntemi uygulanmıştır. Kuersetin kalibrasyon çözeltileri yardımıyla hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre, total flavonoid konsantrasyonu kuersetin eşdeğeri olarak hesaplanmış ve ekstrenin toplam flavonoid miktarı mg/g ekstre ± standart sapma olarak verilmiştir[13].

### 2.5. Ekstrelerde Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini (mg/g)

Toplam fenolik madde miktarını tayin etmek için Singleton ve Rosi, (1965)modifiye ettiği Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır. Gallik asit kalibrasyon çözeltileri yardımıyla hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre, toplam fenol konsantrasyonu gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmış ve ekstrenin toplam fenolik madde miktarı mg/g ekstre ± (GAE) standart sapma olarak verilmiştir[14].

### 3. Bulgular

Bu çalışmada farklı serin iklim tahıllarından elde edilen çim sularına ait verimler ve yapılan laboratuvar çalışmalarından elde edilen teknolojik özelliklere ait veriler aşağıda verilmiştir.

#### 3.1. Çim ve Çim Suyu Verimi (g)

Farklı serin iklim elde edilen çim suyu verimleri Tablo.1'de verilmiştir. Çimlerin biçim yüksekliğine gelmesiyle 12., 20. ve 30. günlerde biçim işlemi yapılmıştır. Çim suyu elde etmek amacıyla biçilen kısımlar ayrı ayrı terazide tartılarak, ağırlıkları gram (g) cinsinden bulunmuştur. Çimler çim suyu makinesi sıkılarak çim suları elde edilmiştir. Ayrıca her biçimden elde edilen çimlerin çim suyu sıkma makinesi ile çim suyu ve posası çıkarılarak, miktarlar Tablo.1'de verilmiştir. Çim suyu elde edilebilirlik veriminin hesaplanması için çimlenen bitkilerden elde edilen yeşil aksam ağırlığının çim suyu sıkma makinasından geçirilmesi ile elde edilen çim sularına oranı (yeşil aksam (g) / çim suyu (ml)) formülü ile hesaplanmıştır [15]. Tartımları yapılan çim suları analiz için, bir kısmı çim suyu olarak, bir kısmı da liyofilize edilerek analizler için muhafaza edilmiştir.

Her bir tahıl cinsinden elde edilen çimler, çim verimleri açısından değerlendirildiğinde arpa çimi (771.48 g), buğday çimi (688,67 g), yulaf çimi (660,22 g) ve çavdar çimi (200,69 g) olarak sıralanmıştır. Her bir tahıl cinslerine ait çeşitlerin ekimi için 1000 gram tohum kullanılmıştır. Tahıl cinslerine ait en yüksek çim miktarı ve çim suyu miktarı arpadan elde edilirken, en düşük çim miktarı ve çim suyu miktarı ise çavdardan elde edilmiştir ( Tablo.1).

Tablo 1. Araştırmada kullanılan farklı tahıl cinslerinin çim, çim suyu, posa miktarları ve ham protein miktarına ait ortalama değerler

Tahıl Çeşitleri	Çim Miktarı(g)	Çim Suyu Miktarı(g)	Posa Miktarı(g)	Ham protein(%)
	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$
Buğday(Konya 2002)	688,67±1,85 <sup>b</sup>	439,57±0,40 <sup>b</sup>	250,476±0,53 <sup>a</sup>	0,52±0,05 <sup>a</sup>
Arpa (Larende)	771,48±0,48 <sup>a</sup>	590,71±1,99 <sup>a</sup>	180,48±0,25 <sup>c</sup>	0,51±0,09 <sup>a</sup>
Yulaf (Seydişehir)	660,22±0,55 <sup>c</sup>	430,86±1,48 <sup>c</sup>	229,92±0,17 <sup>b</sup>	0,53±0,005 <sup>a</sup>
Çavdar (Aslım 95)	200,69±0,37 <sup>d</sup>	150,55±0,11 <sup>d</sup>	49,975±0,18 <sup>d</sup>	0,56±0,02 <sup>a</sup>

a, b, c: P<0.01

Tahıl cinsleri çim suyu miktarları bakımından değerlendirildiğinde ise, yine en yüksek miktar arpadan (590,71 g) elde edilmiştir. Buğday ve yulaftan sırasıyla 439,57 g; 430,86 g çim suyu elde edilirken, en düşük çim suyu ise çavdar dan (150,55 g) elde edilmiştir. Yine Çizelge 3.1. incelendiğinde posa miktarı bakımından, en yüksek posa miktarı buğdaydan (250,476 g) elde edilmesine karşın en düşük posa miktarı çavdardan (49,975 g) elde edilmiştir. (Çizelge 3.1.).

Yapılan bu çalışmada çim verimleri bakımından arpa bitkisinin diğerlerine göre daha üstün olduğu buna bağlı olarak çim suyu veriminin yine arpa çim suyunda daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Bunun sebepleri arasında arpa tohumlarının daha geç çimlenmesi, kök gelişiminin daha az olmasından dolayı yeşil aksam ağırlığının fazla olması olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda da [15] tahıl cinsleri arasında arpa en yüksek çim suyu miktarı verdiği buğday ve yulaf arasında önemsenecek ölçüde farklılık görülmediği tespit edilerek araştırma sonuçlarımızı destekleyen veriler elde edilmiştir.

#### 3.2. Klorofil İçeriği

Araştırmada kullanılan farklı tahıl cinslerine ait çim sularında klorofil a ve klorofil b miktarları (mg/L) Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Araştırmada Kullanılan Farklı Tahıl Cinslerine Ait Çim Sularında Klorofil A ve Klorofil B Miktarları (mg/L)

Tahıl Çeşidi	Klorofil A (mg/L)	Klorofil B (mg/L)
Buğday(Konya 2002)	1.8306 mg/L	3.2508 mg/L
Arpa (Larende)	2.3400 mg/L	4.2588 mg/L
Yulaf (Seydişehir)	4.9656 mg/L	8.2586 mg/L
Çavdar (Aslım 95)	4.3954 mg/L	7.944 mg/L

Farklı tahıl cinslerine ait çim sularında yapılan klorofil a ve klorofil b içerikleri değerlendirildiğinde; klorofil a içeriği en yüksek yulaf (Seydişehir) çim sularından (4.9656mg/L) elde edilirken, aynı şekilde klorofil b miktarı da en yüksek yine yulaf çim sularından (8.2586mg/L) elde edilmiştir. Klorofil a ve klorofil b içeriği sırası ile (1.8306 mg/L) ve (3.2508 mg/L) en düşük buğday (Konya2002) çim sularından elde edilmiştir. Yulaf çim sularından sonra en yüksek klorofil a ve klorofil b içeriği sırasıyla; (4.3954 mg/L) ve b (7.944 mg/L) çavdar (Aslım 95) çim sularından elde

edilmiştir. Arpa (Larende) çim sularında ise klorofil içeriği klorofil a ve b içeriği sırasıyla (2.3400 mg/L), (4.2588 mg/L) olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.7.). Yapılan diğer bir çalışmada çalışmaya göre, en yüksek klorofil a içeriği 2.22 mg/l ile buğday cinsinden elde edilmiş. Bunu sırasıyla; 0.97mg/l ve 0.82mg/l ile yulaf ve buğday cinsleri izlediği belirtilmiştir. En düşük klorofil a içeriği 0.86mg/l ile 10 cm çim boyunda biçilen cinslerde olduğu belirtilmiştir [15]. Diğer taraftan yapılan bir çalışmada, farklı sulama uygulamalarının klorofil-a, klorofil-b, üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur[16]. Klorofil içeriğindeki farklılıklar sulama aralıklarında ise sık aralıklarla sulanan bitki yaprak klorofil içeriği değerleri daha yüksek bulunmuş. Sulama aralığı arttıkça yaprak klorofil içeriğinde azalma gözlemlendiği belirtilmiştir. Yapılan bu çalışmada da tahıl cinslerine ait farklı cinslerin buğday çim sularının klorofil a (1.8306mg/L) ve b (3.2508mg/L) içerikleri birbirinden oldukça farklılık göstermektedir. Bu çalışmada klorofil içeriklerindeki bu farklılığın denemelerde kullanılan tahıl cinslerine ait çeşitlerin özelliklerinden kaynaklı olabileceği gibi aynı zamanda yetiştirme ortamındaki torf ve ışık, nem gibi diğer faktörlerden de kaynaklı olabileceği ifade edilebilir.

### 3.3.Ham Protein Miktarı (%)

Farklı tahıl cinslerine ait çim sularındaki ham protein oranları değerlendirildiğinde zaman birbirine yakın değerlerde ham protein oranları elde edilmesine rağmen, en yüksek ham protein oranı %0.56 oranında çavdar çim sularından elde edilirken, en düşük değer ise %0.51 ile arpa çim sularından elde edilmiştir. [8]' tarafından yapılan araştırma sonuçlarına göre, protein, diyet lif, N ve Cu içerikleri bakımından buğday ve arpa çim suyu ön plana çıktığını belirtmiştir. Bu çalışmada ham protein içeriği bakımından çavdar ve yulafın ön plana çıkması materyal olarak kullanılan çeşit ve yetiştirme ortamının etkili olabileceğinin yanı sıra verim kalite ilişkisinden de kaynaklı olabileceği söylenebilir.

### 3.4.Toplam Fenolik Madde Miktarı(mg/g ekstre ± S.S. GAE)

Fenolik maddeler bitkisel kaynaklı besinlerin lezzetine özellikle ağızda buruk bir tat bırakma yönünde ve rengine etki eden, meyve ve sebzelerde genellikle çok az miktarlarda bulunmakla birlikte önemli olan bir madde grubudur. Fenolik maddeler aromatik halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bileşiklerdir. Bitkisel gıdalardaki fenolik maddeler; lignanlar, fenolik asitler, stilbenler ve flavonoidler gibi alt gruplara ayrılmaktadır. Bunlardan antioksidan olarak önem taşıyanlar, fenolik asitler ve flavonoidlerdir. Antioksidan özelliğinden dolayı flavonoidler, diyetdeki en önemli antikarsinojenlerden biridir [17]. Son zamanlarda doğal fenolik bileşiklerin miktarı ve biyolojik özellikleri ile ilişkili pek çok çalışma bulunmaktadır [18].

Tablo 3. Araştırmada Kullanılan Tahıl Cinslerinin Çim Suyu Ekstrelerinde Toplam Flavonoid Miktarı, Toplam Fenolik Madde Miktarı ve Antioksidan Aktivitesi

ANALİZ ÖRNEKLERİ		DPPH Serbest Radikal Süpürücü Etki (%Süpürme±S.S.)	Toplam Flavonoid Miktar Tayini (mg/g ekstre kesretin eşdeğeri±S.S.)	Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini (mg/g ekstre gallik asit eşdeğeri±S.S.)
Toz ekstre (Liyofilizasyon)	Buğday (Konya 2002)	6.80±1.08	17.21±3.49	15.70±1.91
	Arpa (Larende)	-	4.76±1.33	15.70±0.96
	Yulaf (Seydişehir)	-	0.84±0.06	28.03±3.66
	Çavdar (Aslın 95)	12.75±1.03	0.22±0.08	34.79±2.24

Yapılan bu çalışmada, toplam fenolik madde miktarı açısından değerlendirildiğinde, en yüksek 34.79 mg/g ile çavdar çim suyu ekstresinden elde edilirken; en düşük toplam fenolik madde miktarı 15.70 mg/g ile arpa çim suyu ve buğday çim suyu ekstresinden elde edilmiştir. Yulafta çim suyu ekstrelerinde ise 28.03 mg/g fenolik madde tespit edilmiştir (Tablo 3). Çavdarı diğer tahıl cinslerinden ayıran en önemli farklılık antosiyanin bakımından zengin olmasıdır.

Tahıl çimlerinin fenol miktarı ve antioksidan bileşikleri, DPPH radikal süpürme yöntemiyle tespit edilmiş ve farklı tahıl çimi ekstraktlarının toplam fenolik ve toplam flavonoid bileşik miktarlarında UV cihazıyla spektrometrik olarak tayin edilebilir. Yapılan bir çalışmada, en yüksek toplam fenolik madde içeriği Gerek-79'un (31.23 ± 1.81 mg GAE/gr), en yüksek flavonoid madde içeriği ise Demir-2000'in (84.00 ± 6.01mg KE/gr) tuz stresi altındaki gruplarında belirlenmiştir [20]. En iyi antioksidan aktivite, en düşük IC50 (13.98 ± 0.25 mg/L) değeriyle tuz stresi altındaki Demir-2000'de görülmüş. Demir-2000'in tuz stresi altında çimlendirilmesiyle antioksidan aktivitesinin anlamlı bir şekilde

artması, bu çeşidin tuz stresi altında antioksidan savunma mekanizmasını diğer buğday çeşitlerinden daha etkin kullandığı şeklinde belirlenmiştir.

### 3.5. Toplam Flavonoid Madde Miktarı (mg/g ekstre $\pm$ S.S. KE)

Buğday, arpa, yulaf, çavdar çim sularının ekstrelerinde toplam flavonoid miktarı Woisky ve Salatino'nun (1998) geliştirdiği alüminyum klorür (AlCl<sub>3</sub>) kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir. Çizelge 3.4'da araştırmada kullanılan tahıl cinslerinin çim suyu ekstrelerinde toplam flavonoid miktarına ait standart sapmalar hesaplanmış ve sonuçlar mg/g ekstre  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Bu araştırma sonucuna göre, toplam flavonoid içeriği 17.21 mg/g ekstre ile en yüksek buğday çim suyundan elde edilirken, en düşük toplam flavonoid içeriği ise 0.22 mg/g ile çavdar çim suyundan elde edilmiştir (Tablo 3). Bir başka çalışmada, buğday (*Triticum aestivum* L.) yapraklarının HPLC-ESI – MS teknikleri ile çalışmaları sonucu toplamda 40 fenolik ve flavonoid bileşik olduğu belirtilmiştir [19].

Bu yapılan çalışmada da tahıl cinslerine ait farklı cinslerin çim sularının toplam flavonoid madde miktarı içeriklerindeki farklılığın denemelerde kullanılan tahıl cinslerine ait çeşitlerin özelliklerinden kaynaklı olabileceği gibi aynı zamanda yetiştirme ortamındaki torf, ışık ve nem gibi diğer faktörlerden de kaynaklı olabileceği ifade edilebilir.

### 3.6. Antioksidan Aktivitesi

Bitkisel kaynaklı birçok gıda, en güçlü antioksidan olan fenolik fitokimyasalları içerdiği gibi oksidatif zararlara karşı da vücut savunmasına katkıda bulunmaktadır. Tahıl çim sularında klorofil önemli fenolik maddelerdendir. Bu bileşikler gıdaları bozulmalara karşı koruduğu gibi tüketilmeleri sonucu da vücudumuza antioksidan madde sağlamaktadırlar. Antioksidan aktivite özelliği gösteren bazı fenolik maddeler çim sularında olduğu bilinmektedir. Bir diğer araştırmaya göre, flavonoid, fenolik asit ve antosiyanin gibi maddelerin biyosentezi ve bitki bünyesinde birikimi, bitki materyalinin antioksidan aktivitesini güçlendirmektedir [20].

Buğday (*Triticum aestivum* L.), arpa (*Hordeum vulgare* L.), yulaf (*Avena sativa* L.) ve çavdar (*Secale cereale* L.) çim sularına ait serbest radikal süpürücü aktivite miktarları Çizelge 3.4.de verilmiştir. Çizelge 3.4. incelendiğinde, çavdarın antioksidan aktivitesinin diğer tahıl cinslerine oranla daha yüksek olduğu görülmektedir. Çim sularında bulunan fenolik ve flavonoid özellikli maddeler önemli antioksidan aktiviteye sahiptirler. Araştırma sonucuna göre, antioksidan aktivitesi en yüksek olan çavdar çim suyu ve daha sonra onu takip eden buğday çim suyu olmuştur. Arpa çim suyu ile yulaf çim suyu antioksidan aktivite çavdar ve buğday çim sularına göre daha düşük bulunmuştur. Buğday, arpa, yulaf ve çavdar çim suyu özellikle antioksidan aktivite bakımından zengin olmasının yanı sıra demir, kalsiyum ve A,C,E vitamini bakımından zengindir. Buğday çimi ekstratının antioksidan aktiviteye sahip olup lösemi hücrelerinin çoğalmasını engelleme potansiyeline sahiptir [4]. Yapılan bir başka çalışmada, buğday çimi ekstresi birincil ve ikincil radikal temizleme ve serbest radikal kaynaklı membran hasarının inhibisyonu gibi çeşitli koruma seviyelerinde olduğu belirtilmiştir [7]. Bir diğer çalışmada ise antioksidanların beslenmedeki en önemli görevi, beslenme sırasında makromoleküllerin (karbohidratlar, proteinler, yağlar) metabolizması sonrası oluşan oksidatif stresi önlemesi olduğu belirtilmiştir [17].

Bu çalışmada da tahıl cinslerine ait farklı cinslerin çim sularının antioksidan aktivitesi karşılaştırıldığında çavdar çim suyunda diğer tahıl cinslerine oranla daha yüksek bulunmasının sebebi kalite verim ilişkisine dayandırılacağı gibi çavdar cinsinin antosiyanin bakımından zengin olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

## 4. Sonuçlar ve tartışma

Bu araştırma ile, dört farklı tahıl cinsinde (buğday, arpa, yulaf ve çavdar), çim suyu verim ve kalitesini belirlemek amacıyla yürütülen araştırma sonuçlarına göre; bu tahıl cinsleri yüksek miktarda çim suyu elde etmek amacı ile kullanılacaksa arpa cinsi tercih edilmelidir. Çim sularında ham protein, çim suyu ekstrelerinde antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde miktarı bakımından incelendiğinde en yüksek miktar çavdar çim suyu ve çavdar çim suyundan elde edilen ekstrelerinde görülmüştür. Ancak toplam flavonoid miktarı bakımından incelendiğinde diğer tahıl cinslerine göre buğday çim suyu ekstrelerinden yüksek miktarda elde edilmiştir. Yulaf diğer tahıllara oranla toplam klorofil miktarı bakımından dikkat çekmektedir. Hem sağlık alanında ve hem gıda takviyesi amacıyla yulaf ve çavdar çim suları tercih edilebilir. Bu çalışmada, bazı tahıl cinslerinin türlerine ait çim suyu verimleri belirlenmiştir. Elde edilen çim sularının klorofil-a ve b, ham protein, toplam flavonoid miktarı ve toplam fenolik madde miktarları tespit edilmiştir. Bunlara ilaveten çim sularının antioksidan aktivite kapasiteleri belirlenmiştir. Farklı tahıl cinslerinin alternatif kullanımlarının ortaya konulması ile hem üreticilere yeni katma değerlerin oluşturulması hem de tüketicilere fonksiyonel yeni gıda hammaddelerinin araştırılması bu çalışmanın özünü oluşturmaktadır.

**Kaynaklar**

- [1] Yadav, M., Sethi, J., Dahyia, K., Sood, S., Gupta, V., Singh, V., & Talwar, A. (2013). Effect of *Triticum aestivum* on physiological and biochemical parameters in high fat diet fed rabbits. *JK Practitioner*, 18(3-4), 39-42.
- [2] Dziki, D., Gawlik-Dziki, U., Kordowska-Wiater, M. Ve Doman-Pytka, M. (2015). Influence Of Elicitation And Germination Conditions on Biological Activity of Wheat Sprouts, *Hindawi Publishing Corporation Journal Of Chemistry*, 1-8.
- [3] Urbonaviciute, A., Samuoliene, G., Brazaityte, A. Ve Duchovskisukauskas, A. (2009). The Effect Of Variety and Lighting Qualityon Wheatgrass Antioxidant Properties, *Zemdirbyste-Agriculture*, 96 (3), 119-128.
- [4] Aydos, O. S., Avcı, A., Özkan, T., Karadağ, A., Gürleyik, E., Altınok, B. Ve Sunguroğlu, A. (2011). Antiproliferative, Apoptoticand Anti Oxidantactivities Of Wheatgrass (*Triticum aestivum*L.) Extract On Cml (K562) Cellline, *Turk J Medsci*, 41 (4), 657- 663.
- [5] Yetim, H., Öztürk, İ., Törnük, F., Sağdıç, O., Hayta, M. (2010). Yenilebilir bitki ve tohum filizlerinin fonksiyonel özellikleri. *Gıda*, 35(3), 205-210.
- [6] Altuner, F., Oral, E. ve Ülker, M. (2018). Bazı Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Çeşitlerinde Verim ve Verim Unsurlarının Belirlenmesi, *Journal Of Bahri Dagdas Crop Research*, 7 (2), 11-22.
- [7] Kulkarni, S. D., Acharya, A. R., Nair, A. G. C., Rajurkar, N. S., Reddy, A. V. R. (2006). Analytical, Nutritional And Clinical Methods Determination Of Elemental Concentration Profiles İn Tender Wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) Using Instrumental Neutron Activation Analysis, *Food Chemistry*, 95(4), 699-707.
- [8] Karaşahin, M. (2015). Topraksız Ortamda Yetiştirilen Bazı Tahılların Çim Suyu Verim ve Besin Değerleri, *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Inst. Der. / Iğdır Univ. J. Inst. Sci. &Tech.*, 5 (4), 57-64.
- [9] Chorowicz, J., Pascal Luxey, P., Lyberis, N., Carvalho, J., Parrot, J. F., Yürür, T. Ve Gündoğdu, N. (1994). The Maras Triple Junction (Southern Turkey) Based On Digital Elevation Model And Satellite Imagery Interpretation, *Journal Of Geophysical Research: Solid Earth*, 99 (B10), 20225-20242.
- [10] Fazaeli, H., Golmohammadi, H. A., Tabatabayee, S. N. Ve Asghari-Tabrizi, M. (2012). Productivity and Nutritive Value of Barley Green Fodder Yield in Hydroponic System, *World Applied Sciences Journal*, 16 (4), 531-539.
- [11] Desobry, D. S., Netto, F. M. ve Labuza, T. P. (1997). Comparison of Spray-Drying, Drum-Drying And Freeze-Drying For B-Carotene Encapsulation and Preservation, *Journal Of Food Science*, 62 (6).
- [12] Karaşahin, M. (2015). Topraksız Ortamda Yetiştirilen Bazı Tahılların Çim Suyu Verim ve Besin Değerleri, *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Inst. Der. / Iğdır Univ. J. Inst. Sci. &Tech.*, 5 (4), 57-64.
- [13] Woisky, R. G. ve Salatino, A. (1998). Analysis Of Propolis: Some Parameters and Procedures for Chemical Quality Control, *Journal of Apicultural Research*, 37 (2), 99-105.
- [14] Singleton, V. L. and Rosi, J. A. J. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolibdic-Phosphotungtic Acid Reagents, *American Journal of Enology And Viticulture*, 16, 144-158.
- [15] Ergün, T. (2011). *Bazı Tahıl Cinslerinin Çim Suyu Verimi ve Kalitesinin Belirlenmesi*, (Basılmamış) Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, Fen Bilimleri Enstitüsü, 58s.
- [16] Demirtaş, M. N., Kırnak, H. (2009). Kayısıda Farklı Sulama Yöntemleri Ve Aralıklarının Fizyolojik Parametrelere Etkisi. *YYÜ Tarım Bilimleri Dergisi*, 19(2), 79-83.
- [17] Güleşçi, N. ve Aygül, İ. (2016). Beslenmede Yer Alan Antioksidan ve Fenolik Madde İçerikli Çerezler, *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi / Gümüşhane University Journal Of Health Sciences*, 5 (1).
- [18] Haşimi, N., Ertaş, A., Yılmaz, M. A., Boğa, M., Temel, H., Demirci, S., Özden, T.Y, Yener, İ. Kolak, U. (2017). LC-MS/MS and GC-MS analyses of three endemic *Astragalus* species from Anatolia towards their total phenolic-flavonoid contents and biological activities. *Biol. Divers. Conserv*, 10, 18-30.
- [19] Moheb, A., İbrahim, R. K., Roy, R., Sarhan, S. (2011). Changes in Wheat Leaf Phenolome İn Response to Cold Acclimation, *Phytochemistry*, 72 (18), 2294-2307.
- [20] Karakaş, F. P. (2016). Kavuzlu Siyez (*Triticum Monococcum* ssp. *Monococcum*) Ve Ekmeklik (*Triticum aestivum* L.) Buğdaylarda Kurak ve Tuz Stresinin Erken Fide Gelişimi Ve Antioksidan Aktivite Üzerine Etkisi, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 107-116.



## Determination of lipase activities of actinomycetes isolates from soil

Gizem ARIK <sup>\*1</sup>, Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ <sup>2</sup>  
ORCID: 0000-0002-3673-3543; 0000-0003-2485-2016

<sup>1</sup> Ankara Medipol Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 06050 Ankara, Turkey  
<sup>2</sup>Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 26470 Eskişehir, Turkey

### Abstract

In this study 156 actinomycetes isolates which were isolated from different soil samples were used. Isolates were inoculated proper medium and incubated at 28°C for 7-10 days. In order to investigate the lipolytic activities of the isolates in the culture medium, the transparent zone formed by isolates in the prepared lipase medium was measured with a ruler. 53 of them (34 %) 10 mm and less, 99 of them (63 %) 20 mm and less, 4 of them (3 %) more than 20 mm transparent zone produced. The isolate which showed the highest lipase activity molecular identification has been made which based on 16S rRNA gene sequence. The 16S rRNA sequence information obtained from the isolate was recorded to GenBank with the access number KY172825. As a result of the study has been made on the NCBI database by using BLAST program, it was observed that, isolate showed 97% similarity ‘uncultured actinobacterium clone AS42 16S ribosomal RNA gene’ which’s access number on the database is EU283368.1.

**Key words:** actinomycetes, lipase, soil

----- \* -----

### Topraktan izole edilen aktinomisetlerin lipaz aktivitelerinin belirlenmesi

#### Özet

Bu çalışmada farklı toprak örneklerinden izole edilmiş 156 aktinomiset izolatu kullanılmıştır. İzolatlar uygun besiyerine ekilmiş ve 28°C’de 7-10 gün inkübe edilmiştir. İzolatların kültürel ortamda lipolitik aktivitelerinin incelenmesi amacıyla, hazırlanan lipaz besiyerinde izolatların oluşturdukları şeffaf zon cetvel ile ölçülmüştür. Bunlardan 53 tanesi (%34) 10 mm ve daha az, 99 tanesi (%63) 20 mm ve daha az, 4 tanesi (%3) ise 20 mm’den daha fazla şeffaf zon oluşturmuştur. Tribütirinli besiyerinde en fazla şeffaf zon oluşturan 47 numaralı (21,5 mm) izolatın 16S rRNA gen bölgesine göre yapılan dizi analizi sonucunda GenBank numarası EU283368.1 olan ‘uncultured actinobacterium clone AS42 16S ribosomal RNA gene’ e %97 oranında benzerlik gösterdiği görülmüştür. İzolatın elde edilen 16S rRNA dizi bilgisi GenBank’a KY172825 erişim numarası ile kaydedilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** aktinomiset, lipaz, toprak

#### 1. Giriş

Aktinomisetler *Actinobacteria* filumunun içinde yer alan gram pozitif, %55’in üzerinde guanin + sitozin oranına sahip bakterilerdir [1]. Filamentli ve dallanan bir yapıya sahip olan bakteriler bu özellikleri nedeniyle küflere benzetilmektedir. Aktinomiset türleri toprak, kompostlar, tatlı su depoları, besin maddeleri ve atmosfer gibi çok çeşitli kaynaklarda bulunabilirler. Asit topraklardan ve turbalardan çok bazik ve nötral topraklarda ve turbalarda yayılış göstermektedirler [2]. Antibiyotik üretme yetenekleri ile tanınmakla beraber diğer intra ve ekstrasellüler metabolitleri ile de endüstri ve biyoteknolojide önemli yerler edinmişlerdir. Antibiyotiklerin yanı sıra antifungal madde üreticisi

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905398723043; Fax.: +905398723043; E-mail: gizemarik1@gmail.com

© Copyright 2021 by Biological Diversity and Conservation

Geliş tarihi: 18.09.2021; Yayın tarihi: 15.12.2021

BioDiCon. 1001-180921

oldukları bilinmektedir [3]. Triaçilgliserollerin hidrolizini katalizyen lipaz enzimini üretme yeteneği de önemli kullanım alanlarından birisidir. Lipazlar uzun triaçilgliserol zincirlerinin tersinir hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Hidroliz sonucu sulu faz ve organik faz arasında diaçilgliserol, monoaçilgliserol, gliserol ve yağ asitleri oluşturmaktadır. Hidrolizin yanı sıra esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarını da katalizler [4]. Mikrobiyal lipazlar stabilite, seçicilik ve geniş substrat spektrumu gibi özelliklerinden ötürü biyoteknolojik uygulamalar için önem taşımaktadır. Ekstraselüler bir enzim olması nedeniyle yüksek miktarlarda üretilebilmektedir Bakteri, fungi ve aktinomisetler ekstraselüler lipaz üretici mikroorganizmalardır [5].

Lipazlar keşfedildikleri tarihten bu yana deterjan, gıda ve farmasötik sanayi gibi başlıca endüstriyel kullanım alanlarına sahiptir. Geleneksel deterjanlara göre lipaz içeren deterjanlar daha az çevresel atık içermektedir. Bu deterjanlar biyolojik olarak parçalanabilen, toksik olmayan, zararlı atıkları olmayan deterjanlardır. Lipazlar ev ve endüstriyel çamaşır, bulaşık deterjanlarında yağ kalıntılarının uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır Alkalin pH'larda (pH: 8-11) çalışabilen lipazların deterjan endüstrisinde kullanım potansiyeli yüksektir. Biyoteknolojik temelli deterjanların kullanımını özellikle endüstride çok yaygındır. Çünkü spesifik temizleme gücüne sahiptirler. Düşük sıcaklıklarda kullanılabilirliği nedeniyle enerji tasarrufu da sağlamaktadır. [6]. Bakteriye lipazlar genellikle nötral ya da alkalin pH'larda optimum çalışabildiğinden bu endüstride kullanım potansiyeli yüksektir [7]. Lipaz tekstil endüstrisinde genellikle kumaşlardan haşıl yağının uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Bu da kumaşın boyayı emmesini kolaylaştırmaktadır [8]. Yüksek sıcaklık ve pH aralıklarında ve çeşitli substratlarda aktif olmaları nedeniyle geleceğin biyokatalistleri arasında yer almaktadır. Bu nedenle yeni lipazların keşfi ve bilinen lipazların da kullanımını daha etkin hale getirme çalışmaları büyük önem kazanmıştır [9].

Bu çalışmada Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında daha önceki bir çalışma ile çeşitli toprak örneklerinden izole edilmiş toplam 156 aktinomiset izolatının lipaz aktiviteleri derin difüzyon yöntemi ile araştırılmış ve en yüksek lipaz aktivitesine sahip olan izolat dizi analizi yöntemi ile tanımlanmıştır.

## 2. Materyal ve yöntem

### 2.1. Aktinomiset izolatları

Lipaz üretme potansiyelleri incelenen 156 adet aktinomiset izolatı daha önceki bir çalışma kapsamında çeşitli toprak örneklerinden izole edilmiştir. -80°C'de muhafaza edilen izolatlar aktif edilmek amacıyla Nutrient Agar (NA) besiyerine ekilmiş ve 28°C'de 7-10 gün inkübe edilerek geliştirilmiştir.

### 2.2. İzolatların lipaz aktivitesinin belirlenmesi

NA besiyerinde geliştirilmiş olan her bir izolattan 6 mm çaplı agar delici ile agar bloklar çıkartılmıştır. Tributirin içeren Lipaz 1 besiyerine (pepton 5 g/L, maya ekstraktı 3 g/L, tributirin 10 ml/L, agar 10 g/L) iki paralel şekilde aktarılan agar bloklar 28°C'de 1 hafta inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda tributirinin lipaz enzimi ile parçalanması sonucu besiyerinde oluşan şeffaf zon ölçülmüştür [10]. Çalışmalar iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

### 2.3. Genomik DNA izolasyonu, 16S rRNA amplifikasyonu ve dizi analizi

Lipolitik aktivitesi yüksek olduğu belirlenen izolatın (47) genomik DNA izolasyonu protokol şu şekildedir: NA ortamında aktinomiset örnekleri inoküle edilmiş ve 28°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Steril santrifüj tüpündeki 200 µl TE (10 mM Tris-HCl pH:8, 1mM EDTA pH:8) tamponuna aktinomisetler aktarılmıştır. Karışıma 400 µl Solüsyon I (% 1 (w/v) sarkosyl, 0,5 M NaCl, % 1 (w/v) SDS) ilave edilmiş ve iyi bir şekilde karıştırılmıştır. 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiş ve her 5 dakikada bir hafifçe çalkalanmıştır. Eşit hacimde fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilmiş ve ters düz yaparak yavaş yavaş karıştırılmıştır. 10.000 g'de 5 dakika 37°C'de santrifüj edilmiş, üst faz yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 0,1 hacim 3M sodyum asetat (pH 5,2) ve 0,6 hacim soğuk isopropanol ilave edilmiştir. 4-6 kez alt üst edilerek yavaşça karıştırılmıştır. 10.000 g'de 5 dakika 37 °C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. 1 ml soğuk %70'lik etanol ilave edilmiş ve 10.000 g'de 3dakika santrifüj edilerek pelet yıkanmıştır. Pelet havada kurutulduktan sonra 50 µl steril nükleaz içermeyen steril distile suda çözülmüştür [11]. Elde edilen genomik DNA % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 2).

16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyon reaksiyonu: 10X TaqBuffer (+KCl-MgCl<sub>2</sub>) 2,5 µl; 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2,5 µl; 2,5 mM dNTP mix 2,5 µl; 2,5 mM primer 9F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 2,5 µl; 2,5 mM primer 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 2,5 µl; Taq polimeraz (5 u/µl) 0,25 µl; nükleaz içermeyen steril distile su 11,75 µl; kalıp DNA 1 µl kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon şartları: ilk denatürasyon; 94°C'de 3 dk, 30 döngü 94°C'de 30 s, 60°C'de 1 dk, 72°C'de 2 dk, son uzama; 72°C'de 10 dk. Elde edilen PCR ürünü %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 3). Promega Wizard® SV Gel-PCR Clean-Up System saflaştırma kiti ile PCR ürünleri saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PCR ürününün dizi analizi için amplifikasyonu yapılmıştır: nükleaz içermeyen steril distile su 1,35 µl; primer 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ya da 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-



3') 0,65 µl; kalıp PCR ürünü 2 µl; PCR mix 6 µl. Reaksiyon şartları: 96°C'de 20 s, 50°C'de 20 s, 60°C'de 4 dk. Beckman Coulter CEQ8000 Quick Start dizi analizi kitiyle dizi analizi reaksiyonu yapılmış, Beckman Coulter Agencourt Clean SEQ ile saflaştırılmıştır. Beckman Coulter CEQ8000 kullanılarak dizi analizi yapılmıştır.

### 3. Bulgular

#### 3.1. İzolatların lipaz aktivitesi

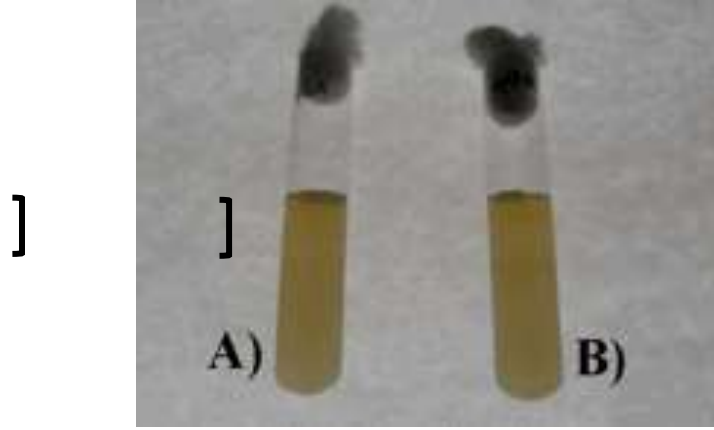
Toplam 156 adet aktinomiset izolatının lipaz üretme potansiyelleri araştırılmış ve sonuçlar Tablo 1 ve 2'de verilmiştir. Şekil 1'de ise lipolitik aktivite sonucu besiyerinde oluşan şeffaf son gösterilmiştir.

Tablo 1. Elde edilen izolatların lipolitik aktiviteleri sonucu oluşturdukları şeffaf zon (mm)

İzolat no	Şeffaf zon	İzolat No	Şeffaf zon	İzolat no	Şeffaf zon	İzolat no	Şeffaf zon
2	11	56	9	120	11,5	169	10,5
3	14,5	59	12,5	123	10	170	15,5
6	10,5	60	13,5	124	7,5	171	15,5
7	8,5	62	13,5	125	8,5	172	13
8	7,5	64	15,5	126	10	173	12,5
9	13	65	10,5	127	15,5	174	20
10	11,5	66	17,5	128	17	175	15
12	10	67	13	129	13,5	176	18,5
13	12	68	13,5	130	18	177	19,5
14	12,5	69	7	131	13	178	12
15	12,5	70	9,5	132	14,5	179	11
16	14,5	71	17,5	133	17,5	180	11
18	8,5	72	16,5	134	17,5	181	8,5
19	9	73	9,5	135	10	182	15
20	10,5	74	10	136	6,5	184	8
21	7,5	75	6,5	137	6,5	185	12,5
22	10,5	76	16,5	138	10	186	6
23	7,5	77	10	139	16	187	6
24	10	78	14,5	141	14	190	11,5
25	10,5	79	20	142	19	192	11,5
26	12	80	18	146	19,5	195	8,5
35	10,5	81	19	147	10,5	196	15,5
36	10,5	85	19	148	5	204	12,5
37	13,5	86	7	149	7,5	205	11
38	14	87	15	150	15	209	18
39	17,5	89	16,5	151	10	211	17,5
40	13	91	18,5	152	7,5	212	12,5
41	14	92	14	153	17	213	18,5
42	19	93	04	154	8,5	215	14,5
43	15	94	07	158	18,5	216	5,5
44	19,5	95	9	159	13	218	16,5
45	16,5	97	16	160	5	219	4,5
46	21	98	10	161	20,5	220	3,5
47	21,5	99	4	162	13,5	221	8
51	8,5	113	13,5	163	7,5	222	20,5
52	9	114	11,5	164	12,5	229	6,5
53	17,5	116	11,5	165	4,5	243	13,5
54	6,5	117	12,5	167	14,5	244	11
55	5	118	10	168	9,5	230A	10

Tablo 2. İzolatların Lipaz 1 besiyerinde oluşturdukları şeffaf zon

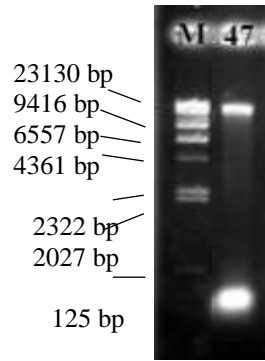
Şeffaf zon	İzolat sayısı
10 mm ve daha az	53
20 mm ve daha az	99
20 mm'den fazla	4



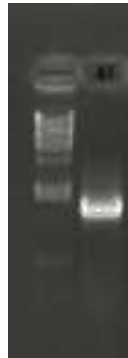
Şekil 1. 47 numaralı izolatın Lipaz 1 besiyerinde oluşturduğu şeffaf zon. A) ve B) çalışmanın paralellerini göstermektedir

### 3.2. Genomik DNA izolasyonu ve 16S rRNA amplifikasyonu

47 numaralı izolatın genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra %1'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir (Şekil 2). Şekil 3'te 1533 bp uzunluğundaki 16S rRNA PCR ürünü gösterilmiştir.



Şekil 2. 47 numaralı izolatın genomik DNA'sının agaroz jelde görüntüsü. M: Lambda DNA/HindIII (Fermentas)



Şekil 3. 9F ve 1541R primerleri ile elde edilen PCR ürünü. Marker: Lambda DNA/HindIII (Fermentas)

#### 4. Sonuçlar ve tartışma

Aktinomisetler sahip oldukları intraselüler ve ekstraselüler biyoaktif metabolitleri nedeniyle önemli bir bakteri grubudur. Biyoteknolojik olarak kullanılan yeni metabolitlerin keşfi için farklı kaynaklardan aktinomiset izolasyonu yapılmaktadır. Aktinomisetlerin yoğun olarak bulunduğu topraktan izolasyon çalışmaları araştırmacılar tarafından yapılmaya devam etmektedir [12,13]. Yapılan bir çalışmada çeşitli toprak örneklerinden izole ettikleri 526 aktinomisetin lipaz aktivitesini incelemiştir. *Streptomyces* cinsi mikroorganizmalar tarafından üretilen lipazlar doğal olmayan substratlar kullanılarak birkaç reaksiyonda test edilmiştir. Sonuçta *Candida rugosa*'dan elde edilen ticari lipazlardan daha iyi aktivite gösteren üç lipaz elde edilmiştir. *Streptomyces halstedii*'den elde edilen lipazın sekonder alkollerin resolüsyonunda iyi aktivite gösterdiği saptanmıştır [14]. Aktinomiset lipazları ile ilgili moleküler çalışmalarda yüksek lipaz aktivitesi gösteren lipaz geninin klonlama çalışmaları yapılmaktadır. Yüksek kopya sayılı vektör taşıyan aktinomisetlerin orijinal izolattan çok daha yüksek lipaz aktivitesi olduğu gösterilmiştir [15].

Bu çalışmada farklı toprak örneklerinden daha önceki bir çalışma sonucu izole edilmiş 156 adet aktinomiset izolatının kültürel ortamda lipolitik aktivitelerinin belirlenmesi sonucu 53 izolatın (%34) 10 mm ve daha az, 99 izolatın (%63) 20 mm ve daha az, 4 izolatın ise (%3) ise 20 mm'den daha fazla şeffaf derinlik oluşturduğu tespit edilmiştir. İzolatlar arasında en yüksek lipolitik aktiviteyi 21.5 mm derinlik ile 47 numaralı izolatın gösterdiği belirlenmiştir. 47 numaralı izolatın 16S rRNA gen bölgesine göre yapılan dizi analizi sonucunda GenBank numarası EU283368.1 olan 'uncultured actinobacterium clone AS42 16S ribosomal RNA gene' e %97 oranında benzerlik gösterdiği görülmüştür. İzolatın elde edilen 16S rRNA dizi bilgisi GenBank'a KY172825 erişim numarası ile kaydedilmiştir. Böylece GenBank kütüphanesine katkı sağlanmıştır.

İleriki çalışmalarda lipaz üretiminin optimizasyonu için çalışmalar gerçekleştirilebilir. Besiyerine eklenen farklı karbon ve nitrojen kaynaklarının kullanımı, besiyerinin pH'nın değiştirilmesi, inkübasyon süresi ve sıcaklığının değiştirilmesi ile optimum şartların belirlendiği çalışmalar mevcuttur [16,17,18]. Ayrıca aktinomiset kaynaklı lipazın enzim karakterizasyonu yapılarak endüstride kullanıma potansiyeli açıklığa kavuşturulabilir.

#### Teşekkür

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi 1005F114 nolu Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir.

#### Kaynaklar

- [1] Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 495–548. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>
- [2] Boyd, R.F. (1988). General microbiology. Mosby College Pub
- [3] Demirel, R., Sariözlü Yılmaz, N., Tay, T., Kıvanç, M. (2016). Screening the antifungal activity of soilborne actinomycetes. *Biological Diversity and Conservation*, 9(2), 207-213.
- [4] Salleh, A. B., Zaliha, R. N., Rahman, R. A., Basri, M. (2006). New Lipases and Proteases. Nova Science Publishers, Inc. New York, U.S.A.
- [5] Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 182–196. <http://doi.org/10.1007/s11947-009-0202-2>
- [6] Hasan F., Shah, A. A., Javed, S., Hameed, A. (2010). Enzymes used in detergents: Lipases. *African Journal of Biotechnology*, 9(31), 4836-4844. <http://doi.org/10.5897/AJBx09.026>
- [7] Sangeetha, R., Arulpandi, I., Geetha., A. (2011). Bacterial Lipases as Potential Industrial Biocatalysts: An Overview. *Research Journal of Microbiology*, 6(1), 1-24. <http://doi.org/10.3923/jm.2011.1.24>
- [8] Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A. (2006). Industrial Applications of Microbial Lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235-251. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>
- [9] Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 763–781. <http://doi.org/10.1007/s00253-004-1568-8>
- [10] Ko, W.H., Wang, I. T., Ann, P. J. (2005). A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 37(3), 597– 599. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.09.006>
- [11] Sharma, A. D., Singh, J. (2005). A nonenzymatic method to isolate genomic DNA from bacteria and actinomycete. *Analytical Biochemistry*, 337(2), 354–356. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2004.11.029>
- [12] Ramesh, S., Mathivanan, N. (2009). Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12), 2103–2111. <http://doi.org/10.1007/s11274-009-0113-4>
- [13] Shah, A. M., Shakeel-u-Rehman, Hussain, A., Mushtaq, S., Rather, M. A., Shah, A., Ahmad, Z., Khan I. A., Hassan, Q. P. (2017). Antimicrobial investigation of selected soil actinomycetes isolated from unexplored regions of Kashmir Himalayas, India. *Microbial Pathogenesis*, 110(2017), 93–99. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.017>

- [14] Cardenas, F., Alvarez, E., De Castro-Alvarez, M.S., Shchez-Montero, J.M., Elson, S., Sinisterra, J.V. (2001). Three New Lipases From Actinomycetes And Their Use In Organic Reactions. *Biocatalysis and Biotransformation*, 19(4), 315-329. <http://doi.org/10.3109/10242420109003647>
- [15] Vujaklija, D., Schröder, W., Abramić, M., Zou, P., Leščić, I., Franke, P., Pigac, J. (2002). A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene. *Archives of Microbiology*, 178(2), 124–30. <http://doi.org/10.1007/s00203-002-0430-6>
- [16] Hasan, N. A., Nawahwi, M. Z., Yahya, N., Othman, N. A. (2018). Identification and optimization of lipase producing bacteria from palm oil contaminated waste. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 10(2S), 300-310. <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v10i2s.23>
- [17] Praveen Kumar, P., Sagaya Jansi, R., Saravana Kumar, P., Nimal Christhudas, I. V. S., Preetam Raj, J. P., Vijayakumar, A., Agastian, P., Ignacimuthu, S. (2017). Optimization of biosynthesis parameters, partial purification and characterization of extracellular lipase from soil derived *Streptomyces* sp. Loyola Lipase-1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12(10), 241–247. <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.10.011>



## Two henbane as alkaloid sources: *Hyoscyamus niger* L. & *Hyoscyamus reticulatus* L.

Kevser TABAN AKÇA<sup>\*1</sup>, Nuraniye ERUYGUR<sup>2</sup>  
ORCID: 0000-0001-8620-6402; 0000-0002-4674-7009

<sup>1</sup> Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 06330, Ankara, Turkey

<sup>2</sup> Selçuk University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 42130, Konya, Turkey

### Abstract

*Hyoscyamus* species known as “Banotu” carry tropane alkaloids. Tropane alkaloids, including atropine, hyoscyamine and scopolamine, have medically important pharmacological activities. In the pharmaceutical industry, medicinal plants can be used as a source of alkaloids. In order to obtain tropane alkaloids in the pharmaceutical industry, the total amount of alkaloids contained in *Hyoscyamus* species must be known.

In this study, the total content of alkaloids in fruit, leaf, stem, and flower parts of *Hyoscyamus niger* L. and *Hyoscyamus reticulatus* L., which grows in Sivas province of Turkey were investigated by spectrophotometric method. In the spectrophotometric analysis, bromocresol green, which forms a complex with alkaloids, was used as a coloring agent, and atropine was used as a standard. As a result of the study, it was determined that all parts of *H. niger* and *H. reticulatus* species contained tropane alkaloids. Except for the flower part, all other parts of *H. niger* contain more alkaloids than *H. reticulatus*. The highest alkaloid content was determined as 3.04 mg/g in *H. niger* leaf and 2.80 mg/g in *H. reticulatus* flower and leaf.

**Key words:** *Hyoscyamus niger*, *Hyoscyamus reticulatus*, total alkaloids, bromocresol green, atropine

----- \* -----

## Alkaloit kaynağı olarak iki banotu: *Hyoscyamus niger* L. & *Hyoscyamus reticulatus* L.

### Özet

“Banotu” olarak bilinen *Hyoscyamus* türleri tropan alkaloitleri taşımaktadır. Atropin, hiyosiyamin ve skopolamin gibi tropan alkaloitleri tıbbi açıdan önemli farmakolojik aktivitelere sahiptir. İlaç endüstrisinde tıbbi bitkiler alkaloit kaynağı olarak kullanılabilir. *Hyoscyamus* türlerinin ilaç endüstrisinde tropan alkaloidi eldesinde kullanılabilmesi amacıyla içerdiği total alkaloit miktarının bilinmesi gerekmektedir. Bu çalışmada ülkemizde Sivas ilinde yetişen banotu türlerinden *Hyoscyamus niger* L. ve *Hyoscyamus reticulatus* L. meyve, yaprak, gövde ve çiçek kısımlarının taşıdığı total alkaloit miktarı spektrofotometrik yöntemle araştırılmıştır. Spektrofotometrik analizde renklendirici ajan olarak alkaloitler ile kompleks oluşturan bromkrezol yeşili, standart olarak ise atropin kullanılmıştır. Çalışma sonucunda *H. niger* ve *H. reticulatus* türlerinin araştırılan tüm kısımlarının tropan alkaloitleri içerdiği belirlenmiştir. Çiçek kısmı dışında *H. niger*'in diğer tüm kısımları *H. reticulatus*'tan daha fazla alkaloit taşımaktadır. En yüksek alkaloit miktarı *H. niger* yaprağında 3.04 mg/g ve *H. reticulatus* çiçek ve yaprağında 2.80 mg/g olarak tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Hyoscyamus niger*, *Hyoscyamus reticulatus*, total alkaloit, bromkrezol yeşili, atropin

### 1. Giriş

Tıbbi bitkilerin hastalıkların tedavisinde ve profilaksisinde kullanılması antik çağlara kadar uzanmaktadır. Tıbbi bitkiler 18. yüzyıla kadar infüzyon ve dekoksiyon gibi basit uygulama şekilleri ile hazırlanırken, etken maddelerin

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903122023178; Fax.: +903122235018; E-mail: kevsertabann@gmail.com

bitkilerden izole edilmesiyle birlikte aktif bileşikleri içeren ilaçlar hazırlanmaya başlanmıştır. 20. yüzyıla gelindiğinde sentez kimyasındaki gelişmelerle birlikte ilaçlarda sentetik bileşikler de yer almaya başlamıştır. Ancak bitkisel ilaçlarla tedavi günümüzde halen önemini korumaktadır. Bazı tıbbi bitkiler doğal florada geniş yayılış göstermektedir ve bu bitkiler ilaç hammaddesi için ucuz kaynak sağlamaktadır. İlaç hammaddesi ihtiyacındaki artış ve bazı bileşiklerin sentezinin izolasyona kıyasla daha zor olması nedeniyle kaynak sağlayabilecek tıbbi bitkilerin kültüre alınarak yetiştirilmesi önem arz etmektedir [1-3].

Alkaloitler doğal kaynaklardan elde edilen, düşük dozlarda bile güçlü fizyolojik ve farmakodinamik aktiviteye sahip olan, bazik özellikteki bileşiklerdir. Alkaloitler botanik ve biyokimyasal kökenleri, kimyasal yapıları ve farmakolojik etkileri yönünden oldukça fazla çeşitlilik göstermektedir [4]. Tropan alkaloitleri azot ihtiva eden bisiklik halka sistemine sahiptir ve 8-metil-8-azabisiklo [3.2.1] oktan yapısındadır. Atropin, hiyosiyamin ve skopolamin önemli tropan alkaloitleridir. Farmakolojik açıdan bu bileşikler parasempatolitik özelliktedir ve özellikle antikolinerjik bileşiklerin başlangıç maddesidir [5,6]. Tropan alkaloitlerinin tıbbi bitkilerden ekstraksiyon ile elde edilmeleri sentetik olarak elde edilmelerine göre daha pratik ve ekonomiktir. Bu bileşikler çoğunlukla Solanaceae familyasına ait bitkilerde bulunmakla birlikte tıbbi amaçla kullanılan türlerin sayısı sınırlıdır. Tropan alkaloiti elde etmek amacıyla *Hyoscyamus*, *Atropa* ve *Duboisia* türleri kullanılmaktadır [4,7].

*Hyoscyamus* (Solanaceae) cinsi ülkemizde “banotu, bengildek, benk, berç, gavur haşhaşı” gibi isimlerle bilinmektedir ve altı tür ile temsil edilmektedir. Bu türler *Hyoscyamus albus* L., *Hyoscyamus aureus* L., *Hyoscyamus leptocalyx* Stapf., *Hyoscyamus niger* L., *Hyoscyamus pusillus* L. ve *Hyoscyamus reticulatus* L.’dur. *Hyoscyamus* türleri alkaloitler, flavonoitler, lignanlar, saponinler, fenolik bileşikler ve gliseridler ihtiva etmektedir. *Hyoscyamus* cinsi tropan alkaloitleri için önemli bir kaynaktır [8].

Alkaloit sentezi ışık, rakım, ısı, toprağın cinsi ve pH’sı ve herbisit uygulamaları gibi çevresel etkenlere göre değişebilmektedir. Alkaloit miktarı aynı cinsde ait bitkilerde türe göre değişkenlik göstermektedir. Ayrıca bir türün kök, gövde, kabuk, yaprak, çiçek, meyve ve tohumlarında değişen miktarlarda alkaloit bulunabilmektedir. Alkaloit miktar tayininde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), florimetri, iyon kromatografisi, kulometri, gaz kromatografi ve elektrokromatografi gibi yöntemler kullanılabilir [9-14]. Bu yöntemlerden başka spektrofotometrik yöntem de alkaloitlerin miktar tayininde sıklıkla tercih edilmektedir. Spektrofotometrik yöntem basitliği, hassasiyeti ve hızlı analize imkan vermesi ile öne çıkmaktadır. Bu yöntemin esası alkaloitin bromkrezol yeşili ile reaksiyonuna dayanmaktadır ve reaksiyon sonucunda sarı renkli katım bileşiği oluşmaktadır [15].

Tropan alkaloitlerinin tıbbi bitkilerden ekstraksiyon ile elde edilmeleri sentetik olarak elde edilmelerine göre daha uygulanabilir bir yöntemdir. Ancak tıbbi bitkilerin ilaç endüstrisinde kullanılabilmesi için bitkinin içerdiği total alkaloit miktarının araştırılması gerekmektedir. Çalışmada Sivas ilinde yetişen banotu türlerinden *Hyoscyamus niger* L. ve *Hyoscyamus reticulatus* L. bitkilerinin çiçek, gövde, meyve ve yaprak kısımlarının taşıdığı total alkaloit miktarı spektrofotometrik yöntemle araştırılmıştır.

## 2. Materyal ve yöntem

### 2.1. Bitki Materyali

*H. reticulatus* ve *H. niger* Temmuz ayında Sivas ilinden toplanmıştır. Bitkiler Doç. Dr. Mehmet Tekin tarafından teşhis edilerek Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi herbaryumunda muhafaza edilmiştir. Örneklerin çiçek, gövde, meyve ve yaprak kısımları ayrılarak oda sıcaklığında gölgede kurutulmuştur.

### 2.2. Ekstraksiyon

Kurutulan örnekler laboratuvar tipi değirmen ile toz edilmiştir. Bitki örnekleri (10 g) kloroform: etilasetat (18:3) içinde süspand edilmiş ve 30 dakika süresince maserasyona bırakılarak ekstreler hazırlanmıştır. Elde edilen ekstreler alçak basınç altında 40°C’de rotavaporda yoğunlaştırılıp kurutulmuştur.

### 2.3. Numune Çözeltilisinin Hazırlanması

Kurutulan ekstre 2 N HCl ile çözülmüş ve çözeltilinin 1 mL’si ayırma hunisine aktarılmıştır. 10 mL kloroform ile 3 kez yıkanarak çözeltilinin pH’sı 0.1 N NaOH ile nötr olacak şekilde ayarlanmıştır. Ardından çözeltiye 5 mL bromkrezol yeşili solüsyonu ve 5 mL fosfat tamponu ilave edilerek karıştırılmıştır. Oluşan alkaloit-bromkrezol yeşili kompleksi 1, 2, 3 ve 4 mL kloroform ile kuvvetlice çalkalanarak ekstre edilmiş ve kompleksin kloroformlu fazda çözünmesi sağlanmıştır. Kloroformlu faz 10 mL’lik bir balon joje içinde toplanmıştır. Gerekli seyreltme işlemlerinden sonra kloroform içinde çözülmüş halde bulunan kompleksin absorbansı 470 nm’de ölçülmüştür [16].

### 2.4. Reaktiflerin Hazırlanması

-Bromkrezol yeşili çözeltisi

Bromkrezol yeşili Shamsa vd. tarafından rapor edilen protokole göre hazırlanmıştır [15]. 69,8 mg bromkrezol yeşili 3 mL 2 N NaOH ve 5 mL distile suda tamamen çözülmüş ve distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

-Fosfat tamponu (pH =4.7)

71.6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 L distile suda çözülerek 2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözeltisi hazırlanmıştır. Ardından 0.2 M sitrik asit ile pH 4.7'ye ayarlanmıştır.

#### 2.5. Atropin standart çözeltisinin hazırlanması

Atropin standart çözeltisi için 10 mg saf atropinin (Sigma, ABD) 10 mL distile suda çözülmüş ve çözeltiden 1 mL alınarak hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

#### 2.6. Kalibrasyon grafiğinin hazırlanması

Atropin standart çözeltisinden 0.4, 0.6, 0.8, 1 ve 1.2 mL alınarak farklı ayırma hunilerine aktarılmıştır. 5 mL fosfat tampon (Ph=4.7) ve 5 mL bromkrezol yeşili çözeltisi eklenerek 1, 2, 3 ve 4 mL kloroform ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Kloroformlu fazlar 10 mL'lik balon jöjede toplanmıştır. Ardından koroformda çözülmüş halde bulunan atropin-bromkrezol kompleksinin absorbanası köre karşı 470 nm'de UV spektrofotometresinde (Shimadzu UV-1700) ölçülmüştür.

### 3. Bulgular

Deneyde kullanılan ekstraksiyon yöntemi ile diğer organik bileşiklerin nihai çözeltide bulunmadığı yalnızca alkaloidleri ihtiva eden bir ekstre elde edilmiştir. Bu sayede bromkrezol yeşili ile alkaloidler bire bir reaksiyona girmekte ve sarı renkli katım bileşiği oluşmaktadır.

Tablo 1'de *H. reticulatus* ve *H. niger* çiçek, gövde, meyve ve yaprak kısımlarında bulunan total alkaloid miktarı mg/g cinsinden ifade edilmiştir. Total alkaloid miktarı en fazla *H. niger* yaprağında 3.04 mg/g ve *H. reticulatus* çiçek ve yaprağında 2.80 mg/g olarak kaydedilmiştir.

Tablo 1. *H. reticulatus* ve *H. niger* çiçek, gövde, meyve ve yaprak kısımlarında tespit edilen total alkaloid miktarı

Bitki adı	Bitki kısımları	Total alkaloid (mg/g)
<i>H. reticulatus</i>	Çiçek	2.80
	Gövde	2.34
	Meyve	2.40
	Yaprak	2.80
<i>H. niger</i>	Çiçek	2.70
	Gövde	2.94
	Meyve	2.74
	Yaprak	3.04

### 4. Sonuçlar ve tartışma

Bitki materyallerinde alkaloidlerin belirlenmesi için farklı hassasiyetlere sahip gravimetrik ve ya titrimetrik yöntemler kullanılabilir. Ancak bu yöntemlerin bazı eksiklikleri bulunmaktadır. Gravimetrik yöntemde elde edilen kalıntının safsızlıklar içerdiği gözlenmiştir. Titrimetrik yöntemlerde ise son noktanın ekstrenin rengiyle maskelenmesi gibi dezavantajlar bulunmaktadır. Öte yandan tüm alkaloidler için geçerli sabit bir yöntem yoktur. HPLC gibi yüksek duyarlılığa sahip yöntemler total alkaloidlerin belirlenmesi için rutin yöntemler değildir ve bu yöntemler oldukça maliyetlidir ve özel ekipman gerektirmektedir.

Tropan alkaloidlerinin bromkrezol yeşili ile spektrofotometrik tayini basit ve hassas bir yöntemdir ve çok fazla özel ekipman gerektirmez. Ayrıca kullanılan yöntemin analiz süresi kısadır, hızlı analize imkan vermektedir.

Tropan alkaloidleri (atropin, hiyosiyamin ve skopolamin) tıbbi açıdan önemli farmakolojik aktivitelere sahiptir. Bu bileşiklerin *Hyoscyamus* türlerinden ekstraksiyon ile elde edilmeleri ve ilaç endüstrisinde kullanılmaları türlerin içerdiği total alkaloid miktarının belirlenmesi ile mümkündür. Aynı il içerisindeki farklı yörelerde çevresel etkenlerin farklılaşması nedeniyle bitkinin sentezlediği alkaloid miktarı değişebilmektedir. Ülkemizde yetişen *H. niger* örnekleri ortalama % 0.107 alkaloid içermektedir [17]. Bitkinin içerdiği total alkaloid miktarı % 0.05 ile 0.10 arasında değişebilmekte ve total alkaloid miktarının %50'sini skopolamin oluşturmaktadır [18]. Literatürde Gümüşhane'den toplanan *H. niger* örneklerinde %0.068, Erzurum'dan toplananlarda %0.084, Eskişehir'den toplanan örneklerde %0.071 ve Aydın-Osmanbükü Yöresi'nden toplanan örneklerde ise % 0.214 oranında alkaloid tespit edildiği bildirilmiştir [19,20]. Bursa Yöresi'nden toplanan *H. niger* yaprak örneklerinde ise total alkaloid oranı % 0.251 ve % 0.195 olarak

hesaplanmıştır [21]. Baytop ve Tanker tarafından yapılan çalışmada *H. reticulatus* yapraklarının % 0.011 ile 0.027 oranında alkaloid içerdiği belirtilmektedir [22]. Van yöresinde 3 farklı alandan toplanan örneklerde ise % 0.058, % 0.116 ve %0.231 oranında alkaloid saptanmıştır [8].

Çalışmamız ile Sivas bölgesinde doğal olarak yetişen *H. niger* ve *H. reticulatus*'un çiçek, gövde, meyve ve yaprak kısımlarının tümünün tropan alkaloidlerini içerdiği gösterilmiştir. Çiçek kısmı dışında *H. niger*'in diğer tüm kısımları *H. reticulatus*'tan daha fazla alkaloid taşımaktadır. İki türde de total alkaloid miktarı yaprak kısımlarında daha fazladır. Elde edilen bulgular ışığında Sivas yöresinde yetişen *H. niger* ve *H. reticulatus* ilaç endüstrisinde tropan alkaloidlerinin elde edilmesi amacıyla kullanılabilir. Bu sayede ülkemiz zengin florası değerlendirilerek tropan alkaloidleri için hammadde kaynağı sağlanabilir.

## Kaynaklar

- [1] Düzenli, A., & Topaktaş, M. (1986, 16-19 Mayıs). Doğal tıbbi bitkilerin tanınması ve kültüre alınması. Bildiri VI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Ankara'da sunulmuştur.
- [2] Kan, Y., & Arslan, N. (2001). *Datura stramonium* L. 'nin botanik varyetelerinin farklı organlarının total alkaloid miktarları ve verimi yönünden karşılaştırılması. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 30(3), 1-12.
- [3] Aslan, S., Akan, H. & Pekmez, H. (2020). Yaslıca beldesi ve Arıkök mahallesi (Şanlıurfa)'nin etnobotanik açıdan araştırılması. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 13(1), 44-61. <https://doi.org/10.46309/biodicon.2020.730293>
- [4] Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2008). Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. Chichester, UK: John Wiley & Sons.
- [5] Drager, B. (2002). Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A*, 978, 1-35. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01387-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01387-0)
- [6] Maldoni, B. (1991). Alkaloids: isolation and purification. *Journal of Chemical Education*, 68(8), 700-703.
- [7] Dewick, P.M. (2009). Medicinal natural products, a biosynthetic approach (3rd ed). Chichester, UK: John Wiley & Sons.
- [8] Yücel, U.M. & Yılmaz, O. (2014). Van yöresinde yetişen iki *Hyoscyamus* (banotu) türünün total alkaloid miktarları. *Van Veterinary Journal*, 25(3), 77-80.
- [9] Qi, M., Wang, P., Lang, Y.X., Lang, J.L., Fu, R.N. (2002). Simultaneous determination of caffeine, theophylline, and theobromine by HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 40, 45-48. <https://doi.org/10.1093/chromsci/40.1.45>
- [10] Masatoki, K. & Hirokazu, T. (2000). Fluorometric reactions of purines and determination of caffeine. *Talanta*, 36, 1171-1175. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(89\)80047-5](https://doi.org/10.1016/0039-9140(89)80047-5)
- [11] Qing-Chun, C., Wang, J. (2001). Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine, and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 937, 57-64. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01306-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01306-1)
- [12] Chernyseva, N.N., Abdullin, I.F., Bundikov, G.K. (2002). Coulometric determination of purine alkaloids series with electrogenerated chlorine. *Journal of Analytical Chemistry*, 56, 663-665.
- [13] Cai, J., Liu, B., Lin, P., Su, Q. (2003). Fast analysis of nicotine related alkaloids in tobacco and cigarette smoke by megabore capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1017, 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.07.003>
- [14] Pagliariussi, R.S., Frietas, A.P., Bastos, J.K. (2002). A quantitative method for the analysis of xanthine alkaloids in Paulliniacupana (guarana) by capillary gas chromatography. *Journal of Separation Science*, 25, 371-374. <https://doi.org/10.1002/1615-9314>
- [15] Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., Verdianrizi, M. (2008). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32, 17-20.
- [16] Ajanal, M., Gundkalle, M.B., Nayak, S.U. (2012). Estimation of total alkaloid in Chitrakadivati by UV-Spectrophotometer. *Ancient Science of Life*, 31(4), 198-201. <https://doi.org/10.4103/0257-7941.107361>
- [17] Baytop, T. (1963). Türkiye'nin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları.
- [18] Tanker, M. & Tanker, N. (1990). Farmakognazi cilt II, Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları.
- [19] Akman, M.Ş. (1952). Aydın ve Muğla illerinde yetişen tıbbi ve zehirli bitkilerin en önemlilerinin farmakolojik toksikolojik etkileriyle, bunlardan hazırlanacak galenik preparatların yabancı memleket müstahzarları ile mukayeseleri, Doçentlik Tezi.
- [20] Baytop, T. & Güner, N. (1983). Une étude sur la teneur en atropine et en scopolamine des Solanacées de Turquie. *İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mecmuası*, 19, 47-55.
- [21] Yılmaz, O. (1990). Bursa yöresinde yetişen önemli zehirli bitkilerin toksikolojik özellikleri, Doktora Tezi.
- [22] Baytop, A. & Tanker, M. (1962). Anadolu *Hyosyamus*'ları üzerinde araştırmalar. *İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası*, 25, 259-68.





## Evaluation of the Potential Anti-inflammatory Effects of Endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) venom on Mammalian Cell Lines

Hülya ALTUNTAŞ<sup>\*1</sup>, Sara VLEMINCKX<sup>2</sup>, Ellen DANNEELS<sup>2</sup>, Ekrem ERGIN<sup>1</sup>, Dirk C. de GRAAF<sup>2</sup>

ORCID: 0000-0003-4505-0098; 0000-0002-6974-5866; 0000-0002-2266-6298;  
0000-0001-7301-3783; 0000-0001-8817-0781

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Eskisehir Technical University, Eskisehir, TURKEY

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Entomology and Bee Pathology, Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences, Ghent University, Ghent, BELGIUM

### Abstract

Parasitic wasps inject their eggs, together with a complex venom mixture, in or on other insects. Parasitoid venoms use various mechanisms to manipulate the physiology and suppress the immune system of their hosts, thus enabling the growth and development of their offspring. Since the major mechanisms of innate immunity in insects are homologous to the Nuclear Factor kappa B (NF-κB) pathway in mammalian immunity, this study hypothesized that venom related immune suppression observed in host insects could also be observed in mammalian cells. Therefore, an NF-κB-dependent luciferase assay was used to determine the effects of *P. turionellae* venom on murine fibrosarcoma L929sA cells. Results from an MTT assay showed that venom from *P. turionellae* has no cytotoxic effects on L929sA cell lines when considering a defined range of exposure time and concentrations. Also, the present study indicated that endoparasitoid *P. turionellae* venom has potential to inhibit NF-κB signaling in cells of mammals at nontoxic concentrations. In conclusion, venom components from ecto- or endoparasitoid wasps have anti-inflammatory potential on increased immune responses of mammalian cells.

**Key words:** endoparasitoid venom; fibrosarcoma cell; NF-κB signal; inflammation; *Pimpla turionellae*

----- \* -----

### *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) Zehirinin Memeli Hücrelerindeki Potansiyel Antienflamatuvar Etkilerinin Değerlendirilmesi

### Özet

Parazitik arılar sahip oldukları kompleks bir zehir karışımı ile birlikte yumurtalarını diğer böceklerin içine veya üzerine enjekte ederler. Parazitoidlerin zehirleri, genç parazitoidin büyüme gelişimini sağlamak amacıyla konak fizyolojisini değiştirecek veya bağışıklık sistemini baskılayacak şekilde iş görmektedir. Böceklerde başlıca doğal bağışıklık yolları olan Toll/Imd yolağının, memelilerdeki NF-kappa B (NF-κB, Nüklear Faktör kappa B) yolağına homolog olması nedeniyle, zehire bağlı olarak konak böceğin bağışıklık sisteminde oluşan tepkilerin memeli hücre sisteminde de olabileceği çalışmamızın hipotezi olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, *P. turionellae* zehirinin murin fibrosarkoma L929sA hücreleri üzerindeki etkilerini belirlemek için NF-κB 'ye bağımlı bir lusiferaz aktivite testi kullanıldı. MTT testinden elde edilen sonuçlar, *P. turionellae*'den elde edilen zehirinin uygulanan inkübasyon sürelerinde ve konsantrasyonlarda L929sA hücre hatları üzerinde sitotoksik etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Ayrıca, bu çalışma, endoparazitoid *P. turionellae* zehirinin, toksik olmayan konsantrasyonlarında memeli hücrelerindeki NF-κB sinyalini inhibe etme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, ekto- veya endoparazitoid

arılardan elde edilen zehir bileşenleri, memeli hücrelerinin artan bağışıklık tepkileri üzerinde antienflamatuvar potansiyele sahiptir.

**Anahtar kelimeler:** endoparazitoit zehir; fibrosarkoma hücre; NF-κB sinyali; enflamasyon; *Pimpla turionellae*

## 1. Introduction

Venom extracts of various animals were studied to determine their possible anti-inflammatory effects on different chronic inflammatory diseases (i.e atherosclerosis and rheumatoid arthritis) and cancer [1-4]. In this context, the research on parasitoid venoms for use as immune suppressing agents has become remarkable, because several peptides/proteins are produced in wide range and at high level in their venom glands. Endoparasitoids have immune regulation mechanisms to provide a suitable nutritional environment for the successful development of their offspring inside host insects [5-6]. These parasitism-dependent regulations of host immunity in particular idiobiont species are due to injection of maternal factors [7-9]. Several endoparasitoids have been proven to exert immune suppressive activity on their host [10]. This function is mostly attributed to the polydnaviruses (PDVs) that are simultaneously released with the parasitoid venom prior to oviposition. PDVs are known to suppress both humoral immunities, by interfering with melanization, AMP synthesis and the prophenoloxidase cascade, and cellular immunity, through inhibition of encapsulation, in the host organism [11-12]. However, like the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae), *P. turionellae* also lacks PDVs, indicating that all immune suppressive effects are likely carried out by venom components [4]. This shows that this endoparasitoid wasp (Hymenoptera: Ichneumonidae) is an interesting species to study anti-inflammatory potential of the venom compounds.

The idiobiont, endoparasitoid wasp *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) also injects its pupal host with venom during oviposition. Studies on the immune suppressive effect of *P. turionellae* venom have shown that it inhibits the immune system in its host organism in order to protect their offspring from elimination. Interestingly, as mentioned before, this wasp venom lacks polydnaviruses and virus-like particles so that the wasp venom is likely to play a major role in host regulation [13]. Venom from *P. turionellae* contains a number of biologically active components including proteins, peptides, and biogenic amines. Additionally, venom displays a mixture of several mid to high range molecular weight proteins [14]. Previous studies reported that depending on host susceptibility, *P. turionellae* venom exhibits cytotoxic and/or cytolytic mechanisms thus inducing host paralysis [9, 14]. Furthermore, venom-induced morphological changes were shown in the BTI-TN-5B1-4 and Aag-2 cell lines isolated from cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) and larvae of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), respectively. All these previous studies have focused on the host insect hemocyte immune responses following treatment with *P. turionellae* venom [15]. However, the promising recent findings reported by Danneels et al. [4] and Saba et al. [16] showed that the venom of two ectoparasitoid species *N. vitripennis* and *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) have anti-inflammatory potential on mammalian cells. It is known that the Toll and Imd pathways in insects are homologous to the mammalian Nuclear Factor kappa B (NF-κB pathway) [17] and studies show that even at molecular level of invertebrates and vertebrates, these innate immunity pathways are evolutionary conserved [18]. In mammalian organisms, various immune responses like inflammation are regulated by the NF-κB transcription factors [19]. Numerous diseases such as inflammatory and autoimmune diseases, septic shock, viral infection, abnormal immune development, and cancer are a result of the incorrect regulation or excess activation of the NF-κB pathway [20-21]. For this reason, modulation of NF-κB activation is the most important therapeutic strategy for reducing tissue damage that follows the release of inflammatory mediators. Therefore, the current study aimed at investigating the potential anti-NF-κB and anti-inflammatory responses of *P. turionellae* venom on mammalian cells. Further, investigating the potential anti-inflammatory responses of an endoparasitoid wasp venom on mammalian cells will help to compare the differences and similarities between an ecto- and endoparasitoid species based on the finding of a previous study [4].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Insect rearing

Idiobiont, solitary and endoparasitoid *P. turionellae* culture was reared on the host, greater wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) pupae [22]. Adult females and males were fed with 50% (v:v) honey-water solution and pupae of *G. mellonella* (5 pupae for every 10 female wasps once every two days). Parasitoid culture was maintained at 24 ± 1°C, 55 ± 5 % RH, and 12: 12 h, L: D photoperiod conditions in insect culture room (D-51) at Animal Physiology Laboratory, Eskisehir Technical University, Eskisehir, Turkey.

### 2.2. Isolation of crude venom from *P. turionellae*

Venom samples used for the experiments were isolated by removing the venom glands of 15 to 20-day-old female wasps [22]. Venom glands of female wasps were used for each replicate of cell viability (MTT) and reporter

gene analysis assays. Females were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes before dissection of venom glands. Then, venom glands were ruptured in distilled water and centrifuged at 12.000 g,  $+4^{\circ}\text{C}$  for 10 min to separate cell debris. The resultant supernatant was used as crude extract of the venom. These supernatants were transferred into clean microcentrifuge tubes and immediately lyophilized in a lyophilizer (Freeze dryer, Christ, model Alpha 1-4), frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use.

### 2.3. Total protein analysis in crude venom

Lyophilized crude venom samples were dissolved in insect saline buffer (ISB, 10 mM Hepes, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM KCl, 150 mM NaCl) before analyzing the amount of total protein content. After suspension of the lyophilized crude venom, a total protein assay was performed according to the Bradford method at 595 nm using bovine serum albumin as the standard curve.

### 2.4. Cell culture

Mouse fibrosarcoma cells transfected with an NF- $\kappa$ B-dependent reporter gene (L929sA cells) were used in all experiments. L929sA cell lines were routinely grown on DMEM medium containing ten percent fetal bovine serum, 0.1 mg/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin supplements and maintained at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  humidified air. Cells were seeded with a density of 3000 cells/well 96-well plates, 48 hours prior to treatment.

### 2.5. MTT assay

To determine the cytotoxicity of *P. turionellae* venom on the viability of L929sA cells, an MTT assay was performed using different concentrations of the venom and multiple incubation times (3, 7 and 24 hours). The MTT assay with L929sA cells was performed according to the protocol of Danneels et al. [4] using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 0.5mg/ml in each well. Subsequently, this plate was incubated at the same cell culture conditions as mentioned above. After this time period, 100  $\mu\text{l}$  culture medium (without serum and antibiotics) in the negative control (NC), 100  $\mu\text{l}$  deionized water or ISB in the positive control (PC) and 100  $\mu\text{l}$  culture medium without serum and antibiotics plus different concentrations of the wasp venom were added to the cell medium in the respective wells. After incubation (3, 7 and 24 hours) with different concentrations of venom (0.08 – 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 20  $\mu\text{l}$  MTT solution (0,5mg/ml) was added to each well in dark flow and incubated overnight in the dark at  $37^{\circ}\text{C}$  till blue deposits appeared. The formazan crystals were then dissolved in SDS/HCl solution and left to incubate at a temperature of  $37^{\circ}\text{C}$  for 5 hours. The absorbance was analyzed calorimetrically at 595 nm with a microplate reader (Apparatus Multiskan FC – Thermo Scientific). Based on this assay, nontoxic concentrations of wasp venom on the L929sA cells were determined to perform reporter gene analysis.

### 2.6. Reporter gene analysis (Luciferase and $\beta$ -galactosidase assay)

Luciferase and  $\beta$ -galactosidase assays were performed as mentioned in Danneels et al. [4]. To examine the effects of the venom on NF- $\kappa$ B activity in this study, NF- $\kappa$ B-dependent reporter gene transfected L929sA cells (3.0 x 10<sup>3</sup> cells in each well) were seeded in a 96 well plate. Subsequently, these plates were incubated as cell culture conditions as mentioned above. After this time period, each well was pretreated with nontoxic concentrations of venom (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63 and 0.32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 15 minutes and stimulated for 5 hours at 1000 and 2000 IU/ml TNF concentrations. After incubation, all media were removed from each well and rinsed with phosphate buffer saline. Subsequently, 100  $\mu\text{l}$  lysis buffer (0.2 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 % Triton X-100) was added to each well and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  overnight. After freezing, cell lysates were thawed and 25  $\mu\text{l}$  of each cell lysate was loaded to black 96-well plates. For luciferase (luc) reporter assays, 50  $\mu\text{l}$  luciferase mix (Sigma) was added per well to one plate and measured directly with luminometer (Viktor3 system, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA). For galactosidase reporter assays, 50  $\mu\text{l}$  gal mix (Sigma) was added per well to the other plate and incubated for one hour. After incubation galactosidase activities in each plate were measured with luminometer (Viktor3 system, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA). The  $\beta$ -galactosidase values were used to normalize the measured luciferase activity. Therefore, normalized NF- $\kappa$ B-dependent reporter gene activity was described as arbitrary light units.

### 2.7. Statistical analysis

All data were expressed as the mean  $\pm$  standard error (SE) of three replicates. Percentage data for cell viability were normalized by arcsine transformation before analysis. The SPSS software program (version 18.0 for Windows, SPSS Science, Chicago, IL) was used for all statistical analysis. First, Shapiro-Wilk test was used to confirm normality of the experimental results. All data were distributed normally. Therefore, our data was evaluated using analysis of

variance (ANOVA) and separated using Least Significant Difference (LSD) and Dunnett's tests. Results were recorded as statistically significant when  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Cytotoxic effects of *P. turionellae* crude venom (MTT assay)

Effects of isolated *P. turionellae* venom on cell viability of L929sA murine fibrosarcoma cells were determined by a cell viability (MTT) assay. As shown in figure 1, the percentage of cell viability changed according to both venom concentration and incubation time ( $P < 0.05$ , Dunnett's test). After three hours of venom treatment, the viability of L929sA cells showed a statistically significant decrease of 17,8% ( $F = 2.796$ ;  $df = 10, 22$ ;  $P = 0.021$ ), only at the highest concentration (40  $\mu\text{g/ml}$ ). After seven hours of venom exposure, lower venom concentrations had no significant effect on cell viability. Treatment with higher venom concentrations (10, 20 and 40  $\mu\text{g/ml}$ ) showed a statistically significant decrease in cell viability. Respectively 87.8 %, 89.9% and 75,31%, of the cells survived ( $F = 8.639$ ;  $df = 10, 22$ ;  $P = 0,000$ ). On the other hand, 24 hours post-incubation with *P. turionellae* venom, it was observed that even at the lower concentrations (from 1.25  $\mu\text{g/ml}$  and above), cell viability decreased significantly when compared with other lower concentrations (0,08 - 0,63  $\mu\text{g/ml}$ ) and control ( $F = 103.162$ ;  $df = 10, 22$ ;  $P = 0.000$ ). Cell viability (%) was reduced below 50% at the two highest venom concentrations after 24 hours incubation as shown in Figure 1.

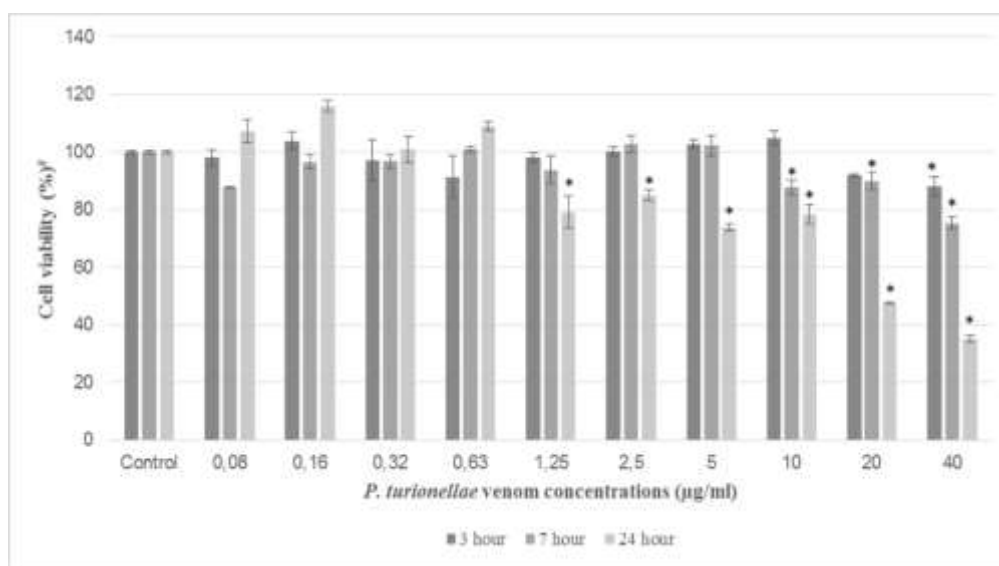


Figure 1. Influence of *P. turionellae* venom on L929sA murine fibrosarcoma cells viability (%)

\*Cell viability was analyzed according to an MTT assay. Means of triplicates (%) after respective treatments are shown in the graph together with the standard error (SE) bars. \*Data were evaluated significantly different at a 95% confidence interval ( $p < 0.05$ , Dunnett's tests).

#### 3.2. Effects of *P. turionellae* crude venom on NF- $\kappa$ B activity in TNF-stimulated L929sA cells

According to MTT assay results, concentrations of venom at 0.32-20  $\mu\text{g/ml}$  were nontoxic on cells within short incubation times. Therefore, these venom concentrations were used on cells for the NF- $\kappa$ B activity analysis. In this analysis, a stably transfected NF- $\kappa$ B -dependent luciferase reporter gene system consisting of an NF- $\kappa$ B-responsive element and a constitutively expressed reporter gene construct (pPGKbGeobpA) encoding  $\beta$ -galactosidase, was used to determine the effects of *P. turionellae* venom on TNF-dependent NF- $\kappa$ B activity in L929sA cells. Transfected L929sA cells were also stimulated with two different concentrations of TNF (1000 and 2000 IU/ml) for five hours to induce the NF- $\kappa$ B reporter gene. While  $\beta$ -galactosidase activity did not change in both TNF-stimulated and unstimulated L929sA cells at all venom concentrations and control group, increased luciferase activity was observed in all TNF-stimulated groups compared with non-TNF-stimulated groups. These results obtained from  $\beta$ -galactosidase activities exhibited continued cell viability. Additionally, the luciferase activity measured in cells induced with TNF at 2000 IU/ml was determined to be higher than the cells stimulated with TNF at 1000 IU/ml. Thus, luciferase and  $\beta$ -galactosidase activity results revealed that L929sA cells responded to TNF, followed by an induction of the NF- $\kappa$ B-reporter gene. After 5 hours of incubation with indicated TNF concentrations, luciferase activity significantly decreased with increased venom concentration in pre-treated cells compared to control ( $P < 0.05$ , Dunnett test). As shown in Figure 2, normalized NF- $\kappa$ B dependent reporter gene activity decreased at 2.5-20  $\mu\text{g/ml}$  venom concentrations when compared with lower venom concentrations and control ( $F = 6.577$ ;  $df = 7, 16$ ;  $P = 0.001$ , LSD test) in cells stimulated with 1000 IU/ml TNF

concentration. Whereas, at all venom concentrations, reporter gene activity decreased in comparison with control in 2000 IU/ml TNF-stimulated L929sA cells ( $F= 9.656$ ,  $df= 7, 16$ ,  $P=0.000$ , LSD test). Briefly, NF- $\kappa$ B dependent reporter gene activity in both 1000 and 2000 IU/ml TNF stimulated L929sA cells was lowest at 10  $\mu$ g/ml venom concentration compared to control cells.

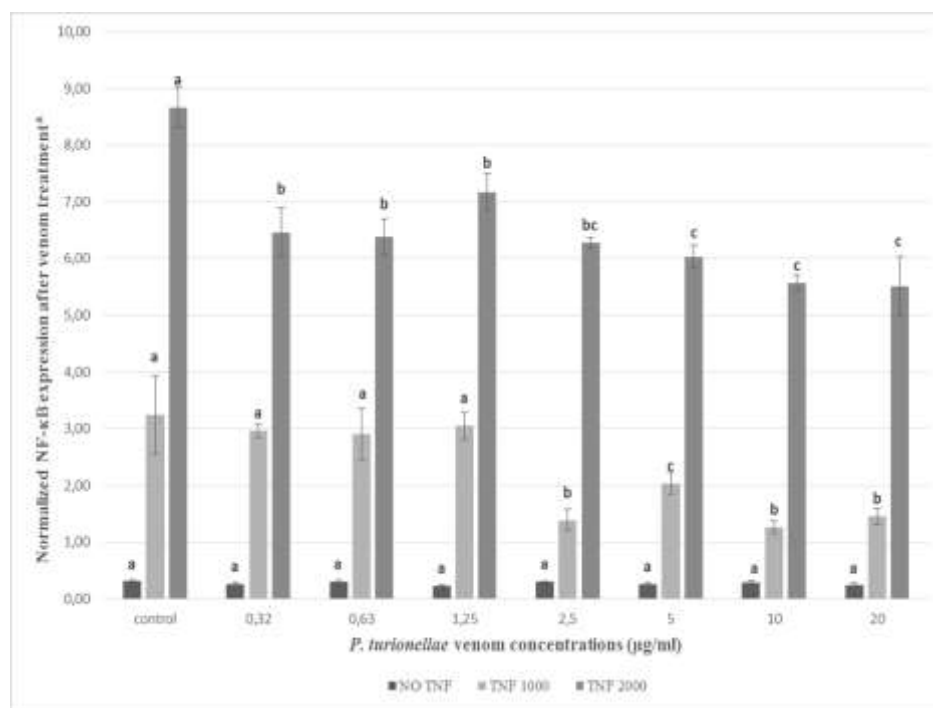


Figure 2. Influence of venom concentrations on TNF-dependent NF- $\kappa$ B expression

\*L929sA cells were seeded in 96 well plates and treated with different venom concentrations (0.32 – 20  $\mu$ g/ml) and TNF (1000-2000 U/ml). Normalized NF- $\kappa$ B expression following treatment is shown as arbitrary light units. Means with SE followed by the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ , LSD test).

#### 4. Conclusions and discussion

Cell death in host-parasitoid relationship is a general mechanism. This is often associated with the suppression of the host's immune system. Cell death may be caused by stimulation of the apoptotic or oncotic pathways by the secretions produced by the female wasps such as venomous cocktails injected into the hosts [10, 23]. Thus, venoms from parasitoid species cause important physiological effects such as interrupting host immunity in parasitoid-host relationships. Previous studies reported that, solitary, idiobiont and endoparasitoid species, *P. hypochondriaca* and *P. turionellae* venoms' lack of PDV induced the paralyzation of their hosts via cytolytic and cytotoxic mechanisms [9, 14-15, 24]. Er et al. [15] also showed that *P. turionellae* venom decreased cell viability, mitotic index, and encapsulation response of host hemocytes. Also, cell-mediated immune response was suppressed via inducing apoptotic or necrotic pathways in the larval and pupal stages of host *G. mellonella*. Furthermore, studies on the suppression of the immune system by endoparasitoid *P. turionellae* venom were performed on other insect cell cultures [15]. However, studies related with the effects of parasitoid venom on mammalian cells are limited in literature [4, 16, 25]. On the other hand, several studies demonstrated that bee venoms exhibit anticonvulsant [26], cytotoxic, genotoxic, mutagenic [27-28], anti-inflammatory [29-30] and cytostatic [31] influences on the mammalian cells. Saba et al. [16] also argued that Hymenopteran venoms contain in them antimicrobial peptides which possess antibiotic activity against mammalian cells. Therefore, the current study was focused on investigating the potential cytotoxic and anti-inflammatory responses of endoparasitoid *P. turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) venom on mammalian cells. Our results show that venom can have cytotoxic effects on mammalian cells but mostly at longer incubation times and higher venom concentrations. Although in our experiment, at some point, significant decrease of cell viability is measured, it is not clear if this is biologically relevant since still 87% of the cells survive (Fig 1). Indeed, *P. turionellae* venom induces cell death in insect cell lines even at low concentrations [15], whereas in murine fibrosarcoma cells (L929sA), cytotoxicity was noticeable only at high doses (20 and 40  $\mu$ g/ml) and long induction time (24 h). Interestingly, these venom concentrations for mammalian cells are higher than concentrations determined for *N. vitripennis* and *B. hebetor* ectoparasitoid species venoms [4, 16]. As is evident from the results, ectoparasitoid venoms have higher toxicity potential than endoparasitoid venoms on mammalian cells.

The second focus of this study was to investigate whether crude venom from *P. turionella* has inhibition potential on the NF- $\kappa$ B immune signaling pathway in L929sA cells stably transfected with a recombinant promoter that has an NF- $\kappa$ B-responsive element. According to cell viability results, venom from *P. turionellae* is not toxic at lower concentrations and shorter incubation periods. Thus, at 5 hours incubation period, 0.32-20  $\mu$ g/ml venom concentrations appeared to be nontoxic to cells and these concentrations were used in reporter gene analysis to determine the anti-inflammatory potential. In previous studies, it was reported that activation of NF- $\kappa$ B transcription factors and mitogen activated protein kinases (MAPK) pathways are evolutionarily conserved in metazoans [32, 33, 34, 35]. Danneels et al. [35] also suggested that ectoparasitoid *N. vitripennis* venom can modulate the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways and thus, suppressing the immune response of the parasitized host *Sarcophaga crassipalpis* pupae. Moreover, *N. vitripennis* venom at low concentrations (0.4-12.5  $\mu$ g/ml) significantly decreased the relative luciferase activity in L929sA fibrosarcoma cells stimulated with TNF (2000IU/ml) 6 hours post-exposure and thus, a concentration dependent venom-mediated suppression was shown in the NF- $\kappa$ B signaling pathway in mammalian cell lines, L929sA and Raw264.7 macrophages [4]. Similarly, venom from endoparasitoid *P. turionellae* decreased the normalized luciferase activity in these L929sA cells stimulated for five hours with two TNF concentrations (1000 and 2000 IU/ml) in this study. At the same time, increased luciferase activity was recorded at 2000 IU/ml TNF concentration when compared to 1000 IU/ml TNF. However, normalized NF- $\kappa$ B-dependent promoter activities in L929sA cells did not decrease in a dose-dependent manner at all venom concentrations, in contrast to *N. vitripennis* venom [4]. In particular, NF- $\kappa$ B dependent reporter gene activity in 2000 IU/ml TNF-stimulated L929sA cells decreased by approximately 36 % at 10  $\mu$ g/ml *P. turionellae* venom concentration compared to control cells. In addition, Saba et al. [16] demonstrated that crude venom from the ectoparasitoid wasp *B. hebetor* has anti-inflammatory activity in a dose dependent manner and suppresses the levels of proinflammatory mediators and cytokines via NF- $\kappa$ B and MAPK pathways in mammals both in vitro and in vivo. Same authors also suggested that *B. hebetor* venom can be evaluated as a nonsteroidal agent for the treatment of inflammatory diseases in the future. Together, the present and previous findings indicate that ectoparasitoid venom even at low concentrations has remarkable inhibitory effects on the NF- $\kappa$ B signaling pathway in mammalian cells as compared to endoparasitoid venom. Keeping this mind, we suggest that these differences between endoparasitoid and ectoparasitoid venom may be related to a number of protein and polypeptide components. It is well known that crude venom from parasitoid wasps includes a high amount of toxins and manipulates cell physiology in diverse ways [25].

In conclusion, our results indicate that venom from *P. turionellae* has an anti-inflammatory potential on mammalian cells dependent on concentrations and exposure time. Therefore, further research on screening *P. turionellae* venom components responsible for possible anti-inflammatory characteristics with the aim of finding treatments for several chronic inflammatory diseases and cancer should be carried out to explore its molecular effects on the NF- $\kappa$ B signaling pathway.

### Acknowledgements

This research was supported by the TUBITAK-FWO Joint Research Cooperation Project (Grant number: 115Z142). This research was also made possible by the funding of the Belgian Agency for Innovation by Science and Technology (IWT), project 141370.

### References

- [1] Tsai, S. H., Chen, Y. C., Chen, L., Wang, Y. M., & Tsai, I. H. (2007). Binding of a venom Lys-49 phospholipase A (2) to LPS and suppression of its effects on *Mouse macrophages*. *Toxicon*, 50, 914–922.
- [2] Park, H. J., Lee, H. J., Choi, M. S., Son, D. J., Song, H. S., Song, M. J., Lee, J. M., Han, S. B., Kim, Y., & Hong, J. T. (2008). JNK pathway is involved in the inhibition of inflammatory target gene expression and NF-kappaB activation by melittin. *Journal of Inflammation*, 29, 5-7. [https://doi: 10.1186/1476-9255-5-7](https://doi.org/10.1186/1476-9255-5-7)
- [3] Dkhil, M. A., Abdel-Baki, A. S., Al-Quraishi, S., & Al-Khalifa, M. (2010). Anti-inflammatory activity of the venom from samsun ants *Pachycondyla sennaarensis*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4, 115–118.
- [4] Danneels, E. L., Gerlo, S., Heyninck, K., Van-Craenenbroeck, K., Bosscher, K., Haegeman, G., & Graaf, D.C. (2014). How the Venom from the Ectoparasitoid Wasp *Nasonia vitripennis* Exhibits Anti-Inflammatory Properties on Mammalian Cell Lines. *Plos-One*, 9 (5), e96825.
- [5] Beckage, N. E. (1993). Games parasites play: The dynamic roles of proteins and peptides in the relationship between parasite and host. In N. E. Beckage, S. N. Thompson & B. A. Federici (Eds), *Parasites and Pathogens of Insects* (pp. 25-57). Academic Press.
- [6] Thompson S. N. (1993). Redirection of host metabolism and effects on parasite nutrition. In N. E. Beckage, S. N. Thompson & B. A. Federici (Eds), *Parasites and Pathogens of Insects* (pp. 125-144). Academic Press.

- [7] Rivers, D. B., Ruggiero, L., & Hayes, M. (2002). The ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) differentially affects cells mediating the immune response of its flesh fly host, *Sarcophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Insect Physiology*, 48, 1053–1064.
- [8] Rivers, D. B., Uçkan, F., Ergin, E., & Keefer, D.A. (2010). Pathological and ultrastructural changes in cultured cells induced by venom from the ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Insect Physiology*, 56, 1935–1948.
- [9] Keenan, B., Uçkan, F., Ergin, E., & Rivers, D. B. (2007). Recent Advances in the Biochemistry, Toxicity, and Mode of Action of Parasitic Wasp Venoms. In D. Rivers & J. Yoder (Eds), Morphological and biochemical changes in cultured cells induced by venom from the endoparasitoid, *Pimpla turionellae* (Chapter 5, pp. 75-92). Research Signpost, Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India.
- [10] Asgari, S. & Rivers, D. B. (2011). Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. *Annual Review of Entomology*, 56, 313–335.
- [11] Gueguen, G., Kalamarz, M. E., Ramroop, J., Uribe, J., & Govind, S. (2013). Polydnviral Ankyrin Proteins Aid Parasitic Wasp Survival by Coordinate and Selective Inhibition of Hematopoietic and Immune NF-kappa B Signaling in Insect Hosts. *PLoS Pathology*, 9. <https://doi:10.1371/journal.ppat.1003580>
- [12] Zhang, G. M., Schmidt, O., & Asgari, S. A. (2006). Calreticulin-like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation. *Developmental & Comparative Immunology*, 30, 756–764.
- [13] Uçkan, F., Sinan S., Savasci S., & Ergin E. (2004). Determination of venom components from the endoparasitoid wasp *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97, 775–780.
- [14] Ergin, E., Uçkan, F., Rivers, D. B., & Sak, O. (2006). In vivo and in vitro activity of venom from the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 61 (2), 87-97.
- [15] Er, A., Sak, O., Ergin, E., Uçkan, F., & Rivers, D. B. (2011). Venom induced immuno-suppression: An overview of hemocyte mediated responses. *Psyche*, Article ID 276376, 14 pages. <https://doi:10.1155/2011/276376>
- [16] Saba, E., Shafeeq, T., Irfan, M., Lee, Y.Y., Kwon, H. W., Seo, M. G., Park, S. J., Lee, K. Y., & Rhee, M. H. (2017). Anti-Inflammatory Activity of Crude Venom Isolated from Parasitoid Wasp, *Bracon hebetor* Say. *Mediators Inflammatory*. <https://doi.org/10.1155/2017/6978194>
- [17] Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., & Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284, 1313-1318.
- [18] Kimbrell, D. A. & Beutler, B. (2001). The evolution and genetics of innate immunity. *Nature Reviews Genetics*, 2, 256-267.
- [19] Yamamoto, Y. & Gaynor, R. B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NFkappa B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 107, 135–142.
- [20] Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A. M., & Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor-kappa B: its role in health and disease. *Journal of Molecular Medicine*, 82, 434-448.
- [21] Di-Donato, J. A., Mercurio, F., & Karin, M. (2012). NF-kappaB and the link between inflammation and cancer. *Immunological Reviews*, 246, 379-400.
- [22] Ergin, E., Altuntaş, H., & Uçkan F. (2013). Effects of parasitization and envenomation by the endoparasitic Wasp *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) on hemolymph protein profile of its host *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Biological Diversity and Conservation*, 6 (1), 62-70.
- [23] Moreau, S. J. & Asgari, S. (2015). Venom proteins from parasitoid wasps and their biological functions. *Toxins*, 7 (7), 2385–2412.
- [24] Parkinson, N. M., & Weaver R. J. (1999). Noxious components of venom from the pupaspecific parasitoid *Pimpla hypochondriaca*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73, 74–83.
- [25] Danneels, E. L., Formesyn, E. M., & de Graaf, D.C. (2015). Exploring the Potential of Venom from *Nasonia vitripennis* as Therapeutic Agent with High-Throughput Screening Tools. *Toxins*, 7, 2051-2070.
- [26] Cunha, A. O. S., Mortari, M. R., Oliveira, L., Oliveira, R., Carolino, G., Coutinho-Netto, J., & dos Santos, W. F. (2005). Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 141(1), 50-57.
- [27] Hoshina, M. M., Santos, L. D., Palma, M. S., & Marin-Morales, M. A. (2013). Cytotoxic, genotoxic/antigenotoxic and mutagenic/ antimutagenic effects of the venom of the wasp *Polybia paulista*. *Toxicon*, 72, 64–70.

- [28] Sisakht, M., Mashkani, B., Bazi, A., Ostadi, H., Zare, M., Avval, F.Z., Sadeghnia, H.R., Mojarad, M., Nadri, M., Ghorbani, A., & Soukhtanloo, M. (2017). Bee venom induces apoptosis and suppresses matrix metalloproteinase-2 expression in human glioblastoma cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 324–328.
- [29] Im, E. J., Kim, S. J., Hong, S.B., Park, J. K., & Rhee, M. H. (2016). Anti-inflammatory activity of bee venom in BV2 microglial cells: Mediation of MyD88-dependent NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative*, Article ID 3704764. [https://doi: 10.1155/2016/3704764](https://doi.org/10.1155/2016/3704764)
- [30] Nipate, S.S., Hurali, P.B., & Ghaisas, M.M. (2015). Evaluation of anti-inflammatory, anti-nociceptive, and anti-arthritic 10 Mediators of Inflammation activities of Indian *Apis dorsata* bee venom in experimental animals: biochemical, histological, and radiological assessment. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 37 (2), 171–184.
- [31] Liu, X., Chen, D., Xie, L., & Zhang, R., (2002). Effect of honeybee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54 (8), 1083-1089.
- [32] Lim, Y. M., Nishizawa, K., Nishi, Y., Tsuda, L., Inoue, Y. H., & Nishida Y. (1999). Genetic analysis of rolled, which encodes a Drosophila mitogen-activated protein kinase. *Genetics*, 153 (2), 763–771.
- [33] Hatada, E. N., Krappmann, D., & Scheidereit, C. (2000). NF-kappa B and the innate immune response. *Current Opinion in Immunology*, 12, 52–58.
- [34] Inoue, H., Tateno, M., Fujimura-Kamada, K., Takaesu, G., Adachi-Yamada, T., Ninomiya-Tsuji, J., Irie, K., Nishida, Y., & Matsumoto, K. A. (2001). Drosophila MAPKKK, D-MEKK1, mediates stress responses through activation of p38 MAPK. *The EMBO Journal*, 20 (19), 5421-30.
- [35] Danneels, E. L., Formesyn, E. M., Hahn, D. A., Denlinger, D. L., Cardoen, D., Wenseleers, T., Schoofs, L., & de Graaf, D.C. (2013). Early changes in the pupal transcriptome of the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis* to parasitization by the ectoparasitic wasp, *Nasonia vitripennis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43, 1189–1200.





## Body size and age structure of *Lacerta agilis* LINNAEUS, 1758 (Reptilia: Lacertidae) from two different populations in Turkey

Kamil CANDAN \*1,2  
ORCID: 0000-0002-6934-3971

<sup>1</sup> Dokuz Eylül University, Faculty of Science, Department of Biology, 35390, Buca, İzmir, Turkey.

<sup>2</sup> Dokuz Eylül University, Fauna and Flora Research and Application Center, 35390, Buca, İzmir, Turkey

### Abstract

Age structure and longevity in 47 museum specimens (31 females and 16 males) of *Lacerta agilis* from two different populations in Turkey were skeletochronologically studied. The mean SVL of males was not significantly different from those of females, although intersexual differences in body size are female-biased. The age structure ranged from 3 to 6 years in male individuals, and 3 to 8 years in females. Age at sexual maturity was 2 years for males, while females reached sexual maturity after the third year of life. The age did not significantly differ between the sexes. Additionally, age structure and SVL did not significantly differ between the two populations. A significant positive correlation between SVL and age structure was present for the Kars population, although there was a weak correlation for the Ardahan population. Considering sex, there was a significant difference in terms of SVL for the Ardahan population, while age structure significantly differed for the Kars population.

**Keywords:** Skeletochronology, Lacertidae, *Lacerta agilis*, Turkey

----- \* -----

## Türkiye'deki iki farklı popülasyondan *Lacerta agilis*'in LINNAEUS, 1758 (Reptilia: Lacertidae) vücut büyüklüğü ve yaş yapısı

### Özet

Türkiye'deki iki farklı popülasyondan *Lacerta agilis*'in 47 müze örneğinde (31 dişi ve 16 erkek) yaş yapısı ve yaşam süresi iskelet kronolojisi kullanılarak incelenmiştir. Cinsiyete bağımlı vücut büyüklüğü dişi eğilimli olmasına rağmen, erkeklerin ortalama SVL'si dişilerden önemli ölçüde farklı değildir. Yaş dağılımı erkek bireylerde 3 ile 6 yıl arasında, dişilerde ise 3 ile 8 yıl arasında değişmektedir. Erkekler iki, dişiler ise yaşamın üçüncü yılından sonra cinsel olgunluğa ulaşır. Yaş, cinsiyetler arasında önemli ölçüde farklılık göstermez. Bununla birlikte, yaş yapısı ve SVL iki popülasyon arasında önemli ölçüde farklı değildir. SVL ile yaş arasında Ardahan popülasyonu için zayıf bir korelasyon olsa da Kars popülasyonu için anlamlı ölçüde bir pozitif korelasyon vardır. Cinsiyetler göz önüne alındığında, Ardahan popülasyonunda SVL için, Kars popülasyonunda ise yaş dağılımı için anlamlı bir fark söz konusudur.

**Anahtar kelimeler:** İskelet kronolojisi, Lacertidae, *Lacerta agilis*, Türkiye

### 1. Introduction

The Sand Lizard, *Lacerta agilis* Linnaeus, 1768, is widely distributed in the Palearctic and extends from north (Sweden, Finland, and southern Great Britain to northern Greece) to south (Caucasus) and west (Pyrenees) to east (northwest China) [1]. In Turkey, it is known from northeastern Turkey including Erzurum, Ardahan, Kars, Artvin, and Trabzon provinces [2]. *Lacerta agilis* is a closely related species belonging to the subgenus *Lacerta* s. str. (= *Lacerta* I group sensu) and is a medium-sized, diurnal, insectivorous lizard [3]. This species is listed as LC (Least Concern) in the

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902323018000; Fax.: + 9023245341 88; E-mail: kamil.candan@deu.edu.tr

© Copyright 2021 by Biological Diversity and Conservation

Geliş tarihi: 06.09.2021; Yayın tarihi: 15.12.2021

BioDiCon. 1002-060921

IUCN Red List of Threatened Species because of its wide distribution, tolerance of a degree of habitat modification, and presumed large population. It is unlikely that its population will decline fast enough to qualify for listing in a more threatened category [4].

The age structure of a population, which is by nature related to its life history [5, 6], is defined by demographic parameters [7], and reveals important features of individuals such as age and size at maturity, frequency of reproduction, clutch or litter size and hatchlings, and survivorship [8, 9]. Nevertheless, variation in some traits, such as offspring size or egg and number, is frequently associated with species body size, and egg or offspring number is generally associated with female size within species [10]. The skeletochronology method, which is based on the presence of growth layers in bone tissue, is very useful in calculating the age of lizards [11]. This method shows that when bone growth is interrupted because of seasonal marks or slowed because of natural biological rhythms, rings representing arrested growth (LAGs) can occur in animals like reptiles [12], and it was used successfully in many studies of the family Lacertidae [5, 6, 9, 13]. However, data about age structure, senescence, and reproductive life span are still not available for the vast majority of reptile species [10]. Therefore, the studies related to age and growth estimation of this species with wide distribution using skeletochronology are quite limited [3, 14, 15, 16, 17, 18]. This study aimed to obtain data about the age structure, life history and some growth parameters of *L. agilis* in two different populations from Turkey.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study sites and specimens

A total of 47 (31 females and 16 males) lizard specimens were used from two different populations of *L. agilis* (Çayağazı Village, Ardahan Province: 41.193240N-42.856007E, 1766 m a.s.l. and Mescitli Village, Kars Province: 40.252579N-42.647452E, 2037 m a.s.l.). All specimens were obtained from the museum collection in the Zoology Lab of the Department of Biology in the Science Faculty, Dokuz Eylül University (Collection numbers: ZDEU-113.2011, ZDEU-319.2013). To obtain bone samples for skeletochronology analysis, the toe of each individual was taken using a single digit from the back-right foot. Then, the toes were placed in an Eppendorf tube containing 96% ethanol. Afterward, they were kept at +4 °C for skeletochronology. The sex of the lizards was determined by examining of the secondary sexual characters (overall coloration, larger head, and more developed femoral pores in males and developing eggs in females). The snout-vent lengths (SVL) of specimens were measured using a digital caliper compass with an accuracy of 0.01 mm.

### 2.2. Skeletochronology

The standard procedure was used for skeletochronology [5, 13, 19, 20]. The phalanges, those preserved in 96% ethanol solution, were washed in tap water for 24 h to remove alcohol and then decalcified in 5% nitric acid solution for 2 h. The phalanges were washed again in tap water for approximately 12 h after decalcification. The cross-sections (16 µm of thickness) were taken from the diaphyseal region of the phalanx by using a rotary microtome and then stained with Ehrlich's hematoxylin. All the sections were examined under a stereomicroscope targeting selection of good sections. All photos were examined, and the analysis of LAGs (lines of arrested growth) was performed by different researchers according to the previous technique that is standard. Double lines were disregarded for age determination. The distance between two adjoining LAGs is a good indicator of individual growth in a given specimen. Any obvious decrease in space between two subsequent LAGs was taken as an indicator of the age of sexual maturity [21]. Age at sexual maturity was determined by considering the distance between the two adjoining LAGs. The proportion of endosteal resorption (the bone remodeling process that might have reabsorbed part of the entire LAGs = ER) was assessed by comparing the diameters of eroded marrow cavities with the diameters of non-eroded marrow cavities [22].

### 2.3. Climatic data

Climatic data for both populations were obtained from the Turkish State Meteorological Service [23]. Monthly average temperature and precipitation data were collected for the measurement periods between 1927 and 2018.

### 2.4. Statistical analyses

The normality of the SVL and age distribution for each population was tested with the Kolmogorov-Smirnov test ( $P > 0.05$ ). After variables were detected to have normal distribution, parametric tests were applied to test significant differences. Non-parametric tests were used when variables were not normally distributed. The difference between SVL and age between sexes were analyzed with both the Student t-test and Mann-Whitney U-test. Spearman's correlation coefficient was used to infer the relationships between age and SVL. Regression analysis was performed by using the quadratic model, which had the highest  $R^2$  value. All statistical tests were performed with IBM SPSS 23.0 for Windows.

A size dependent dimorphism index (SDI) aiming to exhibit the degree of sexual size dimorphism (SSD) was used by following [24]:

$$SDI = [(\text{mean length of the larger sex} / \text{mean length of the smaller sex}) \pm 1]$$

+1 if males are larger or -1 if females are larger. It is defined as positive whenever females are larger than males and negative in the converse case.

### 3. Results

LAGs were counted on phalangeal cross-sections in Figure 1. Although endosteal resorption was observed in 30 individuals (63,8%), it was not difficult to determine the age of specimens. Double lines were observed in 13 (27,6%) specimens. The age at sexual maturity was 2 and 3 years for males and females of *L. agilis*, respectively.

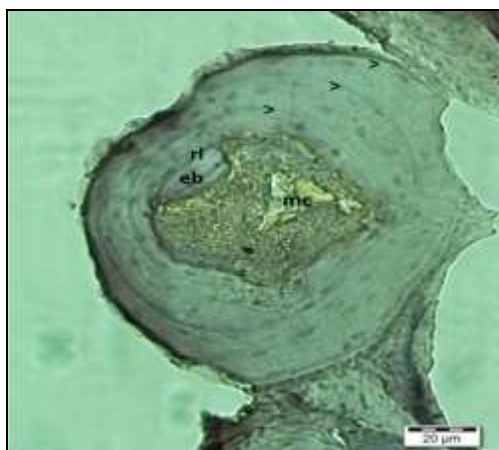


Figure 1. A cross-section at the diaphysis of a phalanx of *Lacerta agilis* with 3 LAGs. eb, endosteal bone; mc, marrow cavity; rl, resorption line. (SVL of the specimen: 61.3 mm).

#### 3.1. The Ardahan population

Descriptive statistics for age and SVL are given in Table 1. Mean SVL and age were  $76.26 \pm 1.62$  mm and  $5 \pm 0.26$  years in males and  $65.62 \pm 3.42$  mm and  $4.33 \pm 0.31$  years in female specimens. Intersexual differences in body size were female-biased (SDI: 0.74). There were significant differences in terms of SVL between sexes (Independent t-test:  $P = 0.04$ ), whereas age did not differ between female and male specimens (Mann-Whitney U-test:  $U = 36$ ,  $P = 0.10$ ). In both sexes, there was no correlation between SVL and age structure (Spearman's correlation, males,  $r = -0.231$ ,  $P = 0.058$ ; females,  $r = 0.427$ ,  $P = 0.11$ ). The exponential regression is similar to Spearman's correlation between SVL and age ( $y = 45.23 + 5.28 * x$ ) (Figure 2). The maximum longevity was seven years for the Ardahan population.

#### 3.2. The Kars population

Descriptive statistics for age and SVL are given in Table 1. Mean SVL and age were  $71.97 \pm 2.33$  mm and  $4.13 \pm 0.22$  years in males and  $76.14 \pm 2.82$  mm and  $5.13 \pm 0.32$  years in female specimens. Intersexual differences in body size were female-biased (SDI: 0.49). There were no significant differences in terms of SVL between sexes (Mann-Whitney U test:  $U = 42$ ,  $P = 0.17$ ). Also, age structure did not indicate a significant difference between female and male specimens (Independent t-test:  $P = 0.55$ ). In both sexes, a significant positive correlation was recorded between SVL and age structure (Spearman's correlation, males,  $r = 0.784$ ,  $P = 0.02$ ; females,  $r = 0.791$ ,  $P = 0.000$ ). The exponential regression fit Spearman's correlation between SVL and age ( $y = 45.28 + 6.15 * x$ ) (Figure 3). The maximum longevity was eight years for the Kars population.

Table 1. Descriptive statistics of populations of *L. agilis*.

Parameters	the Ardahan population			the Kars population			Total		
	N	Mean±SE	Range	N	Mean±SE	Range	N	Mean±SE	Range
<b>Females</b>	15			16			31		
SVL (mm)		65.62±3.42	49.40-92.70		76.14±2.82	47.10-94.50		71.05±2.37	47.10-94.50
Age (years)		4.33±0.31	3-7		5.13±0.32	3-8		4.74±0.23	3-8
<b>Males</b>	8			8			16		
SVL (mm)		76.26±1.62	70.70-83.40		71.97±2.33	62-81.60		74.11±1.48	62.00-83.40
Age (years)		5±0.26	4-6		4.13±0.22	3-5		4.56±0.81	3-6

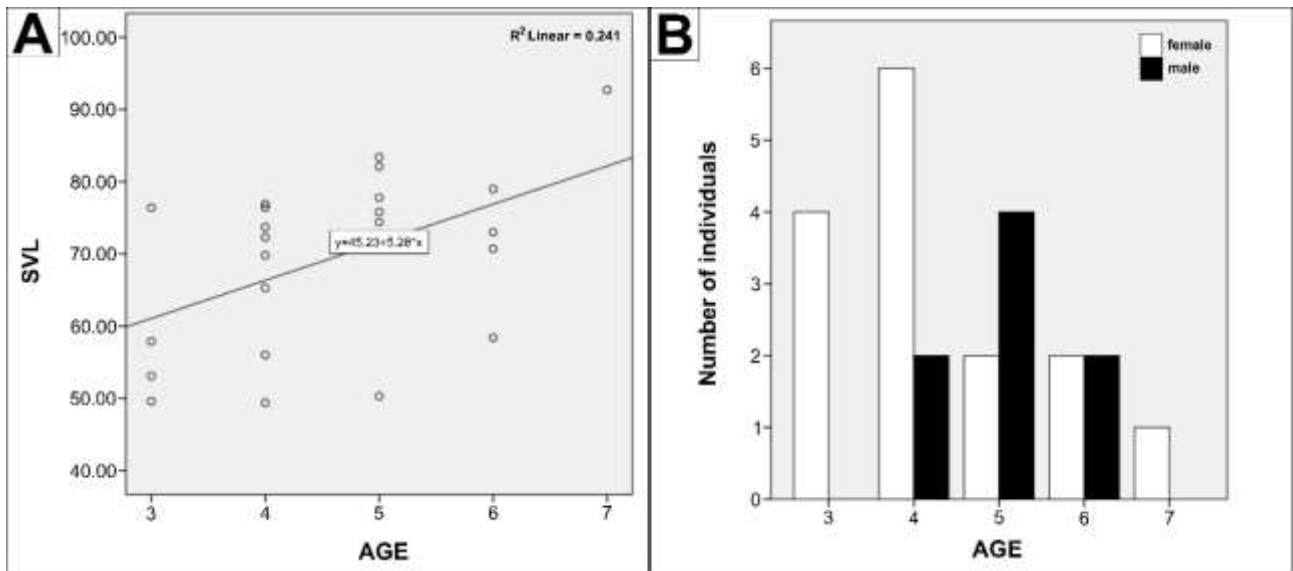


Figure 2. (A) Regression of SVL on age in *L. agilis* from the Ardahan population. (B) Age distribution of males and females in *L. agilis* from the Ardahan population.

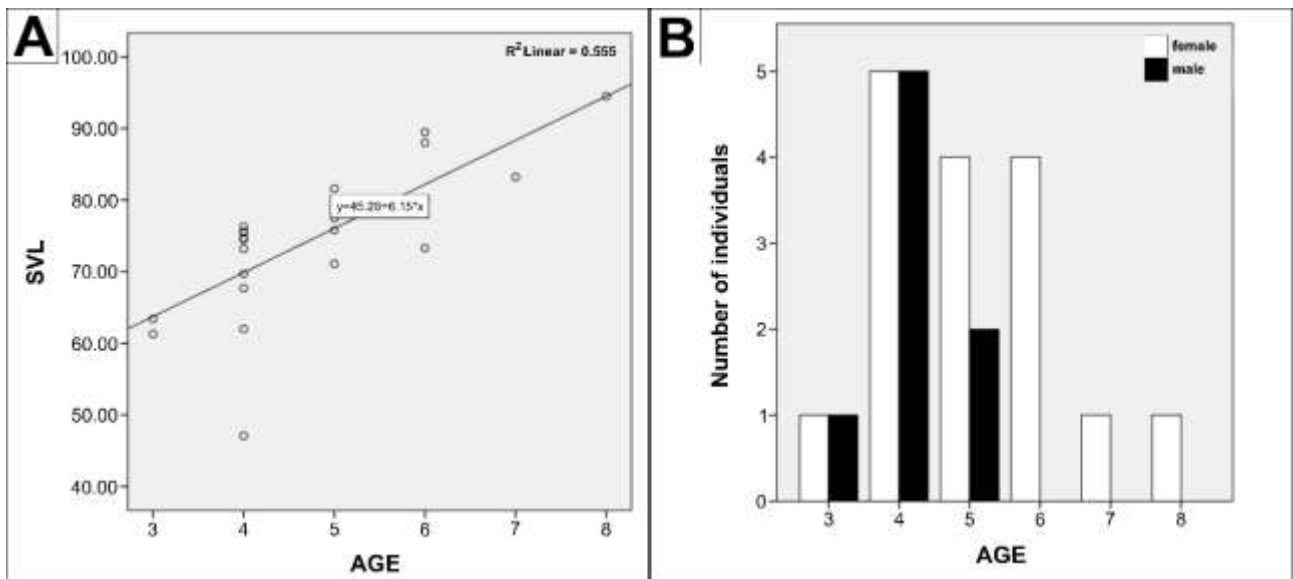


Figure 3. (A) Regression of SVL on age in *L. agilis* from the Kars population. (B) Age distribution of males and females in *L. agilis* from the Kars population.

### 3.3. Climatic data

Both temperature and precipitation data indicated normal distribution according to the Shapiro-Wilk test ( $0.05 < P$ ). In the independent samples test, Levene's test indicated that the variances of the groups were homogeneous with 95% confidence ( $F = 0, P = 0.997$ ;  $F = 0.934, P = 0.344$  for precipitation). Consequently, there was no difference for both populations in terms of precipitation ( $t = 0.462, df = 22, P = 0.648$ ). Similarly, the temperature did not indicate extreme differences between the populations ( $t = -0.244, df = 22, P = 0.809$ ).

## 4. Discussion and conclusion

The skeletochronological method was applied to specimens of *Lacerta agilis* from different populations and the first data about age structure and body size were obtained in Turkey. The longevity of *L. agilis* was estimated to be 8 years in females and 6 years in males. The maximum longevity of *L. agilis* is comparable to that of other related lizards, such as *Ophisops elegans* [25] and *Psammoudrous algirus* [26], but lower than *Acanthodactylus boskianus* [13] and *Eremias suphani* [6]. The maximum longevity of *L. agilis* from Dagestan (Russian) was 6-7 years for males and 5-6 years for females [3], whereas age ranged from 2-4 years in males and 3 years in females of *L. agilis* from Italy [16].

[15] reported that the maximum longevity of the same species from Sweden was 12 years for females and 11 years for males. On the other hand, [27] reported that the maximum longevity in a high population of *Darevskia clarkorum* was 12 years, whereas longevity was 10 years in low populations. It seems that age structure and longevity in lizards are variable among populations of the same species. Furthermore, this variation in longevity is probably a result of physiological features, the effect of predators and parasites [28].

In the results, the mean SVL had a significant difference between sexes in the Ardahan population, but there was no difference in terms of SVL between male and female individuals from the Kars population; in addition to this, SSD of both populations was female-biased. However, [29] pointed out that male individuals were larger than female individuals in the majority of lizards; moreover, they stated that male-biased SSD was the rule in several families like Lacertidae, but this rule is not always valid because this status can change in many lizard species (*Podarcis tauricus* [30]; *Apathya cappadocica* [19]; *Carlia rostralis* [31]; *Phoenicolacerta laevis* [9] for male-biased SSD; *Darevskia derjugini* [32]; *Carlia storri* [31] for female-biased). [29] also stated that SSD variation between male and female individuals of a single species was associated with population differences based on environmental conditions like altitude, latitude, and climate. In addition, in another study, *L. a. agilis* (female-biased) and *L. a. boemica* (male-biased) showed a clear contrast concerning SSD, and it was stated to occur in ecogeographical clines within subspecies of *L. agilis* with more male-biased SSD in warmer climates [33]. According to observations, there was no difference for *L. agilis* in terms of climatic conditions between Ardahan and Kars regions; that is, annual average temperature and precipitation in Ardahan were 3.9 C° and 555 mm, whereas annual average temperature and precipitation in Kars were 4.9 C° and 500 mm, respectively, according to measurement period between 1927 and 2018 [23]. Furthermore, this status was statistically supported. The female-biased SSD in populations of *L. agilis* for both regions may be due to reproductive success because the body size of female individuals is strongly correlated with fecundity in many animal species, whereas the body size of male individuals was correlated with mating success [34]. Additionally, [35] pointed out that reproductive characteristics like fecundity selection can explain the relationship to sexual size dimorphism (SSD) in *L. agilis*. Also, it was shown that species which are female-biased SSD are also oviparous and viviparous [34]. This applies to *L. agilis*, which is an oviparous lizard.

In conclusion, life-history traits such as age structure, body size, longevity, and sexual maturity were studied for *L. agilis* from Turkey. In this study, all populations of *L. agilis* had female-biased SSD. The results supported that the effect of sexual selection was probably weaker than selection on fecundity in this species because the climatic conditions of both populations did not have an important effect on SSD.

## References

- [1] Andres, C., Franke, F., Bleidorn C., Bernhard, D., & Schlegel, M. (2014). Phylogenetic analysis of the *Lacerta agilis* subspecies complex. *Systematics and Biodiversity*, 12, 43-54.
- [2] Baran, İ., & Atatür, M. K. (1998). *Turkish Herpetofauna (Amphibians and Reptiles)*. Turkish Republic of Environmental Ministry, Ankara.
- [3] Roitberg, E. S., & Smirina, E. M. (2006). Age, body size and growth of *Lacerta agilis boemica* and *L. agilis strigata*: a comparative study of two closely related lizard species based on skeletochronology. *Herpetological Journal*, 16, 133-148.
- [4] Agasyan, A., Avcı, A., Tuniyev, B., Lymberakis, P., Andren, C., Cogalniceanu, D., Wilkinson, J., Ananjeva, N., Üzümlü, N., Orlov, N., Podloucky, R., Tuniyev, S., Kaya, U., Crnobrnja-Isailovic, J., Vogrin, M., Corti, C., Perez-Mellado, V., Sa-Sousa, P., Cheylan, M., Pleguezuelos, J., Kyek, M., Westerström, A., Nettmann, H. K., Borczyk, B., Sterijovski, B., & Schmidt, B. (2010). *Lacerta agilis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T157288A5071439. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-4.RLTS.T157288A5071439.en>.
- [5] Gül, S., Özdemir, N., Kumlutaş, Y., & Ilgaz, Ç. (2014). Age structure and body size in three populations of *Darevskia rudis* (Bedriaga, 1886) from different altitudes. *Herpetozoa*, 26, 151-158.
- [6] Üzümlü, N., Avcı, A., Kumlutaş, Y., Beşer, N., & Ilgaz, Ç. (2015). The first record of age structure and body size of the Suphan Racerunner, *Eremias suphani* Başoğlu & Hellmich, 1968. *Turkish Journal of Zoology*, 39, 513-518.
- [7] Stearns, S. C., & Koella, J. (1986). The evolution of phenotypic plasticity in life-history traits: predictions for norms of reaction for age and size-at-maturity. *Evolution*, 40, 893-913.
- [8] Bauwens, D. (1999). Life history variation in lacertid lizards. *Natura Croatica*, 8, 239-252.
- [9] Üzümlü, N., Ilgaz, Ç., Avcı, A., Candan, K., Güler, H., & Kumlutaş, Y. (2018). Comparison of the body size and age structure of Lebanon lizard, *Phoenicolacerta laevis* (Gray, 1838) at different altitudes in Turkey. *Vertebrate Zoology*, 68, 83-90.
- [10] Vitt, L. J. (2016). Reptile diversity and life history. p. 3–15. In: Jr. C. K. Dodd (ed.), *Reptile Ecology and Conservation. A Handbook of Techniques*. Oxford University Press, Penrith, Cumbria.
- [11] Castanet, J., & Smirina, E. M. (1990). Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. *Annales Des Sciences Naturelles*, 11, 191-196.

- [12] Green, C.C. (2018). Osteohistology and Skeletochronology of An Ontogenetic Series of Clidastes (Squamata: Mosasauridae): Growth and Metabolism in Basal Mosasaurids. Unpublished master's thesis. Fort Hays State University, Kansas.
- [13] Üzüm, N., Ilgaz, Ç., Kumlutaş, Y., Gümüş, Ç., & Avcı, A. (2014). The body size, age structure, and growth of Bosc's fringe-toed lizard, *Acanthodactylus boskianus* (Daudin, 1802). *Turkish Journal of Zoology*, 38, 383-388.
- [14] Strijbosch, H., & Creemers, R. C. M. (1988). Comparative demography of sympatric populations of *Lacerta vivipara* and *L. agilis*. *Oecologia*, 76, 20-26.
- [15] Olsson, M., & Shine, R. (1996). Does reproductive success increase with age or with size in species with indeterminate growth - a case study using sand lizards (*Lacerta agilis*). *Oecologia*, 105, 175-178.
- [16] Guarino, F. M., Gia, I. D., & Sindaco, R. (2010). Age and growth of the sand lizards (*Lacerta agilis*) from a high alpine population of north-western Italy. *Acta Herpetologica*, 5, 23-29.
- [17] Kidov, A. A., Timoshina, A. L., Khairutdinov, I. Z., Kovrina, E. G., & Matushkina, K. A. (2014). Age, growth and reproduction of the Bohme's lizard, *Lacerta agilis boemica* SUCHOV 1929 (Reptilia: Lacertilia: Lacertidae) in the foothills of North Ossetia. *Vestnik of Buryat State University*, 4(2), 49-52.
- [18] Guarino, F. M., Crovetto, F., Mezzasalma, M., & Salvidio, S. (2015). Population size, age structure and life expectancy in a *Lacerta agilis* population from northwest Italian Alps. *North Western Journal of Zoology*, 11, 241-246.
- [19] Gül, S., Özdemir, N., Avcı, A., Kumlutaş, Y., & Ilgaz, Ç. (2015). Altitudinal effects on the life history of the Anatolian lizard (*Apathya cappadocica*, Werner 1902) from southeastern Anatolia, Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 39, 507-512.
- [20] Gül, S., Ilgaz, Ç., Kumlutaş, Y., & Candan, K. (2017). Age structure and growth pattern in an east Anatolian high altitude population of *Iranolacerta brandtii* (De Filippi, 1863) (Squamata: Sauria: Lacertidae). *Herpetozoa*, 30, 3-7.
- [21] Altunışık, A., & Eksilmez, H. (2018). Demographic life history traits in a population of a critically endangered species, *Darevskia dryada* (Darevsky & Tuniyev, 1997). *Animal Biology*, 68, 27-37.
- [22] Beşer, N., Ilgaz, Ç., Kumlutaş, Y., Avcı, A., Candan, K., & Üzüm, N. (2019). Age structure and body size of a critically endangered species, *Acanthodactylus harranensis* (Squamata: Lacertidae) and its demography. *Animal Biology*, 69, 421-431.
- [23] Tsms (2020). Turkish State Meteorological Service. < <https://www.mgm.gov.tr> > Ministry of Agriculture and Forestry, Ankara, Turkey. Accessed 11 May 2019.
- [24] Lovich, J. E., & Gibbons, J. W. (1992). A review of techniques for quantifying sexual size dimorphism. *Growth Development and Aging*, 56, 269-281.
- [25] Gharzi, A., & Yari, A. (2013). Age determination in the Snake-eyed Lizard, *Ophisops elegans* by means of skeletochronology (Reptilia: Lacertidae). *Zoology in the Middle East*, 59(1), 10-15.
- [26] Bouragaoui, Z., & Nouira, S. (2019). Age determination in the Sans Lizard *Psammodromus algirus* (Reptilia: Lacertidae) by means of skeletochronology. *Current Herpetology*, 38(2), 173-179.
- [27] Bülbül, U., Kurnaz, M., & Eroğlu, İ. (2016). Body size and age structure of the endangered Clark's lizard (*Darevskia clarkorum*) populations from two different altitudes in Turkey. *Amphibia-Reptilia*, 37, 450-456.
- [28] Zhang, L., & Lu, X. (2012). Amphibians live longer at higher altitudes but not at higher latitudes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 106, 623-632.
- [29] Cox, R. M., Butler, M. A., & John-Alder, H. B. (2007). The evolution of sexual size dimorphism in reptiles. p. 38-49. In: D. J. Fairbairn, T. Székely, and W. Blanckenhorn (eds.), Sex, size and gender Roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism. Oxford University Press, Oxford, UK.
- [30] Altunışık, A., Ergül-Kalaycı, T., Uysal, İ., Tosunoğlu, M., & Özdemir, N. (2016). Age, adult survival rate and adult life expectancy of *Podarcis tauricus* population (Reptilia: Lacertidae) from Saros Bay. Turkey. *Russian Journal of Herpetology*, 23, 278-282.
- [31] Manicom, C., Alford, R., Schoener, T. W., & Schwarzkopf, L. (2014). Mechanisms causing variation in sexual size dimorphism in three sympatric, congeneric lizards. *Ecology*, 85, 1531-1544.
- [32] Kurnaz, M., Bülbül, U., Eroğlu, A. İ., Uzun, F., Koç, H., & Kutrup, B. (2018). Age and growth of the artvin Lizard, *Darevskia derjugini* (NIKOLSKY, 1898), in Turkey (Squamata: Sauria: Lacertidae). *Herpetozoa*, 30, 147-158.
- [33] Roitberg, E. S. (2007). Variation in sexual size dimorphism within a widespread lizard species. p. 143-153. In: D. J. Fairbairn, T. Székely, and W. U. Blanckenhorn (Eds.). Sex, size and gender Roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism. Oxford University Press, Oxford, UK.
- [34] Jimenez-Arcos, V. H., Sanabria-Urban, S., & Cueva del Castillo, R. (2017). The interplay between natural and sexual selection in the evolution of sexual size dimorphism in *Sceloporus* lizards (Squamata: Phrynosomatidae). *Ecology and Evolution*, 7, 905-917.
- [35] Roitberg, E. S., Eplanova, G. V., Kotenko, T. I., Carretero, M. A., Kuranova, V. N., Bulakhova, N. A., Zinenko, O. I., & Yakovlev, V. A. (2015). Geographic variation of life-history traits in the sand lizard, *Lacerta agilis*: testing Darwin's fecundity-advantage hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology*, 28, 613-629.



## The impacts of climate change on genetic diversity

Aynur DEMİR \*<sup>1</sup>

ORCID: 0000-0002-7856-2789

<sup>1</sup>Aksaray University, Department of Urbanisation and Environmental Problems, Aksaray, Turkey

### Abstract

In this research, the destruction caused by climate change on genetic diversity has been demonstrated with solid examples. The consequences of the destruction on the genetic levels are discussed with concrete examples. In the study, the data obtained from the results of 40 printed publications were evaluated by correlation analysis. With these data, the importance of genetic diversity, the effect of climate change on genetic diversity, the models used to determine the relationship between climate and genetic diversity, genetic losses and protection measures were evaluated. It is noteworthy that embedded methods, in which ecological models are integrated into climate models, have been used in determining the relationships between climate and genetic diversity, especially in recent years. It is firstly necessary to detect genetic losses, genetic shifts and variations, and to reveal their future projections. These projections play a decisive role in taking effective protection measures against climate change.

**Keywords:** climate change, genetic diversity, ecological nice models, climate models

----- \* -----

## İklim değişikliğinin genetik çeşitlilik üzerine etkisi

### Özet

Bu araştırmada iklim değişikliğinin genetik çeşitlilik üzerinde yarattığı tahribat somut örneklerle ortaya konmuş ve sonuçları somut örneklerle tartışılmıştır. Araştırmada 40 basılı yayının sonuçlarından elde edilen veriler korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Bu verilerle genetik çeşitliliğin önemi, iklim değişikliğinin genetik çeşitlilik üzerine etkisi, iklimle genetik çeşitlilik arasındaki ilişkileri belirlemede kullanılan modellemeler, genetik kayıplar ve koruma önlemleri değerlendirilmiştir. İklimle genetik çeşitlilik arasındaki ilişkileri belirlemede özellikle son yıllarda ekolojik modellerin iklim modellerine entegre edildiği bütünlük yöntemlerin kullanıldığı dikkat çekmektedir. Özellikle genetik kayıpların, genetik kaymaların ve varyasyonların saptanmasında ve gelecek projeksiyonlarının ortaya konması gerekmektedir. Bu projeksiyonlar iklim değişikliğine karşı etkin koruma önlemlerinin alınmasında önemli rol oynamaktadır.

**Anahtar kelimeler:** iklim değişikliği, genetik çeşitlilik, ekolojik niş modelleri, iklim modelleri

### 1. Introduction

In the 21st century, rapid changes in climate systems are putting increasing pressure on biodiversity systems. The biodiversity crisis, which has been experienced five times in the last 500 million years, caused the extinction of 76% of living species in that period as the major cause [1]. The impact of climate change on biodiversity are not limited to the extinction of species. Factors such as temperature increases, precipitation irregularities, increases in extreme climate events, and consequently the melting of glaciers and rising of sea levels affect biodiversity at all levels such as the genetic level to ecosystems and even biomes (large life zones such as tropical rainforests, savannas, and tundras) [2]. It causes biodiversity to be exposed to additional stresses.

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905437246300; Fax.: +905437246300; E-mail: aynurdemir@aksaray.edu.tr

According to the research conducted by [3], unless strategic measures are taken to reduce climate change, there will be wide-scale shrinkage in biodiversity. For example, 60% of plants and 35% of the animals will disappear. This is the most striking indicator that the process called the 6<sup>th</sup> extinction crisis can be experienced, [4] which is confirmed by the latest report of IPCC [5].

The impact of climate change on biodiversity occurs at various levels such as the effects on gene, species, ecosystem, and functional diversity (figure 1). Since each level is related to each other, damage on one level breaks the entire system. Genetic losses cause changes in gene pool and frequencies. It directly effects species diversity. The impact of climate change on species and populations appears in the form of loss of species, phenological changes, invasive species, adaptation and migration, and changes in geographical distribution. The balance between the ecosystem factors and different dominating species can be widely effected by climate change. For example, tree biota provides habitat for numerous fungi, and lichens, small and large animals, and also herbaceous plants. So, the loss of tree biota will effect all the populations that make up a forest ecosystem [6].

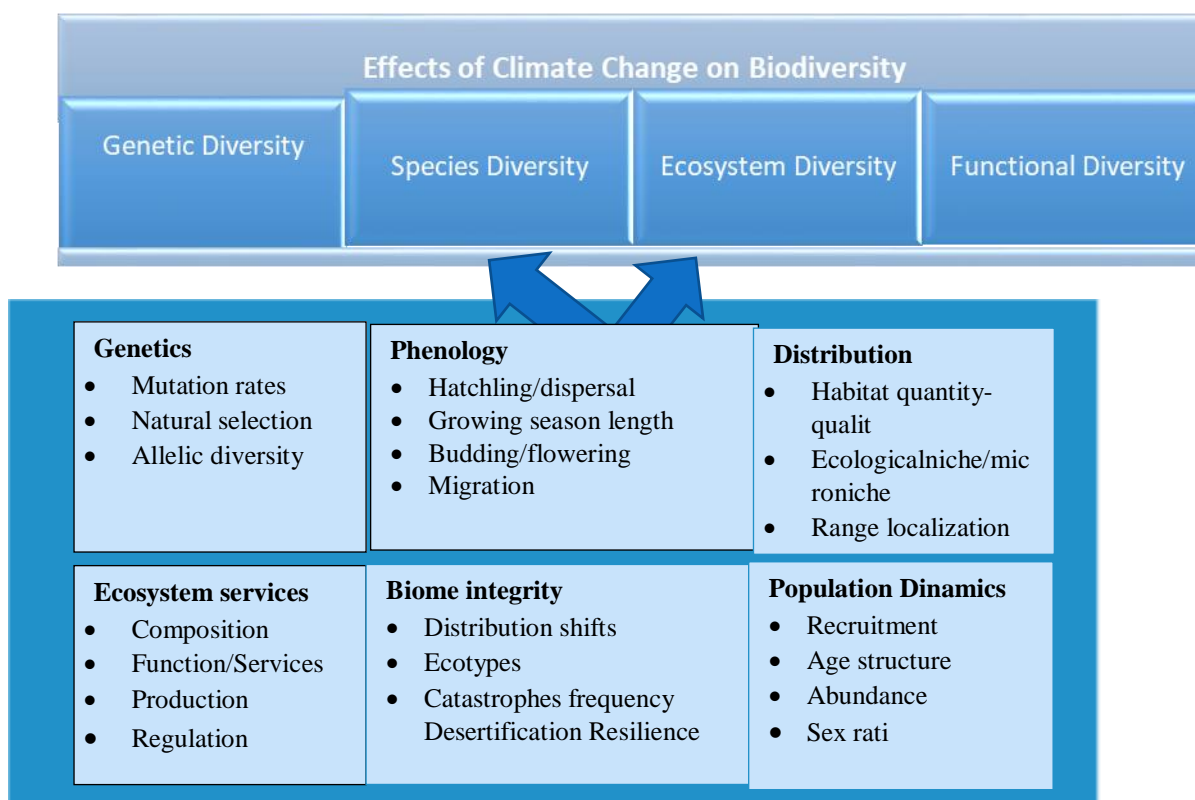


Figure 1. Impact of climate change on biodiversity levels

As it can be seen, there is a reciprocal relationship between the basic components of biological diversity. The loss of species or genetic makeup of populations negatively effects the productivity and sustainable use of ecosystems. At the same time, changes in ecosystems cause losses in species and genetic diversity. The magnitude of losses is great especially in case of endemic species and sensitive ecosystems.

Genetic diversity is the main source for evolution; however, few researches have evaluated the effects of climate change on gene diversity. Therefore, the research has focused on the effects of climate change on genetic diversity. The study sought answers to the following questions: Why should genetic diversity (intraspecies and interspecies) of climate change be investigated? How does climate change affect genetic diversity? How to investigate the impact of climate change on gene diversity? What needs to be done for the future? The answers to these questions are discussed using the concrete data in the literature. In addition, the importance of including genetic diversity when evaluating the effects of climate change was emphasized.

## 2. Materials and methods

Using the web of sciences in the research, 56 articles published between 2009-2021 were determined by using the key sentence of *the impacts of climate change on gene diversity*. 40 (n) studies were used in the study,



and 16 studies were eliminated because they did not match the keywords. The studies used were evaluated with a systematic internal consistency. In this assessment:

1. Distribution of the publications in which the keyword is used by year: It is used to reveal the importance of the subject.
2. Secondly, the effect of climate on genetic diversity was surveyed. Genetic losses and their consequences are discussed with concrete, species-based examples.
3. Third, the studies were examined methodologically. It was determined by the methods used to investigate the effects of climate change on genetic diversity.
4. In the fourth stage, what need to be done for the future was discussed in terms of the protection of gene resources.

Correlation analysis was used to determine the relationships between variables. Pearson correlation were calculated using IBM SPSS Statistics 20 software. The statistical significance was shown as  $**P < 0.01$  and  $*P < 0.05$  level (2-tailed).

### 3. Results

#### 3.1. The importance of genetic diversity and impacts of climate change on gene diversity

Out of 40 works investigating the importance of genetic diversity in this research, 7 are reviews and 33 are research articles (figure 2). In the majority of research articles mainly focused on the effect of climate change on species. Spatial shifts of species in the face of climate change, geographical distribution, adaptation processes, genetic variations and their effects on evolutionary processes are explained. Particularly, the importance of gene diversity in terms of evolution has been emphasized in studies. Genetic diversity is considered as the main ingredient of evolution, and it has been stressed that evolution provides a conservation area for genetic material.



Figure 2. Distribution of publications used in the research by year

Therefore, identifying populations and species that may be more fragile to climate change is important. But, so far, genetic diversity has been overlooked in assessing the effects of climate change. Whereas genetic diversity plays an important role in determining the capacity of populations and species to genetically adapt to climate change. The responses and adaptation capacities of living things to climate change are quite different.

In terms of biodiversity, the identification of future losses may be possible by detecting losses of genetic diversity in particular. In this context, the loss of biodiversity mainly depends on the magnitude of the loss in genetic diversity, which in turn depends on the amount of loss in genetic information [7]. Genetic diversity is the guarantee of the continuity of the species. Changing conditions outside the world of living things can cause significant changes in the functioning of genes, which in turn effects diversity. Mutation, gene flow, genetic drift, natural selection, preferential mating, and epigenetic changes lead to the emergence of genetic variety [8,9]. In the natural process, these differences cause the species to differ as well. However, changing climatic conditions can effect these mechanisms and cause unnatural changes in the functioning of genes. It negatively effects genetic diversity and the gene pool. As a result, the loss of gene brings along the loss of species. However, the effect at the genetic level depends on whether the species can adapt to changing climatic conditions. Living things adapt to changing conditions genetically through mutation. However, if the change is rapid, genetic adaptation becomes difficult [2,10]. It may lead to evolutionary adaptations in the species. As seen in the results of the research, it is noteworthy that the studies conducted in recent years have focused on genetic adaptations (fig 3). In this context, Genetic diversity is also effective in the evolutionary process of

species. The richness of intraspecies genetic diversity increases the resistance of species to climate change. But, low genetic richness reduces evolutionary resistance in the species [8,9].

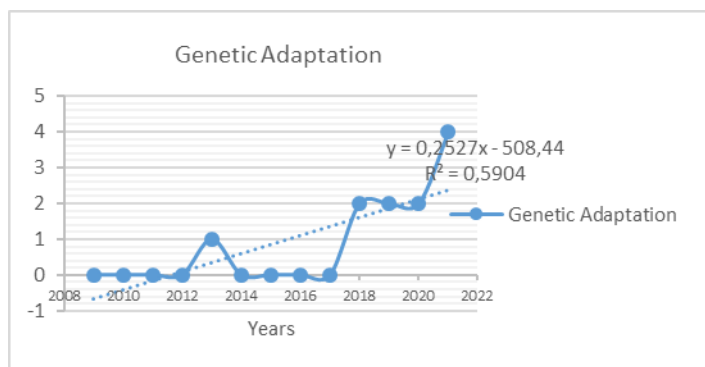


Figure 3. Publications on the impact of climate change on the genetic adaptation of species

The results of the analysis showed that genetic diversity is seriously affected by climate change. Especially in studies conducted at the species and population level, it has been determined that intraspecific variations lead to genetic variations and increase intraspecies homogeneity [10, 11]. This leads to losses in gene diversity and gene pool and reduces resistance to climate change. This has been clearly demonstrated in the studies that are the subject of this research.

Research reveals a lot of evidence that species have undergone evolutionary adaptations to climate change. This evidences are evident in research based on species diversity. The research on the impacts of climate change on species has been increasing, especially since 2016 (fig 4). This allows to determine the genetic relationship with the climate, and the genetic response of the species can be evaluated. For example, *In the UK, the daphnia (Daphnia magna) has evolved to cope with higher thermality* [12]. Between the 1960s and 2000s, and cornflower (*Centaurea cyanus*) traits have changed in response to warmer springs across northern France [13]. Another example is anadromous Pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). In this species, it was determined that evolutionarily early migration took place and there was a decrease in the incidence of a marker encoding late migration [12]. Time-series data provides important insights into genetic responses to climate change. For example, Genotypic values for critical day length in the pitcher plant mosquitos (*Wyeomyia smithii*) were correlated with latitude. It was determined that the latitude relationship changed in the period from 1972 to 1996 [12]. Oceanic phytoplankton in the Gulf of Cariaco, Venezuela have been monitored for 15 years. In response to a temperature increase of +0.73 °C, phytoplactons adapted by adjusting their thermal niches to +0.45°C. [15]. Similarly, adaptation is possible in some reef corals [16]. These distribution shifts in population ranges create new "hybrid regions" at the global level. For example, hybrid zones between black-capped (*Poecile atricapillus*) and Carolina warbler (*P. carolinensis*) are changing in response to increases in winter temperatures in North America [17]. The southern flying squirrel (*Glaucomys volans*) has extended its range northward in Northeast America, and this species has interbred with the northern flying squirrel (*G. sabrinus*) to form a hybrid zone [18].

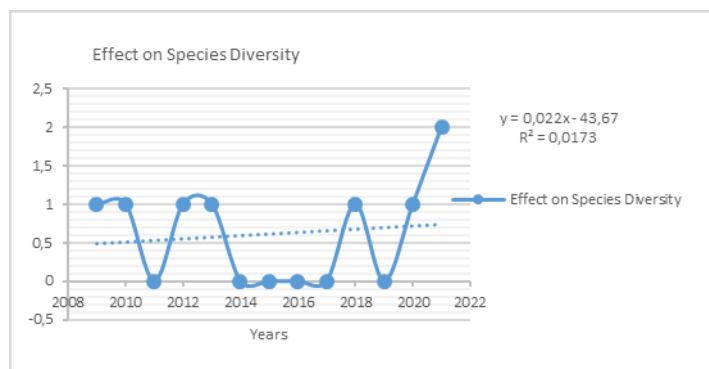


Figure 4. Publications on the impact of climate change on species diversity

Relatively few research have investigated the potential effects of climate on the spatial structure of genetic diversity and how population ranges change (fig. 5a). Similarly, in few studies have included intra-species relationships (fig. 5b). However, there has been a significant increase in these studies in recent years. This is an indication that intraspecific relationships are affected by genetic diversity. Some case studies support this situation.

The deep of genetic divergences in intraspecies lineages that widely distributed is remarkable. In this case, intraspecific relationship acted as a buffer against changes in the geographical structure [10]. In species with a strong

phytogeographic cluster of gene diversity, the effects of climate change can be fairly different. The best example is seen in the study of New Zealand forest beetles (*Agyrtodes labralis* (Leiodidae), *Brachynopus scutellaris* (Staphylinidae) and *Epistranus lawsoni* (Zopheridae)) [6]. In the study, it was determined that *Agyrtodes labralis* will lose 50% of its haplotypes by 2100 and its population distribution and current distribution areas will decrease. In *Brachynopus scutellaris* and *Epistranus lawsoni* species, little change in genetic diversity is expected. However, there will be expansion in climatically suitable areas. It is also expected that *Brachynopus scutellaris* populations will show phylogenetically more clustering by 2100 [6]. In the study on the South American treefrog *Scinax squalirostris* Lutz, it was determined that climate change will increase the geographical distribution range of the species and lead to homogenization [9]. This will also increase the genetic loss (5b). Another study explored effects of climate change on the phytogeographic distribution of European beech trees. In the species area models, it is estimated that the distribution of beech trees will expand towards the north and habitat loss will occur in the south. The effect of this change on genetic diversity is low [19, 20]. The use of climate models and geographic information systems in determining the geographical distribution of species has resulted in increased interest in this area (5b).

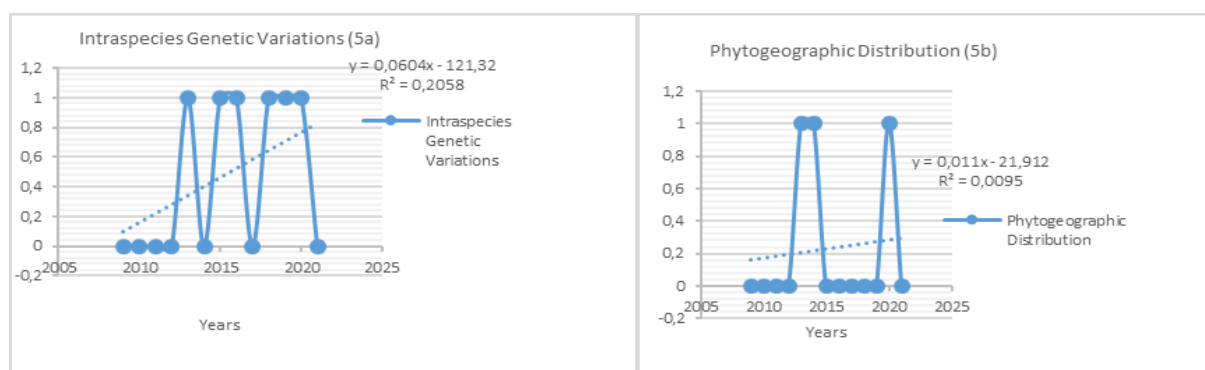


Figure 5a and 5b. Studies on intraspecies genetic variations and phytogeographic distribution

Climate change can also cause changes in gene flows. For example, chestnut crows (*Garrulus glandarius*) can cause gene flow between oaks and other tree populations. New individuals which join a population through migration may cause the gene frequency of the population to change. If gene flows that initially cause diversity continues long enough, they may reduce the differences between populations and cause neighbouring populations to form one population with the same genetic structure [21]. This is not a desired situation. Because this event causes a decrease in heroziot gene richness among populations. This leads to a decrease in adaptability and an increase in fragility and vulnerability in the population. It results in decreased biological richness and increased species and population losses.

Another threat to genetic diversity is invasive species. With the impact of climate change, it is inevitable that the number of invasive alien species will continue to increase, leading to the elimination of native species, which threatens especially rare and endemic species. This affects local species more rapidly, especially populations and gene flows of endemic and rare species. Because rare and endemic species are vulnerable and fragile to the impacts of climate change. It is very difficult for these species to show genetic adaptation to changing climatic conditions. The most striking example of this is seen in the Mediterranean.

In the researches, it was revealed that the water temperature in the Mediterranean increased up to 32 °C with climate change, and therefore, the fish of the Red Sea spread to the Mediterranean water and created new ecosystems [22]. The tropicalization process has started with the increase in temperature, especially in the Eastern Mediterranean. Approximately 1000 invasive species have migrated to the Mediterranean so far. In some areas in the Mediterranean, stingrays have caused up to 40% reduction in the number of native species [23]. This situation poses a great threat especially to local gene resources and diversity.

### 3.2. Models used to investigate the impact of climate change on genetic diversity

Various modeling approaches are used to determine the relationships between genetic diversity and climate. Especially, ecological niche and species models have been combined with climate scenarios in recent years. In this way, current and future losses in genetic diversity, changes in geographical distribution and their effects on genetic diversity and variations are estimated (fig. 6). The results indicate that there is a positive linear relationship between modeling methods over time. It is also clear that there has been an increase in interest in this commune, especially in recent years. In studies using these modules, genetic losses due to climate change in the future, field shifts, have been revealed and mapped. These estimates play an important role in the concrete perception of genetic losses.

In recent years, It has been understood that climate is a significant abiotic factor that shapes genetic diversity within the species. Especially the models revealing habitat fragmentation, increasing range fragmentation and pieces distribution shifts a support this situation. However, while the number of researches investigating the effect of climate change on the gene diversity of species has increased, most of them have focused on a single plant or animal species at

the geographical scale [24]. Ecological niche models are widely used to predict changes in the eco-geographical distribution of species due to climate change. This model uses the current distribution data of populations and species. It integrates these data into climate scenarios and predicts possible new eco-geographies for the future. In this way, the effect of spatial dynamics and changes on possible species distribution in the future is understood. In these projections, it is assumed that the species protect their current ecological niche and will be able to follow suitable climatic conditions in future [9,25].

In some studies, ecological niche models and population genetic approaches have been considered together. Thus, possible changes in genetic diversity can be projected into the future by using plastid and nuclear DNA. This provides information on whether species will generally lose their habitat range in the future. However, it is known that genetic homogeneity in the gene pool will become more pronounced in the future [25, 26]. Another model used is the species distribution model. This model focuses on species dynamics against the impact of climate change, especially in vulnerable populations [20].

Climate models are made for the years 2030, 2050, 2070 and 2100. Geographic information systems are generally used in these models based on scenario approach. With putative scenarios, maps are drawn about how species and genetic structures will follow in the future. For example, genomic and ecological modelling approaches have been used to describe climate-related genetic adaptations in two cryptic forest bats [10]. The data obtained were also used to predict the range changes directly resulted by future climate change. Population persistence was also assessed through the spread of climate-adapted genetic variation.

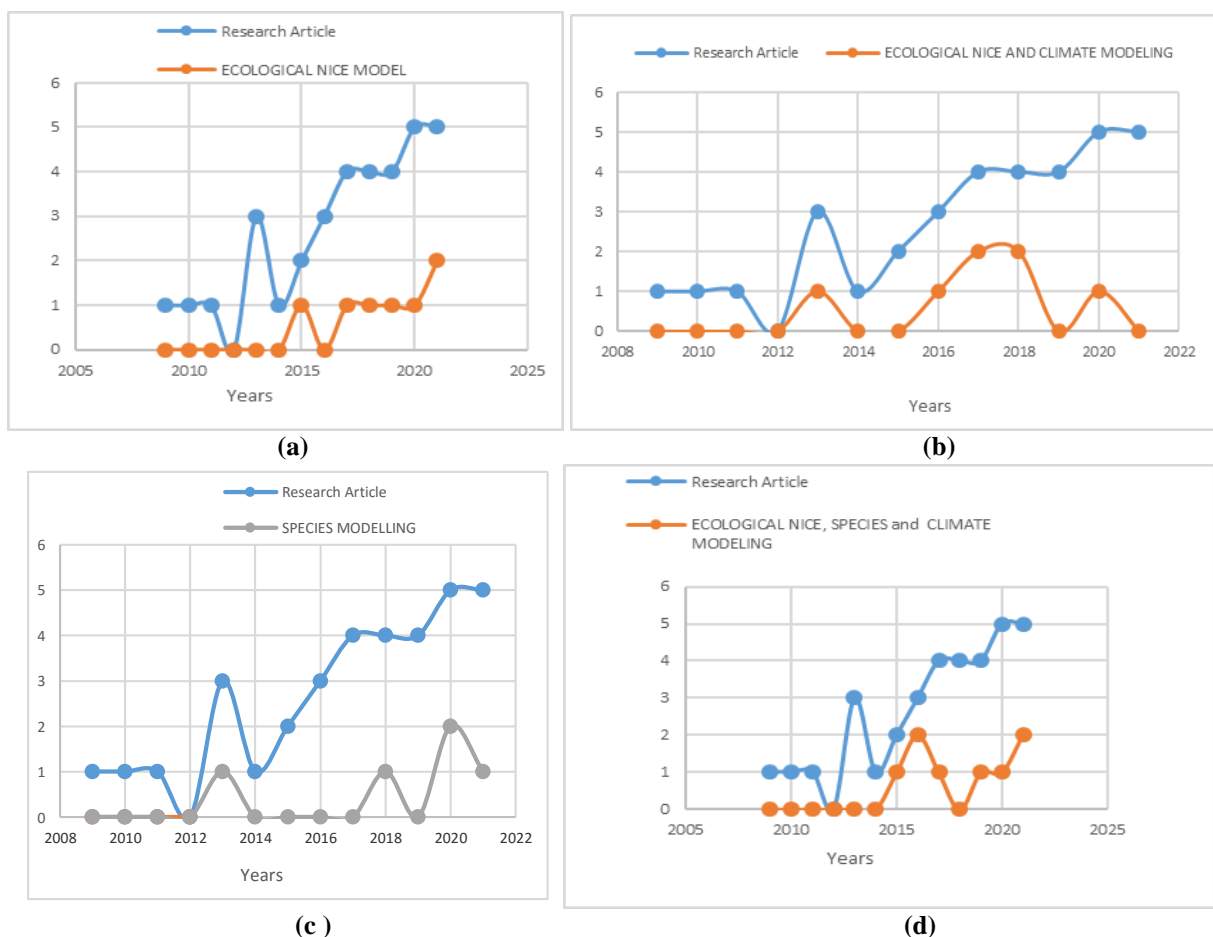


Figure 6. Distribution of models used to determine the relationships between genetic diversity and climate; (a) Ecological models, (b) Ecological and Climate models, (c) Species models, (d) Ecological, Species and Climate models

Gene diversity is significance for species to respond to climate change. Discovering relationships between gene diversity and factors of climatic might help estimate how climate change will shape the gene diversity of species in the future [22]. This allows us to understand how species will cope with changing climatic factors and to preserve the genetic diversity of species in the future.

### 3.4. Evaluation of studies on the conservation of genetic diversity

Gene diversity is critical for species to evolve and adapt to new conditions, as well as for ecosystem recovery and populations responses to environmental changes. Therefore, understanding the effects of climate change on genetic diversity is of great importance for species protection, especially rare and endangered species conservation and recovery [24]. In research results, studies on the conservation of genetic diversity have increased especially after 2016. This situation shows that there is a positive correlation between recent years and studies that include measures for the protection of genetic diversity and reveal its importance (Figure 7). At the same time, these studies reveal that genetic losses should not be neglected in climate change studies.

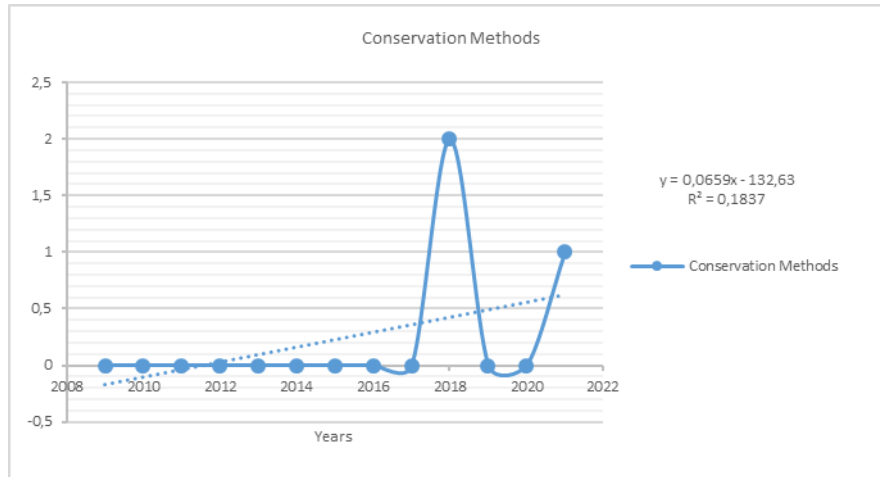


Figure 7. Correlation curve for conservation of genetic diversity

Climate models have shown that future space changes will be limited by interspecies competition. However, this depends on the adaptive capacity of the population. This is associated with genetic variations [22]. Resources show that native adaptations are neglected in the estimates of species fragility and extinction risks. However, incorporating local adaptations into modelling estimates reduces habitat losses [10]. It also increases the effectiveness of protection measures. Taking insuti and exsuti protection measures against field change, creating protected areas and adopting process-based models are significant in the protection of genetic diversity. Considering the fragility of local, rare and endemic genetic resources, the importance of this issue increases even more.

#### 4. Conclusions and discussion

As a result, revealing the relationships between climate and genetic diversity is important in the conservation and transfer of genetic diversity to the future. Thus, using ecological models together with climate models will more clearly explain the effect of climate on genetic diversity. Climate analysis and mapping of all global species and populations will enable conservation measures to be developed and managed. Losses in genetic diversity levels at local, regional, national, and global levels should be mapped, integrated with bioclimatic models and a global database should be created. To prioritize populations and species for conservation, it is critical to generate reliable predictions about the adaptive portrait. Taking green protection measures based on innovation technologies will play an important role in reducing the impact of climate change on living things. Especially for endemic and rare species, "integrated approaches based on ecology" should be developed at the global level.

#### References

- [1] Alsos, G.J., Ehrich, D., Thuiller, W., Eidesen, B.P., Tribsch, A., Scho'nswetter, P., Lagaye, C., Taberlet, P., & Brochmann, C. (2012). Genetic consequences of climate change for northern plants. *Proceedings of the Royal Society B*, 279, 2042–2051 doi:10.1098/rspb.2011.2363
- [2] Tolunay, D. (2019). İklim Değişikliğinin Ekolojik Sistemlerdeki Yeri. *İklim Değişikliği Eğitim Modülleri Serisi 5*, Ankara.
- [3] Warren, R., & Warren, R.J. (2013). Unauthorized Immigration to the United States: Annual Estimates and Components of Change, by State, 1990 to 2010. *International Migration Review*, 47, 296–329. <http://dx.doi.org/10.1111/imre.12022>
- [4] Ramirez-Villegas, J., Cuesta, F., Devenish, C., Peralvo, M., Jarvis, A., & Arnilla, A.C. (2014). Using species distributions models for designing conservation strategies of Tropical Andean biodiversity under climate change. *Journal for Nature Conservation*, 22, 391-404.

- [5] IPCC (2021). IPCC report: ‘Code red’ for human driven global heating, warns UN chief. Access date 18.11.2021 <https://news.un.org/en/story/2021/08/1097362>
- [6] Pärli, R., Lieberherr, E., Holderegger, R., Gugerli, F., Widmer, A., Fischer, C.M. (2021). Developing a monitoring program of genetic diversity: what do stakeholders say? *Conservation Genetics*, 22, 673–68
- [7] Demir, A. (2009). Küresel iklim değişiminin biyolojik çeşitlilik ve ekosistem kaynakları üzerine etkisi. *Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi*, 1(2), 37-54
- [8] Rizvanovic, M., Kennedy, D.J., Nogués-Bravo, D., & Marske, A.K. (2019). Persistence of genetic diversity and phylogeographic structure of three New Zealand Forest beetles under climate change. *Diversity and Distributions*, 25, 142–153. DOI: 10.1111/ddi.12834
- [9] Abreu-Jardim, F.P.T., Jardim, L., Ballesteros-Mejia, L., Maciel, M.N., & Collevatti, G.R. (2021). Predicting impacts of global climatic change on genetic and phylogeographical diversity of a Neotropical treefrog. *Diversity and Distributions*, 27, 1519–1535
- [10] Razgoura, O., Forester, B., Taggart, B.T., Bekaert, M., Juste, J., Ibáñez, C., Puechmaillef, J.S, Novella-Fernandez, R., Alberdi, A., & Manelj, S. (2019). Considering adaptive genetic variation in climate change vulnerability assessment reduces species range loss projections. *PNAS*, 116 (21), 10418–10423
- [11] Scheffers, R.B., De Meester, L., C. L. Bridge, L.C.T., Hoffmann, A.A., Pandolfi, M.J., Corlett, T.R., Butchart, M.H.S., Pearce-Kelly, P., Kovacs, M.K., Dudgeon, D., Pacifici, M., Rondinini, C., Foden, B.W., Martin, G.T., Mora, C., Bickford, D., & Watson, M.E.J. (2016). The broad footprint of climate change from genes to biomes to people. *Science*, 354, 767. DOI: 10.1126/science.aaf7671
- [12] De Meester, L., Stoks, R., & Brans, I.K. (2018). Genetic adaptation as a biological buffer against climate change: Potential and limitations. *Integrative Zoology*, 13, 372–39
- [13] Thomann, M., Imbert, E., Engstrand, C.R., & Cheptou O.P. (2015). Contemporary evolution of plant reproductive strategies under global change is revealed by stored seeds. *Journal of Evolutionary Biology*, 28, 766–778. doi: 10.1111/jeb.12603
- [14] Kovach, R.P., Gharrett, A.J., & Tallmon, D.A. (2012). Genetic change for earlier migration timing in a pink salmon population. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279, 3870–3878. doi: 10.1098/rspb.2012.1158; pmid: 22787027
- [15] Irwin, J.A., Finkel, V.Z., Müller-Karger, E.F., & Troccoli Ghinaglia, L. (2015). Phytoplankton adapt to changing ocean environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 5762–5766. doi: 10.1073/pnas.1414752112; pmid: 25902497
- [16] Palumbi, S.R., Barshis, J.D., Traylor-Knowles, N., & Bay, A.R. (2014). Mechanisms of reef coral resistance to future climate change. *Science*, 344, 895–898
- [17] Taylor, A.S., White, A.T., Hochachka, H.M., Ferretti, V., Curry, L.R., & Lovette, I. (2014). Climate-mediated movement of an avian hybrid zone. *Current Biology*, 24, 671–676. doi: 10.1016/j.cub.2014.01.06
- [18] Garroway, J.C., Bowman, J., Cascaden, J.T., Holloway, L.G., Mahan, G.C., Malcolm, R.J., Msteele, A.M., Turner, G., & Wilson, J.P. (2010). Climate change induced hybridization in flying squirrels. *Global Change Biology*, 16, 113–121. doi: 10.1111/j.1365-2486.2009.01948.x
- [19] Kramer, K., Degen, B., Buschbom, J., Hickler, T., Thuiller, W., Sykes, T.M., & de Winter, W. (2010). Modelling exploration of the future of European beech (*Fagus sylvatica* L.) under climate change—Range, abundance, genetic diversity and adaptive response. *Forest Ecology and Management*, 259, 2213–2222
- [20] Diniz-Filho, F.A.J., Barbosa, F.O.C.A., Chaves, J.L., Souza, S.K., Dobrovolski, R., Rattis, L., Terribile, C.L., Lima-Ribeiro, S.M., de Oliveira, G., Brum, T.F., Loyola, R., & Telles, C.P.M. (2020). Overcoming the worst of both worlds: integrating climate change and habitat loss into spatial conservation planning of genetic diversity in the Brazilian Cerrado. *Biodiversity and Conservation*, 29, 1555–1570
- [21] Doğan, S., Özçelik, S., Dolu, Ö., & Erman, O. (2010). Global warming and biodiversity. *İklim Değişikliği ve Çevre*, 3
- [22] Sękiewicz, K., Walas, L., Beridze, B., Fennane, M., & Dering, M. (2020). High genetic diversity and low future habitat suitability: will *Cupressus atlantica*, endemic to the High Atlas, survive under climate change? *Regional Environmental Change*, 20(132), 2-19
- [23] WWF (2021). İklim Değişikliğinin Akdeniz’deki Etkileri; Aşırı ısınan bir denizden altı hikaye. WWF 2021 raporu. Access date: 01.09.2021. [https://wwftr.awsassets.panda.org/downloads/iklim\\_deiiklii\\_nin\\_akdeniz\\_deki\\_etikileweb.pdf](https://wwftr.awsassets.panda.org/downloads/iklim_deiiklii_nin_akdeniz_deki_etikileweb.pdf)
- [24] Jingfang, T., Jizhong, W., Fangli, L., & Feiha, Y. (2018). Relationships between Genetic Diversity of Vascular Plant Species and Climate Factors. *Journal of Resources and Ecology*, 9(6), 663-672. DOI: 10.5814/j.issn.1674-764x
- [25] Wróblewska, A., & Mirski, P. (2018). From past to future: impact of climate change on range shifts and genetic diversity patterns of circumboreal plants. *Regional Environmental Change*, 18, 409–424. DOI 10.1007/s10113-017-1208-3
- [26] Raza, A., Razaq, A., Mehmood, S.S., Zou, X., Zhang, X., Lv, Y., & Xu, J. (2019). Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review. *Plants*, 8, 34. doi:10.3390/plants8020034

Contents / İçindekiler

Yayın/Page No.-Sıra/Order No.

01. 350 Determination of trophic status of aquatic systems of Ballıkaya nature park (Kocaeli, Turkey)
02. 359 A new record from the mediterranean temporary wetland habitats, for Flora of Turkey: *Crassula vaillantii*
03. 365 Morphological, anatomical, palynological, and micromorphological study on *Diplotaxis tenuifolia* (Brassicaceae)
04. 372 Essential oils compositions and local names of some medicinal and aromatic plants from Lamiaceae family sold in local bazaars of Edremit-Akçay (Balıkesir-Turkey)
05. 380 The existence of *Anoplotrupes stercorosus* (Scriba, 1791) (Coleoptera: Geotrupidae) for Turkey is validated from Gölcük Natural Park in Isparta Province
06. 385 Determination of the foraging plants of *Bombus terrestris* (L.1758) (Hymenoptera: Apidae) through the pollen grains found in their nest materials
07. 390 Endemic *Verbascum detersile* Boiss. & Heldr.'s (Scrophulariaceae) Anatomical Features
08. 39. A survey of heavy metal pollution in Ayvalık Saltern (Balıkesir-Turkey)
09. 405 Leaf anatomy of *Quercus macranthera* subsp. *sypirensis* (K.Koch) Menitsky
10. 411 Comparative morphology and morphometric analysis of some Histeridae (Insecta: Coleoptera) species
11. 418 Investigation of *Erodium hoefftianum* (Geraniaceae) production by tissue culture methods
12. 427 Investigation of industrially important enzyme activities of thermophilic and thermotolerant filamentous fungi
13. 431 Phylogenetic analysis for endemic *Fritillaria baskilensis* Behçet (Liliaceae): Evidence from cpDNA “*trn*” sequences
14. 442 Biosystematic studies on some *Fumana* taxa which naturally distributed in Eskişehir/ Türkiye
15. 456 Contributions to the Cercopidae Leach, 1815 (Hemiptera: Auchenorrhyncha) fauna of the Bolkar Mountains
16. 464 The effect of phosphorus doses on cotton growth under full and deficit irrigation conditions
17. 470 Assessment the *Promachus leoninus* Loew 1848 (Diptera: Asilidae) Species, with COI and NADH<sub>2</sub> Gene Regions, with New Locality Records in Anatolia
18. 480 Investigation of cool climate cereals yield and some technological features
19. 487 Determination of lipase activities of actinomycetes isolates from soil
20. 493 Two henbane as alkaloid sources: *Hyoscyamus niger* L. & *Hyoscyamus reticulatus* L.
21. 497 Evaluation of the Potential Anti-inflammatory Effects of Endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) venom on Mammalian Cell Lines
22. 505 Body size and age structure of *Lacerta agilis* LINNAEUS, 1758 (Reptilia: Lacertidae) from two different populations in Turkey
23. 511 The impacts of climate change on genetic diversity

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

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

Web of Science-Clarivate Analytics, Zoological Records Indexed

Bu dergi CrossRef (DOI;10.46309/biodicon) üyesidir. (This journal is a CrossRef member (DOI;10.46309/biodicon))

“Biological Diversity and Conservation” has been added to the journal list of the Medical Reads (RRS) program together with the “Biology and Medical Journals”.

Dergide yayımlanan makalelere” [http:// www.biodicon.com](http://www.biodicon.com)” adresinden ulaşabilir.

This journal is available online at [http:// www.biodicon.com](http://www.biodicon.com)

© 2021 Tüm hakları saklıdır/All rights reserved

ISSN 1308-5301 Print / ISSN 1308-8084 Online



## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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

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

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

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

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

### **Authorship Contribution Form**

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

### **Policy of Screening for Plagiarism**

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

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

### **ICMJE Conflict of Interest form**

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

### **Appeals and Complaint**

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

### **Copyright**

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

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

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

### **PREPARATION OF MANUSCRIPT**

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

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



### Authors are required to submit the following

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

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

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

A separate title page should be submitted for all submissions and this page should include:

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

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

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

## MANUSCRIPT TYPES

### Original Research

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

**Title:** Must be provided both in English and Turkish.

**Abstract:** It should not include subheadings and should be limited to 350 words

**Keywords:** This section should contain at least three and at most six items and should be provided just below the abstract.

**Main Text:** The text should start with the Introduction, and be divided into appropriate sections. Sections must be numbered consecutively. Section headings must be written minisculely flush left and bold with their numbers (as, 1. Introduction, 2. Material and method, 3. Results, 4. Conclusions and discussion). Subsections must be numbered as "1.1", "1.2", etc., using the section number and must be written minisculely flush left. All acronyms and abbreviations used in the manuscript should be defined at first use, both in the abstract and in the main text. In the final section there must be Acknowledgements (if any) , References and Appendices (if any). Please check Table 1 for the limitations. It should include Introduction, other subheadings and Conclusion sections and should be limited to 5000 words except for the references.

**References:** The reference list should be placed just below the main text and the number of references should not exceed 50.

**Tables, Figures and Images:** The appearance of Tables, Figures and Images should be provided in the text. The visuals should be original or the written permission obtained from the copyright holder should be sent to the Editor-in-Chief's Office.

### Review

Reviews prepared by the authors who have a broad knowledge in a specific area and represented in the international literature by a high number of publications and citations, are evaluated.

**Title:** Must be provided both in English and Turkish.

**Abstract:** Abstract shouldn't include subheadings and should be limited to 350 words.

**Key words:** This section should include at least three and at most six items and should be provided just below the abstract.

**Main Text:** It should include Introduction, other subheadings and Conclusion sections and should be limited to 5000 words excluding the references.

**References:** The reference list should be placed below the main text and the number of references should not exceed 55.

**Tables, Figures and Images:** Tables, Figures and Images: The appearance of Tables, Figures and Images should be provided in the text. The visuals should be original or the written permission obtained from the copyright holder should be sent to the Editor-in-Chief's Office. Please check Table 1 for the limitations.

### Research note, Case Reports, Case Series and Literature Review

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

### Letters to the Editor

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

Table 1. Limitations for each manuscript type

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

### Tables

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

### Figures, Graphics and Photographs

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

### References

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

#### Reference form

#### Reference form

#### No author

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

#### Journal article with DOI

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

#### Journal article with DOI

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

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

#### Journal article published in a supplement

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

#### Books

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

#### eBook

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

#### Chapter in an edited print book

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

#### Conference paper

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



### Hakem Değerlendirme Formu / Reviewer Evaluation Form

Makale adı / Article Title:

Makale No / Article No:

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

1. Makale orijinal mi? / Is the article original?
  - Evet / Yes
  - Hayır / No
2. Problem uygun şekilde belirlenmiş mi? / Is the problem properly stated?
  - Evet / Yes
  - Hayır / No
3. Problem uygun şekilde ele alınmış mı veya çözülmüş mü? / Is the problem adequately treated or solved?
  - Evet / Yes
  - Değişiklikler veya ekler gerekli / Changes or elaborations required
  - Hayır / No
4. Belgeleme / Documentation:
  - Tablolar / Tables:
    - İyi / Good
    - Zor anlaşılır (Tablo no: ) / Unclear (Table no: )
    - Gereksiz (Tablo no: ) / Unnecessary (Table no: )
    - Doğru değil (Tablo no: ) / Incorrect (Table no: )
  - Grafikler / Graphs:
    - İyi / Good
    - Zor anlaşılır (Şekil no: ) / Unclear (Figure no: )
    - Gereksiz (Şekil no: ) / Unnecessary (Figure no: )
    - Doğru değil (Şekil no: ) / Incorrect (Figure no: )
  - Diğer çizimler / Other illustrations:
    - İyi / Good
    - Değişiklik gerekli (Şekil no: ) / Change needed (Figure no: )
    - Gereksiz (Şekil no: ) / Unnecessary (Figure no: )
    - Düşük kalitede (Şekil no: ) / Poor quality (Figure no: )
  - İstatistikler / Statistics:
    - Uygun / Suitable
    - Uygun değil / Unsuitable
5. Sonuçların yorumu / Interpretation of results:
  - Doğru veya uygun / Correct or appropriate
  - Düzeltilmeli / Should be amended
  - Bulunamadı / Not found
6. Literatür alıntısı / Literature cited:
  - Uygun / Appropriate
  - Çok geniş / Too broad
  - Tam değil / Incomplete
7. Dil ve üslup / Language and style:
  - İyi yazılmış / Well written
  - Daha kısa ve öz olmalı / Should be made more concise
  - Tekrar yazılmalı veya düzenlenmeli / Should be rewritten or edited
8. Makale başlığı / Article title:
  - Uygun / Appropriate
  - Çok uzun / Too long
  - Çok genel / Too general

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

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

Hakemin adı / **Name of reviewer**:

Adres / **Address**:

Tel / Fax no:

e-mail:

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

**Telif Hakkı Devir Formu/ *The Copyright Agreement Form***Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma/*Biological Diversity and Conservation*

ISSN 1308-5301 Print; ISSN 1308-8084 Online

Prof. Dr. Ersin YÜCEL, P.K. 86, İki Eylül PTT Merkez, 26000 Eskişehir / Türkiye

Derginin Adı / *Journal Title*: Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma/*Biological Diversity and Conservation*Makalenin Adı / *Manuscript title*: .....

.....

.....

Yazarların Adı / *Full Names of All Authers*: .....

.....

.....

Yazışmaların Yapılacağı Yazarın Adı ve Adresi / *Name, Adres Of Corresponding Author*: .....

.....

.....

TC Kimlik No. / *ID Number*: ..... e-posta: .....**Yazar(lar) / The Author(s) warrant(s) that:**

Sunulan makalenin orijinal olduğunu; makalenin başka bir yerde basılmadığını veya basılmak için sunulmadığını; diğer şahıslara ait telif haklarını ihlal etmediğini taahüt eder. /

*The manuscript submitted is his own orijinale work; the manuscript has not been published and is not being submitted or considered for publication elsewhere; the manuscript do not infringere upon any existing copyright.*“Telif Hakkı Devir Formu” tüm yazarlarca imzalanmalıdır. / *This copyright form must be signed by all authors.*TC Kimlik No. / *ID Number*:.....Adı Soyadı / *Full name*:.....Tarih / *Date*: ..... İmza / *Signature*.....TC Kimlik No. / *ID Number*:.....Adı Soyadı / *Full name*:.....Tarih / *Date*: ..... İmza / *Signature*.....TC Kimlik No. / *ID Number*:.....Adı Soyadı / *Full name*:.....Tarih / *Date*: ..... İmza / *Signature*.....TC Kimlik No. / *ID Number*:.....Adı Soyadı / *Full name*:.....Tarih / *Date*: ..... İmza / *Signature*.....TC Kimlik No. / *ID Number*:.....Adı Soyadı / *Full name*:.....Tarih / *Date*: ..... İmza / *Signature*.....TC Kimlik No. / *ID Number*:.....Adı Soyadı / *Full name*:.....Tarih / *Date*: ..... İmza / *Signature*.....TC Kimlik No. / *ID Number*:.....Adı Soyadı / *Full name*:.....Tarih / *Date*: ..... İmza / *Signature*.....**Address:**

Prof. Dr. Ersin YÜCEL

İki Eylül PTT Merkez, P.K. 86; 26000 Eskişehir / Turkey

Phone: +90364189988; E-mail: [biodicon@gmail.com](mailto:biodicon@gmail.com)



www.biodicon.com

ISSN: 1308-8084 Online

*Biological Diversity and Conservation*

Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma

ISSN: 1308-5301 Print

**ABONE FORMU / SUBSCRIPTION FORM**

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

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

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

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

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

Abone olmak istiyorum / I would like to have an annual subscription;

..... ( ) 2020.....( ) 20

Dergi aboneliğiniz ile ilgili ücreti

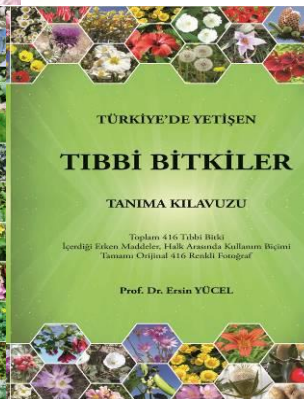
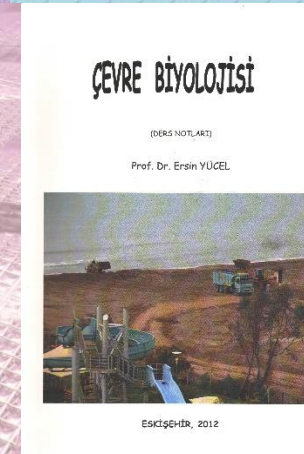
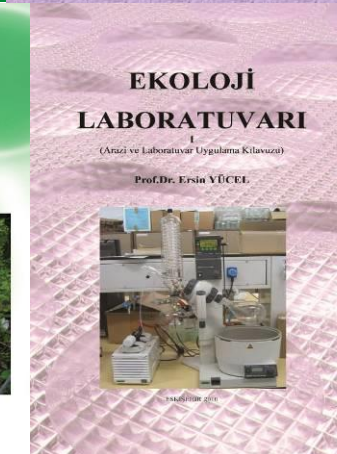
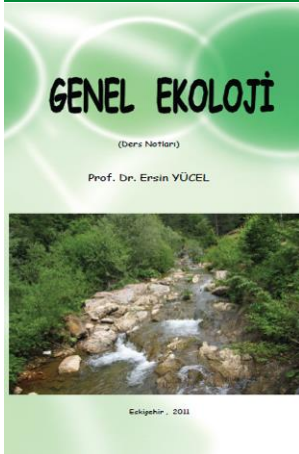
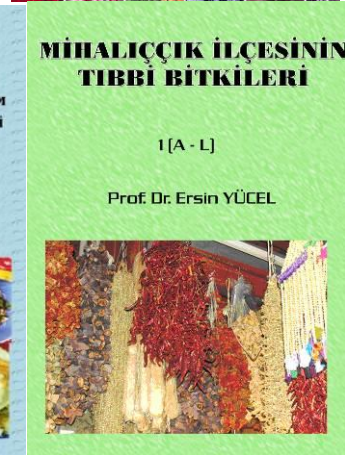
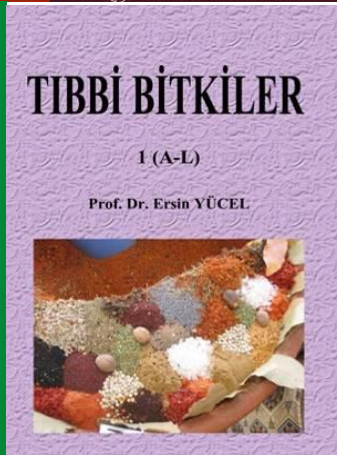
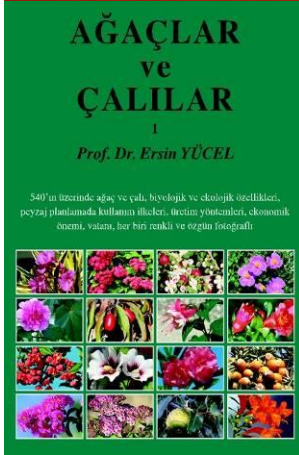
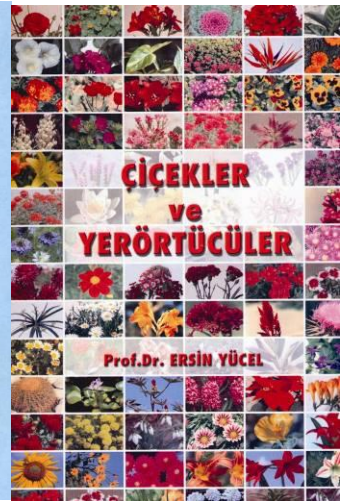
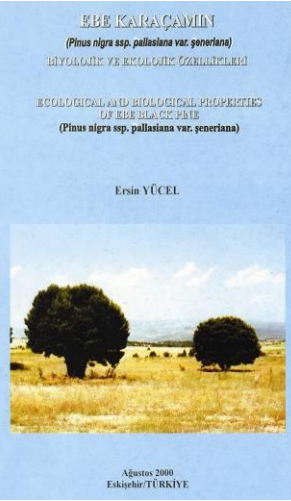
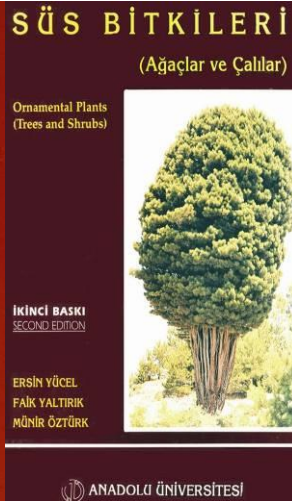
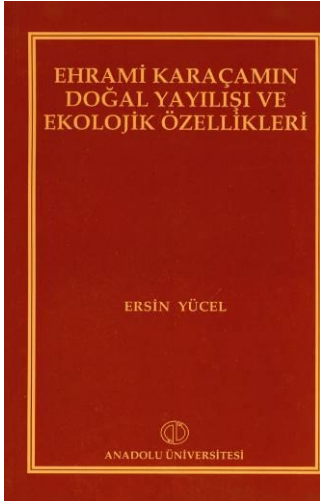
“**AKBANK, Ersin Yücel, IBAN: TR24 0004 6011 0088 8000 0256 06**” numaralı hesaba yatırdıktan sonra bu formu “**biodicon@gmail.com**” adresine ulaştırınız. Dergi adresinize posta ile adresinize gönderilecektir.

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

Tarih / Date: ...../...../20

İmza / Signature:

(Abone formunu Word belgesi olarak gönderiniz/Please send subscription form as a Word document)



İletişim Adresi: [ebitki@gmail.com](mailto:ebitki@gmail.com)  
<http://www.bitkilerim.com>